



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Caracterización de redes neuronales involucradas
en el apareamiento de *Drosophila melanogaster*.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

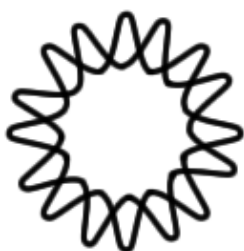
PRESENTA:

BIOL. ALEJANDRO GONZÁLEZ GALLINA

ASESOR DE TESIS: DR. ENRIQUE A. REYNAUD GARZA

TUTORES: DR. ALBERTO DARSZON

DR. ENRIQUE SALAS



CUERNAVACA, MORELOS. MARZO DEL 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción.....	2
2.1. Cortejo y apareamiento en <i>Drosophila</i>	5
3. Antecedentes.....	7
3.1. Genes que regulan el desarrollo sexualmente dimórfico del sistema nervioso y la conducta sexual.....	7
3.2. Genes que regulan la cópula y la conducta postcopulatoria de los machos.....	11
3.3. Redes neuronales involucradas en la reproducción de <i>Drosophila</i>	13
4. Hipótesis y Objetivos	17
5. Materiales y Métodos	18
6. Resultados.....	23
6.1. Cruzas y fenotipos de fertilidad encontrados.....	23
6.2. Pruebas de cortejo y apareamiento	26
6.3. Neuronas capturadas por el elemento-P en la línea L75.....	28
6.4. Sitio de inserción del elemento-P en la línea L75.....	33
7. Discusión	37
8. Perspectivas	42
9. Bibliografía.....	43

Dedicatoria

A mis padres y a mi hermano por todo el apoyo y el cariño que me han brindado y por toda la paciencia que me tienen.

A Enrique (de quien este proyecto fue idea), Nacho, René e Iván cuyos útiles consejos y enseñanzas hicieron posible la realización del presente trabajo.

A Aura por su amistad y por ayudarme a soportar los malos momentos que viví durante mi estancia en el IBT.

Resumen

En los animales, distintos aspectos de la reproducción sexual se encuentran regulados por el sistema nervioso y muchas de las propiedades y funciones del mismo se encuentran a su vez determinadas genéticamente. Utilizando el sistema GAL4/UAS se encontró una línea de moscas que tiene la inserción GAL4, la L 75, en la que al expresar la cadena ligera de la toxina de tétanos (TNT), tanto las hembras como los machos presentan problemas motores y estos últimos son incapaces de copular aunque sí realizan el ritual de cortejo pero con la diferencia de que pasan una mayor proporción del cortejo cantando con respecto a los controles. Expresando GFP y GFP-MCD8 en esta línea, se mapearon las neuronas que expresan GAL4, las cuales se distribuyen en varias regiones tanto en el cerebro como en el ganglio torácico abdominal y mediante PCR inverso se determinó que la inserción de GAL4 se encuentra en un intrón del gen *squid*, un gen que codifica para una ribonucleoproteína involucrada en el establecimiento de la polaridad del huevo en *Drosophila*.

Introducción

El sistema nervioso central (SNC) controla prácticamente todas las funciones en los animales, manteniendo la homeostasis del organismo mediante la regulación del metabolismo y la coordinación de la actividad de distintos órganos y estructuras a la vez que permite responder a distintos estímulos y adaptarse al entorno mediante la programación de comportamientos y la generación de procesos cognitivos. El SNC se organiza en redes neuronales, conjuntos de neuronas que se coordinan para realizar funciones específicas como la respuesta a estímulos, el control de movimientos o la estimulación de órganos particulares. Muchas de las características de las redes neuronales, incluso en numerosos casos su conectividad, se encuentran a su vez determinadas por la expresión de diversos genes (Yamamoto et al., 1998, Sokolowski M. B., 2001, Shirangi y McKeown, 2007 y Dickson, 2008).

Uno de los muchos procesos que es regulado por el SNC y que puede ser usado como modelo para estudiar la forma en que éste determina y controla funciones complejas, es la reproducción sexual. En los animales, la reproducción sexual puede clasificarse de acuerdo al tipo de fertilización involucrada. En algunos casos la fertilización es externa y el óvulo es fecundado fuera del cuerpo del animal, mientras que en otros casos la fertilización es interna y el óvulo es fecundado dentro del cuerpo del animal. La reproducción sexual en los animales que llevan a cabo fertilización interna, como es el caso del humano y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, es más compleja ya que por lo general involucra algún tipo de comportamiento de cortejo por parte de los machos, competencia entre éstos y un proceso de selección de pareja por parte de las hembras, lo que lleva finalmente al apareamiento.

Debido a que el cortejo y el apareamiento requieren de la percepción de distintas señales producidas por ambos sexos, de la integración de las mismas y de la generación de una respuesta adecuada, las redes neuronales involucradas en el proceso reproductivo están constituidas por diversos tipos de neuronas con funciones distintas. Es en este aspecto neurológico de la reproducción en el que se centra el presente trabajo.

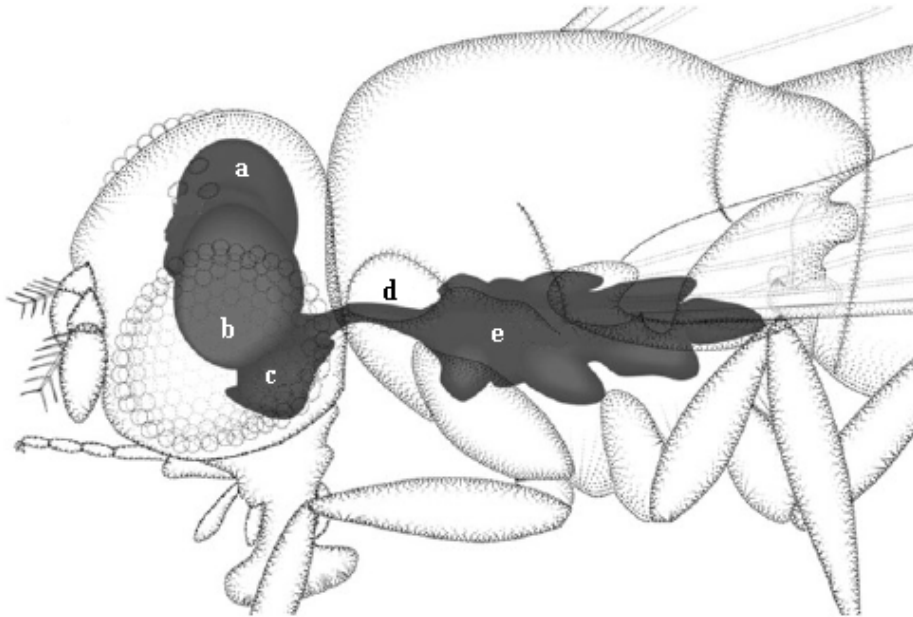
La mosca de la fruta es un modelo animal que ha sido muy utilizado para estudiar diversos fenómenos biológicos debido a la facilidad que ofrece para realizar

experimentos genéticos ya que tiene un ciclo de vida corto, es fácil de criar y de mantener en grandes cantidades, posee sólo 4 cromosomas y se cuenta con cromosomas balanceadores, cromosomas que han sufrido varias inversiones por lo que no pueden recombinar con cromosomas silvestres, facilitando el seguimiento y el mantenimiento de mutaciones. También se han desarrollado técnicas para la manipulación genética de la mosca como es el caso del sistema *GAL4/UAS* que permite la captura de “enhancers” y la expresión dirigida espaciotemporalmente de cualquier gen que se desee (Brand y Perrimon, 1993). Además, compartimos alrededor del 70 % de nuestros genes con este organismo modelo y muchas de las funciones que llevan a cabo estos genes se encuentran conservadas (Ashburner et al., 2005).

Debido a estas ventajas y al hecho de que el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso está determinado genéticamente se ha podido utilizar el sistema *GAL4/UAS* para desactivar selectivamente ciertas redes neuronales específicas o sus subcomponentes en la mosca de la fruta permitiendo deducir el papel que desempeñan. Además, la mosca de la fruta posee un cerebro muy pequeño y relativamente simple en comparación con los cerebros de los vertebrados, pero a pesar de esto, es capaz de llevar a cabo comportamientos complejos entre los que se encuentran el cortejo y el apareamiento y procesos como la memoria y el aprendizaje, lo que la convierte en un buen modelo para estudiar el funcionamiento del SNC (Chittka y Niven, 2009). Fig. 1.

De esta manera, se está llevando a cabo la disección genética y funcional del sistema nervioso de *Drosophila* lo que nos puede ayudar a entender cómo se integran los distintos componentes y los distintos niveles de organización del sistema nervioso de este organismo desde el genético al sistémico, pasando por el neuronal para dar origen a sus distintos comportamientos y procesos cognitivos que en última instancia pueden servirnos para comprender como nuestro cerebro lleva a cabo algunas de sus funciones.

A)



B)

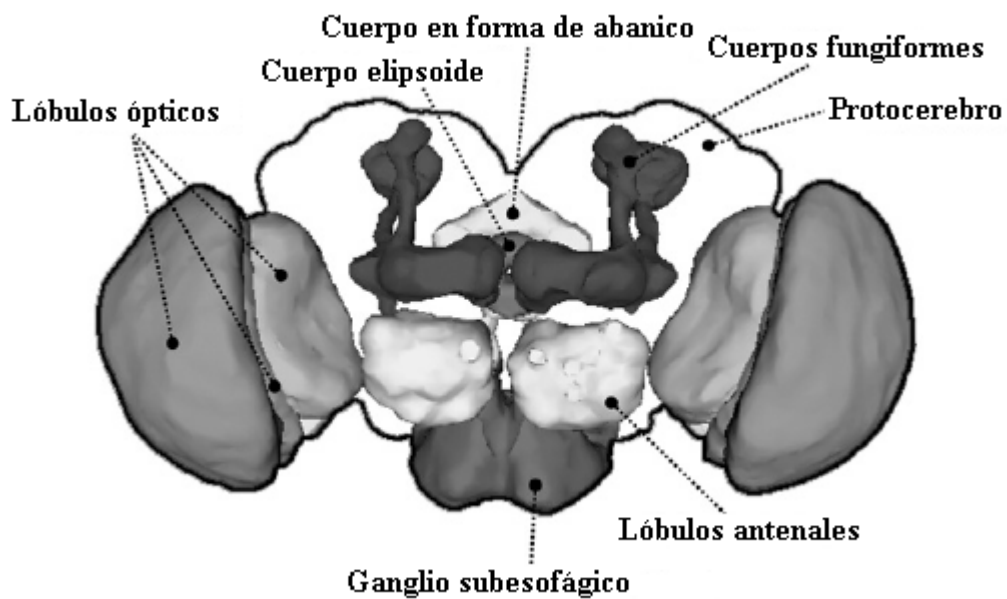


Figura 1. SNC de *Drosophila melanogaster*. A) Vista lateral mostrando el cerebro central (a), el lóbulo óptico (b), el ganglio subesofágico (c) el nervio conectivo cervical (d) y el ganglio torácico abdominal (e). B) Esquema del cerebro con algunas de sus principales estructuras, los lóbulos ópticos, el cuerpo en forma de abanico, el cuerpo elipsoide, los cuerpos fungiformes, los lóbulos antenales, el ganglio subesofágico y regiones del protocerebro no etiquetadas, en blanco (modificado de Nichols, 2006).

Los estudios en *Drosophila* han demostrado, como se verá posteriormente, que conjuntos neuronales discretos regulan distintas etapas y aspectos del proceso reproductivo, tanto en machos como en hembras. En parte, estos estudios se han basado en la búsqueda de fenotipos estériles o que se caractericen por la modificación de algún parámetro de su proceso reproductivo ocasionado por la desactivación selectiva de redes neuronales utilizando el sistema *GAL4/UAS* o por mutaciones que provocan un funcionamiento anormal de ciertas neuronas que pueden estar involucradas tanto en la conducta sexual como en el funcionamiento adecuado de los órganos sexuales y de ciertos músculos involucrados en el aspecto mecánico de la reproducción (Rodríguez-Valentín *et al*, 2006, Ditch L.M. *et al.*, 2004 y Shirangi y McKeown, 2007).

Sin embargo, a pesar de que las bases neuronales de la reproducción sexual han sido ampliamente estudiadas en *Drosophila*, probablemente más que en cualquier otro organismo, aún no se ha caracterizado la totalidad de las redes neuronales involucradas ni se conocen todos los genes que participan en la regulación de las mismas (Shirangi y McKeown, 2007).

Cortejo y apareamiento en *Drosophila*

La parte conductual de la reproducción sexual en los animales es el cortejo y el apareamiento. En *Drosophila*, el macho corteja a la hembra después de haber detectado ciertas feromonas producidas por ésta que señalan que se encuentra lista para reproducirse. Para esto, el macho se orienta hacia la hembra y comienza a seguirla, después se aproxima a la hembra por detrás y golpea suavemente su abdomen con las patas delanteras, posteriormente, el macho comienza a generar una canción de cortejo que es específica de cada especie, vibrando una de sus alas. Luego, el macho lame los genitales de la hembra e intenta copular doblando su abdomen y si la hembra accede, procede el apareamiento (Sokolowski, 2001). Aunque el cortejo en *Drosophila* es un comportamiento innato, la experiencia puede modificar la habilidad de los machos para discriminar entre hembras que ya copularon y aquellas que no lo han hecho en base al patrón de las feromonas que éstas producen (Shirangi y McKeown, 2007 y Dickson, 2008). Fig. 2.

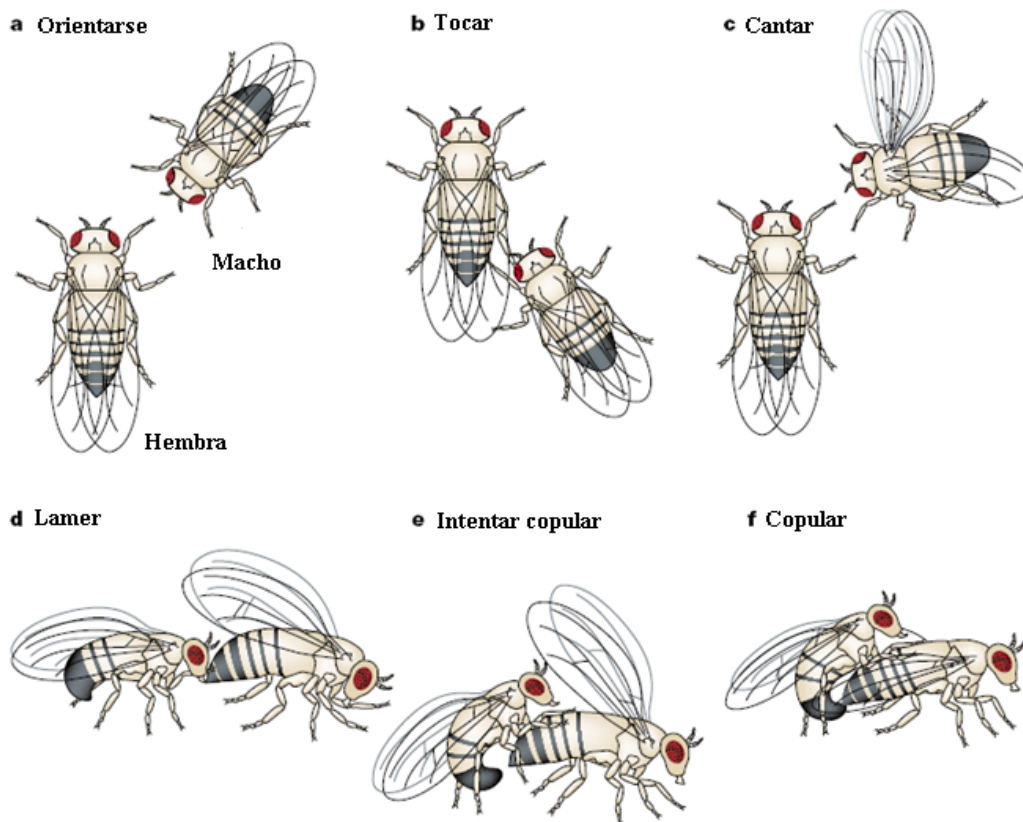


Figura 2. Pasos del cortejo de *Drosophila*, a) orientarse, b) tocar, c) cantar, d) lamer, e) intentar copular y f) copular (Sokolowski, 2001).

