



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

**CARACTERIZACIÓN DE FENOTIPOS DE ALELOS MUTANTES DE *kayak (kay)*  
EN EL DESARROLLO DEL OJO DE *Drosophila melanogaster***

Que para optar por el grado de:  
Maestro en Ciencias

Presenta:  
Manuel Alejandro Zuniga Garcia

Tutor principal  
Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar  
Instituto de Neurobiología, UNAM

Miembros del comité tutor

Dr. Luis Daniel Ríos Barrera  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Gonzalo Martínez De La Escalera Lorenzo  
Instituto de Neurobiología, UNAM

8 de mayo de 2023  
Juriquilla, Querétaro



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.

## Resumen

*kayak* (*kay*) es un gen que tiene múltiples funciones durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster* y se expresa en múltiples tejidos en diferentes etapas del desarrollo. *kay*, además, participa en varias vías de señalización. En este estudio nos enfocamos en caracterizar los fenotipos oculares de cuatro alelos mutantes de *kay*, *kay*<sup>1</sup>, *kay*<sup>2</sup>, *kay*<sup>4</sup> y *kay*<sup>5</sup>. Ya que los individuos homocigotos que portan estos alelos mueren durante la embriogénesis generamos clones mutantes de todos ellos en el ojo. Los ojos con clones mutantes fueron analizados utilizando microscopía óptica, confocal y electrónica de barrido, lo que nos permitió describir los fenotipos mutantes en los adultos. En particular encontramos que los individuos con clones mutantes de *kay*<sup>1</sup>, *kay*<sup>2</sup> y *kay*<sup>5</sup> mostraron defectos en la córnea y las quetas mecanorreceptoras, mientras que los que tenían clones de *kay*<sup>5</sup> mostraron grandes indentaciones en la cutícula, además de defectos similares a los observados en los ojos con clones de *kay*<sup>1</sup> y *kay*<sup>2</sup>. Además, el análisis de imágenes obtenidas por microscopía confocal revelaron defectos de polaridad de los fotorreceptores y una disminución en el tamaño de clones mutantes. Finalmente, encontramos que el porcentaje de fotorreceptores mutantes es significativamente menor que el de fotorreceptores silvestres. Esto sugiere que *kay* podría ser necesario para la supervivencia o diferenciación de los fotorreceptores. En resumen, nuestros resultados muestran que *kay* desempeña varios papeles clave en el desarrollo de todos los linajes celulares del ojo, lo que subraya la importancia del papel de *kay* en la regulación de múltiples procesos durante el desarrollo.

## **Abstract**

*kayak* (*kay*) is a pleiotropic gene transcribed in many places and developmental stages in *Drosophila melanogaster*. *kay* participates in several signaling pathways. We characterize the eye phenotypes of four *kay* mutant alleles, *kay*<sup>1</sup>, *kay*<sup>2</sup>, *kay*<sup>4</sup>, and *kay*<sup>5</sup>. To do so, we generated mutant clones for all of them in the eye as these alleles are all embryonic lethal. We describe adult eye mutant phenotypes by analyzing them with optical, confocal, and scanning electron microscopy. Mutant *kay*<sup>1</sup>, *kay*<sup>2</sup>, and *kay*<sup>5</sup> clones exhibit ommatidium and bristle defects. Mutant *kay*<sup>5</sup> shows big cuticle indentations and loss of ommatidial structure in the medial-anterior eye region. Semithin optical sections analysis revealed ommatidium polarity defects and ommatidia with fewer photoreceptors. Finally, we found that the rate of mutant versus wildtype photoreceptors decreased in *kay* clones, suggesting that Kay is necessary for cell fate and/or photoreceptor survival. Taken together, these results indicate that *kay* plays several key roles in general eye development.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al pueblo de México que por medio del CONACYT me brindó el apoyo económico que me está permitiendo realizar mi sueño de dedicarme a la ciencia.

A la UNAM y al Instituto de Neurobiología por generar las condiciones necesarias para desarrollar mi trabajo de investigación.

A los Doctores Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo y Luis Daniel Ríos Barrera, miembros del Comité Tutor, por su valiosa retroalimentación y orientación durante toda la maestría.

A las Doctoras Martha Vázquez Laslop, Rocío Salceda Sacaneles y Ataulfo Martínez, miembros del Jurado del Examen de Grado, por sus valiosos comentarios y cuestionamientos que retroalimentaron la redacción y discusión de este trabajo.

A Elsa Nydia Hernández Ríos por su acompañamiento y asesoramiento en el uso del microscopio confocal.

Al Doctor Juan Manuel Murillo Maldonado por sus acertadas recomendaciones, sus críticas constructivas y su apoyo técnico durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio que con su sonrisa presta y su solidaridad constante siempre me hicieron sentir en casa.

A Daniel Tapia Merino por su invaluable colaboración en el desarrollo del código para contar los pezones corneales.

A todos los amigos que han hecho de mi estancia en México una experiencia inmejorable.

Al doctor Juan Riesgo por haber confiado en mí para ser parte de su laboratorio, por sus consejos acertados y enseñanzas enriquecedoras. Por ser su impulso inquebrantable durante todo el proyecto, y por sobre todo por su inefable amistad.

A Lupita que me brindó apoyo absoluto, respaldo constante y amor incondicional, he hizo que disfrutara aún más de este trabajo.

*A mis padres*

*Por enseñarme a esforzarme al máximo,  
Por exhortarme a seguir mis sueños,  
Por inculcarme curiosidad,  
Por confiar en mí,  
Por creer en mí.*

# ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	8
II. ANTECEDENTES	9
1. <i>kay</i> : descubrimiento, complejidad génica y estructural	9
2. Funciones de <i>kay</i> durante el desarrollo	11
2.1. Ovogénesis	11
2.2. Embriogénesis	13
2.3. Cerrado torácico durante la metamorfosis	14
3. El ojo compuesto de la mosca de la fruta	15
3.1. Estructura externa de los omatidios	15
3.2. Estructura interna de los omatidios	16
4. El disco ojo-antena es el precursor del ojo	17
5. Funciones conocidas de <i>kay</i> en el desarrollo del ojo	19
III. JUSTIFICACIÓN	21
IV. HIPÓTESIS	22
V. OBJETIVOS	22
VI. METODOLOGÍA	23
1. Materiales	23
2. Reactivos	23
3. Equipos	24
4. Cromosomas y líneas de moscas utilizadas	24
5. Recombinación de alelos de <i>kay</i> con el sistema <i>FLP/FRT</i>	26
6. Generación de mosaicos genéticos en el ojo	28
7. Generación de clones marcados con proteínas fluorescentes	29
8. Generación de líneas de moscas que expresan RNAi para <i>kay</i> en el ojo	30
9. Análisis histológico en el microscopio confocal	31
10. Fijación de ojos con clones mutantes	32
11. Corte y observación de ojos adultos	33
12. Microscopía electrónica de barrido	34
13. Análisis estadístico	35
VII. RESULTADOS	36
1. Los individuos mutantes de <i>kay</i> presentan defectos en el ojo	36

2.	Las moscas que expresan RNAi contra <i>kay</i> no muestran defectos	40
3.	La formación de la ultraestructura externa del ojo requiere de Kay	41
4.	Los mutantes de <i>kay</i> presentan defectos en las células pigmentadas	45
5.	Los clones mutantes tienen fotorreceptores faltantes o malformados	45
6.	<i>kay</i> se requiere para la diferenciación o supervivencia de todos los fotorreceptores externos	48
VIII. DISCUSIÓN		50
1.	La regulación diferencial de los transcritos de <i>kay</i> puede explicar la diferencia de fenotipos entre alelos	50
2.	Todos los fotorreceptores externos requieren de <i>kay</i>	51
3.	<i>kay</i> se requiere en todos los linajes celulares del ojo	52
4.	<i>kay</i> regula la formación de los pezones corneales	53
5.	Kay podría actuar como mediador de la vía de Dpp en el ojo	53
IX. CONCLUSIONES		55
X. PERSPECTIVAS		56
XI. REFERENCIAS		57
XII. ÍNDICE DE FIGURAS		70
XIII. ANEXOS		71

## I. INTRODUCCIÓN

*Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) es un modelo ampliamente utilizado en el estudio del desarrollo de los organismos, y el ojo es uno de los órganos más fáciles de examinar debido a su fácil accesibilidad y su estructura altamente organizada. Durante las últimas décadas, se ha investigado ampliamente la formación del ojo y se han identificado muchos de los mecanismos y redes de genes involucrados en este proceso. A pesar de esto, la complejidad del ojo hace que todavía haya mucho por comprender. Aunque se conocen los genes principales necesarios para la formación del ojo, todavía se desconoce cómo interactúan con otros genes o vías de señalización.

Estudiar un sistema que se comprende relativamente bien ayuda a conocer mejor las acciones que un gen específico puede tener en su desarrollo. Este proyecto tiene como objetivo sentar las bases necesarias para identificar las posibles funciones de *kayak* (*kay*) en desarrollo del ojo.

*kay* es un gen bastante bien caracterizado debido a que es el único homólogo de los genes *fos* de vertebrados en *Drosophila* (Perkins et al., 1990; Riesgo-Escovar & Hafen, 1997a). En la mosca su función se ha estudiado, mayoritariamente, durante la embriogénesis, donde es fundamental para que se lleve a cabo el cerrado dorsal. Esto hace que los mutantes de pérdida de función de *kay* sean letales embrionarios lo que dificulta su estudio en etapas más tardías del desarrollo. Sin embargo, el desarrollo de técnicas que permiten generar clones de células homocigotas mutantes en tejidos adultos concretos, permitió que se empezaron a estudiar los efectos de *kay* en eventos tardíos del desarrollo.

Se ha demostrado que *kay* tiene efectos pleiotrópicos, ya que es esencial para diversos procesos embrionario e interviene en al menos dos vías de señalización, en la vía de la cinasa de Jun (JNK) y la de Dpp (Riesgo-Escovar & Hafen, 1997a; Dequier et al., 2001; Alfonso-Gonzales & Riesgo-Escovar, 2018). Asimismo, se sabe que el locus que lo codifica produce al menos cinco isoformas distintas (Hudson & Goldstein, 2008). Todo ello hace que el estudio de *kay* sea capaz de proporcionar valiosa información sobre los procesos que rigen el desarrollo.

## II. ANTECEDENTES

### 1. *kay*: descubrimiento, complejidad génica y estructural

En 1984 se publicó un estudio en el que utilizaron metanosulfonato de etilo (EMS) para generar mutaciones que permitieron identificar genes necesarios para el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*. En este estudio se describieron dos alelos mutantes de un gen que causaban un fenotipo de apertura dorsal. A este gen se le denominó *kayak* (*kay*) y a los alelos mutantes *kay*<sup>1</sup> y *kay*<sup>2</sup> (Jürgens et al., 1984). Después de esta publicación, que también describió los loci *canoea* y *punt*, inició una tradición de nombrar a los mutantes con fenotipo de apertura dorsal como pequeñas embarcaciones. Posteriormente Perkins et al., (1990) utilizando cDNAs de *c-fos* y *c-jun* como sondas para amplificar transcritos de *D. melanogaster* y a partir de ellos localizar los genes que los codifican. Así identificaron dos genes a los que llamaron *dfra* (*Drosophila fos related antigen*) y *djra* (*Drosophila jun related antigen*). Además, demostraron que las proteínas codificadas por *dfra* y *djra*, al igual que c-Fos y c-Jun, forman el heterodímero denominado «Activation Protein 1» (AP-1), el cual es un factor de transcripción que se une al DNA.

En estudios posteriores, se demostró que *dfra* identificado previamente por Perkins et al., (1990) es en realidad *kay*. Riesgo-Escovar & Hafen, (1997a) rescataron el fenotipo de apertura dorsal de embriones homocigotos para los alelos *kay*<sup>1</sup> y *kay*<sup>2</sup> al expresar el cDNA de *dfra* en el ectodermo embrionario. Además, Zeitlinger et al., (1997) reportaron que embriones homocigotos de *kay*<sup>1</sup> no expresan la proteína Kay.

Como cabría esperar, los mutantes de *kay* tienen un fenotipo similar al de mutantes de *Jra* (*djra* fue renombrado como *Jra*), en el cerrado dorsal embrionario, ya que ambos se requieren para este proceso (Riesgo-Escovar et al., 1996; Riesgo-Escovar & Hafen, 1997a; Zeitlinger et al., 1997).

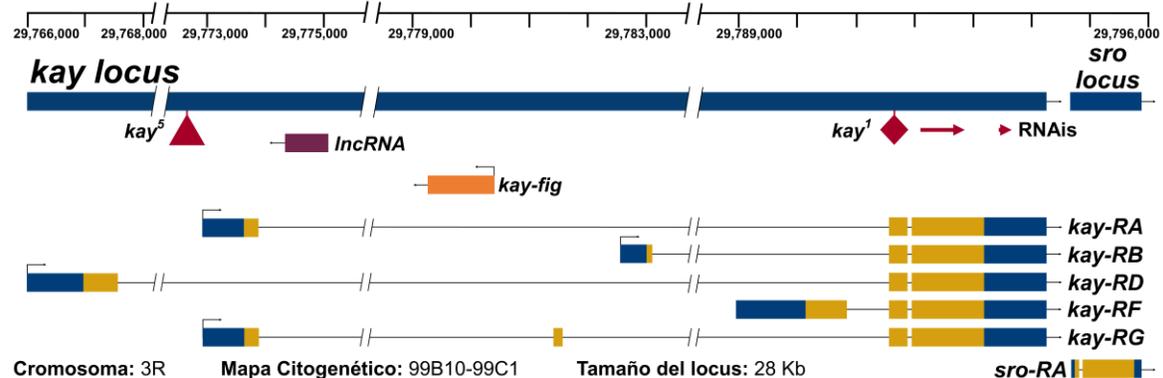
Además de formar heterodímeros con *Jra*, Kay puede formar homodímeros o heterodímeros con otras proteínas *in vitro*, tal como se reporta en el estudio de Perkins et al., (1990). Estos hallazgos, en conjunto con los diferentes fenotipos mutantes descritos, sugieren que *kay* podría tener múltiples funciones en el desarrollo. Sin embargo, los experimentos en los que se detecta la proteína o el

transcrito muestran que su expresión no es ubicua, sino que se limita a los tejidos donde cumple una función (Alfonso-Gonzales & Riesgo-Escovar, 2018).

El locus *kay* en *D. melanogaster* es complejo; se conocen tres sitios de inicio de la transcripción diferentes, exhibe empalme «splicing» alternativo (Figura 1). Esto da lugar a cinco diferentes transcritos (*kay-RD*, *kay-RA*, *kay-RG*, *kay-RB*, *kay-RF*) y un sexto transcrito que incluye un exón del gen vecino *shroud* (*sro*) que pueden regularse independientemente (Hudson & Goldstein, 2008). Además, en el locus se localizan otras dos unidades de transcripción: *fos intronic gene* (*fig*), que codifica para una fosfatasa de serina-treonina (PP2C) evolutivamente conservada pero no caracterizada y un RNA largo no codificante (*CR46110*), ambos anidados en el segundo intrón de *kay* (Hudson et al., 2007; Hudson & Goldstein, 2008).

La secuenciación de 12 genomas de especies de la familia *Drosophilae* mostró que la organización genómica del locus de *kay* con el gen intrónico *fig* está conservada. Esto sugiere un papel evolutivamente conservado para *fig* y *kay* (Hudson et al., 2007). Hasta la fecha, no se ha probado que Fig o alguna otra fosfatasa desfosforile a Kay. Por ende, hasta ahora no hay evidencia que indique que *fig* pueda interactuar con *kay*.

Todos los transcritos de *kay* comparten dos exones 3' y tienen exones 5' variables. Los dos exones de la región 3' contienen un dominio bZip conservado evolutivamente, compuesto por una región básica (b) que se une al DNA y un dominio de «zipper» de leucina (Zip) que permite la unión proteína-proteína (Larkin et al., 2021). Algunas isoformas se regulan diferencialmente y parecen tener



**Figura 1:** El locus de *kay* se encuentra el brazo derecho del tercer cromosoma, tiene alrededor de 30 Kb, seis exones, cinco intrones y dos genes anidados (*fig* y un RNA largo no codificante). Codifica para cinco isoformas. En las isoformas el amarillo señala las secuencias codificantes (marcos de lectura abiertos) y lo azul las zonas no codificantes (secuencias líder y tráiler). El locus de *sro* está justo al lado de *kay*. Triángulo señala el lugar donde está insertado el elemento P que produce la mutación de *kay<sup>5</sup>*, el rombo señala el lugar donde el codón de paro que produce la mutación de *kay<sup>1</sup>*. Las flechas señalan los sitios contra los cuales interfiere un RNAi. Modificado de Larkin et al., (2021).

funciones independientes. Las dos primeras estudiadas (*kay-RA* y *kay-RB*) tienen diferentes patrones de expresión durante la ovogénesis, pero similar durante la embriogénesis (Souid & Yanicostas, 2003). Estudios posteriores han mostrado regulación diferencial para otras isoformas (Hudson & Goldstein, 2008; Alfonso-Gonzales, 2018; Larkin et al., 2021).

En mamíferos, la estructura proteica generada por los dominios bZip están bien caracterizados. El dominio de «zipper» de leucina forma una hélice  $\alpha$  que tiene un residuo de leucina cada cuatro residuos de aminoácidos, de manera que se puede unir a otra semejante por estos residuos, formando un «zipper» de leucina. El dominio básico se une a secuencias del DNA llamadas sitios AP-1 (Glover & Harrison, 1995; Yin et al., 2017). *Kay* también se une al DNA. Aunque no se han realizados estudios sobre la estructura proteica de *Kay*, predicciones hechas por «AlphaFold» sugieren que la estructura del bZip de *Kay* es muy similar a la de mamíferos (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022).

## **2. Funciones de *kay* durante el desarrollo**

El ciclo de vida *D. melanogaster* es holometábolo, lo que significa que experimenta una metamorfosis completa en la que pasa por una etapa larval y luego se desarrolla en un adulto, también conocido como imago. Durante el desarrollo *kay* es necesario para muchos eventos. Se ha demostrado que es necesario para la ovogénesis, el cerrado dorsal de los embriones, el cerrado torácico, la formación del intestino embrionario y larval. Además, hay evidencias de que *kay* también interviene en la formación del ojo y del ala imagal.

### **2.1. Ovogénesis**

La primera etapa del desarrollo donde *kay* se requiere es durante la ovogénesis. Los ovocitos en las moscas se forman a partir de células germinales totipotenciales de los germarios localizadas en la base de estructuras compuestas por hileras de folículos en desarrollo llamadas ovariolas que en conjunto constituyen los ovarios. Para que una célula germinal que inicia su diferenciación se convierta en un ovocito maduro listo para ser fecundado que ocurran muchos procesos celulares que no sólo implican a la línea germinal, sino también a células somáticas foliculares. Estos procesos incluyen el ciclo celular, la diferenciación, la polarización celular y la

morfogénesis epitelial, entre otros (Bastock & St Johnston, 2008). *kay* se expresa tanto en células foliculares como en células de la línea germinal (Dequier et al., 2001).

Durante las primeras etapas de la ovogénesis algunas células somáticas de la gónada se diferencian en células somáticas foliculares que rodean a las células germinales que se separan del resto de las células germinales totipotenciales y empiezan su diferenciación. Por su parte, una célula germinal experimenta cuatro rondas de divisiones nucleares, para formar un sincicio con 16 células parcialmente divididas unidas por canales en forma de anillo. En este proceso, un grupo de células foliculares externas, las «border cells», migran desde el polo anterior del folículo hacia la dirección posterior. Estas células son esenciales para que se desarrolle el folículo ovárico y su migración depende de *kay* (Montell, 1994; Niewiadomska et al., 1999; Dequier et al., 2001).

Una de las células del sincicio producirá un ovocito y las restantes generarán 15 células nodrizas y un futuro ovocito. A mitad de la ovogénesis, las células nodrizas drenan su citoplasma, también llamado plasma germinal, hacia el ovocito. Este plasma contiene nutrientes, proteínas y RNA, todos ellos necesarios para el desarrollo y crecimiento del ovocito. Finalmente, los restos de las células nodrizas sufren apoptosis (Extavour & Akam, 2003; Kloc et al., 2004; Bastock & St Johnston, 2008). *kay* es necesario para que las células nodrizas mueran, para la maduración correcta del ovocito y para que éste pueda ser fecundado (Dequier et al., 2001; Klein et al., 2016).

Durante los procesos descritos anteriormente *kay* es regulado por varias vías. Por ejemplo, en las células foliculares por la vía de *Wg* y la vía de *Dpp* (Dequier et al., 2001; Dobens et al., 2001). Por otro lado, en las células germinales, se sintetiza un RNA llamado piRNA que interactúa con Piwi. Los piRNA se unen a Piwi y median la represión que éste hace en transposones de la línea germinal (Cenik & Zamore, 2011). Se ha demostrado que el piRNA generado a partir de fragmentos de la región 5' del mRNA de *kay* es necesario para la maduración adecuada del ovocito (Klein et al., 2016).

### **2.1.1. Apéndices respiratorios**

Las células foliculares que rodean al ovocito forman los apéndices respiratorios. El destino de estas células foliculares que darán lugar a los apéndices es regulado por las vías de Dpp y de las MAP cinasas (Neuman-Silberberg & Schüpbach, 1993; Twombly et al., 1996). Estas células se alargan y doblan hasta formar un tubo tridimensional (Dorman et al., 2004; Boyle et al., 2010). Kay y Jra, como heterodímero AP-1, regulan la expresión de genes necesarios para la reorganización de estas células foliculares (Dequier et al., 2001; Dobens et al., 2001; Suzanne et al., 2001; Tran & Berg, 2003; Boyle et al., 2010).

## **2.2. Embriogénesis**

La embriogénesis en *D. melanogaster* es un proceso altamente coordinado que ocurre en 24 horas a 25°C donde Kay es requerido en múltiples ocasiones. La expresión de *kay* durante la embriogénesis es dinámica. Comienza siendo generalizada; luego se concentra en la amnioserosa, más adelante en el epitelio lateral, especialmente en las células de la hilera guía y finalmente en el endodermo (Perkins et al., 1990; Riesgo-Escovar & Hafen, 1997a; Zeitlinger et al., 1997; Szüts & Bienz, 2000; Reed et al., 2001). Además, al menos algunas isoformas de *kay* tienen patrones de expresión diferenciados (Souid & Yanicostas, 2003).

El requerimiento más temprano conocido de *kay* durante la embriogénesis es la regulación de la expresión de *Ance* (*Angiotensin converting enzyme*). La expresión de *Ance* depende de la señalización por Dpp y también de Kay, por lo que se ha hipotetizado que Dpp podría inducir la transcripción de *kay* y éste por sí mismo o junto a Dpp regular la expresión de *Ance* (Riesgo-Escovar & Hafen, 1997a).

