



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Participación del gen *escargot* en la respuesta gustativa de  
larvas *Drosophila melanogaster***

**TRABAJO DE DESARROLLO PROFESIONAL POR ETAPAS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**B I Ó L O G O**  
P R E S E N T A:  
**JESSICA MAGALI MONTOYA MARTÍNEZ**

**DRA. VERÓNICA MERCEDES NARVÁEZ PADILLA**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**SEPTIEMBRE, 2020**

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Dra. Verónica por permitirme participar en su proyecto y recibirme en su laboratorio, al Dr. Agustín Reyes por brindarme su ayuda cuando lo requería.

Agradezco también al Doctor Enrique Reynaud por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme estar cuando fue necesario, a Iván Sánchez por enseñarme las técnicas necesarias que se utilizaron en el proyecto. A Diego Zambrano por brindarme su ayuda amablemente cuando más lo necesité.

Y por último pero no menos importantes a todas mis sinodales: la Dra. Rosa Estela Quiroz Castañeda, la profesora María Luisa Barroso, la Doctora Verónica Obregón Barboza y la Dra. María del Rayo Sánchez Carbente les agradezco por participar en mi evaluación, pero más que nada, por fungir como guías para desarrollar mejor el proyecto.

## Resumen

*Drosophila melanogaster* es un díptero que ha sido utilizado como modelo de estudio por investigadores en el campo de la genética, biología molecular y biología del desarrollo debido a que presenta sólo cuatro pares de cromosomas; es fácil de reproducir, genera una gran descendencia y su mantenimiento requiere un bajo costo.

En el laboratorio se aisló una línea que lleva una mutación de pérdida de función del gen *escargot*, llamada *esg<sup>L4</sup>*. Trabajos anteriores han demostrado que esta mutación afecta el desarrollo de órganos gustativos y olfativos en moscas adultas, sin embargo, no se sabe si este gen participa también en el desarrollo de estos sistemas en la etapa de larva. Es por esto que este proyecto de investigación se enfocó en estudiar el comportamiento gustativo frente a sustancias amargas de la línea *esg<sup>L4</sup>* y compararla con la línea silvestre *w<sup>118</sup>*.

Los resultados arrojaron que la línea mutante *esg<sup>L4</sup>* tiene afectado el sistema del gusto, al menos para sustancias aversivas, por lo que se concluyó que el gen *escargot* participa en el desarrollo del sistema gustativo en larvas.

# Índice

1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1. <i>Drosophila melanogaster</i>	2
2.2. Sistema gustativo en moscas adultas de <i>Drosophila melanogaster</i>	4
2.2.1. Probóscide y sensilias gustativas	5
2.3. Neuronas receptoras gustativas y receptores gustativos (Grs)	9
2.4. Gen <i>escargot</i>	11
2.5. Elemento $P\{GawB\}$	13
2.6. Sistema UAS-GAL4	15
3. Antecedentes	17
4. Justificación	20
5. Hipótesis	20
6. Objetivos	20
7. Materiales y métodos	21
7.1. Ingredientes de la dieta de Diane o Down para el mantenimiento de <i>D. melanogaster</i>	21
7.2. Stocks de moscas <i>Drosophila melanogaster</i>	22
7.3. Cruza de la mutante con la línea <i>UAS-GFP</i> para corroborar la inserción del elemento $P\{GawB\}$ en el gen <i>escargot</i> de la línea <i>esg<sup>L4</sup></i>	23
7.4. Experimentos conductuales gustativos con larvas <i>Drosophila melanogaster</i>	25
7.5. Sustancias amargas	26
7.6. Índice de preferencia I.P	30
8. Resultados	31

<b>8.1. Cruza de la línea <i>esg<sup>L4</sup></i> con la línea <i>UAS-GFP</i></b>	.....	31
<b>8.2. Experimentos para evaluar la conducta gustativa</b>	.....	33
<b>8.2.1. Experimentos conductuales gustativos con larvas <i>w<sup>118</sup></i> y <i>esg<sup>L4</sup></i> empleando cafeína</b>	.....	34
<b>8.2.2. Experimentos conductuales gustativos con larvas <i>w<sup>118</sup></i> y <i>esg<sup>L4</sup></i> empleando lobelina</b>	.....	36
<b>8.2.3. Experimentos conductuales gustativos con larvas <i>w<sup>118</sup></i> y <i>esg<sup>L4</sup></i> empleando quinina</b>	.....	37
<b>8.2.4. Experimentos conductuales gustativos con larvas <i>w<sup>118</sup></i> y <i>esg<sup>L4</sup></i> empleando nicotina</b>	.....	38
<b>9. Discusión</b>	.....	39
<b>10. Conclusiones</b>	.....	42
<b>11. Perspectivas</b>	.....	43
<b>11.11. Perspectivas a corto plazo: Comprobar si la línea <i>esg<sup>L4</sup>/UAS-esgRNAis</i> tiene dañado completamente el sentido del gusto</b>	.....	43
<b>11.2. Perspectivas a corto plazo: Determinar si la mutación en <i>esg</i> afecta el sentido del olfato</b>	.....	43
<b>11.3. Perspectivas a largo plazo: Caracterizar los receptores gustativos expresados en larva y a qué sustancias responden</b>	.....	44
<b>12. Referencias bibliográficas</b>	.....	45

## Abreviaturas

<b>AN</b>	Nervio antenal
<b>CyO</b>	Cromosoma balanceador que mantiene la mutación estable en la línea <i>esg</i> <sup>L4</sup>
<b>DCSO</b>	Órgano de los sentidos cibariales dorsal
<b>DO</b>	Órgano dorsal
<b>DOG</b>	Ganglio dorsal
<b>DPO</b>	Órganos dorsal faríngeo
<b>DPS</b>	Órgano dorsal faríngeo de los sentidos
<b>dCtBP</b>	Proteína de unión C-terminal
<b>Esg</b>	Proteína <i>escargot</i>
<b><i>esg</i></b>	Gen <i>escargot</i>
<b><i>esg</i><sup>L4</sup></b>	Línea de moscas con una pérdida de función en el gen <i>esg</i>
<b>GAL4</b>	Factor de transcripción GAL4 de levadura
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GNR</b>	Neuronas receptoras gustativas
<b>Grs</b>	Receptores gustativos
<b>I.P.</b>	Índice de preferencia
<b>LBN</b>	Nervio labial
<b>LN</b>	Nervio labral
<b>LSO</b>	Órgano sensorial labral
<b>MN</b>	Nervio maxilar
<b>OBP</b>	Proteínas de unión al olor

<b>PPS</b>	Órgano posterior faríngeo
<b>SOG</b>	Ganglio subesofágico
<b>TBE</b>	Disolución formada por Tris, borato y EDTA
<b>TOG</b>	Ganglio terminal
<b>UAS</b>	Upstream Activating Sequences: secuencias activadoras de la transcripción río arriba a las que se une GAL4
<b>VCSO</b>	Órganos de los sentidos cibariales ventral
<b>VO</b>	Órgano gustativo ventral
<b>VOG</b>	Ganglio ventral
<b>VPS</b>	Órgano ventral faríngeo
<b><i>w</i><sup>1118</sup></b>	Línea de moscas <i>white</i> <sup>1118</sup> que llevan una mutación en el gen <i>white</i> lo que hace que tengan ojos blancos

## Figuras

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	3
<b>Figura 2.</b> Sistema gustativo de <i>D. melanogaster</i> .....	4
<b>Figura 3.</b> Probóscide de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	5
<b>Figura 4.</b> Probóscide y diferentes órganos que se encuentran dentro de la faringe de las moscas adultas <i>D. melanogaster</i> .....	6
<b>Figura 5.</b> Sistema gustativo de larvas <i>Drosophila melanogaster</i> .....	6
<b>Figura 6.</b> Sensilia gustativa tipo cerda .....	8
<b>Figura 7.</b> Sensilia gustativa tipo clavija .....	8
<b>Figura 8.</b> Mapa del brazo izquierdo del cromosoma 2 de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	12
<b>Figura 9.</b> Dominios de <i>escargot</i> .....	13
<b>Figura 10.</b> Elemento $P\{GawB\}$ .....	14
<b>Figura 11.</b> Sistema UAS-GAL4 .....	16
<b>Figura 12.</b> Individuo <i>esg<sup>L4</sup>/UAS-esgRNA</i> is sin probóscide .....	17
<b>Figura 13.</b> Gráfica de los I.P de la línea <i>w<sup>118</sup></i> y <i>Gr-GAL4</i> sometidas a 9 compuestos amargos .....	18
<b>Figura 14.</b> Representación de los experimentos conductuales .....	25

<b>Figura 15.</b> Estructura química de la cafeína	26
<b>Figura 16.</b> Estructura química de la lobelina	27
<b>Figura 17.</b> Estructura química de la nicotina	28
<b>Figura 18.</b> Estructura química de la cafeína quinina	29
<b>Figura 19.</b> Expresión de GFP dirigida por <i>esg<sup>L4</sup></i>	32
<b>Figura 20.</b> Experimentos de conducta gustativa	34
<b>Figura 21.</b> I.P de larvas <i>w<sup>1118</sup></i> y <i>esg<sup>L4</sup></i> sometidas a cafeína	35
<b>Figura 22.</b> I.P de larvas <i>w<sup>1118</sup></i> y <i>esg<sup>L4</sup></i> sometidas a lobelina	36
<b>Figura 23.</b> I.P de larvas <i>w<sup>1118</sup></i> y <i>esg<sup>L4</sup></i> sometidas a quinina	37
<b>Figura 24.</b> I.P de larvas <i>w<sup>1118</sup></i> y <i>esg<sup>L4</sup></i> sometidas a nicotina	38

## Cuadros y tablas

<b>Cuadro 1.</b> Cruza entre la línea <i>esg<sup>L4</sup></i> y <i>UAS-GFP</i> .....	31
<b>Tabla 1.</b> Tipos de neuronas receptoras gustativas identificadas en <i>D. melanogaster</i> y las sustancias que son capaces de detectar .....	10
<b>Tabla 2.</b> Ingredientes de la receta de comida de Diane o Down y peso de los mismos para realizar la comida de moscas <i>D. melanogaster</i> .....	21
<b>Tabla 3.</b> Ingredientes para el tampón de TBE .....	24
<b>Tabla 4.</b> Información de la cafeína .....	26
<b>Tabla 5.</b> Información de la lobelina .....	27
<b>Tabla 6.</b> Información de la nicotina .....	28
<b>Tabla 7.</b> Información de la quinina .....	29
<b>Tabla 8.</b> Índice de preferencia de las larvas <i>w<sup>118</sup></i> y <i>esg<sup>L4</sup></i> usando cafeína .....	35
<b>Tabla 9.</b> Índice de preferencia de las larvas <i>w<sup>118</sup></i> y <i>esg<sup>L4</sup></i> usando lobelina .....	36
<b>Tabla 10.</b> Índice de preferencia de las larvas <i>w<sup>118</sup></i> y <i>esg<sup>L4</sup></i> usando quinina .....	37
<b>Tabla 11.</b> Índice de preferencia de las larvas <i>w<sup>118</sup></i> y <i>esg<sup>L4</sup></i> usando nicotina .....	38

## 1. Introducción

Los sentidos nos proporcionan información vital que nos permite relacionarnos con el mundo que nos rodea de manera segura e independiente. Por medio de las sensaciones, que son una cascada de mecanismos y procesos físico-químicos en nuestro cuerpo y cerebro, se procesan todos los estímulos que recibimos, como la luz, los sonidos, el olor y el sabor, la temperatura, el dolor, entre otros. De tal forma, percibir es la función cerebral, y el primer proceso cognitivo, que nos permite elaborar e interpretar la información proveniente de nuestro entorno a través de los órganos de los sentidos distribuidos a lo largo del cuerpo (Miranda, 2011).

El sentido del gusto es el componente del sistema quimiosensorial, que les permite a los animales detectar las sustancias comestibles y evitar las sustancias tóxicas. Además, los estímulos gustativos pueden ser refuerzos, es decir, pueden inducir recuerdos de estímulos o acciones que los precedieron, de modo que el animal pueda encontrar buena y evitar la mala comida (Jeong y Young, 2011).

*Drosophila melanogaster* se ha convertido en un excelente modelo para investigar la organización y función del sistema gustativo debido a la organización neuroanatómica relativamente simple de su cerebro y la disponibilidad de tecnología genética y transgénica. Por lo tanto, a nivel molecular y celular, ya se ha logrado una gran cantidad de información sobre la detección periférica y la codificación de la información gustativa (Bohra et al., 2018).

## 2. Marco teórico

### 2.1. *Drosophila melanogaster*

*Drosophila melanogaster* es un díptero con distribución cosmopolita y es considerada una de las especies más importantes para el estudio de la biología (Díaz et al., 2008; Rincón et al., 2009). Gracias a los estudios que realizó Thomas Hunt Morgan, la genética de *Drosophila* se conoce mejor que la de cualquier otro organismo multicelular. *D. melanogaster* tiene cuatro pares de cromosomas, tres pares son autosomas y el cuarto corresponde al par sexual: XX en hembras y XY en machos (Curtis et al., 2006). Otras ventajas es que su tamaño es pequeño, es fácil de reproducir, teniendo numerosa descendencia. También el costo en su manejo y mantenimiento es muy bajo y tiene un ciclo de vida corto, de alrededor de 10 días a 25°C. Como organismo holometábolo, el desarrollo ontogénico presenta cuatro estadios: embrión, larva, pupa y adulto (Figura 1) (Curtis et al., 2008; Díaz et al., 2008; Santalla et al., 2016).

El periodo del desarrollo embrionario comprende desde el momento de la fecundación y tiene una duración de un día. Al cabo de este periodo el embrión rompe la cáscara del huevo y emerge como una larva. Esta pasa por tres estadios, a través de los cuales aumenta su tamaño. El cambio de estadio se produce cuando la larva muda, es decir, se deshace de la cutícula externa que le resulta pequeña y queda cubierta por una nueva envoltura cuticular adecuada. Al final del tercer estadio larval, ésta se vuelve inmóvil, se encapsula en una estructura conocida como pupario y se convierte en pupa. Dentro del pupario, la mayoría de los tejidos y estructuras larvales son degradados, mientras que en forma progresiva se van ensamblando los tejidos y los órganos que constituirían la mosca adulta. Estos surgen de las estructuras conocidas como discos imaginales, los cuales se producen desde la etapa embrionaria. A este periodo de remodelación radical se le conoce como metamorfosis.

