



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**Identificación de células de Kenyon positivas a *teczitcatl* (*tecu*) y caracterización del comportamiento de mutantes *tecu***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

**LAURA ALEJANDRA LUJANO PÉREZ**

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar

Instituto de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Alfredo Varela Echavarría

Instituto de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla

Dra. Martha Vázquez Laslop

Instituto de Biotecnología, UNAM Campus Cuernavaca

Juriquilla, Querétaro, marzo de 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Instituto de Neurobiología**

Los miembros del comité del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Laura Alejandra Lujano Pérez, cuyo título es “Identificación de células de Kenyon positivas a *tecuzitécatl* (*tecu*) y caracterización del comportamiento de mutantes *tecu*” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente: Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda

Secretario: Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar

Vocal: Dr. Daniel Ríos Barrera

Suplente: Dra. Martha Vázquez Laslop

Suplente: Dr. Ataulfo Martínez Torres

Dr. José Gerardo Rojas Piloni

Coordinador del programa de Maestría en Ciencias

(Neurobiología)

## RESUMEN

Para este estudio aislamos mutaciones en un gen de *Drosophila melanogaster* al que llamamos *tecuzitécatl* (*tecu*) que codifica para una fosfolipasa tipo A2. Encontramos que *tecu* se expresa en un grupo de células de Kenyon (CK), las cuales son las células intrínsecas de los cuerpos setíferos (CS) del cerebro. Aquí mostramos que las mutaciones en este gen conducen a respuestas conductuales defectuosas en los paradigmas visuales. Comparamos directamente las respuestas del control (*yw*) y dos líneas *tecu* mutantes, *tecu*<sup>1</sup> y *tecu*<sup>2</sup>, que tienen alelos con inserciones de un elemento P en diferentes lugares del locus. Ambas líneas mutantes y el control tienen el mismo fondo genético. Un ensayo de fototaxis en larvas reveló que las líneas mutantes migran más hacia la luz que la línea *yw*. En un ensayo de contracorriente en adultos observamos además que las líneas mutantes tienen una respuesta deficiente a la luz (tienen fototaxis que de manera significativa es menos positiva). Para dilucidar si las mutaciones en *tecu*, además de causar un deterioro en el comportamiento de la mosca, tienen también un fenotipo mutante de la función de los fotorreceptores, realizamos electroretinogramas (ERG) en adultos control y mutantes. Los ERG sugieren que la comunicación de los fotorreceptores con las células de la lámina (L1 y L2) del lóbulo óptico del cerebro está algo comprometida. En conjunto, estos resultados muestran que *tecu* tiene un papel importante en el procesamiento de las respuestas visuales en *D. melanogaster*.

**Palabras clave:** Células de Kenyon (CK), cuerpos setíferos, ERG, fosfolipasa A2, fototaxis y *tecuzitécatl* (*tecu*).

## ABSTRACT

For this study we employed mutations in a gene in *Drosophila melanogaster* we named *tecuzitécatl* (*tecu*), that encodes a phospholipase A2 expressed at low levels in a group of Kenyon Cells (KCs). KCs are the intrinsic cells of the mushroom bodies (MB). Here we show that mutations in this gene lead to faulty behavioral responses in visual paradigms. We directly compared responses of control (*yw*) and two mutant *tecu* strains: *tecu*<sup>1</sup> and *tecu*<sup>2</sup>. Both mutations consist in P element insertions in different regions of the *tecu* locus. Mutant and control strains share the same genetic background. We first performed a larval phototaxis assay. Results show that *tecu* mutant individuals present significantly different responses (they migrate more towards the light) than *yw* control individuals. We also performed an adult countercurrent assay, where *tecu* mutant individuals have a deficient response to light (they have significantly less positive phototaxis). To elucidate whether mutations in *tecu*, apart from causing an impairment in fly behavior, also cause an impairment in photoreceptor function, we performed electroretinograms on control and mutant flies. Electroretinogram results are consistent with photoreceptor synaptic communication being somewhat compromised with optic lobe laminar cells (L1 and L2). Taken together, these results show that *tecu* has an important role processing visual responses in *D. melanogaster*.

**Key words: Electroretinograms, Kenyon cells, mushroom bodies, phospholipase A2, phototaxis and *tecuzitécatl* (*tecu*).**

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Genética de transducción de señales, del departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla, de Febrero de 2021 a Noviembre de 2022.

Se agradece al comité tutor que asesoró el desarrollo de este trabajo, el cual estuvo conformado por el Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar y el Dr. Alfredo Varela Echavarría, del Instituto de Neurobiología, UNAM, y por la Dra. Martha Vázquez Laslop del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Se agradece al Dr. Juan Manuel Murillo Maldonado por su apoyo en las labores técnicas y académicas del laboratorio.

Se agradece a las siguientes instancias académicas:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, No de CVU: 1082845

Coordinación General de Estudios de Posgrado de la UNAM

Coordinación del Programa Maestría en Ciencias (Neurobiología): Dra. Maricela Luna Muñoz y Dr. José Gerardo Rojas Piloni

A la Unidad de Enseñanza: Dra. Nuri Aranda López

A la Unidad de Videoconferencia: Lic. Lourdes Lara Ayala (q.e.p.d.)

## DEDICATORIAS

A mi familia:

A mi madre, María Elena Pérez Hernández.

A mi padre, Luis Fernando Sánchez y González.

A mi hermana, Luisa Fernanda Sánchez Pérez.

A mis abuelitos, Rosalio Moisés Pérez Alvirde y Maria Elena Hernández Quiroz.

No puedo más que agradecerles por su apoyo incondicional, así como el amor y la comprensión que me han brindado a lo largo de todo este trabajo.

Me resulta difícil expresar con palabras cuanto los amo y que tan importante ha sido su apoyo a lo largo de mi vida. Los amo infinitamente.

Al Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar, gracias por su magnífica tutela durante el desarrollo de este proyecto; es además una persona a quien tengo gran admiración, cariño y respeto.

A mis amigos, quienes a pesar de las situaciones fluctuantes y durante las tempestades; se mantuvieron cerca de mi, apoyandome y cuidandome; siempre sin esperar nada a cambio.

A Manuel Alejandro Zuniga y Daniel Tapia, amigos y compañeros leales, sinceros y comprometidos en el estudio de *D. melanogaster*. Sin su apoyo habría salido corriendo múltiples ocasiones del laboratorio. Me han regalado entrañables momentos. Nos encontraremos muchas veces en esta vida, espero que con las mismas queridas y entrañables conversaciones sobre: *tecu*, nano partículas y *kayak*.

A mis adorados y siempre leales Cuca, Güero y Gaba, quienes vieron más de lo que muchos podrían soportar y su mirada se ha mantenido siempre con el mismo amor incondicional.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	3
ABSTRACT.....	4
ÍNDICE .....	7
ACRÓNIMOS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
INTRODUCCIÓN .....	11
ANTECEDENTES.....	13
<b>SISTEMA VISUAL EN <i>D. MELANOGASTER</i></b> .....	13
<i>Estructura del ojo de D. melanogaster</i> .....	13
<i>Omatidios</i> .....	14
<i>Lóbulos ópticos</i> .....	17
<i>Vía de transducción en la visión de D. melanogaster</i> .....	19
<i>ERG</i> .....	22
<b>CUERPOS SETÍFEROS (CS) Y CÉLULAS DE KENYON (CK)</b> .....	24
<b>FOSFOLIPASAS</b> .....	27
<i>Fosfolipasa A2</i> .....	28
<b>PRUEBAS VISUALES EN ADULTOS Y LARVAS</b> .....	30
<b>ANTECEDENTES DIRECTOS</b> .....	32
<b>HIPÓTESIS</b> .....	32
<b>OBJETIVOS</b> .....	32
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	32
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	33
<b>METODOLOGÍA</b> .....	34
<b>LINEAS DE MOSCAS</b> .....	34
<b>GENÉTICA Y CRUZAS</b> .....	35
<b>PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO</b> .....	35
<b>ERG</b> .....	37
<b>DISECCIÓN DE CEREBROS Y DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA</b> .....	38
<b>COMPARACIÓN DE TRANSCRITOS</b> .....	39
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	39

<b>RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
<b>ENSAYO DE FOTOTAXIS EN LARVAS</b> .....	40
<b>ENSAYOS DE CONTRACORRIENTE EN ADULTOS</b> .....	42
<b>ANÁLISIS DE ERG</b> .....	44
<b>CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS <i>TECU</i> POR FLUORESCENCIA</b> .....	46
<b>COMPARACIÓN DE TRANSCRITOS</b> .....	47
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>49</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>52</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>53</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- ABHD:  $\alpha/\beta$  hidrolasa  
aMe12: Médula accesoria 12  
CK: Células de Kenyon  
cPLA<sub>2</sub>: PLA<sub>2</sub> citosólica  
CS: Cuerpos setíferos  
DAG: Diacilglicerol  
DRA: Área del borde dorsal del cerebro del adulto  
Dy: Dorsales-amarillos  
PAF: Factor activador de plaquetas  
ERG: Electrorretinogramas  
GPI: Glicosilfosfatidilinositol  
IP<sub>3</sub>: Fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato  
iPLA<sub>2</sub>: PLA<sub>2</sub> independiente de Ca<sup>+2</sup>  
IR: Índice de respuesta  
LBM: Motivo de unión a lípidos  
LMC: Neuronas monopolares de la lámina  
LOP: Placa de la lóbula

LPLA<sub>2</sub>: PLA<sub>2</sub> lisosomal

LPTC: Células tangenciales de la placa lobular

LVIN: Interneuronas visuales locales

MeTu: Clase de células de la médula del tubérculo óptico anterior

mbm, mushroom body miniature

Mi1: Medula 1

ML-VPN1: Neuronas de proyección visual 1 de la médula a la lóbula

*ninaE*: *neither inactivation nor afterpotential E*, gen de *Drosophila* que codifica para la rodopsina Rh1

Oc: Tipo de omatidio del ojo compuesto del adulto de la mosca, llamado “extraña pareja”, por sus siglas en inglés (odd couple)

*ORR*: Cepa silvestre de moscas llamada *Oregon-R*

*ort*: *ora transientless*, gen de *Drosophila* que codifica para un canal ionotrópico activado por histamina, necesario para la visión

p: Tipo de omatidio en el ojo compuesto del adulto de la mosca, llamado “pálido”

PA-FAH: Familia de PLA<sub>2</sub> específicas de acil-hidrolasa

PIP<sub>2</sub>: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PLA<sub>2</sub>: Fosfolipasa A<sub>2</sub>

PLAAT: PLA/aciltransferasa

PLB: Fosfolipasa B

PLC: Fosfolipasa C

PLD: Fosfolipasa D

PLP: Protocerebro lateral posterior

PR: Potencial de receptor sostenido

PUFAs: Ácidos grasos poli-insaturados

*rad*: *radish*, gen de *Drosophila* involucrado en la memoria y el ritmo cardiaco

*RpL32*: *ribosomal protein L32*

sPLA<sub>2</sub>: PLA<sub>2</sub> secretada

TAG: Triacilglicéridos

*tecu*: *tecuzitécatl*, un gen de *Drosophila* que codifica para una PLA<sub>2</sub>

Tlp: Placa translobulada de los lóbulos ópticos del cerebro de *Drosophila*

Tm3: Neuronas transmedulares, neuronas que conectan a la medula y la lobula

TPM: Transcritos por millón

VPN: Neuronas visuales de proyección

y: Yellow, tipo de omatidio en el ojo compuesto del adulto de *Drosophila*

*yw*: *yellow white*, cepa control de *Drosophila* que es homocigota mutante para *yellow*, un gen de *Drosophila* que codifica para una proteína involucrada en la pigmentación, y para *white*. *white* codifica para un transportador de pigmentos

## INTRODUCCIÓN

**La complejidad de la retina de los insectos es algo estupendo, desconcertante y sin precedentes en otros animales ... Comparado con la retina de estos aparentemente humildes representantes de la vida ... la retina de las aves, o de los mamíferos superiores parece algo tosco, grosero y deplorablemente elemental.**

**—Ramón y Cajal (1937), Recuerdos de mi vida**

Uno de los objetivos clave de las neurociencias es comprender cómo los circuitos específicos de las células cerebrales permiten que los animales respondan de manera óptima al mundo en constante cambio que los rodea. Estos procesos se estudian más fácilmente en cerebros con un menor número de neuronas, y la mosca de la fruta (debido a su tamaño, su ciclo de vida y su conjunto de herramientas genéticas bien desarrolladas), se usa de manera amplia no solo para estudiar los genes sino los circuitos que subyacen al aprendizaje y la conducta.

El cerebro de *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) procesa información obtenida a partir de diferentes estímulos sensoriales durante su vida. La información de diversas modalidades sensoriales como el olfato y la visión se procesan, al menos de manera parcial, en los CS que son el sustrato neural en donde las hipótesis vigentes proponen que se detectan las coincidencias temporales de estímulos sensoriales para generar memorias (Barth & Heisenberg, 1997; Brembs & Wiener, 2006; Riesgo-Escovar et al., 1995; Yamagata et al., 2015).

En este trabajo se caracterizó en detalle los fenotipos conductuales de *tecu* en respuesta a estímulos visuales. Además, se sabe por estudios preliminares que aproximadamente el 10% del total de las CK presentes en los CS expresan *tecu* (Suplementaria A).

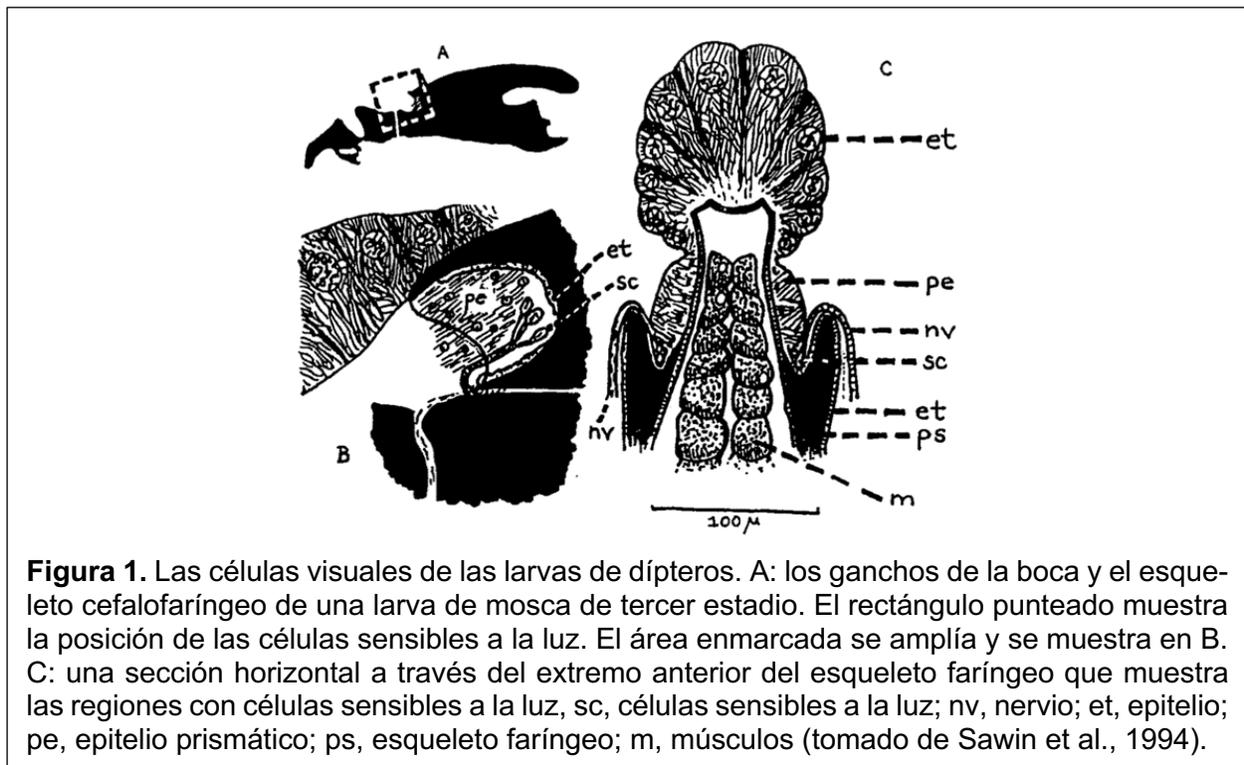
También se realizaron pruebas de comportamiento, ERG y análisis de comparación de transcritos para estudiar los fenotipos mutantes de *tecu* en respuesta a estímulos sensoriales visuales y se identificó a las CK que expresan *tecu*.

## ANTECEDENTES

### Sistema visual en *D. melanogaster*

#### Estructura del ojo de *D. melanogaster*

Los ojos compuestos de *D. melanogaster* tienen la capacidad para detectar colores, movimientos, luz polarizada y luz ultravioleta. Cada ojo compuesto está conformado por 750-800 omatidios que cubren 330° en acimut y 180° en elevación, proporcionando una visión de campo amplio a las moscas (Hardie, 1985; Heisenberg & Wolf, 1984). Los omatidios contienen fotorreceptores o células R, las cuales se dividen en tres clases: R1 a R6, que son los fotorreceptores externos y los fotorreceptores internos R7 y R8.

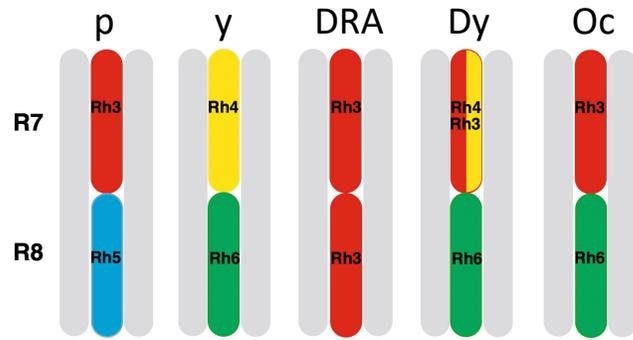


Por otro lado, el sistema visual en larvas es mucho más simple en comparación con el de los adultos. Consta de un par de órganos visuales bilaterales u órganos de Bolwig que se encuentran en la cabeza (Figura 1). Cada órgano visual está compuesto aproximadamente de 12 fotorreceptores, los cuales proyectan axones que forman el nervio óptico (o nervio de Bolwig), el cual se extiende desde los fotorreceptores pasa por el hemisferio larvario ipsilateral, y termina en los lóbulos ópticos del cerebro central de la larva (Campos et al., 1995; Fristrom, 1970; Green et al., 1993).