### **2.2.2. Cerrado dorsal**

Durante la embriogénesis tardía, la banda germinal se retira de la región dorsal del embrión dejando al descubierto las células de la amnioserosa. Este es el momento en que comienza el proceso de cerrado dorsal. El epitelio lateral que rodea a la amnioserosa se estira dorsalmente y cambia de forma. Mientras tanto, la amnioserosa pulsa y genera la fuerza necesaria para que se produzca el cerrado dorsal. Finalmente, la amnioserosa es englobada por el epitelio lateral y termina por sufrir muerte celular. Al mismo tiempo, las células de la hilera guía, ubicadas en los

bordes del epitelio lateral, se juntan como en una cremallera, cerrando el hueco en el dorso del embrión (Rios Barrera & Riesgo-Escovar, 2013; Pasakarnis et al., 2016; Hayes & Solon, 2017).

En los embriones mutantes de *kay* no se produce el cerrado dorsal o es parcial si el alelo es hipomorfo, como *kay*<sup>2</sup>. Se sabe que Kay se requiere en este proceso al menos en dos ocasiones: primero, durante el inicio del cerrado dorsal, donde junto con Jra, y regulado por la vía de JNK, regula la expresión de genes en las células de la hilera guía que en parte promueven la formación de una red supracelular de actinmiosina en la hilera-guía (Riesgo-Escovar & Hafen, 1997a; Reed et al., 2001; Ciapponi & Bohmann, 2002; Hayes & Solon, 2017). Jra y Kay también inducen la expresión de *dpp*. Después, bajo el control de la vía de Dpp, *kay* se expresa en las células epiteliales laterales ventrales a las células de la hilera guía en un gradiente de la región dorsal a ventral (Riesgo-Escovar & Hafen, 1997a).

### **2.2.3. Especificación del endodermo y las células “de cobre”**

Durante la embriogénesis el intestino se diferencia a partir del endodermo. Uno de los tipos de células en ese tejido son las células «de cobre». Para que éstas se diferencien requieren de la expresión del gen homeótico *labial (lab)* (Hoppler & Bienz, 1994). Las células del mesodermo vecino liberan Dpp, que induce la expresión de *kay* en el endodermo, y en algunas de estas células Kay induce la expresión de *lab* (Tremml & Bienz, 1992; Riese et al., 1997; Riesgo-Escovar & Hafen, 1997a; Szüts & Bienz, 2000). Kay también regula la expresión de *lab* en las células “de cobre” del intestino medio en los primeros estadios larvarios. En estos procesos, y a diferencia de lo descrito para el cerrado dorsal, Kay actúa independiente de Jra (Riese et al., 1997; Szüts & Bienz, 2000).

### **2.3. Cerrado torácico durante la metamorfosis**

La mayoría de las estructuras adultas de la mosca derivan de discos imagales, que están compuestos por tres tipos de células: un epitelio pseudoestratificado llamado «disco propio» del cual se derivan las estructuras adultas, un epitelio de células escamosas denominado epitelio peripodial que recubre el disco por una cara y una tira de células columnares en el margen entre ambos epitelios que conecta el disco

a su región de anclaje, ya sea el tegumento u otra estructura (Weasner & Kumar, 2022).

Durante la metamorfosis los discos imagales de ala se fusionan en un proceso llamado «cerrado torácico» para formar el tórax dorsal de la mosca adulta. En este proceso, dos capas epiteliales provenientes de discos opuestos cambian de forma, se extienden y finalmente se unen en la línea media dorsal del tórax (Noselli & Agnès, 1999; Tripathi & Irvine, 2022). Al igual que en el cerrado dorsal embrionario este proceso es controlado por la vía de JNK y también por *kay*. Los individuos mutantes de *kay* y de otros miembros de la vía de JNK presentan un fenotipo de «tórax abierto» donde el tórax dorsal tiene hendiduras en la línea media y en los casos más extremos los defectos se pueden observar en la cabeza y en el abdomen (Glise et al., 1995; Riesgo-Escovar & Hafen, 1997a; Noselli & Agnès, 1999; Zeitlinger & Bohmann, 1999; Calleja et al., 2000).

### **3. El ojo compuesto de la mosca de la fruta**

El ojo imagal o adulto de *D. melanogaster* es un ojo compuesto, constituido por alrededor de 750 unidades llamadas omatidios. Estos se ordenan en 32-34 columnas. Los ojos de las hembras son ligeramente más grandes y tienen aproximadamente 50 omatidios más que los de los machos (Wolff & Ready, 1993; Mishra & Knust, 2019).

#### **3.1. Estructura externa de los omatidios**

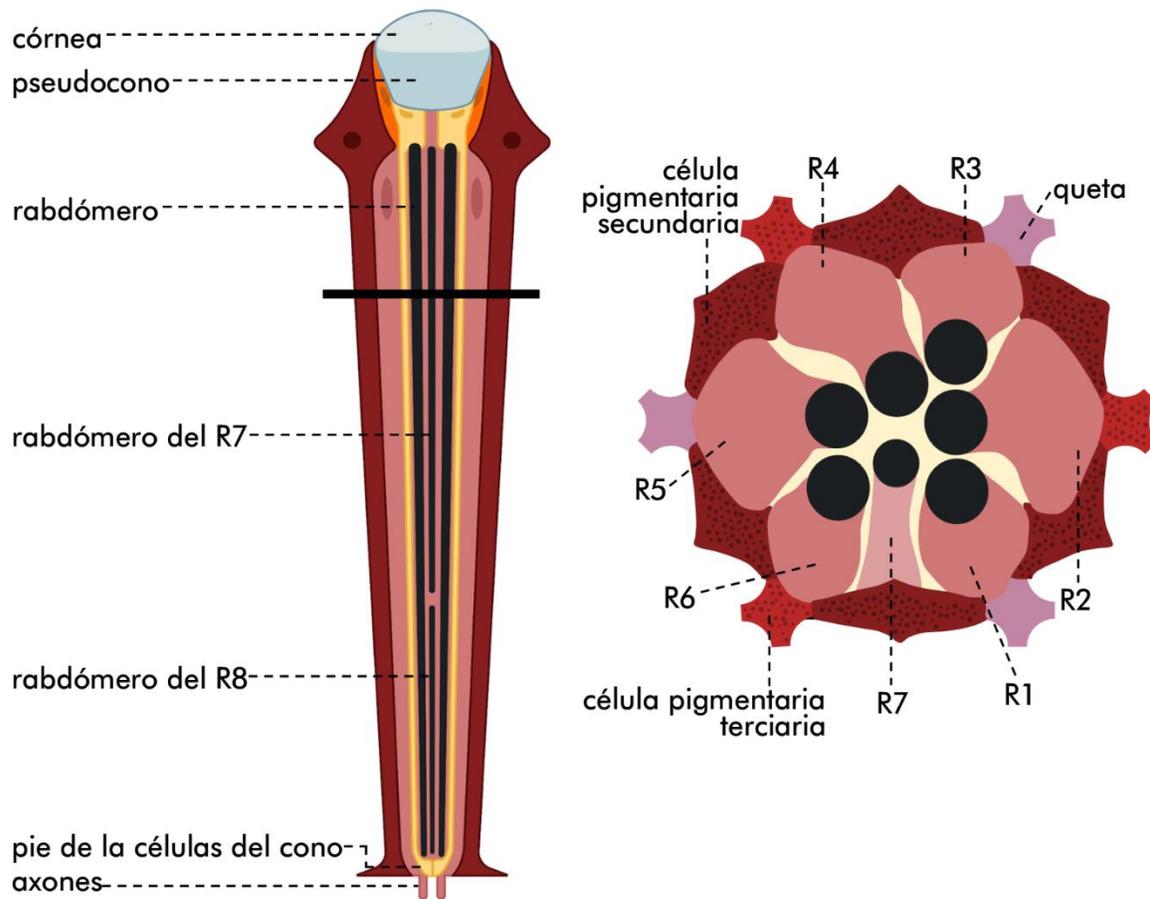
Al observar con microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés «Scanning Electron Microscopy») el ojo de *D. melanogaster*, se observan las córneas de los omatidios y las quetas mecanorreceptoras. Las córneas son convexas y tienen una forma hexagonal; además en tres vértices alternos del hexágono se observan quetas mecanorreceptoras (Stumm-Tegethoff & Dicke, 1974; Cagan & Ready, 1989).

Las córneas de muchos insectos están tapizadas por estructuras nanométricas denominadas pezones corneales debido a su forma. La presencia y organización de estas estructuras disminuye el índice de reflexión de la córnea. Los patrones de distribución de los pezones en las córneas son específicos de especies o grupos. *D. melanogaster* en particular muestra patrones pseudorregulares con pezones con

un diámetro de alrededor de 200 nm (Bernhard & Miller, 1962; Bernhard et al., 1963; Kryuchkov et al., 2011; Blagodatski et al., 2015; Kryuchkov et al., 2020).

### 3.2. Estructura interna de los omatidios

Cada omatidio, la unidad básica de ojo compuesto, está formado por 19 células, ocho de las cuales son fotorreceptores y 11 son células accesorias (Figura 2). Estas últimas incluyen células del cono, células pigmentadas que rodean y delimitan cada omatidio, así como quetas mecanorreceptoras. Los fotorreceptores (células R) morfológicamente se dividen en dos grupos: los fotorreceptores externos (R1 a R6) y los fotorreceptores internos (R7 y R8). Por su origen los fotorreceptores externos se pueden dividir en dos grupos: R2/3/4/5, que se diferencian después del paso de surco morfogénico y R1/6, que se diferencian después de la segunda ola mitótica. (Wolff & Ready, 1993; Mishra & Knust, 2019).



**Figura 2:** Esquema de la configuración de un omatidio. A la izquierda una sección longitudinal donde se puede observar que el rabdómero del R7 se encuentra sobre el del R8 en una posición central. A la derecha, esquema de un corte histológico sagital al nivel de la línea en el esquema de la izquierda. En negro los rabdómeros de los fotorreceptores.

La organización de los fotorreceptores en el omatidio forma un trapecioide asimétrico. El trapecioide está formado por los rabdómeros (región fotosensible) del R1 al R6, el rabdómero del R3 forma el vértice del rabdómero. A diferencia de los fotorreceptores externos, que se extienden a toda la longitud del omatidio, el rabdómero del R7 está por encima del rabdómero del R8. La sección longitudinal y transversal de los rabdómeros del R7 y R8 también es más pequeña que la de los fotorreceptores externos (Wolff & Ready, 1993; Mishra & Knust, 2019; Weasner & Kumar, 2022).

Los rabdómeros son las estructuras más importantes de los fotorreceptores, ya que concentran el 90% de la membrana plasmática de estas células. Cada rabdómero contiene alrededor de 60,000 microvellosidades y es en las membranas de estas estructuras donde se inserta la opsina, el pigmento fotosensible que permite la detección de luz (Wolff & Ready, 1993).

Los omatidios presentan una organización especular. En la mitad dorsal del ojo los omatidios orientan el trapecioide hacia la región dorsal y en la mitad ventral el R3 apunta ventralmente. El límite entre la mitad dorsal y ventral del ojo se denomina ecuador. Además, los omatidios del ojo izquierdo están orientados especularmente en relación con los del ojo derecho (Wolff & Ready, 1993).

#### **4. El disco ojo-antena es el precursor del ojo**

La mayor parte del dorso de la cabeza, incluido el ojo, deriva del disco imagal ojo-antena (Krafka, 1924; Chen, 1929). La especificación del ojo está bajo el control de una serie de factores de transcripción y se da en el disco propio (Kumar, 2010; Davis & Rebay, 2017).

Durante el desarrollo embrionario, entre seis y 23 células del ectodermo dorsolateral se agrupan para formar el primordio del disco ojo-antena (García-Bellido & Merriam, 1969). Durante el primer estadio larvario, estas células se dividen y se invaginan para formar una estructura en forma de saco. Las células que forman uno de los lados del saco se convertirán en el disco propio, mientras que las células del otro lado se formarán el epitelio peripodial (Wolff & Ready, 1993).

Durante el desarrollo larvario temprano, el disco ojo-antena crece en tamaño, sin que haya diferenciación celular. Es hasta el inicio del tercer estadio larvario cuando inicia la diferenciación de los fotorreceptores (Wolff & Ready, 1993). En el margen

posterior del disco de ojo se forma el surco morfogenético que es una ola de diferenciación formada por un cambio de forma transitoria de las células del disco propio. Este surco se observa porque se reduce el eje longitudinal de las células y se «mueve» de las más posteriores a las anteriores, como el fenómeno de las “olas” que realiza el público en las gradas de los estadios durante eventos deportivos (Ready et al., 1976; Tomlinson & Ready, 1987; Weasner & Kumar, 2022).

Las células del margen liberan Hedgehog (Hh) que induce la liberación de Dpp. Esto a su vez reprime la expresión de *wingless* (*wg*), permitiendo así la iniciación del surco morfogenético (Domínguez & Hafen, 1997). Una vez que el surco avanza algunas de las células posteriores a éste se agrupan en «preclusters» de cinco células. De ellas, una se diferencia en R8 y libera Hh, lo que a su vez activa la transcripción de *dpp* en las células indiferenciadas del surco morfogenético. La señalización de Hh y Dpp es necesaria tanto para iniciar como para avanzar el surco, ya que Dpp provoca que el ciclo celular se detenga en las células delante del surco y desencadena otros procesos que contribuyen a que el surco continúe moviéndose en el disco propio (Heberlin et al., 1993; Ma et al., 1993; Pan & Rubin, 1995; Penton et al., 1997; Horsfield et al., 1998).

Después de la formación de los «preclusters» dos células se diferencian en R2/5 y luego las dos restantes en R3/4. En respuesta a la secreción de Spitz (Spi) por el R8. Spi es un ligando de la vía de las MAPK y desencadena la activación de la vía de las MAPK en las células que dan origen al R2, 3, 4 y 5 (Freeman, 1994; Tio et al., 1994; Spencer et al., 1998). Luego todas las células indiferenciadas alrededor de los «preclusters» se dividen una última vez formando una segunda ola mitótica en la que se generan los precursores del resto de las células que compondrán el omatidio (Wolff & Ready, 1993). Después de la segunda ola mitótica dos células se diferencian en R1/6 de nuevo bajo la activación de la vía de las MAPK por Spi (Tomlinson & Ready, 1987; Dominguez et al., 1998). La activación de la vía de las MAPK permite que una célula indiferenciada aledaña al «cluster» se diferencie en R7, sin embargo, pero a diferencia de los fotorreceptores externos, no es activada por Spi. En su lugar Bride of Sevenless (Boss), una proteína de membrana expresada en el R8 activa el receptor de membrana con actividad de tirosina cinasa Sevenless (Sev) que a su vez activa la vía de las MAPK (Banerjee et al., 1987;

Hafen et al., 1987; Reinke & Zipursky, 1988; Simon et al., 1989; Simon et al., 1991; Kramer et al., 1991; Biggs et al., 1994; Brunner et al., 1994). Este es uno de los mejores ejemplos de cómo la interacción física de dos células a través de ligandos y receptores acoplados a la membrana produce comunicación entre células y activa vías de transducción en la célula receptora.

Al final del estadio larvario las células del cono se agregan a los omatidios que ya contienen las ocho células fotorreceptoras. Mas tarde, durante el inicio del estado pupal, se diferencian las células pigmentadas y al final del del estadio pupal se formará la única estructura clonal del ojo cuando se recluten células denominadas precursoras de órgano sensorial; cada una se dividirá dos veces para formar cuatro células. Una de ellas se diferenciará en una neurona, otra en una célula glial y las dos restantes en células que secretarán la cutícula que formará la base de la queta mecanorreceptora «socket» y la queta o sensilia, finalmente estas dos células sufrirán apoptosis (Ready et al., 1976; Tomlinson & Ready, 1987; Meserve & Duronio, 2017). La célula que secreta el «socket» se le denomina tormógena y la que secreta la queta se le denomina tricógena.

## **5. Funciones conocidas de *kay* en el desarrollo del ojo**

La función de *kay* en el desarrollo del ojo es controversial. Se han realizado estudios con RNAi, y construcciones que sobre-expresan una proteína trunca, pero ningún resultado se ha corroborado con experimentos de pérdida de función.

Se ha reportado que la sobreexpresión de Fos-bZip, una proteína trunca con el dominio bZip de Kay, así como la expresión ectópica de RNAi contra *kay*, generan defectos en el desarrollo del ojo (Cerrato, et al., 2006; Hyun et al., 2006; Franciscovich et al., 2008; Weber et al., 2008). Los estudios con Fos-bZip sugieren que Kay interactúa con miembros de la vía de JNK para establecer la polaridad planar en el disco de ojo (Fanto et al., 2000; Weber et al., 2008). Esto sugiere que Kay actúa como dímero con Jra, al igual que en el cerrado dorsal.

Sin embargo, estudios realizados en individuos con alelos de pérdida de función de *Jra* y en genes que codifican para otros miembros de la vía de JNK, no presentan fenotipos mutantes; las células homocigotas mutantes tienen un fenotipo silvestre en el ojo, lo que descarta la propuesta de que la vía de JNK interviene en la formación del ojo y sugiere que *kay* no está río abajo de la vía JNK en la formación

del ojo (Riesgo-Escovar et al., 1996). Posteriormente, *kay* fue propuesto como un efector de la vía de las MAPK (Ciapponi et al., 2001; Weber et al., 2008). Sin embargo, esta propuesta también se basó en la sobreexpresión de dominantes negativos. Además, algunos de los fenotipos encontrados con experimentos de sobreexpresión se pueden deber a que la vía de JNK se activa cuando hay daño al DNA (Luo et al., 2007). En conclusión, a partir de los datos reportados no se puede saber con certeza si Kay interviene en la formación del ojo. Sin embargo, datos no publicados de nuestro laboratorio sugieren que la falta de función de Kay afecta el desarrollo del ojo.

### III. JUSTIFICACIÓN

El estudio del desarrollo nos ha brindado un entendimiento más profundo sobre la formación de tejidos, órganos y sistemas, en general comprender mejor el funcionamiento de los organismos. En particular, ha sido esencial para descubrir los mecanismos que regulan la expresión génica y, por ende, la manera en que la información en el DNA se traduce en la formación de los organismos. *D. melanogaster* se ha convertido en uno de los modelos más destacados en el campo de biología del desarrollo debido a su facilidad de cultivo y a las múltiples técnicas desarrolladas a lo largo de más de 100 años de estudio de este modelo.

*kay* es un gen dinámicamente regulado y conocido por su implicación en diversos procesos del desarrollo, lo que lo convierte en un gen pleiotrópico. Se ha demostrado que Kay participa en la vía de la cinasa de Jun, donde actúa como efector en forma de heterodímero con Jra. Sin embargo, se ha observado que Kay también actúa de forma independiente de Jra en algunos procesos del desarrollo, como es el caso de la formación del ojo (J. Riesgo-Escovar, datos no publicados). A pesar de ello, todavía se desconocen en detalle los requerimientos de *kay* en la formación del ojo. Por lo tanto, este proyecto propone estudiar los efectos que mutaciones de pérdida de función de *kay* producen en el desarrollo del ojo de *D. melanogaster*.

## **IV. HIPÓTESIS**

*kay* es necesario para el desarrollo adecuado del ojo compuesto de *D. melanogaster*.

## **V. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar los fenotipos de alelos mutantes de *kay* en el desarrollo del ojo compuesto de *D. melanogaster*.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Elaborar líneas de moscas con alelos mutantes de *kay* recombinados con el sistema *FLP/FRT*.
2. Generar y caracterizar mosaicos genéticos con mutantes de *kay* en el ojo compuesto de *D. melanogaster*.
3. Analizar la histología de los omatidios del ojo compuesto de *D. melanogaster* con clones de diferentes alelos de *kay*.
4. Estudiar mediante microscopía electrónica de barrido el fenotipo externo de clones mutantes para *kay* en ojos de moscas adultas.

## **VI. METODOLOGÍA**

### **1. Materiales**

- Aguja de disección
- Bases para montar objetos para microscopía electrónica de barrido
- Cápsulas de infiltración para resina marca Beem
- Cubreobjetos
- Cuchillas para afeitar
- Etiquetas con pegamento para microscopía de barrido de carbón
- Frascos de vidrio con tapa de 1 ml
- Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu$ l
- Navajas de cristal para microtomo
- Pinzas de disección
- Pipetas Pasteur de cristal
- Portaobjetos normales y excavados
- Puntas de micropipetas
- Software FIJI (Schindelin et al., 2012)
- Software iVision (BioVision Technologies, Inc, 2006)
- Software ZEN 3.4 (Carl Zeiss Microscop, 2016)
- Software Prism9 (GraphPad Software, 2021)

### **2. Reactivos**

- Acetona
- Agarosa
- Azul de toluidina al 1% en agua
- Buffer de cacodilatos ( $C_2H_6AsNaO_2$ ), pH = 7.0
- Glutaraldehído al 50% en agua
- Medio de montaje Entellan
- Pegamento de carbón para microscopía electrónica de barrido
- Resina Spurr
- Tetraóxido de Osmio ( $OsO_4$ ) al 2% en buffer de cacodilatos

### 3. Equipos

- Microscopio confocal Zeiss LSM780
- Microscopio electrónico de barrido marca JEOL JSM-6060
- Microscopio estereoscópico binocular
- Microscopio óptico compuesto marca Nikon modelo Eclipse e600
- Microtomo marca Leica RM2265
- Parrilla caliente
- Procesador de tejidos automático marca Leica
- Secador de punto crítico automatizado Leica EM CPD300

### 4. Cromosomas y líneas de moscas utilizadas

Los cromosomas balanceadores son cromosomas que contienen múltiples inversiones que evitan la recombinación con el cromosoma homólogo durante la meiosis. Las líneas utilizadas poseen los balanceadores *TM3* y *TM6*, que están marcados con alelos mutantes de *Ubx* y *Ser*, respectivamente. Las moscas con alelos mutantes de *Ubx* tienen halterios más grandes, mientras que los de *Ser* tienen alas aserradas. Los múltiples cambios en los cromosomas balanceadores también generan mutaciones que en homocigosis son letales, lo que impide que se desarrollen moscas homocigotas de los balanceadores. Esto permite mantener la mutación estudiada en heterocigosis. Como ambos cromosomas son homocigotos letales, se obtiene una cepa que consiste únicamente de heterocigotos y que es estable.