Transcurridos los nueve días desde el momento de la fecundación, del pupario emerge una mosca adulta (Curtis et al., 2008). El promedio de vida de una mosca adulta es de 70 días a 25°C (Santalla et al., 2016).

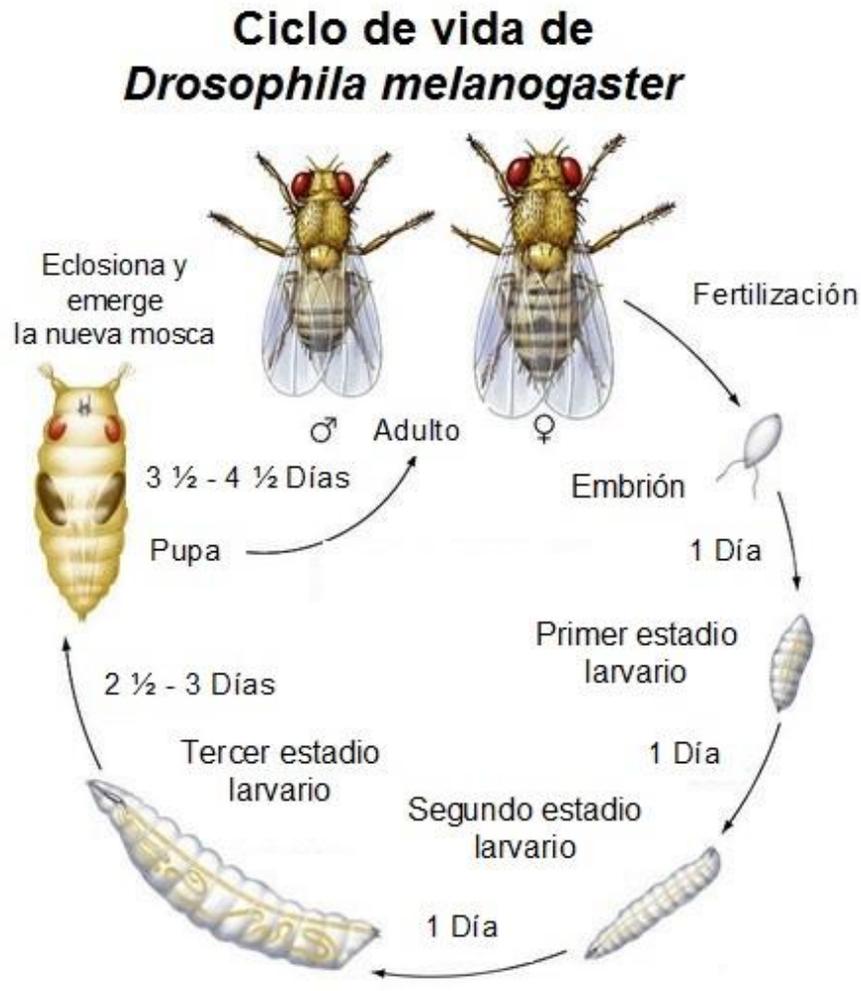


Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

El ciclo de *D. melanogaster*, que va desde el apareamiento de dos individuos de diferente sexo y los estadios por los que pasa hasta que emerge la nueva mosca (Anónimo. (2018). Recuperado de: <https://dendrotterra.jimdo.com/art%C3%ADculos/drosophila-alimento-vivo/>).

## 2.2. Sistema gustativo en moscas adultas de *Drosophila melanogaster*

El sentido del gusto es importante para insectos, ya que con él puede diferenciar entre sustratos ricos en nutrientes, como azúcares, aminoácidos y sustancias dañinas que se encuentran presentes en plantas y que en su mayoría son de sabor amargo (Freeman y Dahanukar, 2015; French et al., 2015; Oseguera, 2015; Chieh y Dahanukar, 2017). En las moscas adultas el sistema gustativo a diferencia del de los mamíferos, no está restringido a un único órgano del gusto, si no que se encuentra distribuido en diferentes partes del cuerpo, como en las patas y en el borde de las alas. En las hembras también se pueden encontrar este tipo de órganos en el órgano ovopositor (Figura 2), y le sirven para poder detectar si la comida es rica en nutrientes para así después decidir colocar los huevos o no en ella (Oseguera, 2015). Los órganos de los sentidos de las moscas adultas de *Drosophila melanogaster* y de los insectos holometábolos en general derivan de los discos imaginales.

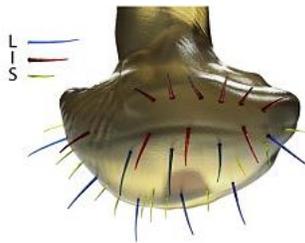


**Figura 2. Sistema gustativo de *D. melanogaster***

Hembra adulta *D. melanogaster* en la cual están señalados con puntos verdes los sitios (probóscide, patas, alas y órgano ovopositor) donde se encuentra distribuido su sistema gustativo (Liman E., Y. Zang, C. Montiel., "Peripheral Coding of Taste". (2014). [Figura 1. The Taste Organs in Mammals, Such as Mice and Humans, and in Flies] Neuron 81 (5) p. 985).

### 2.2.1. Probóscide y sensilias gustativas

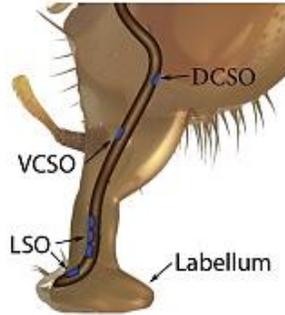
Las moscas adultas de *D. melanogaster* presentan un órgano en la cabeza que le permite percibir los sabores, este recibe el nombre de probóscide y está compuesta por dos palpos labiales ubicados en el extremo distal. Cada palpo está cubierto con 31 sensilias gustativas de tipo cerda, las cuales se clasifican de acuerdo a la morfología de su cerda: largas (L), intermedias (I) y pequeñas (S) (Figura 3) (Amrein et al., 2005).



**Figura 3. Probóscide de *Drosophila melanogaster***

Punta de la probóscide conformada por los dos palpos labiales en los cuales se encuentran los diferentes tipos de sensilias (largas (L), intermedias (I) y pequeñas (S)) que llegan a presentar las moscas adultas de *D. melanogaster* (Liman E., Y. Zang, C. Montiel., "Peripheral Coding of Taste". (2014). [Figura 1. The Taste Organs in Mammals, Such as Mice and Humans, and in Flies] Neuron 81 (5) p. 985).

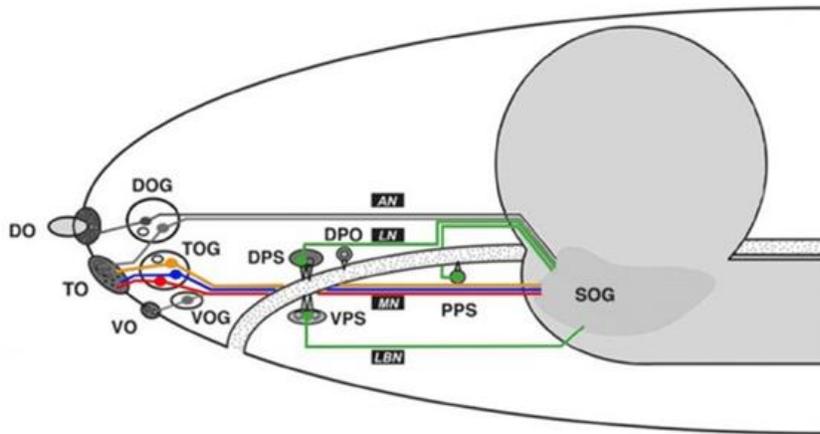
Los palpos labiales permanecen cerrados, y durante la alimentación se abren y exponen sensilias gustativas adicionales de forma de clavija que se encuentran recubriendo la pared interior de la faringe formando tres órganos: el órgano sensorial labral (LSO) y los órganos de los sentidos cibariales; ventral (VCSO) y dorsal (DCSO), que recubren la pared interior de la faringe y controlan la comida a medida que se ingiere (Figura 4). No se conocen las funciones específicas de estos órganos internos del gusto, pero pueden servir como sensores para sustancias nocivas que si se activan provocan una respuesta como "regurgitar" o verificar las sustancias deseables y promover los reflejos de succión (Amrein et al., 2005). Cada uno de los tres órganos faríngeos de adultos son de origen embrionario y se derivan de los órganos de los sentidos de larvas (Gendre et al., 2004).



**Figura 4. Probóscide y diferentes órganos que se encuentran dentro de la faringe de las moscas adultas de *D. melanogaster***

El órgano sensorial labral (LSO) y los órganos de los sentidos cibariales; ventral (VCSO) y dorsal (DCSO), recubren la pared interior de la faringe. (Liman E., Y. Zang, C. Montiel., "Peripheral Coding of Taste". (2014). [Figura 1. The Taste Organs in Mammals, Such as Mice and Humans, and in Flies] Neuron 81 (5) p.985).

El sistema gustativo de larvas es más simple que el de los adultos. Las larvas tienen en la región de la cabeza tres órganos externos (dorsal, terminal y ventral) y tres órganos internos de la faringe (dorsal, ventral y posterior) (Figura 5). Se ha estimado que en estos órganos hay alrededor de 80 neuronas receptoras gustativas, mucho menos de las que se encuentran en el sistema gustativo de adulto (Liman et al., 2014; Freeman y Dahanukar, 2015).



**Figura 5. Sistema gustativo de larvas *Drosophila melanogaster***

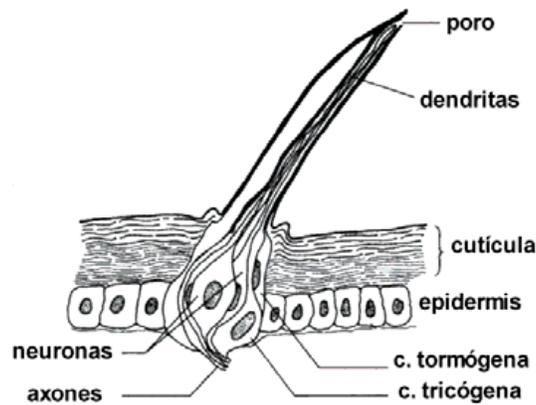
Esquema general del sistema gustativo de larvas *Drosophila melanogaster*, se muestran los órganos gustativos externos (dorsal (DO), terminal (TO) y ventral (VO)), los órganos faríngeos (dorsal faríngeo (DPO), dorsal faríngeo de los sentidos (DPS), ventral faríngeo (VPS) y posterior faríngeo (PPS)), los ganglios (dorsal (DOG), terminal (TOG), ventral (VOG)) y las proyecciones centrales. Cuatro nervios

principales que conectan a los órganos quimiosensoriales con el sistema nervioso central: nervio antenal (AN), nervio labral (LN), nervio maxilar (MN) y nervio labial (LBN). El cerebro se muestra en gris al igual que el ganglio subesofágico (SOG). También se observan los cuerpos celulares de las neuronas receptoras gustativas bipolares que se agrupan en los ganglios cercanos al órgano respectivo. Cada neurona receptora gustativa responde a diferentes sustancias, por ejemplo: la de color verde responde a fructosa, la roja a quinina, la azul a altas concentraciones de sal y la amarilla a bajas concentraciones de sal. (Apostolopoulou, A., & A. Rist. "Taste processing in *Drosophila* larvae". (2015). [Figura 1. Anatomy of the larval taste system] Front. Integr. Neurosci. 9(50) p.3).

Los órganos gustativos que se encuentran en la probóscide de adulto tienen un origen mixto, ya que las sensilias de los labelos se originan a partir de los discos imaginales del labio, mientras que las sensilias de los órganos de la faringe vienen de los órganos gustativos internos de la larva (Gendre, 2004).

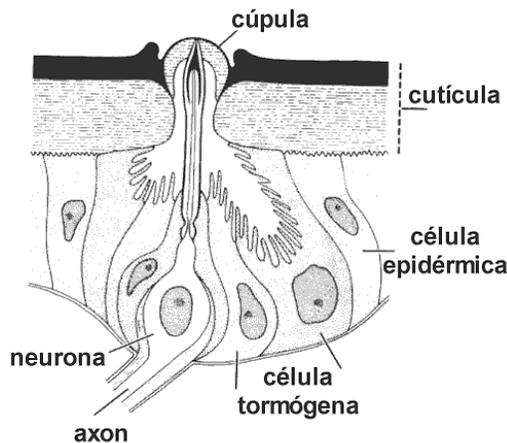
Cabe mencionar que las sensilias son la unidad básica de los órganos sensoriales en insectos y que surgen a partir de una secuencia de interacciones que se da entre célula-célula y divisiones celulares (Singhania & Grueber, 2014). Cada sensilia gustativa está conformada por una neurona mecanosensorial, neuronas receptoras gustativas y tres células accesorias: tricógeno (eje), termógeno (enchufe) y genógeno (vaina) (Liman et al., 2014). Como primer paso para que se lleve a cabo la formación de sensilias es necesario que se creen grupos de células ectodérmicas que expresan genes proneurales. Posteriormente una célula dentro de este grupo será el precursor de la sensilia, llamada precursora de órgano sensorial o SOP, por sus siglas en inglés. En este punto, esta célula precursora experimentará una serie de divisiones celulares para dar lugar a las neuronas y las células de soporte que se asocian con cada sensilia (Singhania & Grueber, 2014).

Las sesilias gustativas de tipo cerda (Figura 6) y clavija (Figura 7) tienen un poro terminal en la punta para permitir el acceso directo de las sustancias alimenticias a los procesos dendríticos de las neuronas receptoras gustativas, que se extienden dentro del eje de la cerda. Existe un espacio entre la dendrita interna y la superficie interna de la cerda que se llena de una secreción llamada linfa. Se sabe poco de la composición de la linfa de las sesilias gustativas, pero se cree que modula el acceso de las sustancias a sus receptores afines (Amrein et al., 2005).



**Figura 6. Sesilia gustativa tipo cerda**

Conformación de la sesilia tipo cerda. (Fonte A. (2018). Los artrópodos [Figura. Quimiorreceptores por contacto (“gustativos”)] Recuperado de: <https://docplayer.es/30302026-Losartropodos-caracteristicas-del-filo-artropodos.html>).



**Figura 7. Sesilia gustativa tipo clavija**

Sesilia tipo clavija con sus partes. (Fonte A. (2018). Los artrópodos [Figura. Sensilia campaniforme] Recuperado de: <https://docplayer.es/30302026-Losartropodos-caracteristicas-del-filo-artropodos.html>).