La conducta sexual de la hembra es menos elaborada y consiste principalmente en acciones receptoras o de rechazo cuando el macho intenta copular. Cuando es receptiva, la hembra abre sus alas exponiendo la parte dorsal del abdomen para permitir que el macho la monte. Después la hembra abre su placa vaginal permitiendo el contacto genital con el macho. El rechazo por su parte, puede darse de dos formas dependiendo del estado fisiológico de la hembra. Las hembras vírgenes no receptoras tienden a levantar su abdomen para evitar el contacto genital con el macho, mientras que las hembras no receptoras previamente fertilizadas bajan la punta de su abdomen y sacan el ovopositor. (Sokolowski, 2001).

Antecedentes

Genes que regulan el desarrollo sexualmente dimórfico del sistema nervioso y la conducta sexual

Para entender cómo el sistema nervioso regula distintos aspectos de la reproducción sexual es importante entender cómo es que éste se diferencia sexualmente y qué genes son responsables de este dimorfismo sexual.

El principal gen responsable del dimorfismo sexual en *Drosophila* es *Sex lethal (Sxl)*, el cual funciona como el interruptor maestro de la cascada de diferenciación sexual que lleva al desarrollo de las hembras y sólo se expresa en éstas en respuesta a la proporción de cromosomas sexuales con respecto a los autosómicos, si ésta es igual o mayor a 1, el individuo se diferencia como hembra, si es igual a 0.5 se diferencia como macho. *Sxl* por un lado funciona como un inhibidor del procesamiento alternativo de su propio transcrito primario, lo que hace que se exprese una isoforma específica de hembra que se une al mRNA de *transformer (tra)* para producir un transcrito funcional de este gen. El producto de *tra*, a su vez es un regulador del procesamiento alternativo, modifica el transcrito primario de otro gen de la cascada de diferenciación sexual, *doublesex (dsx)*. Los transcritos femeninos y masculinos de *dsx* codifican para factores transcripcionales que promueven la activación o inhibición de distintos genes para desarrollar estructuras morfológicas específicas a cada sexo (Yamamoto et al., 1998).

Se han encontrado estructuras del sistema nervioso central (SNC) en las que se da un dimorfismo sexual dependiente de *dsx*. Una de estas estructuras se localiza en la región abdominal terminal del ganglio fusionado en la cual unos pocos neuroblastos presentan patrones de proliferación específicos del sexo. Otro ejemplo se localiza en un nervio ventral causado por muerte celular dependiente del transcrito femenino de *dsx* y una tercer estructura se localiza en el cerebro posterior debido a una mayor división celular en esta región dependiente del transcrito masculino de este gen (Sanders y Arbeitman, 2008).

Un gen importante en la cascada de diferenciación sexual en las moscas que repercute en la conducta sexual y que también codifica para un factor transcripcional es el gen

fruitless (fru). Este gen, cuya expresión se limita al sistema nervioso, puede dar origen a transcritos sexo específicos como resultado de las modificaciones de su transcrito primario en las hembras ocasionado por la presencia de TRA (Charalambos, 2005). Tal es el caso del transcrito *fruM*, que sólo se encuentra en los machos y es necesario para generar el patrón de conducta sexual de éstos, al grado que hembras alteradas genéticamente para expresar este transcrito presentan ciertos aspectos de la conducta de los machos, no son receptivas al cortejo y producen huevos pero no los depositan (Demir y Dickson, 2005). Por esto se considera que *fru* funciona como un interruptor genético que es necesario para determinar el funcionamiento dimórfico del SNC (Charalambos, 2005). Distintas mutaciones en este gen generan fenotipos relacionados con la conducta sexual en machos, pueden generar comportamiento homosexual, bisexual o una reducción en la frecuencia de cortejo (Shirangi y McKeown, 2007).

fru se expresa en unas 2000 neuronas, que corresponden aproximadamente al 2 % del total de neuronas de la mosca, porcentaje que incluye a neuronas sensoriales, interneuronas, motoneuronas y neuronas de regiones superiores del sistema nervioso que integran señales sensoriales y coordinan respuestas adecuadas a estímulos sexuales (Manoli y Baker, 2004). Interesantemente, existen evidencias de que el RNA de *fruF*, el transcrito femenino de este gen, no es funcional y no se traduce (Shirangi y McKeown, 2007).

Con base en los estudios antes mencionados, se ha propuesto que *dsx* contribuye principalmente a la determinación sexual de mecanismos vitales y a la determinación de la morfología específica de cada sexo mientras que *fru* proporciona flexibilidad en el comportamiento sexual de los machos (Yamamoto et al., 1998). Recientemente se ha determinado que se requiere de la expresión de ambos genes en ciertas regiones del SNC para que éstas se desarrollen de manera adecuada dependiendo del sexo del individuo (Kimura et al., 2008 y Rideout et al., 2007).

Otro gen importante para la reproducción en moscas es *dissatisfaction (dsf)* que codifica para un receptor nuclear y que muestra un patrón de expresión diferente al patrón de expresión de *fru* manifestándose en conjuntos pequeños de neuronas (Finley K. M. et al. 1998). Las hembras mutantes en este gen son estériles debido a defectos en la ovoposición, lo cual se ha correlacionado con la pérdida de inervaciones de neuronas

motoras a los músculos del útero; además, presentan una mayor resistencia durante el cortejo y la cópula, mientras que los machos mutantes en este gen son conductualmente bisexuales, defectuosos para doblar el abdomen adecuadamente durante el apareamiento y presentan sinapsis anormales en los músculos ventrales del segmento A5 del abdomen (Finley K. M. et al. 1998). La expresión de este gen es independiente de *dsx* y *fru*, por lo que podría tratarse de una tercera rama en la cascada de diferenciación sexual a partir de *tra*, aparte de la rama de *dsx* y la de *fru* (Finley K. M. et al. 1998 y Yamamoto et al., 1998). No obstante, es poco probable que *dsf* sea directamente regulado por *tra* ya que no existe evidencia de transcritos sexo-específicos de *dsf* ni las secuencias blanco para el splicing alternativo mediado por *tra*, por lo que se ha propuesto que es regulado por algún gen blanco de *tra* o que la proteína DSF es parte común de un complejo dimérico con componentes sexo-específicos (Finley K. M. et al. 1998).

Otro gen que también contribuye al comportamiento sexual de las moscas es el factor transcripcional *retained* (*retn*) el cual actúa en diferenciación y control de la expresión genética a lo largo de los ejes anteroposterior y dorsoventral en los embriones, así como en la formación de estructuras tubulares como los ductos salivares y los intestinos y también se expresa en pequeños conjuntos de neuronas localizados en varias regiones del SNC que incluyen los cuerpos fungiformes, el ganglio subesofágico, el ganglio ventral y los fotoreceptores (Ditch L.M. et al., 2004). Este gen sufre splicing alternativo pero no es sexualmente dimórfico y su patrón de expresión en el SNC no se sobrepone con el de *fru* (Ditch L.M. et al., 2004). Las hembras con mutaciones en este gen muestran un fenotipo que no ocurre con mutaciones en ninguno de los genes antes mencionados, se resisten al cortejo y muestran ellas mismas conductas de cortejo tanto hacia hembras como hacia machos que se acentúan conforme envejecen, incluso en ausencia de *fruM* y de *dsxM*, mientras que los machos con esas mutaciones muestran un comportamiento normal aunque presentan defectos en la transferencia de esperma y son parcialmente estériles (Ditch L.M. et al., 2004).

Debido a que los mutantes de *dsx* en ambos sexos se desarrollan morfológicamente como inter-sexos, es decir, que presentan características morfológicas de ambos sexos, y a que pueden presentar conducta sexual masculina en ausencia de *fruM* e incluso en ausencia de *fruM* y *dsxM*, como en el caso de las hembras con mutaciones en *retn*, actualmente se cree que existe una vía neural intrínseca a ambos sexos con capacidad

para comportamiento masculino y femenino (Shirangi y McKeown, 2007). En este modelo, en los machos, *fruM* y *dsxM* masculinizan esta vía neural bipotencial suprimiendo el comportamiento femenino y activando completamente el masculino (Shirangi y McKeown, 2007). *retn* funciona en ambos sexos como un factor constitutivo pro-femenino/anti-masculino mientras que un supuesto factor aún no descubierto que funciona como un factor constitutivo pro-masculino/anti-femenino explica el comportamiento masculino de cortejo observado en hembras mutantes en *retn* y en machos mutantes en *fruM* (Shirangi y McKeown, 2007). *dsf*, por su parte, funciona debajo de *tra*, vía *fru* u otro gen para promover el comportamiento masculino en machos (Shirangi y McKeown, 2007). En las hembras, la presencia de *dsxF* y la ausencia tanto de *fruM* como de *dsxM* feminizan la vía neural intrínseca para inducir el comportamiento femenino y suprimir el masculino mientras que *dsf* funciona para promover el comportamiento femenino (Shirangi y McKeown, 2007). Fig. 3.

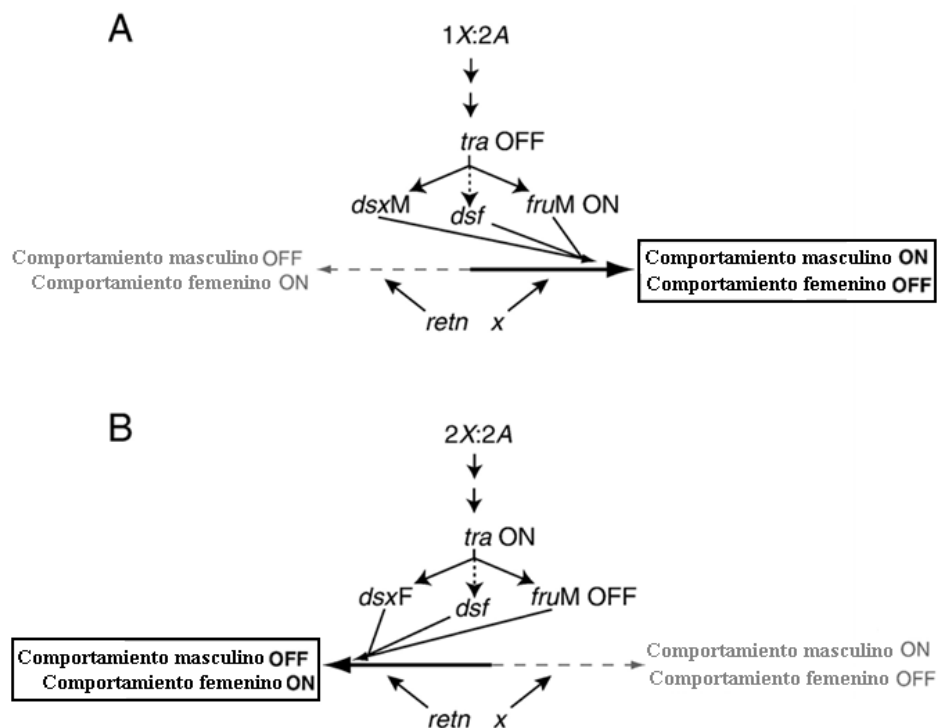


Figura 3. Modelo de diferenciación sexual de la red neuronal que regula la conducta sexual en *Drosophila* en el que una vía neural intrínseca con capacidad para comportamiento masculino y femenino es modulada por distintos factores genéticos para dar origen ya sea a un comportamiento masculino (*fruM*, *dsxM*, *dsf* y un supuesto factor masculinizante constitutivo *x*) o femenino (*tra*, *dsxF*, *dsf* y el factor feminizante constitutivo *retn*) (Shirangi y McKeown, 2007).

De esta manera, las interacciones entre estos genes determinan el desarrollo y función de las neuronas *fru*-P1, determinantes de la conducta sexual. En el caso de *fru* y *dsx* esta interacción puede ser intracelular, mientras que *dsf* y *retn* regulan la actividad de estas neuronas de manera indirecta, por interacción célula-célula, ya que el patrón de expresión de estos dos genes en el SNC no se sobrepone con el de *fru* (Shirangi y McKeown, 2007, Shirangi et al., 2006 y Finley K. M. et al. 1998).

Genes que regulan la cópula y la conducta postcopulatoria de los machos

La culminación del cortejo es la cópula y también se han encontrado algunos genes involucrados en la regulación de este evento de la reproducción. Los machos con mutaciones en estos genes son capaces de cortejar a las hembras y de ejecutar la canción de cortejo, sin embargo no son exitosos para copular (Yamamoto, 1997).

Uno de estos genes es *celibate (cel)*, cuyas mutaciones ocasionan que sólo un 16% de los machos realicen intentos de cópula con una débil contracción del abdomen sin hacer contacto con las hembras mientras que el 95% cortejan y no son capaces de copular (Yamamoto, 1997). Otros mutantes con un fenotipo similar a los mutantes *cel* son aquellos que tienen mutaciones en el gen *platonian (plt)* (Yamamoto, 1997). Las hembras con mutaciones en estos dos genes no presentan alteraciones en su comportamiento sexual (Yamamoto, 1997).

Los mutantes en el gen *Nerd* también muestran una reducción en los intentos de cópula y presentan un éxito de apareamiento disminuido, el cual puede explicarse en parte por la baja producción de la hormona cuticular T-7 que ocasiona un mayor rechazo por parte de las hembras (Ferveur y Jallon, 1996).

El gen *cuckold (cuc)* también está involucrado en la cópula ya que los machos homocigotos para dos alelos mutantes de *cuc* son incapaces de copular y también muestran un cortejo defectuoso así como una longevidad reducida, muriendo a los 8 días después de eclosionar (Castrillon, et al., 1993).

Una vez realizada la cópula, el macho debe mantenerla el tiempo suficiente para que la transferencia de espermia y fluido seminal sea exitosa. En machos silvestres esto dura alrededor de 19 min y requiere un control neural que es disociable de aquel responsable del establecimiento de la cópula (Yamamoto, 1997). El gen *coitus interruptus (coi)* está involucrado en este proceso ya que los machos con mutaciones en este gen presentan un tiempo de cópula 40% más corto que los silvestres lo cual aunado a que sólo 60% de estos mutantes poseen espermia funcional los vuelve estériles (Yamamoto, 1997).