En estudios recientes en moscas adultas se determinó que el número total de neuronas en el lóbulo óptico es de aproximadamente 100,000. Esto es comparable al número de neuronas del resto del cerebro central, lo que demuestra la importancia y complejidad del procesamiento visual en esta especie (Raji & Potter, 2021). Ahora se sabe que las neuronas de proyección visual (VPN) llevan esta información a las estructuras cerebrales centrales, incluyendo los glomérulos ópticos (OG), el complejo central (CX) y los CS.

## **Omatidios**

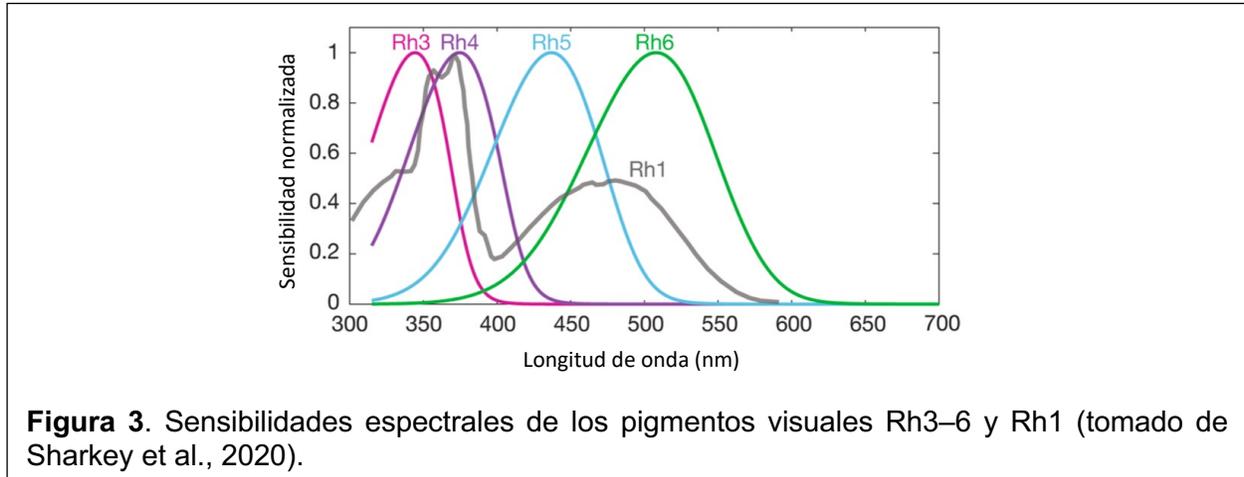
Cada omatidio consiste en un clúster de ocho fotorreceptores: seis externos (R1-R6) y los internos R7 y R8, encontrándose el órgano fotosensible o rabdómero del R7 por arriba del rabdómero del R8. Este acomodo da lugar a dos funciones muy importantes: la visión del color y la detección del vector de la luz polarizada. Todas las células fotorreceptoras tienen un rabdómero conformado por membranas plegadas, las cuales contienen las proteínas fotosensibles denominadas rodopsinas; estas confieren sensibilidad a los fotorreceptores, dependiendo del tipo de pigmento que expresen (Wernet & Desplan, 2004).



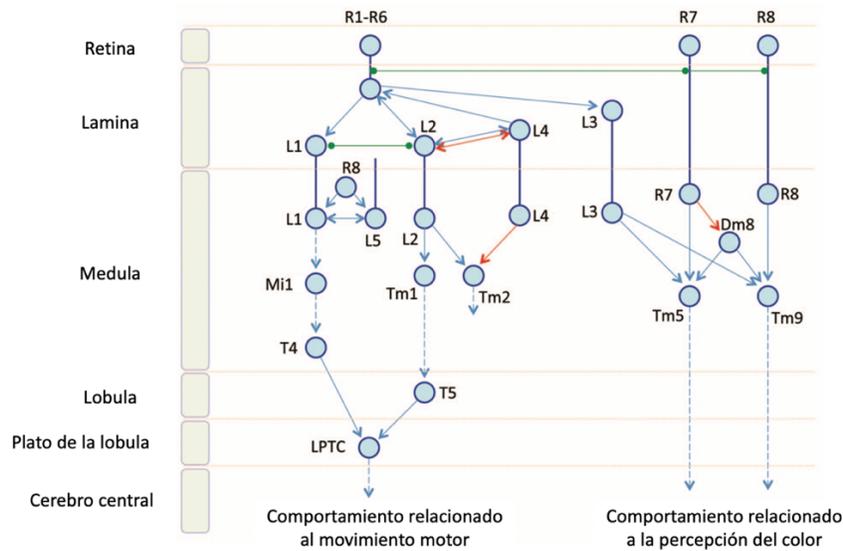
**Figura 2.** Representación esquemática de cinco tipos de omatidios en *D. melanogaster*. Las barras grises ilustran los rabdomeros de las seis células fotorreceptoras externas (R1 a R6) que expresan opsina Rh1 y que rodean a dos células fotorreceptoras internas (R7 y R8). Los tipos de omatidios se diferencian por distintas combinaciones de expresión de rodopsinas en las células fotorreceptoras internas, como se indica mediante barras de colores. Rh3 (rojo), Rh4 (amarillo), Rh5 (azul), Rh6 (verde) (tomado de Hilbrant et al., 2014). Cada célula fotorreceptora presenta hacia el centro del omatidio un organelo fotosensible llamado rabdomero, formando por múltiples prolongaciones de la membrana celular en forma de microvellosidades. Las moscas sólo son sensibles a los verdes y azules del espectro visible humano, pero son sensibles al ultravioleta, y a la luz polarizada.

Se pueden distinguir cinco tipos de omatidios basándonos en la expresión de combinaciones específicas de rodopsinas en los fotorreceptores internos (Figura 2). En primer lugar, están las “amarillos” (y, por sus siglas en inglés) que constituyen aproximadamente el 70% de todos los omatidios; éstas expresan la rodopsina 4 (Rh4) en el R7, y la rodopsina 6 (Rh6), la cual es sensible al verde en los R8. En segundo lugar, están los omatidios “pálidos” (p, por sus siglas en inglés) que son aproximadamente el 30% del total y expresan rodopsina 3 (Rh3) en R7 y la rodopsina 5 (Rh5) en R8 la cual es sensible a luz azul. De manera adicional están los omatidios del área del borde dorsal (DRA, por sus siglas en inglés) que expresan Rh3 tanto en R7 como en R8, los cuales son monocromáticos y extremadamente sensibles a la polarización. Por otro lado, en la mitad dorsal del ojo se encuentran los dorsales-amarillos (Dy, por sus siglas en inglés) que representan aproximadamente el 10% del total de los omatidios y expresan tanto Rh3 como Rh4 en R7 y Rh6 en R8 (Hilbrant et al., 2014). El tipo que expresa Rh3 en R7 y Rh6 en R8 representa el 6% del total y ha sido descrito como “extraña pareja” (Oc, por sus siglas en inglés). Para el caso de los fotorreceptores externos, estos expresan la opsina Rh1, la cual confiere una sensibilidad al espectro azul-verde de banda ancha ( $\lambda_{max} = 478 \text{ nm}$ ) (Figura 3),

con un pico adicional en la luz UV (Feiler et al., 1992; Kirschfeld & Franceschini, 1977; Salcedo et al., 1999; Sharkey et al., 2020).



Los fotorreceptores R1-R6 forman conexiones sinápticas que van desde la retina hasta el neurópilo de la lámina en los lóbulos ópticos. Los fotorreceptores R7-R8 proyectan sus axones desde la retina a través de la lámina y terminan en dos capas diferentes de otro neurópilo de los lóbulos ópticos, la medula (Ting & Lee, 2007).



**Figura 4.** Conectividad en el sistema visual de *D. melanogaster*. Los comportamientos relacionados con el movimiento dependen de la ruta R1-R6, mientras que la ruta R7/R8 es responsable de la percepción del color y los comportamientos relacionados con el color, la luz polarizada y la luz ultravioleta. Las conexiones sinápticas directas se muestran como flechas. Cuando se desconoce la conexión directa, se utiliza una flecha con una línea de puntos para indicar la dirección del flujo de información. Las conexiones recíprocas se muestran como una línea con dos puntas de flecha. Las conexiones acopladas eléctricamente a través de uniones comunicantes se representan como líneas verdes con círculos verdes. Las flechas de color rojo indican entradas sinápticas provenientes de otras columnas visuales.

## Lóbulos ópticos

En los lóbulos ópticos podemos encontrar dos clases de neuronas: interneuronas y neuronas de proyección (Hofbauer & Campos-Ortega, 1990). Los lóbulos ópticos se dividen en cuatro relevos sinápticos llamados neurópilos, estos están conformados cada uno por cuerpos celulares en la periferia que tienen comunicación con proyecciones adyacentes y otros cuerpos celulares y son: la lámina, la medula, la lóbula y la placa de la lóbula. En la lámina se encuentran las neuronas monopolares de la lámina (LMC), las cuales se dividen en cinco tipos (L1-L5). Cada uno de estos tipos se conecta con un solo fotorreceptor (formando las columnas de la lámina); después proyectan retinotópicamente a la médula. También existen células amacrinas que conectan con varias interneuronas en la misma lámina (Bausenwein et al., 1992; Hofbauer & Campos-Ortega,

1990; Tuthill et al., 2013). El siguiente neuropilo de los lóbulos ópticos es la médula que tiene aferencias de los fotorreceptores R7 y R8 y de neuronas monopolares de la lámina. La médula se divide en 10 capas (M1-M10) (Morante & Desplan, 2004). De M1 a M6 se le conoce como médula distal, mientras que de M7 a M10 reciben información de la médula distal y a ese segmento de la médula se le conoce como médula proximal.

La médula contiene aproximadamente 40,000 interneuronas que se dividen en 80 tipos de células. Los tipos se subdividen de acuerdo con sus patrones de proyección (tangenciales y columnares). Las columnares proyectan hacia el complejo lobular, el cual está compuesto de la lóbula y la placa de la lóbula (LOP). La lóbula se divide en seis capas que albergan principalmente a neuronas visuales de proyección (VPN). Las neuronas de la lóbula también se dividen en dos categorías: neuronas columnares y neuronas tangenciales. La placa de la lóbula contiene neuropilos divididos en cuatro capas que contienen dendritas. Las interneuronas de la placa lobular llamadas células T4 y T5 se pueden subdividir cada una en cuatro subclases (T4a, b, c, d y T5a, b, c, d) que forman dendritas en sólo una de estas cuatro capas. Otras dos clases de interneuronas tienen entradas presinápticas en la placa de la lóbula y salida postsináptica en la lóbula: las neuronas de la placa translobulada (Tlp) y las células Y. Ambas tienen sus cuerpos celulares adyacentes a los de las células T4 y T5. Las células tangenciales de la placa lobular (LPTC) son neuronas de proyección cuya caracterización ha proporcionado una gran comprensión del movimiento motor (Figura 4) (Hausen, 1984; Maisak et al., 2013). En general, las LPTC son sensibles al movimiento visual de manera selectiva en la dirección (Hausen, 1984). Varios miles de neuronas retinotópicas de salida del complejo de la lóbula se segregan en 25 glomérulos ópticos que constituyen gran parte del protocerebro lateral (Hausen, 1984). Es así que toda la información visual que deviene de los lóbulos ópticos llega al cerebro central; esta estructuración neural era desconocida hasta hace poco (Vogt et al., 2014; Zhang et al., 2007). Estudios más recientes sugieren que son los CS los que reciben eferencias visuales a través de vías indirectas que en la actualidad siguen siendo poco estudiadas, ya que no se han observado conexiones directas a estas áreas (Tanaka et al., 2008). Sin embargo, el grupo de Emil Kind recientemente encontró que aproximadamente el 10% las VPN conectan los R7-8 con el cerebro central. Su

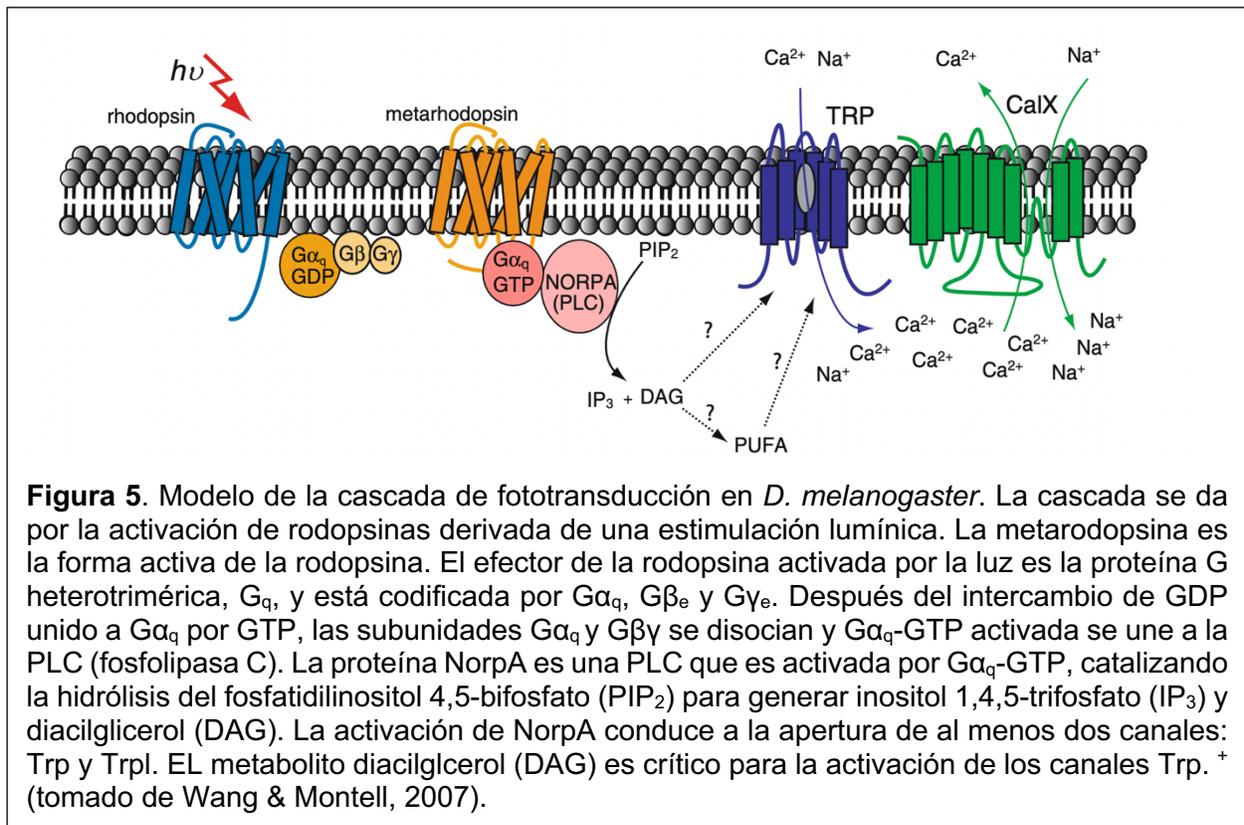
reconstrucción confirma que las MeTu (clase de células de la médula del tubérculo óptico anterior) son blancos únicos de los fotorreceptores R7. Adicional a éstas, también se encontró que las células aMe12 (médula accesoria 12) proyectan a los cálices de los CS y a ambos hemisferios, así como a la médula (Kind et al., 2021). Por otro lado, diversos trabajos han publicado que las células aMe12 están presentes en el conectoma del hemisferio, demostrando ser importantes entradas a las CK yd (Figura12) (Clements et al., 2020; Kind et al., 2021; J. Li et al., 2020; Scheffer et al., 2020).

Recientemente se identificaron dos VPN como selectivas para la entrada pálida de R8: las células aMe12 y ML-VPN1 (neuronas de proyección visual 1 de la médula a la lóbula). ML-VPN1 proporciona información al PLP (protocerebro lateral posterior), mientras que las aMe12 tienen sitios presinápticos en la médula accesoria, el PLP, y como se mencionó anteriormente, en los CS. Estos patrones de conectividad sugieren roles en el ritmo circadiano y el aprendizaje y la memoria, respectivamente (Kind et al., 2021). Las células R8 pálidas (Figura 2, izquierda) son más sensibles a las longitudes de onda azules (Heath et al., 2020; Salcedo et al., 1999; Schnaitmann et al., 2018; Sharkey et al., 2020) y las proyecciones de aMe12 y ML-VPN1 demuestran que la luz azul es procesada y utilizada por el cerebro central. Se sabe poco sobre el procesamiento central del color en *D. melanogaster*, pero la detección de la luz azul juega un papel importante en la evitación circadiana de la luz brillante (Lazopulo et al., 2019). Las moscas de la fruta también pueden aprender a discriminar entre grandes áreas de luz azul y verde y se ha informado que un grupo de VPN proporcionan información a las CK y son necesarias para esta capacidad (Vogt et al., 2014).