Los órganos de los sentidos en larvas y adultos a menudo son muy diferentes en términos de números de células, organización y función, reflejando así los diferentes estilos de vida de las dos etapas. Se sabe que la mayoría de las sensilias de las larvas son perdidas durante la metamorfosis y son sustituidas por sensilias de adultos que se originan de los discos imaginales. Las sensilias gustativas externas de las larvas de *Drosophila* se degradan durante la metamorfosis y se sustituyen por sensilias de adulto que se derivan del disco labial imaginal. Curiosamente, la faringe de adultos deriva de células pequeñas imaginales, que están estrechamente asociadas con el esqueleto de la faringe en larvas. El sistema sensorial larval es sorprendente porque la faringe sufre reorganización durante la metamorfosis. Existe una excepción de la regla de sustitución sensorial, se ha demostrado que pequeños subconjuntos de neuronas asociadas a discos imaginales de pata o segmentos abdominales persisten durante la metamorfosis (Gendre et al., 2004).

### **2.3. Neuronas receptoras gustativas y receptores gustativos (Grs)**

Las neuronas receptoras gustativas son aquéllas que perciben las sustancias sápidas a través de los receptores gustativos (Grs) que tienen en su membrana. Las neuronas receptoras gustativas que se encuentran en las sensilias gustativas de *Drosophila melanogaster* son neuronas bipolares que extienden las dendritas dentro de las sensilias y los axones están proyectados hacia el ganglio subesofágico. Cada una de las neuronas receptoras gustativas expresa uno o varios receptores gustativos y se especializa en la respuesta a un tipo de sabor amargo, dulce, o salado. También existen neuronas receptoras gustativas que responden a agua (Tabla 1) (Miyamoto et al., 2012, Liman et al., 2014).

**Tabla 1. Tipos de neuronas receptoras gustativas identificadas en *D. melanogaster* y las sustancias que son capaces de detectar**

<b>Neurona receptora gustativa</b>	<b>Sustancia que es capaz de detectar</b>
B	Amarga
S	Azúcar
W	Agua
L1	Baja concentración de sal
L2	Alta concentración de sal

La mayoría de los receptores para los sabores amargo y dulce en moscas y otros insectos son miembros de una superfamilia de proteínas receptoras acopladas a proteína G, con 7 dominios transmembranales. Se sabe que *Drosophila* presenta 68 miembros de estos receptores. En adultos, se ha logrado caracterizar el tipo de receptor que expresa cada neurona receptora gustativa y la sustancia a la que responde. Por ejemplo: los receptores gustativos *Gr32a*, *GrR33a* y *Gr66a*, son necesarios para la respuesta a la mayoría de sustancias amargas. Estos tres receptores gustativos, así como *Gr89a* y *Gr39a.a* se expresan en todas las neuronas receptoras gustativas que responden al sabor amargo. Por otro lado la percepción de sustancias dulces se da a través de tres receptores gustativos: *Gr5a*, *Gr64a* y *Gr64f*. *Gr64a* responde a la sacarosa y maltosa, mientras que *Gr5a* es necesario para la detección de trehalosa y melezitosa (Liman et al., 2014). Posiblemente en larvas los receptores *Gr33a* y *Gr66a* puedan ser los que reaccionen a sustancias amargas porque son los que están más expresados. Las larvas también presentan *Gr89a* y *Gr93a*, estos reaccionan específicamente a L-canavanina y cafeína, pero son necesarios para detectar otros compuestos amargos (Liman et al., 2014). En larvas se ha encontrado la expresión de 39 receptores gustativos en sus órganos gustativos. Se sabe que hay diferencias entre adultos y larvas ya que, por ejemplo, los receptores *Gr5a*, *Gr61a*, *Gr64a-f*, se requieren para la detección de azúcares en adulto, pero en larva no se expresan. Sin embargo, todavía falta caracterizar bien los receptores expresados en larva y a qué sustancias responden.

## 2.4. Gen *escargot* (*esg*)

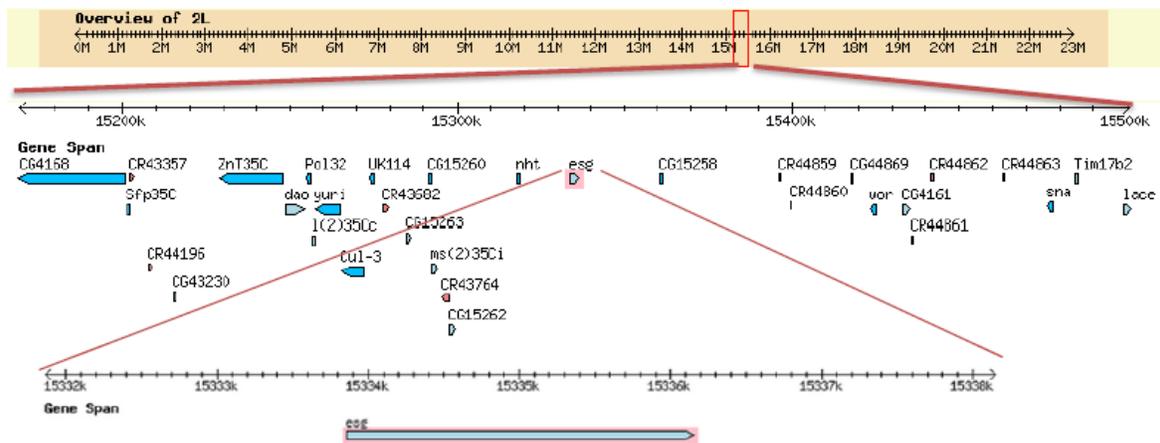
En *Drosophila* existe una familia llamada Snail que está compuesta por tres genes: *snail*, *worniu* y *escargot*. *snail* fue el primero en identificarse y se observó que la mutante homóciga presenta defectos durante la invaginación de la gastrulación y formación del mesodermo. Posteriormente se identificaron los otros dos; *worniu* y *escargot*. Estos genes codifican a factores de transcripción con dominios de dedos de zinc, y están involucrados, entre otras funciones, en el desarrollo del sistema nervioso en artrópodos y cordados. El homólogo de *escargot* en humano es conocido como Snail II o Slug y mutaciones en este gen se han relacionado con el desarrollo de enfermedades como el Piebaldismo y el Síndrome de Waardenburg así como algunos tipos de cáncer (Leptin, 1991; Oseguera, 2015; Simoneko et al., 2018).

En el laboratorio se aisló una línea (*esg<sup>L4</sup>*) que lleva insertado el elemento *P{GawB}* en el gen *escargot* (*esg*) causando una mutación de pérdida de función. Esta línea es homóciga letal, pero viable y fértil de forma heteróciga.

*esg* se localiza en el segundo cromosoma (Figura 8), y su único exón codifica a un factor de transcripción con cinco dominios de dedos de zinc de unión al ADN; puede tanto reprimir como activar la transcripción mediante su unión a la secuencia de ADN consenso 5'-A / GCAGGTG-3' o al co-represor dCtBP (proteína de unión C-terminal) (Figura 9). (Simoneko et al., 2018).

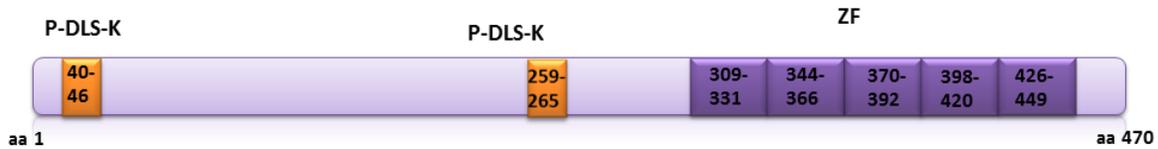
*escargot* es un gen multifuncional que participa en varios procesos del desarrollo. Durante la embriogénesis, *escargot* se expresa en todas las células que darán origen a las estructuras de adulto (discos imagales e histoblastos), pero la función que lleva a cabo en cada uno de estos tejidos no se conoce completamente. Se sabe que *esg* mantiene la diploidía de los histoblastos que son células a partir de las cuales se originará la epidermis abdominal en el adulto. La mayoría de los tejidos larvarios son poliploides, sin embargo, los discos imagales e histoblastos se mantienen diploides. Cuando *esg* es mutado, las células de los histoblastos no se dividen mitóticamente y por lo tanto las células se vuelven poliploides. Por otro lado, se requiere de *esg* y de *snail* para la formación del disco imagal de ala, ya que

dobles mutantes de estos genes no forman este disco (Fuse et al., 1996). *escargot* también se expresa en las células que migran a través del embrión para formar el ramaje del sistema traqueal, cuya función es el transporte de oxígeno. *esg* también se ha visto involucrado en la diferenciación neuronal, ya que promueve que los precursores neuronales se diferencien a neuronas (Ashraf et al., 2001; Oseguera, 2015). En el adulto, *escargot* participa en el mantenimiento de células germinales intestinales. En este caso se sabe que *esg* actúa en la unión del factor de transcripción Scute al promotor del gen *prospero*, cuya expresión se requiere para iniciar la diferenciación hacia células maduras del intestino (Li et al., 2017). Participa también en el establecimiento de las células germinales masculinas (células gaméticas), manteniendo el nicho somático que permite la diferenciación de estas células (Voog et al., 2014).



**Figura 8. Mapa del brazo izquierdo del cromosoma 2 de *Drosophila melanogaster***

Esquema del mapa del brazo izquierdo del cromosoma 2 de *Drosophila melanogaster* que muestra la localización del gen *escargot*. Cabe resaltar que en este brazo del cromosoma también se localizan los genes *snail* y *wormiu*, los otros miembros de la familia Snail. (Rosales F. (2014). Implicación del gen *escargot* en la sensibilidad a nicotina volatilizada en *Drosophila melanogaster*. [Figura 9. Mapa del brazo izquierdo del cromosoma 2] Tesis de maestría. p. 33).



**Figura 9. Dominios de *escargot*.**

Esg presenta 5 dedos de zinc, esta región se encuentra conservada entre los miembros de la familia Snail, además presenta dos dominios de unión al co-represor dCtBP (proteína de unión C-terminal). (Rosales F. (2014). Implicación del gen *escargot* en la sensibilidad a nicotina volatilizada en *Drosophila melanogaster*. [Figura 4. Dominios de *escargot*] Tesis de maestría. p.15).

## 2.5. Elemento $P\{GawB\}$

Como se mencionó anteriormente, la línea *esg*<sup>L4</sup> lleva insertado al transposón  $P\{GawB\}$  en el gen *escargot* causando la pérdida de función del gen.  $P\{GawB\}$  es un elemento transponible tipo P modificado que contiene varios segmentos (Figura 8). Contiene al gen *Gal4* bajo la regulación de un promotor que es incapaz de llevar a cabo la transcripción por sí solo lo que permite que este elemento funcione como un “enhancer trap” ya que requiere atrapar el enhancer (secuencia de DNA que aumenta la transcripción de un promotor cercano) de un gen cercano a la inserción para llevar a cabo la transcripción de *Gal4* (Brand & Perrimon 1993). El gen *mini-white* otorga el color rojo a los ojos y aquellas moscas con un fondo genético *white* tendrán los ojos rojos si en su genoma han integrado un elemento P. En el extremo 3´ se encuentra el vector pBluescript que además de contener un sitio de origen de replicación de *E. coli*, contiene también el gen de resistencia a ampicilina, que al escindir con enzimas de restricción y ligarlo se puede realizar una transformación en bacterias que permita rescatar al vector y al rescatarlo se pueden conocer las secuencias de los enhancers que están regulando al elemento  $P\{GawB\}$  (Figura 10) (Oseguera, 2015; Rosales, 2014).

Finalmente, este contiene las secuencias terminales repetidas invertidas que le permite ser reconocido por una transposasa (que no se encuentra codificada en este elemento), para poder ser escindido y transponerse a otro sitio (Sánchez, 2015).

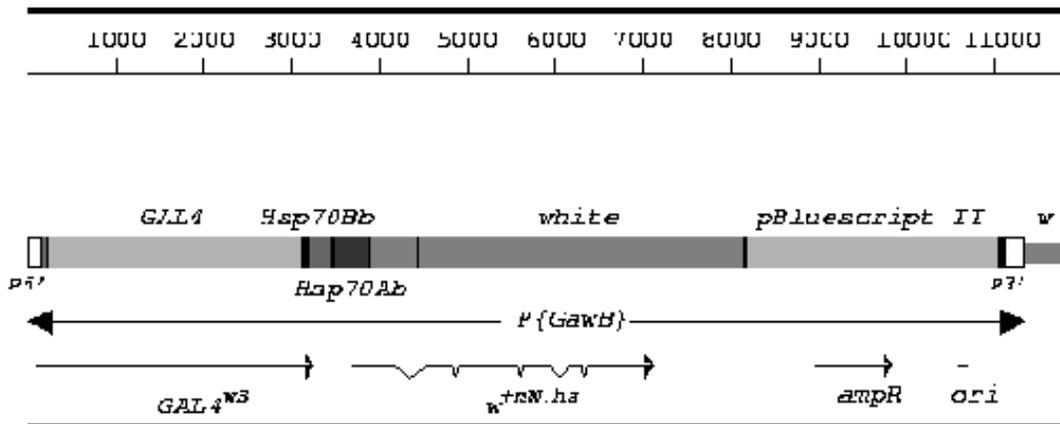


Figura 10. Elemento  $P\{GawB\}$

Elemento  $P\{GawB\}$  conformado por el gen  $GAL4$ , el gen *mini-white* y el vector pBluescript (Fly Base (2018). Recombinant Construct:  $P\{GawB\}$  [Figura]. Recuperado de: <http://flybase.org/reports/FBtp0000352.html>).

En la línea  $esg^{L4}$ , el elemento  $P\{GawB\}$  se encuentra insertado después del sitio de inicio de la transcripción del gen *escargot*, en el nucleótido 39 (Rosales, 2014). Se corroboró que esta inserción causa pérdida de función de este gen. Por otro lado, la transcripción de *Gal4* bajo los elementos reguladores de *escargot* permiten dirigir la expresión de un gen efector en el patrón de expresión de *escargot* con el sistema UAS/GAL4.