Los machos con mutaciones en el gen *fickle (fic)*, que codifica para una tirosin-cinasa de la familia *src* que se sabe participa en el desarrollo neural y en la modulación sináptica, presentan un tiempo de apareamiento muy variable que va desde 1 min a 40 min y las hembras silvestres con las que copulan con frecuencia repiten la cópula después de un corto intervalo, en contraste con las hembras silvestres recién fertilizadas por machos silvestres las cuales exhiben una conducta de rechazo hacia los machos (Yamamoto, 1997).

La última fase en la reproducción de las moscas lo constituye la separación del macho de la hembra para finalizar la cópula. Este evento, en el cual el macho debe retraer el pene y liberar los genitales de la hembra, se considera un paso discreto en términos de control neural (Yamamoto, 1997). Las mutaciones en *stuck (sk)* y *lingerer (lig)* causan defectos en este proceso con la consecuencia de que los machos con mutaciones en *sk* presentan dificultades para desmontarse de la hembra, en ocasiones permaneciendo unidos por días e incluso hasta que ambos mueren (Yamamoto, 1997). Los machos con mutaciones en *lig* presentan un fenotipo similar pero menos severo (Yamamoto, 1997). Cabe destacar que se desconoce la función de estos genes y su patrón de expresión en el sistema nervioso de *Drosophila*.

Redes neuronales involucradas en la reproducción de *Drosophila*

A pesar de las diferencias morfológicas y conductuales presentes entre ambos sexos, los estudios que se han realizado para tratar de caracterizar las redes neuronales responsables de regular el proceso reproductivo en *Drosophila*, especialmente aquellas que expresan *fru*, han revelado que existe poco dimorfismo sexual en la anatomía del SNC de la mosca (Yu Jai y Dickson, 2005).

Algunas de las neuronas involucradas en el proceso reproductivo de las moscas son aquellas que conforman los sistemas olfativo y gustativo. En el sistema olfativo, existen distintos tipos de neuronas sensoriales olfativas (NSO), unas de las cuales expresan receptores específicos para feromonas (Dickson, 2008). Las NSO de una clase específica envían proyecciones axonales a un glomérulo discreto de los lóbulos antenales que convierten el mapa periférico de los receptores olfativos a un mapa espacial de activación glomerular que a su vez envía la información olfativa al protocerebro, que constituye el centro superior del cerebro de las moscas, a través de las neuronas olfativas de segundo orden (NP's) (Dickson, 2008). Las NSO específicas para una feromona masculina, la *vis-vaccenil acetato* (cVA), y las NP's del glomérulo DA1 que inervan, responden de la misma manera a esta feromona en ambos sexos. Sin embargo, éstas últimas forman arborizaciones sexo específicas en el protocerebro y son responsables de las respuestas diferentes de ambos sexos a esta misma feromona (Datta et al., 2008). La vía de DA1 y la de otro glomérulo, VA1v, que recibe respuestas evocadas por feromonas producidas por ambos sexos, convergen en una región del protocerebro sexualmente dimórfica separada de la región que recibe NP's que responden a olores de comida y se cree que las respuestas producidas por estas dos vías codifican el sexo y la especie de otros individuos (Dickson, 2008).

En el caso de las hembras, la principal señal en la que se basan para el apareamiento, es la canción de cortejo producida por el macho, la cual detectan con las antenas y cuyo movimiento activa neuronas receptoras en una estructura en la base de la antena conocida como el órgano de Johnston. Distintas neuronas del órgano de Johnston responden a distintos estímulos mecánicos y se proyectan a distintas regiones del cerebro, algunas de las cuales deben responder específicamente a la canción de cortejo (Dickson, 2008).

Por otro lado, la receptividad de las hembras así como el patrón de feromonas que producen es modificado por un pequeño péptido de unos 36 aminoácidos conocido como péptido sexual, el cual se transfiere a las hembras en el fluido seminal de los machos durante el apareamiento, estimulando también la ovoposición (Yapici N. et al., 2008). La respuesta a este péptido está mediada por un conjunto de 6 neuronas sensoriales que expresan su receptor e inervan el útero y el oviducto y se conectan con el ganglio subesofágico, cerca del lugar donde terminan las proyecciones de las neuronas auditivas (Hasemeyer et al., 2009). La desactivación de estas neuronas provoca que las hembras actúen como si hubieran recibido el péptido sexual, mientras que la represión de la expresión del receptor del péptido sexual en estas neuronas ocasiona que las hembras mantengan una receptividad similar a la que poseen las hembras vírgenes (Hasemeyer et al., 2009). No obstante, se sabe que el péptido sexual pasa del tracto reproductivo de la hembra a la hemolinfa y es capaz de atravesar la barrera entre la hemolinfa y el cerebro y muchas neuronas en regiones superficiales del cerebro expresan el receptor de este péptido (Yapici N. et al., 2008).

Por lo tanto, debe haber redes neuronales en las hembras que integren señales del sistema olfativo, auditivo y de su tracto reproductivo para decidir si aparearse o rechazar a un macho (Dickson, 2008).

La conducta reproductiva de la hembra no consiste únicamente en el apareamiento, también debe realizar la ovoposición de los huevos fertilizados en un sitio seleccionado adecuadamente. Unas neuronas importantes en la ovoposición en la mosca de la fruta son aquellas que expresan el neuropéptido tipo insulina ILP7, similar a la hormona reproductiva de mamíferos *relaxina*, el cual se expresa en unas pocas neuronas del SNC que se proyectan al ganglio subesofágico, al nervio ventral y al tracto reproductivo de la mosca. La desactivación de estas neuronas provoca esterilidad mediante la abolición de los programas motores de ovoposición (Yang Ch. et al., 2009)

Muchas de las redes neuronales mencionadas se caracterizan por expresar *fru*. No obstante, a pesar de que los distintos transcritos de este gen determinan en gran parte el comportamiento sexual dimórfico en la mosca, los machos y las hembras presentan poco dimorfismo sexual con respecto a estas redes, inclusive se ha visto que si se

activan artificialmente mediante optogenética las redes que expresan *fru* del ganglio torácico abdominal en hembras decapitadas, el cuerpo de éstas lleva a cabo la canción de cortejo (Dylan y Miesenbo, 2008). Por lo que las diferencias entre sexos mediadas por esta red podrían derivarse no tanto de la anatomía de las redes en esta región sino más bien de la modulación de las mismas (Kvitsiani y Dickson, 2005).

Sin embargo, a pesar de presentar pequeñas diferencias, se ha encontrado un dimorfismo sexual en varios conjuntos discretos de neuronas que expresan *fru*. Uno de estos grupos neuronales es un conjunto de interneuronas del lóbulo antenal, conocido como fru mAL, que se cree integra señales olfativas y gustativas. Este grupo neuronal consiste de alrededor de 30 neuronas en las moscas macho mientras que en las hembras consiste de alrededor de 5. Además, en los machos estas neuronas tienen una morfología diferente (Kimura et al., 2005). Otro marcado dimorfismo lo constituye el conjunto de interneuronas P1, ausente en las hembras por acción de *dsx*, gen que promueve la apoptosis de los neuroblastos que dan origen a estas interneuronas. En los machos, el conjunto P1 se compone de unas 20 neuronas en el cerebro dorsal superior cerca de los cuerpos fungiformes y presenta arborizaciones específicas establecidas por *fru*, el cual inhibe la apoptosis dirigida por *dsx* (Kimura et al., 2008). Estos grupos de neuronas, aunque pequeños, son determinantes para la conducta sexual de las moscas ya que es suficiente con masculinizar estas neuronas para que una hembra morfológicamente silvestre, realice los primeros pasos del cortejo los cuales son una conducta exclusivamente del macho (Kimura et al., 2005 y Kimura et al., 2008). Es posible que otros de los conjuntos dimórficos que se han encontrado participen en etapas posteriores del cortejo y del apareamiento.

Las neuronas que expresan *fru* han sido las más estudiadas en relación a la reproducción ya que regulan el comportamiento sexual de los machos (Kvitsiani y Dickson, 2005). Se ha propuesto que *fru* esculpe las redes neuronales que seleccionan entre acciones alternativas mientras que, las redes motoras y sensoriales están conservadas en ambos sexos pero afinadas por Fru y Dsx (Dickson, 2008). Sin embargo, aún se desconoce cómo las diferencias en estas redes a su vez son responsables de la diferencia en el comportamiento de ambos sexos.

A parte de los aspectos conductuales, existen neuronas que regulan aspectos fisiológicos de la reproducción, ya sea coordinando el funcionamiento de los órganos sexuales o promoviendo la maduración de los gametos. Tal es el caso de las neuronas serotoninérgicas del ganglio torácico abdominal de los machos que inervan la vesícula seminal, el ducto testicular, el ducto eyaculatorio y otras estructuras reproductivas, las cuales expresan *fru* y cuya desactivación lleva a esterilidad (Billeter y Goodwin, 2004).

Se ha encontrado que la ovulación en *Drosophila*, se encuentra regulada por neuronas octopaminérgicas situadas en el ganglio torácico abdominal que inervan el tracto reproductivo (Monastirioti, 2003 y Rodríguez Valentín *et al.*, 2006). La octopamina actúa como neurotransmisor, neuromodulador y neurohormona pero no es el único neuroquímico que regula el funcionamiento de los órganos reproductores de las hembras de *Drosophila* (Monastirioti, 2003 y Rodríguez Valentín *et al.*, 2006). También, se ha visto que existen unas pocas neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas inervando el tracto reproductivo cuya función es desconocida (Monastirioti, 2003).

Anteriormente en este laboratorio, utilizando el sistema *Gal4/UAS;TeTxLC* se capturaron las redes neuronales octopaminérgicas de *Drosophila* y se observó un marcado dimorfismo sexual en el SNC con respecto a estas redes que se distribuyen tanto en el cerebro como en el ganglio torácico abdominal. Las redes octopaminérgicas son más sencillas en las hembras, e inervan principalmente el oviducto mientras que en los machos, en los cuales no se han caracterizado completamente, parecen más complejas. Se demostró que estas redes son responsables de modular la contracción del oviducto de *Drosophila*, siendo por consiguiente esenciales para la fertilidad de las hembras. También se demostró que la octopamina actúa inhibiendo la contracción muscular mientras que el glutamato, actúa induciéndola, por lo que ambos neurotransmisores son necesarios para un correcto funcionamiento del oviducto (Rodríguez Valentín *et al.*, 2006).

Hipótesis

Drosophila posee redes neuronales discretas aun no conocidas involucradas en el apareamiento, cuya desactivación causará una disminución en la fertilidad o un fenotipo de esterilidad.

Objetivos

General

- Identificar redes neuronales que al ser desactivadas ocasionen esterilidad o una disminución en la fertilidad en *Drosophila*.

Particulares

- Encontrar un fenotipo de esterilidad o de fertilidad disminuida en *Drosophila* ocasionado por desactivación neuronal mediante el sistema *Gal4/UAS;TNT*.
- Mapeo de la red neuronal capturada.
- Determinar la región del genoma donde se insertó el elemento-P Gal4.
- Determinar la función de la red neuronal capturada.

Materiales y Métodos

Búsqueda de fenotipos estériles por inactivación neuronal

Se cruzaron 86 líneas de moscas transgénicas que contienen una inserción de un elemento-P con *Gal4* de una biblioteca establecida anteriormente en el laboratorio con la línea homóziga para la inserción de un elemento-P con *UAS-TNT*. TNT es la cadena ligera de la toxina de tétanos, la cual corta a la sinaptobrevina, una proteína necesaria para la fusión de vesículas cargadas de neurotransmisores con la membrana externa en las terminales sinápticas, por lo cual, cuando una neurona expresa la TNT, es incapaz de comunicarse mediante transmisión sináptica (Sweeney et al., 1995).

La progenie que resultó de estas cruzas y que heredó la inserción con *Gal4* se cruzó a su vez con una línea *white-*, que es el fondo genético de las líneas que se evaluaron, para buscar moscas que sean estériles o menos fértiles como resultado de la expresión de TNT. Las cruzas se llevaron a cabo a 25 °C en viales con comida de maíz estándar, según la receta de

La lógica detrás de estas cruzas es la siguiente:

Las líneas que presenten un patrón de expresión generalizado de GAL4 mostrarán un fenotipo letal en presencia de *UAS-TNT* (Fig. 3, parte superior).

Las líneas que presenten un patrón de expresión no neural de GAL4 no mostrarán fenotipo (Fig. 3, parte media). Esto se debe a que TNT es una proteasa que sólo afecta a las neuronas ya que corta específicamente a la sinaptobrevina n-syb, una de las dos sinaptobrevinas presentes en la mosca y que sólo se expresa en el sistema nervioso, cuya función es anclar a las vesículas sinápticas a la membrana de las neuronas, siendo necesaria para la liberación de neurotransmisores (Sweeney et al. 1995).

Las líneas que presentan un patrón de expresión neural discreto de GAL4 mostrarán defectos específicos, un ejemplo de los cuales es esterilidad, como consecuencia de la expresión de TNT (Fig. 4, parte inferior).

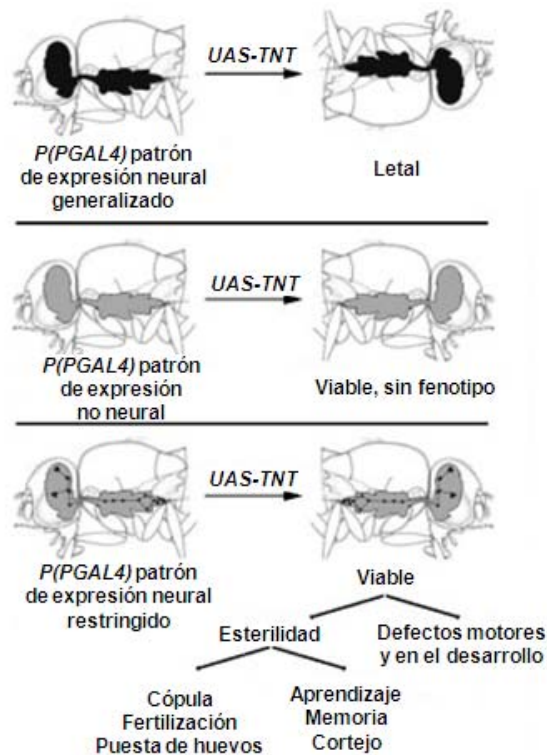


Fig. 4. Resultados esperados de las cruces entre líneas con *GAL4* y la línea *UAS-TNT*. Superior) La expresión panneural resulta en letalidad. Medio) La expresión en tejidos no neuronales no provoca ningún fenotipo. Inferior) La expresión en conjuntos discretos de neuronas ocasiona un fenotipo dependiente de la función de éstos (Rodríguez Valentín et.al, 2006).