- $y^1, w^{1118}; \frac{FRT82, kay^1}{TM3, Sb^1, Ser^1}$

Esta línea contiene los alelos  $y^1$  y  $w^{1118}$  en el cromosoma X. También contiene en uno de los cromosomas 3 la secuencia blanco de recombinación *FRT* (*Flipase Recognition Target*) en la posición 82 del brazo derecho del tercer cromosoma, y un alelo mutante de *kay* producido, entre otras lesiones, por una mutación puntual en la posición 1045 (Figura 1) de la secuencia de *kay* que produce un codón de paro (Riesgo-Escovar & Hafen, 1997a). El otro cromosoma tres es el cromosoma balanceador *Third Multiple three* (*TM3*) que tiene los alelos dominantes *Stubble* ( $Sb^1$ ) y *Serrate* ( $Ser^1$ ).

$$- y^1, w^{1118}; \frac{FRT82, kay^2}{TM3, Ser^1, y^+}$$

Esta línea contiene los alelos de *yellow* ( $y^1$ ) y *white* ( $w^{1118}$ ) en el cromosoma X. También contiene en uno de los cromosomas tres la secuencia blanco de recombinación *FRT82*, y un alelo mutante de *kay* producido por una mutación con EMS no caracterizado molecularmente (Jürgens et al., 1984). El otro cromosoma tres es el cromosoma balanceador *TM3* que tiene el alelo dominante *Ser<sup>1</sup>* y *yellow* (*y*) silvestre.

$$- y^1, w^{1118}; \frac{FRT82, kay^4}{TM3, Ser^1, y^+}$$

Esta línea contiene los alelos  $y^1$  y  $w^{1118}$  en el cromosoma X. También contiene en uno de los cromosomas tres la secuencia blanco de recombinación *FRT82*, y un alelo mutante de *kay* producido por la inserción de un elemento P no caracterizado molecularmente (Bellotto et al., 2002). El otro cromosoma tres es el cromosoma balanceador *TM3* que tiene el alelo dominante *Ser<sup>1</sup>* y *y* silvestre.

$$- y^1, w^{1118}; \frac{FRT82, kay^5}{TM3, Sb^1, Ser^1}$$

Esta línea contiene los alelos  $y^1$  y  $w^{1118}$  en el cromosoma X. También contiene en uno de los cromosomas tres la secuencia blanco de recombinación *FRT82*, y un alelo mutante de *kay* producido por la inserción de un elemento P (Figura 1) insertado antes del segundo intrón de *kay* (Bellotto et al., 2002; Riesgo-Escovar no publicado). El otro cromosoma tres es el cromosoma balanceador *TM3* que tiene los alelos dominantes *Sb<sup>1</sup>* y *Ser<sup>1</sup>*.

$$- y^1, w^{1118}, ey - FLP; \frac{FRT82 arm-lacz}{TM6, Ubx^{P15}}$$

Esta línea contiene los alelos  $y^1$  y  $w^{1118}$  y la inserción de un elemento P con la secuencia de *Flipasa* (*FLP*) bajo el control del enhancer de *eyeless* (*ey*) en el cromosoma X. También contiene en uno de los cromosomas tres la secuencia blanco de recombinación *FRT82* y el gen de *Escherichia coli*, *lacZ* bajo el control del enhancer de *armadillo* (*arm*). Además, tiene el cromosoma balanceador *Third Multiple six* (*TM6*) que tiene un alelo de *Ultrabithorax* (*Ubx*) *Ubx<sup>P15</sup>*.

- $ey - FLP, ninaE - GAL4; UAS - GFP - ninaC; \frac{FRT82, ninaE-tdTomato-ninaC}{TM6, Tb^1}$

Línea con la inserción de cinco elementos P; dos en el cromosoma X, el primero de ellos con la secuencia de *FLP* bajo el control del enhancer de *ey*, el segundo incluye el gen de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) *Gal4* bajo el control del enhancer de *ninaE*. En el segundo cromosoma la inserción incluye el transgen *GFP-ninaC* bajo el control de *UAS* («Upstream Activation Sequence») de *S. cerevisiae*. En uno de los cromosomas tres tiene dos inserciones, una de ellas contiene la secuencia *FRT82* y la otra el transgen *TdTomato-ninaC* bajo el control del enhancer de *ninaE*. Además, en el otro cromosoma tres tiene el *TM6* que tiene el alelo *Tb*<sup>1</sup>. Línea obtenida de centro de cepas de *Drosophila* en Bloomington, código 43348.

- $y^1, v^x; \frac{UAS-kayRNAi}{TM3, Sb^1}$

Esta línea contiene los alelos *y*<sup>1</sup> y de *vermillion* (*v*<sup>x</sup>) en el cromosoma X. Además, en uno de los cromosomas tres tiene la inserción de un elemento P que expresa RNAi contra la secuencia de *kay* bajo el control de *UAS*. El otro cromosoma tres es el cromosoma balanceador *TM3* que tiene el alelo dominante *Sb*<sup>1</sup>.

- $y^1, v^x, sc, sev^{21}; UAS - kayRNAi$

Esta línea contiene los alelos *y*<sup>1</sup>, *v*<sup>x</sup>, *sc*<sup>1</sup> de *scute* y *sev*<sup>21</sup> en el cromosoma X. Además, en el cromosoma tres tiene la inserción de un elemento P que expresa RNAi contra la secuencia de *kay* bajo el control de *UAS*.

- $y^1, w^{1118}; ey - Gal4$

Esta línea contiene los alelos *y*<sup>1</sup> y *w*<sup>1118</sup> en el cromosoma X. En el Cromosoma dos tiene la inserción de un elemento P que expresa *Gal4* bajo el control del enhancer de *ey*.

## 5. Recombinación de alelos de *kay* con el sistema *FLP/FRT*

A excepción de las líneas que portan alelos de *kay*<sup>2</sup> que cultivadas a 18°C generan alrededor del 1% de adultos (Lehmann et al., 2002), con surcos en el tórax (Zeitlinger et al., 1997; Zeitlinger & Bohmann, 1999), todos los individuos homocigotos con las mutaciones en *kay* con las que trabajamos, presentan letalidad

embrionaria. En cambio, en heterocigosis presentan fenotipos silvestres. Por lo tanto, para poder comprobar si la falta de función de este gen en el desarrollo afecta la formación de estructuras generadas después de la embriogénesis, se deben de obtener tejidos homocigotos mutantes en la estructura a estudiar. Una forma de lograr esto es generar clones homocigotos mutantes en un tejido específico. El sistema *FLP/FRT* permite generar recombinación mitótica durante el desarrollo de un órgano imagal y generar clones mutantes y silvestres en este tejido.

Para que este sistema funcione es necesario que el cromosoma que tiene la mutación de *kay* tenga una secuencia *FRT* en la base del brazo del cromosoma en donde está la mutación en estudio. Ya que *kay* se encuentra al final del brazo derecho del tercer cromosoma se recombinaron alelos mutantes de *kay* con una línea con la inserción de una secuencia *FRT* en la posición 82 en la base del brazo derecho del tercer cromosoma (*FRT82*).

Para generar la línea recombinada se hicieron las siguientes cruzas (Figura 3).

Cruzas a detalle:

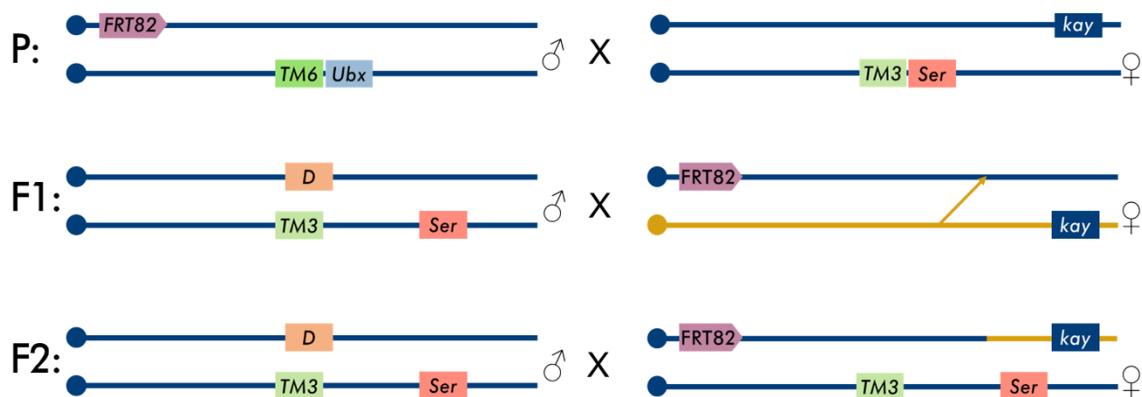
$$\mathbf{P:} y^1, w^{1118}, ey - FLP; \frac{FRT82, arm-lacz}{TM6, Ubx^{P15}} \sigma \times \frac{alelo\ de\ kay}{TM3, Ser^1} \varnothing$$

$$\mathbf{F1:} y^1, w^{1118}; \frac{D^1, gl^1}{TM3, Ser^1} \sigma \times yw ey - FLP o +; \frac{FRT82, arm-lacz}{alelo\ de\ kay} \varnothing$$

$$\mathbf{F2:} y^1, w^{1118}; \frac{D^1, gl^1}{TM3, Ser^1} \sigma \times yw; \frac{FRT82, arm-lacz, alelo\ de\ kay}{TM3, Ser^1} \varnothing$$

En la F1 de esta craza se seleccionaron hembras vírgenes con este genotipo:

$y^1, w^{1118}, ey - FLP o +; \frac{FRT82, arm-lacz}{alelo\ de\ kay}$  donde se seleccionan con los marcadores



**Figura 3:** Diagrama esquemático de cómo se produce la recombinación mitótica para generar alelos de *kay* recombinados con la secuencia *FRT* en la posición 82 en la base del brazo derecho del cromosoma tres. En el esquema solo se representa los cromosomas tres.

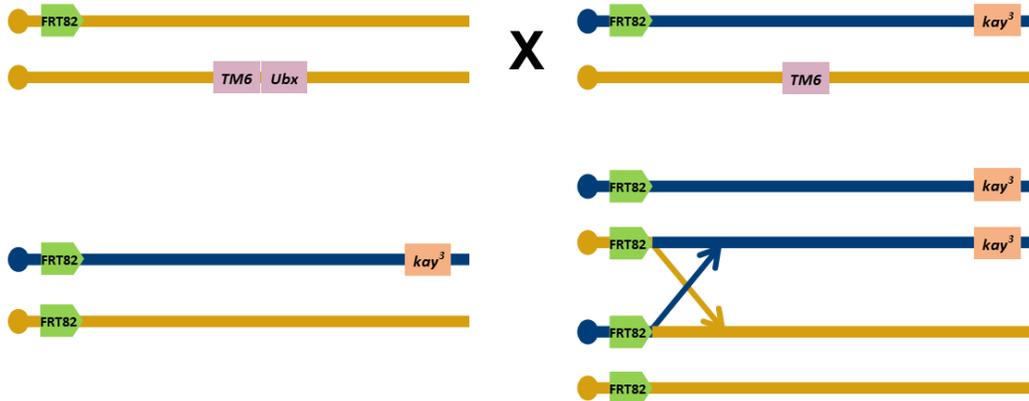
apropiados, individuos con *FLP* y los dos cromosomas tres que se van a recombinar (en uno *FRT82* y en el otro el alelo de *kay*). Para reconocer este genotipo identificamos las moscas de la F1 que no tengan alas aserradas ni halterios más grandes ya que esto indicaría que tienen un cromosoma balanceador.

Las moscas de la F1 que tienen el alelo de *kay* que deseamos estudiar en uno de sus cromosomas y la secuencia *FRT82* en el otro se cruzan con moscas con el este genotipo:  $y^1, w^{1118}; \frac{D^1, gl^1}{TM3, Ser^1}$  ya que en ambos cromosomas tres tienen alelos dominantes con fenotipos fácilmente reconocibles. Durante la meiosis, los cromosomas tres de interés, se recombinan y esperamos que, en alguno de los múltiples eventos de recombinación, surja algún cromosoma tres donde el *FRT82* y el alelo de *kay* coexistan. El otro cromosoma proveniente del otro progenitor será el balanceador que nos permita establecer en el siguiente paso, una línea con el genotipo deseado para obtener los clones de interés.

Después se seleccionaron individuos con el siguiente genotipo  $y^1, w^{1118}; \frac{FRT82, arm-lacz, alelo de kay}{TM3, Ser^1}$  en la F2, se llevaron a cabo cruza individuales con moscas que tengan un balanceador para establecer líneas que podrían contener el cromosoma recombinante con *FRT82* y el alelo de *kay*. Se generaron varias líneas y se seleccionaron aquellas en las que se produjo la recombinación esperada. Para confirmar que estas líneas contenían el alelo mutante de *kay*, se realizaron pruebas de complementación. Esto se logró al cruzar una línea con el alelo *kay*<sup>1</sup> con la línea a probar. Luego se revisó la descendencia y se observó que, si todos los individuos que tenían *kay*<sup>1</sup> en un cromosoma tres y el alelo de *kay* a probar en el otro murieron durante la embriogénesis, se concluyó que estos alelos no complementan y, por lo tanto, son dos alelos del mismo gen. Las líneas que no complementaron se cruzaron con otra línea capaz de producir clones (Figura 4), y se conservan aquellas líneas que permitieron la generación de clones.

## 6. Generación de mosaicos genéticos en el ojo

Se utilizaron dos líneas que contenían los alelos *kay*<sup>1</sup> y *kay*<sup>2</sup> los cuales fueron recombinadas como se describió antes y las líneas *kay 200MB* y *kay 640-7* de la colección de cepas del laboratorio que tienen alelos mutantes de *kay* y un *FRT82* ya recombinados. Los alelos mutantes de *200MB* y *kay 640-7* se van a renombrar



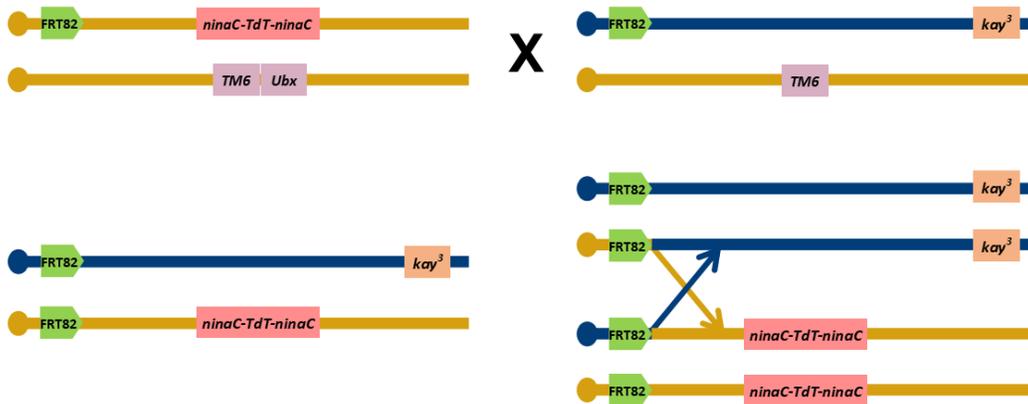
**Figura 4:** Esquema de la recombinación mitótica. Se cruzaron dos líneas, una con una inserción de la secuencia *FRT82* en el cromosoma 3 y ningún alelo mutante y otra con un alelo mutante de *kay* recombinado con la secuencia *FRT82*, cuando se está formando el ojo se activa la expresión de *FLP* dirigida por el enhancer de *ey*. Cuando hay mitosis en estas células los cromosomas indicados se recombinan produciendo que algunas células descendientes sean homocigotas mutantes para el gen de interés y otras sean homocigotas silvestres para el mismo. En el esquema sólo se representan los cromosomas tres.

como *kay*<sup>4</sup> y *kay*<sup>5</sup> siguiendo las recomendaciones de nomenclatura para nombrar alelos dadas en flybase.org (Larkin et al., 2021).

Para generar clones, se cruzó una línea con un alelo de *kay* recombinado con *FRT82* con otra línea que tuviera un *FRT82* y que exprese *FLP* (Figura 4). Cuando dos cromosomas homólogos tienen un *FRT*, se produce recombinación mitótica cuando *FLP* está presente. Para generar clones únicamente en el ojo, se dirige la expresión de *FLP* con el enhancer de *ey*, ya que este gen se expresa en tejidos oculares desde etapas tempranas del desarrollo del ojo.

### 7. Generación de clones marcados con proteínas fluorescentes

Para visualizar los ommatidios con fluorescencia, se realizaron cruzas similares a las descritas antes, con la diferencia que el alelo de *kay* recombinado se cruzó con esta línea:  $ey - FLP, ninaE - GAL4; UAS - GFP - ninaC; \frac{FRT82, ninaE - tdTomato - ninaC}{TM6, Tb^1}$ , cuyo genotipo es explicado en la primera sección de Métodos. Dado que Gal4 activa genes que tienen *UAS* y que tanto NinaE como NinaC son opsinas que se unen a las microvellosidades que forman los rabdómeros los clones homocigotos silvestres y heterocigotos expresarán TdTomato y GFP en los rabdómeros de los fotorreceptores, mientras que los clones mutantes solo GFP (Figura 5).



**Figura 5:** Esquema de la recombinação mitótica. Se produce recombinação (como se describe en Figura 4) sin embargo el cromosoma silvestre tiene la inserción de un fluoróforo (TdTTomato) que se expresará en los fotorreceptores externos. Además, la línea silvestre (en el Cromosoma dos) tiene la inserción de GFP que también se expresará en los fotorreceptores externos, tanto en los mutantes como en los silvestres. En el esquema sólo se representan los cromosomas tres.

## 8. Generación de líneas de moscas que expresan RNAi para *kay* en el ojo

Se obtuvieron dos líneas de moscas que codifican para RNAi contra *kay* provenientes del cepario de *Drosophila* de la Universidad de Indiana en Bloomington. Una de ellas expresa un RNAi bajo el control de *UAS* que interfiere con 507 pares de bases de la región 3' (Figura 1) del transcrito de *kay*. La segunda línea expresa un RNAi que interfiere con 21 pares de bases también de la región 3' (Figura 1) y cuya expresión se induce bajo el control del sistema Gal4/*UAS*. Ambas líneas codifican para RNAis que afectan a todas las isoformas (Perkins et al., 2015). La primera línea obtenida tiene en el cromosoma X *sev*<sup>21</sup>, un alelo nulo de *sev*, por ende, las moscas con este alelo no tienen R7 (Escobedo et al., 2019). Por lo que para hacer experimentos válidos en el ojo es necesario cambiar este cromosoma X por uno sin mutaciones en *sev*. Para ellos realizamos las siguientes cruza:

$$\mathbf{P: } y^1, v^x, sc, sev^{21}; UAS - kayRNAi \text{ } \sigma \times y^1, v^1 \text{ } \text{f}$$

$$\mathbf{F1: } \frac{y^1, v^1}{-}; \frac{UAS - kayRNAi}{+} \text{ } \sigma \times y, v \text{ } \text{f}$$

$$\mathbf{F2: } \frac{y^1, v^1}{-}; \frac{UAS - kayRNAi}{+} \text{ } \sigma \times y, v \frac{UAS - kayRNAi}{+} \text{ } \text{f}$$

$$\mathbf{F3: } y^1, v^1; \frac{UAS - kayRNAi}{+} \text{ } \text{f} \times y^1, v^1; \frac{UAS - kayRNAi}{+}$$

La presencia del RNAi se pudo corroborar en todo momento del proceso debido a que la inserción que contiene el RNAi está marcada con un rescate de *vermillion*

( $v^+$ ) que hace que las moscas tengan fenotipo silvestre a pesar de que tienen un alelo mutante de  $v$ .

Para que se expresara el RNAi se realizó la siguiente cruce:

**P:**  $y^1, v^1; UAS - kayRNAi$  ♂ x  $y^1, w^{1118}; ey - Gal4$  ♀

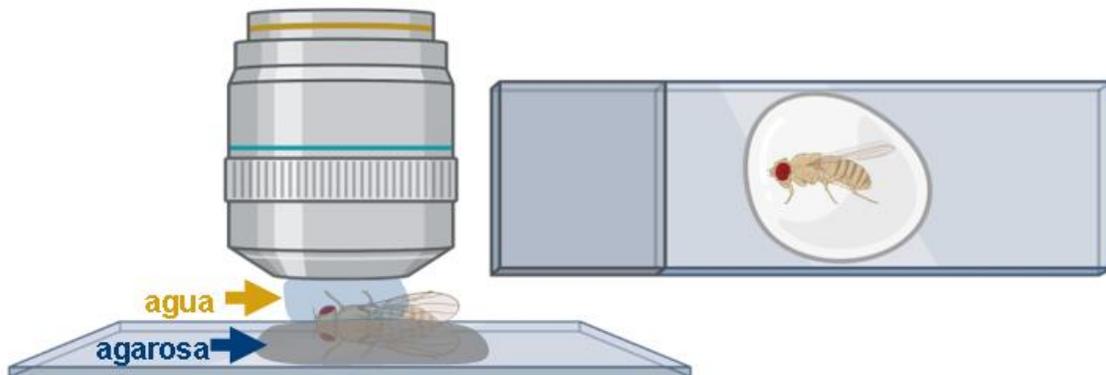
**F1:**  $y^1, v^1; \frac{ey-Gal4}{+}; \frac{UAS-kayRNAi}{+}$

Por ende, en la descendencia durante el desarrollo del ojo Gal4 se une a  $UAS$  y activa la expresión del RNAi.

### 9. Análisis histológico en el microscopio confocal

Para observar los ojos de moscas adultas con clones marcados con GFP y TdTomato, las montamos en un portaobjetos excavado con una gota de agarosa aún líquida. Luego, se colocaron las moscas de tal manera que la pseudo-pupila estuviera en el centro del ojo (Figura 6), tal como se describe en el estudio de Dourlen et al. (2013). Finalmente utilizamos un microscopio confocal para analizar las muestras en vivo.

Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal Zeiss LSM 780, con un objetivo LD LCL Plan-Apochromat 15x/0.8 Imm Korr DIC m27. Cada imagen consta de entre 30 y 40 planos, con un grosor de 43.835  $\mu\text{m}$  por plano y cada voxel tiene un tamaño de 0.60  $\mu\text{m}$  x 0.60  $\mu\text{m}$  x 1.15  $\mu\text{m}$ . Para la excitación de la muestra se utilizaron dos láseres, uno de 488 nm y otro de 561 nm. El láser de 488 nm se utilizó con un pinhole con una apertura de 1.69 AU/32  $\mu\text{m}$ , mientras que el láser de 561 nm se utilizó con un pinhole con una apertura de 1.66 AU/37  $\mu\text{m}$ .



**Figura 6:** Esquema del montaje de moscas vivas para ver en microscopio confocal

Las imágenes fueron analizadas con el software ZEN 3.4 (Carl Zeiss Microscopy, 2016), donde se realizaron reconstrucciones 3D para observar la estructura de las células pigmentadas. Además, en el mismo software se seleccionaron dos planos para observar la mayor cantidad de rabdómeros y luego contar el número de fotorreceptores que expresan solo GFP (mutantes) y los que expresan TdTomato (silvestres o heterocigotos).