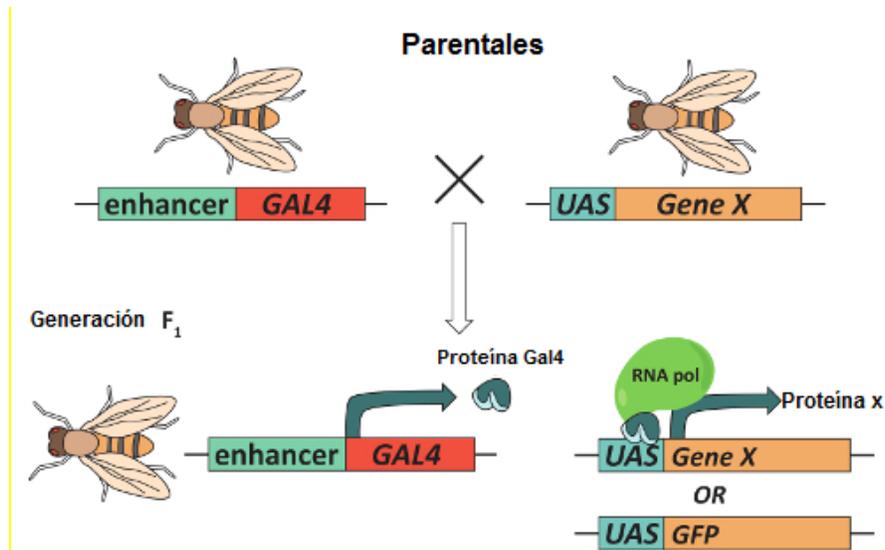
## 2.6. Sistema UAS-GAL4

Reynaud (2007) menciona que una de las técnicas genéticas más interesantes que existen en la mosca es el sistema UAS/GAL4. Este sistema permite expresar *in vivo* cualquier gen (ya sea de mosca o de cualquier otro organismo) de manera dirigida y específica a cualquier tipo de células y en cualquier momento del desarrollo de la mosca.

GAL4 es una proteína de levadura cuya función es activar la transcripción genética. En la levadura, GAL4 es indispensable para que se expresen los genes involucrados que permiten que la levadura pueda comer un tipo especial de azúcar (galactosa). GAL4 sólo puede activar genes que tienen una secuencia reguladora que se llama UAS (*Upstream Activating Sequences*, secuencias activadoras de la transcripción río arriba), y los genes de levadura para la digestión de galactosa tienen esta secuencia. La unión de GAL4 a UAS es muy específica y GAL4 no puede activar la transcripción de ningún gen que no las contenga. En la mosca no existen genes homólogos a GAL4 y ningún gen de mosca tiene secuencias UAS (Reynaud, 2007).

Brand y Perrimon (1993) desarrollaron un método para inducir en un lugar específico la transcripción de GAL4 utilizando las secuencias reguladoras transcripcionales de un promotor definido. A estas líneas que llevan GAL4 se les conoce como “drivers”. Por otro lado se pueden clonar genes de interés bajo la secuencia reguladora UAS, de forma que GAL4, sólo active a este gen en el patrón en el que GAL4 se expresa, cuando ambos elementos se encuentran en una misma mosca. Por ejemplo, si se crea una mosca transgénica que exprese GAL4, no pasará nada, ya que no hay secuencias UAS endógenas. Sin embargo, si se crea otra mosca transgénica que tenga cualquier gen clonado río abajo de las secuencias UAS (gen efector) y se cruza con la mosca que expresa GAL4, la progenie que herede ambos transgenes expresará el gen efector con el patrón definido por el promotor que regula a GAL4 (Figura 11). El uso de promotores específicos de tejido permite que la transcripción sea restringida a un subconjunto definido de células, pero está limitado por la disponibilidad de los promotores clonados y caracterizados que pueden dirigir la

expresión en el patrón deseado. Este inconveniente puede ser superado utilizando “enhancer traps”, como *P{GawB}*, los cuales pueden insertarse al azar en el genoma pudiendo atrapar las regiones regulatorias de cualquier gen (Reynaud, 2007).



**Figura 11. Sistema UAS-GAL4**

Esquema del sistema UAS-GAL4 para expresar a la proteína GFP en células donde se expresa *escargot*. (Seth K., A. Elchert & M Kahl. “Dissection and immunofluorescent staining of mushroom body and photoreceptor neurons in adult *Drosophila melanogaster* brains”. 2017. [Figura 2. The GAL4/UAS system can be used for targeted gene expression] Jove 129. p. 13).

### 3. Antecedentes

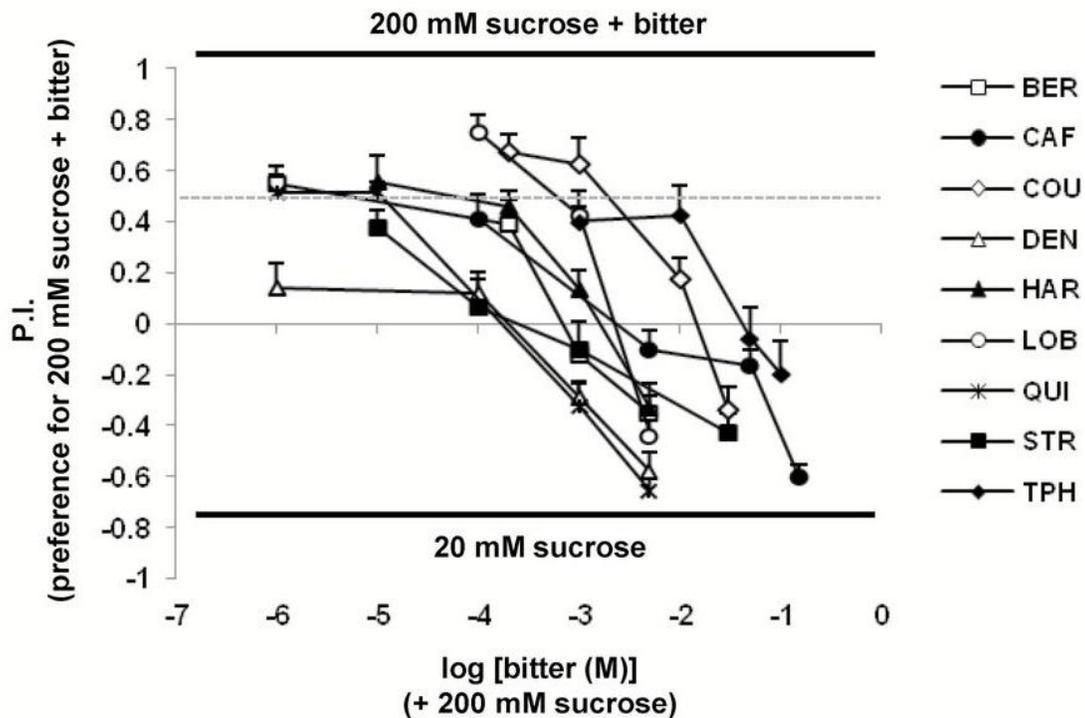
Sánchez (2015) y colaboradores aislaron líneas que tenían alterada la percepción de la nicotina a partir de una colección de moscas que llevan insertado el elemento *P{GawB}* en diferentes partes del genoma. Esto lo hicieron estableciendo un protocolo de nicotina volatilizada para poder comparar la respuesta de las moscas silvestres y las mutantes. Las moscas, al ser expuestas a la nicotina, se paralizan por un tiempo, por lo que se evaluó el tiempo necesario para que la mitad de las moscas se recuperara. A este tiempo se le definió como tiempo medio de recuperación (HTR). Se encontró que las moscas mutantes tardaban más tiempo en despertar debido a que son más sensibles a la nicotina en comparación con las moscas control. Fue así que se identificó a la línea *esg<sup>L4</sup>*, que como ya se mencionó anteriormente presenta una pérdida de función que reduce los niveles de la proteína Esg a la mitad. Cabe recordar que la línea *esg<sup>L4</sup>* es homocigota letal, por lo que, para bajar aún más los niveles de Esg se usan RNAs interferentes contra *esg*, en las líneas heterocigotas *esg<sup>L4</sup>/UAS-esgRNAis*. Se observó que estas moscas que llevan los microRNAs contra *esg* bajaron los niveles de expresión de *escargot*, ocasionando la pérdida de la probóscide en moscas adultas (Figura 12). Esto llevó al desarrollo de la tesis doctoral de Fernando Rosales Bravo quien estudió el papel de *escargot* en el desarrollo del sistema gustativo y olfativo en adultos. Rosales, observó que este gen se expresa desde etapas embrionarias en la región cefálica y discos de labio. Su trabajo se enfocó en el papel de *escargot* en adultos (tesis doctoral).



**Figura 12. Individuo *esg<sup>L4</sup>/UAS-esgRNAis* sin probóscide**

En las moscas que llevan los RNAis contra *esg*, se observó que los bajos niveles de *escargot* ocasionaban la pérdida de la probóscide en moscas adultas. (Rosales, 2019)

Para llevar a cabo este proyecto y evaluar si la mutación en *escargot* afecta el sentido del gusto en larvas, nos basamos en el reporte de Kim y colaboradores del año 2015 en donde estudiaron exhaustivamente las respuestas de sabor amargo de las larvas utilizando ensayos de comportamiento de 2 opciones. Ellos dividen una caja de Petri en 4 secciones. Colocan agarosa con sacarosa en baja concentración (20 mM) en dos de ellas y agarosa con sacarosa en alta concentración (200 mM) con una sustancia amarga en las otras dos y cuentan cuántas larvas hay en cada sección. Esto porque se sabe que normalmente las larvas prefieren sacarosa de mayor concentración, pero si la de mayor concentración se mezcla con un compuesto amargo, dependiendo de la concentración del compuesto amargo, la preferencia se desplaza hacia la sacarosa de menor concentración. Obtienen graficas como la que se muestra en la figura 13.



**Figura 13. Grafica de los I.P de la línea *w<sup>1118</sup>* y *Gr-GAL4* sometidas a 9 compuestos amargos**

En esta gráfica se muestran los diferentes índices de preferencia de 9 compuestos amargos que provocan un comportamiento aversivo, dependiendo de la dosis del compuesto amargo. La línea discontinua indica el I.P de cuando no se añadió compuesto amargo a la sacarosa de 200 mM. (Kim H., M. S. Choi, K. J. Kang & J. J. Kwon. "Behavioral analysis of bitter taste perception in *Drosophila* larvae" 2015. [Figure 1. In 2 choice assays, *Drosophila* larvae show aversive behavior toward bitter tastants] *Chemical senses*. 41(1): 87p).

Los resultados arrojaron que las larvas prefieren el cuadrante que tiene más sacarosa (200 mM) mezclada con el compuesto amargo; pero a medida que aumentan las concentraciones de los compuestos amargos, la preferencia se desplaza hacia la sacarosa de 20 mM.

## 4. Justificación

*escargot* es un gen que lleva a cabo diferentes funciones, y cuyas mutaciones han sido correlacionadas con varias enfermedades en humanos, por ello es importante entender a detalle cuál es su papel en los diferentes procesos en los que participa. Dado que existen evidencias que han demostrado que *escargot* tiene un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso central y periférico de la mosca adulta, sin embargo, no se ha descrito el papel de *escargot* en el desarrollo de órganos sensoriales de larva, el presente trabajo tiene como objetivo determinar si la pérdida de función de *escargot* afecta el sistema del gusto en larvas.

## 5. Hipótesis

El gen *escargot* participa en el desarrollo del sistema gustativo de larvas por lo que la pérdida de función de este gen, alterará la percepción de sustancias sápidas de larvas.

## 6. Objetivos

### Generales

Determinar si la pérdida de función de *escargot* altera el sistema del gusto en larvas de la línea mutante *esg<sup>L4</sup>*

### Específicos

Corroborar por medio de una cruce entre *esg<sup>L4</sup>* y una línea que tiene a la GFP bajo las secuencias UAS, que *esg<sup>L4</sup>* tenga insertado el elemento  $P\{GawB\}$  en el gen *escargot* y que dirige a la GFP en el patrón de *esg*.

Evaluar la conducta gustativa en larvas de tercer estadio de la línea silvestre *w<sup>118</sup>* y la línea mutante *esg<sup>L4</sup>* cuando son sometidas a diferentes sustancias amargas como: cafeína, lobelina, nicotina y quinina.

## 7. Materiales y métodos

### 7.1 Ingredientes de la dieta de Diane o Down para el mantenimiento de *D. melanogaster*

*D. melanogaster* fue mantenida en botellas con comida hecha a base de levadura, agar, dextrosa, sacarosa, maíz molido (esterilizado) y ácido propiónico, a una temperatura de aproximadamente 24°C como lo indica el protocolo de Diane o Dowd (Oseguera, 2015).

Tabla 2. Ingredientes de la receta de comida de Diane o Down y peso de los mismos para realizar la comida de moscas *D. melanogaster*.

Ingredientes	Peso y volumen para 500 ml de agua	Peso y volumen para 1 L de agua	Peso y volumen para 1.5 L de agua	Peso y volumen para 2 L de agua
<b>Levadura</b> (comercial Magidely)	10.5 g	21 g	31.5 g	42 g
<b>Agar</b> (Sigma aldrich)	3.5 g	7 g	10.5 g	14 g
<b>Dextrosa</b> (Anhydrous J.T Baker)	24.37 g	48.74 g	73.11 g	97.48 g
<b>Sacarosa</b> (comercial)	10.5 g	21 g	31.5 g	42 g
<b>Maíz molido</b> (estéril)	30 g	60 g	90 g	120 g
<b>Acido propiónico</b> (Sigma aldrich)	2 ml	4 ml	6 ml	8 ml

Para elaborar esta dieta primeramente se debe calentar el agua esterilizada en una parrilla, posteriormente colocar los primeros cuatro ingredientes moviendo constantemente por 10 minutos hasta que hierva. Después se debe de agregar el maíz molido y dejar hervir por tres minutos más. Además para poder agregar el ácido propiónico la mezcla tiene que estar a una temperatura de entre 40-45 °C, y se debe de mover bien para incorporarlo. Por último se debe de vaciar 50 ml de la mezcla en las botellas, dejar que se enfríen, taparlas y meterlas al refrigerador (Oseguera, 2015).

## **7.2. Stocks de moscas *Drosophila melanogaster***

*esg<sup>L4</sup>* se generó en el laboratorio de la Dra. Narváez con una movilización del elemento *P{GawB}*. Como es homóciga letal, se mantiene estable con el cromosoma balanceador CyO, el cual, entre otras cosas, permite observar el fenotipo de alas curvas, pero también lleva arreglos que le impide recombinar con otro cromosoma 2. La línea que lleva la fusión *UAS-GFP* se utilizó como reportero del sitio de expresión de *esg* al cruzarla con *esg<sup>L4</sup>*. *w<sup>1118</sup>* se usó como control para ensayos de comportamiento ya que *esg<sup>L4</sup>* lleva este fondo genético. Estas dos líneas fueron obtenidas de Bloomington Stock Center en Indiana, Estados Unidos.