Evaluación de la capacidad de cortejo

Para evaluar la capacidad de las moscas para cortejar y aparearse se colocaron machos mutantes y *white-* con hembras *white-* en cámaras de cortejo de 10 mm de diámetro y 4 mm de alto, sin anestesiarlas, aspirándolas con una manguera para transferirlas de los viales a éstas y se coloca una pareja por cámara. Inmediatamente después se empezó a grabar a las moscas con una cámara de video durante 10 minutos. Después se analizaron los videos y se midieron tres parámetros, el índice de cortejo definido como el tiempo que pasan las moscas en todas las etapas de cortejo, el índice de extensión de alas, definido como el tiempo que los machos pasan cantando y el número de veces que cada macho intenta copular. Adicionalmente se comparó qué proporción del índice de cortejo los machos pasan cantando. Estos parámetros se midieron manualmente con un cronómetro viendo los videos obtenidos.

Las moscas, tanto machos como hembras fueron recolectados vírgenes (antes 12 horas transcurridas a 18 °C o 7 horas transcurridas a 25 °C después de eclosionar), los machos se mantuvieron por separado en viales individuales por 5 días antes de realizar las pruebas mientras que las hembras se mantuvieron en grupo también por 5 días antes de las pruebas, las cuales se llevaron a cabo entre las 3:30 y 6:30 pm ya que uno de los momentos en que son más activas las moscas es alrededor de las 5 pm.

Se evaluó la interacción de distintas combinaciones de parejas con distinto genotipo:

L75/TNT ♂ con *White* ♀ y los respectivos controles *L75* ♂ con *White* ♀; *White* ♂ con *White* ♀ y *TNT* ♂ con *White* ♀.

Mapeo de las neuronas que dirigen la expresión del elemento-P con Gal4

Se cruzó la línea con el patrón de expresión de Gal4 que dio origen al fenotipo de esterilidad con una línea que contiene el inserto *UAS-GFP* y otra que contiene el inserto *UAS-GFP MCD8*. Se llevaron a cabo disecciones del SNC de la progenie heteróxima *Gal4/UAS-GFP* y de la progenie heteróxima *Gal4/UAS-GFP MCD8* y se observaron en el microscopio de fluorescencia y en el microscopio confocal para determinar las neuronas que la TNT desactivó y establecer su localización y el destino de sus proyecciones.

Se extrajo el SNC de machos y hembras *L75;GFP* y *L75;GFP-MCD8* de entre 5 y 7 días de edad en buffer PBS, inmediatamente después se transfirieron a una solución de formaldehído al 4 % en buffer de fosfato de sodio dibásico 100 mM a pH 7.4 y se mantuvieron ahí durante 20 min. Después se realizaron dos lavados con el mismo buffer de fosfato que se utilizó para hacer la solución de paraformaldehído. Al terminar se colocó una gota de unos 100 µL de citifluor en un cubreobjetos rectangular y con cuidado se transfirieron los cerebros a esta gota. Posteriormente, se cubrió la gota con un cubreobjetos circular y se rodeó la orilla de éste con barniz de uñas.

Mapeo del sitio de inserción del elemento-P

Se determinó el sitio de inserción del elemento-P que contiene Gal 4 en la línea L 75 mediante PCR inverso y la posterior secuenciación del producto obtenido. Se utilizaron

cuatro enzimas de digestión para digerir el DNA extraído mediante el método de fenol-cloroformo: PstI, XbaI, Sau3AI y MspI. Posteriormente las digestiones se ligaron con Ligasa en una concentración de alrededor de 1 µg/ µl y amplificadas por PCR por 40 ciclos utilizando oligos en el extremo 5' del elemento: 5'GCG GCC GCA AGC TTA ACA AGC 3' (5'_Fwd*) y 5'CTG AAT TTA AGT GTA TAC TTC GG 3' (5'_Rev*). Como control positivo se utilizaron los oligos: 5'CGT CAC AGA TAG ATT GGC TTC AGT GG 3' (Gal4 Fwd) y 5'GCG TCG GTG AGT GCA CGA TAG GGC 3' (Gal4 Rev) los cuales amplifican una región de 470 pb del gen Gal 4. Para la secuenciación del producto, se utilizó el oligo 5'AAGTGCGACATCATCGG 3' (5'Fwd2) el cual aparece en el elemento-P (Fig 5).

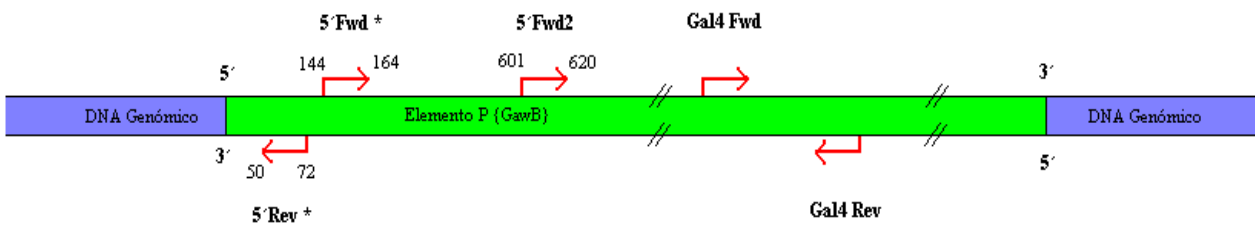


Figura 5. Oligos utilizados para mapear la inserción del elemento-P en la línea L75 mediante PCR inverso. Los oligos 5'Fwd* y 5'Rev* fueron utilizados para el PCR inverso, los oligos Gal4 Fwd y Gal4 Rev fueron utilizados para la reacción del control positivo y el oligo 5'Fwd2 fue utilizado para secuenciar el producto del PCR inverso. El elemento-P mide 11.279 kb.

Una vez obtenida la secuencia del producto del PCR inverso, se mandaron a hacer nuevos oligos para corroborar el sitio de inserción y se mandaron a secuenciar los productos obtenidos de los PCR con estos nuevos oligos.

Para amplificar y secuenciar la región adyacente al extremo 5' del elemento P, se mandó a hacer el siguiente oligo: 5'GAA TAT CGT GCT GCC TAG CC 3' (Sqd) que aparece en el gen sqd, del cual se obtuvo la secuencia, y se realizó un PCR utilizando este oligo en combinación con el oligo 5'_Rev* antes mencionado y también en combinación con el oligo 5'GCCAATCTATCTGTGACGGC 3' (5'Rev2) que también aparece cerca del extremo 5' en el elemento-P (Fig 6). Para secuenciar los productos de ambas reacciones se utilizaron los oligos Sqd y 5'Rev* (Fig 6).

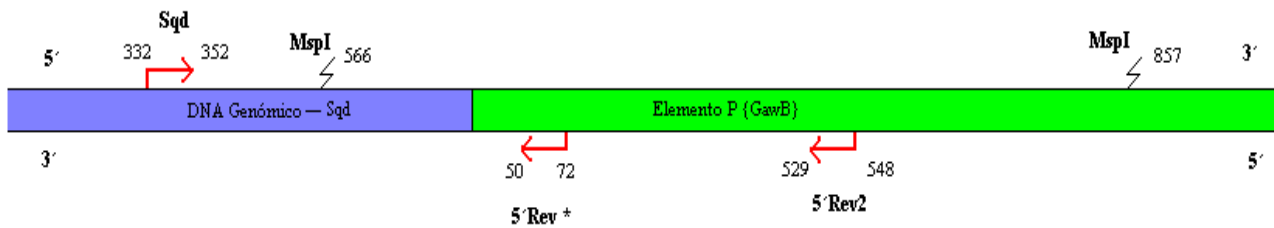


Figura 6. Oligos utilizados para comprobar el sitio de inserción del elemento-P alrededor de su extremo 5' en la línea L75. Se llevaron a cabo reacciones con dos combinaciones de oligos, Sqd junto con 5'Rev* y Sqd junto con 5'Rev2. Para secuenciar los productos de ambas reacciones se utilizaron los oligos Sqd y 5'Rev*.

Para amplificar y secuenciar la región adyacente al extremo 3' del elemento-P se mandaron a hacer los siguientes oligos: 5' TAT GCA GCC GCC ATT TTG GG 3' (Sqd Rev1) y 5' TGG CAA CTC CAA ACA ACG CC 3' (Sqd Rev2) los cuales aparean en el gen del cual se obtuvo la secuencia y el oligo 5' ACC CCA CGG ACA TGC TAA GG 3' (Ele-P 3'1) que aparean dentro del elemento-P y se realizó un PCR con las tres combinaciones de estos oligos (Fig 7). Para secuenciar los productos de ambas reacciones se utilizaron los oligos Ele-P 3'1 y Sqd Rev1 (Fig 7).

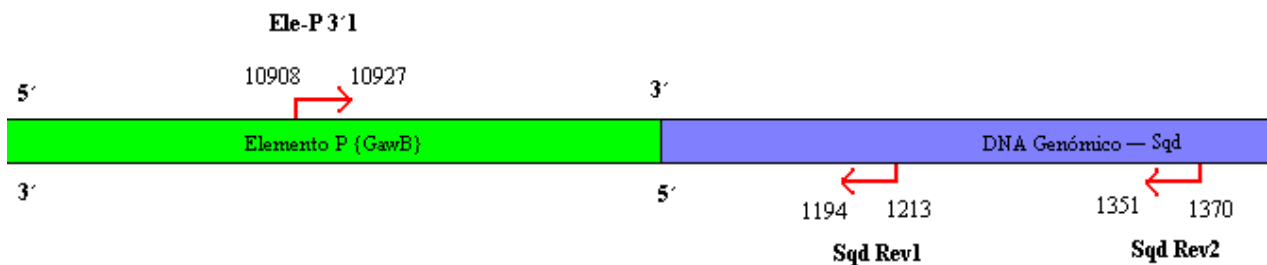


Figura 7. Oligos utilizados para comprobar el sitio de inserción del elemento-P alrededor de su extremo 3' en la línea L75. Se llevaron a cabo reacciones con dos combinaciones de oligos, Ele-P 3'1 junto con Sqd Rev1 y Ele-P 3'1 junto con Sqd Rev2. Para secuenciar los productos de ambas reacciones se utilizaron los oligos Ele-P 3'1 y Sqd Rev1.

Resultados

Para encontrar fenotipos relacionados con fertilidad se cruzaron líneas de moscas que tienen una inserción con *Gal4* con moscas homocigotas para una inserción con *UAS-TNT* y la progenie de estas cruces que heredó la inserción con *Gal4*, tanto machos como hembras, fue colocada con moscas *white-* (Tabla 1).

Cruzas y fenotipos de fertilidad encontrados

Líneas Gal4 +TNT	Fenotipo	
	Hembras	Machos
L 82	Fértil	Fértil
L 73	Letal	Letal
L 21	Letal	Letal
L 114	Letal	Letal
L 110	Letal	Letal
L 12	Letal	Letal
L 14	Letal	Letal
L 15	Fértil	Fértil
L 19	Letal en X	Letal en X
L 10	Letal en X	Letal en X
L 101	Letal en X	Letal en X
BL4894/5M6B	Fértil	No aplica
14 AR	Fértil	Fértil
L 84	Letal	Letal
L 111	Letal	Letal
L 124	Fértil	No aplica
L 13	Letal	Letal
CM 8*	Letal	Letal
L 83	Letal	Letal
L 99	Letal	Letal
L 118	Letal	Letal
Lnbhg	Letal	Letal
L 75	Fértiles, problemas motores	"Estériles", problemas motores
L 5	Letal	Letal
L x	Fértil	Fértil
CM 9	Letal	Letal
CM 4	Letal	Letal
CM 2	Letal	Letal
CM 11*	Letal	Letal
CM 12*	Fértil	Fértil

CM 16	Fértil	Fértil
CM 16*	Fértil	Fértil
CM 16**	Fértil	Fértil
CM 7	Letal	Letal
CM 10	Poco fértil	Fértil
CM 12	Poco fértil	Fértil
L 91	Letal	Letal
L 92(1)	Letal	Letal
L 92(2)	Letal	Letal
L 93*	Letal	Letal
L 96	Letal	Letal
L 103	Poco fértil	No aplica
L 102	Letal en X	Letal en X
L 105*	Letal en X	Letal en X
L 105 ^a *	Letal en X	Letal en X
L 119	Letal	Letal
L 104	Letal en X	Letal en X
L 103*	Letal en X	Letal en X
L 120	Letal en X	Letal en X
L 123	Letal en X	Letal en X
L 111 ^a *	Letal en X	Letal en X
L 126	Fértil	Fértil
L 121	Letal en X	Letal en X
L 105	Letal en X	Letal en X
L 107	Letal en X	Letal en X
L112	Fértiles	No aplica
L4	Fértiles	Fértiles
L2	Letal	Letal
L24	Letal	Letal
L90	Letal	Letal
L122	Letal en X	Letal en X
Lnchnd	Letal en X	Letal en X
Ln5	Letal en X	Letal en X
Lndis	Letal en X	Letal en X
Lnshnd	Letal en X	Letal en X
Lncj	Letal en X	Letal en X
Lndtsv	Letal en X	Letal en X
Lnog*	Letal en X	Letal en X
Lx1*	Letal en X	Letal en X
Lx1	Letal en 3	Letal en 3
Ldoce	Letal en X	Letal en X
L3	Fértiles	"Infértiles"
Lt	Fértiles	"Infértiles"

Lndtsch	Letal en X	Letal en X
LnM	Letal en X	Letal en X
L108	Letal en X	Letal en X
Lnchd	Letal en X	Letal en X
Lnwnd	Letal en X	Letal en X
Lmp	Letal en X	Letal en X
Lnch	Letal en X	Letal en X
R68	Fértiles	Fértiles
R17	Letal	Letal
R60	Fértiles	Fértiles
R3	Fértiles	Fértiles
R58	Fértiles	Fértiles
Cm2	Fértiles	Fértiles
R18	Poco fértiles	"Infértiles"

Tabla 1. Tabla de cruzas. Siete líneas mostraron un fenotipo relacionado con fertilidad, L75 (♂), CM10 (♀), CM12 (♀), L103 (♀), L3 (♂), Lt (♂) y R18 (♂ y ♀). Los nombres de las líneas son arbitrarios.

La razón de que en algunas cruzas no se obtuvo un fenotipo de los machos es que la inserción se encuentra en el cromosoma X por lo que sólo se obtuvieron hembras que la heredaran. Muchas de las inserciones letales también se encontraban en el X.

Las hembras de la progenie obtenida de las cruzas de las líneas CM10, CM12, L103 y R18 con la línea TNT presentaron un fenotipo de fertilidad reducida y los machos de la progenie obtenida de las cruzas de las líneas L75, L3, Lt y R18 con la línea TNT presentaron un fenotipo de esterilidad. Las cruzas se realizaron por duplicado para cada una de estas líneas y en el caso de la L75 se realizaron dos repeticiones.

Los machos *L75/TNT* no tuvieron descendencia al ser colocados con hembras silvestres tanto en la primera cruce como en las repeticiones mientras que las hembras del mismo genotipo son fértiles. Estos machos así como las hembras del mismo genotipo manifiestan problemas motores, una falta de coordinación, con frecuencia mueren pegadas a la comida, tardan más en voltearse una vez que caen de espaldas, su respuesta de geotaxis negativa es más lenta y en general se mueven más lento y son menos coordinadas que las moscas silvestres y que los parentales. La combinación del elemento-P de la línea L75 junto con la toxina de tétanos es semiletal ya que en lugar de

la proporción del 50% que se esperaría que nacieran con la combinación de ambos elementos, sólo alrededor del 21% de las moscas que eclosionan los heredan ambos. La inserción de la línea *L75* es semiletal ya que sólo alrededor del 8% de los individuos que nacen son homocigotos y de éstos los machos son infértiles.