### **10. Fijación de ojos con clones mutantes**

Se fijaron ojos con clones mutantes para cortes histológicos y moscas completas para SEM. Para realizar cortes histológicos de ojo se utilizaron pinzas para separar la cabeza del cuerpo dejando parte de la hemolinfa para evitar la desecación. Luego se realizó un corte medio sagital con una cuchilla de modo que se dejó un ojo en cada media cabeza. Posteriormente se introdujeron los ojos en 1 ml de solución fijadora y se incubó en hielo por 30 min.

Componentes de la solución fijadora:

1. 210 µl de H<sub>2</sub>O;
2. 250 µl buffer de cacodilatos (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>AsNaO<sub>2</sub>), pH = 7.0;
3. 40 µl de glutaraldehído al 50% en agua;
4. 500 µl de OsO<sub>4</sub> al 2%.

Después se cambió a otra solución de OsO<sub>4</sub> al 2% y se dejó de dos a cuatro h en hielo. Seguido de eso se deshidrató pasando la muestra cinco min en soluciones de acetona en agua al 30%, 50%, 70%, 90% y 96% respectivamente, y luego 10 min en acetona al 100% y finalmente toda la noche en una mezcla Spurr: acetona (1:1) a temperatura ambiente.

Composición del Spurr (resina)

1. 7.5 g 4-Vinylcyclohexenedioxide
2. 19.5 g Anhídrido Nonenyl Succinic
3. 3.75 g D.E.R. 736 (Polipropileno glicol, [clorometil] polímero oxirane)
4. 0.3 g 2,4,6-Tri (Dimethylaminomethyl)-Phenol

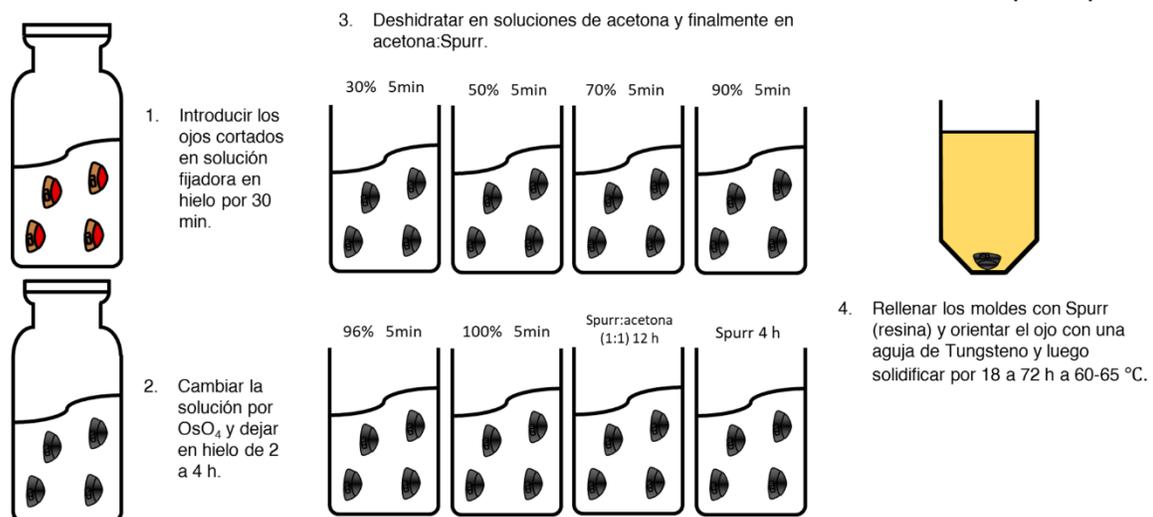
Al día siguiente se sustituye la mezcla de Spurr:acetona por Spurr y se deja a temperatura ambiente por al menos 4 horas. Luego se rellenan moldes Beem de plástico con Spurr y se orientan los ojos con una aguja de tungsteno al fondo de los

moldes con la superficie ocular hacia abajo, y se deja solidificar de 18 a 70 horas a 60-65°C (Figura 7).

Para realizar la SEM se anestesiaron moscas con clones mutantes, luego se hicieron perforaciones en el tórax y abdomen (para garantizar que ingresen las soluciones), y luego se fijaron con el mismo procedimiento descrito antes y se deshidrataron en un procesador de tejidos que dejó las muestras dos h en soluciones de acetona en agua con concentraciones del 30%, 50%, 70%, 90%, 96%, 100% respectivamente, para después en otra solución de acetona 100% por 24 h. Finalmente son almacenadas en acetona al 100% hasta el secado de punto crítico.

### 11. Corte y observación de ojos adultos

Los bloques de Spurr con los ojos dentro fueron cortados a distintas profundidades del ojo utilizando un microtomo Leica modelo RM2265 con navajas de vidrio para obtener cortes semifinos de un grosor igual a un  $\mu\text{m}$ . Se colocaron los cortes en un portaobjetos y se fijaron al calor en una parrilla a 100°C durante un minuto. Posteriormente se colocó azul de toluidina en agua al 1% durante un minuto para teñir las estructuras celulares de los omatidios y se colocaron las muestras en la parrilla por 15 s. Se lavó el exceso de colorante con agua bidestilada y se colocó un cubreobjetos sobre cada muestra con Entellan para poder ser observados con aceite de inmersión. Las muestras fueron observadas en un microscopio óptico



**Figura 7:** Representación esquemática del proceso de fijación de ojos. El cambio de coloración en los ojos es producido por la acción del  $\text{OsO}_4$ .

Nikon Eclipse e600 y se tomaron imágenes con una cámara Photometrics CoolSnap cf en campo claro.

## **12. Microscopía electrónica de barrido**

Las moscas previamente fijadas y en acetona al 100% se introdujeron en un secador de punto crítico Leica EM CPD300. En este equipo en primer lugar se hizo un cambio de acetona a CO<sub>2</sub> líquido y luego se aumentó la temperatura y presión hasta alcanzar y superar el punto crítico (31°C y 73 Bar) lo que permite un secado rápido que no daña el tejido. Después se sacaron las muestras y se colocaron encima de un cilindro de montaje en donde previamente se había colocado una etiqueta con pegamento de carbón. Una vez orientadas las moscas, se agrega pegamento de carbón para asegurar una buena conductividad eléctrica entre las moscas y el cilindro metálico. Posteriormente se introdujeron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6060 del Laboratorio de Microscopía del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) de la UNAM, se hizo el alto vacío, se observaron y se tomaron micrografías a diferentes aumentos. Se utilizó una potencia de 20-22 kV para tomar las imágenes.

Las imágenes posteriormente fueron analizadas en software FIJI (Schindelin et al., 2012), donde se ajustó la escala a los parámetros de cada fotografía, luego se delimitó el perímetro del ojo y partir del cual se obtuvieron los descriptores de la forma, después se contó el número de omatidios y de quetas. En las imágenes de mayor aumento se midió el tamaño de las quetas y en imágenes donde se observaban sólo pezones corneales, se delimitó el perímetro de todos los pezones de una imagen y a partir de éstos se obtuvieron los descriptores de forma (área, circularidad, diámetro de Feret y el centroide) de cada uno de ellos. El área se calculó contando la cantidad de píxeles dentro la delimitación y luego se convirtió a µm basados en la escala de cada fotografía. La circularidad se calculó usando la siguiente ecuación  $Circularidad = \frac{\text{Área}}{\text{Perímetro}^2}$  cuando el resultado de la ecuación es más cercano a cero más circular es la forma. El diámetro de Feret se define como la mayor distancia entre dos puntos del perímetro de cada pezón. Las coordenadas

del centroide se calculan a partir del promedio de los puntos en el eje x y y de la delimitación de cada pezón.

Se ejecutó un código de Python con el que a partir del centroide de los pezones se midió la distancia entre todos los pezones con la siguiente ecuación  $Distancia = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}$  y con esos datos se determinó la densidad relativa de cada pezón. Es decir, se delimitó un círculo con un radio de 0.5  $\mu\text{m}$  cuyo centro era cada pezón y se contabilizó el número de pezones en ese círculo y se repitió el procedimiento con todos los pezones. El código ejecutado está disponible en: [https://github.com/DanielT-M/tetillas\\_mosca](https://github.com/DanielT-M/tetillas_mosca).

### **13. Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados utilizando el software de análisis estadístico Prism9 (GraphPad Software, 2021). Para conjuntos de datos con solo dos condiciones que tienen una distribución normal se utilizó una prueba t no pareada (Student, 1908), si los datos tenían tres o más condiciones se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía (Fisher, 1915) para determinar si había diferencia entre los grupos, para comparar los grupos se usó la prueba de Tukey (Tukey, 1949) para múltiples comparaciones. Cuando las distribuciones de los datos no eran normales se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952) para determinar si había diferencia entre los grupos, para comparar los grupos se usó la prueba de Dunn para múltiples comparaciones (Dunn & Clark, 1969).

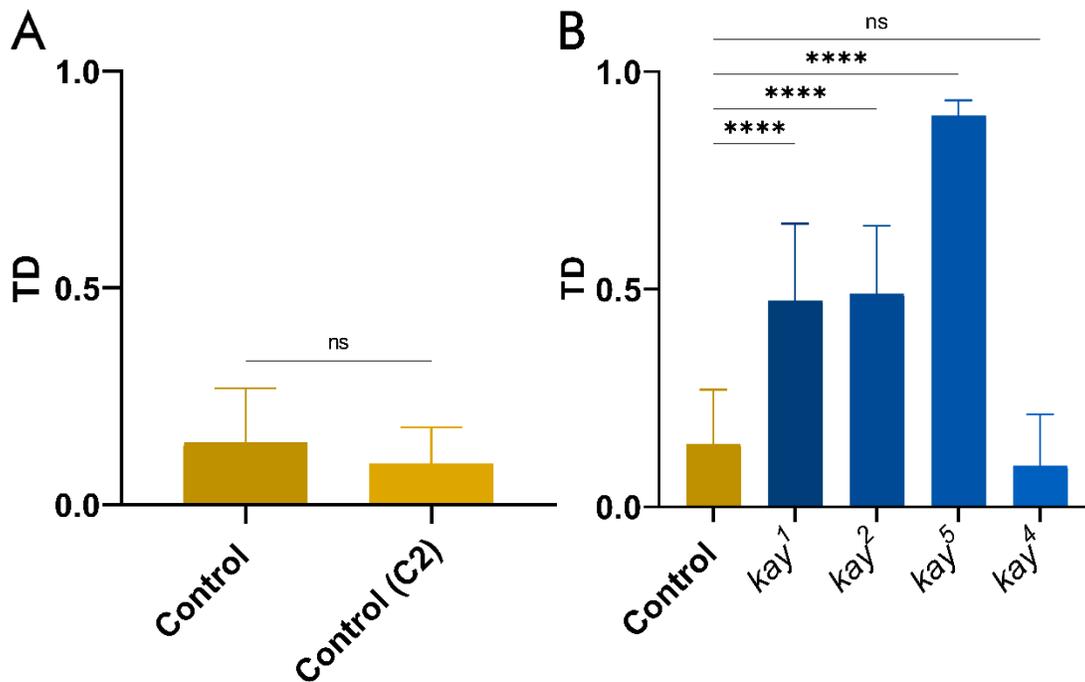
## VII. RESULTADOS

### 1. Los individuos mutantes de *kay* presentan defectos en el ojo

Los ojos con clones mutantes de los alelos de *kay* presentan defectos visibles. Sin embargo, no en todos los individuos, no siempre son iguales, ni son bilaterales en todos los casos. Esta variabilidad se debe a varios factores intrínsecos del sistema de generación de clones y de los individuos «per se». El sistema *FLP/FRT* puede generar clones de distinto tamaño debido a que la recombinación en las células se produce de manera estocástica y depende del nivel de expresión de *FLP* que puede variar de célula a célula. Por otro lado, la reproducción sexual produce que individuos provenientes de una misma línea no tengan el mismo genoma y, por ende, tienen alelos distintos en algunos genes que pueden aumentar o disminuir el fenotipo de una mutación. Para cuantificar el efecto causado por los clones mutantes de alelos de *kay* en el ojo, se evaluó el número de defectos observados con microscopio de disección. Al comparar los resultados con otros alelos mutantes del mismo gen, podemos determinar diferencias entre conjuntos a pesar de la variabilidad intrínseca del modelo de estudio. En primera instancia sólo se cuantificó la presencia o ausencia de defectos ya que para clasificar de forma fehaciente los tipos de defectos es necesario observar el ojo con un microscopio electrónico.

Al analizar la presencia de ojos con clones usando el microscopio de disección encontramos que alrededor del 50% de las moscas con clones de *kay*<sup>1</sup> y *kay*<sup>2</sup> presentan defectos en sus ojos; en cambio casi el 100% de los individuos con clones de *kay*<sup>5</sup> tienen defectos, sin embargo, solo el 10% de los individuos con clones mutantes de *kay*<sup>4</sup> exhiben defectos (Figura 8B). Esto indica que *kay*<sup>4</sup> es el alelo más hipomorfo, seguido de *kay*<sup>1</sup> y *kay*<sup>2</sup>, que a su vez son más hipomorfos que *kay*<sup>5</sup> en el ojo. O sea, para los fenotipos mutantes en el ojo la serie alélica es la siguiente: *kay*<sup>4</sup> < *kay*<sup>1</sup> = *kay*<sup>2</sup> < *kay*<sup>5</sup>.

Cuando se indujeron clones sin mutaciones conocidas en el cromosoma tres encontramos, se encontró que alrededor del 15% de los individuos presentaban defectos en los ojos, una tasa más alta que la observada en moscas con clones de *kay*<sup>4</sup>. Para investigar si esto es una característica del sistema para inducir clones,



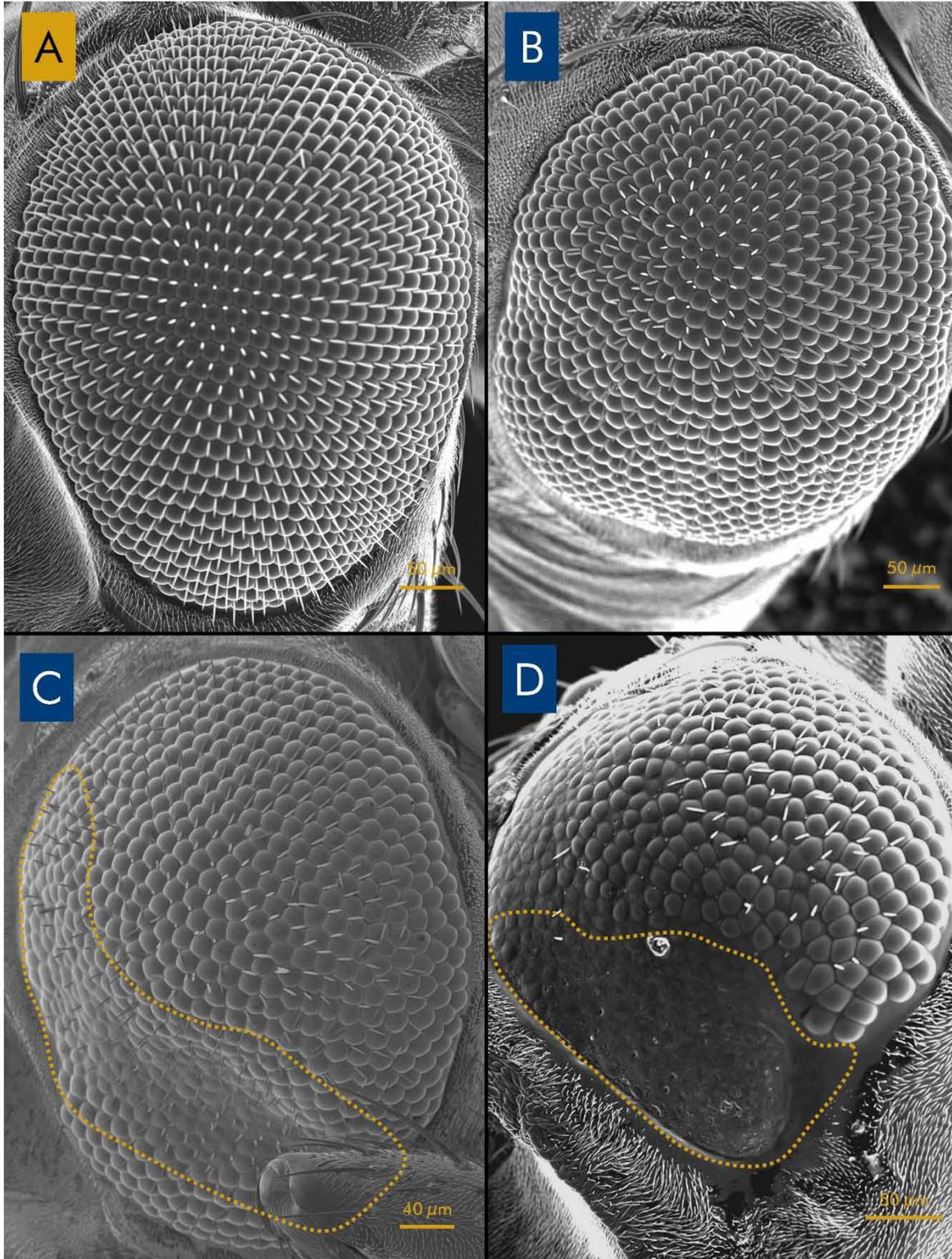
**Figura 8:** Cuantificación de la tasa de defectos de los alelos de *kay* estudiados. TD (Tasa de defectos). (A) No hay diferencia en la tasa de defectos de individuos con clones silvestres del cromosoma tres o con clones silvestre del Cromosoma dos. Los datos fueron analizados utilizando una prueba t no pareada ( $t = 0.9658$ ,  $df = 16$ ,  $p = 0.3485$ ). C2 (cromosoma dos). (B) Las moscas con clones de *kay*<sup>1</sup>, *kay*<sup>2</sup> y *kay*<sup>5</sup> tienen significativamente más defectos que las moscas con clones silvestres (control). En cambio, la tasa de defectos de individuos con clones de *kay*<sup>4</sup> no es significativamente diferente que la del control. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía ( $F(4, 41) = 48.90$ ,  $p < 0.0001$ ). Las diferencias entre los distintos grupos fueron analizadas usando la prueba de Tukey para múltiples comparaciones (ver Anexos). ns = no significativo, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .  $n = 10$  conteos en los que se contó de alrededor de 140 ojo en cada uno.

se utilizaron *FRT* para inducir clones en el cromosoma dos utilizando el mismo método. En este caso, encontramos que el 10% de los individuos con clones silvestres presentaban defectos oculares (Figura 8A). La tasa de defectos entre individuos que tienen clones silvestres del cromosoma dos y tres no fue significativamente diferente, lo que sugiere que la inducción de clones por el sistema produce inherentemente de 10-15% de individuos con defectos en los ojos. Por lo tanto, esta tasa debe ser considerada como el fondo de referencia al comparar los resultados de los individuos con clones de los alelos mutantes.

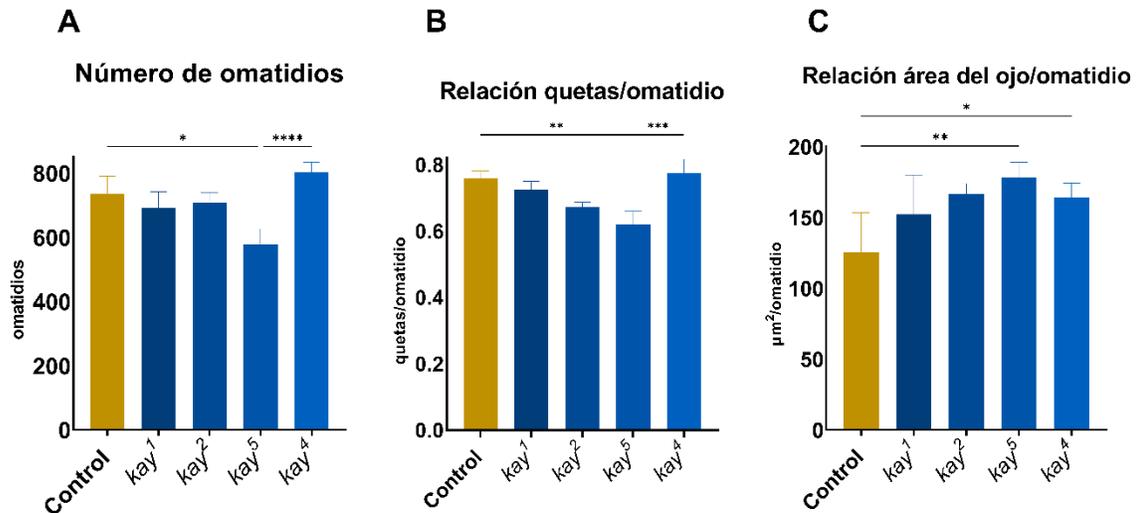
Esta tasa de defectos se debe al sistema empleado para generar los clones, ya que la tasa de defectos de *kay*<sup>1</sup>, *kay*<sup>2</sup> y *kay*<sup>5</sup> fue significativamente diferente de los controles podemos determinar que el aumento de defectos solo puede explicarse por efectos de la mutación. Sin embargo, no podemos afirmar que las mutaciones

de *kay<sup>4</sup>* causen defectos en el ojo ya que su tasa de defectos fue similar a la de los controles.