### 7.3. Cruza de la mutante con la línea *UAS-GFP* para corroborar la inserción del elemento *P{GawB}* en el gen *escargot* de la línea *esg<sup>L4</sup>*

Para asegurarnos que la línea mutante *esg<sup>L4</sup>* tiene insertado el elemento *P{GawB}* y es capaz de dirigir la expresión de GFP como el patrón endógeno de expresión de *esg*, se realizó una cruce con la línea *UAS-GFP* empleando el sistema UAS-GAL4.

Para dejar esto más claro, se tiene a *esg<sup>L4</sup>* la cual tiene a GAL4 bajo el promotor del gen *escargot*. Esta mosca expresa a GAL4 en las células donde se expresa *escargot*. Si cruzamos a moscas *esg<sup>L4</sup>* con moscas transgénicas que contengan el gen de la proteína verde fluorescente de medusa clonado bajo secuencias UAS (línea *UAS-GFP*), se tendrán larvas o moscas fluorescentes con el genotipo *esg<sup>L4</sup>/UAS-GFP* las cuales expresarán a la GFP en las regiones donde *escargot* está siendo expresado. Cabe mencionar que la fluorescencia en las larvas o moscas se monitorea utilizando un microscopio de fluorescencia.

Para la cruce se necesitan moscas hembras vírgenes de cualquiera de las dos líneas (*esg<sup>L4</sup>* o *UAS-GFP*), estas se deben de seleccionar de una línea ya que de la otra se van a tomar machos (no es necesario que sean vírgenes) para cruzarlos con las hembras.

Primero se toman pupas de los viales y se colocan una por cada tubo de ensayo, estos tubos de ensayo se tapan con un algodón. De acuerdo al ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, las moscas adultas eclosionan de los puparios de uno a dos días. Una vez que las moscas hayan eclosionado se duermen con hielo colocándolas en una caja Petri que debe de estar puesta sobre una charola con hielo (esto para evitar que las moscas se despierten y comiencen a volar) y después serán llevadas al microscopio estereoscópico para poder corroborar cuales son las hembras y los machos. Posteriormente en un vial con comida se deberán colocar 5 moscas hembras vírgenes con 5 machos, se pueden colocar varios viales, entre más viales se coloquen con la cruce de moscas de las dos líneas (*UAS-GFP* x *esg<sup>L4</sup>*) es más probable obtener descendencia de las mismas.

Los individuos de tercer estadio de la F1 se podrán encontrar del tercer al cuarto día. Estas larvas se deben colocar en una caja de vidrio de disección con 500  $\mu$ L de solución de TBE (Tris, borato y EDTA) al 0.5X (Tabla 3) y posteriormente deben ser montadas en un porta objetos para llevarlo al microscopio de fluorescencia y corroborar que algunos de los individuos presenten fluorescencia en los sitios donde se expresa *escargot*.

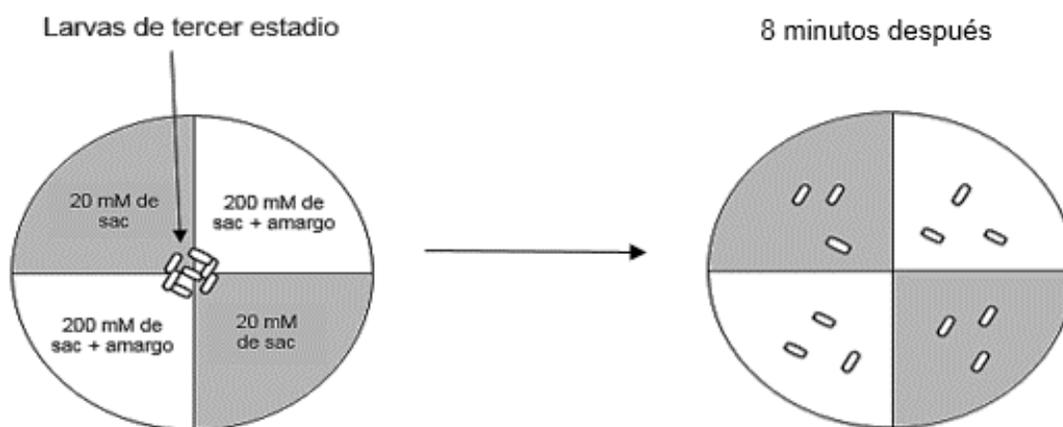
**Tabla 3. Ingredientes para el tampón de TBE**

<b>Sustancias</b>	<b>Peso y volumen para el stock de TBE (1 L)</b>
<b>Tris base</b>	54 g
<b>Ácido bórico</b>	27.5 g
<b>EDTA al 0.5 M (pH 8)</b>	20 ml
<b>H<sub>2</sub>O (Destilada)</b>	980 ml
<b>Para TBE al 5X</b>	Colocar el Tris base y el ácido bórico en un vaso de precipitado, posteriormente colocar 500 ml de H <sub>2</sub> O y mover la mezcla para incorporar bien las sustancias, después se le debe agregar los 20 ml de EDTA. Esta mezcla se debe pasar a una probeta y por último aforar hasta los 1000 ml (1 L).
<b>Para TBE al 0.5X</b>	Para obtener TBE al 0.5X se debe de tomar 100 ml del TBE al 0.5X en una probeta y después aforarlo hasta 1000 ml (1 L) con H <sub>2</sub> O. Por ultimo esta solución deberá ser guardada en botellas esterilizadas.

#### 7.4. Experimentos gustativos conductuales con larvas *Drosophila melanogaster*

El procedimiento para realizar los experimentos gustativos conductuales lo utilizó Kim y colaboradores en el año 2016 y consiste en: Transferir el mayor número de moscas a botellas con alimento fresco cada 12h, y realizar los experimentos con las larvas de los viales 5 días después de la puesta de huevos.

Preparar cajas de Petri (90 mm de diámetro) con agar al 1.5% y con sacarosa cristal J.T Baker a 20 mM (llenar a la mitad, 25 ml de la sustancia), dejar solidificar el agar, dividir en cuatro cuadrantes con una navaja de afeitar y quitar dos, estos dos cuadrantes vacíos se llenarán con agar al 1.5% más sacarosa a 200 mM y la sustancia amarga a utilizar. Una vez que estén totalmente solidificadas las cajas con agar, se deben colocar 40 larvas de tercer estadio en el centro (las larvas a utilizar deben ser extraídas con un pincel de punta fina de los viales y lavarlas 3 veces con agua destilada antes de usarlas en los experimentos) y dejarlas por un lapso de 8 minutos (Figura 14), para después tomar una foto y realizar el conteo para obtener el I.P (índice de preferencia).



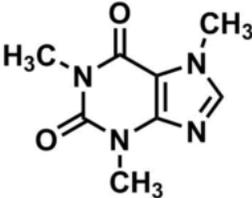
**Figura 14. Representación de los experimentos conductuales**

Representación de una caja de Petri la cual tiene 4 cuadrantes alternados (dos con 20 mM de sacarosa y dos con 200 mM de sacarosa + la sustancia amarga) y en el centro se observan larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster*, las cuales se dejaron en un lapso de 8 minutos y pasado el tiempo se observa cómo se movieron a los diferentes cuadrantes. (Kim H., M. S. Choi, K. J. Kang & J. J. Kwon. "Behavioral analysis of bitter taste perception in *Drosophila* larvae" 2015. [Figure 1. In 2 choice assays, *Drosophila* larvae show aversive behavior toward bitter tastants] Chemical senses. 41(1): 87p).

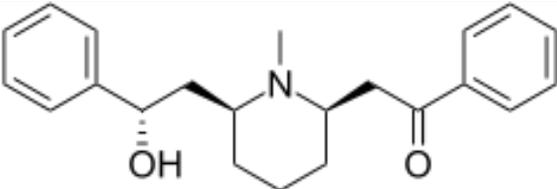
## 7.5. Sustancias amargas

A continuación se muestran cuatro tablas en las cuales se indican las sustancias amargas a utilizar, sus características y cómo se deben emplear en los experimentos.

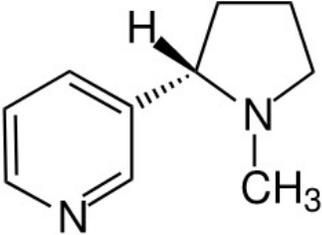
**Tabla 4. Información de la Cafeína**

Sustancia	<b>Cafeína (CAF) (27600, Sigma)</b>
Características generales	Es un constituyente natural presente en más de 60 especies de plantas. Es un polvo inodoro, incoloro y amargo, su fórmula química es: C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> .
Estructura química	 <p><b>Figura 15. Estructura química de la cafeína</b></p> <p>Estructura química de la cafeína. (Wikipedia (2019). Cafeína [Figura. Structure of caffeine] Recuperado de: <a href="https://es.wikipedia.org/wiki/Cafe%C3%ADna#/media/Archivo:Koffein_-_Caffeine.svg">https://es.wikipedia.org/wiki/Cafe%C3%ADna#/media/Archivo:Koffein_-_Caffeine.svg</a>)</p>
Peso g/mol	194.14
Solubilidad	666 mg/ml se disuelven en H <sub>2</sub> O hirviendo
Molaridad a utilizar	1 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM
NOTA	La cafeína se disuelve mejor en líquidos calientes.

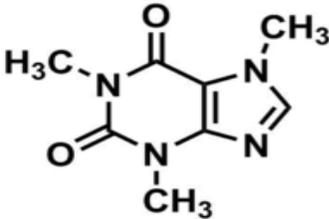
**Tabla 5. Información de la Lobelina**

Sustancia	<b>(-)-Hidrocloruro de lobelina (LOB) (141879, Aldrich)</b>
Características generales	Es un alcaloide que se encuentra en varias plantas, entre ellas la <i>Lobelia inflata</i> , <i>Lobelia tupa</i> , <i>Lobelia cardinalis</i> entre otras. Este polvo de sabor amargo es incoloro e inodoro y su fórmula es C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>2</sub> .
Estructura química	 <p><b>Figura 16. Estructura química de la lobelina</b></p> <p>Estructura química de la lobelina. (Wikipedia (2019). Lobelina [Figura. Chemical structure of lobeline (8,10-diphenyllobelionol; inflatine)] Recuperado de: <a href="https://es.wikipedia.org/wiki/Lobelina#/media/Archivo:Lobelina_structur e.svg">https://es.wikipedia.org/wiki/Lobelina#/media/Archivo:Lobelina_structur e.svg</a></p>
Peso g/mol	373.92
Solubilidad	0.08 g/ml se disuelven en Etanol
Molaridad a utilizar	1 mM y 5 Mm
NOTA	Como la lobelina se disuelve en etanol, esta se debe de colocar a temperatura ambiente para que el etanol no se evapore con el calor.

**Tabla 6. Información de la Nicotina**

Sustancia	(-)-Nicotina ≥99% (GC), líquida (N3876)
Características generales	Es un compuesto que se encuentra en la planta del tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> ). Es un potente veneno y se usado como insecticida. Su fórmula química es C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> .
Estructura química	<div style="text-align: center;">  <p><b>Figura 17. Estructura química de la nicotina</b></p> <p>Estructura química de la nicotina. (Wikipedia (2019). Nicotina [Figura. Structure of nicotine] Recuperado de: <a href="https://es.wikipedia.org/wiki/Nicotina#/media/Archivo:Nikotin_-_Nicotine.svg">https://es.wikipedia.org/wiki/Nicotina#/media/Archivo:Nikotin_-_Nicotine.svg</a>)</p> </div>
Peso g/mol	162.23
Solubilidad	Soluble en H <sub>2</sub> O
Molaridad a utilizar	10mM, 50 mM y 100 mM
NOTA	La nicotina es una sustancia altamente peligrosa, se debe de manipular con todo el equipo de laboratorio necesario. Esta sustancia se debe de colocar a temperatura ambiente.

**Tabla 7. Información de la Quinina**

Sustancia	<b>Hidrocloruro de quinina dihidrato (QUI) (22630 Sigma)</b>
Características generales	Es un alcaloide natural, blanco y cristalino de sabor amargo que proviene de la corteza del árbol llamado quino. Su fórmula química es C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .
Estructura química	 <p><b>Figura 18. Estructura química de la quinina</b></p> <p>Estructura química de la quinina. (Wikipedia (2019). Quinina [Figura. Skeletal formula of quinine] Recuperado de: <a href="https://es.wikipedia.org/wiki/Quinina#/media/Archivo:Quinine_structure.svg">https://es.wikipedia.org/wiki/Quinina#/media/Archivo:Quinine_structure.svg</a></p>
Peso g/mol	396.91
Solubilidad	0.162 g en 1 ml de etanol
Molaridad utilizar	a 1 mM, 10 mM y 50 mM
NOTA	La quinina debe de colocarse cuando esté a una temperatura media para para que el etanol no se evapore y la quinina pueda disolverse por completo.

Para todas las sustancias, primero se prepara la agarosa con sacarosa sin la sustancia amarga, se deja que se solidifique, se cortan dos cuadrantes alternados y después se prepara la agarosa con sacarosa y la sustancia amarga y se vierte en los cuadrantes vacíos.

## 7.6. Índice de preferencia I.P

El índice de preferencia se calcula de la siguiente forma:

$$I.P = \frac{[(N \text{ 200mM SAC} + \text{amargo}) - (N \text{ 20mM SAC})]}{[N \text{ total}]}$$

- **I.P** = Índice de preferencia
- **N 200mM SAC + amargo** = Número de larvas en el cuadrante que tiene sacarosa a 200 mM + el amargo.
- **N 20mM SAC** = Número de larvas que se encuentran en el cuadrante que tiene sacarosa a 20mM.
- **N total** = Número total de larvas encontradas en los cuatro cuadrantes.

Un I.P inferior a 0 indica aversión, mientras que un I.P superior a 0 indica atracción.