Cabe notar que los machos *L75/TNT* sí ejecutan el ritual de cortejo y que las hembras silvestres con las que se colocan responden a la canción de cortejo y depositan huevos sin fertilizar, aunque esto último podría deberse a que el cortejo de los machos estimula a las hembras a ovopositar aunque no copulen. La incapacidad de los machos *L75/TNT* para reproducirse se puede deber a un problema motor y no a un problema de fertilidad o de comportamiento.

Pruebas de cortejo y apareamiento

Para determinar si la razón por la cual los machos *L75/TNT* no tienen descendencia al ser colocados junto con hembras *white-* es una alteración conductual, se midieron los siguientes parámetros del cortejo de machos *L75/TNT* y de los respectivos controles *white-*, *L75/TM2* y *TNT*: Índice de cortejo (IC), índice de extensión de ala (IEA), la relación entre el índice de extensión de ala y el índice de cortejo (IEA/IC) y el número de los intentos de cópula. En el caso del IC, el IEA y los intentos de apareamiento, no hubo diferencias significativas entre los machos *L75/TNT* y los controles (Fig. 8 a,b y c). El único parámetro en el que hubo diferencias significativas entre los machos *L75/TNT* y los controles fue en (IEA/IC) (Fig. 8 d).

Ninguno de los machos *L75/TNT* copuló en las pruebas, incluso cuando se dejaron en las cámaras con las hembras por más de 10 min, mientras que en los controles hubo varios individuos que lo hicieron (Tabla 2). El control en que menos individuos copularon fue el de los machos *TNT* (Tabla 2). Los machos *L75/TNT* no podían doblar el abdomen como los machos control cuando intentaban copular.

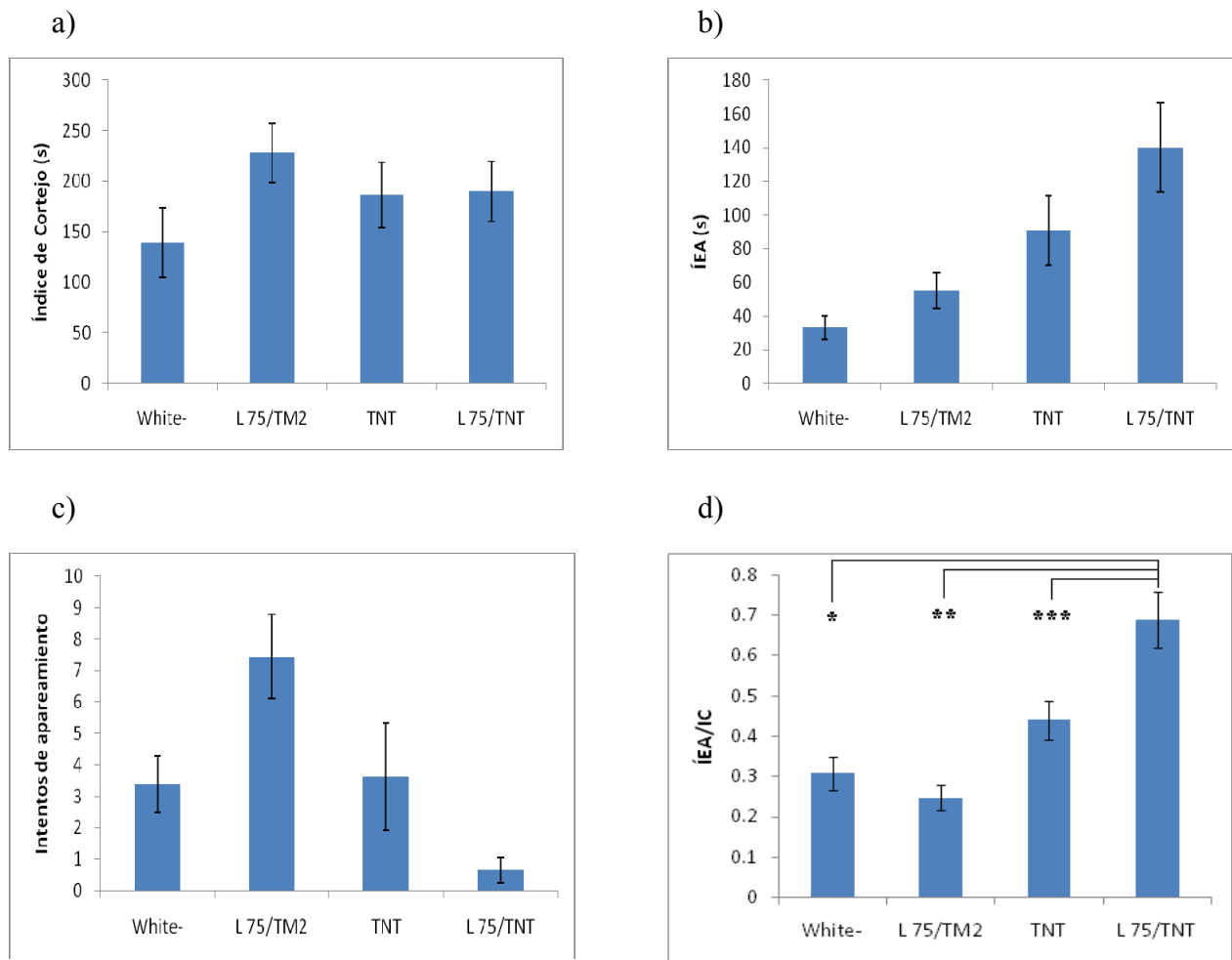


Figura 8. La proporción del tiempo de cortejo que los machos *L75;TNT* pasan ejecutando la canción de cortejo es mayor que en los controles pero no muestran una diferencia significativa con respecto a los demás parámetros del cortejo. a) Índice de cortejo. b) Índice de extensión de ala. c) Intentos de cópula. d) Relación entre el Índice de extensión de ala y el índice de cortejo. $n=16, 16, 16$ y 14 para White-, L75;TM2, TNT y L75;TNT respectivamente. Se muestra el error estándar. $p < 0.0000051$ *, $p < 0.0000002$ ** y $p < 0.0035925$ *** (ANOVA y prueba de Tukey).

Genotipo	Número total de machos	Porcentaje de machos que copularon
White-	16	62.5
L75;TM2	16	81.25
TNT	16	31.25
L75;TNT	14	0

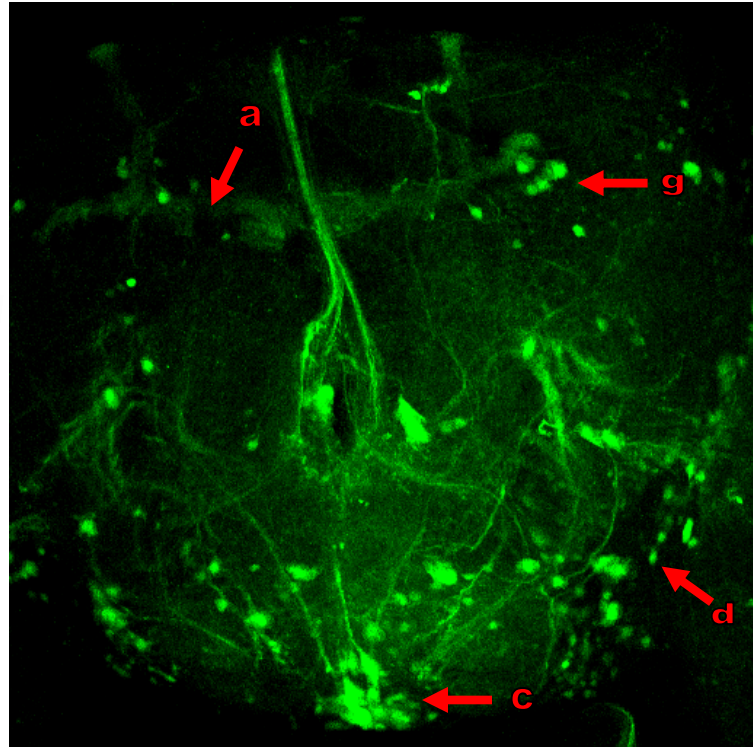
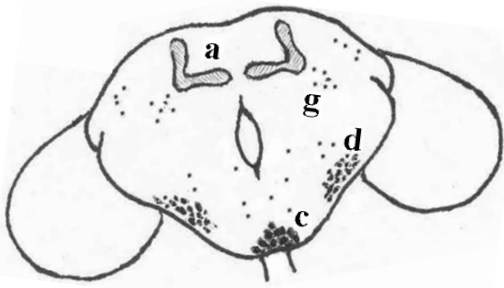
Tabla 2. Porcentaje de machos que copularon antes de 10 min del total de machos que fueron sometidos a las pruebas de cortejo y apareamiento. Los datos se muestran para cada genotipo que se probó. Ninguno de los machos *L75;TNT* copuló.

Neuronas capturadas por el elemento-P en la línea L75.

Para mapear las neuronas desactivadas por la TNT se realizaron disecciones del SNC tanto de machos como de hembras *L75/GFP* y *L75/GFP MCD8*, las cuales se observaron en el microscopio de fluorescencia y en el confocal. Se observó que el patrón de expresión de GFP dirigido por el driver de la inserción de Gal4 era generalizado, se detectaron numerosas neuronas marcadas en el cerebro y en el ganglio torácico abdominal tanto en machos como en hembras, entre los cuales no se observaron diferencias significativas (Figs 9, 10, 11 y 12). En el cerebro se marcaron las células de Kenyon, neuronas alrededor de los lóbulos antenales, neuronas peptidérgicas en la parte posterior dorsal, en la parte posterior, en la parte ventrolateral y en el ganglio subesófágico; también los lóbulos de los cuerpos fungiformes y el cuerpo en forma de abanico mostraron expresión de GFP (Figs 9 y 10).

En el ganglio torácico abdominal, se marcaron neuronas en la parte anterior ventral del primer y el segundo lóbulos, pero la mayor cantidad de neuronas marcadas se encontró en el lóbulo posterior, en el cual se observa un grupo de neuronas en hilera que se extiende hasta la punta por la parte central de éste, mientras que dos grupos de neuronas grandes se extienden alrededor del centro de la parte posterior del ganglio (Figs 11 y 12). Cabe destacar un conjunto de 3 pares de neuronas conectadas entre sí de gran tamaño a los lados del centro del lóbulo (Fig 12). Además de los cuerpos neuronales que se observaron en el ganglio, también se observaron muchas proyecciones marcadas, algunas proviniendo del cerebro y otras originándose en el ganglio (Figs 11 y 12).

A) ♂ Vista anterior.



B) ♂ Vista posterior.

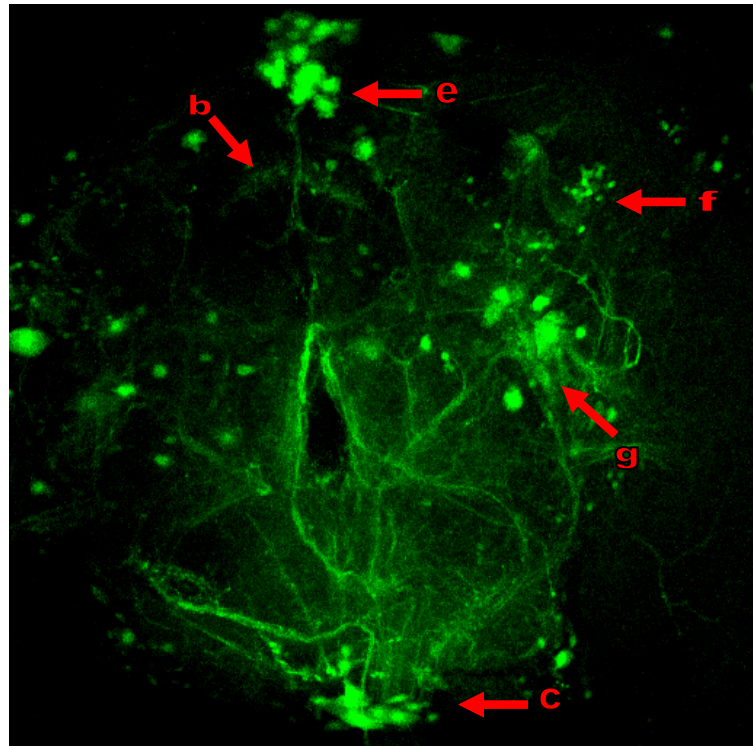
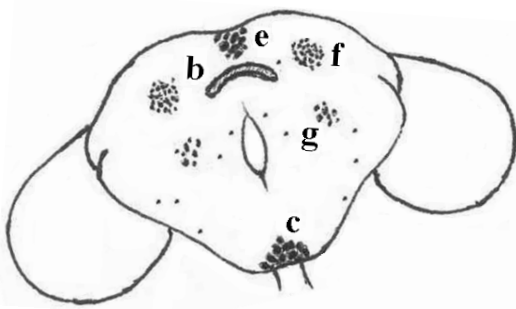
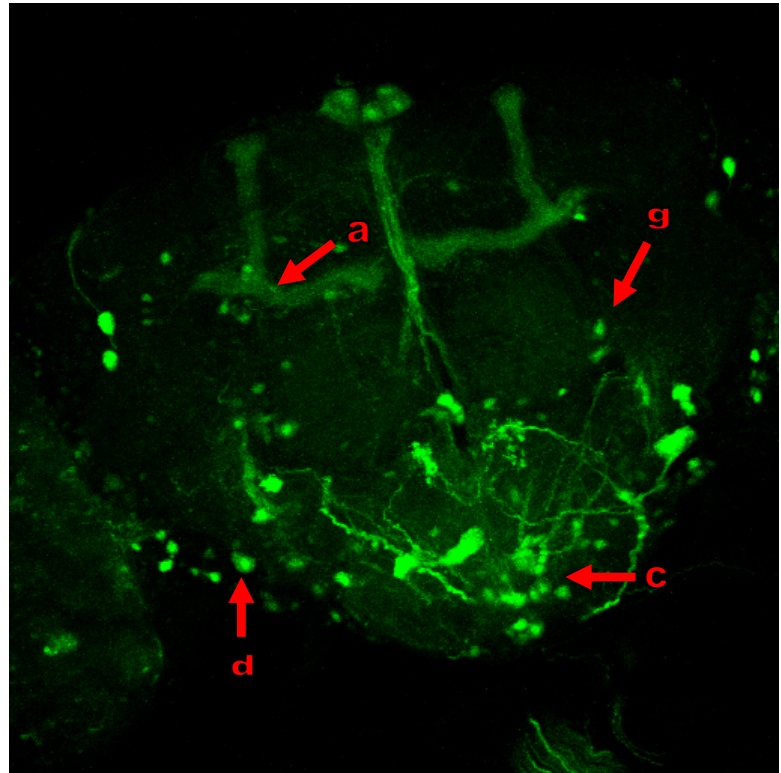
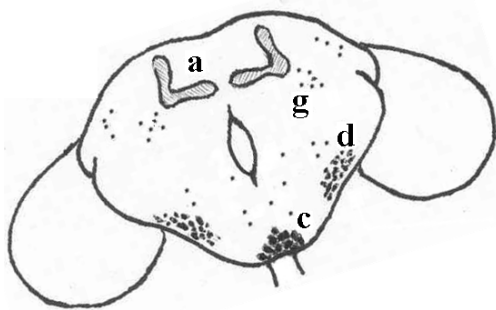


Figura 9. Neuronas capturadas por la inserción del elemento-P en el cerebro de un macho de la línea L75 marcadas con GFP. Se muestra la parte anterior (A) y la posterior (B) del cerebro. Las flechas señalan los cuerpos fungiformes (a), el cuerpo en forma de abanico (b), neuronas en el ganglio subesofágico (c), neuronas en la parte ventrolateral (d) en la parte dorsal (e), las células de kenyon (f) y neuronas dispersas tanto en la parte posterior y anterior (g). A la izquierda se muestran esquemas con las estructuras señaladas. n=20

A) ♀ Vista anterior.