Al analizar los ojos con clones mutantes en el microscopio electrónico de barrido encontramos que las moscas con los alelos *kay<sup>1</sup>* y *kay<sup>2</sup>* presentan varios tipos de defectos, y que los defectos son más acusados en individuos con clones de *kay<sup>5</sup>*. Clasificamos los tipos de defectos encontrados en leves (Figura 9B) cuando solo se afecta la estructura de unos pocos omatidios, moderados (Figura 9C) cuando hay defectos en zonas grandes del ojo y severos (Figura 9D) cuando hay zonas en las que hay pérdida total de la arquitectura del ojo. Analizamos 10 ojos siguiendo estos parámetros en SEM y encontramos que moscas con clones de *kay<sup>4</sup>* solo presentan defectos leves (20%) y el 80% no presenta defectos. En individuos con clones de *kay<sup>1</sup>* el tipo de defecto se distribuye de la siguiente manera: leves 44%, moderados 44%, y severos el 11%. Por su parte en las moscas con clones de *kay<sup>2</sup>* un 40% son leves y moderados el 60% restante. Finalmente, los tipos de defectos en moscas con clones de *kay<sup>5</sup>* se distribuyen así: leves 15%, moderados 46% y severos 38%. Estos datos refuerzan la idea de que *kay<sup>5</sup>* es el alelo más fuerte y con mayor penetrancia en el ojo, y en general, concuerdan con la serie alélica establecida en base a los defectos observados con el microscopio de disección. Realizamos un conteo del número de omatidios en los ojos con clones mutantes para determinar si este parámetro también estaba afectado. Los ojos con clones control tenían de media de 736 omatidios lo que es consistente con lo reportado en ojos silvestres. Los ojos con clones de *kay<sup>1</sup>* y *kay<sup>2</sup>* tienen en promedio 30 omatidios menos que los controles, en cambio los ojos con clones de *kay<sup>4</sup>* tiene más omatidios que los controles siendo la media de 802 omatidios, sin embargo, la diferencia no es estadísticamente significativa en ninguno de los casos. En cambio, los ojos con clones de *kay<sup>5</sup>* tienen una media de 577 omatidios y a diferencia de los otros alelos la diferencia con los ojos con clones control y con clones de *kay<sup>4</sup>* sí es estadísticamente significativa (Figura 10A). En cuanto al el número de quetas por cada omatidio también fueron los ojos con clones de *kay<sup>5</sup>* los únicos que mostraron diferencias significativas con los ojos control. Los ojos control tienen casi ocho quetas por cada 10 omatidios, mientras que los clones de *kay<sup>5</sup>* sólo seis (Figura 10B). Al comparar el área del ojo y el número de omatidios encontramos que los



**Figura 9:** Fotografías panorámicas de ojos obtenidas con SEM. (A) ojo control, donde podemos observar el fenotipo silvestre. (B) Ojo con clones de *kay*<sup>2</sup> en donde se observan irregularidades en la superficie del ojo y omatidios de diferentes tamaños. Defectos como estos los clasificamos como defectos leves. (C) Ojo con clones de *kay*<sup>1</sup> donde se observa hundimiento de un área (línea punteada) en la que los omatidios tienen formas y tamaños irregulares. Defectos como estos los clasificamos como defectos moderados (D) Ojo con clones mutantes de *kay*<sup>5</sup> donde hay un área con pérdida total de la arquitectura del ojo (línea punteada); además se observan omatidios de forma y tamaño irregulares en otras áreas del ojo. Defectos como estos los clasificamos como defectos severos. Las barras amarillas indican la escala.

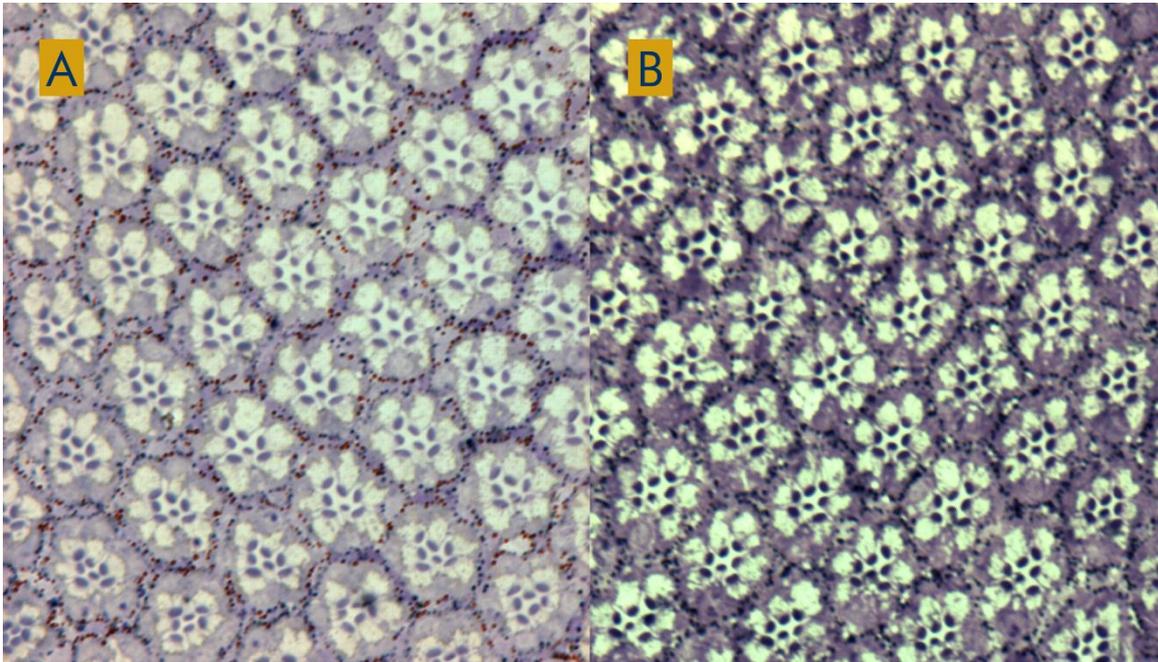


**Figura 10:** Cuantificación de los aspectos morfológicos del ojo completo. (A) Número promedio de omatidios en ojo con clones control y clones mutantes. (B) Correlación entre el número total de quetas y el número total de omatidios en un ojo. (C) Relación entre el área que ocupa el tejido ocular y el número de omatidios de un ojo. Los datos fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía. A.  $F(4, 35) = 8.541, p < 0.0001$ . B.  $F(4, 35) = 7.643, p = 0.0002$ . C.  $F(4, 35) = 4.612, p = 0.0043$ . Las diferencias entre los distintos grupos fueron analizadas usando la prueba de Tukey para múltiples comparaciones (ver Anexos). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p = 0.001$ , \*\*\*  $p = 0.0001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .  $n = 10$  ojos.

ojos con clones de *kay*<sup>4</sup> y *kay*<sup>5</sup> tienen en proporción mayor cantidad de área por cada omatidio (Figura 10C). Esto puede indicar que los omatidios son más grandes o que hay zonas delimitadas dentro del ojo donde no hay omatidios. Esto último es lo más probable en los ojos con clones de *kay*<sup>5</sup> ya que se observan regiones donde no hay omatidios, pero sí tejido ocular no organizado. No se observaron diferencias significativas entre los ojos con clones control y con clones mutantes en el área del ojo y el número de quetas.

## 2. Las moscas que expresan RNAi contra *kay* no muestran defectos

Las moscas que expresaron los RNAis contra *kay* no presentaron defectos visibles con microscopio de disección y tampoco se encontraron defectos al analizar la histología del ojo. Se repitieron los experimentos, pero haciendo crecer estas moscas a 29°C, temperatura a la que debería aumentar la expresión de los RNAis, y tampoco se observan alteraciones (Figura 11). No se realizaron experimentos para determinar si la expresión de *kay* disminuyó. Por lo tanto, no podemos saber si los RNAis realmente están interfiriendo con *kay* y será necesario medir directamente el transcrito de *kay* para determinar si este sistema puede utilizarse para estudiar la falta o disminución de función de Kay.

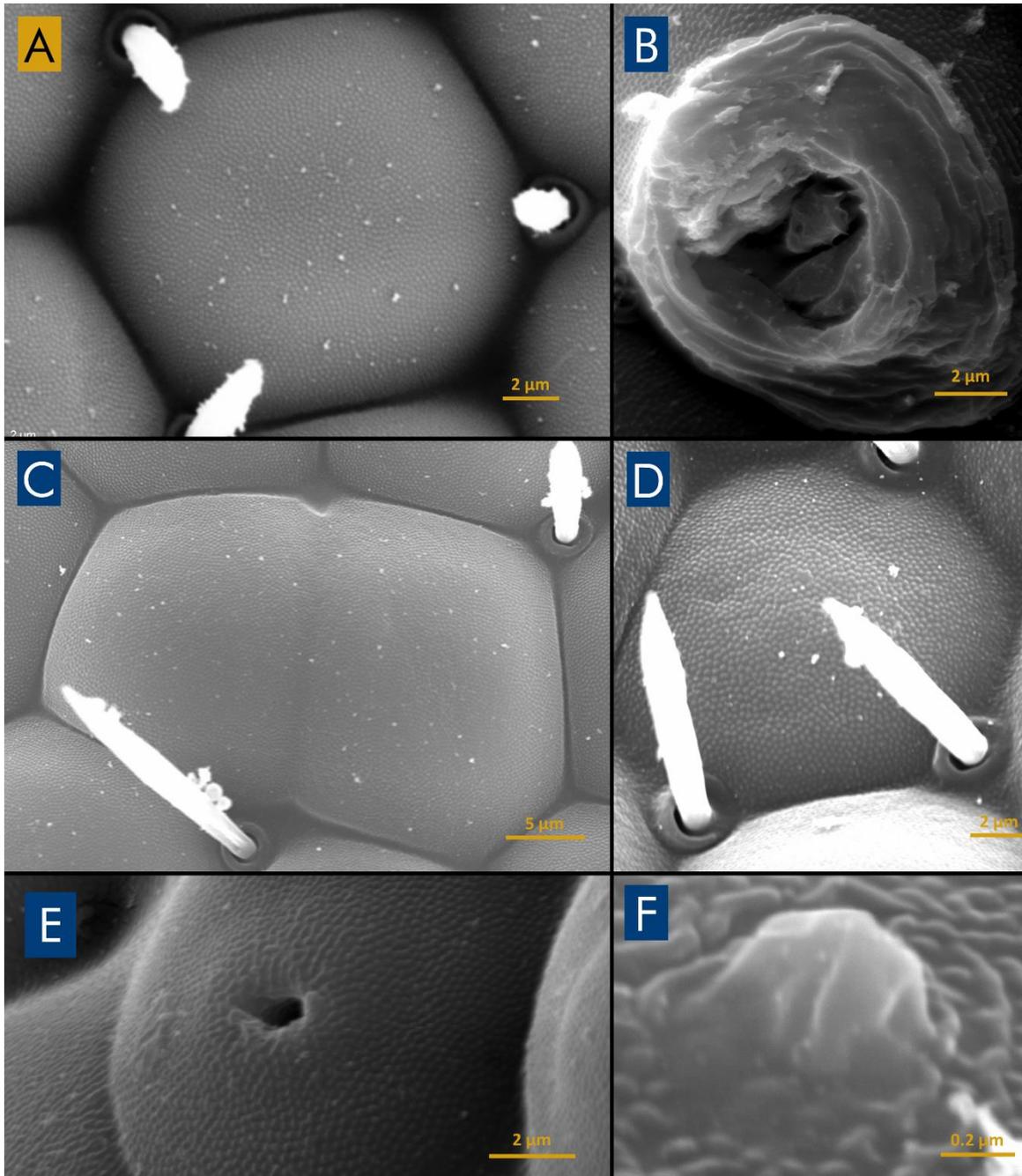


**Figura 11:** Corte histológico de ojo de moscas que expresaron RNAi contra *kay* donde se observa un fenotipo silvestre. (A) RNAi que interfiere con 21 pares de bases de la región 3'de *kay* y que se expresó en el patrón de expresión de *ey* (B) RNAi que interfiere con 507 pares de bases de la región 3'de *kay* y que se expresó en el mismo patrón del anterior.

### 3. La formación de la ultraestructura externa del ojo requiere de Kay

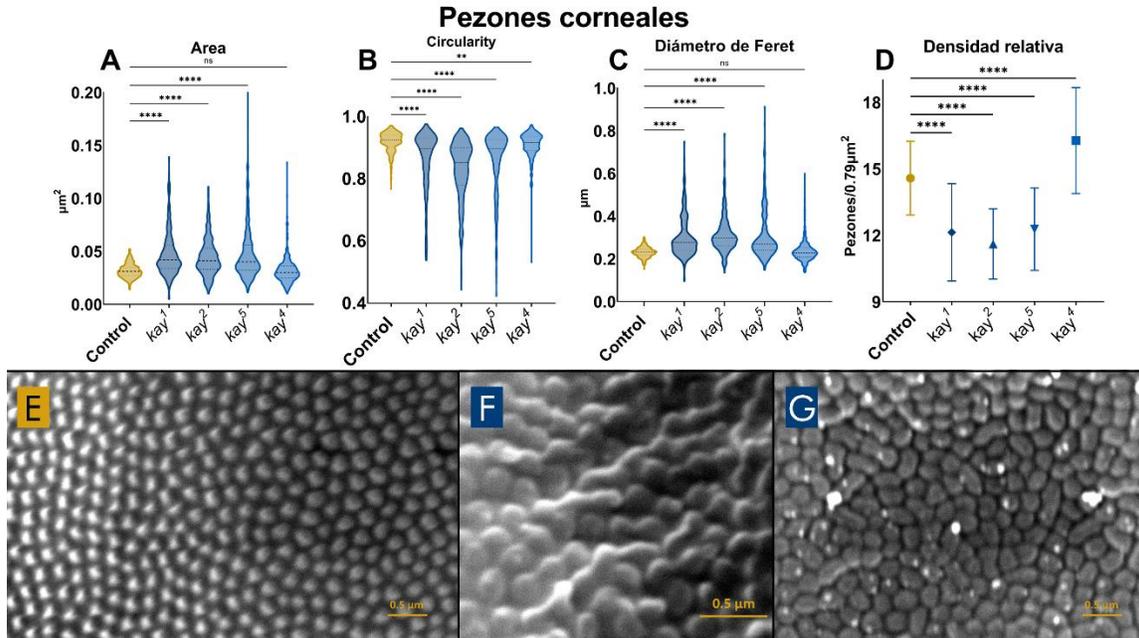
Durante el desarrollo la córnea es secretada por las células del cono y las células pigmentarias secundarias. Si ocurren alteraciones en estas células se pueden observar defectos en las córneas del ojo adulto. Los clones mutantes de *kay* presentan distintos tipos de alteraciones corneales. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido muestran córneas fusionadas, otras más pequeñas de lo habitual, agujeros y excrecencias corneales (Figura 12).

La ultraestructura de la córnea también está afectada en clones mutantes (Figura 13F y G). En los clones mutantes de todos los alelos, excepto en clones de *kay*<sup>4</sup>, los pezones corneales son más grandes y menos circulares y están más desorganizados, que los pezones de los controles (Figura 13A-C). Para medir el grado de desorganización, determinamos la densidad relativa de cada pezón (ver Métodos) y calculamos el coeficiente de variación (CV) correspondiente. Encontramos que los pezones de clones control tienen un CV de 11.4%. En cambio, los pezones en los clones mutantes tienen un CV ligeramente mayor de los controles, siendo los pezones en clones de *kay*<sup>1</sup> los que tiene un CV más alto



**Figura 12:** Córneas de omatidios de clones silvestres y mutantes (A) Córnea de un omatidio con fenotipo silvestre. (B) Excrecencia de cutícula en la córnea con un agujero en el medio. Clon de *kay*<sup>5</sup>. (C) Dos córneas fusionadas. Clon de *kay*<sup>1</sup>. (D) Córnea significativamente más pequeña que una cornea silvestre. Clon de *kay*<sup>2</sup> (E) Córnea de tamaño reducido y con un agujero central rodeado de pezones deformados. Clon de *kay*<sup>4</sup> (F) Pequeña excrecencia de cutícula rodeada de pezones deformados. Clon de *kay*<sup>1</sup>. Las barras amarillas indican la escala.

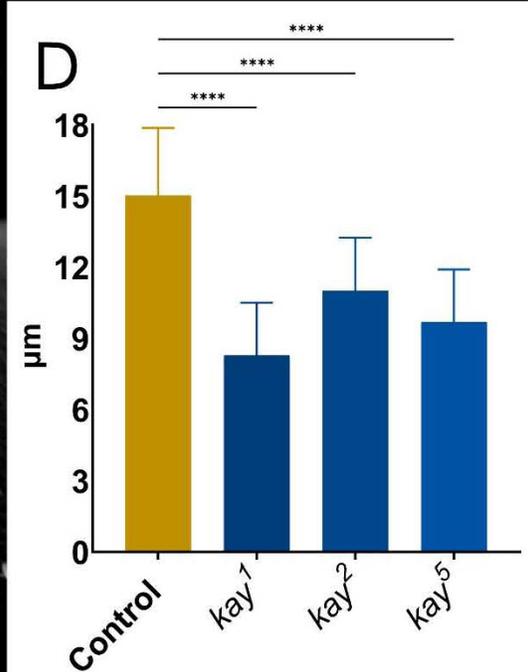
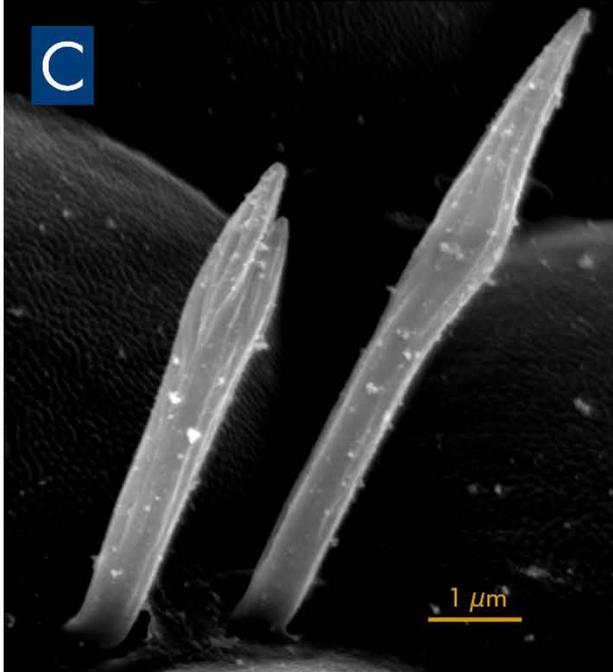
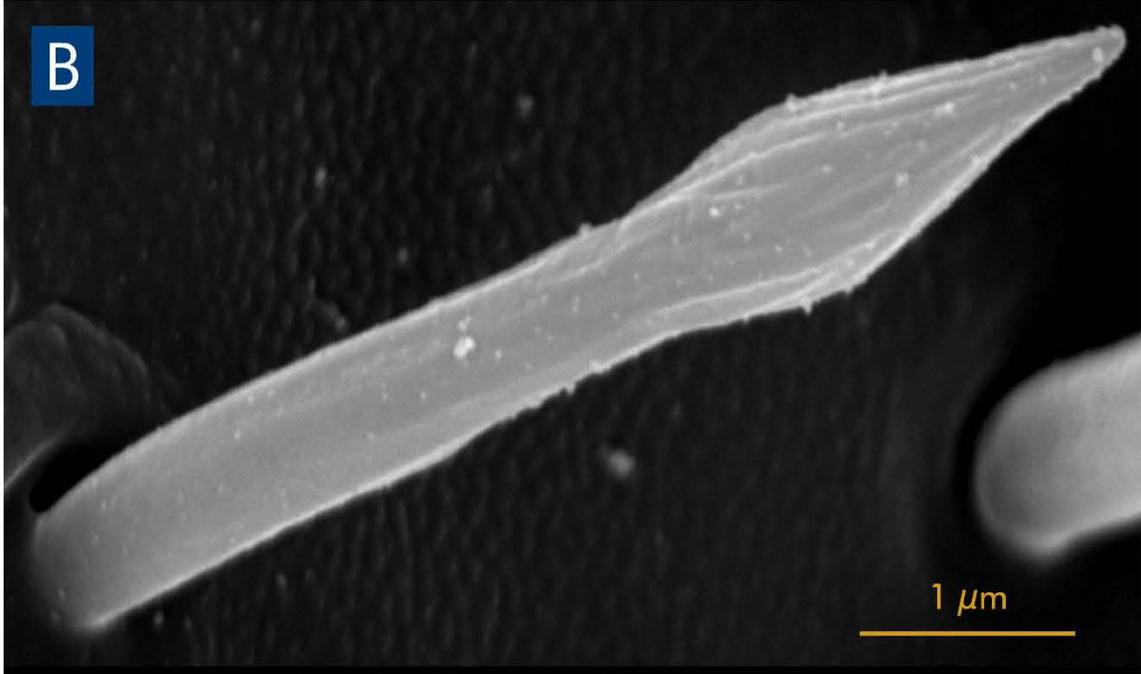
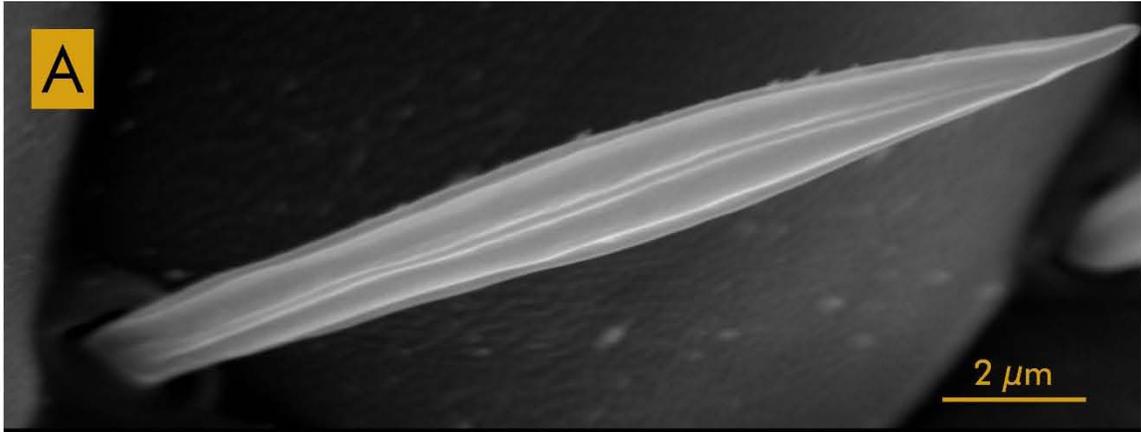
(18.09%), seguido por *kay*<sup>5</sup> (15.16%), *kay*<sup>4</sup> (15.16%) y *kay*<sup>2</sup> (13.66%). También se observaron cambios en la densidad relativa «per se», donde los pezones en los clones de *kay*<sup>1</sup>, *kay*<sup>2</sup> y *kay*<sup>5</sup> tienen una densidad menor que los controles, probablemente debido a que son, en promedio, más grandes que los controles. Sin



**Figura 11:** Cuantificación de los indicadores de forma de los pezones corneales. (A) Los pezones mutantes tienen un área mayor que los controles, excepto en clones de *kay*<sup>4</sup>. (B) La circularidad es significativamente alta en los pezones de los clones mutantes (C). El diámetro de Feret es mayor en clones mutantes. (D) La densidad relativa (ver Metodología secc.10) de los pezones es menor en clones de *kay*<sup>1</sup>, *kay*<sup>2</sup> y *kay*<sup>5</sup>, pero es mayor en clones de *kay*<sup>4</sup>. (E) Pezones con fenotipo silvestre. (F) Zona con pezones malformados. Clon de *kay*<sup>5</sup>. (G) pezones desordenados y malformados. Clon de *kay*<sup>1</sup>. Los datos fueron analizados utilizando una prueba de Kurskal-Wallis A: K-W = 406.1,  $p < 0.0001$ ; B: K-W = 370.3,  $p < 0.0001$ ; C: K-W = 575.9,  $p < 0.0001$ ; D: K-W = 691.7,  $p < 0.0001$ . La prueba de Dunn fue usada para determinar las diferencias entre grupos (ver Anexos). ns = no significativo, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p = 0.001$ , \*\*\*  $p = 0.0001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . en A, B y C control: n=387 pezones, *kay*<sup>1</sup>: n=273 pezones, *kay*<sup>2</sup>: n=405 pezones, *kay*<sup>5</sup>: n=454 pezones, *kay*<sup>4</sup>: n=644 pezones. En D control: n=239 pezones, *kay*<sup>1</sup>: n=155 pezones, *kay*<sup>2</sup>: n=257 pezones, *kay*<sup>5</sup>: n=299 pezones, *kay*<sup>4</sup>: n=419 pezones. Las barras amarillas indican la escala

embargo, los pezones en clones de *kay*<sup>4</sup> tienen mayor densidad a pesar de tener en promedio el mismo tamaño que los pezones silvestres, lo que podría indicar que están más cercanos entre sí (Figura 13D).