## 8. Resultados

### 8.1 Cruza de la línea *esg<sup>L4</sup>* con la línea *UAS-GFP*

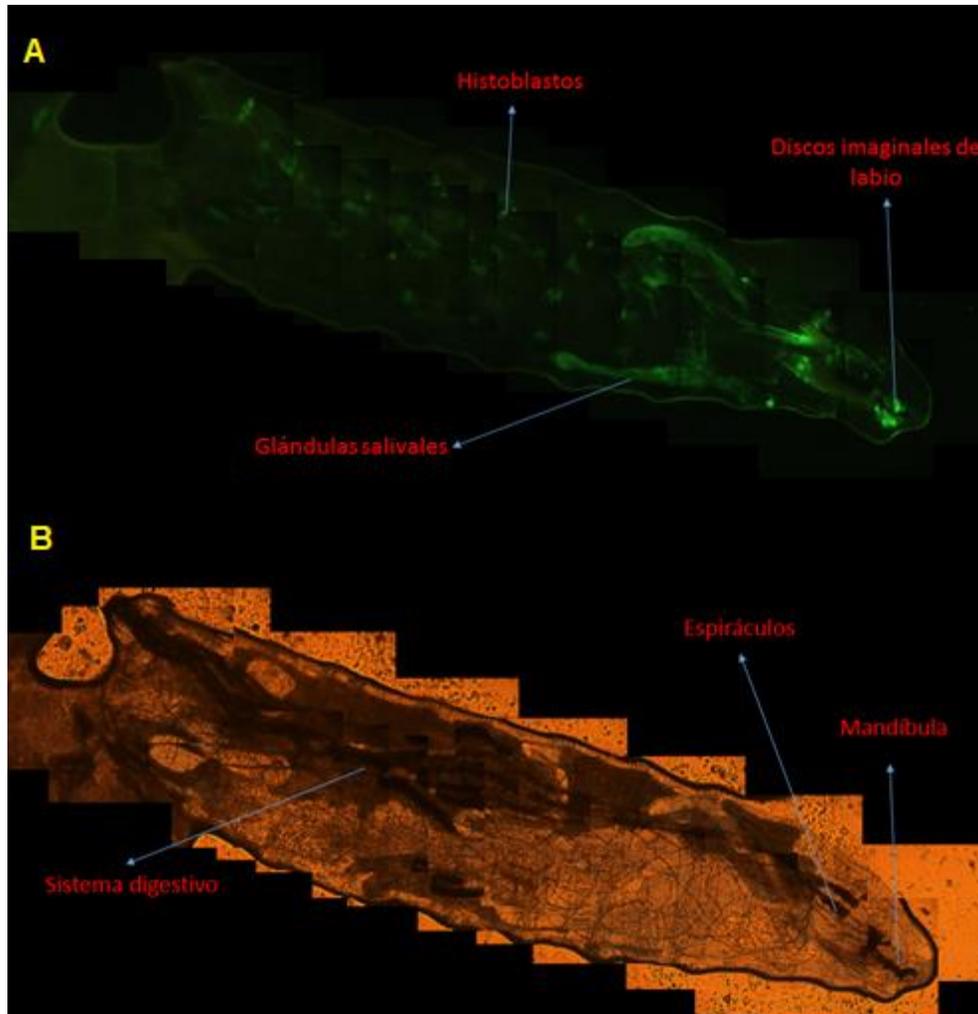
Se realizó una cruce de 5 hembras vírgenes de la línea *esg<sup>L4</sup>* con 5 machos de la línea *UAS-GFP* homociga (cuadro 1) y se colocaron 10 viales con la cantidad de 10 individuos por cada uno. Al cuarto día se encontraron larvas de tercer estadio las cuales se observaron en el microscopio de fluorescencia para corroborar la expresión de GFP bajo el promotor de *escargot*.

Machos   Hembras	<i>UAS-GFP</i>	<i>UAS-GFP</i>
<i>esg<sup>L4</sup></i>	<u><i>esg<sup>L4</sup></i></u> <i>UAS-GFP</i>	<u><i>esg<sup>L4</sup></i></u> <i>UAS-GFP</i>
CyO	<u>CyO</u> <i>UAS-GFP</i>	<u>CyO</u> <i>UAS-GFP</i>

**Cuadro 1. Cruza entre la línea *esg<sup>L4</sup>* y *UAS-GFP***

Cuadro de Punnet que muestra la descendencia F1 de la cruce entre una hembra virgen de la línea *esg<sup>L4</sup>* y un macho de la línea *UAS-GFP*. En los cuadros rojos se encuentra el genotipo de los individuos que tendrán un fenotipo de ojos rojos y alas normales. En los cuadros naranjas se encuentra el genotipo de los individuos que presentarán un fenotipo de ojos naranjas y alas curvas.

Como se mencionó anteriormente, se seleccionaron larvas de tercer estadio para observarse en el microscopio de fluorescencia. Se observó la expresión de GFP en los histoblastos, glándulas salivales y discos imaginales de labio, comprobando que la línea *esg<sup>L4</sup>* efectivamente dirige la expresión de GFP en el patrón reportado de *esg* (Figura 19. Los resultados fueron los siguientes.



**Figura 19. Expresión de GFP dirigida por *esg<sup>L4</sup>***

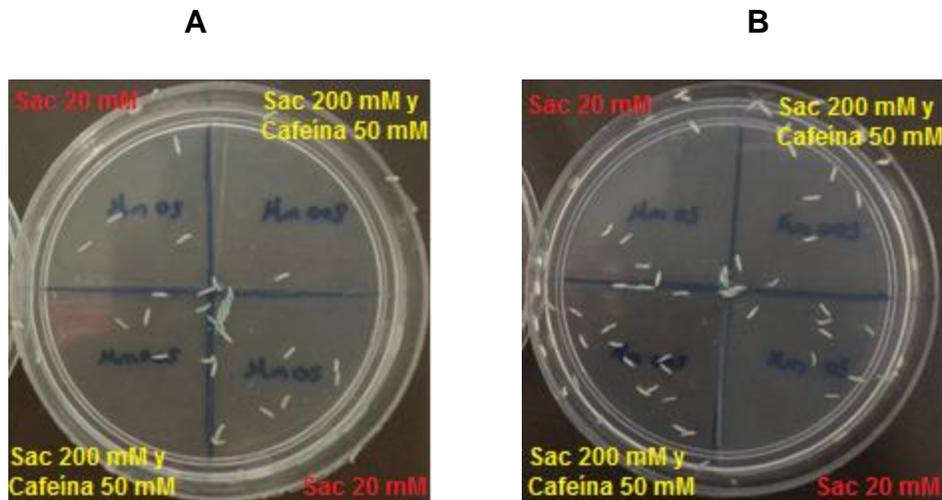
En el panel A se muestra una larva *esg<sup>L4</sup>/UAS-GFP* de tercer estadio vista en el microscopio de fluorescencia (Axiovert 200, ZEISS al 10x) en la que se observa la expresión de *escargot* en los discos imaginales de labio, las glándulas salivales y los histoblastos. En el panel B se observa el mismo individuo perteneciente al panel A (larva *esg<sup>L4</sup>/UAS-GFP* de tercer estadio) visto en el microscopio de fluorescencia (Axiovert 200, ZEISS al 10x) sólo con luz transmitida. Se observa la mandíbula, los espiráculos y el sistema digestivo.

## 8.2 Experimentos para evaluar la conducta gustativa

Para poder seleccionar larvas del mismo estadio fue un tanto complicado debido a que algunas larvas de tercer estadio comenzaban a formar el pupario minutos después de ser seleccionadas. Por lo tanto se optó por hacer comida a base de maíz como lo indica la receta mencionada anteriormente, pero esta vez de color azul. Por cada dos litros de comida se añadieron 0.50 gramos del colorante azul brillante (en inglés: Brilliant blue). Posteriormente las moscas se colocaron en los viales para reproducirse y obtener descendencia. Las larvas de tercer estadio se identificaron por tener un tamaño grande a comparación de las demás larvas y por tener los intestinos color azul. Si las larvas eran de tercer estadio pero no presentaban dicha coloración no se seleccionaban para realizar los experimentos, porque las larvas que aún están en el tercer estadio suelen comer y las que ya están a punto de pupar defecan y quedan sin nada en el aparato digestivo. Se realizaron 8 experimentos (8 cajas de Petri) por cada concentración de las sustancias amargas (cafeína, lobelina, nicotina y quinina) a utilizar. Los resultados de los índices de preferencia se promediaron y graficaron. Se usó un ANOVA (Análisis de varianza) de dos vías seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Sidak's para comparar el comportamiento de la línea control ( $w^{118}$ ) con larvas de la línea *esg<sup>L4</sup>* (\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  y ns (no significativo)). Las barras de error representan la desviación estándar.

### 8.2.1. Experimentos conductuales gustativos con larvas $w^{118}$ y $esg^{L4}$ empleando cafeína

Los experimentos conductuales gustativos se iniciaron probando la cafeína. En la figura 20A, se presenta un ejemplo del ensayo conductual, que se llevó a cabo en larvas de la línea  $w^{118}$ . Se puede apreciar que hay un mayor número de larvas ubicadas en los cuadrantes que contienen sacarosa a 20 mM. Por otro lado en la figura 20B se muestra un ejemplo del ensayo realizado con individuos de la línea  $esg^{L4}$ . Aquí se observa que hay un mayor número de larvas localizadas en los cuadrantes que contienen sacarosa a 200 mM + cafeína a 50 mM.



**Figura 20. Experimentos de conducta gustativa**

Caja Petri A con larvas  $w^{118}$  y caja de Petri B con larvas  $esg^{L4}$ , ambas con cafeína a 50mM.

Posteriormente se procedió a sacar el índice de preferencia de cada experimento, sumarlos y dividirlos entre 8. En la tabla 8 se muestran los promedios de los índices de preferencia cuando la cafeína se probó con larvas  $w^{118}$  y  $esg^{L4}$  en concentraciones de 0 mM, 1 mM, 10 mM, 50 mM y 100 mM.

Tabla 8. Índice de preferencia de las larvas  $w^{1118}$  y  $esg^{L4}$  usando cafeína

mM de cafeína	I.P de larvas usando cafeína		Desviación estándar	
	$w^{1118}$	$esg^{L4}$	$w^{1118}$	$esg^{L4}$
0 mM	0.72	0.79	0.18	0.08
1 mM	0.69	0.75	0.19	0.14
10 mM	0.59	0.61	0.18	0.13
50 mM	-0.44	0.15	0.21	0.15
100 mM	-0.82	-0.46	0.10	0.20

En la figura 21 se muestran los índices de preferencia, en ella se puede observar que las larvas de las dos líneas en las concentraciones de 1 mM y 10 mM de cafeína, prácticamente no perciben la sustancia amarga. Sin embargo, a partir de 50 mM de cafeína, la línea control ya la percibe como aversiva, mientras que para  $esg^{L4}$ , todavía es atractiva, siendo el I.P entre ellas significativamente diferente. A la concentración de 100 mM esta resulta aversiva para ambas líneas, pero claramente  $esg^{L4}$  responde menos a la cafeína que la línea  $w^{1118}$ .

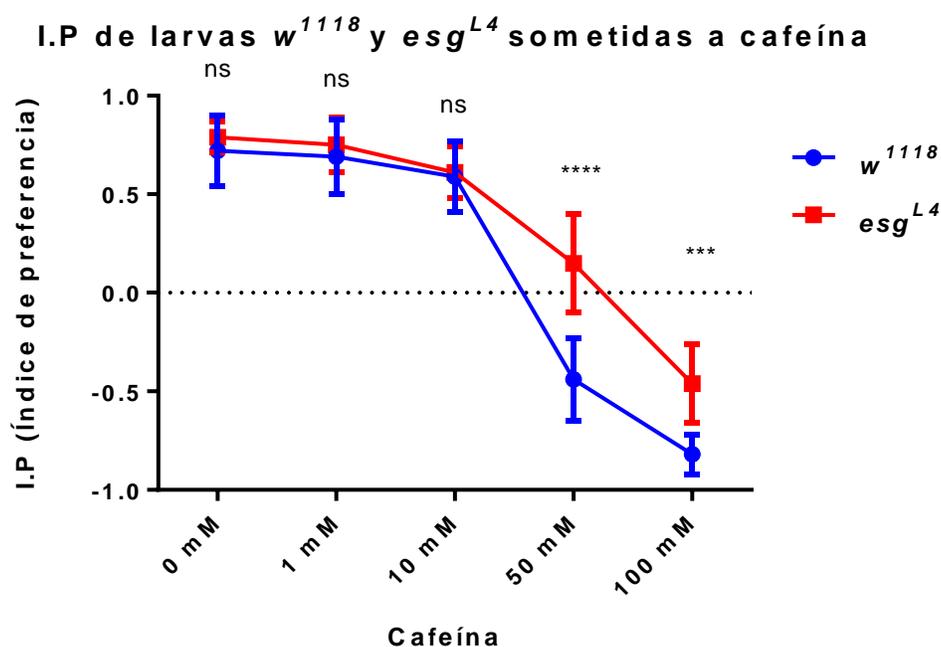


Figura 21. I.P de larvas  $w^{1118}$  y  $esg^{L4}$  sometidas a cafeína

En esta gráfica se muestran los promedios de los diferentes índices de preferencia de la línea  $w^{1118}$  y  $esg^{L4}$  sometidas a cafeína, la cual provoca un comportamiento aversivo en larvas de tercer estadio de las dos líneas dependiendo de la dosis del compuesto amargo.

El procedimiento anterior se realizó de igual manera para cada sustancia. A continuación se presentan los resultados de la lobelina, nicotina y quinina.

### 8.2.2. Experimentos conductuales gustativos con larvas $w^{1118}$ y $esg^{L4}$ empleando lobelina

En la tabla 9 se encuentran los promedios de los índices de preferencia cuando la lobelina fue utilizada con larvas  $w^{1118}$  y  $esg^{L4}$  a concentraciones de 0 mM, 1 mM y 5 mM. La figura 22 muestra que a las larvas de línea  $w^{1118}$  ya desde la concentración de 1 mM les resulta aversiva, mientras que para las larvas de la línea  $esg^{L4}$  ni siquiera a 5 mM les resulta aversiva. Esto significa que  $esg^{L4}$  tiene reducida su sensibilidad para percibir la lobelina.

Tabla 9. Índice de preferencia de las larvas  $w^{1118}$  y  $esg^{L4}$  usando lobelina

mM de lobelina	I.P de larvas usando lobelina		Desviación estándar	
	$w^{1118}$	$esg^{L4}$	$w^{1118}$	$esg^{L4}$
0 mM	0.72	0.79	0.18	0.08
1 mM	-0.09	0.74	0.25	0.16
5 mM	-0.79	0.4	0.11	0.08

I.P de larvas  $w^{1118}$  y  $esg^{L4}$  sometidas a lobelina

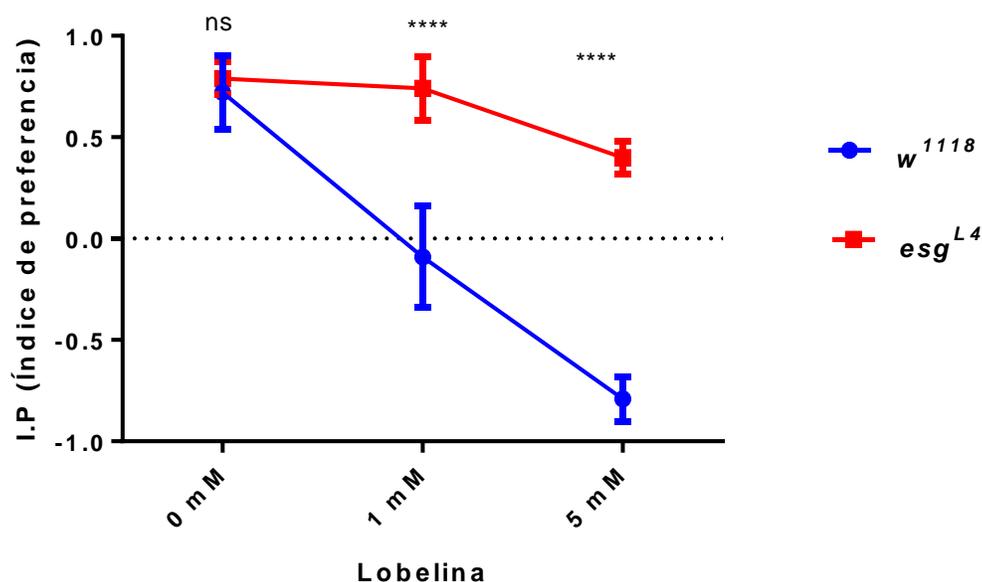


Figura 22. I.P de larvas  $w^{1118}$  y  $esg^{L4}$  sometidas a lobelina

Se observan los promedios de los índices de preferencia de las líneas  $w^{1118}$  y  $esg^{L4}$  cuando son sometidas a 0 mM, 1 mM y 5 mM de lobelina.

### 8.2.3. Experimentos conductuales gustativos con larvas $w^{1118}$ y $esg^{L4}$ empleando quinina

Tabla 10. Índice de preferencia de las larvas  $w^{1118}$  y  $esg^{L4}$  usando quinina

mM de quinina	I.P de larvas usando quinina		Desviación estándar	
	$w^{1118}$	$esg^{L4}$	$w^{1118}$	$esg^{L4}$
0 mM	0.72	0.79	0.18	0.08
10 mM	0.64	0.70	0.30	0.10
50 mM	-0.24	0.50	0.24	0.36

En la tabla anterior se encuentran los promedios de los índices de preferencia cuando la quinina fue utilizada con larvas  $w^{1118}$  y  $esg^{L4}$  a concentraciones de 0 mM, 10 mM y 50 mM, los cuales aparecen ya graficados en la figura 23. Aquí también podemos observar que la línea  $esg^{L4}$  percibe menos la quinina ya que a 50 mM sigue siendo atrayente, mientras que para  $w^{1118}$  es repelente.

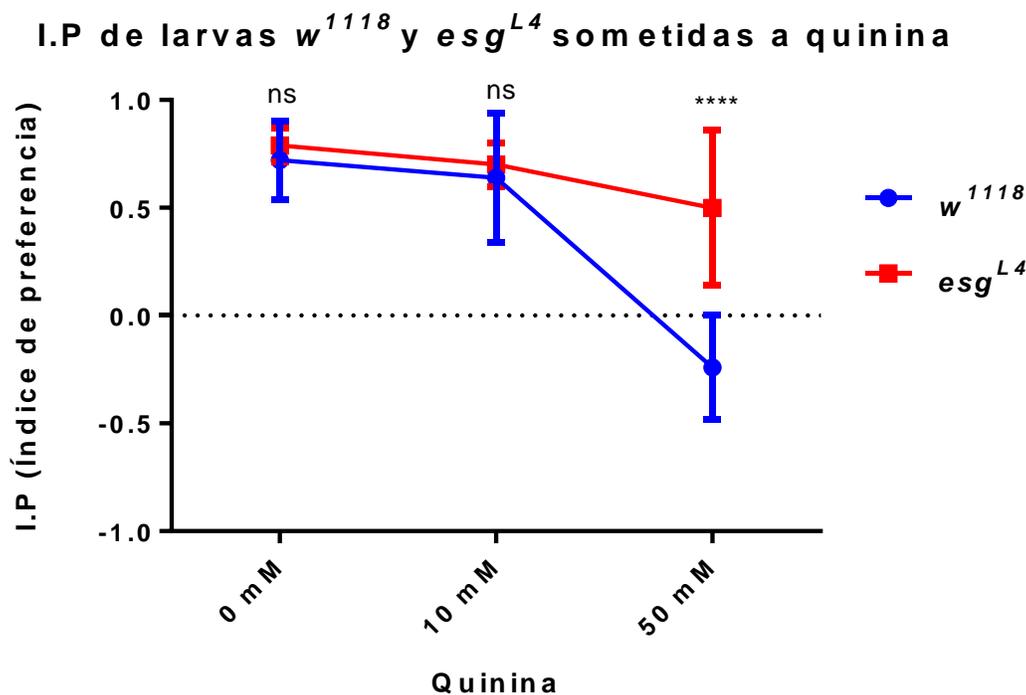


Figura 23. I.P de larvas  $w^{1118}$  y  $esg^{L4}$  sometidas a quinina

Se encuentran graficados los promedios de los índices de preferencia de larvas de tercer estadio de la línea  $w^{1118}$  y  $esg^{L4}$  sometidas 0,10 y 50 mM de quinina.

### 8.2.4. Experimentos conductuales gustativos con larvas $w^{1118}$ y $esg^{L4}$ empleando nicotina

De igual manera la tabla 11 contiene los promedios de los índices de preferencia cuando la nicotina fue probada en larvas de individuos  $w^{1118}$  y  $esg^{L4}$  a concentraciones de 0 mM, 1 mM, 10 mM, 50 mM y 100 mM. En la figura 24 es notorio que a las concentraciones de nicotina estudiada, ésta no resultó ser aversiva para ninguna de las dos líneas estudiadas.

Tabla 11. Índice de preferencia larvas  $w^{1118}$  y  $esg^{L4}$  usando nicotina

mM de nicotina	I.P de larvas usando nicotina		Desviación estándar	
	$w^{1118}$	$esg^{L4}$	$w^{1118}$	$esg^{L4}$
0 mM	0.72	0.79	0.18	0.08
10 mM	0.78	0.83	0.11	0.10
50 mM	0.89	0.77	0.08	0.80
100 mM	0.81	0.87	0.08	0.09

### I.P de larvas $w^{1118}$ y $esg^{L4}$ sometidas a nicotina

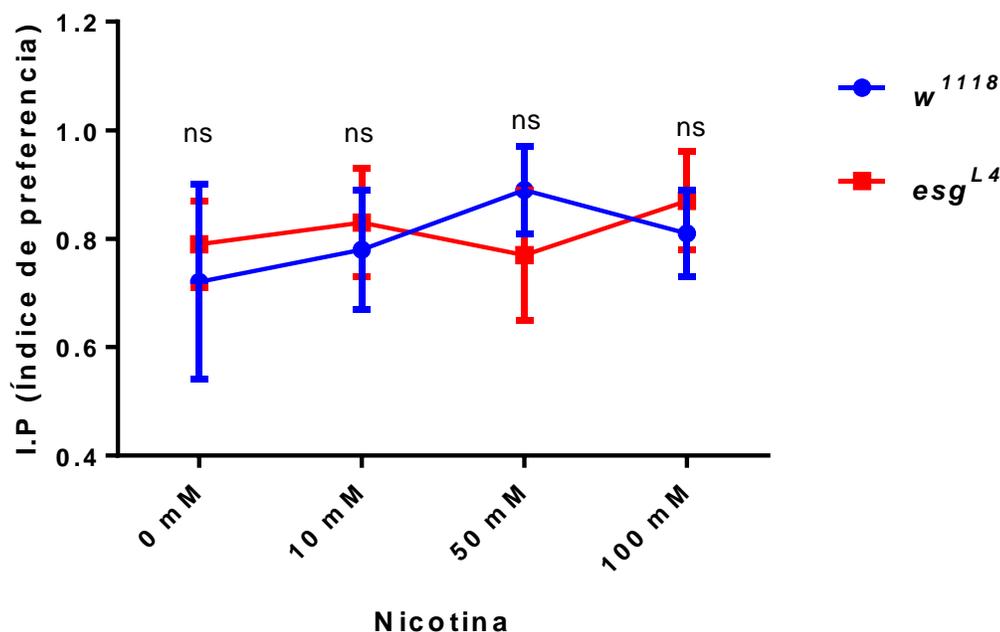


Figura 24. I.P de larvas  $w^{1118}$  y  $esg^{L4}$  sometidas a nicotina

Representación de los promedios de los índices de preferencia de las larvas de tercer estadio de la línea  $w^{1118}$  y la  $esg^{L4}$  sometidas a concentraciones de 0, 10, 50 y 100 mM de nicotina.

## 9. Discusión

De la cruce realizada entre la línea *esg<sup>L4</sup>* y la línea *UAS-GFP* se pudo comprobar que la línea *esg<sup>L4</sup>* tenía insertado el elemento *P{GawB}* bajo las secuencias regulatorias de *esg* ya que se observó la expresión de la GFP en el patrón de expresión de *escargot* en larvas de tercer estadio.

Como lo menciona la literatura (Freeman y Dahanukar, 2015; French et al., 2015; Oseguera, 2015; Chieh y Dahanukar, 2017), se sabe que las moscas *Drosophila melanogaster* se sienten atraídas por alimentos dulces y evitan comer alimentos amargos. Este es un comportamiento natural que les permite saber si el alimento es nocivo o no. En este trabajo se estudió el comportamiento de larvas de dos líneas transgénicas (*w<sup>1118</sup>* y *esg<sup>L4</sup>*) cuando fueron sometidas a diferentes sustancias amargas. Trabajos anteriores en el laboratorio ya habían demostrado que la mutación en el gen *esg* causa una alteración en la percepción gustativa en adultos (Rosales, 2014; Oseguera, 2015), sin embargo, no se sabía si esta alteración en el sentido del gusto puede estar afectando desde la etapa larvaria.

Liman y colaboradores en el año 2014 mencionan que los adultos presentan los receptores gustativos *Gr32a*, *GrR33a* y *Gr66a* y que son necesarios para la respuesta a la mayoría de sustancias amargas. En larvas los receptores *Gr33a* y *Gr66a* son los que están más expresados, pero también presentan los receptores *Gr89a* y *Gr93a*, los cuales reaccionan específicamente a L-canavanina y cafeína, aunque también son necesarios para detectar otros compuestos amargos. Nosotros pudimos observar que para la cafeína, lobelina y quinina, las larvas de la línea control *w<sup>1118</sup>* prefieren el cuadrante que tiene mayor concentración de sacarosa y menor concentración de la sustancia amarga. Pero esto cambia conforme se aumenta la concentración de la sustancia amarga, lo que indica que les resulta aversiva y prefieren comer del cuadrante que sólo tiene una concentración baja de sacarosa. Esto es lo esperado puesto que las larvas presentan los receptores gustativos *Gr33a* y *Gr66a* que son los que responden a las sustancias amargas probadas, pero también presentan los receptores *Gr89a* y *Gr93a* que son los que

reaccionaron específicamente a la cafeína. Sin embargo, se observa que las larvas de la línea *esg<sup>L4</sup>* que comieron de los cuadrantes que contenían sacarosa con baja y media concentración de sustancias amargas no les causó aversión, sino hasta concentraciones mayores. Esto nos indica que la percepción de sustancias amargas está alterada en las larvas de la línea *esg<sup>L4</sup>*, lo cual pudiera ser por alguna alteración en la expresión de ciertos receptores gustativos causada por la mutación de *esg*. Se ha reportado en adultos que la sobre-expresión de *esg* induce la expresión ectópica de dos receptores (*Gr21a* y *Gr63a*) en los palpos maxilares, lo que causa que ahora se detecte el CO<sub>2</sub> de forma atrayente (cuando normalmente *Drosophila* lo percibe como repelente) (Hartl et al., 2011). Es posible que una pérdida en la dosis normal de *esg* como sucede en *esg<sup>L4</sup>*, altere la expresión de los receptores necesarios para percibir las sustancias que nosotros probamos.

Por otro lado, el caso de la nicotina es distinto ya que ambas líneas respondieron de forma similar sin que ninguna de las concentraciones probadas les resultara aversivas. Cabe mencionar que la concentración de 100 mM si les resulta aversiva a las moscas adultas (Oseguera, 2015) y que la línea *esg<sup>L4</sup>* es más sensible a la nicotina que la línea *w<sup>118</sup>*. Es interesante que justo la forma en la que se aisló la línea *esg<sup>L4</sup>* fue por su alta sensibilidad a la nicotina ya que al exponer a adultos de esta línea a nicotina volatilizada se paralizan por más tiempo que la línea control. Sin embargo, en larvas no encontramos diferencia en su percepción gustativa hacia la nicotina entre *esg<sup>L4</sup>* y la línea control. Esto enfatiza la diferencia que existe entre el sistema gustativo en larvas y adultos. La diferencia en percepción a la nicotina pudiera deberse a que las larvas no expresen los receptores gustativos necesarios para detectar a la nicotina. Sin embargo, el hecho de que la línea *esg<sup>L4</sup>* tenga alterada la percepción de las otras tres sustancias amargas probadas, apoya nuestra hipótesis que *esg* participa en el desarrollo de los órganos gustativos desde larva, aunque la forma exacta en la que participa durante la etapa larvaria y en adulto pudiera variar en cuanto a los receptores que puedan verse alterados.

Un fenómeno de relevancia en la actualidad es el problema del colapso de las colmenas de abejas que han sido relacionadas al uso generalizado de insecticidas nicotinoides. Algunos estudios han visto que estos insecticidas, que se basan en moléculas semejantes a la nicotina, al parecer son atractivos para las abejas. En este proyecto pudimos comprobar que al menos en el estadio de larva, la nicotina a altas concentraciones no les es aversiva, lo que puede indicar que efectivamente para ciertos insectos los insecticidas neonicotinoides pudieran no ser repelentes.

## 10. Conclusiones

- La técnica UAS-GAL4 permitió corroborar que la línea mutante tenía insertado el elemento  $P\{GawB\}$  en el gen *escargot* y funciona para dirigir la expresión de GFP en el patrón de expresión endógeno de *escargot*.
- Las larvas de la línea  $w^{118}$  y  $esg^{L4}$  presentan los receptores gustativos *Gr33a* y *Gr66a* ya que son los que respondieron a lobelina y quinina, pero también presentan los receptores *Gr89a* y *Gr93a* que son los que reaccionaron específicamente a la cafeína.
- Se pudo observar que la línea  $esg^{L4}$  tiene afectada su percepción a sustancias amargas ya que sólo las percibe a altas concentraciones. Esto puede ser debido a la mutación que lleva en el gen *escargot*.
- Las larvas de la línea  $esg^{L4}$  a pesar de estar mutadas ponen en acción su mecanismo de defensa, ya que cuando prueban los cuadrantes con una alta concentración de sustancia amarga les causa aversión, por lo tanto para ellas eso indica que el alimento puede ser peligroso para su consumo o no apto para depositar sus huevos en él.
- A las larvas de línea  $w^{118}$  y  $esg^{L4}$  la nicotina no les resultó aversiva, esto puede ser debido a que los receptores gustativos que reaccionan a nicotina no se expresan en larva, sólo en adultos.

## 11. Perspectivas

### 11.1. Perspectivas a corto plazo: Comprobar si la línea *esg<sup>L4</sup>/UAS-esgRNAis* tiene dañado completamente el sentido del gusto

Rosales en el año 2014 utilizó a *Drosophila* como modelo para identificar factores genéticos que están implicados en la sensibilidad a la nicotina para poder generar nuevos conocimientos que ayuden a tratar la adicción a la nicotina. Para este estudio utilizó diferentes líneas, una de ellas fue la línea *esg<sup>L4</sup>/UAS-esgRNAis*; la cual llevaba a los microRNAs contra *esg* provocando una disminución en los niveles de expresión de *escargot*, ocasionando la pérdida de la probóscide en moscas adultas. Como se mencionó anteriormente, *escargot* está involucrado en el desarrollo del sistema gustativo, por lo tanto sería interesante utilizar esta misma línea para comprobar por medio de experimentos conductuales gustativos si con los bajos niveles de *escargot* que presenta, aun percibe las sustancias amargas o tiene dañado el sistema gustativo.

### 11.2. Perspectivas a mediano plazo: Determinar si la mutación en *esg* afecta el sentido del olfato

Al parecer una mutación en *escargot* afecta el sentido del gusto tanto en adultos como en larvas, sin embargo, los órganos gustativos de adulto y los de larva vienen de tejidos distintos. Los órganos larvarios vienen de tejido embrionario de la zona anteno-maxilar, mientras que los de adulto se originan a partir del disco imaginal de labio. Se ha demostrado la expresión de *escargot* en los discos imaginales, pero no está claro si se expresa en la zona anteno-maxilar del embrión. Se deberá verificar con cuidado si *escargot* se expresa en esta región. Por otro lado, los órganos gustativos de la larva se encuentran íntimamente relacionados con los órganos olfativos y ambos provienen de la misma región, por lo que es probable que también se encuentre alterado su sistema olfativo. Se tendrá que evaluar esto por medio de

ensayos de comportamientos olfativos en larvas de las líneas  $w^{118}$ ,  $esg^{L4}$  y  $esg^{L4}/UAS-esgRNAis$ .

### **11.3. Perspectivas a largo plazo: Caracterizar los receptores gustativos expresados en larva y a qué sustancias responden**

Como se sabe, la mayoría de los receptores gustativos que se han caracterizado han sido en adultos *Drosophila*. En adultos, se ha logrado caracterizar el tipo de receptor que expresa cada neurona receptora gustativa y la sustancia a la que responde, pero en larvas aún no se ha logrado del todo. Por lo tanto sería excelente en un futuro poder caracterizar los receptores gustativos de larvas de las líneas  $w^{118}$ ,  $esg^{L4}$  y  $esg^{L4}/UAS-esgRNAis$  y saber a qué sustancias responden.

## 12. Referencias bibliográficas

Amrein H. & N. Thorne. (2005). Gustatory Perception and Behavior in *Drosophila melanogaster*. 15(17): 673-684.

Apostolopoulou, A., & A. Rist. (2015). Taste processing in *Drosophila* larvae. Front Integr Neurosci. 9 (50): 1-9.

Ashraf, S. I. & Y. Tony Ip. (2001). The Snail protein family regulates neuroblast expression of inscuteable and string, genes involved in asymmetry and cell division in *Drosophila*. Development 128: 4757- 4767.

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

Bohra A., B. Kallman y H. Reichert. (2018). Identification of a single pair of interneurons for bitter taste processing in the *Drosophila* brain. Cell press. 28(6): 847-858.

Chieh D. & A. Dahanukar. (2017). Molecular and cellular organization of taste neurons in adult *Drosophila* pharynx. 21: 2978- 2991.

Curtis H., N. Barnes, A. Schnek y A. Massarini. (2006). Invitación a la Biología. (6ª ed.). Panamericana. Madrid, España. 768 p.

Curtis H., N. Barnes, A. Schnek y A. Massarini. (2008). Biología. (7ª ed.). Panamericana. Madrid, España. 1009 p.

Fuse N., S. Hirose & S. Hayashi. (1996). Determination of wing cell fate by the *escargot* and the *snail* genes in *Drosophila*. Development. 122: 1059-1067.

Freeman G. & A. Dahanukar. (2015). Molecular neurobiology of *Drosophila* taste. Current opinion in neurobiology. 34: 140-148.

French S., M. Sellier & M. Agha. (2015) Dual mechanism of bitter avoidance in *Drosophila*. The journal of neuroscience. 39(9): 3990-4004.

Gendre N., K. Luer & Friche S. (2004). Integration of complex larval chemosensory organs into the adult nervous system of *Drosophila*. Development. 131: 83-92.

Hartl M., L. Loschek, D. Stephan & K. P. Siju. (2011). A New Prospero and *microRNA-279* pathway restricts CO<sub>2</sub> receptor neuron formation. The Journal of Neuroscience, 31(44): 15660 –15673.

Hayashi S., S. Hirose, T. Metcalfe & A. D. Shirras. (1993). Control of imaginal cell development by the *escargot* gene of *Drosophila*. Development. 118: 105-115.

Joseph R. & J. Carlson. (2015). *Drosophila* chemoreceptors: A molecular base between the chemical world and the brain. Trends in genetics. 31(12): 683-695.

Jeong P. & J. Young. (2011). Heterogeneous expression of *Drosophila* gustatory receptors in enteroendocrine cells. Plos one. 6(12): 1-7.

Kim H., M. S. Choi, K. J. Kang & J. J. Kwon. (2015) Behavioral analysis of bitter taste perception in *Drosophila* larvae. Chemical senses. 41(1): 85-94.

Li Y., Z. Pang., C. Wang & T. Cai. (2017). Transcription factor antagonism controls enteroendocrine cell specification from intestinal stem cells. Scientific reports. 7(988): 1-12.

Liman, E. R., Y. V. Zhang & C. Montell. (2014). Peripheral coding of taste. Neuron. 81(5): 984-1000.

Leptin, M. (1991). *twist* and *snail* as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. Genes. Dev. 5: 1568- 1576.

Miranda I. (2011). El sabor de los recuerdos: formación de la memoria gustativa. Revista digital universitaria. 12(3): 1-14.

Miyamoto T., J. Slone, X. Song & H. Amrein. (2012). A fructose receptor functions as a nutrient sensor in the *Drosophila* brain. Cell. 151: 1113-1125.

Oseguera T. (2015). Participación del gen *escargot* en el sentido del gusto de *Drosophila melanogaster*. Memoria de título, Lic.en ciencias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos., Fac. Cien. Cuernavaca, Morelos.

Rosales F. (2014). Implicación del gen *escargot* en la sensibilidad a nicotina volatilizada en *Drosophila melanogaster*. Memoria de título, Maestro en ciencias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos., Fac. Cien. Cuernavaca, Morelos.

Reynaud E. (2007). La mosca y tú (conócete a ti mismo). Biotecnología. 14: 43-52.

Rincón D., P. Fernández y D. Reséndez. (2009). De la genética de la mosca a la salud humana. Ciencia UANL. 1: 83-89.

Sánchez I., F. Rosales & J. Reyes (2015). The *esg* is involved in nicotine sensitivity in *Drosophila melanogaster*. Plos one. 10(7): 1-20.

Santalla M., E. L. Portiansky y P. Ferrero. (2016). *Drosophila melanogaster*, un modelo animal emergente en el estudio de enfermedades cardíacas humanas. Rev Argent Cardiol. 84: 424-430.

Seth K., A. Elchert & M Kahl. (2017). Dissection and immunofluorescent staining of mushroom body and photoreceptor neurons in adult *Drosophila melanogaster* brains. Jove. 129: 1-13

Simoneko A., N. Roshina, A. Kremetsova & E. Pasyukova. (2018). Reduced Neuronal Transcription of Escargot, the *Drosophila* Gene Encoding a Snail-Type Transcription Factor, Promotes Longevity. *Front Genet.* 9(151): 1-115.

Voog J., S. Sandall, G. Hime & L. Resende. (2014). *escargot* restricts niche cell to stem cell conversion in the *Drosophila* testis. *Cell reports.* 7: 722-734.

Cuernavaca, Mor., a 5 de octubre del 2020

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **Jessica Magali Montoya Martínez**, con el título del trabajo: **Participación del gen *escargot* en la respuesta gustativa de larvas *Drosophila melanogaster*** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR:      SI (  **X**  )              NO (\_\_\_\_)

A T E N T A M E N T E



\_\_\_\_\_  
**DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

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

### Sello electrónico

**MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2020-10-05 13:20:10 | Firmante**

FkDWDSTTaeBUa2kAlclCO2MPzIOQoJaH0jJ6jDEYE/n+Nq7UCRRK9anTbjklc9GLEvrRQ1mMpbAb1RCNI11P0qqsvZuvj6uW3wubjQ/Ffan9Ecg8QDJNLMa8J2KjQInVEvhj/1NWij9qeoYWgriXCR86zneEzEr0afALFFfKHWAdnX6uaNoODsyawoH3Wi1s2VN9VD0Jpfb2fP+tu5Wtcsn Cm2mJDI193J5CF85J2Tkn9uMhMwAaKJy8FdZmDIhPV2jNfQ62x30hfJmUsl.94BphQxln6akUlvoJ5GzdkJtYLSpZIVudAJ8W/5G4Bz1TJS6e4Q3M3ufVH4IkQQNRjSA==

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



[nxj5WA](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Z55YteeVeis8S4jhB6qd0Ec641GNvykm>



Cuernavaca, Mor., a 5 de octubre de 2020

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **Jessica Magali Montoya Martínez**, con el título del trabajo: **Participación del gen *escargot* en la respuesta gustativa de larvas *Drosophila melanogaster*** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR:      SI ()              NO ()

ATENTAMENTE



---

**DRA. VERÓNICA M. NARVÁEZ PADILLA**



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

**VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2020-10-05 18:10:33 | Firmante**

LS8hc2+1KmMa0o2+b89YozhuOY/u8dXHarJyxm3MzI/9fo9MQEWxPUIolgKR2ulVYCBdZaYPtodTo3bU68H9UnrcbT5jB6JdWvH70m/CeXT6d3pzveEu+cV+mpiPelSmRrwg5hsV  
oSP5s4DKGVUtgaQqLh+nLp6EoSDg/9U4LIAhIw9zp4LSmg5iNNbPBaL5jQOuGjxHVFFQ5bqjRTFXtMXdEIN2g6BZKAGjkU9OKqnHv6erhM5kAuckpZFXmJlz+m94CoV6oD1xK  
AmRgLLH4XUOObpGSnDtOMfGEtUTIT1tmJIXatxiyW+xznJJPj3Mg9FqsMn5qF1pszVoJChwo7g==

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



[fVL8kw](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/9ZTaBjnBsi5GtTchKweKGhY5wlxk4GaV>



Cuernavaca, Mor., a 7 de octubre de 2020

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **Jessica Magali Montoya Martínez**, con el título del trabajo: **Participación del gen *escargot* en la respuesta gustativa de larvas *Drosophila melanogaster*** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR:      SI ( X )              NO ( \_\_\_\_ )

A T E N T A M E N T E

---

**DRA. VERÓNICA OBREGÓN BARBOZA**



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

VERONICA OBREGON BARBOZA | Fecha:2020-10-07 12:51:11 | Firmante

kRZewYYADisSctVzaA8PcUTW+1d9Dc3Yfpci0wp9K+kX/HLZcplvF/kuX3qq3BtJKWmu5je2nrGApeVJscFXEZ92Dw45xPhbkr9y1Uz7VFTCajLEjU28VnmgzKHEww+y/+h/q2s3n6y1dcHOLONjMLXnXpOab7+Jtrn/Nkn2HCvHtvD81y44CFqhdrWZyP3sdRi7G0WDgWbpcqy2+4hlDo4KZ0ln3kObZhYyNAJ7H/BSCdVlpxG5wI6TVoUyljX2SBpLbipcZaeLNB2v7wmA3Xo/sVHZYin5AYVwJvAK6L0J/W6dmh6onanDmunaBCiebnApLirmajWpEnmBAPdCvqQ==

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



DiCK4m

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/sVZOWRzVhEugElcTSdTo0lNPBWYYybgm>



Cuernavaca, Mor.,\_ Octubre.05.2020\_\_\_\_

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **Jessica Magali Montoya Martínez**, con el título del trabajo: **Participación del gen *escargot* en la respuesta gustativa de larvas *Drosophila melanogaster*** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR:      SI ()      NO ()

A T E N T A M E N T E

*Luisa Barroso*

\_\_\_\_\_  
M. EN C. MARÍA LUISA BARROSO GARCÍA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

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

### Sello electrónico

**MARIA LUISA BARROSO GARCIA | Fecha:2020-10-05 19:36:09 | Firmante**

qXpzp3DDCruMfLBeT60Fp0bBGqhwHneySrfoubmTCzJhn/48S2nw596c+G9Sn8ndAiSJXVo9hAOgpyZ5PHj3AeTx27LTslgvCDKvseHBT1Y8Ej58UJZcJufw2UhG/E6hrOFTZ/s9I3DF7f87u4zaRvmUuQEB/VmEFtYyfQfMURVkcGvkcuT80zQh7mZ5h5mwr/AmPax0RxcwVxJ+2jASwEdh1OKTkOIIIB06Ud7DZluymGPPSMRCfKr2yPV/9JFcElavSSbh24yDHI t320Yr2XHzoCPk1Y0aJp8qeZZucbwApAle22rxjzMPjS7RzsyA+P3EDLMKoH0CQX25WQ==

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



fN02kq

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/P6dwGWrMWrGylPpsVQDkIx4Yeq0xGoXd>