B) ♀ Vista posterior

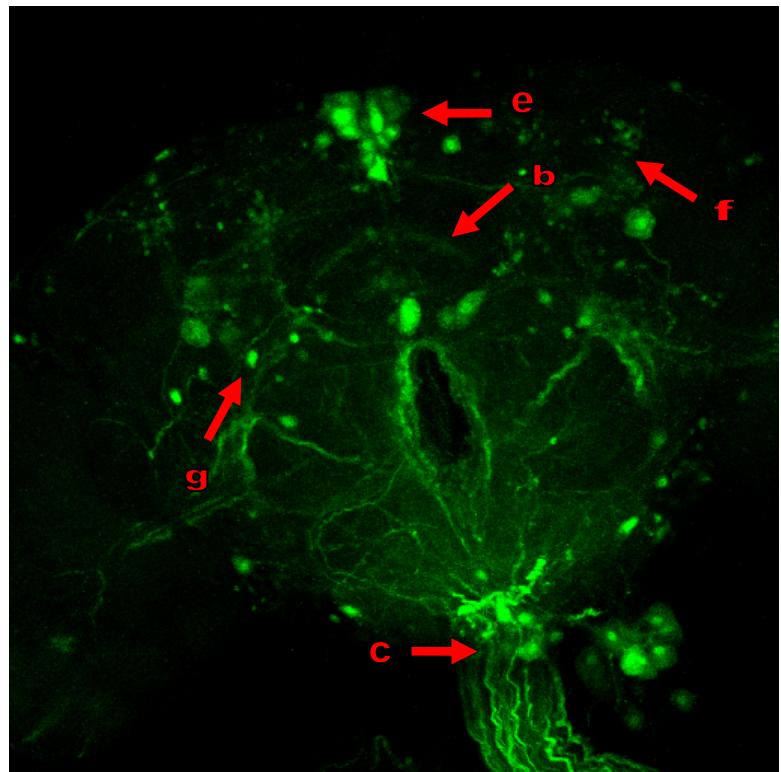
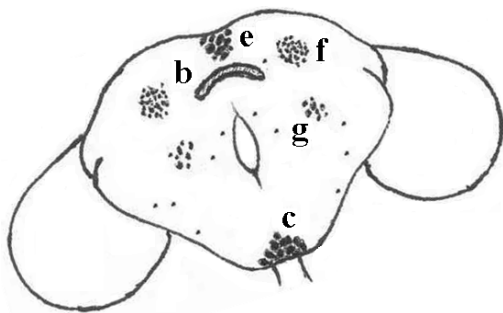
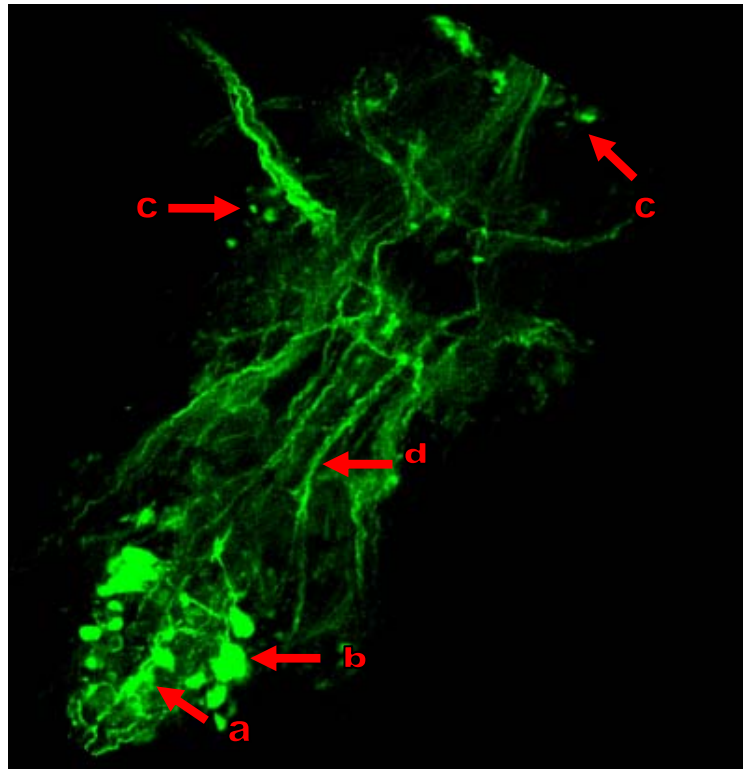
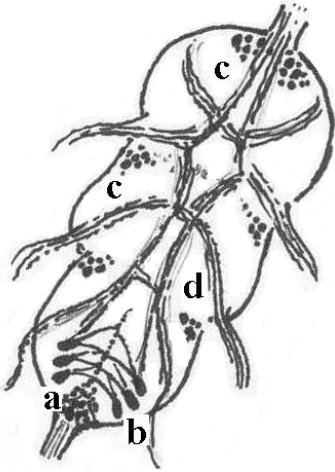


Figura 10. Neuronas capturadas por la inserción del elemento-P en el cerebro de una hembra de la línea L75 marcadas con GFP. Se muestra la parte anterior (A) y la posterior (B) del cerebro. Las flechas muestran los cuerpos fungiformes (a), el cuerpo en forma de abanico (b), neuronas en el ganglio subesofágico (c), neuronas en la parte ventrolateral (d) en la parte dorsal (e), las células de kenyon (f) y neuronas dispersas tanto en la parte posterior y anterior (g). A la izquierda se muestran esquemas con las estructuras señaladas. n=15

A) ♂



B) ♀

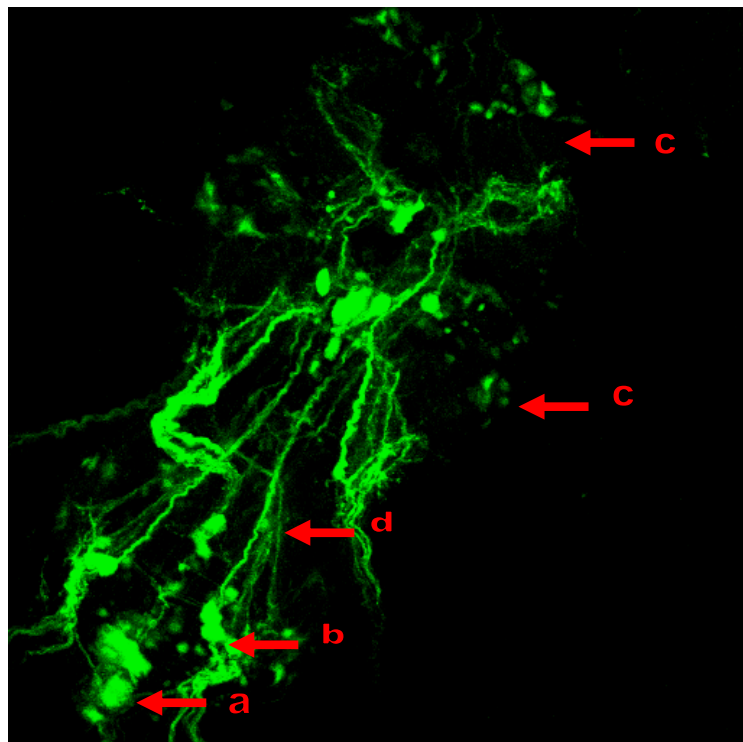
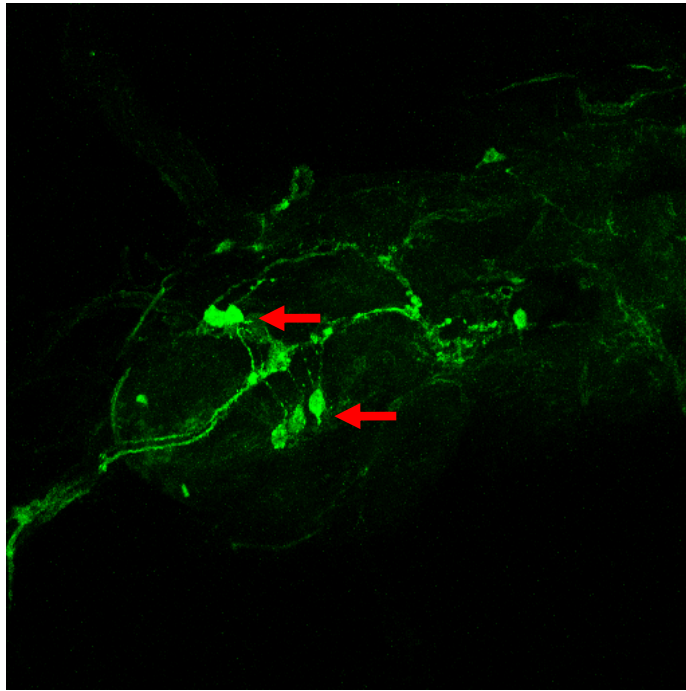


Figura 11. Neuronas capturadas por la inserción del elemento-P en el ganglio torácico abdominal de la línea L75 marcadas con GFP. No hay diferencias evidentes entre machos (A) y hembras (B). Las flechas muestran una hilera central (a), dos hileras laterales de neuronas pareadas en el lóbulo posterior (b), cuerpos neuronales en la parte anterior del primer y segundo lóbulos (c) y proyecciones (d). A la izquierda se muestra un esquema con las estructuras señaladas. ♂n=20, ♀n=15

A) ♂



B) ♀

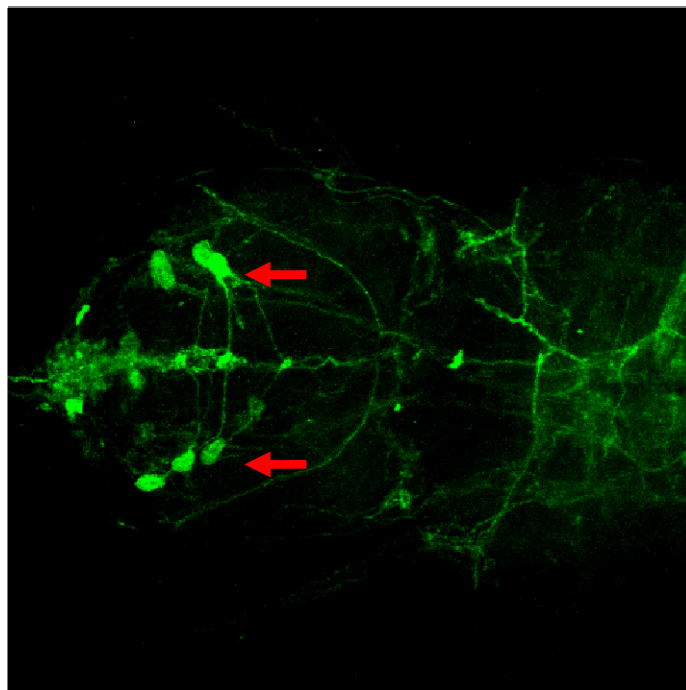


Figura 12. Neuronas capturadas por la inserción del elemento-P en el lóbulo posterior del ganglio torácico abdominal de la línea L75 marcadas con GFP-MCD8. Se distinguen grandes neuronas pareadas a los lados tanto en machos (A) como en hembras (B). ♂n=10, ♀n=10

Sitio de inserción del elemento-P en la línea L75.

Para mapear el sitio de inserción del elemento-P con *Gal4* se realizaron PCRs inversos de DNA genómico digerido con dos enzimas de restricción, PstI y MspI. Sólo se obtuvo producto en el PCR inverso a partir de las digestiones con MspI. El corte más cercano al extremo 5' del elemento-P por esta enzima es en la base 857. El fragmento que se amplificó fue de alrededor de 1000 pb (Fig 13).

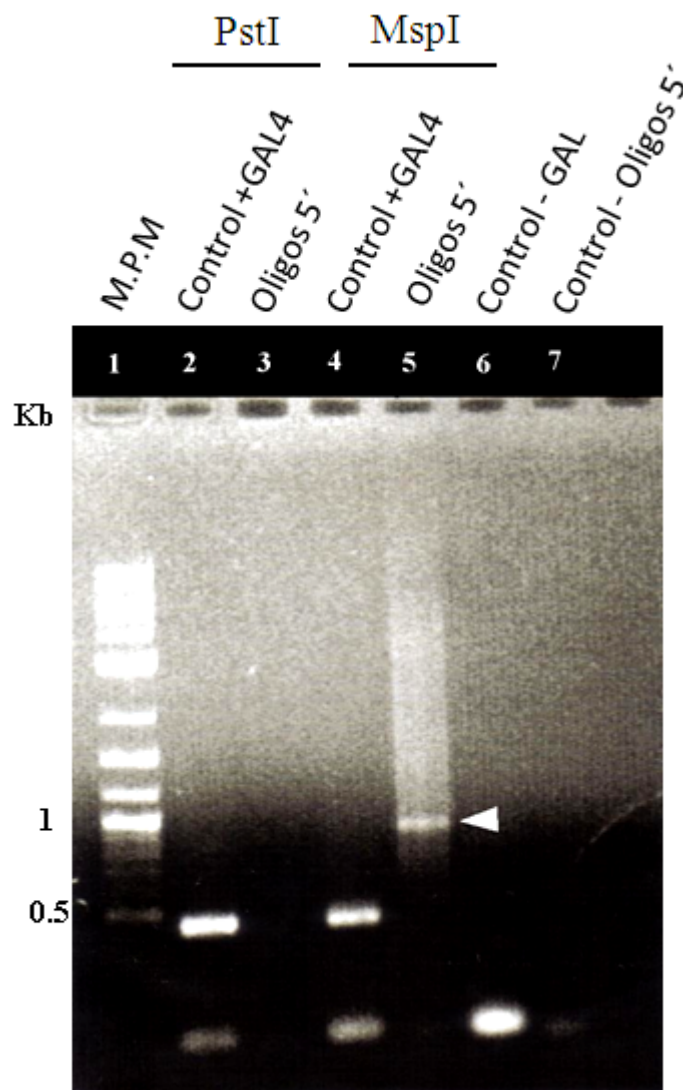


Figura 13. Producto del PCR inverso. La flecha señala un producto de alrededor de 1000 pb compuesto por el extremo 5' del elemento-P y una sección de DNA genómico.