### **Vía de transducción en la visión de *D. melanogaster***

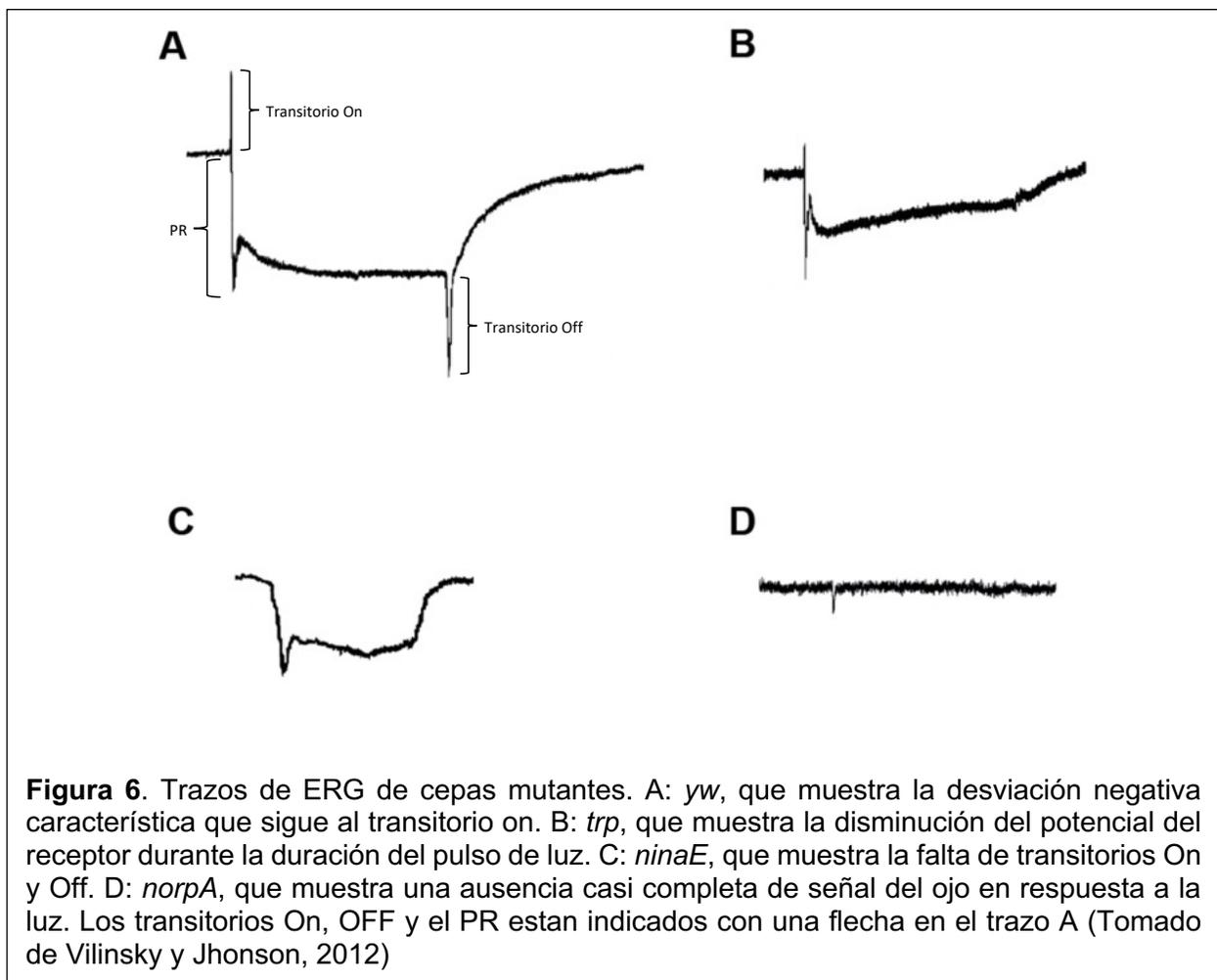
Los fotorreceptores R1-6 tienen una gran sensibilidad, puesto que son capaces de generar eventos eléctricos en respuesta a la fotoisomerización de una sola molécula de rodopsina (Wu & Pak, 1978). Las rodopsinas de la mosca están formadas por dos subunidades; una apoproteína con siete pases transmembranales denominada opsina y un cromóforo (11-*cis* 3 hidroxiretinal) unido de manera covalente a un residuo de lisina en el

séptimo dominio transmembranal de la opsin. Cuando la luz estimula a la rodopsina, el 11-*cis* retinal se isomeriza a todo-*trans* retinal, promoviendo así un cambio conformacional en la opsin que está a su vez está acoplada a una proteína heterotrimérica de tipo  $G_q$ . La rodopsina activada o meta-rodopsina induce la disociación de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  de la proteína G permitiendo que la subunidad  $G\alpha$  active a una fosfolipasa C del tipo  $\beta$  (PLC  $\beta$ ). Esta PLC  $\beta$  está codificada por el gen *norpA* (*no receptor potential A*). La PLC  $\beta$  hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ), generando diacilglicerol y fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato ( $IP_3$ ) (Figura 5). El fenotipo derivado de mutaciones en el gen *norpA* es la ausencia de señal en respuesta a la luz que se puede apreciar en el ERG.



Se ha demostrado que el DAG y no el  $IP_3$ , es el metabolito importante en la fototransducción. El DAG es hidrolizado por la diacilglicerol lipasa, la cual es codificada por *ninaE* (*neither inactivation nor afterpotential E*), liberando ácidos grasos poli-

insaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés). Se ha postulado que tanto el DAG como los PUFAs intervienen en la apertura de dos tipos de canales de calcio responsables de la despolarización de los fotorreceptores (Hardie, 2003; Jörs et al., 2006) (Figura 6), los canales del potencial transitorio del receptor (Trp; codificado por *trp*) (Hardie & Minke, 1992) y los canales relacionados a Trp (Trpl; codificado por *trpl*) (Niemeyer et al., 1996). Como se observa en la Figura 6, las moscas mutantes de *trp* presentan defectos marcados en el PR del ERG (Hardie & Minke, 1992; Montell, 1999; Raghu, 2006); defectos similares se observan en mutantes en *ninaE* (Leung et al., 2008).



Uno de los reguladores de la despolarización generada por la apertura de los Trp y Trpl es el producto proteico del gen *calx*, el cual es un transportador acoplado de

intercambio o antiportador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , cuya función es nivelar los niveles de calcio (Wang & Montell, 2007).

Gracias a diversos estudios farmacológicos se identificó que la histamina funge como neurotransmisor de los fotorreceptores, permitiendo la entrada de cloro a las neuronas monopolares de la lámina y produciendo así una hiperpolarización en ellas, como consecuencia de un estímulo luminoso (Hardie, 1989). De manera predecible, el fenotipo de las moscas mutantes del receptor de histamina es la ausencia de los transitorios On y Off del ERG (Pantazis et al., 2008), lo cual produce moscas ciegas.

## **ERG**

Los ERG en *D. melanogaster* se han utilizado durante más de 40 años (Heisenberg, 1971; Hotta & Benzer, 1969; Stark & Wasserman, 1972). Han sido fundamentales para caracterizar muchos de los genes que son clave en la fototransducción (Hardie & Raghu, 2001; Montell, 1999; Pak, 1995). Para generar registros de ERG se utilizan electrodos extracelulares, ya que el ERG registra un potencial de campo de fotorreceptores y de neuronas postsinápticas aguas abajo dentro del ojo de la mosca en respuesta a estímulos luminosos (Dolph et al., 2011).

El ERG de *D. melanogaster* proporciona una lectura accesible e incisiva de la función del sistema visual en un organismo modelo manejable genéticamente (Vilinsky & Johnson, 2012). La forma de onda compleja representa una combinación extracelular de actividades eléctricas asociadas con la fototransducción y la transmisión sináptica. Las características de la forma del ERG incluyen un potencial de receptor sostenido (PR), así como transitorios de luz On y Off, al principio y al final del estímulo (Coombe, 1986). Los picos transitorios al inicio y final de un estímulo luminoso corresponden a potenciales postsinápticos en las neuronas de la lámina (On y Off), mientras que el PR durante el estímulo de luz resulta de la despolarización de las células fotorreceptoras (Hardie & Raghu, 2001; Montell, 1999; Stark & Wasserman, 1972; Wu & Pak, 1978). Los diferentes componentes de la señal ERG reflejan eventos distintos durante la transducción de

señales visuales en el ojo (Heisenberg, 1971). Las mutaciones en algunos genes que codifican para proteínas involucradas en la transducción visual dan como resultado cambios característicos en la forma del ERG (Figura 6).

El componente PR representa la despolarización sostenida en las células fotorreceptoras (Heisenberg, 1971), mientras que los transitorios son la respuesta post-sináptica de las grandes neuronas monopolares en la lámina óptica (L1 y L5), con las que establecen sinapsis los fotorreceptores R1-R6 a través de los canales de cloruro activados por la histamina (codificados por el gen *ort*: *ora transientless*), lo que hace que se hiperpolaricen ante un estímulo de luz (transitorio On) (Gao et al., 2008; Gengs et al., 2002; Rister et al., 2007). Las células L1-L3 proyectan axones a distintas capas de la médula (L1 a M1/M5, L2 a M2 y L3 a M3) y liberan distintos tipos de neurotransmisores. Las células L1 liberan glutamato e hiperpolarizan a las neuronas intrínsecas de la médula 1 (Mi1) y transmedulares 3 (Tm3) a través de  $\text{GluCl}\alpha$ , un canal de cloruro activado por el glutamato (Cully et al., 1996; Davis et al., 2020; Molina-Obando et al., 2019; Strother et al., 2017; Yang et al., 2016). Por el contrario, las células L2 y L3 liberan acetilcolina que despolariza a las neuronas postsinápticas, Tm1/Tm2 y Tm9/Mi9 (Davis et al., 2020; Fisher et al., 2015; Ramos-Traslosheros & Silies, 2021; Yang et al., 2016). Esto conduce a dos vías visuales con respuestas opuestas: la hiperpolarización de las células L1, L2 y L3, causada por una respuesta a un estímulo de luz (transitorio On), el cual conduce a la despolarización de las células Mi1/Tm3 (denominadas por tanto neuronas light-On) y la hiperpolarización de las células Tm1/Tm2 y Tm9/Mi9 (neuronas light-Off). Estos circuitos de luz son importantes para la mayoría de los comportamientos visuales, incluida la fototaxis.

Para comprender en detalle la naturaleza y el origen del curso temporal del ERG, es necesario delinear las respuestas subyacentes de las células fotorreceptoras y las neuronas de segundo orden. Todas las células fotorreceptoras (R1-R8) responden a un pulso de luz simple con una despolarización sostenida que ocurre con un retraso de tan solo 3 ms. Este llamado potencial receptor dura tanto como el estímulo. Su amplitud es proporcional al logaritmo de la intensidad del estímulo. A intensidades de luz altas, la gran

despolarización del fotorreceptor al inicio del pulso se reduce después de 50-100 ms mediante mecanismos de adaptación rápida a un nivel más bajo. Esto da como resultado un pico agudo al comienzo del potencial del receptor. En las moscas adaptadas a la luz, la adaptación rápida suele ir seguida de una oscilación amortiguada de la meseta del potencial receptor. Los fotorreceptores R1-6 transmiten el potencial receptor a las neuronas de segundo orden en la lámina, L1 y L5. Las neuronas laminares actúan como filtros de paso alto con una fuerte amplificación a altas frecuencias, amplificando así en gran medida pequeños cambios en el potencial del receptor. Como ya se mencionó antes, en mutantes *norpA* se interrumpe el inicio de la fototransducción por lo que estas moscas son ciegas (Meyertholen et al., 1987); se ha rescatado el fenotipo *norpA* con la expresión específica del gen *norpA* en células fotorreceptoras (McKay et al., 1995).

### **Cuerpos setíferos (CS) y Células de Kenyon (CK)**

En este trabajo nos centramos en la expresión de *tecu*<sup>1</sup> en los CS, los cuales son estructuras pareadas que se encuentran en cerebro y, como la mayor parte del cerebro, están dispuestos en simetría especular con respecto al plano medio sagital. Estas estructuras se originan de cuatro neuroblastos embrionarios, los cuales derivan de un área del neuroectodermo prosencefálico. Esta zona expresa genes proneurales aunque la vía de Notch, una vía clásica implicada en la diferenciación neural, no es necesaria para su formación (Ito & Hotta, 1992).

Los CS son estructuras prominentes del cerebro de la mosca y constan de varios neurópilos formados por axones y dendritas de las CK, las únicas neuronas intrínsecas de los CS y las fibras que hacen sinapsis con ellas.

Los somas de las CK se localizan en la parte dorsal y posterior del cerebro (de Belle & Heisenberg, 1996). Los axones de estas células corren desde el cáliz (el cual está conformado por el cáliz principal y tres cálices accesorios: dorsal, lateral y ventral) de los CS hasta el borde frontal del neurópilo cerebral, donde se dividen en dos ramas que constituyen gran parte de los lóbulos.

## Tipos de CK

Las CK son las neuronas intrínsecas de los CS que se dividen en tres clases que nacen en el orden siguiente:  $\gamma$ ,  $\alpha'/\beta'$ , y  $\alpha/\beta$ . La información olfativa que llega a los CS predomina entre otras informaciones sensoriales; sin embargo, se han encontrado tres clases de CK que contienen pequeños subconjuntos dedicados a la información no olfativa. A continuación se hará énfasis en cada una de las clases de CK.

### CK $\gamma$

Neuronas de esta clase innervan el lóbulo  $\gamma$  y se dividen en cuatro subtipos: 590 CK $\gamma$ m, 99 CK $\gamma$ d, ocho neuronas CK $\gamma$ t con dendritas en el cáliz anterior (dirigidas preferentemente a las neuronas termo/higrosensoriales) y cuatro neuronas CK $\gamma$ s que toman muestras de uno o más cálices accesorios (Aso et al., 2009; Aso et al., 2014; Vogt et al., 2016).

### CK $\alpha' / \beta'$

Se han identificado 337 KCs  $\alpha' / \beta'$ , de las cuales hay 91  $\alpha' / \beta'$ ap1, 127  $\alpha' / \beta'$ ap2 y 119  $\alpha'/\beta'$ m. Las dendritas de las KCs  $\alpha' / \beta'$ ap1 se encuentran en el cáliz accesorio lateral y en el ventral, zonas a las que se dirigen preferentemente las neuronas de proyección sensorial termo/higrosensorial.

### KCs $\alpha / \beta$

Se han identificado 889 KCs  $\alpha/\beta$  que se dividen en cuatro subtipos: 60 KC $\alpha/\beta$ p que son las primeras KC  $\alpha/\beta$  que nacen y por tanto se denominan neuronas KC $\alpha/\beta$  pioneras (Lin et al., 2007; Zhu et al., 2003), 223 KC $\alpha/\beta$ s, 354 KC $\alpha/\beta$ m y 252 KC $\alpha/\beta$ c. Las dendritas

de las  $\alpha/\beta$ p forman el cáliz accesorio dorsal mientras que el resto tienen dendritas en el cáliz principal (Tanaka et al., 2008).

Los axones de estas CK proyectan a los lóbulos, con excepción de las  $\gamma$ m que solo se dirigen al lóbulo horizontal. Este tipo de acomodaciones espaciales permite que las neuronas de proyección de los CS reciban información sensorial mixta o segregada dependiendo de dónde extienden sus dendritas dentro de las diferentes capas de las CK. Las CK también hacen sinapsis con CK vecinas en el cáliz, el pedúnculo y los lóbulos.

Los CS reciben y procesan diversos tipos de información, olfativa, gustativa, motora y visual (Barth & Heisenberg, 1997; Crocker et al., 2016; F. Li et al., 2020; J. Li et al., 2020; Vogt et al., 2016; Vogt et al., 2014). El procesamiento de la información olfativa ha sido la más estudiada, ya que un 20% de las conexiones entre las neuronas de proyección y las CK está relacionada a la detección de olores determinados (Owald & Waddell, 2015). Asimismo, es posible que estas conexiones estén especializadas en funciones como la memoria a corto y largo plazo; siendo de manera general las células  $\gamma$  y las responsables de la memoria a corto plazo, las  $\alpha' / \beta'$  en la consolidación de la memoria y las  $\alpha / \beta$  en la memoria a largo plazo (Crocker et al., 2016). Lo anterior revela que las CK están estrechamente relacionadas con circuitos complejos responsables de la memoria y el aprendizaje, entre otras funciones.

Para estudiar el funcionamiento de los CS se han utilizado diferentes líneas mutantes de *D. melanogaster*, como lo es *rutabaga* que codifica para una adenilil-ciclasa; esta se utilizó para demostrar que los CS son suficientes para la formación de la memoria de discriminación olfativa (Zars et al., 2000). Para ello, las moscas se expusieron secuencialmente a dos olores, uno de los cuales se combina con descargas eléctricas. Una vez terminado el protocolo de condicionamiento clásico, se probó a las moscas exponiéndolas simultáneamente a los dos olores usados en el condicionamiento en un laberinto en T, y se cuantificó hacia qué lado del laberinto se distribuyeron las moscas, como medida de la memoria (las moscas silvestres evitan el olor asociado a la descarga

eléctrica). Las mutantes obtuvieron puntuaciones de memoria significativamente más bajas que los controles.

Otros genes que presentan niveles elevados de expresión en los CS son: *dunce*, *leonardo* y *volado*; los cuales son necesarios para el aprendizaje de la discriminación olfativa (Margulies et al., 2005). En el caso de la respuesta motora se demostró que al inhibir la proliferación de las células precursoras de los CS mediante ablación química, al expresar la subunidad catalítica de la tetradotoxina en subconjuntos de CK y que al mutar un gen que afecta la diferenciación de las CK (*mbm*, *mushroom body miniature*), las moscas presentan una función motora alterada (Martin et al., 1998).

En general, los CS median diversos procesos en el cerebro de la mosca (memoria y funcionamiento motor, entre otros). Su estudio y conocimiento en detalle es una labor crítica.

## **Fosfolipasas**

Las fosfolipasas son enzimas lipolíticas que hidrolizan sustratos de fosfolípidos en enlaces éster específicos. Éstas pueden existir en formas secretadas, asociadas a la membrana o localizadas intracelularmente. Existen dos conjuntos generales de fosfolipasas, las acil-hidrolasas y las fosfodiesterasas. Las enzimas de cada conjunto se clasifican de acuerdo con el sitio del enlace dividido en sus sustratos de fosfolípidos. La fosfolipasa A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>), la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y la fosfolipasa B (PLB) constituyen las acil-hidrolasas, mientras que las fosfodiesterasas están representadas por la fosfolipasa C (PLC) y la fosfolipasa D (PLD). PLA<sub>1</sub> y PLA<sub>2</sub> producen ácidos grasos libres y 2-acil o 1-acil-lisofosfolípidos, respectivamente (Dowhan, 1997).