La forma de las quetas mecanorreceptoras también está alterada en los clones mutantes. Las quetas silvestres tienen cuatro venas («ridges», en inglés) que recorren toda la extensión de la queta (Figura 14A). En cambio, en los clones de *kay*<sup>1</sup>, *kay*<sup>2</sup> y *kay*<sup>5</sup> se encontraron quetas con formas anormales en las que no se distinguen las venas de una queta silvestre y además tiene un engrosamiento en la punta. Por su parecido a un pincel denominamos a este fenotipo como queta «pincel» (Figura 14B y C). Además, las quetas pincel son más pequeñas de las quetas silvestres; el tamaño medio de éstas en los clones de *kay*<sup>1</sup>, *kay*<sup>2</sup> y *kay*<sup>5</sup> fue de entre 9 y 11  $\mu\text{m}$ . En cambio, las quetas silvestres tienen un tamaño promedio de 15  $\mu\text{m}$  (Figura 14D).



**Figura 124:** Los clones de *kay* presentan defectos en las quetas. (A) Queta con fenotipo silvestre. Se observan tres de las cuatro venas que las caracterizan. (B) Queta pincel. Clon de *kay*<sup>1</sup>. (C) Par de quetas pincel con deformidades. Clon de *kay*<sup>5</sup>. (D) Las quetas pincel son significativamente más pequeñas que las quetas en clones control. Los datos fueron analizados usando una ANOVA de una vía ( $F(3, 519) = 204.9$ ). La prueba de Tukey fue usada para determinar las diferencias entre grupos (ver Anexos). \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .  $n = 141$  quetas. Las barras amarillas indican la escala.

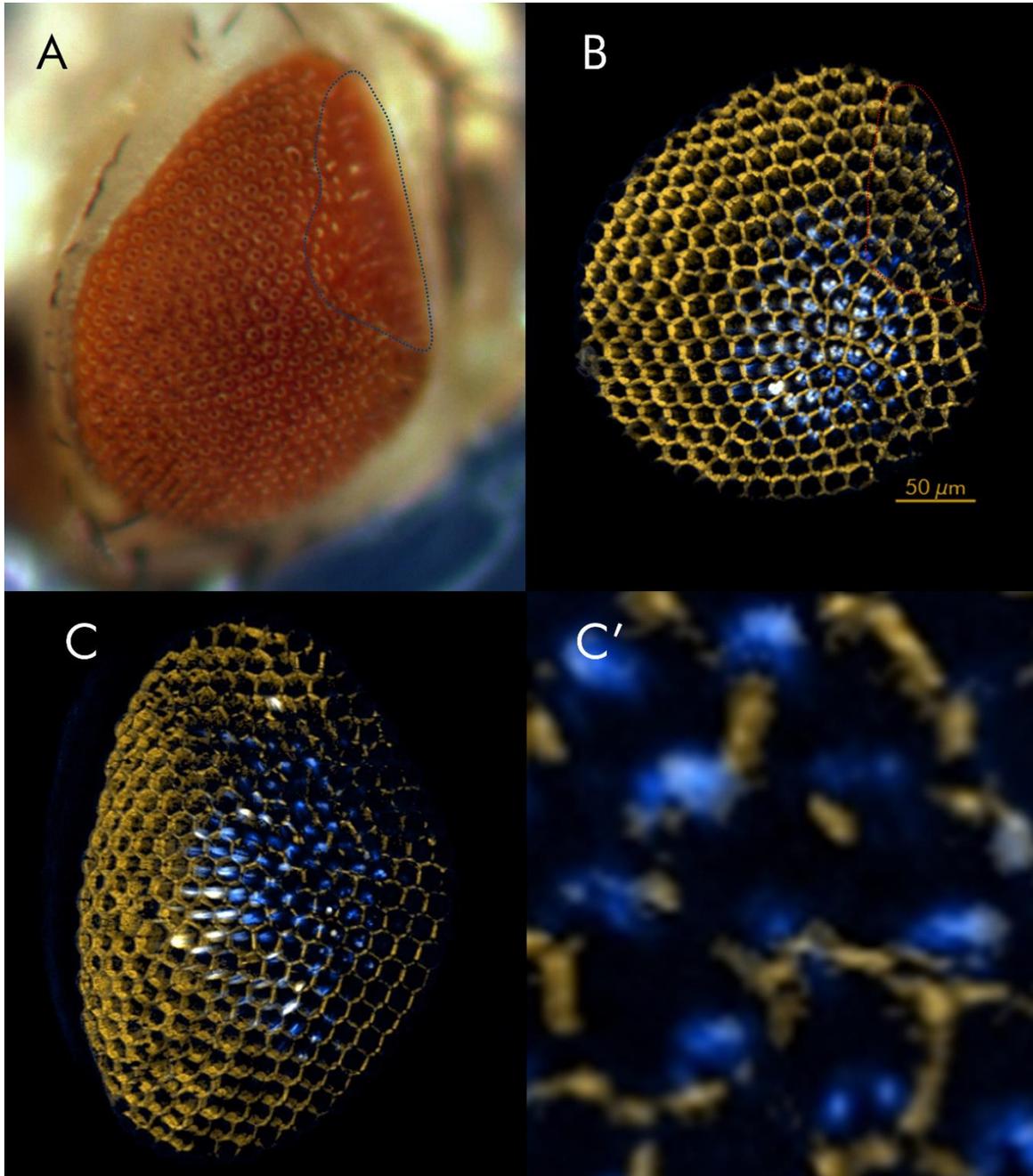
#### **4. Los mutantes de *kay* presentan defectos en las células pigmentadas**

Las células pigmentadas pueden ser estudiadas con el microscopio confocal, que permite ver la fluorescencia de los pigmentos que las caracterizan cuando son excitados con un láser de 561 nm. En nuestro estudio, al realizar reconstrucciones tridimensionales de ojos con clones mutantes observamos que en las zonas donde se observó un cambio de textura (Figura 15A), se observa que las células pigmentarias pierden su disposición hexagonal característica (Figura 15B y C) especialmente cerca de los fotorreceptores mutantes. En algunas ocasiones la señal de fluorescencia producida por los pigmentos disminuye o está ausente en zonas en las que debería haber una célula pigmentada (Figura 15C'). Estos resultados sugieren que estas células podrían no están acumulando pigmentos correctamente o que su estructura podría estar muy alterada.

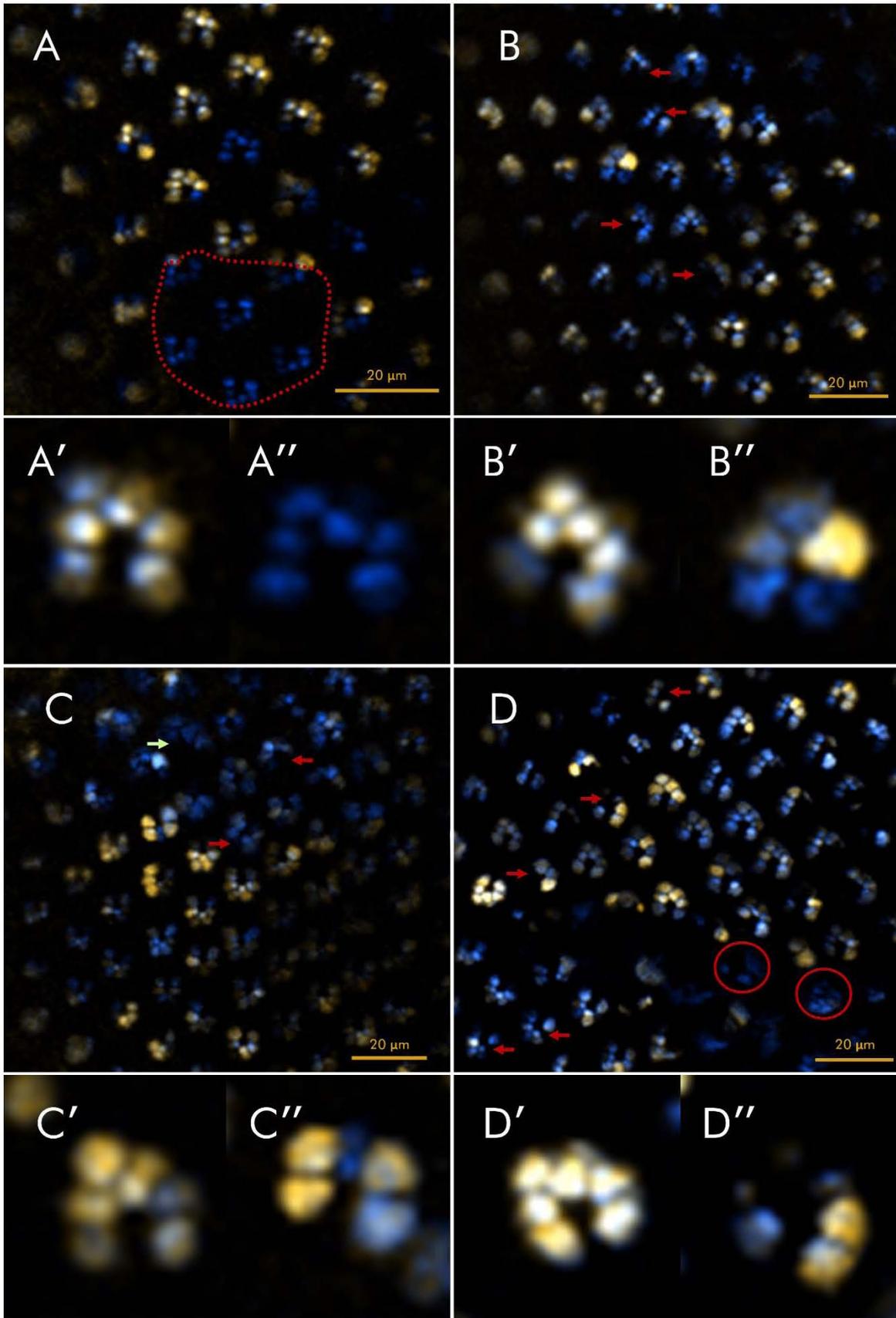
#### **5. Los clones mutantes tienen fotorreceptores faltantes o malformados**

Los fotorreceptores externos que expresan GFP y/o TdTomato en los rabdómeros, se analizaron mediante microscopía confocal (ver Metodología secc. 8). Se encontró que los fotorreceptores mutantes de todos los alelos exhiben defectos. Asimismo, los omatidios donde hay fotorreceptores mutantes no conservan la estructura trapezoide habitual (pérdida de la polaridad planar). Además, en algunos omatidios faltan fotorreceptores o son supernumerarios (Figura 16). Ninguno de estos defectos fue encontrado en clones control.

En clones de *kay*<sup>5</sup> se producen defectos más severos y frecuentes; incluso se observa que en algunos clones hay ausencia total de omatidios. En clones de *kay*<sup>1</sup> y *kay*<sup>2</sup> también se observan fotorreceptores anormales o pérdida de la polaridad planar. No obstante, los clones de *kay*<sup>4</sup> presentan casi siempre un fenotipo silvestre. Los defectos se suelen acumular y ser más acusados en el ecuador y en zonas aledañas al mismo.



**Figura 15:** En amarillo las células pigmentarias y la señal de TdTomato, en azul la señal de GFP. (A) Imagen de un ojo con clones de *kay<sup>1</sup>* donde se observa un cambio en la textura del ojo (marcado con línea punteada azul). (B) Reconstrucción de planos del mismo ojo de A donde línea punteada roja señala zona donde las células pigmentadas han perdido su forma y en la que disminuye la señal de los pigmentos. (C) Ojo con clones de *kay<sup>5</sup>*, donde también se pueden observar pérdida de la forma hexagonal y pérdida de señal de las células pigmentadas. (C') ampliación de C, donde se observa que no hay señal en zonas en las que debería haber una célula pigmentada.

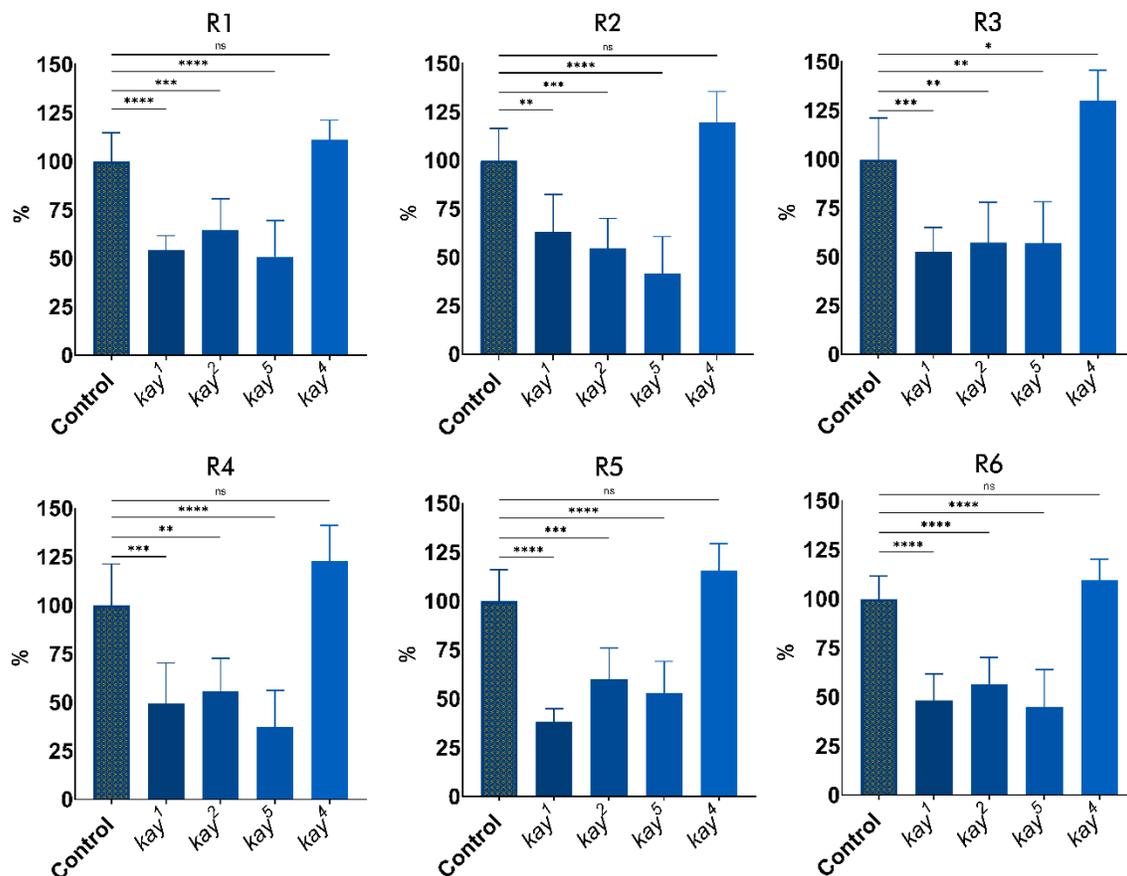


**Figura 16:** Las imágenes muestran la orientación defectuosa de los fotorreceptores mutantes. Todos los fotorreceptores están marcados con señal azul (GFP); los silvestres están marcados con señal amarilla

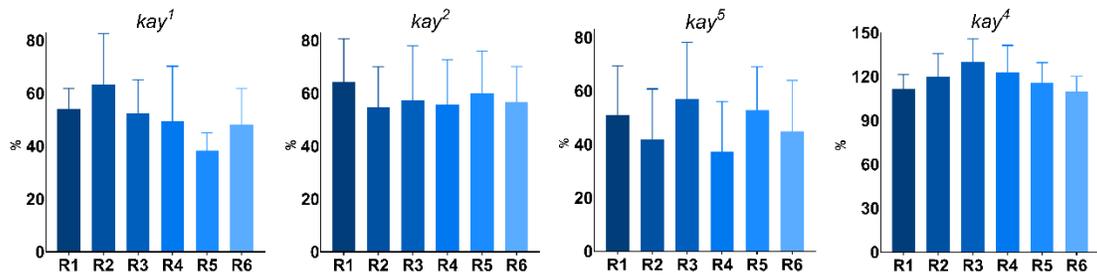
(TdTomato), por consecuencia los fotorreceptores que solo expresan GFP son mutantes. Las flechas indican ausencia de un fotorreceptor (A) Los ojos con clones de *kay*<sup>4</sup> tienen un fenotipo silvestre. (A') Amplificación de A. (B) Los ojos con clones de *kay*<sup>1</sup> tienen fotorreceptores ausentes y deformados. (B') Amplificación de B donde se observan un omatidio con solo cinco fotorreceptores externos. (C) Los clones de *kay*<sup>2</sup> también tienen fotorreceptores ausentes y algunos agrandados (flecha verde) (C') amplificación de C. (D) En ojos con clones de *kay*<sup>5</sup> se observa la ausencia de fotorreceptores en algunos omatidios. En el ecuador se observan defectos más acusados (círculos) en los que hay disminución de señal, rabdómeros deformados y faltan omatidios. (D') amplificación de D.

## 6. *kay* se requiere para la diferenciación o supervivencia de todos los fotorreceptores externos

Con el fin de averiguar si los alelos mutantes de *kay* afectan la cantidad de fotorreceptores, se comparó el porcentaje de fotorreceptores que sólo expresan GFP con el porcentaje de fotorreceptores que expresan TdTomato y GFP. Los rabdómeros que solo expresan GFP corresponden a los fotorreceptores mutantes, mientras que los que expresan ambos corresponden a los fotorreceptores silvestres



**Figura 17:** Análisis estadístico de los porcentajes de fotorreceptores mutantes de *kay*<sup>1</sup>, *kay*<sup>2</sup>, *kay*<sup>4</sup>, *kay*<sup>5</sup> y control en cada tipo de fotorreceptor externo. Los datos fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía R1: F (4, 25) = 23.34, p<0.0001, R2: F (4, 25) = 21.42, p<0.0001, R3: F (4, 25) = 20.50, p<0.0001, R4: F (4, 25) = 21.42, p<0.0001, R5: F (4, 25) = 31.79, p<0.0001, R6: F (4, 25) = 28.44, p<0.0001 Las diferencias entre los distintos grupos fueron analizadas usando la prueba de Tukey para múltiples comparaciones (ver Anexos). ns = no significativo, \* p<0.05, \*\* p<0.001, \*\*\* p<0.0001, \*\*\*\* p<0.0001 n = 10 conteos de entre 40 y 50 fotorreceptores por alelo.



**Figura 13:** Análisis estadístico de los porcentajes de fotorreceptores mutantes de cada tipo de fotorreceptor externo en clones mutantes de *kay*<sup>1</sup>, *kay*<sup>2</sup>, *kay*<sup>5</sup>, *kay*<sup>4</sup> y controles. No se encontró diferencia significativa en ninguno de los análisis. Los datos fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía *kay*<sup>1</sup>:  $F(5, 30) = 1.909$   $p=0.1223$ , *kay*<sup>2</sup>:  $F(5, 30) = 0.2785$   $p=0.9213$ , *kay*<sup>5</sup>:  $F(5, 30) = 0.9159$   $p=0.4841$ , *kay*<sup>4</sup>:  $F(5, 30) = 1.732$   $p=0.1577$ .  $n = 10$  conteos de entre 40 y 50 fotorreceptores por alelo.

o heterocigotos. Los resultados indican que, en promedio, el porcentaje de fotorreceptores externos (R1-R6) mutantes en clones de *kay*<sup>1</sup>, *kay*<sup>2</sup> y *kay*<sup>5</sup> es un 50% menor que en los clones control, lo que apunta a que las mutaciones afectan a todos los tipos de fotorreceptores externos. Por otro lado, en clones de *kay*<sup>4</sup> no se encontraron diferencias con el control, excepto en el R3, donde el porcentaje de fotorreceptores mutantes es significativamente mayor (Figura 17). Además, al comparar los porcentajes de cada tipo de fotorreceptor externo para cada alelo, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de ellos (Figura 18). Estos hallazgos sugieren fuertemente que los alelos de *kay* afectan por igual a todos los fotorreceptores externos.

## VIII. DISCUSIÓN

En mamíferos, el regulador de la transcripción AP-1 es un heterodímero compuesto por c-Fos y c-Jun (Curran & Teich, 1982; Curran et al., 1982; Lee et al., 1987; Curran & Franza, 1988). En *D. melanogaster*, los homólogos de c-Fos y c-Jun, *Kay* y *Jra* respectivamente también forman el heterodímero AP-1 que regula la transcripción génica y que es un importante regulador durante el desarrollo (Perkins et al., 1990; Riesgo-Escovar et al., 1996; Glise & Noselli, 1997; Riesgo-Escovar & Hafen, 1997a; Riesgo-Escovar & Hafen, 1997b; Zeitlinger et al., 1997; Reed, et al., 2001; Lehmann et al., 2002). Sin embargo, los miembros de la vía de la cinasa de Jun, *Jra* y *bsk* no son requeridos para el desarrollo del ojo de *D. melanogaster* (Riesgo-Escovar et al., 1996; Riesgo-Escovar & Hafen, 1997b) mientras que los individuos mutantes de *kay* sí presentan defectos en el ojo. Lo que indica que *kay* actúa de forma independiente de *Jra* como lo hace en el desarrollo del intestino larvario (Riesgo-Escovar & Hafen, 1997a).

Es posible que *Kay* pueda actuar con *Jra* y con otros factores de transcripción ya que el gen codifica para cinco o quizá hasta seis transcritos diferentes (Hudson & Goldstein, 2008) y que alguno de ellos se traduzca en una proteína que no interactúe con *Jra*. Además, los transcritos de *kay* son regulados diferencialmente durante el desarrollo (Souid & Yanicostas, 2003; Alfonso-Gonzales, 2018).

### 1. La regulación diferencial de los transcritos de *kay* puede explicar la diferencia de fenotipos entre alelos

Esperábamos que *kay*<sup>1</sup> fuera el alelo con fenotipo mutante más fuerte debido a que, entre otras lesiones, tiene un codón de paro que lo hace prácticamente un nulo (Riesgo-Escovar & Hafen, 1997a). Sin embargo, encontramos que *kay*<sup>5</sup> es el alelo más fuerte en el ojo, mientras que *kay*<sup>1</sup> y *kay*<sup>2</sup> exhiben fenotipos intermedios entre los de *kay*<sup>4</sup> y *kay*<sup>5</sup>. En cambio, *kay*<sup>4</sup> es claramente el alelo más débil ya que casi siempre presenta fenotipos silvestres. Esto se contrapone al hecho que todos los alelos estudiados son letales cultivados a 25°C (Riesgo-Escovar & Hafen, 1997a; Zeitlinger et al., 1997; Bellotto et al., 2002). Durante la embriogénesis, se ha observado una expresión diferencial de algunas isoformas de *kay* (Souid &

Yanicostas, 2003; Alfonso-Gonzales, 2018), por lo que algo similar podría suceder en el ojo y ser una de las razones que explica la variabilidad de fenotipos mutantes provocados por los alelos. Además, sugiere que no todas las isoformas son igualmente importantes durante el desarrollo ocular. El hecho que *kay*<sup>1</sup> sea el alelo más fuerte durante la embriogénesis y que, en cambio, *kay*<sup>5</sup> lo sea en el ojo refuerza esta idea. Basados en la lesión molecular de *kay*<sup>5</sup>, inserción de un elemento P justo antes el primer exón de las isoformas *kayRA* y *kayRG*, y a que durante la embriogénesis la expresión de la isoforma *kayRF* se encuentra casi abolida en mutantes de *kay*<sup>1</sup>, *kay*<sup>2</sup> y *kay*<sup>5</sup>, pero en niveles normales en mutantes de *kay*<sup>4</sup> sugieren que al menos alguna de estas tres isoformas es importante para el desarrollo del ojo (Alfonso-Gonzales, 2018; Riesgo-Escovar, datos no publicados). Basados en todo esto creemos que la mutación de *kay*<sup>5</sup> afecta a isoformas cruciales para el desarrollo del ojo. En cambio, creemos que la mutación de *kay*<sup>1</sup> que en primera instancia se reportó como nula (Riesgo-Escovar & Hafen, 1997a); en realidad es un alelo hipomorfo fuerte. Esto estaría en concordancia con lo reportado por Zeitlinger et al., (1997) y Ciapponi & Bohmann (2002) cuando proponen que *kay*<sup>1</sup> no es un alelo nulo.

## **2. Todos los fotorreceptores externos requieren de *kay***

Los mutantes de *kay* afectan a todos los fotorreceptores externos por igual. Debido a que los fotorreceptores se diferencian gradualmente pensamos que *kay* se requiere temprano en el desarrollo, antes de que los fotorreceptores comiencen a diferenciarse o durante la diferenciación de todos los fotorreceptores, es decir en varias etapas del desarrollo del ojo. La pérdida de la polaridad de los omatidios con fotorreceptores mutantes refuerza la idea de que *kay* es necesario durante la diferenciación de todos los fotorreceptores. La orientación de los omatidios comienza a establecerse hasta que, al diferenciarse el R3/R4, se establece el eje dorsoventral de los omatidios (Zheng et al., 1995). Esto sugiere que *kay* podría requerirse en esta etapa, sin embargo, sí es posible que la mutación produzca defectos severos en etapas tempranas que afecten la polaridad de los fotorreceptores. Por lo tanto, es necesario observar las etapas tempranas y medias del desarrollo para determinar si *kay* afecta el inicio del desarrollo o si lo hace en múltiples ocasiones.

La falta de función de *kay* podría dificultar que las células indiferenciadas se conviertan en fotorreceptores y esto podría explicar que en ojos con clones de *kay*<sup>1</sup>, *kay*<sup>2</sup> y *kay*<sup>5</sup> hayamos encontrado una disminución del porcentaje de fotorreceptores mutantes. Ya que, siguiendo con esta hipótesis, las células silvestres o heterocigotas se diferenciarían en fotorreceptores con mayor facilidad y por ende la mayoría de los fotorreceptores serían silvestres cuando se generan clones en el ojo. Otra explicación que también explica el menor número de fotorreceptores mutantes en ojos con clones es que las células mutantes de *kay* diferenciados en fotorreceptores podrían morir tempranamente. Notamos que los clones mutantes de *kay*<sup>1</sup>, *kay*<sup>2</sup> y *kay*<sup>5</sup> abarcan pocas células y rara vez encontramos un omatidio con todos los fotorreceptores mutantes. En cambio, los clones mutantes de *kay*<sup>4</sup> y los clones silvestres siempre abarcan muchas células y siempre se encuentra omatidios con todos los fotorreceptores mutantes. Se ha reportado que *kay* interacciona con *head involution defective (hid)*, un gen proapoptótico (Luo et al., 2007), por ende, es posible que la mutación de *kay* cause apoptosis (Bilak & Su, 2009). El exceso de muerte celular en clones mutantes también podría explicarse por mecanismos de competencia celular (Baker, 2017), ya que si la mutación de *kay* vuelve a las células «sub-competentes» otras células más «competentes» podrían reemplazarlas. No obstante, se requiere demostrar que hay un aumento de muerte celular en el disco de ojo y caracterizarlo adecuadamente para confirmar alguna de estas teorías.

### **3. *kay* se requiere en todos los linajes celulares del ojo**

En un omatidio las células que forman los fotorreceptores, las células pigmentadas y las células del cono no tienen un origen clonal y derivan de linajes celulares independientes (Lawrence & Green, 1979). En cambio, las células que forman las quetas mecanorreceptoras derivan de una célula precursora. Ya que encontramos defectos en todos los fotorreceptores externos, en las células pigmentadas, en las córneas y en las quetas mecanorreceptoras podemos afirmar que *kay* afecta a todos los linajes celulares y, además, actúa en prácticamente todos los estadios de desarrollo del ojo. Durante el tercer estadio larvario inicial desarrollo del ojo. Basados en los datos obtenidos creemos que en esta etapa afecta la formación de fotorreceptores (Ready et al., 1976), durante el inicio de estadio pupal afecta la organización de las células pigmentadas y casi al final del estadio pupal

afecta la excreción de la córnea por las células de cono y la formación de las quetas mecanorreceptoras (Fröhlich, 2001). El caso de estas últimas es particular porque además de tener origen clonal no están en contacto con las células que formarán el omatidio hasta el estadio pupal, cuando se diferencia su precursor. Su diferenciación inicia en el centro y se expande hacia los márgenes a diferencia de todas las demás células que siguen un patrón posteroanterior de diferenciación (Cagan & Ready, 1989). Los defectos encontrados en la córnea y en los pezones corneales, que, al igual que las quetas mecanorreceptoras, se secretan casi al final de estadio pupal, son consistentes con una multitud de requerimientos de *kay* durante el desarrollo del ojo.

#### **4. *kay* regula la formación de los pezones corneales**

Los pezones corneales son nanoestructuras de la córnea que siguen un patrón de Turin (Blagodatski et al., 2015). Se producen por una secreción de un activador, que se difunde lento y un inhibidor que se difunde rápidamente. Se ha propuesto que Retinin, una proteína constituyente de la córnea actúe como activador y las ceras que también se secretan por las células del cono como inhibidor. La liberación de Retinin y la composición de la cera están reguladas genéticamente. Los pezones corneales en los clones de *kay* se asemejan mucho a los pezones de vistos en moscas en las que se sobre expresó *retinin* y se disminuyó la función de *CG5326*, un gen que codifica para una proteína que controla la biosíntesis de ceras en la retina (Kryuchkov et al., 2020). Esto podría indicar que *kay* podría estar regulando estos genes o a genes que los regulan y por ende es requerido para formación y disposición de los pezones corneales.

#### **5. *Kay* podría actuar como mediador de la vía de Dpp en el ojo**

Durante la embriogénesis *Kay*, independiente de *Jra*, actúa como mediador de la vía de Dpp en el epitelio lateral y en el endodermo controla la expresión de *Ance* un gen blanco de Dpp (Riesgo-Escovar & Hafen, 1997a). Por tanto, es posible que *kay* tenga un papel similar en el desarrollo del ojo. Esta idea se refuerza por los defectos observados en clones mutantes *Thickveins*, el receptor de membrana activado por Dpp (Penton et al., 1997) que son similares a los observados en clones de *Kay*. Además, cerca del sitio de la lesión, que produce el alelo *kay*<sup>5</sup>, se encuentra un sitio

de unión para el factor de transcripción final de la vía de Dpp, Mothers against dpp (Mad) (Larkin et al., 2021). Todo esto sugiere que Kay actúa río debajo de Dpp durante el desarrollo del ojo. Dado que Dpp es esencial para la establecer del surco morfogénico, (Wiersdorff et al., 1996; Domínguez & Casares, 2005), formar preclusters de fotorreceptores (Pan & Rubin, 1995; Borod & Heberlein, 1998) y producir la segunda ola mitótica (Penton et al., 1997; Horsfield et al., 1998), es plausible que la ausencia de función de Kay en la vía de Dpp explique los defectos observados en clones mutantes de *kay* en el ojo.

## IX. CONCLUSIONES

1. *kay* es importante para desarrollo adecuado de todos los linajes celulares del ojo de *D. melanogaster*.
2. La regulación diferencial de los transcritos de *kay* puede explicar las diferencias entre alelos, lo que sugiere que no todas las isoformas son igualmente importantes para la formación del ojo.
3. Las alteraciones tanto en los fotorreceptores como en las quetas y las córneas apuntan a que *kay* es requerido en distintas etapas del desarrollo del ojo.
4. En el desarrollo del ojo *kay* podría ser uno de los genes regulados por la vía de Dpp.
5. Para comprender cómo la falta de función de *kay* afecta el desarrollo del ojo, se requieren estudios en discos de ojo, pues es ahí donde se produce la diferenciación de las células que darán lugar a un omatidio.

## **X. PERSPECTIVAS**

1. Caracterizar en discos de ojos los defectos en el desarrollo producidos por la falta de función de *kay*.
2. Observar durante el desarrollo de ojo si las isoformas se expresan diferencialmente, luego identificar las que son más cruciales para el desarrollo del ojo y determinar si la sobreexpresión de esas isoformas rescata el fenotipo en un alelo nulo de *kay*.
3. Realizar interacciones genéticas con miembros de la vía de Dpp para determinar fehacientemente si Kay está río abajo de esta vía.
4. Identificar genes diferencialmente expresados, mediante un análisis transcriptómico, en tejido mutante de *kay* comparado con el tejido silvestre para identificar genes diana de *kay*.

## XI. REFERENCIAS

- Alfonso-Gonzales, C. (2018). *Análisis de la expresión de las isoformas kayak-RG y kayak-RF en la embriogénesis de Drosophila melanogaster [Tesis de Maestría no publicada]*. Maestría en Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Querétaro.
- Alfonso-Gonzales, C., & Riesgo-Escovar, J. (2018). Fos metamorphoses: lessons from mutants in model organisms. *Mechanisms of Development*, 154, 73-81. doi:10.1016/j.mod.2018.05.006
- Baker, N. E. (2017). Mechanisms of cell competition emerging from *Drosophila* studies. *Current Opinion in Cell Biology*, 48, 40-46. doi:10.1016/j.ceb.2017.05.002
- Banerjee, U., Renfranz, P. J., Pollock, J. A., & Benzer, S. (1987). Molecular characterization and expression of *sevenless*, a gene involved in neuronal pattern formation in the *Drosophila* eye. *Cell*, 42(2), 281-291.
- Bastock, R., & St Johnston, D. (2008). *Drosophila* oogenesis. *Current Biology*, 18(23), R1082-R1087. doi:10.1016/j.cub.2008.09.011.
- Bellotto, M., Bopp, D., Senti, K. A., Burke, R., Deak, P., Maroy, P., . . . Hafen, E. (2002). Maternal-effect loci involved in *Drosophila* oogenesis and embryogenesis: P element-induced mutations on the third chromosome. *The International Journal Developmental Biology*, 46(1), 149-157.
- Berhard, C. G., Miller, W. H., & Moller, A. (1963). Function of the corneal nipples in the compound eyes of insects. *Acta Physiologica Scandinavica*, 58, 381-382. doi:10.1111/j.1748-1716.1963.tb02661.x
- Bernhard, C. D., & Miller, W. H. (1962). A corneal nipple pattern in insect compound eyes. *Acta Physiologica Scandinavica*, 52, 385-386. doi:10.1111/j.1748-1716.1962.tb02515.x
- Biggs, W. H., Zavitz, K. H., Dickson, B., van des Straten, A., Brunner, D., Hafen, E., & Zipursky, S. L. (1994). The *Drosophila* rolled locus encodes a MAP kinase required in the Sevenless signal transduction pathway. *The EMBO Journal*, 13(7), 1628-1635. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06426.x

- Bilak, A., & Su, T. T. (2009). Regulation of *Drosophila melanogaster* pro-apoptotic gene *hid*. *Apoptosis: an International Journal on Programmed Cell Death*, 14(8), 943-949. doi:10.1007/s10495-009-0374-2
- BioVision Technologies, Inc. (2006). iVision-Mac. [software]. <https://www.biovis.com/ivision.html>
- Blagodatski, A., Sergeev, A., Kryuchkov, M., Lopatina, Y., & Katanaev, V. L. (2015). Diverse set of Turing nanopatterns coat corneae across insect lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(34), 10750-10755. doi:10.1073/pnas.1505748112
- Borod, E. R., & Heberlein, U. (1998). Mutual regulation of *decapentaplegic* and *hedgehog* during the initiation of differentiation in the *Drosophila* retina. *Developmental Biology*, 197(2), 187-197. doi:10.1006/dbio.1998.8888
- Boyle, M. J., French, R. L., Cosand, K. A., Dorman, J. B., Kiehart, D. P., & Berg, C. A. (2010). Division of labor: subsets of dorsal-appendage-forming cells control the shape of the entire tube. *Developmental Biology*, 346(1), 68-79. doi:10.1016/j.ydbio.2010.07.018
- Brunner, D., Dücker, K., Oellers, N., Hafen, E., Scholz, H., & Klämbt, C. (1994). The ETS domain protein pointed-P2 is a target of MAP kinase in the Sevenless signal transduction pathway. *Nature*, 370(6488), 386-389. doi: 10.1038/370386a0
- Cagan, R. L., & Ready, D. F. (1989). The emergence of order in the *Drosophila* pupal retina. *Developmental Biology*, 136(2), 346-362. doi:10.1016/0012-1606(89)90261-3
- Calleja, M., Herranz, H., Estella, C., Casal, J., Lawrence, P., Simpson, P., & Morata, G. (2000). Generation of medial and lateral dorsal body domains by the *pannier* gene of *Drosophila*. *Development*, 127(18), 3971-3980. doi:10.1242/dev.127.18.3971
- Carl Zeiss Microscopy GmbH. (2016). ZEN 3.4 - Blue edition software for microscopy. [software]. <https://www.zeiss.com/microscopy/us/products/microscope-software/zen.html>
- Cenik, E. S., & Zamore, P. D. (2011). Argonaute proteins. *Current Biology*, 21(12), R446-R449. doi:10.1016/j.cub.2011.05.020

- Cerrato, A., Parisi, M., Santa Anna, S., Missirlis, F., Guru, S., Agarwal, S., . . . Olivier, B. (2006). Genetic interactions between *Drosophila melanogaster* *menin* and Jun/Fos. *Developmental Biology*, *298*(1), 59-70. doi:10.1016/j.ydbio.2006.06.013
- Chen, T. Y. (1929). On the development of imaginal buds in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *Journal of Morphology*, *47*(1), 135-199. doi:https://doi.org/10.1002/jmor.1050470105
- Ciapponi, L., & Bohmann, D. (2002). An essential function of AP-1 heterodimers in *Drosophila* development. *Mechanisms of Development*, *115*(2), 35-40. doi:10.1016/s0925-4773(02)00093-x
- Ciapponi, L., Jackson, D. B., Mlodzik, M., & Bohman, D. (2001). *Drosophila* Fos mediates ERK and JNK signals via distinct phosphorylation sites. *Genes & Development*, *15*(12), 1540-1553. Doi: 10.1101/gad.886301
- Curran, T., & Franza, B. R. (1988). Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell*, *55*(3), 395-397. doi:10.1016/0092-8674(88)90024-4
- Curran, T., & Teich, N. M. (1982). Identification of a 39,000-dalton protein in cells transformed by the FBJ murine osteosarcoma virus. *Virology*, *116*(1), 221-235. doi:10.1016/0042-6822(82)90415-9
- Curran, T., Peters, G., Van Beveren, C., Teich, N. M., & Verma, I. M. (1982). FBJ murine osteosarcoma virus: identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. *Journal of Virology*, *44*(2), 674-682. doi:10.1128/JVI.44.2.674-682.1982
- Davis, T. L., & Rebay, I. (2017). Master regulators in development: views from the *Drosophila* retinal determination and mammalian pluripotency gene networks. *Developmental Biology*, *421*(2), 93-107. doi:10.1016/j.ydbio.2016.12.005
- Dequier, E., Souid, S., Pál, M., Maróy, P., Lepesant, J.-A., & Yanicostas, C. (2001). Top-DER- and DPP-dependent requirements for the *Drosophila fos/kayak* gene in follicular epithelium morphogenesis. *Mechanisms of Development*, *106*(2), 47-60. doi:10.1016/s0925-4773(01)00418-x.
- Dobens, L. L., Martín-Blanco, E., Martínez-Arias, A., Kafatos, F. C., & Raftery, L. A. (2001). *Drosophila puckered* regulates Fos/Jun levels during follicle cell morphogenesis. *Development*, *128*(10), 1845-1856. doi:10.1242/dev.128.10.

- Domínguez, M., & Casares, F. (2005). Organ specification-growth control connection: new in-sights from the *Drosophila* eye-antennal disc. *Developmental Dynamics*, 232(3), 673-684. doi:10.1002/dvdy.20311
- Domínguez, M., & Hafen, E. (1997). Hedgehog directly controls initiation and propagation of retinal differentiation in the *Drosophila* eye. *Genes & Development*, 11(23), 3254-3264. doi:10.1101/gad.11.23.3254
- Dominguez, M., Wasserman, J. D., & Freeman, M. (1998). Multiple functions of the EGF receptor in *Drosophila* eye development. *Current Biology*, 8(19), 1039-1048. doi:10.1016/s0960-9822(98)70441-5
- Dorman, J. B., James, K., Fraser, S. E., Kiehart, D. P., & Berg, C. A. (2004). *bullwinkle* is required for epithelial morphogenesis during *Drosophila* oogenesis. *Developmental Biology*, 267(2), 320-341. doi:https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.10.020
- Dourlen, P., Levet, C., Mejat, A., Gambis, A., & Mollereau, B. (2013). The *Tomato/GFP-FLP/FRT* method for live imaging of mosaic adult *Drosophila* photoreceptor cells. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 79, e50610. doi:10.3791/50610
- Dunn, O. J., & Clark, V. (1969). Correlation coefficients measured on the same individuals. *Journal of the American Statistical Association*, 64(325), 366-377. doi: 10.1080/01621459.1969.10500981
- Escobedo, S., Zirin, J., & Weake, V. (2019). TRiP stocks contain a previously uncharacterized loss-of-function *sevenless* allele. *microPublication Biology*, 10.17912. doi:10.17912/micropub.biology.000097
- Extavour, C. G., & Akam, M. (2003). Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development*, 130(24), 5869-5884. doi:10.1242/dev.00804
- Fanto, M., Weber, U., Strutt, D. I., & Mlodzik, M. (2000). Nuclear signaling by Rac and Rho GTPases is required in the establishment of epithelial planar polarity in the *Drosophila* eye. *Current Biology*, 10(16), 979-988. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00645-x

- Fisher, R. A. (1915). Frequency distribution of the values of the correlation coefficient in samples from an indefinitely large population. *Biometrika*, 10(4), 507-521. doi:10.2307/2331838
- Franciscovich, A. L., Vrailas Mortiner, A. D., Freeman, A. A., Gu, J., & Sanyal, S. (2008). Overexpression screen in *Drosophila* identifies neuronal roles of GSK-3b/shaggy as a regulator of AP-1-dependent developmental plasticity. *Genetics*, 180(4), 2057-2071. doi: 10.1534/genetics.107.085555
- Freeman, M. (1994). The *spitz* gene is required for photoreceptor determination in the *Drosophila* eye where it interacts with the EGF receptor. *Mechanisms of Development*, 48(1), 25-33. doi:10.1016/0925-4773(94)90003-5
- Fröhlich, A. (2001). A scanning electron-microscopic study of apical contacts in the eye during postembryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Cell and Tissue Research*, 303(1), 117-128. doi:10.1007/s004410000306
- García-Bellido, A., & Merriam, J. R. (1969). Cell lineage of the imaginal discs in *Drosophila* gynandromorphs. *The Journal of Experimental Zoology*, 170(1), 61-75. doi:10.1002/jez.1401700106
- Glise, B., & Noselli, S. (1997). Coupling of Jun amino-terminal kinase and Decapentaplegic signaling pathways in *Drosophila* morphogenesis. *Genes & Development*, 11(3), 1738-1747. doi:10.1101/gad.11.13.1738
- Glise, B., Bourbon, H., & Noselli, S. (1995). *hemipterous* encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell*, 83(3), 451-461. doi:10.1016/0092-8674(95)90123-x
- Glover, J. N., & Harrison, S. C. (1995). Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature*, 373(6511), 257-261. doi:10.1038/373257a0
- GraphPad Software. (2021). Prism (Versión 9). [software]. <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>
- Hafen, E., Basler, K., Edstroem, J. E., & Rubin, G. M. (1987). *sevenless*, a cell-specific homeotic gene of *Drosophila*, encodes a putative transmembrane receptor with a tyrosine kinase domain. *Science*, 236(4797), 55-63. doi: 10.1126/science.2882603

- Hayes , P., & Solon , J. (Apr de 2017). *Drosophila* dorsal closure: An orchestra of forces to zip shut the embryo. *Mechanisms of Development*, 144(Pt A), 2-10. doi:10.1016/j.mod.2016.12.005
- Heberlin, U., Wolff, T., & Rubin, G. M. (1993). The TGF beta homolog *dpp* and the segment polarity gene *hedgehog* are required for propagation of a morphogenetic wave in the *Drosophila* retina. *Cell*, 75(5), 913-926. doi:10.1016/0092-8674(93)90535-x
- Hoppler, S., & Bienz, M. (1994). Specification of a single cell type by a *Drosophila* homeotic gene. *Cell*, 76(4), 689-702. doi:10.1016/0092-8674(94)90508-8
- Horsfield, J., Penton, A., Secombe, J., Hoffman, F. M., & Richardson, H. (1998). *decapentaplegic* is required for arrest in G1 phase during *Drosophila* eye development. *Development*, 125(24), 5069-5078. doi:10.1242/dev.125.24.5069
- Hudson, S. G., & Goldstein, E. S. (2008). The gene structure of the *Drosophila melanogaster* proto-oncogene, *kayak*, and its nested gene, *fos-intronic gene*. *Gene*, 420(1), 76-81. doi:10.1016/j.gene.2008.05.001
- Hudson, S. G., Garrett, M. J., Carlson, J. W., Micklem, G., Celniker, S. E., Goldstein, E. S., & Newfeld, S. J. (2007). Phylogenetic and genome wide analyses suggest a functional relationship between *kayak*, the *Drosophila fos* homolog, and *fig*, a predicted protein phosphatase 2C nested within a *kayak* intron. *Genetics*, 177(3), 1349-1361. doi:10.1534/genetics.107.071670
- Hyun, J., Bécam, I., Yanicostas, C., & Bohmann, D. (2006). Control of G2/M Transition by *Drosophila Fos*. *Molecular and Cellular Biology*, 26(22), 8293-8302. doi: 10.1128/MCB.02455-05
- Jumper, J., Richard, E., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., . . . Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583-589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2
- Jürgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C., & Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. II. Zygotic loci on the third chromosome. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*, 193(5), 283-295. doi:10.1007/BF00848157

- Klein, J. D., Qu, C., Yang, X., Fan, Y., Tang, C., & Peng, J. C. (2016). *c-Fos* repression by piwi regulates *Drosophila* ovarian germline formation and tissue morphogenesis. *PLoS Genetics*, *12*(9), e1006281.  
doi:10.1371/journal.pgen.1006281
- Kloc, M., Bilinski, S., & Etkin, L. D. (2004). The Balbiani body and germ cell determinants: 150 years later. *Current Topics in Developmental Biology*, *59*, 1-36. doi:10.1016/S0070-2153(04)59001-4
- Krafka, J. J. (1924). Development of the compound eye of *Drosophila melanogaster* and its bar-eyed mutant. *The Biological Bulletin*, *47*, 143-149.  
doi:10.2307/1536493
- Kramer, H., Cagan, R. L., & Zipursky, S. L. (1991). Interaction of Bride of Sevenless membrane-bound ligand and the Sevenless tyrosine-kinase receptor. *Nature*, *352*(6332), 207-212. doi: 10.1038/352207a0
- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, *74*(260), 583-621.  
doi:10.1080/01621459.1952.10483441
- Kryuchkov, M., Bilousov, O., Lehmann, J., Fiebig, M., & Katanaev, V. L. (2020). Reverse and forward engineering of *Drosophila* corneal nanocoatings. *Nature*, *585*(7825), 383–389. doi:10.1038/s41586-020-2707-9
- Kryuchkov, M., Katanev, V. L., Enin, G. A., Sergeev, A., Timchenko, A. A., & Serdyuk, I. N. (2011). Analysis of micro- and nano-structures of the corneal surface of *Drosophila* and its mutants by atomic force microscopy and optical diffraction. *PloS One*, *6*(7), e22237. doi:10.1371/journal.pone.0022237
- Kumar, J. P. (2010). Retinal determination the beginning of eye development. *Current Topics in Developmental Biology*, *93*, 1-28. doi:10.1016/B978-0-12-385044-7.00001-1
- Larkin , A., Marygold, S. J., Antonazzo, G., Attrill, H., Dos Santos, G., Garapati, P., . . . FlyBase Consortium. (2021). FlyBase: updates to the *Drosophila melanogaster* knowledge base. *Nucleic Acid Research*, *49*(D1), D899-D907.  
doi: 10.1093/nar/gkaa1026

- Lawrence, P. A., & Green, S. M. (1979). Cell lineage in the developing retina of *Drosophila*. *Developmental Biology*, 71(1), 142-152. doi:10.1016/0012-1606(79)90088-5
- Lee, W., Haslinger, A., Karin, M., & Tijian, R. (1987). Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human *metallothionein* gene and *SV40*. *Nature*, 325(6102), 268-372. doi: 10.1038/325368a0
- Lehmann, M., Jiang, C., Ip, Y. T., & Thummel, C. S. (2002). AP-1, but not NF-kappa B, is required for efficient steroid-triggered cell death in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation*, 9(5), 581-590. doi:10.1038/sj.cdd.4401003
- Luo, X., Puig, O., Hyun, J., Bohmann, D., & Jasper, H. (2007). Foxo and Fos regulate the decision between cell death and survival in response to UV irradiation. *The EMBO Journal*, 26(2), 380-390. doi:10.1038/sj.emboj.7601484
- Ma, C., Zhou, Y., Beachy, P. A., & Moses, K. (1993). The segment polarity gene *hedgehog* is required for progression of the morphogenetic furrow in the developing *Drosophila* eye. *Cell*, 75(5), 927-938. doi:10.1016/0092-8674(93)90536-y
- Meserve, J. H., & Duronio, R. J. (2017). A population of G2-arrested cells are selected as sensory organ precursors for the interommatidial bristles of the *Drosophila* eye. *Developmental Biology*, 430(2), 374-384. doi:10.1016/j.ydbio.2017.06.023
- Mishra, M., & Knust, E. (2019). Analysis of the *Drosophila* compound eye with light and electron microscopy. En B. Weber, T. Langmann, B. H. Weber, & T. Langmann (Edits.), *Retinal Degeneration. Methods in Molecular Biology* (1 ed., págs. 345-364). New York, NY: Humana. doi:10.1007/978-1-49
- Montell, D. J. (1994). Moving right along: regulation of cell migration during *Drosophila* development. *Trends in Genetics*, 10(2), 59-62. doi:10.1016/0168-9525(94)90150-3
- Neuman-Silberberg, F. S., & Schüpbach, T. (1993). The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein. *Cell*, 75(1), 165-174. doi:10.1016/S0092-8674(05)80093-5

- Niewiadomska , P., Godt, D., & Tepass, U. (1999). DE-Cadherin is required for intercellular motility during *Drosophila* oogenesis. *The Journal of Cell Biology*, *144*(3), 533-547. doi:10.1083/jcb.144.3.533
- Noselli, S., & Agnès, F. (1999). Roles of the JNK signaling pathway in *Drosophila* morphogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development*, *9*(4), 466-472. doi:10.1016/S0959-437X(99)80071-9
- Pan, D., & Rubin, G. M. (1995). cAMP-dependent protein kinase and Hedgehog act antagonistically in regulating *decapentaplegic* transcription in *Drosophila* imaginal discs. *Cell*, *80*(4), 543-552. doi:10.1016/0092-8674(95)90508-1
- Pasakarnis, L., Frei, E., Caussinus, E., Affolter, M., & Brunner, D. (2016). Amnioserosa cell constriction but not epidermal actin cable tension autonomously drives dorsal closure. *Nature Cell Biology*, *18*(11), 1161-1172. doi:10.1038/ncb3420
- Penton, A., Selleck, S. B., & Hoffmann, F. M. (1997). Regulation of cell cycle synchronization by *decapentaplegic* during *Drosophila* eye development. *Science*, *275*(5297), 203-206. doi:10.1126/science.275.5297.203
- Perkins, L. A., Holderbaum, L., Tao, R., Hu, Y., Sopko, R., McCall, K., . . . Perrimon, N. (2015). The transgenic RNAi project at Harvard Medical School: resources and validation. *Genetics*, *201*(3), 843-852. doi:10.1534/genetics.115.180208
- Perkins, K. K., Amon, A., Patel, N., & Tijian, R. (1990). The *Drosophila* Fos-related AP-1 protein is a developmentally regulated transcription factor. *Genes & Development*, *4*(5), 822-834. doi:10.1101/gad.4.5.822
- Ready, D. F., Hanson, T. E., & Benzer, S. (1976). Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Developmental Biology*, *53*(2), 217-240. doi:10.1016/0012-1606(76)90225-6
- Reed, B. H., Wilk, R., & Lipshitz, H. D. (2001). Downregulation of Jun kinase signaling in the amnioserosa is essential for dorsal closure of the *Drosophila* embryo. *Current Biology*, *11*(14), 1098-1108. doi:10.1016/s0960-9822(01)00318-9
- Reinke, R., & Zipursky, S. L. (1988). Cell-cell interaction in the *Drosophila* retina: the *bride of sevenless* gene is required in photoreceptor cell R8 for R7 cell development. *Cell*, *55*(2), 321-330. doi:10.1016/0092-8674(88)90055-4

- Riese, J., Tremml, G., & Bienz, M. (1997). *D-fos*, a target gene of Decapentaplegic signalling with a critical role during *Drosophila* endoderm induction. *Development*, *124*(17), 3353-3361. doi:10.1242/dev.124.17.3353
- Riesgo-Escovar, J. R., & Hafen, E. (1997a). Common and distinct roles of DFos and DJun during *Drosophila* development. *Science*, *278*(5338), 669-672. doi:10.1126/science.278.5338.669
- Riesgo-Escovar, J. R., & Hafen, E. (1997b). *Drosophila* Jun kinase regulates expression of *decapentaplegic* via the ETS-domain protein Aop and the AP-1 transcription factor DJun during dorsal closure. *Genes & Development*, *11*(13), 1717-1727. doi:doi.org/10.1101/gad.11.13.1717
- Riesgo-Escovar, J., Jenni, M., Fritz, A., & Hafen, E. (1996). The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes & Development*, *10*(21), 2769-2768. doi:10.1101/gad.10.21.2759
- Rios Barrera, L. D., & Riesgo-Escovar, J. R. (2013). Regulating cell morphogenesis: the *Drosophila* Jun N-terminal kinase pathway. *Genesis*, *51*(3), 147-162. doi: 10.1002/dvg.22354
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., . . . Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676-682. doi:10.1038/nmeth.2019
- Simon, M. A., Bowtell, D. D., & Rubin, G. M. (1989). Structure and activity of the Sevenless protein: a protein tyrosine kinase receptor required for photoreceptor development in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(21), 8333-8337. doi:10.1073/pnas.86.21.8333
- Simon, M. A., Bowtell, D. D., Dodson, G. S., Laverty, T. R., & Rubin, G. M. (1991). Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the Sevenless protein tyrosine kinase. *Cell*, *61*(4), 701-706. doi:10.1016/0092-8674(91)90065-7
- Soud, S., & Yanicostas, C. (2003). Differential expression of the two *Drosophila fos/kayak* transcripts during oogenesis and embryogenesis. *Developmental Dynamics*, *227*(1), 150-154. doi:10.1002/dvdy.10293

- Spencer, S. A., Powell, P. A., Miller, D. T., & Cagan, R. L. (1998). Regulation of EGF receptor signaling establishes pattern across the developing *Drosophila* retina. *Development*, 125(23), 4777-4790. doi:10.1242/dev.125.23.477
- Student. (1908). The probable error of a mean. *Biometrika*, 6(1), 1-25.
- Stumm-Tegethoff, B. F., & Dicke, A. W. (1974). Surface structure of the compound eye of various *Drosophila* species and eye mutants of *Drosophila melanogaster*. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische und Angewandte Genetik*, 44(6), 262-265. doi:10.1007/BF00278740
- Suzanne, M., Perrimon, N., & Noselli, S. (2001). The *Drosophila* JNK pathway controls the morphogenesis of the egg dorsal appendages and micropyle. *Developmental Biology*, 237(1), 282-294. doi:10.1006/dbio.2001.038
- Szűts, D., & Bienz, M. (2000). LexA chimeras reveal the function of *Drosophila* Fos as a context-dependent transcriptional activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), 5351-5356. doi:10.1073/pnas.97.10.5351
- Tio, M., Ma, C., & Moses, K. (1994). *spitz*, a *Drosophila* homolog of transforming growth factor- $\alpha$ , is required in the founding photoreceptor cells of the compound eye facets. *Mechanisms of Development*, 48(1), 13-23. doi:10.1016/0925-4773(94)90002-7
- Tomlinson, A., & Ready, D. F. (1987). Neuronal differentiation in *Drosophila* ommatidium. *Developmental Biology*, 120(2), 366-367. doi:10.1016/0012-1606(87)90239-9
- Tran, D. H., & Berg, C. A. (2003). *bullwinkle* and *shark* regulate dorsal-appendage morphogenesis in *Drosophila* oogenesis. *Development*, 130(25), 6273-6282. doi:10.1242/dev.00854
- Tremml, G., & Bienz, M. (1992). Induction of *labial* expression in the *Drosophila* endoderm: response elements for *dpp* signalling and for autoregulation. *Development*, 116(2), 447-456. doi:10.1242/dev.116.2.447
- Tripathi, B. K., & Irvine, K. D. (2022). The wing imaginal disc. *Genetics*, 220(4), iyac020. doi:10.1093/genetics/iyac020
- Tukey, J. W. (1949). Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*, 5(2), 99-114. doi:10.2307/3001913

- Twombly, V., Blackman, R. K., Jin, H., Graff, J. M., Padgett, R. W., & Gelbart, W. M. (1996). The TGF-beta signaling pathway is essential for *Drosophila* oogenesis. *Development*, *122*(5), 1555-1565. doi:10.1242/dev.122.5.1555
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., . . . Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D439-D444. doi:10.1093/nar/gkab1061
- Weasner, B. P., & Kumar, J. (2022). The early history of the eye-antennal disc of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *221*(1), iyac041. doi:https://doi.org/10.1093/genetics/iyac041
- Weber, U., Pataki, C., Mihaly, J., & Mlodzik, M. (2008). Combinatorial signaling by the Frizzled/PCP and Egfr pathways during planar cell polarity establishment in the *Drosophila* eye. *Developmental Biology*, *316*(1), 110-123. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.01.016
- Wiersdorff, V., Lecuit, T., Cohen, S. M., & Mlodzik, M. (1996). Mad acts downstream of Dpp receptors, revealing a differential requirement for Dpp signaling in initiation and propagation of morphogenesis in the *Drosophila* eye. *Development*, *122*(7), 2153-2162. doi:10.1242/dev.122.7.2153
- Wolff, T., & Ready, D. F. (1993). Pattern formation in the *Drosophila* retina. En M. Bate, & A. Martínez Arias, *The development of Drosophila melanogaster* (Vol. 2, págs. 1278-1325). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Yin, Z., Machius, M., Nestler, E., & Rudenko, G. (2017). Activator Protein-1: redox switch controlling structure and DNA-binding. *Nucleic Acids Research*, *45*(19), 11425-11436. doi:10.1093/nar/gkx795
- Zeitlinger, J., & Bohmann, D. (1999). Thorax closure in *Drosophila*: involvement of Fos and the JNK pathway. *Development*, *126*(17), 3947-3956. doi:10.1242/dev.126.17.3947
- Zeitlinger, J., Kockel, L., Peverali, F. A., Jackson, D. B., Mlodzik, M., & Bohman, D. (1997). Defective dorsal closure and loss of epidermal *decapentaplegic* expression in *Drosophila fos* mutants. *The EMBO Journal*, *16*(24), 7393-7401. doi:10.1093/emboj/16.24.7393

Zheng, L., Zhang, J., & Carthew, R. W. (1995). *frizzled* regulates mirror-symmetric pattern formation in the *Drosophila* eye. *Development*, 121(9), 3045-3055. doi:10.1242/dev.121.9.3045

## XII. ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1</i> .....	10
<i>Figura 2</i> .....	16
<i>Figura 3</i> .....	27
<i>Figura 4</i> .....	29
<i>Figura 5</i> .....	30
<i>Figura 6</i> .....	31
<i>Figura 7</i> .....	33
<i>Figura 8</i> .....	37
<i>Figura 9</i> .....	39
<i>Figura 10</i> .....	40
<i>Figura 11</i> .....	41
<i>Figura 12</i> .....	42
<i>Figura 13</i> .....	43
<i>Figura 14</i> .....	44
<i>Figura 15</i> .....	46
<i>Figura 16</i> .....	47
<i>Figura 17</i> .....	48
<i>Figura 18</i> .....	49

### XIII. ANEXOS

**Tabla 1:** Datos estadísticos

Figura	ANOVA de una vía o prueba de Kruskal-Wallis	Grupo comparados (Prueba de Tukey o Dunn)	Diferencia de medias	95.00% CI	Valor de P
8A	F (4, 41) = 48.90	Control vs. <i>kay</i> <sup>1</sup>	-0.3301	-0.5118 to -0.1485	<0.0001
		Control vs. <i>kay</i> <sup>2</sup>	-0.3456	-0.5223 to -0.1688	<0.0001
		Control vs. <i>kay</i> <sup>5</sup>	-0.7554	-0.9370 to -0.5738	<0.0001
		Control vs <i>kay</i> <sup>4</sup>	0.05000	-0.1375 to 0.2375	0.9403
10A	F (4, 35) = 8.541	Control vs. <i>kay</i> <sup>1</sup>	44.56	-89.20 to 178.3	0.8719
		Control vs. <i>kay</i> <sup>2</sup>	28.53	-125.1 to 182.2	0.9832
		Control vs. <i>kay</i> <sup>5</sup>	159.8	28.78 to 290.9	0.0104
		Control vs <i>kay</i> <sup>4</sup>	-66.07	-197.1 to 64.99	0.6010
10B	F (4, 35) = 7.643	Control vs. <i>kay</i> <sup>1</sup>	0.03581	-0.0689 to 0.1405	0.8611
		Control vs. <i>kay</i> <sup>2</sup>	0.08641	-0.0339 to 0.2067	0.2579
		Control vs. <i>kay</i> <sup>5</sup>	0.1399	0.0373 to 0.2425	0.0034
		Control vs <i>kay</i> <sup>4</sup>	-0.01462	-0.1172 to 0.0879	0.9938
10C	F (4, 35) = 4.612	Control vs. <i>kay</i> <sup>1</sup>	-26.70	-64.36 to 10.97	0.2699
		Control vs. <i>kay</i> <sup>2</sup>	-41.36	-84.63 to 1.918	0.0668
		Control vs. <i>kay</i> <sup>5</sup>	-52.72	-89.63 to -15.82	0.0020
		Control vs <i>kay</i> <sup>4</sup>	-38.56	-75.47 to -1.659	0.0369
12A	406.1	Control vs. <i>kay</i> <sup>1</sup>	-563.2	N/A	<0.0001
		Control vs. <i>kay</i> <sup>2</sup>	-503.4	N/A	<0.0001
		Control vs. <i>kay</i> <sup>5</sup>	-503.3	N/A	<0.0001
		Control vs <i>kay</i> <sup>4</sup>	35.37	N/A	>0.9999
12B	370.3	Control vs. <i>kay</i> <sup>1</sup>	408.4	N/A	<0.0001
		Control vs. <i>kay</i> <sup>2</sup>	753.0	N/A	<0.0001
		Control vs. <i>kay</i> <sup>5</sup>	453.0	N/A	<0.0001
		Control vs <i>kay</i> <sup>4</sup>	148.3	N/A	0.0022
12C	575.9	Control vs. <i>kay</i> <sup>1</sup>	-590.2	N/A	<0.0001
		Control vs. <i>kay</i> <sup>2</sup>	-768.8	N/A	<0.0001
		Control vs. <i>kay</i> <sup>5</sup>	-575.7	N/A	<0.0001
		Control vs <i>kay</i> <sup>4</sup>	-26.68	N/A	>0.9999
13D	691.7	Control vs. <i>kay</i> <sup>1</sup>	371.0	N/A	<0.0001
		Control vs. <i>kay</i> <sup>2</sup>	472.3	N/A	<0.0001
		Control vs. <i>kay</i> <sup>5</sup>	367.0	N/A	<0.0001
		Control vs <i>kay</i> <sup>4</sup>	-205.9	N/A	<0.0001

13D	F (3, 51) = 204.9	<b>Control vs. <i>kay</i><sup>1</sup></b>	6.733	5.995 to 7.472	<0.0001
		<b>Control vs. <i>kay</i><sup>2</sup></b>	4.020	3.209 to 4.830	<0.0001
		<b>Control vs. <i>kay</i><sup>5</sup></b>	5.328	4.590 to 6.067	<0.0001
16 R1	F (4, 25) = 23.34	<b>Control vs. <i>kay</i><sup>1</sup></b>	45.78	24.67 to 66.88	<0.0001
		<b>Control vs. <i>kay</i><sup>2</sup></b>	35.54	14.44 to 56.65	0.0007
		<b>Control vs. <i>kay</i><sup>5</sup></b>	49.02	27.91 to 70.12	<0.0001
		<b>Control vs <i>kay</i><sup>4</sup></b>	-11.35	-32.45 to 9.759	0.4464
16 R2	F (4, 25) = 21.42	<b>Control vs. <i>kay</i><sup>1</sup></b>	36.74	10.71 to 62.78	0.0041
		<b>Control vs. <i>kay</i><sup>2</sup></b>	45.35	19.32 to 71.39	0.0005
		<b>Control vs. <i>kay</i><sup>5</sup></b>	58.21	32.17 to 84.24	<0.0001
		<b>Control vs <i>kay</i><sup>4</sup></b>	-19.68	-45.72 to 6.351	0.1783
16 R3	F (4, 25) = 20.50	<b>Control vs. <i>kay</i><sup>1</sup></b>	47.46	19.49 to 75.43	0.0006
		<b>Control vs. <i>kay</i><sup>2</sup></b>	42.68	14.71 to 70.64	0.0019
		<b>Control vs. <i>kay</i><sup>5</sup></b>	42.95	14.99 to 70.92	0.0018
		<b>Control vs <i>kay</i><sup>4</sup></b>	-30.24	-58.21 to -2.274	0.0313
16 R4	F (4, 25) = 21.42	<b>Control vs. <i>kay</i><sup>1</sup></b>	50.46	21.35 to 79.56	0.0005
		<b>Control vs. <i>kay</i><sup>2</sup></b>	44.26	15.15 to 73.36	0.0020
		<b>Control vs. <i>kay</i><sup>5</sup></b>	62.57	33.46 to 91.67	<0.0001
		<b>Control vs <i>kay</i><sup>4</sup></b>	-22.96	-52.07 to 6.142	0.1522
16 R5	F (4, 25) = 31.79	<b>Control vs. <i>kay</i><sup>1</sup></b>	61.55	40.08 to 83.02	<0.0001
		<b>Control vs. <i>kay</i><sup>2</sup></b>	40.02	18.55 to 61.49	0.0002
		<b>Control vs. <i>kay</i><sup>5</sup></b>	47.18	25.71 to 68.65	<0.0001
		<b>Control vs <i>kay</i><sup>4</sup></b>	-15.60	-37.07 to 5.873	0.2048
16 R6	F (4, 25) = 28.44	<b>Control vs. <i>kay</i><sup>1</sup></b>	51.74	30.63 to 72.84	<0.0001
		<b>Control vs. <i>kay</i><sup>2</sup></b>	43.41	22.30 to 64.52	<0.0001
		<b>Control vs. <i>kay</i><sup>5</sup></b>	55.01	33.90 to 76.12	<0.0001
		<b>Control vs <i>kay</i><sup>4</sup></b>	-9.595	-30.70 to 11.51	0.5878