El producto de PCR que se mandó a secuenciar contenía una secuencia que correspondía al gen *squid*, localizado en el brazo derecho del cromosoma 3 (Fig 14). Para comprobar que el elemento-P en la línea L75 se encontraba insertado en este gen, se realizaron PCRs para amplificar el extremo 5' del elemento-P junto con la región genómica adyacente a éste con el oligo Sqd en combinación con los oligos 5'_Rev* y 5'_Rev2, mientras que se realizaron PCR's para amplificar el extremo 3' del elemento-P junto con la región genómica adyacente a éste con el oligo Ele-P 3'1 en combinación con los oligos Sqd Rev1 y Sqd Rev2.

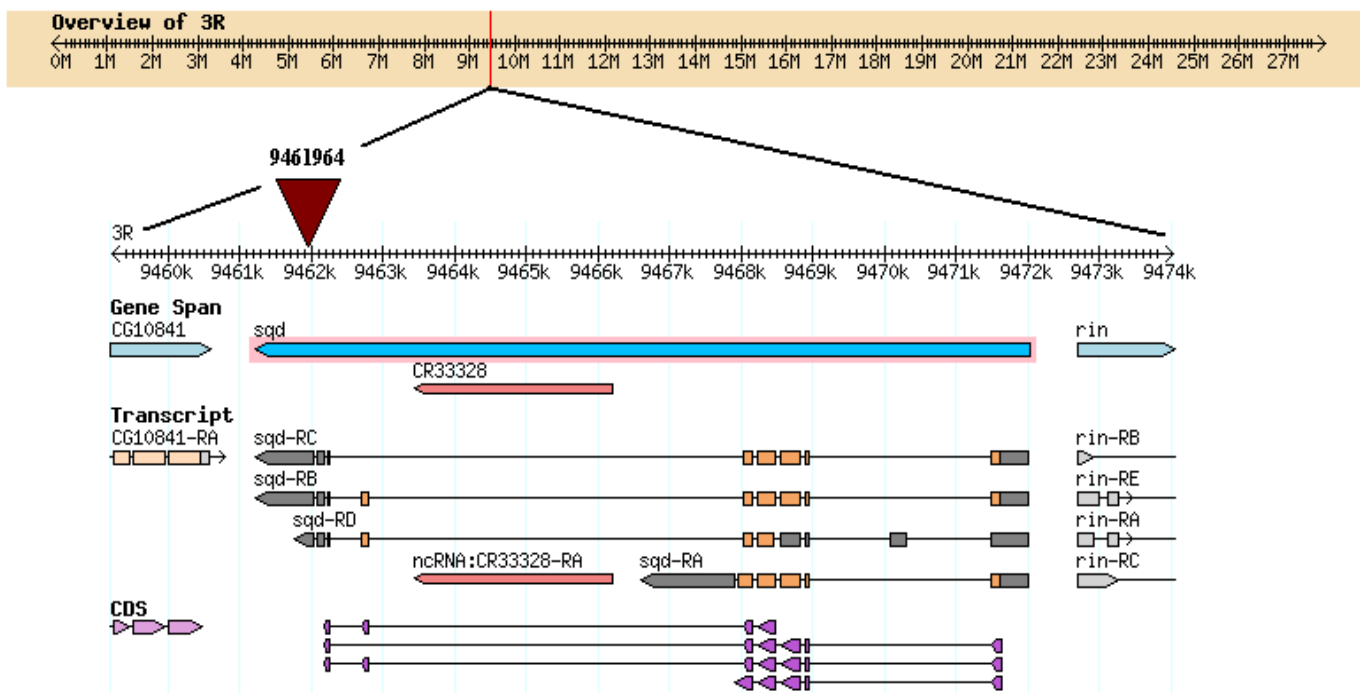


Figura 14. El elemento P {Gaw B} en la línea L 75 se encuentra insertado en un intrón del gen *squid* localizado en el brazo derecho del cromosoma 3. El triángulo vino muestra el sitio de inserción en la base 9461964 del cromosoma (Flybase).

Los productos obtenidos en estas reacciones fueron de alrededor de 500 pb para una combinación de oligos y de alrededor de 1000 pb para la otra combinación de oligos en el caso del extremo 5' del elemento-P (Fig 15). En el caso del extremo 3' del elemento-P, los productos obtenidos en las reacciones fueron de alrededor de 700 pb para una combinación de oligos y de alrededor de 900 pb para la otra combinación de oligos (Fig 16). Los pesos moleculares de los productos coincidieron con los pesos moleculares esperados en base a la secuencia inicial que se obtuvo a partir del PCR inverso.

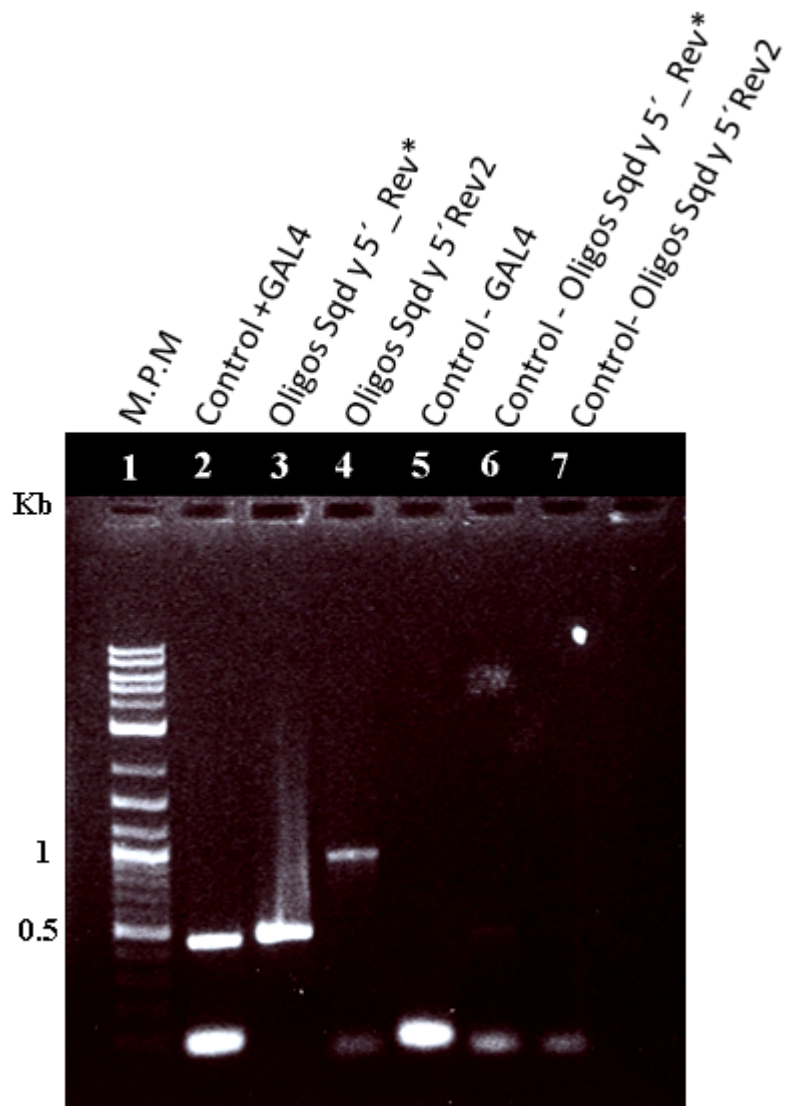


Figura 15. Comprobación del sitio de inserción del elemento-P adyacente al extremo 5' del mismo. Se muestra un producto de alrededor de 500 pb con la primera combinación de oligos (carril 3) y un producto de alrededor de 1000 pb con la segunda combinación de oligos (carril 4) para amplificar el extremo 5' del elemento-P y la región genómica adyacente.

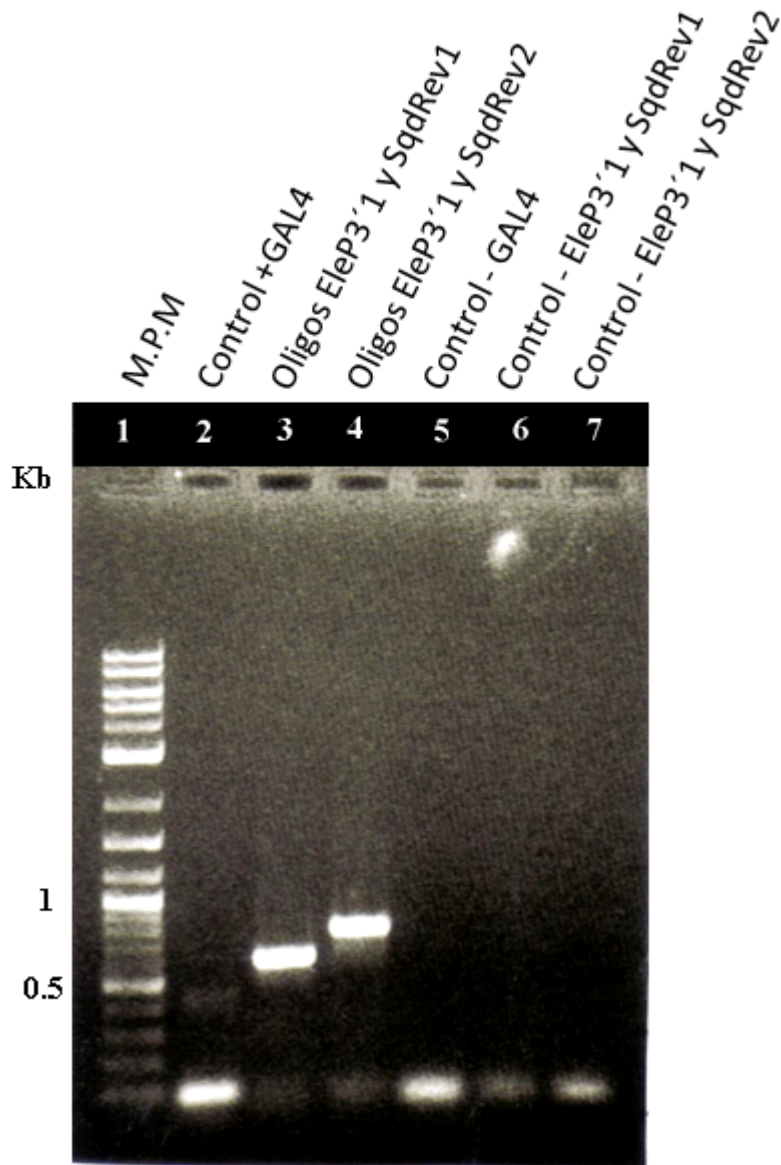


Figura 16. Comprobación del sitio de inserción del elemento-P adyacente al extremo 3' del mismo. Se muestra un producto de alrededor de 700 pb con la primera combinación de oligos (carril 3) y otro de alrededor de 900 pb con la segunda combinación (carril 4) para amplificar el extremo 3' del elemento-P y la región genómica adyacente.

Los productos de PCR se mandaron a secuenciar y se pudo determinar que el elemento-P se encuentra insertado entre la base 750 del gen *squid* y una pequeña repetición de 8 nucleótidos correspondientes al segmento 743-750 del mismo gen. Esto de acuerdo a la secuencia del gen *squid* en la base de datos de Flybase. Esta región corresponde al primer intrón del gen.

Discusión

De las siete líneas que presentaron un fenotipo de esterilidad o de fertilidad reducida al expresar TNT del total de las 86 líneas que se probaron, en cuatro, las hembras presentaron un fenotipo de fertilidad reducida y en cuatro, los machos presentaron un fenotipo de esterilidad. No se cuantificó la cantidad de crías que tenían las hembras con fenotipo de fertilidad reducida, pero se trataba de una reducción lo suficientemente drástica para ser evidente. De las líneas que presentaron un fenotipo de esterilidad, la L75 se estudió más a fondo por ser la primera línea que se encontró que presentó este fenotipo.

De los parámetros que fueron medidos en las pruebas de cortejo y apareamiento, el único en el que hay una diferencia significativa entre los machos *L75;TNT* y los controles, fue la relación entre el índice de extensión de ala y el índice de cortejo. Esta diferencia conductual puede atribuirse a una desregulación de las neuronas que codifican el programa motor de la canción de cortejo o a que al presentar dificultades para intentar la copulación permanecen más tiempo en la etapa de canto.

La infertilidad de los machos *L75/TNT* probablemente se debe a que los problemas motores que presentan les impiden copular ya que para copular los machos deben realizar un rápido movimiento en el que se montan a la hembra, doblan el abdomen y la penetran. Debido a que las hembras sólo tienen que permanecer estáticas, abrir las alas y la placa vaginal para copular, los problemas motores que presentan no les impiden aparearse. Por lo que algunas de las neuronas desactivadas en estas moscas por acción de la *TNT* pueden estar regulando la contracción de algunos de los músculos del abdomen que los machos utilizan para realizar los movimientos requeridos durante el apareamiento.

Los cerebros presentan tres pares de neuronas marcadas en la sección posterior del ganglio torácico abdominal, algunas neuronas grandes en el cerebro, así como un patrón de proyecciones que recorren el ganglio. Las diferencias observadas podrían deberse a daños ejercidos al tejido durante las disecciones y a diferencias en la preparación de las muestras y la fijación de las mismas más que a diferencias intrínsecas al patrón de expresión.

Probablemente las neuronas responsables del fenotipo de déficit en la cópula de los machos *L75/TNT* son las neuronas en la sección más posterior del ganglio torácico abdominal que se marcan al expresar GFP en las moscas *L75*. Esto se debe a que estos machos pueden llevar a cabo todos los pasos de cortejo y este programa motor es ejecutado por neuronas que se encuentran organizadas a lo largo del ganglio torácico abdominal (Hall, 1978, Dylan y Miesenbo, 2008). Las neuronas que regulan los movimientos del abdomen necesarios para el apareamiento deben encontrarse en la última sección del ganglio torácico abdominal, ya que esta sección regula la contracción de los músculos más posteriores del abdomen. Otra alternativa es que los machos *L75/TNT* no logren copular por un problema motor o de coordinación más generalizado como consecuencia del patrón extensivo de expresión de *sqd* en el SNC y no debido a la desactivación de un circuito neuronal discreto que se encuentre involucrado específicamente en el apareamiento *per se*. No obstante, la baja frecuencia de intentos de copulación y que éstos consisten en una débil contracción del abdomen insuficiente para hacer contacto con la hembra sugiere que además del problema motor y de coordinación generalizado, estas moscas presentan un fenotipo de copulación deficiente. Este fenotipo es similar al que ha sido observado en los mutantes *cel* y *plt* (Yamamoto, 1997); por lo que es factible que por lo menos algunas de las neuronas que expresan *sqd* involucradas en la cópula y algunas de las que expresan *cel* y *plt* involucradas en este fenómeno sean las mismas.

Dada la participación de las neuronas que expresan *fru* en el comportamiento reproductivo de los machos de *Drosophila* y a que algunos mutantes en este gen a pesar de que cortejan indiscriminadamente no copulan (Manoli y Baker, 2004, Stockinger et al., 2005); podría ser que algunas de las neuronas involucradas en copulación que expresen *sqd* también expresan *fru*.