Los principales lípidos en los insectos son los triacilglicéridos (TAG) que se utilizan tanto para el almacenamiento de energía como para el almacenamiento de precursores de ácidos grasos; los fosfolípidos que tienen actividad en la estructura de la membrana, además de los hidrocarburos que junto con los ésteres de estos fosfolípidos se incorporan

en o sobre la superficie de la cutícula para minimizar la pérdida de agua por evaporación (Fast, 1967; Gilby, 1965; Horne et al., 2009; Stanley-Samuelson et al., 1988).

## **Fosfolipasa A2**

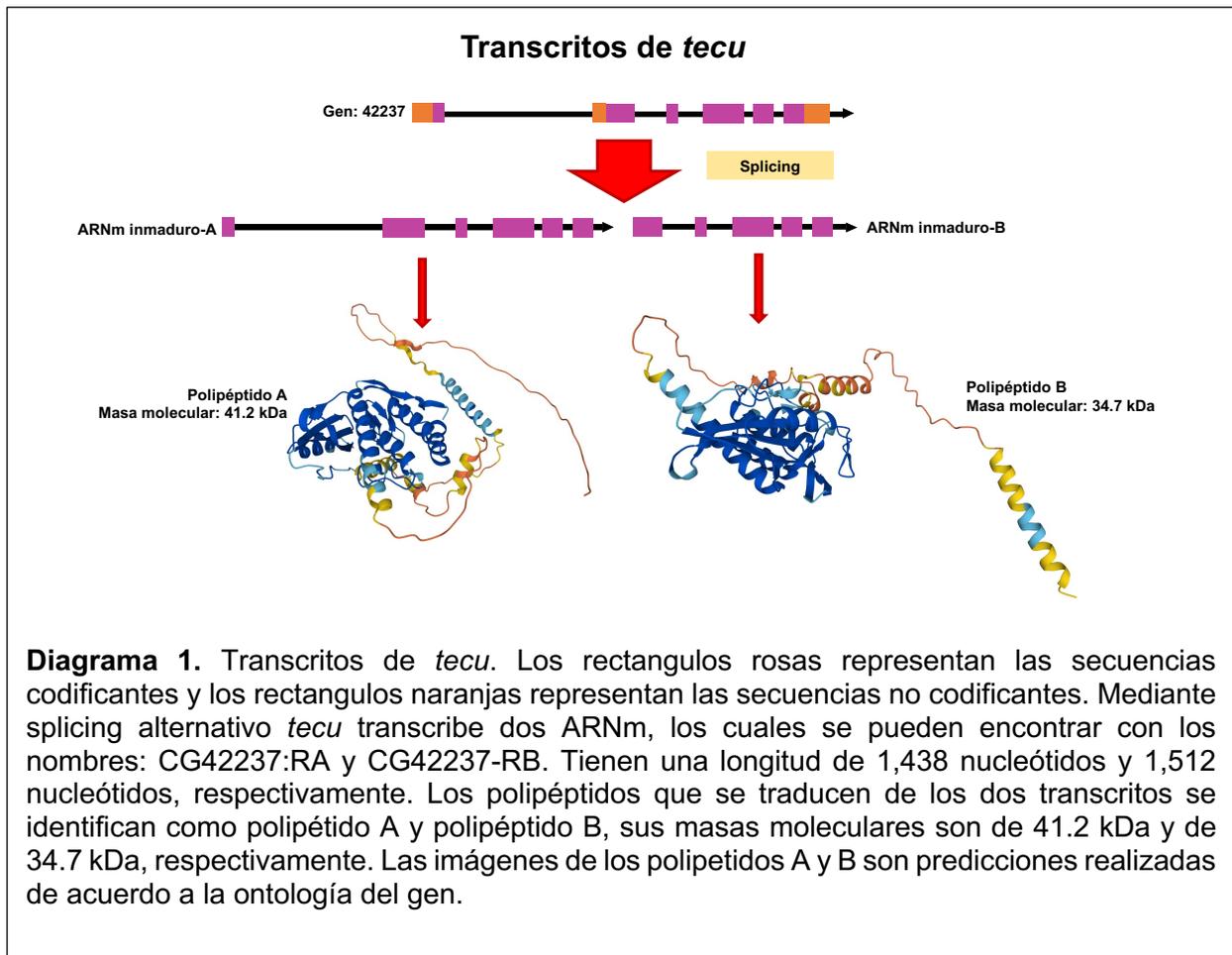
De acuerdo con Murakami et al., (2020), en mamíferos la superfamilia de PLA<sub>2</sub> contiene más de 50 enzimas y éstas se han caracterizado en diversos organismos gracias a la homología de sus secuencias y a sus propiedades bioquímicas. Es así que éstas se han dividido en diversos subgrupos: la PLA<sub>2</sub> secretada (sPLA<sub>2</sub>), la PLA<sub>2</sub> citosólica (cPLA<sub>2</sub>), la PLA<sub>2</sub> independiente de Ca<sup>+2</sup> (iPLA<sub>2</sub>), el factor activador de plaquetas (PAF), la familia de PLA<sub>2</sub> específicas de acil-hidrolasa (PA-FAH), la PLA<sub>2</sub> lisosomal (LPLA<sub>2</sub>), la PLA/aciltransferasa (PLAAT), la  $\alpha/\beta$  hidrolasa (ABHD) y la glicosilfosfatidilinositol (GPI) específica de la familia de PLA<sub>2</sub> (Murakami et al., 2020). *D. melanogaster* no posee miembros de las cPLA y tampoco de la PAFAH (Ben-David et al., 2015; Murakami et al., 2020; Murakami et al., 2011).

Las sPLA<sub>2</sub> tienen una estructura que va de cinco a ocho puentes disulfuro y un mecanismo similar al catalítico de las dependientes de Ca<sup>+2</sup>. En mamíferos se clasifican en once grupos (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA y XIIB) que presentan funciones fisiológicas y patológicas, como lo son la digestión de lípidos, la proliferación de células y la neurosecreción (Bayne et al., 1985; Murakami et al., 2011; Renault et al., 2002).

La presencia de una diversidad molecular de sPLA<sub>2</sub> se reconoció por primera vez en venenos de animales, especialmente en venenos de serpientes (Balboa et al., 1997). Subsecuentemente se encontraron varios genomas que también codifican para una diversidad molecular de sPLA<sub>2</sub>; se han encontrado dos sPLA<sub>2</sub> similares al grupo I en *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) y se han clonado seis sPLA<sub>2</sub> distintas en *D. melanogaster*. Una de las sPLA<sub>2</sub> de *D. melanogaster* es una enzima similar al grupo I (llamada dGI) mientras que las otras cinco son sPLA<sub>2</sub> del grupo III (dGIIIA, dGIIIB, dGIIC, dGIID y dGIIIE) (Valentin & Lambeau, 2000). Se tienen registrados siete genes que codifican

para las sPLA<sub>2</sub> (CG3009, CG14507, CG30503, CG42237, *Gllspla*<sub>2</sub>, *GXIVsPLA*<sub>2</sub> y *sPLA*<sub>2</sub>) (Ben-David et al., 2015; Renault et al., 2002). *tecu* es una sPLA codificada por CG42237.

*tecu* se puede encontrar en FlyBase con el símbolo Dmel\CG42237 (FBgn0250862). El gen se encuentra en el cromosoma X y se reporta que tiene una actividad de fosfolipasa A2 (Gaudet et al., 2011; Members, 2004-). Se predice por ontología de genes (GO, por sus siglas en inglés), que es ortólogo de la proteína que interactúa con la ciclina A1 (PROCA1) y hasta la fecha no hay datos fenotípicos disponibles del gen. *tecu* codifica para dos transcritos, que se traducen en dos polipéptidos que tienen una masa molecular predicha de 34.7 kDa y 41.2 kDa (Diagrama 1).



## Pruebas visuales en adultos y larvas

Se han utilizado generalmente tres paradigmas de comportamiento bien establecidos en *D. melanogaster* para estudiar respuestas a la estimulación luminosa: el ensayo de fototaxis, la prueba de elección de luz UV-visible (UV-Vis) y el ensayo de respuesta optomotora. Los tres paradigmas son robustos y pueden obtenerse de moscas de tipo silvestre en ausencia de cualquier condicionamiento previo (Choe & Clandinin, 2005).

La fototaxis es uno de los comportamientos más simples en las moscas adultas, ya que éstas se orientan y se mueven hacia una fuente de luz. Las células R pueden proporcionar información para la respuesta de fototaxis, aunque las células R1–R6 desempeñan un papel dominante en la respuesta a la luz visible tenue que refleja su sensibilidad relativamente alta (Harris et al., 1976). Benzer en 1967 realizó pruebas de contracorrente en adultos para observar la respuesta fototáctica en *D. melanogaster*. En su trabajo describió el procedimiento y el aislamiento de mutantes que muestran cambios en el comportamiento fototáctico; en sus resultados demostró que el comportamiento observado es fototáctico y no simplemente un aumento del movimiento aleatorio con la intensidad de la luz (Benzer, 1967).

Las larvas pasan por tres estadios antes de comenzar la pupación. Los tres estadios larvarios duran aproximadamente 96 horas a 25°C (Demerec & Kaufmann, 1967). En el primer y segundo estadio, las larvas muestran una representativa aversión a la luz (fototaxis negativa) (Grossfield et al., 1978). En cambio, a la mitad del tercer estadio, la respuesta de la larva a la luz se convierte en una fototaxis positiva (Godoy-Herrera et al., 1992). Este cambio ocurre junto con una serie de otros comportamientos relacionados con la selección de un sitio adecuado para la pupación (Davis, 1953; Godoy-Herrera et al., 1989; Grossfield et al., 1978; Sawin et al., 1994).

Se han utilizado diversos ensayos conductuales para estudiar la fototaxis en larvas, la cual se dividen en dos clases: una que involucra gradientes de luz espacial y la

otra que implica gradientes de luz temporales. Para ensayos de gradiente de luz espacial, la arena se divide en el mismo número de secciones en luz y oscuridad; la luz se hace incidir desde abajo de las larvas y también se puede hacer desde arriba (comúnmente se utiliza una caja Petri con agar para colocar las larvas). Para los ensayos de gradiente de luz temporal, la intensidad de la luz es espacialmente uniforme en la arena, pero con cambios en la intensidad a lo largo del tiempo (Keene & Sprecher, 2012).

## **ANTECEDENTES DIRECTOS**

En el Laboratorio de Genética de Transducción de Señales a cargo del Dr. Riesgo-Escovar se identificaron mutaciones en el gen *tecuzitécatl* (*tecu*), que codifica para una fosfolipasa A<sub>2</sub> expresada en un número limitado de células de Kenyon (CK) en los CS del cerebro de *D. melanogaster* (Suplementaria A).

Las CK son las únicas neuronas intrínsecas de los CS que además de estar implicadas en vías sensoriales, también están involucradas en procesos como el aprendizaje y memoria a corto y largo plazo. En el laboratorio se tienen datos preliminares que apuntan a que mutantes de *tecu* muestran respuestas conductuales defectuosas a estímulos visuales y olfativos, sin evocar procesos de aprendizaje y memoria (Riesgo-Escovar, datos no publicados).

En este trabajo se dilucidaron funciones estudiadas muy poco (procesamiento visual) de esta área del cerebro de la mosca y se establecieron subdivisiones funcionales entre las células que lo componen de acuerdo con su implicación en el procesamiento de información visual.

## **HIPÓTESIS**

El gen *tecu* codifica para una fosfolipasa de tipo A<sub>2</sub> expresada en una subpoblación de las CK en los CS implicadas en el procesamiento de estímulos visuales de *D. melanogaster*.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Caracterización de los fenotipos de alelos mutantes para *tecu* en pruebas conductuales con estímulos visuales, realización de ERG y análisis de transcritos para identificar las CK que expresan *tecu*<sup>+</sup>.

### **Objetivos Particulares**

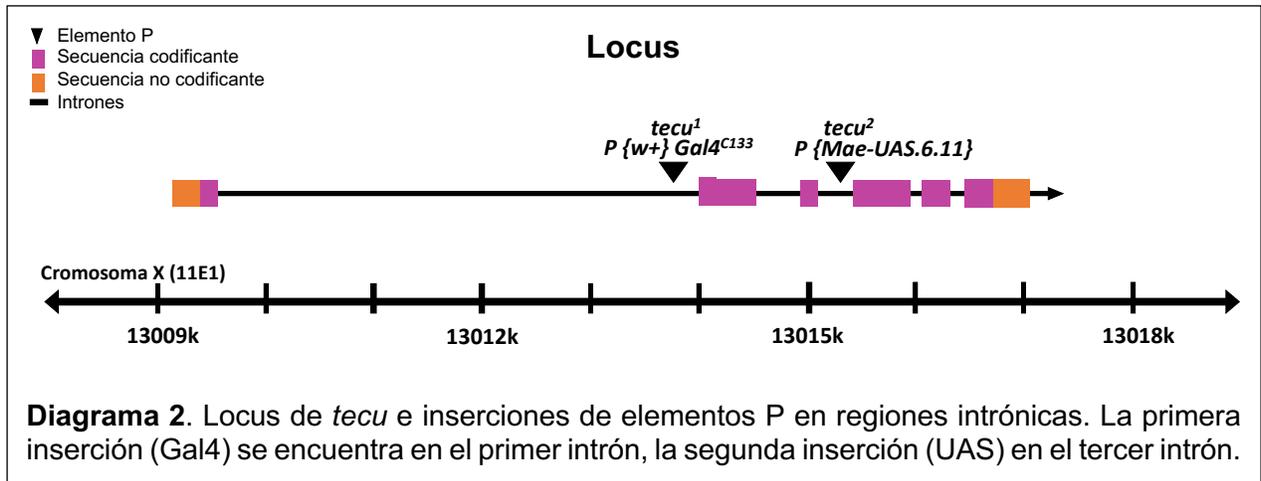
1. Caracterizar el comportamiento de *tecu*<sup>-</sup> por medio de pruebas conductuales visuales en larvas y adultos.
2. Marcar las células que expresen *tecu* mediante el sistema Gal4-UAS.
3. Realizar ERG en dos líneas mutadas de *tecu*.
4. Cuantificar e identificar la expresión del transcrito de *tecu*<sup>+</sup> en las de CK.

## METODOLOGÍA

### Líneas de moscas

Las líneas mutantes que se utilizaron en este estudio corresponden a *tecuzitécatl<sup>1</sup>* (*tecu<sup>1</sup>*) la cual es una inserción de un transposón (elemento P) en el primer intrón del locus *tecu*; ésta es una línea Gal4 y está marcada con *w<sup>+</sup>* (*tecu<sup>1</sup>*, *w<sup>+</sup>*); por otro lado se utilizó *tecuzitécatl<sup>2</sup>* (*tecu<sup>2</sup>*) la cuál es una inserción de elemento P en el tercer intrón (Diagrama 2), disponible del cepario de Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC), en Bloomington, Indiana, EE. UU. (stock #13256: *y<sup>1</sup> w<sup>67c23</sup> P(Alawi & Pak) CG42237<sup>GC01395</sup>*), marcado con *y<sup>+</sup>*. Para el marcaje de neuronas *tecu* mediante el sistema GAL4-UAS, se utilizó la línea *10xUAS-myr::tdTomato* disponible del cepario de Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC).

Como controles se usaron las líneas *yellow white (yw)* y *Oregon-R (ORR)*. *yw* se utilizó para las pruebas de comportamiento y los ERG debido a que las líneas de moscas mutantes homocigotas para *tecu<sup>1</sup>*, *tecu<sup>2</sup>* y *yw* tienen el mismo fondo genético. ORR se utilizó únicamente para los ERG ya que esta línea presenta pigmento rojo en sus ojos, al igual que *tecu<sup>2</sup>*. Todas las moscas se criaron en un medio estándar de levadura y piloncillo (Riesgo-Escovar et al., 1995), en una habitación a 25°C con 30-50% de humedad relativa, con un ciclo de 12 h en luz / 12 h oscuridad.



## Genética y cruzas

Para marcar las células que expresan *tecu* se utilizó la línea F1 (la primera generación filiar resultado de la cruce de dos tipos parentales), resultado de la cruce entre hembras vírgenes homocigotas que expresan *tecu*<sup>1</sup> en el cromosoma X y machos de la línea *10xUAS-myr::tdTomato*, ambas tienen una inserción de un elemento P. En el caso de *tecu*<sup>1</sup>, esta es una línea con una inserción de un Gal4 en el primer intrón. La línea con expresión de fluorescencia lo hace mediante un transposón que contiene la secuencia UAS a la que se une Gal4. Al cruzar las líneas se obtuvo una F1 con células que expresan una proteína roja fluorescente en el patrón de expresión de *tecu*. La línea *10xUAS-myr::tdTomato* tiene diez copias del transposón UAS, seguidas de un promotor basal Hsp70. Éste se une aguas arriba a una secuencia codificante de tdTomato etiquetada en el extremo N-terminal con una señal de miristoilación; de esta manera se une Gal4 a la secuencia UAS para activar la transcripción de genes en el patrón de expresión de Gal4, en este caso, el patrón de expresión dirigido por la inserción de la línea *tecu*<sup>1</sup>.

## Pruebas de comportamiento

Ensayos en larvas: Los ensayos de placa con estímulos visuales se realizaron con algunas modificaciones de la técnica usada por Mazzoni (2005). Se usaron 48-70 larvas por prueba individual, con una  $n=14$  por genotipo.

Se realizaron pruebas con larvas *tecu*<sup>1</sup>, *tecu*<sup>2</sup> y *yw* como control, dado que es el fondo genético en el que están las mutantes de *tecu*. La prueba se realizó en una habitación a 25°C, 30-50% de humedad relativa, siempre a la misma hora y con larvas de primer y segundo estadio. Primeramente, se separaron larvas de los “stocks” a utilizar; para ello se les agregó agua desionizada (la suficiente para poder separarlas de la comida) y por último se utilizó un cernidor para retirar los residuos de comida e identificar a aquellas larvas que fuesen de tercer estadio. Se procedió a pasar las larvas al centro de una caja Petri con agar, en un cuarto oscurecido. La caja Petri se colocó sobre un transiluminador, donde la mitad del transiluminador estaba oscurecida y la otra iluminada; se esperaron tres minutos para posteriormente realizar el conteo de las larvas que migraron a la mitad oscurecida (las larvas silvestres muestran fototaxis negativa) y las que migraron a la mitad iluminada. De esta manera se obtuvo un índice de respuesta (IR). El índice de respuesta se obtiene calculando la diferencia entre las larvas que se encuentran en el lado oscuro y las que se encuentran en el lado iluminado, esto dividido entre el total de las larvas. Los valores de IR van desde 1 a -1. Cuando el IR se acerca a 1, representa la preferencia a la oscuridad y cuando tiende a -1 indica preferencia a la luz; finalmente si el IR tiende a 0 denota una respuesta conductual aleatoria al estímulo presentado. Para la prueba en la cual se separaron a machos de hembras, se realizó el mismo procedimiento, pero al momento de limpiarlas y separarlas con el cernidor, se observaron bajo el estereoscopio para poder separar los sexos. Para separar a las larvas por sexo se examinó el disco imaginal gonadal, que es de mucho mayor tamaño en machos, permitiendo así realizar la separación (Mazzoni et al., 2005).

Ensayos en adultos: Se realizaron ensayos de contracorriente con modificaciones de la técnica utilizada por Benzer (1967). Éstos fueron realizados en dos condiciones: con estímulo lumínico y sin estímulo lumínico; para ambos se usaron 75-100 moscas por prueba individual, con una  $n=10$  por genotipo. Las pruebas se realizaron con moscas

macho y hembras (por separado), adultas de 5-10 días, de las líneas *tecu*<sup>1</sup>, *tecu*<sup>2</sup> y *yw*, esta última como control. La prueba se realizó en una habitación a 25°C, 30-50% de humedad relativa, siempre a la misma hora. Los grupos de moscas experimentales fueron de un solo sexo, se separaron y se introdujeron en tubos oscuros antes de la prueba. Se mantuvieron en la oscuridad por tres horas en las mismas condiciones de oscuridad, humedad y temperatura (oscuridad, 30-50% humedad relativa, 25°C temperatura). En estas tres horas, las moscas se habituaron a esas condiciones, se recuperaron de la anestesia ligera con CO<sub>2</sub> y se adaptaron a la oscuridad (Benzer, 1967).

El experimento con estímulo lumínico se realizó bajo luz roja tenue en un cuarto oscuro, tomando el tubo con las moscas e insertándolo en un dispositivo de contracorriente. Se hizo coincidir con un tubo oscuro con un fondo transparente opuesto a él y una fuente de luz puntual blanca a 30 cm del extremo transparente de este tubo (durante las pruebas el estímulo lumínico fue de 5300 luxes). Se dejó esta luz puntual encendida durante un minuto y se permitió que las moscas se distribuyeran en los dos tubos mientras la fuente de luz puntual estaba encendida. Luego, la fuente de luz puntual se apagó y los tubos se movieron en el dispositivo de contracorriente para separar los tubos y evitar el movimiento entre los dos tubos. Se guardaron las moscas del tubo inicial y las moscas que se movieron al primer tubo de estímulo se colocaron en el aparato para exponerlas a una nueva prueba con un segundo tubo de estímulo con fondo transparente, con la misma fuente de punto de luz. Esto se realizó dos veces más, se guardaron y contaron las moscas de cada tubo. El porcentaje de moscas del número inicial presente en el último tubo (tercer estímulo), se tomó como el porcentaje de moscas que respondieron.

En el experimento sin estímulo lumínico se utilizaron las mismas condiciones y tiempos; sin embargo, los recambios de tubos se realizaron únicamente con la luz roja tenue.

## **ERG**

Los ERG se realizaron con algunas modificaciones de la técnica usada por Vilinsky y Johnson (2012). Primero se inmovilizó una mosca en una punta de pipeta, dejando expuesta la cabeza y parte del tórax; posteriormente se introdujo un microelectrodo de referencia en la cabeza y se colocó un microelectrodo haciendo contacto eléctrico con el ojo de la mosca, cerrando así el circuito eléctrico; esto nos permitió medir los cambios en el potencial eléctrico de las células fotorreceptoras y las neuronas de la lámina con las que hacen sinapsis. Se dejó a la mosca en total oscuridad por 3 min para que se adaptara y posteriormente se estimuló con un “flash” de luz blanca a partir de un led (3900 luxes), durante un segundo. Después se tomaron fotografías de los registros (Suplementaria B) para obtener trazos representativos de los ERG y se realizó la medición de la respuesta eléctrica. Con las fotografías se midieron las amplitudes de los potenciales (PR, transitorios On y Off) y con los datos se realizaron las pruebas estadísticas (ANOVA de dos vías). Para este ensayo se realizaron comparaciones de *yw* vs *tecu*<sup>2</sup> y *ORR* vs *tecu*<sup>1</sup> (esto último debido al pigmento de los ojos, ya que *yw* y *tecu*<sup>2</sup> tienen el fenotipo de ojos blancos y por otro lado *ORR* y *tecu*<sup>1</sup> tienen el fenotipo de ojos rojos). Los registros se repitieron diez veces por individuo, con una n=4 por genotipo, en una habitación a 18°C-20°C, en un horario de 10:00-13:00 y con adultos de dos a 5 días de edad.

### **Disección de cerebros y detección de fluorescencia**

Se anestesiaron machos adultos con CO<sub>2</sub>, para posteriormente sumergirlos en una solución de PBS. Bajo un estereoscopio y con una fuente de luz con cuello de cisne apuntando en un ángulo que no bloquee la manipulación de la mosca y utilizando pinzas de disección de relojero del número 5, se inmovilizó a la mosca con pinzas y con la otra se retiró la probóscide, permitiendo de esta manera perforar la región suave y translúcida de la cutícula que se encuentra debajo de la probóscide. A continuación, con una pinza se sostuvo por un lado la cutícula y con la otra se arrancó la mayor parte de cutícula que rodea a la cabeza de la mosca y la mayor parte del ojo y la tráquea. Por último, se retiraron con cuidado los tejidos remanentes, como la tráquea que aparece como una fibra blanca, para dejar el cerebro solo, fuera de la cápsula de la cabeza. Finalmente se colocaron los

cerebros disecados en un portaobjetos con PBS para posteriormente realizar la adquisición de imágenes.

La adquisición de las imágenes de las CK marcadas en los CS se realizó con el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse y con el microscopio confocal (Zeiss LSM 780 DUO). En el microscopio confocal se adquirieron imágenes a lo largo del eje Z (Z Stack) con el objetivo 25x.

### **Comparación de transcritos**

Se utilizó la base de datos publicada en <http://github.com/fredpdavis/mushroombody> por Maxwell y colaboradores. Se tomaron los datos de los transcriptomas nucleares de los siete subtipos de las CK, se realizó una búsqueda de *tecu*<sup>+</sup> (*CG42237*), se comparó el número de transcritos por millón (TPM) de éste, con respecto a siete genes que codifican para las sPLA<sub>2</sub> en *D. melanogaster* (*CG3009*, *CG14507*, *CG30503*, *CG42237*, *GIII<sub>spla2</sub>*, *GXIV<sub>sPLA2</sub>* y *sPLA<sub>2</sub>*) y dos genes que se encuentran enriquecidos en los CS: *radish* (*rad*) y *ribosomal protein L32* (*RpL32*).

### **Análisis estadístico**

Para el análisis de las puebas conductuales y los ERG, se utilizó el paquete de software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU). Para los ensayos en adultos, se normalizaron los datos con la función arcosen.

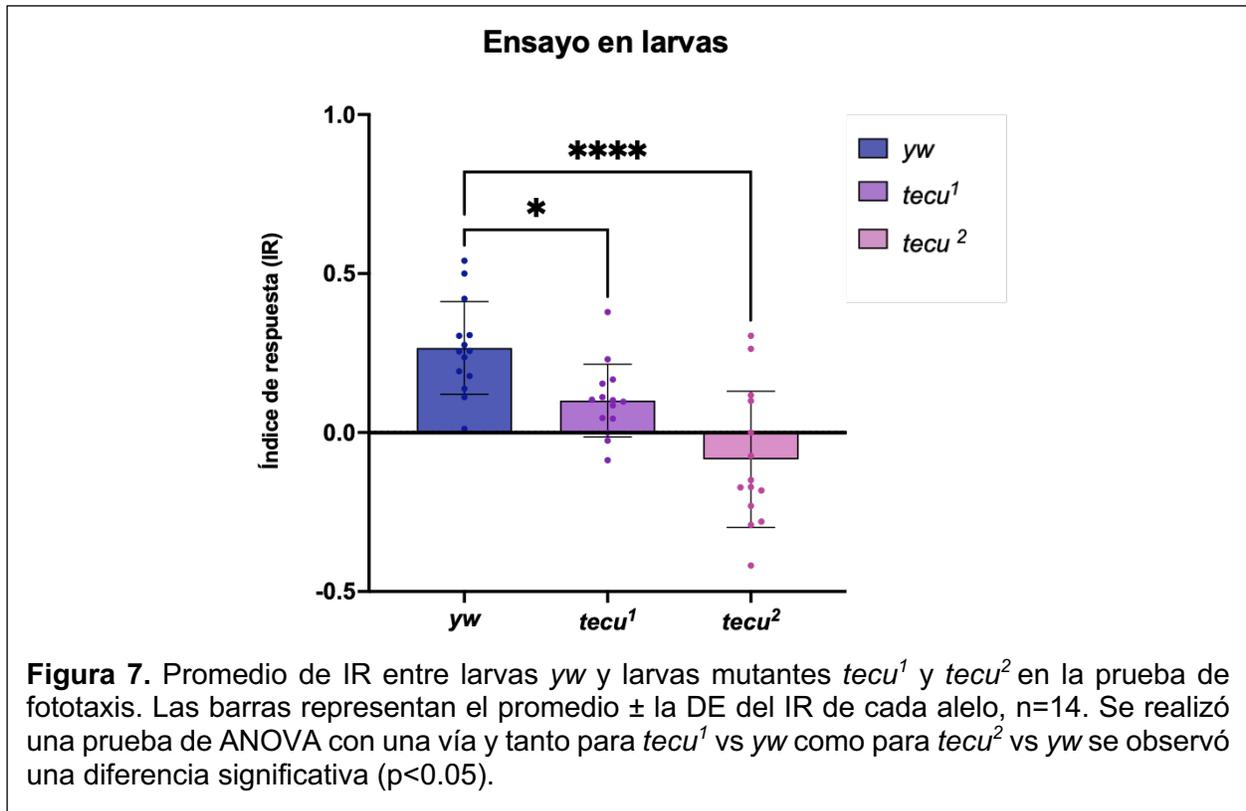
## RESULTADOS

Se realizaron dos tipos de pruebas conductuales, una para larvas y otra para adultos. En el caso de las larvas fue un ensayo de fototaxis negativa. En una primera parte se usaron los genotipos (*yw*, *tecu<sup>1</sup>* y *tecu<sup>2</sup>*) sin separar machos de hembras; posteriormente se repitió la misma prueba y en esta ocasión se separaron machos de hembras para poder estudiar si había diferencias entre larvas de diferentes sexos.

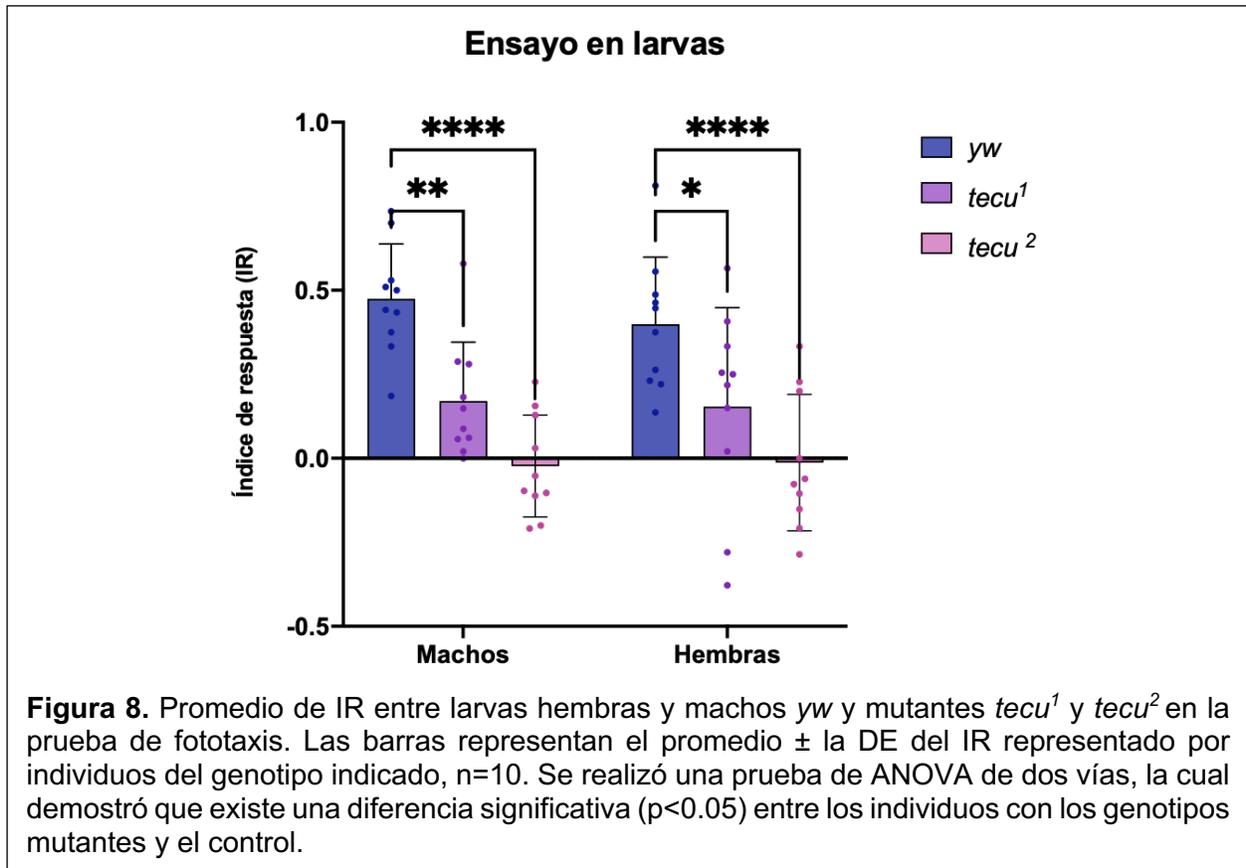
Para los ensayos de contracorriente de adultos se separaron machos de hembras, para que no existiesen influencias entre los sexos al momento de realizar los ensayos. Para cada prueba se utilizaron tubos limpios, para que los aromas no causaran ninguna variación en las respuestas de los individuos.

### Ensayo de fototaxis en larvas

En este ensayo, se observó una diferencia significativa en la fototaxis de larvas *tecu<sup>1</sup>* y *tecu<sup>2</sup>* con la presentada por larvas de la línea control (Figura 7). En larvas *yw*, la línea control, encontramos un valor de IR positivo ( $0.26 \pm 0.14$  IR), el cual disminuye significativamente a cero en ambas líneas mutantes. En el caso de las larvas *tecu<sup>2</sup>* el IR tiende a valores negativos ( $-0.08 \pm 0.2$  IR) y en las *tecu<sup>1</sup>* tiende a cero ( $0.10 \pm 0.11$  IR), lo cual implica que tienen una respuesta conductual aleatoria; es decir se reparten de manera indistinta en ambos cuadrantes.



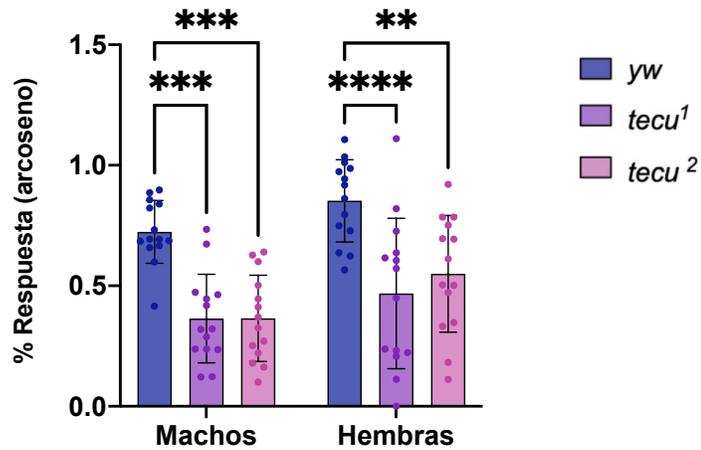
Para el segundo ensayo en el que se midió el IR tanto en larvas machos como en larvas hembras, encontramos una diferencia significativa entre la línea control y las mutantes (Figura 8). En la línea control el valor del IR tiende a uno (machos,  $0.47 \pm 0.16$  IR y hembras,  $0.33 \pm 0.19$  IR), el cual disminuye significativamente a cero en ambas líneas mutantes, *tecu<sup>1</sup>* tiende en mayor medida a cero (machos;  $0.17 \pm 0.17$  IR y hembras  $0.15 \pm 0.29$  IR) y *tecu<sup>2</sup>* a valores negativos (machos,  $-0.02 \pm 0.15$  IR y hembras  $-0.01 \pm 0.20$  IR). Estos resultados fueron consistentes con lo obtenido en los ensayos realizados en larvas no sexadas.



### Ensayos de contracorriente en adultos

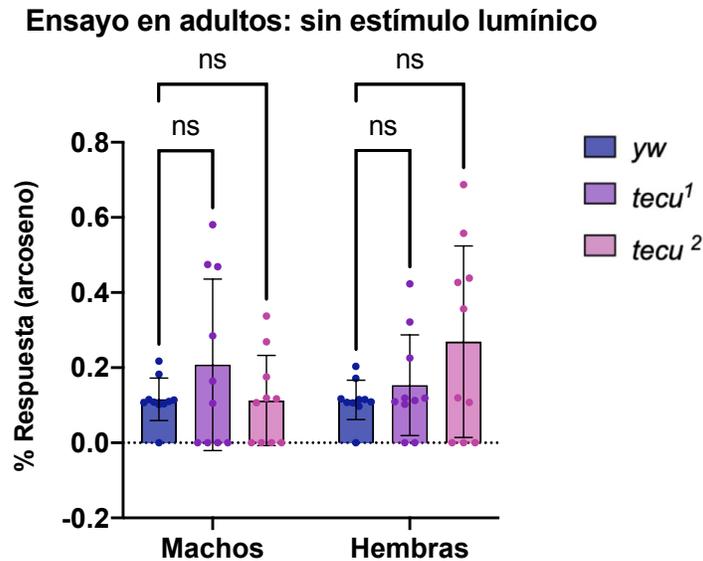
En este ensayo se normalizaron los datos con la función arcosen. Para obtener el porcentaje de respuesta a la luz, se tomó en cuenta el promedio del número de adultos que pasaron al último tubo con respecto al total. Los ensayos se realizaron con hembras y machos por separado y se observó que las moscas adultas *yw* tienen una mayor atracción al estímulo lumínico (machos;  $0.72 \pm 0.13$  % y hembras  $0.85 \pm 0.17$  %) a diferencia de *tecu*<sup>1</sup> (machos;  $0.36 \pm 0.18$  % y hembras  $0.46 \pm 0.31$  %) y *tecu*<sup>2</sup> (machos;  $0.36 \pm 0.17$  % y hembras  $0.55 \pm 0.24$  %).

### Ensayo en adultos: con estímulo lumínico



**Figura 9.** Porcentaje de hembras y machos adultos que pasan al último tubo-de la línea *yw* y las líneas mutantes *tecu<sup>1</sup>* y *tecu<sup>2</sup>* en la prueba de contracorriente (con estímulo lumínico). Las barras representan el promedio  $\pm$  la DE del porcentaje de individuos por genotipo que pasan al último,  $n=14$ . Se realizó una prueba de ANOVA de dos vías, la cual demostró que existe una diferencia significativa ( $p<0.05$ ) entre los genotipos mutantes y el control.

Los ensayos de contracorriente sin estímulo lumínico fueron controles de las pruebas con estímulo lumínico, ya que se buscó demostrar que la mutación no altera funciones motoras. Los resultados concordaron con lo anterior ya que no se observó diferencia significativa entre las hembras y machos control con respecto a las mutantes (Figura 10). Esto apunta a que todas las líneas presentaron preferencia a la oscuridad y que el paso entre los tubos (como ocurrió en el ensayo de contracorriente con estímulo lumínico), no se debió a un efecto del gen mutado en la respuesta motora.

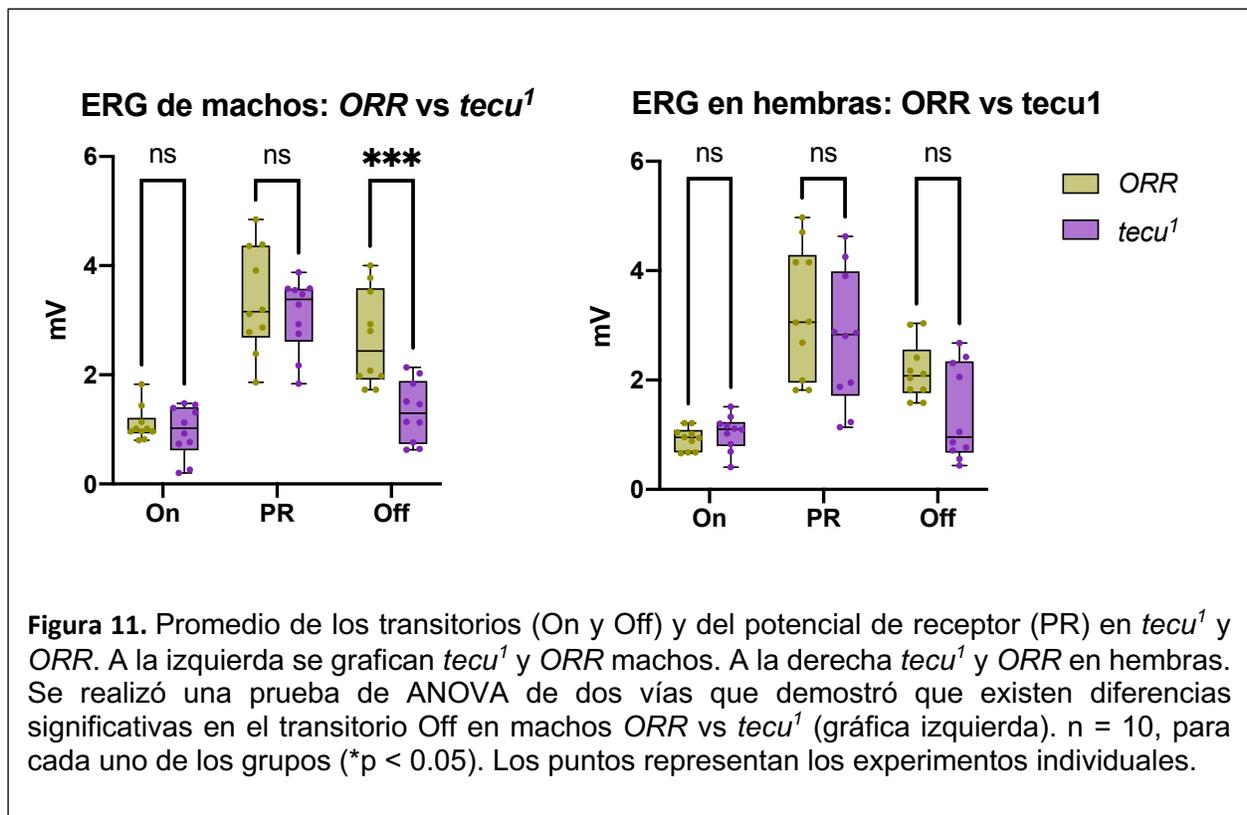


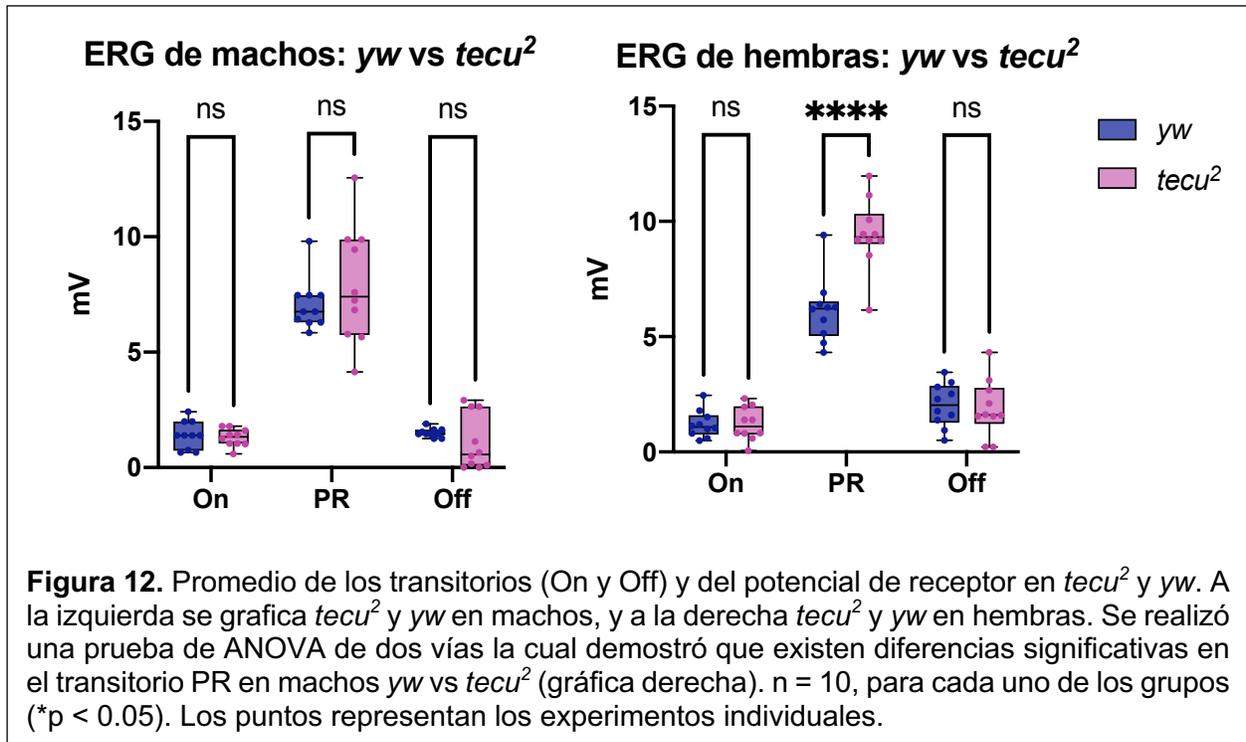
**Figura 10.** Porcentaje de hembras y machos adultos que pasan al último tubo de la línea *yw* y las líneas mutantes *tecu<sup>1</sup>* y *tecu<sup>2</sup>* en la prueba de contracorriente (sin estímulo lumínico). Las barras representan el promedio  $\pm$  la DE del porcentaje de individuos por genotipo que pasan al último tubo,  $n=10$ . Se realizó una prueba de ANOVA de dos vías, la cual demostró que no existe una diferencia significativa ( $p<0.05$ ) entre los genotipos mutantes y el control.

## Análisis de ERG

Para dilucidar si las mutaciones en *tecu* causan un deterioro en la función de los fotorreceptores, además de causar una deficiencia en el comportamiento de las moscas, se realizaron ERG en moscas *ORR*, *yw* y moscas mutantes. La comparación de los promedios del transitorio Off, On y el PR se presenta en las figuras 11 y 12. Encontramos que el transitorio Off en adultos machos *tecu<sup>1</sup>* ( $1.32 \pm 0.56$  mV) presenta diferencia significativa ( $p<0.05$ ) con respecto al presentado por *ORR* ( $2.65 \pm 0.87$  mV) (Figura 11, lado izquierdo). En adultos hembra *tecu<sup>1</sup>*, no encontramos diferencia significativa ( $p>0.05$ ) con respecto al presentado por animales del control (*ORR*), (Figura 11, lado derecho). En los ERG de machos *tecu<sup>2</sup>* vs *yw* no se encontró diferencia significativa ( $p>0.05$ ) con respecto al presentado por *yw* (Figura 12, lado derecho). En el PR de adultos hembras *tecu<sup>2</sup>* ( $9.43 \pm 01.54$  mV) presenta una diferencia significativa ( $p<0.05$ ) con respecto de *yw* ( $6.14 \pm 1.41$  mV) (Figura 12, lado derecho).

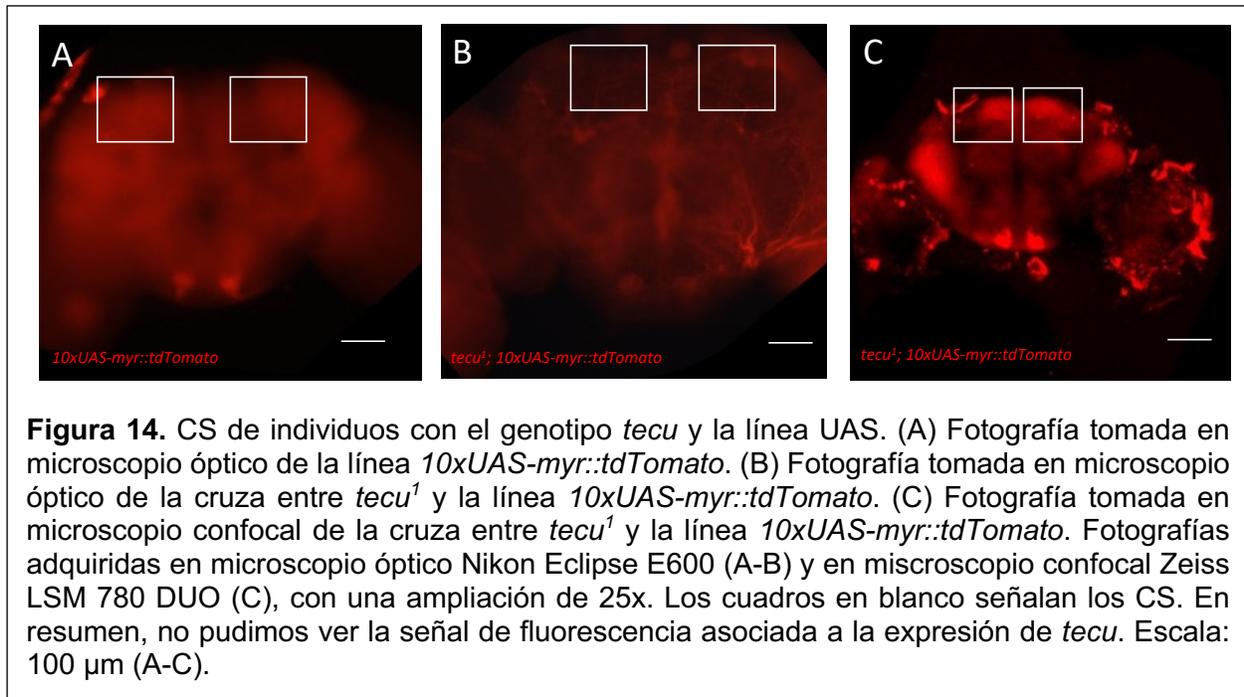
Las diferencias en el transitorio Off corresponden a la repolarización de las neuronas de la lámina. Esta actividad sináptica se da entre las células fotorreceptoras y las células postsinápticas, las grandes neuronas monopolares en la lámina óptica. Por ello, estas diferencias en el transitorio Off implican que hay defectos en la comunicación de los fotorreceptores y las células postsinápticas.





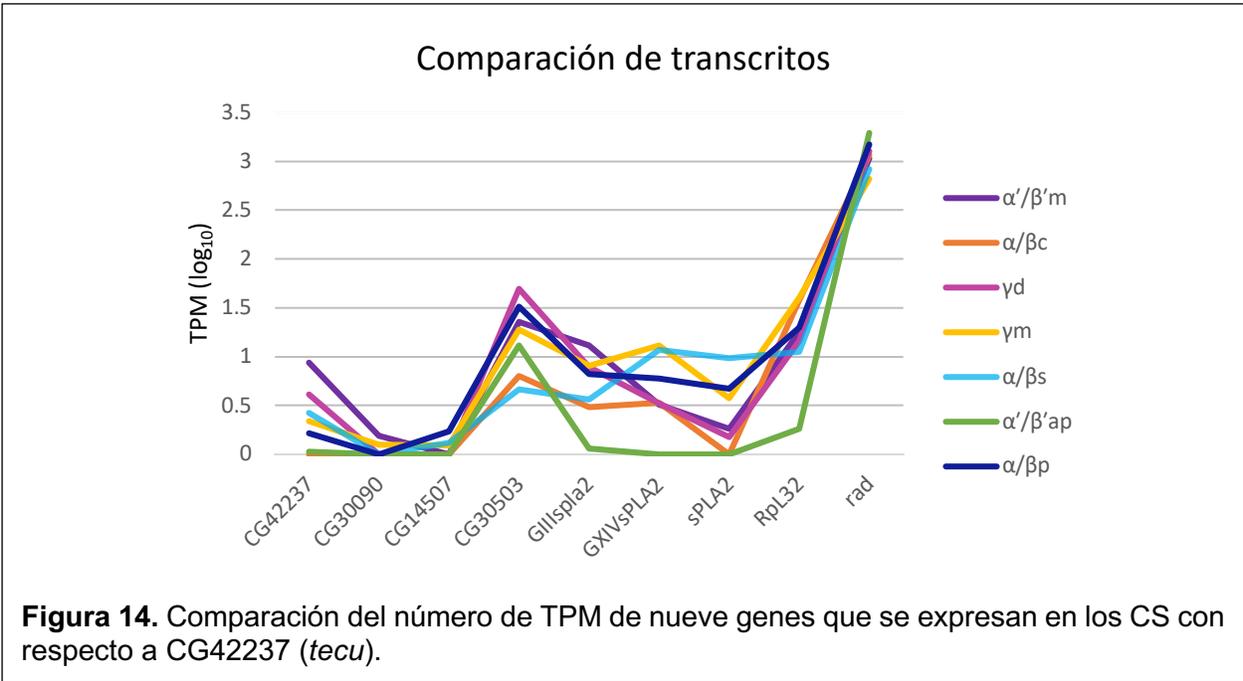
### Caracterización de células *tecu* por fluorescencia

Los resultados obtenidos fueron de carácter cualitativo. En la Figura 13, se puede observar una imagen adquirida en el microscopio óptico de un individuo macho de la F1, obtenida de la cruce entre *tecu*<sup>1</sup> (hembra) y la línea *10xUAS-myr::tdTomato* (macho). Algunas células presentaron fluorescencia, sin embargo; el área que se encontró marcada no corresponde con los CS (Figura 13; B). Para poder explicar estos resultados, se realizaron disecciones de cerebros de la línea control, *10xUAS-myr-tdTomato* (Figura 13; A). Lo que finalmente se observó fue autofluorescencia en los cerebros control y estas imágenes coincidieron con los cerebros obtenidos de los controles. Adicionalmente se adquirieron fotografías en microscopio confocal para confirmar lo anterior. Es así que no se logró detectar fluorescencia específica en los CS debido a la expresión de Gal4 en el patrón de *tecu*, como anteriormente se había visto (Suplementaria A).



## Comparación de transcritos

Para poder identificar si existe expresión de *tecu*<sup>+</sup> (CG42237) en los CS y cuantificarlo, se buscó el transcrito en la base de datos obtenida por Maxwell y colaboradores (2019), para posteriormente comparar el número de transcritos por millón (TPM) en cada célula con respecto a los siete genes que codifican para las sPLA<sub>2</sub> en *D. melanogaster* (CG3009, CG14507, CG30503, CG42237, *Gllspla2*, *GXIVsPLA<sub>2</sub>* y *sPLA<sub>2</sub>*). Adicional a los genes de las sPLA<sub>2</sub>, se comparó *tecu* con dos genes enriquecidos (*rad* y *RpL32*). Como se observa en la Figura 14 el número de TPM es baja para el caso de *tecu*<sup>+</sup> ( $\alpha'/\beta'm$ : 7.67,  $\alpha/\beta c$ : 0,  $\gamma d$ : 3.1,  $\gamma m$ : 1.18,  $\alpha/\beta s$ : 1.65,  $\alpha'/\beta'ap$ : 0.06 y  $\alpha/\beta p$ : 0.64). En el trabajo citado se utilizó un nivel basal de al menos 10 TPM de abundancia en una muestra, al menos el doble de diferencia en la expresión y una tasa de descubrimiento falso (FDR) del cinco por ciento para identificar genes expresados diferencialmente. En conclusión, estos datos nos señalan que existe una expresión de *tecu*<sup>+</sup> en algunas CK, pero que ésta expresión es muy baja.



## DISCUSIÓN

Anteriormente no se se conocía como es que la vía visual de *D. melanogaster* tiene eferencias que devienen de los lóbulos ópticos a los CS (Kind et al., 2021; Klapoetke et al., 2022; J. Li et al., 2020; Tuthill et al., 2013; Vogt et al., 2016; Vogt et al., 2014; Yamagata et al., 2015). Recientemente se desmostro que las VPN de la medula y la lóbula tienen conexiones en el cáliz accesorio ventral con las CK  $\gamma$ d y por otro lado estan las VPN que devienen únicamente de la médula y tienen sinápsis en el cáliz accesorio dorsal, específicamente con las 60 CK  $\alpha/\beta$ p (F. Li et al., 2020; J. Li et al., 2020). Además, Kind y colaboradores (2021), encontraron que las CK  $\gamma$ d tienen conexiones con células de la médula aMe12, las cuales forman parte de las VPN y proyectan a los cálices de ambos CS (Kind et al., 2021). Esta nueva información nos ha permitido hipotetizar que existen genes que tienen relación con la vía visual y se expresan en los CS; área del cerebro de *D. melanogaster* que anteriormente se conocía unicamene como un centro sensorial mayoritariamente olfativo asociado al aprendizaje y la memoria.

Por resultados obtenidos anteriormente en el laboratorio, se sugiere que *tecu* aparte de estar relacionado a la respuesta visual ante estímulos lumínicos, tiene una expresión en los CS; es asi que adicionalmente a las pruebas conductuales, para confirmar datos anteriores se realizó un nuevo marcaje fluorescente de *tecu* en los CS. Sin embargo los resultados fueron negativos, ya que al observar los cerebros disecados en un microscopio confocal Zeiss LSM 780 y un microscopio óptico de epifluorescencia Nikon Eclipse, no se observó expresión del gen en las CK como anteriormente se había encontrado; por ello se realizó la comparación de transcritos para poder observar la expresión del gen.

En la comparación de transcritos se encontró que existe poca expresión de *tecu* en los CS, es así que no necesariamente la mutación de *tecu* tiene una implicación únicamente en esta área (como anteriormente se hipotetizaba), por lo que es posible que el gen se exprese en diferentes áreas a lo largo de la vía visual (desde la retina hasta los

CS). Lo anterior se confirma en los ERG, donde se observó un defecto diferencial en los sexos derivado de la mutación en *tecu*, en el PR y el transitorio Off.

Trabajos recientes indican que los estímulos visuales se procesan a través de vías de On y Off en gran medida independientes, que procesan respectivamente aumentos y disminuciones de luminiscencia. Se sabe que L1-L3 reciben información sináptica directa de los fotorreceptores R1-R6 y proporcionan información que subyace en los transitorios Off y On (Chundi et al., 2021). Los ERG de las cepas de *tecu*<sup>1</sup> y *tecu*<sup>2</sup> demuestran que las mutaciones tienen un fenotipo electrofisiológico mutante a nivel de los lóbulos ópticos y no sólo de comportamiento. Esto se observa en los machos del grupo *tecu*<sup>1</sup> (Figura 11, lado derecho), los cuales tienen una respuesta reducida en el transitorio Off, que es un potencial derivado de la información sináptica transmitida de los fotorreceptores (R1-R6) a la lamina (L1-L3), derivada del cese del estímulo lumínico; también se observó una diferencia entre hembras *tecu*<sup>2</sup> y sus controles en el PR, el cual representa la despolarización sostenida en las células fotorreceptoras (Figura 12, lado derecho). Es así que la señalización en este punto aún se lleva a cabo, aunque no de manera silvestre.

En principio, la magnitud de los defectos en los transitorios no son suficientes para explicar enteramente las deficiencias conductuales, ya que son defectos parciales; lo que apuntaría a otros defectos más centrales. Por lo tanto, las pruebas conductuales que se realizaron tanto en larvas como adultos de ambos alelos son consistentes con que el déficit conductual puede ser tanto a nivel de cerebro central, como a nivel de los lóbulos ópticos (esto derivado a las diferencias de los ERG), o en las dos estructuras.

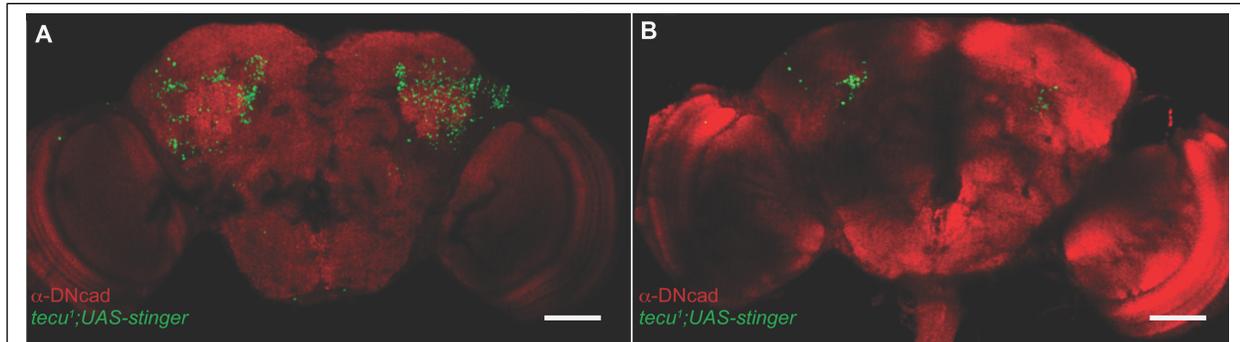
A la fecha se conoce muy poco sobre el funcionamiento de diferentes PLA<sub>2</sub>, sin embargo existen fosfolipasas que están relacionadas en la vía visual, como es el caso de la fosfolipasa C que está codificada por el gen *norpA* y que se ha visto que está asociada a la vía de fototransducción, al igual que el gen *rdgB* (Riesgo-Escovar et al., 1995). Por lo anterior se entiende que esa fosfolipasa al estar mutada, afectaría al menos una parte de la vía visual.

Se sabe que el motivo de unión a lípidos (LBM, por sus siglas en inglés) de la endofilina A1 interactúa con el ácido lisofosfatídico y la acil-coenzima A y los condensa a ácido fosfatídico. Esto es esencial para la formación de microvesículas sinápticas de la membrana plasmática y el cambio en la curvatura de las mismas. La PLA<sub>2</sub> hidroliza el enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos liberando ácidos grasos, principalmente ácido araquidónico (en el caso de mamíferos) y lisofosfolípidos, mientras que el dominio N-terminal LBM de la endofilina, se encarga de la condensación de ese ácido fosfatídico que está asociado al reciclamiento de vesículas sinápticas (Guichet et al., 2002). Lo anterior sugiere que el funcionamiento que tiene la PLA<sub>2</sub> (*tecu*) podría estar asociado a la formación de vesículas sinápticas, lo cual en este caso compromete la vía visual en las moscas de la fruta. Para poder dilucidar esto, será necesario realizar un análisis bioinformático de la expresión de los dos transcritos de *tecu*, a lo largo de toda la vía visual, así como marcar las células positivas a *tecu*, todo esto a lo largo del espacio y tiempo de la vida de la mosca de la fruta.

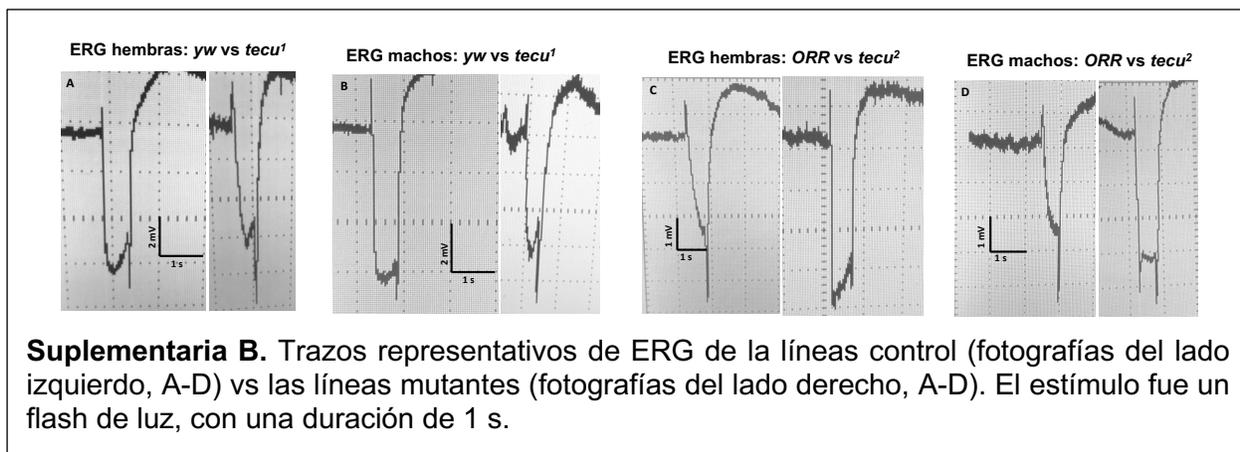
## CONCLUSIONES

- Las pruebas de fototaxis en larvas demostraron que mutaciones de la PLA<sub>2</sub> (*tecu*<sup>1</sup> y *tecu*<sup>2</sup>) causan un déficit visual, provocando una respuesta deficiente a la luz.
- Las pruebas de contracorriente en adultos demostraron que en la vida adulta de *D. melanogaster*, la mutación tiene un efecto negativo en la respuesta visual de ambos alelos.
- En los ERG se demostró hay algunos defectos, en un caso que la comunicación de fotorreceptores con las células de la lámina (L1 y L2) está comprometida, y en otro en la depolarización de los fotorreceptores.
- Al no obtener fluorescencia en las células marcadas, se hipotetiza que no necesariamente los CS y las CK que lo componen, expresan *tecu*.

## SUPLEMENTARIAS



**Suplementaria A.** Expresión de *tec*<sub>u</sub> en los CS. (A) Vista ventral de los CS. (B) Vista dorsal de los CS. Tanto en A como en B se observa fluorescencia en verde (UAS-stinger) de los somas marcados de un tipo de CK que expresa *tec*<sup>1</sup>. Fotografía tomada en microscopio confocal vertical Zeiss LSM 780 DUO, con una ampliación de 25x. Riesgo-Escovar (Datos no publicados).



**Suplementaria B.** Trazos representativos de ERG de la líneas control (fotografías del lado izquierdo, A-D) vs las líneas mutantes (fotografías del lado derecho, A-D). El estímulo fue un flash de luz, con una duración de 1 s.

## REFERENCIAS

- Aso, Y., Grübel, K., Busch, S., Friedrich, A. B., Siwanowicz, I., & Tanimoto, H. (2009). The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *J Neurogenet*, 23(1-2), 156-172. <https://doi.org/10.1080/01677060802471718>
- Aso, Y., Hattori, D., Yu, Y., Johnston, R. M., Iyer, N. A., Ngo, T. T., Dionne, H., Abbott, L. F., Axel, R., Tanimoto, H., & Rubin, G. M. (2014). The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning. *Elife*, 3, e04577. <https://doi.org/10.7554/eLife.04577>
- Balboa, M. A., Balsinde, J., Jones, S. S., & Dennis, E. A. (1997). Identity between the Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 enzymes from P388D1 macrophages and Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, 272(13), 8576-8580. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.13.8576>
- Barth, M., & Heisenberg, M. (1997). Vision affects mushroom bodies and central complex in *Drosophila melanogaster*. *Learn Mem*, 4(2), 219-229. <https://doi.org/10.1101/lm.4.2.219>
- Bausenwein, B., Dittrich, A. P., & Fischbach, K. F. (1992). The optic lobe of *Drosophila melanogaster*. II. Sorting of retinotopic pathways in the medulla. *Cell Tissue Res*, 267(1), 17-28. <https://doi.org/10.1007/BF00318687>
- Bayne, C. G., Hunt, W. S., Johanson, D. C., Flynn, E. T., & Weathersby, P. K. (1985). Doppler bubble detection and decompression sickness: a prospective clinical trial. *Undersea Biomed Res*, 12(3), 327-332. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2932833>
- Ben-David, G., Miller, E., & Steinhauer, J. (2015). spermatid individualization is sensitive to temperature and fatty acid metabolism. *Spermatogenesis*, 5(1), e1006089. <https://doi.org/10.1080/21565562.2015.1006089>
- Benzer, S. (1967). Behavioral mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 58(3), 1112-1119. <https://doi.org/10.1073/pnas.58.3.1112>
- Brembs, B., & Wiener, J. (2006). Context and occasion setting in *Drosophila* visual learning. *Learn Mem*, 13(5), 618-628. <https://doi.org/10.1101/lm.318606>

- Campos, A. R., Lee, K. J., & Steller, H. (1995). Establishment of neuronal connectivity during development of the *Drosophila* larval visual system. *J Neurobiol*, 28(3), 313-329. <https://doi.org/10.1002/neu.480280305>
- Choe, K. M., & Clandinin, T. R. (2005). Thinking about visual behavior; learning about photoreceptor function. *Curr Top Dev Biol*, 69, 187-213. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)69007-2](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)69007-2)
- Chundi, X., Tyler, R., & Chris, D. (2021). *Homeodomain proteins hierarchically specify neuronal diversity and synaptic connectivity*.
- Clements, J., Dolafi, T., Umayam, L., Neubarth, N. L., Berg, S., Scheffer, L. K., & Plaza, S. M. (2020). Analysis Tools for EM Connectomics. *bioRxiv*, 2020.2001.2016.909465. <https://doi.org/10.1101/2020.01.16.909465>
- Coombe, P. E. (1986). The large monopolar cells L1 and L2 are responsible for ERG transients in *Drosophila*. In (Vol. 159, pp. 655–665 ): *J. Comp. Physiol*.
- Crocker, A., Guan, X. J., Murphy, C. T., & Murthy, M. (2016). Cell-Type-Specific Transcriptome Analysis in the *Drosophila* Mushroom Body Reveals Memory-Related Changes in Gene Expression. *Cell Rep*, 15(7), 1580-1596. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.046>
- Cully, D. F., Paress, P. S., Liu, K. K., Schaeffer, J. M., & Arena, J. P. (1996). Identification of a *Drosophila melanogaster* glutamate-gated chloride channel sensitive to the antiparasitic agent avermectin. *J Biol Chem*, 271(33), 20187-20191. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.33.20187>
- Davis, F. P., Nern, A., Picard, S., Reiser, M. B., Rubin, G. M., Eddy, S. R., & Henry, G. L. (2020). A genetic, genomic, and computational resource for exploring neural circuit function. *Elife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.50901>
- Davis, M. T. M. R. a. C. G. (1953). Light as an Ecological Determinant of Interspecific Competition between *Drosophila willistoni* and *Drosophila melanogaster*. *The American Naturalist*, 87(837), 389--392. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/281799>
- de Belle, J. S., & Heisenberg, M. (1996). Expression of *Drosophila* mushroom body mutations in alternative genetic backgrounds: a case study of the mushroom body

- miniature gene (mbm). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(18), 9875-9880.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9875>
- Demerec, M., & Kaufmann, B. P. (1967). *Drosophila Guide: Introduction to the Genetics and Cytology of Drosophila melanogaster* (C. I. o. Washington, Ed. 8 ed.).
- Dolph, P., Nair, A., & Raghu, P. (2011). Electroretinogram recordings of *Drosophila*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2011(1), pdb.prot5549. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5549>
- Dowhan, W. (1997). Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu Rev Biochem*, 66, 199-232.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.199>
- Fast, P. G. (1967). Ethanolamine phosphoglycerides: effect on the properties of myelinoid lecithin water systems. *Science*, 155(3770), 1680-1681.  
<https://doi.org/10.1126/science.155.3770.1680>
- Feiler, R., Bjornson, R., Kirschfeld, K., Mismar, D., Rubin, G. M., Smith, D. P., Socolich, M., & Zuker, C. S. (1992). Ectopic expression of ultraviolet-rhodopsins in the blue photoreceptor cells of *Drosophila*: visual physiology and photochemistry of transgenic animals. *J Neurosci*, 12(10), 3862-3868.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1403087>
- Fisher, Y. E., Leong, J. C., Sporar, K., Ketkar, M. D., Gohl, D. M., Clandinin, T. R., & Silies, M. (2015). A Class of Visual Neurons with Wide-Field Properties Is Required for Local Motion Detection. *Curr Biol*, 25(24), 3178-3189.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.018>
- Fristrom, J. W. (1970). The developmental biology of *Drosophila*. *Annu Rev Genet*, 4, 325-346. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.04.120170.001545>
- Gao, S., Takemura, S. Y., Ting, C. Y., Huang, S., Lu, Z., Luan, H., Rister, J., Thum, A. S., Yang, M., Hong, S. T., Wang, J. W., Odenwald, W. F., White, B. H., Meinertzhagen, I. A., & Lee, C. H. (2008). The neural substrate of spectral preference in *Drosophila*. *Neuron*, 60(2), 328-342. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.08.010>
- Gaudet, P., Livstone, M. S., Lewis, S. E., & Thomas, P. D. (2011). Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Brief Bioinform*, 12(5), 449-462. <https://doi.org/10.1093/bib/bbr042>

- Gengs, C., Leung, H. T., Skingsley, D. R., Iovchev, M. I., Yin, Z., Semenov, E. P., Burg, M. G., Hardie, R. C., & Pak, W. L. (2002). The target of *Drosophila* photoreceptor synaptic transmission is a histamine-gated chloride channel encoded by ort (hclA). *J Biol Chem*, 277(44), 42113-42120. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207133200>
- Gilby, A. R. (1965). Lipids and Their Metabolism in Insects. *Annual Review of Entomology*, 10(1), 141-160. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.10.010165.001041>
- Godoy-Herrera, R., Alarcon, M., Caceres, H., Loyola, I., Navarrete, I., & Vega, J. L. (1992). The development of photoresponse in *Drosophila melanogaster* larvae. *Rev. Chilena Hist. Nat*, 65, 95-101.
- Godoy-Herrera, R., Cifuentes, L., de Arcaya, M. F. D., Fernández, M., Fuentes, M., Reyes, I., & Valderrama, C. (1989). The behaviour of *Drosophila melanogaster* larvae during pupation. *Animal behaviour*, 37, 820-829.
- Green, P., Hartenstein, A. Y., & Hartenstein, V. (1993). The embryonic development of the *Drosophila* visual system. *Cell Tissue Res*, 273(3), 583-598. <https://doi.org/10.1007/BF00333712>
- Grossfield, J., Ashburner, M., & Wright, T. (1978). The genetics and biology of *Drosophila*. In: Academic.
- Guichet, A., Wucherpfennig, T., Dudu, V., Etter, S., Wilsch-Bräuniger, M., Hellwig, A., González-Gaitán, M., Huttner, W. B., & Schmidt, A. A. (2002). Essential role of endophilin A in synaptic vesicle budding at the *Drosophila* neuromuscular junction. *EMBO J*, 21(7), 1661-1672. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1661>
- Hardie, R. C. (1985). Functional Organization of the Fly Retina. In H. Autrum, D. Ottoson, E. R. Perl, R. F. Schmidt, H. Shimazu, & W. D. Willis (Eds.), *Progress in Sensory Physiology* (pp. 1-79). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-70408-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-70408-6_1)
- Hardie, R. C. (1989). A histamine-activated chloride channel involved in neurotransmission at a photoreceptor synapse. *Nature*, 339(6227), 704-706. <https://doi.org/10.1038/339704a0>
- Hardie, R. C. (2003). Regulation of TRP channels via lipid second messengers. *Annu Rev Physiol*, 65, 735-759. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142505>

- Hardie, R. C., & Minke, B. (1992). The *trp* gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*, 8(4), 643-651. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90086-s](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90086-s)
- Hardie, R. C., & Raghu, P. (2001). Visual transduction in *Drosophila*. *Nature*, 413(6852), 186-193. <https://doi.org/10.1038/35093002>
- Harris, W. A., Stark, W. S., & Walker, J. A. (1976). Genetic dissection of the photoreceptor system in the compound eye of *Drosophila melanogaster*. *J Physiol*, 256(2), 415-439. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1976.sp011331>
- Hausen, K. (1984). Structure, Function and Significance in Visual Behaviour. In M. A. e. Ali (Ed.), *The Lobula-Complex of the Fly* (Vol. 74). Springer. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2743-1\\_15](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2743-1_15)
- Heath, S. L., Christenson, M. P., Oriol, E., Saavedra-Weisenhaus, M., Kohn, J. R., & Behnia, R. (2020). Circuit Mechanisms Underlying Chromatic Encoding in *Drosophila* Photoreceptors. *Curr Biol*, 30(2), 264-275.e268. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.075>
- Heisenberg, M. (1971). Separation of receptor and lamina potentials in the electroretinogram of normal and mutant *Drosophila*. *J Exp Biol*, 55(1), 85-100. <https://doi.org/10.1242/jeb.55.1.85>
- Heisenberg, M., & Wolf, R. (1984). *Vision in Drosophila: Genetics of Microbehavior*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-69936-8>
- Hilbrant, M., Almudi, I., Leite, D. J., Kuncheria, L., Posnien, N., Nunes, M. D., & McGregor, A. P. (2014). Sexual dimorphism and natural variation within and among species in the *Drosophila* retinal mosaic. *BMC Evol Biol*, 14, 240. <https://doi.org/10.1186/s12862-014-0240-x>
- Hofbauer, A., & Campos-Ortega, J. A. (1990). Proliferation pattern and early differentiation of the optic lobes in *Drosophila melanogaster*. *Roux Arch Dev Biol*, 198(5), 264-274. <https://doi.org/10.1007/BF00377393>
- Horne, I., Haritos, V. S., & Oakeshott, J. G. (2009). Comparative and functional genomics of lipases in holometabolous insects. *Insect Biochem Mol Biol*, 39(8), 547-567. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.06.002>

- Hotta, Y., & Benzer, S. (1969). Abnormal electroretinograms in visual mutants of *Drosophila*. *Nature*, 222(5191), 354-356. <https://doi.org/10.1038/222354a0>
- Ito, K., & Hotta, Y. (1992). Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*, 149(1), 134-148. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(92\)90270-g](https://doi.org/10.1016/0012-1606(92)90270-g)
- Jörs, S., Kazanski, V., Foik, A., Krautwurst, D., & Harteneck, C. (2006). Receptor-induced activation of *Drosophila* TRP gamma by polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*, 281(40), 29693-29702. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602215200>
- Keene, A. C., & Sprecher, S. G. (2012). Seeing the light: photobehavior in fruit fly larvae. *Trends Neurosci*, 35(2), 104-110. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.11.003>
- Kind, E., Longden, K. D., Nern, A., Zhao, A., Sancer, G., Flynn, M. A., Laughland, C. W., Gezahegn, B., Ludwig, H. D., Thomson, A. G., Obrusnik, T., Alarcón, P. G., Dionne, H., Bock, D. D., Rubin, G. M., Reiser, M. B., & Wernet, M. F. (2021). Synaptic targets of photoreceptors specialized to detect color and skylight polarization in. *Elife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.71858>
- Kirschfeld, K., & Franceschini, N. (1977). Photostable pigments within the membrane of photoreceptors and their possible role. *Biophys Struct Mech*, 3(2), 191-194. <https://doi.org/10.1007/BF00535818>
- Klapoetke, N. C., Nern, A., Rogers, E. M., Rubin, G. M., Reiser, M. B., & Card, G. M. (2022). A functionally ordered visual feature map in the *Drosophila* brain. *Neuron*, 110(10), 1700-1711.e1706. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.02.013>
- Lazopulo, S., Lazopulo, A., Baker, J. D., & Syed, S. (2019). Daytime colour preference in *Drosophila* depends on the circadian clock and TRP channels. *Nature*, 574(7776), 108-111. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1571-y>
- Leung, H. T., Tseng-Crank, J., Kim, E., Mahapatra, C., Shino, S., Zhou, Y., An, L., Doerge, R. W., & Pak, W. L. (2008). DAG lipase activity is necessary for TRP channel regulation in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*, 58(6), 884-896. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.05.001>
- Li, F., Lindsey, J. W., Marin, E. C., Otto, N., Dreher, M., Dempsey, G., Stark, I., Bates, A. S., Pleijzier, M. W., Schlegel, P., Nern, A., Takemura, S. Y., Eckstein, N., Yang, T., Francis, A., Braun, A., Parekh, R., Costa, M., Scheffer, L. K., . . . Rubin, G. M.

- (2020). The connectome of the adult *Drosophila* mushroom body provides insights into function. *Elife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.62576>
- Li, J., Mahoney, B. D., Jacob, M. S., & Caron, S. J. C. (2020). Visual Input into the *Drosophila melanogaster* Mushroom Body. *Cell Rep*, 32(11), 108138. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108138>
- Lin, H. H., Lai, J. S., Chin, A. L., Chen, Y. C., & Chiang, A. S. (2007). A map of olfactory representation in the *Drosophila* mushroom body. *Cell*, 128(6), 1205-1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.006>
- Maisak, M. S., Haag, J., Ammer, G., Serbe, E., Meier, M., Leonhardt, A., Schilling, T., Bahl, A., Rubin, G. M., Nern, A., Dickson, B. J., Reiff, D. F., Hopp, E., & Borst, A. (2013). A directional tuning map of *Drosophila* elementary motion detectors. *Nature*, 500(7461), 212-216. <https://doi.org/10.1038/nature12320>
- Margulies, C., Tully, T., & Dubnau, J. (2005). Deconstructing memory in *Drosophila*. *Curr Biol*, 15(17), R700-713. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.08.024>
- Martin, J. R., Ernst, R., & Heisenberg, M. (1998). Mushroom bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Learn Mem*, 5(1-2), 179-191. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10454382>
- Mazzoni, E. O., Desplan, C., & Blau, J. (2005). Circadian pacemaker neurons transmit and modulate visual information to control a rapid behavioral response. *Neuron*, 45(2), 293-300. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.038>
- McKay, R. R., Chen, D. M., Miller, K., Kim, S., Stark, W. S., & Shortridge, R. D. (1995). Phospholipase C rescues visual defect in norpA mutant of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*, 270(22), 13271-13276. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.22.13271>
- Members, I. P. (2004-). Gene Ontology annotation through association of InterPro records with GO terms. In.
- Meyertholen, E. P., Stein, P. J., Williams, M. A., & Ostroy, S. E. (1987). Studies of the *Drosophila norpA* phototransduction mutant. II. Photoreceptor degeneration and rhodopsin maintenance. *J Comp Physiol A*, 161(6), 793-798. <https://doi.org/10.1007/BF00610221>

- Molina-Obando, S., Vargas-Fique, J. F., Henning, M., Gür, B., Schladt, T. M., Akhtar, J., Berger, T. K., & Silies, M. (2019). ON selectivity in the. *Elife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.49373>
- Montell, C. (1999). Visual transduction in *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15, 231-268. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.15.1.231>
- Morante, J., & Desplan, C. (2004). Building a projection map for photoreceptor neurons in the *Drosophila* optic lobes. *Semin Cell Dev Biol*, 15(1), 137-143. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2003.09.007>
- Murakami, M., Sato, H., & Taketomi, Y. (2020). Updating Phospholipase A. *Biomolecules*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/biom10101457>
- Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Hirabayashi, T., & Yamamoto, K. (2011). Recent progress in phospholipase A<sub>2</sub> research: from cells to animals to humans. *Prog Lipid Res*, 50(2), 152-192. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.12.001>
- Niemeyer, B. A., Suzuki, E., Scott, K., Jalink, K., & Zuker, C. S. (1996). The *Drosophila* light-activated conductance is composed of the two channels TRP and TRPL. *Cell*, 85(5), 651-659. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81232-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81232-5)
- Owald, D., & Waddell, S. (2015). Olfactory learning skews mushroom body output pathways to steer behavioral choice in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol*, 35, 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.10.002>
- Pak, W. L. (1995). *Drosophila* in vision research. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36(12), 2340-2357. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7591624>
- Pantazis, A., Segaran, A., Liu, C. H., Nikolaev, A., Rister, J., Thum, A. S., Roeder, T., Semenov, E., Juusola, M., & Hardie, R. C. (2008). Distinct roles for two histamine receptors (hclA and hclB) at the *Drosophila* photoreceptor synapse. *J Neurosci*, 28(29), 7250-7259. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1654-08.2008>
- Raghu, P. (2006). Regulation of *Drosophila* TRPC channels by protein and lipid interactions. *Semin Cell Dev Biol*, 17(6), 646-653. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2006.11.008>
- Raji, J. I., & Potter, C. J. (2021). The number of neurons in *Drosophila* and mosquito brains. *PLoS One*, 16(5), e0250381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250381>

- Ramos-Traslosheros, G., & Silies, M. (2021). The physiological basis for contrast opponency in motion computation in *Drosophila*. *Nat Commun*, 12(1), 4987. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24986-w>
- Renault, A. D., Starz-Gaiano, M., & Lehmann, R. (2002). Metabolism of sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid: a genome wide analysis of gene expression in *Drosophila*. *Mech Dev*, 119 Suppl 1, S293-301. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(03\)00131-x](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(03)00131-x)
- Riesgo-Escovar, J., Raha, D., & Carlson, J. R. (1995). Requirement for a phospholipase C in odor response: overlap between olfaction and vision in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(7), 2864-2868. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2864>
- Rister, J., Pauls, D., Schnell, B., Ting, C. Y., Lee, C. H., Sinakevitch, I., Morante, J., Strausfeld, N. J., Ito, K., & Heisenberg, M. (2007). Dissection of the peripheral motion channel in the visual system of *Drosophila melanogaster*. *Neuron*, 56(1), 155-170. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.014>
- Salcedo, E., Huber, A., Henrich, S., Chadwell, L. V., Chou, W. H., Paulsen, R., & Britt, S. G. (1999). Blue- and green-absorbing visual pigments of *Drosophila*: ectopic expression and physiological characterization of the R8 photoreceptor cell-specific Rh5 and Rh6 rhodopsins. *J Neurosci*, 19(24), 10716-10726. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10594055>
- Sawin, E. P., Harris, L. R., Campos, A. R., & Sokolowski, M. B. (1994). Sensorimotor transformation from light reception to phototactic behavior in *Drosophila* larvae (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Insect Behavior*, 7(4), 553-567. <https://doi.org/10.1007/BF02025449>
- Scheffer, L. K., Xu, C. S., Januszewski, M., Lu, Z., Takemura, S. Y., Hayworth, K. J., Huang, G. B., Shinomiya, K., Maitlin-Shepard, J., Berg, S., Clements, J., Hubbard, P. M., Katz, W. T., Umayam, L., Zhao, T., Ackerman, D., Blakely, T., Bogovic, J., Dolafi, T., . . . Plaza, S. M. (2020). A connectome and analysis of the adult. *Elife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.57443>
- Schnaitmann, C., Haikala, V., Abraham, E., Oberhauser, V., Thestrup, T., Griesbeck, O., & Reiff, D. F. (2018). Color Processing in the Early Visual System of *Drosophila*. *Cell*, 172(1-2), 318-330.e318. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.018>

- Sharkey, C. R., Blanco, J., Leibowitz, M. M., Pinto-Benito, D., & Wardill, T. J. (2020). The spectral sensitivity of *Drosophila* photoreceptors. *Sci Rep*, 10(1), 18242. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74742-1>
- Stanley-Samuelson, D. W., Jurenka, R. A., Cripps, C., Blomquist, G. J., & de Renobales, M. (1988). Fatty acids in insects: composition, metabolism, and biological significance. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 9(1), 1-33.
- Stark, W. S., & Wasserman, G. S. (1972). Transient and receptor potentials in the electroretinogram of *Drosophila*. *Vision Res*, 12(10), 1771-1775. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(72\)90049-1](https://doi.org/10.1016/0042-6989(72)90049-1)
- Strother, J. A., Wu, S. T., Wong, A. M., Nern, A., Rogers, E. M., Le, J. Q., Rubin, G. M., & Reiser, M. B. (2017). The Emergence of Directional Selectivity in the Visual Motion Pathway of *Drosophila*. *Neuron*, 94(1), 168-182.e110. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.010>
- Tanaka, N. K., Tanimoto, H., & Ito, K. (2008). Neuronal assemblies of the *Drosophila* mushroom body. *J Comp Neurol*, 508(5), 711-755. <https://doi.org/10.1002/cne.21692>
- Ting, C. Y., & Lee, C. H. (2007). Visual circuit development in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol*, 17(1), 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.12.004>
- Tuthill, J. C., Nern, A., Holtz, S. L., Rubin, G. M., & Reiser, M. B. (2013). Contributions of the 12 neuron classes in the fly lamina to motion vision. *Neuron*, 79(1), 128-140. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.024>
- Valentin, E., & Lambeau, G. (2000). Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1488(1-2), 59-70. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(00\)00110-4](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00110-4)
- Vilinsky, I., & Johnson, K. G. (2012). Electroretinograms in *Drosophila*: a robust and genetically accessible electrophysiological system for the undergraduate laboratory. *J Undergrad Neurosci Educ*, 11(1), A149-157. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23494679>
- Vogt, K., Aso, Y., Hige, T., Knapek, S., Ichinose, T., Friedrich, A. B., Turner, G. C., Rubin, G. M., & Tanimoto, H. (2016). Direct neural pathways convey distinct visual

- information to *Drosophila* mushroom bodies. *Elife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.14009>
- Vogt, K., Schnaitmann, C., Dylla, K. V., Knapek, S., Aso, Y., Rubin, G. M., & Tanimoto, H. (2014). Shared mushroom body circuits underlie visual and olfactory memories in *Drosophila*. *Elife*, 3, e02395. <https://doi.org/10.7554/eLife.02395>
- Wang, T., & Montell, C. (2007). Phototransduction and retinal degeneration in *Drosophila*. *Pflugers Arch*, 454(5), 821-847. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0251-1>
- Wernet, M. F., & Desplan, C. (2004). Building a retinal mosaic: cell-fate decision in the fly eye. *Trends Cell Biol*, 14(10), 576-584. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.007>
- Wu, C. F., & Pak, W. L. (1978). Light-induced voltage noise in the photoreceptor of *Drosophila melanogaster*. *J Gen Physiol*, 71(3), 249-268. <https://doi.org/10.1085/jgp.71.3.249>
- Yamagata, N., Ichinose, T., Aso, Y., Plaçais, P. Y., Friedrich, A. B., Sima, R. J., Preat, T., Rubin, G. M., & Tanimoto, H. (2015). Distinct dopamine neurons mediate reward signals for short- and long-term memories. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(2), 578-583. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421930112>
- Yang, H. H., St-Pierre, F., Sun, X., Ding, X., Lin, M. Z., & Clandinin, T. R. (2016). Subcellular Imaging of Voltage and Calcium Signals Reveals Neural Processing In Vivo. *Cell*, 166(1), 245-257. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.031>
- Zars, T., Fischer, M., Schulz, R., & Heisenberg, M. (2000). Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science*, 288(5466), 672-675. <https://doi.org/10.1126/science.288.5466.672>
- Zhang, K., Guo, J. Z., Peng, Y., Xi, W., & Guo, A. (2007). Dopamine-mushroom body circuit regulates saliency-based decision-making in *Drosophila*. *Science*, 316(5833), 1901-1904. <https://doi.org/10.1126/science.1137357>
- Zhu, S., Chiang, A. S., & Lee, T. (2003). Development of the *Drosophila* mushroom bodies: elaboration, remodeling and spatial organization of dendrites in the calyx. *Development*, 130(12), 2603-2610. <https://doi.org/10.1242/dev.00466>