Numerosas neuronas fueron desactivadas tanto en el cerebro como en el ganglio torácico abdominal, sin embargo, no todas ellas necesariamente contribuyen al fenotipo observado. Como se mencionó, podría tratarse de neuronas motoras que directamente estimulen algunos de los músculos abdominales que las moscas requieren para aparearse pero también podría tratarse de interneuronas que regulen la actividad de dichas neuronas motoras o ambas. La expresión de GFP de las moscas *L75; GFP* y

L75;GFP-MCD8 en los nervios que surgen del ganglio sugiere que algunas de las neuronas desactivadas envían proyecciones a los músculos. Además, algunas neuronas que fueron capturadas envían proyecciones hacia el cuerpo en forma de abanico, una estructura del complejo central que se encuentra involucrada en la coordinación motora. También fueron capturadas algunas neuronas de Kenyon y los lóbulos anteriores de los cuerpos fungiformes por lo que estas moscas probablemente presenten problemas de memoria y aprendizaje.

Determinar exactamente cuáles de todas las neuronas que fueron desactivadas en los machos *L75* están involucradas en regular el apareamiento requerirá experimentos más complejos como la generación de mosaicos genéticos con los que se podría restringir aún más el número de neuronas desactivadas (Lee y Luo, 1999). De manera similar ocurre con la determinación de los tipos de neuronas, que fueron desactivada, el tamaño de algunas de éstas indica que se trata de neuronas peptidérgicas, no obstante, para establecer qué tipo o tipos de neuronas peptidérgicas son, haría falta hacer inmunotinciones de marcadores específicos para distintos tipos de neuronas en cerebros de moscas *L75;GFP*, no sólo para determinar la identidad de las neuronas peptidérgicas sino también del resto de neuronas que expresan *sqd*.

Los heterózigos para la inserción de la línea *L75* no presentan ningún fenotipo aparente, ni morfológico ni conductual, como lo atestigua su desempeño durante las pruebas de cortejo y apareamiento mientras que la inserción homózigas es semiletal y tampoco causa un fenotipo morfológico aparente. Esto puede ser consecuencia de que el elemento-P se encuentra insertado en un intrón del gen *sqd* por lo que puede estar afectando su splicing, ya que es un inserto de 11.279 kb, pero sin inhibirlo por completo, de tal forma que algunos homózigos logren desarrollarse y sobrevivir. Alternativamente, la inserción podría estar afectando un sitio regulatorio del gen que se encuentre dentro del intrón.

La inserción *L75* aunada a la toxina de tétanos es semiletal, lo cual puede explicarse como un efecto de la expresión generalizada del gen *sqd* en el SNC. Los machos *L75* homózigos son infértiles al igual que los machos heterózigos *L75* que expresan la toxina de tétanos, de tal manera que la expresión de la toxina podría estar fenocopiando el fenotipo de déficit en el apareamiento de los homózigos. Esto sugiere que las neuronas

que expresan *sqd* involucradas en la cópula no se desarrollan correctamente en los homocigotos a causa de una reducción en la producción de la proteína Sqd.

El gen *squid*, donde se encuentra insertado el elemento-P en la línea L75, pertenece a una familia de genes conocidos como ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas. Estas proteínas se unen a RNAs nucleares para formar complejos con los transcritos producidos por la RNA polimerasa II y participan en una amplia gama de procesos celulares como transcripción, procesamiento de pre-mRNA en el núcleo, así como traducción y recambio de mRNA citoplasmático (The Interactive Fly).

Se conocen cuatro transcritos de este gen y a su vez cuatro isoformas de la proteína Sqd, de las cuales se ha visto que cumplen distintas funciones en la localización de *gurken* (Norvell et al., 1999) y probablemente de los transcritos de otros genes con los que interactúa. Los procesos biológicos en los que se ha visto que participa este gen son en el proceso reproductivo, en la especificación del eje dorsoventral, en la especificación del eje del oocito, en regulación de procesos metabólicos, establecimiento y mantenimiento de la polaridad del epitelio folicular, en el movimiento de componentes celulares, en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad del citoesqueleto y en regulación negativa del splicing del RNA (Flybase).

La mejor caracterización de la función de *sqd* ha sido durante la ovogénesis cuando la proteína Sqd se une a la región 3' no traducida del mRNA de los genes *gurken* y *oskar*, genes maternos que codifican para proteínas que contribuyen a determinar los ejes anteroposterior y dorsoventral del oocito, y junto con la proteína Bruno, y al parecer mediante su interacción con la proteína motora Dineína, participa en la localización del mRNA de *gurken* en la región anterior dorsal a la vez que inhibe su traducción mientras que participa en la localización del mRNA de *oskar* en la parte posterior del oocito (Norvell et al., 2005, Cáceres y Nilson, 2009 y The Interactive Fly). También se ha demostrado que este gen determina que los transcritos de *fushi tarazu* se localicen apicalmente de los núcleos en los blastodermos (Lall et al., 1999).

La función del gen *sqd* sólo ha sido estudiada en etapas tempranas del desarrollo, nunca en el sistema nervioso. Ya que el gen *sqd* está involucrado en la determinación de la polaridad de los embriones, es probable que en las neuronas en las que se expresa,

también lleve a cabo una función similar, determinando la polaridad de las mismas, aunque debido a que no se expresa en todas las neuronas, tal vez sólo determina la distribución de uno o más componentes de las neuronas en donde se expresa de tal modo que puede no ser un determinante de la morfología polarizada éstas pero sí influir en su función.

Como la función del gen *sqd* en etapas del desarrollo posteriores al establecimiento de la polaridad del embrión no ha sido estudiada, la línea L75, en virtud de tener una inserción que no es letal de un elemento-P con Gal4 en este gen, ofrece una buena oportunidad para estudiar la participación de *sqd* a lo largo del desarrollo tanto en el sistema nervioso como en otros tejidos.

Perspectivas

Tomar más videos de los machos *L75;TNT* así como de los respectivos controles y medir los distintos parámetros del cortejo y el apareamiento en machos *L75* homocigotos.

Evaluar si las hembras homocigotas para la inserción *L75* son fértiles.

Establecer una línea con el genotipo *GFP/GFP;L75/TM2* para realizar disecciones del SNC de machos homocigotos para la inserción *L75* que expresen GFP y compararlos con el SNC de los machos heterocigotos para la inserción *L75* que expresen GFP.

Hacer disecciones del abdomen de machos *L75* tanto homocigotos como heterocigotos que expresen GFP o alguna variante de ésta para determinar que músculos y estructuras son inervadas por las neuronas que expresan *sqd*.

Cuantificar mediante Western Blots la diferencia en la producción de la proteína Sqd entre los machos homocigotos y heterocigotos para la inserción *L75*.

Realizar inmunotinciones de marcadores específicos de distintos tipos neuronales en cerebros de machos *L75;GFP* para determinar la identidad de algunas de las neuronas que fueron capturadas. En especial con anticuerpos contra Fru y si es posible con anticuerpos contra Cel y Plt.

Cruzar moscas que expresen Gal4 bajo el promotor de *elav* con moscas que tengan una inserción con un iRNA específico para *sqd* bajo una secuencia UAS para ver si se puede reproducir en los machos de la progenie el fenotipo de déficit en apareamiento que muestran los machos *L75;TNT* reduciendo la expresión de *sqd* únicamente en el sistema nervioso.

Bibliografía

Ashburner M., Golic K., Hawley R. S. 2005. *Drosophila: A Laboratory Handbook*. 2^o Ed. CSHL Press. EUA.

Billeter J. C. y Goodwin S. F. 2004. Characterization of *Drosophila fruitlessgal4* Transgenes Reveals Expression in Male-Specific *fruitless* Neurons and Innervation of Male Reproductive Structures. *J. Comp. Neurol.* 475, 270–287.

Brand A. H. y Perrimon N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.

Castrillon D.H., Gonczy P., Alexander S., Rawson R., Eberhart C.G., Viswanathan S., DiNardot S. y Steven A. Wasserman S.A. 1993. Toward a Molecular Genetic Analysis of Spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* Characterization of Male-sterile Mutants Generated by Single P Element Mutagenesis. *Genetics* 135: 489-505

Cáceres L. y Nilson L. A. 2009. Translational repression of *gurken* mRNA in the *Drosophila* oocyte requires the hnRNP Squid in the nurse cells. *Dev. Biol.* 326. 327–334.

Charalambos P. Kyriacou. 2005. Sex in fruitflies is *fruitless*. *Nature*, 436, 334-335.

Chittka Lars y Niven Jeremy. 2009. Are Bigger bBrains bBetter?. *Current Biology* 19, R995–R1008

Datta S. R., Vasconcelos M. L., Ruta V., Luo S., Wong A., Demir E., Flores J., Balonze K., Dickson B. J. y Axel R. 2008. The *Drosophila* pheromone cVA activates a sexually dimorphic neural circuit. *Nature* 452, 473 – 477.

Demir E. y Dickson B. J., 2005. *fruitless* Splicing Specifies Male Courtship Behavior in *Drosophila*. *Cell*, Vol. 121, 785–794.

Dickson B. J. 2008. Wired for Sex: The Neurobiology of *Drosophila* Mating Decisions. *Science*, 322, 904 – 908.

Ditch L.M., Shirangi T., Pitman J. L., Latham K. L.4, Finley K. D.2, Edeen P. T., Taylor B. J. y McKeown M. 2004. *Drosophila* retained/dead ringer is necessary for neuronal pathfinding, female receptivity and repression of fruitless independent male courtship behaviors. *Development* 132 (1), 155-164.

Dylan C. J. y Miesenbo G. 2008. Sex-Specific Control and Tuning of the Pattern Generator for Courtship Song in *Drosophila*. *Cell*, 133, 354 – 363.

Ferveur JF y Jallon JM. 1996. Genetic control of male cuticular hydrocarbons in *Drosophila melanogaster*. *Genet Res.* 67(3):211-8.

Finley K. M., Edeen P. T., Foss M., Gross E., Ghbeish N., Palmer R. H., Taylor B. J. y McKeown M. 1998. *dissatisfaction* Encodes a Tailless-like Nuclear Receptor Expressed in a Subset of CNS Neurons Controlling *Drosophila* Sexual Behavior. *Neuron*, Vol. 21, 1363–1374

Hall J.C. 1978. CONTROL OF MALE REPRODUCTIVE BEHAVIOR BY THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF *DROSOPHILA*: DISSECTION OF A COURTSHIP PATHWAY BY GENETIC MOSAICS. *Genetics* 92: 437-457.

Hasemeyer M., Yapici N., Heberlein U. y Dickson B. J. 2009. Sensory Neurons in the *Drosophila* Genital Tract Regulate Female Reproductive Behavior. *Neuron* 61, 511–518.

Kimura K., Hachiya T., Koganezawa M., Tazawa T. y Yamamoto D. 2008. Fruitless and Doublesex Coordinate to Generate Male-Specific Neurons that Can Initiate Courtship. *Neuron* 59, 759–769.

Kimura K., Ote M., Tazawa T., and Yamamoto D. (2005). Fruitless specifies sexually dimorphic neural circuitry in the *Drosophila* brain. *Nature* 438, 229–233.

Kvitsiani Duda y Dickson Barry J. 2005. Shared neural circuitry for female and male sexual behaviours in *Drosophila*. *Current Biology* Vol 16 No 10.

Lall S., Francis-Lang H., Flament A., Norvell A., Schupbach T. 1999. Squid hnRNP Protein Promotes Apical Cytoplasmic Transport and Localization of *Drosophila* Pair-Rule Transcripts. *Cell*, Vol. 98, 171–180

Lee Tzumin y Luo Liqun. 1999. Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker for Studies of Gene Function in Neuronal Morphogenesis. *Neuron*, Vol. 22, 451–461.

Manoli D. S. & Baker B. S. 2004. Median bundle neurons coordinate behaviours during *Drosophila* male courtship. *Nature* 430, 564-568.

Monastirioti M. 2003. Distinct octopamine cell population residing in the CNS abdominal ganglion controls ovulation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 264(1):38-39.

Nichols C. D. 2006. *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacology & Therapeutics* 112, 677–700.

Norvell A., Kelley R. L., Wehr K. y Schupbach T. 1999. Specific isoforms of Squid, a *Drosophila* hnRNP, perform distinct roles in Gurken localization during oogenesis. *GENES & DEVELOPMENT* 13:864–876.

Norvell A., Debec A., Finch D., Gibson L., Thoma B. 2005. Squid is required for efficient posterior localization of oskar mRNA during *Drosophila* oogenesis. *Dev Genes Evol* 215: 340–349.

Rideout E. J., Billeter J. C. y Goodwin S. F. 2007. The Sex-Determination Genes fruitless and doublesex Specify a Neural Substrate Required for Courtship Song. *Current Biology* 17, 1473–1478.

Rodríguez Valentín R., López González I., Jorquera R., Labarca P., Zurita M. y Reynaud E. 2006. Oviduct Contraction in *Drosophila* is Modulated by a Neural Network that is both, Octopaminergic and Glutamatergic. *Journal of Cellular Physiology* 209:183-198.

Sanders L. y Arbeitman M., 2008, Doublesex establishes sexual dimorphism in the *Drosophila* central nervous system in an isoform-dependent manner by directing cell number. *Developmental Biology* 320, 378–390.

Shirangi T. R. y McKeown M. 2007. Sex in flies: What ‘body–mind’ dichotomy? *Developmental Biology* 306, 10–19.

Shirangi T. R., Taylor B. J. y Michael McKeown M. 2006. A double-switch system regulates male courtship behavior in male and female *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* 38, 1435–1439.

Sokolowski M. B. 2001. *Drosophila*: Genetics Meets Behaviour. *Nature Reviews, Genetics*, Vol. 2.

Stockinger P., Kvitsiani D., Rotkopf S., Tirián L. y Dickson B.J. 2005. Neural Circuitry that Governs *Drosophila* Male Courtship Behavior. *Cell*, Vol. 121, 795–807.

Sweeney S. T., Kendal Broadie K., John Keane J., Heiner Niemann H., y J. O’Kane C. 1995. Targeted Expression of Tetanus Toxin Light Chain in *Drosophila* Specifically Eliminates Synaptic Transmission and Causes Behavioral Defects. *Neuron*, Vol. 14, 341-351.

Yamamoto D. 1997. Genetic Dissection of Sexual Behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Entomol*, 42:551–85

Yamamoto D., Kazuko Fujitani, Kazue Usui, Hiroki Ito, Yoshiro Nakano. 1998. From behavior to development: genes for sexual behavior define the neuronal sexual switch in *Drosophila*. *Mechanisms of Development* 73, 135–146.

Yang Ch., Belawat P., Hafen E., Y. Jan L., Jan Y. 2009. Drosophila Egg-Laying Site Selection as a System to Study Simple Decision-Making Processes. SCIENCE VOL 319, 1679-1683.

Yapici N., Young-Joon Kim, Ribeiro C. y Dickson B. J. 2008. A receptor that mediates the post-mating switch in Drosophila reproductive behaviour. Nature 451, 33 – 38.

Yu Jai y Dickson Barry J. 2005. Sexual Behaviour: Do a Few Dead Neurons Make the Difference?, Current Biology, Vol 6, No. 1.

<http://flybase.org/>

The Interactive Fly, <http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm>