



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE GRUPOS  
NEURONALES DISCRETOS EN EL SISTEMA  
NERVIOSO CENTRAL DE *Drosophila melanogaster*  
INVOLUCRADOS EN LA FERTILIDAD”

**T E S I S**

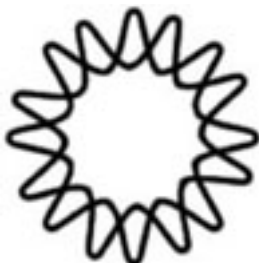
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A:

**ROCÍO RODRÍGUEZ VALENTÍN**

ASESOR: DR. ENRIQUE REYNAUD GARZA



CUERNAVACA, MORELOS.

2009

*A mis padres, Agustín y Ofelia*

*A mi hermana Fátima*

*A la vida...*

*Gracias*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Enrique Reynaud por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por compartir conmigo sus ideas y su pasión por la ciencia.

Al Dr. Mario Zurita por sus consejos y por recibirme en su laboratorio.

Al Dr. Ignacio Lopez, al Dr. Ramón Jonquera y al Dr. Pedro Labarca por su colaboración para la realización de este trabajo.

A los miembros del comité tutorial, el Dr. Jean Louis Charli y el Dr. Juan Riesgo por su valiosa asesoría.

A los miembros del jurado, el Dr. Alberto Darszon, la Dra. Diana Escalante, la Dra. Leonor Pérez y el Dr. Enrique Salas por sus comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros de trabajo Zuritas-Covarrubias-Lomeli por su amistad y apoyo.

A mis tios, Carmen, Gela y Joaquín, y a mi familia política Dulce y Fili, gracias por su gran cariño y por creer en mí.

A Clau y Alex, Juve, Denhi y Enrique, Ruth y Kike, Omar, Elsa, Eddie, Memo, Lau y Tako, Nachito, Conchita y Herbert, Diana, Gaby, Niur, Manuel, David, Gabo y Clau, Rayo, Vero, Mariana y Lucia por todos los años que me han brindado su amistad.

Este trabajo se realizó, en su mayor parte, en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México, en Cuernavaca Morelos, bajo la asesoría del Dr. Enrique Reynaud Garza. Otra parte del trabajo se llevo a cabo en el Centro de Estudios Científicos de Chile, en el laboratorio del Dr. Pedro Labarca. Para el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo económico del CONACyT.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
Sección I. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo para el estudio del comportamiento y la función neural.....	3
I.1. ¿Qué es el comportamiento?.....	3
I.2. El comportamiento y la función neural.....	4
I.3. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio.....	5
I.4. El desarrollo de <i>D. melanogaster</i> .....	7
I.5. El desarrollo del SNC de <i>Drosophila</i> .....	9
I.6. Anatomía y función del SNC en el adulto de <i>Drosophila</i> .....	11
I.6.1. El cerebro.....	12
I.6.2. El ganglio torácico abdominal.....	13
I.7. El estudio de las bases neurales del comportamiento en <i>Drosophila</i> .....	14
I.7.1. Sistemas de expresión genética dirigida: herramientas que permiten alterar la función neuronal y generar fenotipos dominantes.....	16
I.7.1.1. El sistema “enhancer trap”.....	16
I.7.1.2. El sistema GAL4/UAS.....	17
I.7.1.3. Silenciamiento neuronal: Mecanismo de acción de la Cadena Ligera de la Toxina de Tétanos.....	19
Sección II. La fertilidad y el comportamiento reproductivo de la hembra de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	21
II.1. Anatomía del tracto reproductivo femenino de <i>Drosophila</i> .....	22
II.2. La ovogénesis.....	24
II.3. La ovoposición.....	26
II.4. El almacenamiento y la utilización del esperma.....	27
II.5. Los mecanismos de regulación del tracto reproductivo de <i>Drosophila</i> .....	28
II.5.1. Regulación dependiente del apareamiento.....	28
II.5.2. Regulación neural de la ovoposición.....	30
II.5.3. Regulación neural de los órganos de almacenamiento del esperma	

de la hembra.....	32
II.5.4. Otras evidencias: regulación de la contracción del oviducto y la espermateca en <i>Locusta migratoria</i> .....	33
II.5.4.1. Glutamato, proctolina y octopamina.....	33
II.5.4.2. Otros moduladores en <i>Locusta</i> .....	35
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	37
<b>OBJETIVOS</b> .....	39
1. Objetivo general del proyecto.....	39
2. Objetivos particulares.....	39
<b>METODOLOGÍA</b> .....	40
1. Líneas de <i>D. melanogaster</i> empleadas.....	40
2. Generación de nuevas inserciones <i>P(GAL4)</i> .....	41
3. Tamizado <i>GAL4/UAS-TeTxLC</i> para identificar líneas <i>P(GAL4)</i> que definen grupos neuronales discretos en el SNC de la mosca involucrados en la fertilidad.....	42
4. Análisis del patrón de expresión neural de los elementos <i>P(GAL4)</i> .....	43
5. Identificación del sitio de inserción del elemento <i>P(GAL4)</i> en la línea <i>1H12D</i> .....	43
6. Evaluación de interacción genética entre alelos de <i>bwk</i> y la inserción <i>1H12D</i> .....	43
7. Detección de $\beta$ -galactosidasa en el SNC de larvas <i>P(lacZ) bwk<sup>08482</sup></i> .....	44
8. Disección de ovarios.....	44
9. Evaluación de parámetros de fertilidad y apareamiento.....	45
9.1. Cuantificación del número promedio de huevos puestos y del porcentaje de huevos eclosionados por hembra .....	45
9.2. Evaluación de la presencia de huevos en el útero.....	45
9.3. Determinación del índice de cortejo (IC).....	45
10. Expresión condicional de la TeTxLC.....	46
11. Análisis del patrón de expresión e inervación de las neuronas <i>bwk<sup>1qs</sup></i> .....	47
12. Inmunohistoquímica (dobles tinciones).....	48
13. Visualización del destino de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo femenino.....	49

14. Mediciones videométricas.....	49
15. Electrofisiología.....	50
16. Análisis estadístico.....	50
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
1. Identificación de inserciones <i>P(GAL4)</i> que atrapan grupos pequeños de neuronas en el SNC esenciales para la fertilidad, la movilidad y el desarrollo de la mosca.....	51
2. Caracterización molecular de la inserción <i>IHI2D</i> .....	56
3. La desactivación de las neuronas <i>bwk<sup>iqs</sup></i> afecta el proceso de ovoposición y causa esterilidad en las hembras de <i>Drosophila</i> .....	58
4. El fenotipo de esterilidad de las moscas <i>UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup></i> no es causado por defectos ontológicos producidos por la falta de transmisión sináptica.....	61
5. Patrón de expresión de <i>bwk<sup>iqs</sup></i> durante el desarrollo del SNC de <i>Drosophila</i> .....	62
6. La inserción <i>bwk<sup>iqs</sup></i> marca las neuronas octopaminérgicas del SNC de <i>Drosophila</i> .....	63
7. Las neuronas <i>bwk<sup>iqs</sup></i> del ganglio torácico abdominal inervan el tracto reproductivo de la hembra de <i>Drosophila</i> .....	65
8. La desactivación de las neuronas <i>bwk<sup>iqs</sup></i> afecta el proceso de almacenamiento de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo de la hembra de <i>Drosophila</i> .....	68
9. La octopamina modula la contracción del oviducto de <i>Drosophila</i> .....	69
10. Las neuronas <i>bwk<sup>iqs</sup></i> del ganglio abdominal modulan la contracción del oviducto de <i>Drosophila</i> de manera dependiente de glutamato y octopamina en conjunción con un grupo independiente de neuronas proctolinérgicas.....	74
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>79</b>
1. Identificación de inserciones <i>P(GAL4)</i> que marcan grupos de neuronas esenciales para la fertilidad y otros procesos específicos en <i>Drosophila</i> .....	79
2. La inserción <i>IHI2D</i> , también llamada <i>bwk<sup>iqs</sup></i> , es un marcador genético de la mayoría de las neuronas octopaminérgicas a lo largo del desarrollo de <i>Drosophila</i> .....	81

3. La función de las neuronas <i>bwk<sup>lqs</sup></i> .....	82
4. Neuromoduladores que regulan la contracción del oviducto de <i>Drosophila</i> .....	85
5. Las neuronas octopaminérgicas <i>bwk<sup>lqs</sup></i> constituyen la inervación glutamatérgica que regula la contracción del oviducto de <i>Drosophila</i> .....	89
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	92
<b>REFERENCIAS</b> .....	93
<b>APÉNDICE I</b> .....	102



## RESUMEN

El conocimiento acerca de los circuitos neuronales, los procesos de desarrollo involucrados en su organización y su relación con el funcionamiento del cerebro y el comportamiento es muy limitado. Con el objetivo de entender más sobre estos aspectos diseñamos un tamizado genético de pérdida de función usando el sistema GAL4/UAS, la cadena ligera de la toxina de tétanos (TeTxLC) y la GFP para identificar grupos discretos de neuronas en el sistema nervioso central (SNC) de *Drosophila melanogaster* esenciales para la fertilidad. Usando esta estrategia aislamos una línea  $P(GAL4)$  llamada  $bwk^{tqs}$ , que presenta un fenotipo de esterilidad específico de hembras causado por la desactivación neuronal en presencia de la TeTxLC. Mediante experimentos de inmunohistoquímica demostramos que la inserción en esta línea marca casi todas las células octopaminérgicas del SNC de la mosca. Además, encontramos que las neuronas  $bwk^{tqs}$  del ganglio abdominal inervan todo el tracto reproductivo de la hembra y son esenciales tanto para el proceso de ovoposición como para el almacenamiento del esperma dentro de la hembra. También mostramos que las sustancias neuroactivas glutamato (Glu), proctolina y octopamina (OA) involucradas en la contracción del oviducto del insecto *Locusta migratoria*, tienen efectos similares en el oviducto de *Drosophila*. Consistentemente, demostramos que la adición simultánea del neurotransmisor excitatorio Glu y el neuromodulador inhibitorio OA rescata la disminución de la contracción del oviducto causada por la desactivación de las neuronas  $bwk^{tqs}$ . A partir de estos datos sugerimos que a diferencia de lo propuesto por el modelo previo que describe el control neuronal de la contracción en el oviducto de *Locusta*, en la mosca, las neuronas  $bwk^{tqs}$  que inervan el oviducto liberan tanto Glu como OA para regular su contracción. Finalmente, demostramos que el tamizado genético desarrollado representa una herramienta útil para la disección funcional del SNC en la mosca.

## ABSTRACT

The properties of neural networks, the functional modules of nervous systems underlying behavior, are poorly understood because there are few strategies to isolate and manipulate them. In an effort to better understand the development and function of the neural networks we used the fruit fly as a model. Using the bipartite GAL4/UAS system, the Tetanus Toxin Light Chain (TeTxLC) and the GFP we designed a loss of function genetic screen to identify groups of neurons in the central nervous system (CNS) whose operation is essential for fly fertility. In this work we isolated and characterized the *bwk<sup>iqs</sup>* line. The *bwk<sup>iqs</sup>* flies showed female sterility that is only noticeable when the insertion leads the expression of TeTxLC. The *bwk<sup>iqs</sup>* insertion is expressed in almost all octopaminergic cells of the fly's CNS. *bwk<sup>iqs</sup>* neurons in the abdominal ganglion innervate the female reproductive tract and are essential both for the process of egg laying as for the sperm storage. We show that three neuroactive substances involved in the oviduct contraction of the insect *Locusta migratoria*, glutamate (Glu), proctolin and octopamine (OA) have similar effects on the *Drosophila* oviduct. Analyzing the physiological consequences caused by the expression of TeTxLC, we found that the inactivation of *bwk<sup>iqs</sup>* neurons drastically reduces the oviduct contraction. Interestingly, only the simultaneous addition of the excitatory neurotransmitter Glu and inhibitory neuromodulator OA was able to rescue the wild type oviduct contraction in *bwk<sup>iqs</sup>* flies that express the TeTxLC. Our findings suggest that *bwk<sup>iqs</sup>* neurons that innervate the oviduct release both Glu and OA to regulate its contraction. These data also allow us to reevaluate the previous model that describes the neural control of the contraction in the oviduct of *Locusta*. Finally, these results also demonstrate that the screening proposed in this work is a useful tool for the dissection of functional discrete groups of neurons.

## INTRODUCCIÓN

### Sección I. El comportamiento y la función neural: *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio.

Uno de los objetivos centrales de las neurociencias es entender como se determina la estructura y organización de los circuitos neuronales y como es que su función permite que los individuos perciban el mundo y lleven a cabo comportamientos específicos basados en dichas percepciones. En los animales, el comportamiento innato o instintivo puede considerarse un fenotipo de la expresión de los genes que controlan el desarrollo del sistema nervioso central (SNC). La naturaleza innata de muchos patrones de comportamiento especie-específicos sugiere que los sustratos neuronales necesarios para su ejecución son determinados genéticamente y programados durante el desarrollo (Baker et al., 2001). Así, los comportamientos innatos representan sistemas de estudio particularmente atractivos para responder preguntas tales como ¿Cuál es el circuito responsable para un comportamiento dado?, ¿Cómo se desarrolla el circuito? y ¿Cómo funciona este circuito?

El estudio de organismos simples y genéticamente manipulables como *Drosophila melanogaster* representa una herramienta con gran potencial para responder este tipo de preguntas fundamentales. Gran parte de la investigación en este modelo se ha enfocado en el estudio de genes y moléculas individuales para la disección genética del comportamiento (Sokolowski, 2001). Por otro lado, también se han realizado estudios de mapeo estructura-función que han permitido correlacionar comportamientos particulares con grandes estructuras en el SNC de la mosca (de Belle y Heisenberg, 1994; Greenspan, 1995; Heisenberg et al., 1985). Hoy en día, el desarrollo reciente de métodos genéticos que permiten manipular grupos específicos de neuronas en el SNC de *Drosophila*, ofrece la posibilidad técnica de comprender aspectos relacionados a la arquitectura y organización de los circuitos neuronales y su papel en el comportamiento.

#### I.1. ¿Que es el comportamiento?

El comportamiento animal, considerado como uno de los fenotipos más complejos, se ha definido como cualquier movimiento ordenado con patrones de actividad reconocibles y repetitivos producidos por los miembros de una especie. Esta definición incluye

comportamientos especie específicos como el cortejo, la depredación, la crianza, la migración, la delimitación del territorio y la construcción del nido, así como aspectos más generales de la existencia animal como lo son la locomoción, el vuelo y la alimentación. Una definición más amplia del comportamiento debe incluir también mecanismos homeostáticos tales como el control del ritmo respiratorio y del ritmo cardíaco, los cuales son regulados por circuitos neuronales. Los comportamientos también se pueden clasificar como innatos o significativamente modificables por la experiencia (Baker et al., 2001). Desde un punto de vista experimental, cada comportamiento que está bajo estudio debe ser definido en el contexto de su propio paradigma. Sin embargo, las definiciones prácticas del comportamiento a menudo son cuestionadas por el hecho de que aún el patrón de comportamiento más simple puede ser dividido en comportamientos individuales aún más pequeños. Los comportamientos parecen estar embebidos unos dentro de otros e incluyen eventos que suceden antes de su propia ejecución. Entonces, ¿Cómo se puede determinar si un comportamiento es lo suficientemente robusto para ser analizado? Al igual que con cualquier otro fenotipo, es necesario tener un método de evaluación ó paradigma relativamente simple y reproducible que permita evaluar un gran número de individuos. Así mismo, es necesario contar con una definición clara del comportamiento estudiado. Además, deben minimizarse las variaciones independientes al comportamiento (Sokolowski, 2001).

## **I.2. El comportamiento y la función neural.**

El comportamiento se genera como resultado de la función del sistema nervioso, el cual a su vez se desarrolla en cada organismo siguiendo un programa o plan corporal preciso determinado genéticamente y característico de cada especie. Esto significa que el comportamiento animal es un reflejo fenotípico de la integridad funcional del sistema nervioso formado durante el desarrollo (Yamamoto et al., 1998). Dentro del sistema nervioso, cada circuito neural está formado por diferentes neuronas interconectadas por una red de conexiones sinápticas con un patrón altamente preciso y a menudo complejo. Estos patrones de conectividad están definidos por programas de desarrollo que establecen el tipo correcto, la localización y el número de neuronas, la morfología de sus axones y dendritas, y las conexiones sinápticas entre ellas (Zipursky et al., 2006). Cualquier comportamiento requiere del funcionamiento de un circuito multicelular, el cual está constituido por al menos tres componentes básicos: 1) elementos sensoriales que reciben la información de distintos

contextos etológicos; 2) componentes centrales que procesan esta información; y 3) elementos neuronales que coordinan y ejecutan una respuesta motora o neuroendócrina característica (Baker et al., 2001). Entonces, una respuesta apropiada depende de la correcta formación y de la integridad de las conexiones entre las neuronas que constituyen al circuito responsable. En otras palabras, la especificidad del comportamiento deriva de la especificidad de los circuitos neuronales, que a su vez, está determinada por la identidad, fisiología y conectividad de las neuronas individuales que los conforman.

### I.3. *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio.

La mosca de la fruta, *D. melanogaster* se usa ampliamente en estudios biológicos por varias razones (Bier, 2005). Primero, *Drosophila* tiene las ventajas prácticas de que es pequeña, es muy fértil y tiene un ciclo de vida corto (Figura 1). Estas características permiten realizar experimentos a gran escala, como los tamizados genéticos, en un periodo de tiempo relativamente corto y a un bajo costo. Segundo, existen técnicas de transformación genética sofisticadas que proporcionan una batería de herramientas muy flexible para el estudio de las vías moleculares y celulares que sustentan los procesos biológicos en la mosca (Venken y Bellen, 2005). Tercero, el genoma de *D. melanogaster* ha sido totalmente secuenciado y está disponible al público de manera gratuita (<http://www.flybase.org>). Además, los datos genómicos han revelado que la información genética está altamente conservada entre especies tan distantes como la mosca y el humano.

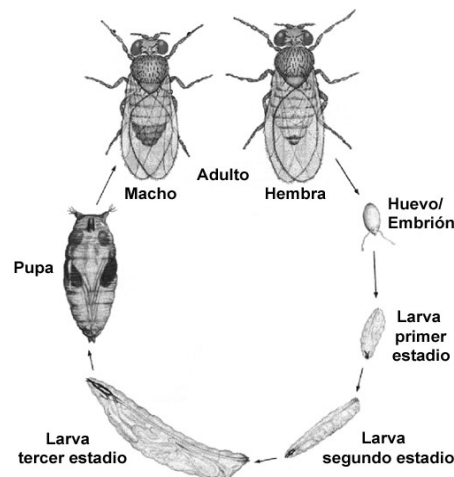


Figura 1. **El ciclo de vida de *D. melanogaster***. El ciclo inicia con el huevo fecundado o embrión, prosigue con la fase larvaria que se divide a su vez en 3 estadios, continúa con una fase pupal y termina en la fase adulta entre los 9 y 10 días (a 25° C) posteriores a la ovoposición. Imagen tomada y modificada del sitio ([http://www.seop.yale.edu/supplementary/supp\\_drosophila.html](http://www.seop.yale.edu/supplementary/supp_drosophila.html)).

Muchas de las vías genéticas que controlan los procesos básicos del desarrollo en los vertebrados e invertebrados están filogenéticamente conservadas (Bier, 2005). En los metazoarios bilateralmente simétricos, mecanismos de desarrollo similares dirigen procesos importantes que incluyen: la especificación de la identidad y la polaridad de los segmentos a lo largo del eje anterior-posterior; la subdivisión del ectodermo en dominios neurales y no-neurales a lo largo del eje dorso-ventral; el establecimiento de los ejes primarios de los apéndices del cuerpo para la formación de estructuras complejas tales como los ojos, el corazón, y el sistema inmune innato; y, potencialmente, el control de comportamientos básicos como el sueño y el abuso de sustancias. En muchos casos, los genes de un organismo (por ejemplo *D. melanogaster*) son capaces de remplazar funcionalmente a sus contrapartes en otro organismo (por ejemplo, un vertebrado).

Además de las similitudes genéticas observadas entre la mosca de la fruta y el humano, existen similitudes fundamentales entre los SNCs de ambos organismos. Aunque el SNC de *Drosophila* es menos complejo que el SNC del humano, está constituido por los mismos componentes básicos que estructuran el SNC de los mamíferos. Las neuronas y las células de la glia son los principales constituyentes, y muchos de los sistemas neurotransmisores empleados por las neuronas también se encuentran conservados (Thor, 1995).

El SNC de *Drosophila* es relativamente pequeño comparado con el del humano, aproximadamente  $2 \times 10^5$  neuronas en la mosca y  $1 \times 10^{11}$  neuronas en el humano (Leysen y Hassan, 2007). A pesar de esto, la mosca presenta un repertorio sorprendentemente complejo de comportamientos tales como: el comportamiento reproductivo, el cual incluye el cortejo del macho hacia la hembra (ver Figura 2), los comportamientos de rechazo o aprobación de la hembra, y una forma simple de comportamiento maternal para la elección de un sitio apropiado para la ovoposición; ciclos de actividad y reposo similares a los ciclos de vigilia y sueño en los mamíferos; aprendizaje y memoria con todas las características básicas del aprendizaje y la memoria en los mamíferos; sensibilidad y tolerancia a drogas adictivas como el alcohol y la cocaína; comportamiento alimenticio; comportamiento locomotor; comportamiento agresivo; olfato y gusto; mecanosensación; comportamiento optomotor; e incluso un comportamiento de rechazo olfativo al estrés (Sokolowski, 2001; Vosshall, 2007).

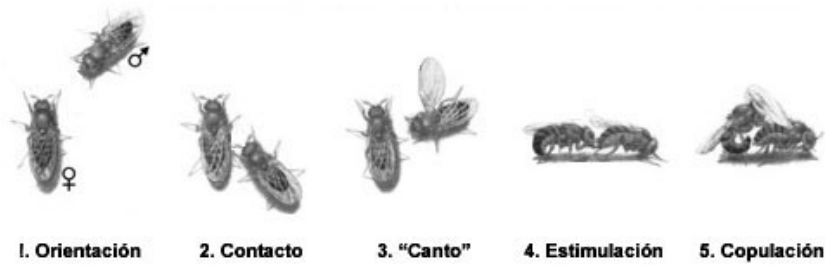


Figura 2. **Comportamiento de cortejo de *Drosophila melanogaster***. Los machos de *Drosophila* tienen el papel más activo durante el cortejo. El esquema describe la secuencia estereotípica de comportamientos mostrados por los machos durante el cortejo (Greenspan y Ferveur, 2000).

La diversidad de paradigmas existentes para la evaluación del comportamiento en *Drosophila* es grande, y abarca todos los tipos de comportamiento arriba mencionados (ver ejemplos en Figura 3). La disponibilidad de una gran colección de paradigmas sumada al numeroso conjunto de ventajas experimentales discutidas con anterioridad, hacen de la mosca de la fruta una de las herramientas más poderosas para el estudio de la neurobiología.

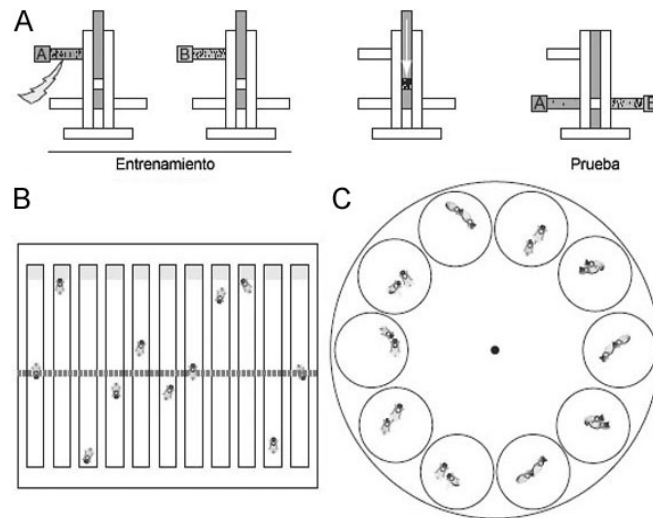


Figura 3. **Ejemplos de paradigmas usados para evaluar el comportamiento de *Drosophila***. **A**, El laberinto-T se usa para estudios de condicionamiento olfativo Pavloviano. Se entrena a las moscas para asociar un olor A con una descarga eléctrica (izquierda). Durante la prueba, estas moscas evitan el olor A (derecha). Los puntos negros pequeños representan a las moscas. **B**, Monitores de actividad circadiana miden la actividad locomotora de moscas individuales usando un haz de luz infrarroja (línea punteada). Una computadora registra el número de veces que la mosca bloquea el haz de luz. **C**, La rueda de cortejo permite observar hasta 10 parejas de moscas en las cuales el macho toma parte en la actividad sexual estereotípica del cortejo. Modificada de (Vosshall, 2007).

#### I.4. El desarrollo de *D. melanogaster*.

Los insectos se pueden clasificar en tres categorías basándose en su perfil de desarrollo: los ametábolos que no sufren metamorfosis, los hemimetábolos que exhiben una

metamorfosis gradual o incompleta y los holometábolos que exhiben una metamorfosis completa. En los insectos ametábolos, incluyendo los colémbolos y los proturos, el ciclo de vida inicia con el desarrollo del huevo a un estado juvenil que solo se diferencia del estado adulto por la madurez sexual y el tamaño. El ciclo de vida de los insectos hemimetábolos, incluyendo los hemípteros (chinchas, pulgones, cigarras), ortópteros (saltamontes, langostas) y los dictiópteros (cucarachas), comienza con el desarrollo del huevo a un estadio de ninfa inmaduro. La ninfa come y crece pasando por varias mudas, reemplazando el exoesqueleto viejo por uno más blando que se expande a un tamaño mayor antes de endurecerse. El último estadio de ninfa da origen al adulto. El desarrollo de los insectos holometábolos, incluyendo a los dípteros (moscas, mosquitos), himenópteros (abejas, hormigas), lepidópteros (mariposas, polillas) y coleópteros (escarabajos) es más complejo. El huevo se desarrolla en una larva que atraviesa varios estadios. El último estadio larval pupa. En la pupa sucede una extensa reorganización llamada metamorfosis que da lugar a la forma adulta (Nation, 2002).

En el insecto holometábolo *Drosophila*, la mayoría de las estructuras de la mosca adulta (con excepción del sistema nervioso central que es de origen embrionario) se desarrollan a partir de estructuras larvarias (discos imagales, anillos imagales y pequeños grupos aislados de histoblastos abdominales), las cuales se diferencian durante la metamorfosis para formar las estructuras de la cabeza, tórax y abdomen del adulto. La metamorfosis inicia al final de la etapa de larva de tercer estadio, aproximadamente a las 120 horas de haber iniciado el desarrollo embrionario. La metamorfosis en la mosca se puede dividir en dos etapas: un periodo prepupal marcado por la pupación o inicio de la transición larva-pupa que dura 12 horas, y un periodo pupal tardío que dura 84 horas (Figura 4).

La pupación es inducida por un pulso de hormona 20-hidroxiecdisona (20E). La cutícula de la larva se convierte en la cápsula prepupal. La epidermis se retrae de la cutícula larval (apólisis) y se forma una burbuja de gas característica en el abdomen prepupal. Durante la pupación se da inicio a la degeneración de la mayoría de los tejidos larvarios, la diferenciación y eversión de los discos imagales para dar origen a la forma básica de las estructuras adultas y la remodelación del sistema nervioso central (Figura 4). El inicio del estadio pupal está marcado por un pulso pequeño de 20E. En respuesta a este pulso hormonal la cabeza asume su posición final por eversión desde el interior del tórax, proceso que dura alrededor de 10 minutos y es orquestado por contracciones de los músculos abdominales. Las alas y las patas se elongan mediante el mismo proceso que dirige la eversión de la cabeza.



Posteriormente un pulso grande de 20E induce todos los cambios finales necesarios para el desarrollo de las estructuras adultas, incluyendo la maduración neural. Una vez que las estructuras adultas son identificadas dentro de la pupa el insecto se puede llamar un farato adulto. Al final del periodo pupal la hormona de la eclosión induce la salida de la mosca adulta de su cápsula (Ashburner, 1989; Fristrom y Fristrom, 1993; Hartenstein, 1993).

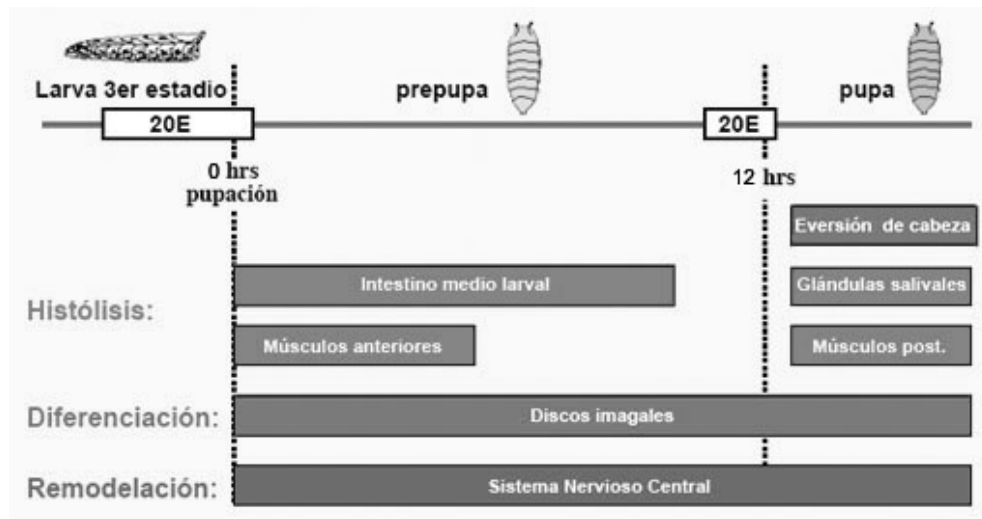


Figura 4. **Procesos de desarrollo que ocurren durante la metamorfosis del insecto holometábolo *D. melanogaster*.** Los recuadros en la parte superior del esquema representan los pulsos de la hormona 20-hidroxiecdisona que inducen las transiciones larva-prepupa y prepupa-pupa.

### I.5. El desarrollo del SNC de *Drosophila*.

En la mosca, la neurogénesis inicia durante el desarrollo del embrión temprano cuando unas pocas células de origen ectodermal son determinadas para convertirse en las células precursoras neuronales (neuroblastos) (Figura 5A). La región neurogénica ventral (RNV) da origen a los neuroblastos del ganglio ventral. La región neurogénica procefálica (RNP) genera los neuroblastos del cerebro. Adyacente a la RNP se encuentra el primordio del lóbulo óptico (LO), el cual se desarrolla diferencialmente del resto del cerebro. La progenie de los neuroblastos se diferencia formando masas ganglionares (neurómeros) asociadas a cada respectivo segmento del embrión. Así, durante el desarrollo embrionario tardío, el SNC aparece como una estructura totalmente segmentada. Por su parte, los precursores del LO forman una vesícula adherida a la superficie de los hemisferios cerebrales. Cuando la larva de primer estadio eclosiona, el SNC, el cual incluye neuronas funcionales, neuroblastos, células

madre ganglionares y células ganglionares en diferenciación, ya ha sufrido un cambio morfológico importante.

El SNC de la larva (Figura 5B), situado en la parte anterior del cuerpo, aparece como un ganglio fusionado (formado por tres pares de neurómeros) compuesto de los dos hemisferios cerebrales (C) y flanqueado lateralmente por los lóbulos ópticos en desarrollo; y un ganglio ventral condensado (GV), situado debajo del esófago, compuesto por doce pares de ganglios fusionados, un par subesofágico, tres pares torácicos y ocho pares abdominales, todos estos correspondientes a los neurómeros en el embrión. Durante la vida de la larva el SNC tiene la tarea dual de regular el comportamiento de la larva y prepararse para la metamorfosis. Los neuroblastos se dividen y generan un gran número de neuronas, las presuntas neuronas adultas, las cuales permanecen indiferenciadas hasta el estadio pupal. En la mayor parte del SNC, la proliferación neuronal se evidencia por el crecimiento del tejido nervioso durante los estadios larvarios.

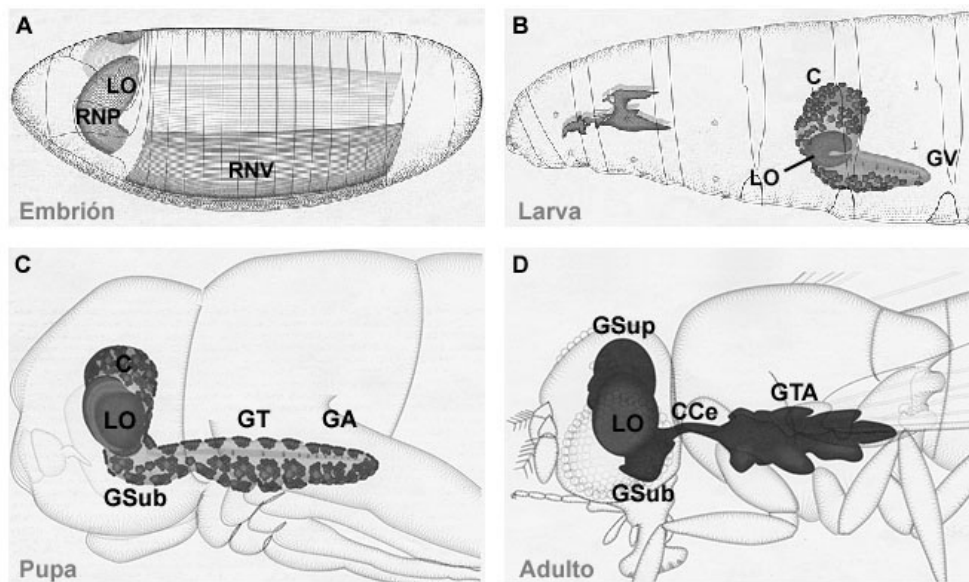


Figura 5. **Esquematación de etapas representativas durante el desarrollo del SNC de *Drosophila*.** **A**, En el estadio de embrión temprano los precursores del SNC (neuroblastos) se derivan del neuroectodermo. RNV-región neurogénica ventral, RNP-región neurogénica procefálica, LO-lóbulo óptico. **B**, En la larva el SNC está formado por un ganglio fusionado o cerebro (C) y un ganglio ventral condensado (GV). Los precursores del LO se encuentran formando una vesícula adherida a cada hemisferio del cerebro. **C**, En la pupa se agregan varias al cerebro central, incluyendo los grandes LOs. El ganglio subesofágico (GSub) se separa del ganglio torácico (GT), este último se expande y el ganglio abdominal (GA) se retrae. **D**, El SNC del adulto está constituido por el ganglio supraesofágico (GSup), que incluye los hemisferios cerebrales y los LOs, por el GSub y por un ganglio torácico abdominal (GTA) formado por los tres neurómeros torácicos y el GA fusionado. CCe-conexión cervical. Los neuroblastos y su progenie, las presuntas neuronas adultas pueden observarse en la superficie del SNC de la larva y la pupa. Imágenes tomadas y modificadas de (Hartenstein, 1993).

En el estadio pupal el SNC sufre cambios dramáticos en su forma y organización celular (Figura 5C). A diferencia de otros tejidos, la mayoría de las neuronas de la larva persiste a través de la metamorfosis hasta la etapa adulta. En el estadio de pupa temprana los neuroblastos se dividen generando la expansión de varias estructuras en el SNC. Durante esta expansión los grupos de diversos linajes celulares se mueven unos con respecto de otros. Las neuronas inmaduras generadas durante los estadios de larva y pupa maduran para dar lugar a las neuronas del adulto. Otros cambios que ocurren durante la metamorfosis son, el crecimiento y la diferenciación de los lóbulos ópticos y de estructuras centrales en los hemisferios del cerebro, la separación de los neurómeros subesofágicos del ganglio torácico, la expansión marcada de los tres neurómeros torácicos (ganglio torácico, GT) y la regresión de los neurómeros abdominales (ganglio abdominal,GA). Para cuando se ha completado el 75% de la metamorfosis el SNC ya presenta la configuración del adulto.

El SNC de la mosca adulta está integrado por un ganglio supraesofágico (GSup) que incluye los dos hemisferios cerebrales y los LOs, un ganglio subesofágico (GSub) y un ganglio torácico abdominal (GTA) integrado por los tres neurómeros torácicos y los ocho neurómeros abdominales fusionados, los cuales forman un pequeño cono adherido al tercer neurómero torácico (Figura 5D). Los dos componentes del cerebro adulto (GSup y GSub) se encuentran unidos al GTA por una estrecha conexión cervical (CCe) (Hartenstein, 1993; Truman et al., 1993).

### **I.6. Anatomía y función del SNC en el adulto de *Drosophila*.**

Como en los vertebrados, el SNC de la mosca adulta se puede dividir en dos partes: el cerebro y el GTA, este último considerado como el análogo a la médula espinal. Una diferencia importante con respecto a la arquitectura del SNC de los vertebrados, es que en la mosca el SNC está integrado por ganglios formados por una corteza celular (motoneuronas, interneuronas y células glia) y un núcleo fibroso, dentro del cual se llevan a cabo las sinapsis (neurópila). Las neuronas sensoriales usualmente se localizan cerca del sitio de recepción del estímulo sensorial, y consecuentemente, muchas de ellas están localizadas periféricamente en la cutícula y en los órganos internos, desde donde envían sus proyecciones hacia la neurópila. A través del SNC, la neurópila está organizada en agregados de proyecciones morfológicamente distintos y funcionalmente especializados, cuya trayectoria sigue un patrón invariante (Nation, 2002).

### **I.6.1. El cerebro.**

A lo largo del eje anterior-posterior el cerebro adulto de *Drosophila* está dividido en el ganglio supraesofágico, integrado por el protocerebro (Pr), deutocerebro (De) y tritocerebro (Tr); y el ganglio subesofágico (GSub) (Figura 6A).

El protocerebro es la región más grande y compleja del cerebro. Localizado en la parte más anterior (Figura 6A), éste representa el principal centro de integración y procesamiento de información en el cerebro. Las neurópilas más características en la parte media del protocerebro son: los cuerpos fungiformes (cf), centros importantes para la integración del estímulo olfativo esenciales en ciertas formas de aprendizaje y memoria; los pares intercerebrales (pi), interconectados con regiones en la base del cerebro y el GTA a través de la fibra media (FM), y los cuales contienen células neurosecretorias que proyectan axones hacia el cuerpo cardíaco (NCCa); el complejo central (cc), formado por el puente protocerebral (pp), el cuerpo con forma de abanico (fb) y el cuerpo elipsoide (ce) (Figura 6B), e involucrado en la integración de la información entre los dos hemisferios del cerebro y en el control de la locomoción y el vuelo; y el cuerpo ventral (cv, Figura 6A), un componente de la neurópila que representa la única vía de entrada hacia el complejo central. El protocerebro también incluye las neurópilas de los lóbulos ópticos (LO), la lámina (la), la médula (me), el lóbulo (lo) y el plato lobular (plo) (Figura 6B), los cuales representan los sitios jerárquicos de procesamiento para la información visual obtenida por los fotorreceptores en la retina.

El deutocerebro es la región anterior contigua al esófago. Está formado por neurópilas mecanosensoriales antenales y por los lóbulos antenales (LA, Figura 6B). El deutocerebro recibe el nervio antenal (NA, Figura 6A, B) y representa el centro olfativo del cerebro. Otra región del deutocerebro, llamada vertiente posterior (vp, Figura 6A), representa una vía importante de salida para la información del cerebro, ya que esta contiene numerosas interneuronas que proyectan hacia las motoneuronas del ganglio torácico abdominal.

El tritocerebro es la región de la neurópila ventral a cada lado del esófago, pero no debajo de este. El tritocerebro envía axones a un grupo de ganglios periféricos llamados sistema estomatogástrico (NGS, Figura 6A), los cuales controlan el comportamiento alimenticio. Además, envía proyecciones al protocerebro a través de la fibra media (FM) y recibe proyecciones descendientes por medio de la misma. Al igual que el deutocerebro, el tritocerebro también da origen a proyecciones descendientes.

La otra parte del cerebro, el ganglio subesofágico (GSub), comprende a la neurópila sensorial y motora que inerva al aparato bucal (NB, Figura 6A) (<http://www.flybrain.org>) (Nassif et al., 1998; Power, 1943).

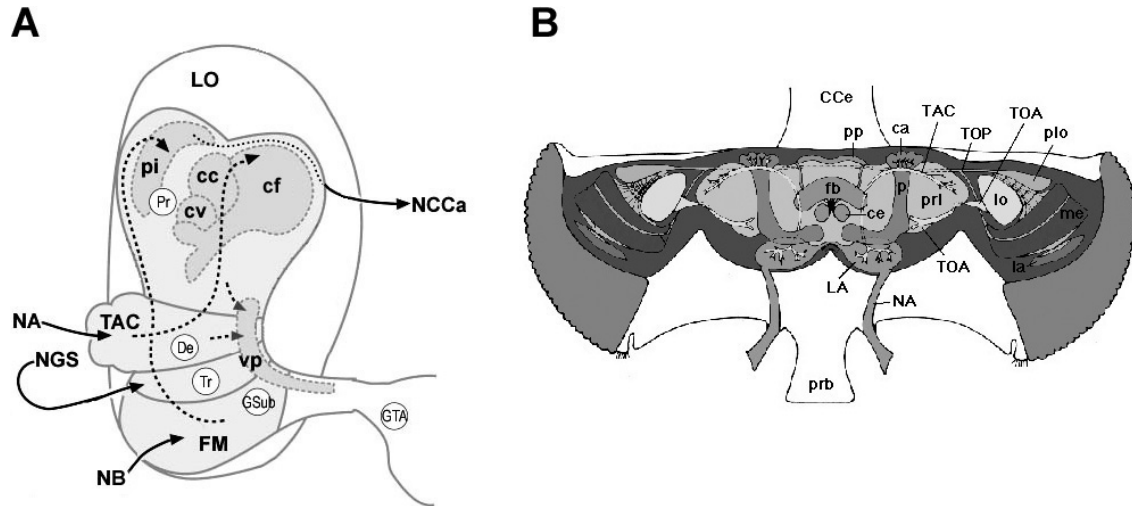


Figura 6. **Descripción esquemática del cerebro adulto de *D. melanogaster*.** **A**, Vista lateral. El ganglio supraesofágico (GSup) comprende el protocerebro (Pr), deutocerebro (De) y tritocerebro (Tr). El protocerebro incluye el lóbulo óptico lateral (LO), los cuerpos fungiformes (cf), el complejo central (cc), el cuerpo ventral (cv) y los pares intercerebrales (pi). El deutocerebro incluye la vertiente posterior (vp), que representa una zona de salida hacia el ganglio torácico abdominal (GTA). En la base del cerebro está el ganglio subesofágico (GSub), el cual inerva partes del aparato bucal. Las líneas punteadas y continuas describen algunos de los nervios y tractos que inervan el cerebro. NCCa-nervio al cuerpo cardiaco, TAC-tracto antenal cerebral, NA-nervio antenal, NGS-nervio estomatogástrico, NB-nervio bucal. Tomada y modificada de (Nassif et al., 1998). **B**, Vista frontal. El diagrama muestra componentes de la neurópila y tractos nerviosos del GSup. la-lámina, me-médula, lo-lóbulo, plo-plato lobular, prl-protocerebro lateral, ca-cáliz del cuerpo fungiforme, p-pedúnculo del cuerpo fungiforme, pp-protocerebral, fb-cuerpo con forma de abanico, ce-cuerpo elipsoide, LA-lóbulo antenal, TOA-tracto óptico anterior, TOP-tracto óptico posterior, TAC-tracto antenal cerebral, NA-nervio antenal. Cce-conexión cervical, prb-probóscide. Tomada y modificada del sitio (<http://brain.biologie.uni-freiburg.de/Atlas/text/brainmap.html>).

### 1.6.2. El ganglio torácico abdominal.

El GTA de la mosca adulta está formado por los ganglios pro-torácico (GProT), meso-torácico (GMesoT) y meta-torácico (GMetaT) y el ganglio abdominal fusionado (GA) (Figura 7A).

Al igual que en el cerebro, la masa ganglionar del GTA de la mosca está compuesta en su mayor parte por la neurópila, con los cuerpos celulares restringidos principalmente a la periferia lateral y ventral. Anatómicamente y funcionalmente, el GTA de los insectos se puede dividir en tres componentes: la neurópila dorsal motora, la neurópila media integradora, y una neurópila ventral sensorial. La información sensorial generalmente llega a la región ventral de

un ganglio por medio de los nervios laterales y de tractos nerviosos a través del GTA. La respuesta motora normalmente se origina de la región dorsal de un ganglio después de que las interneuronas asociativas permiten la comunicación entre ambas regiones (Nation, 2002).

Cada uno de los ganglios torácicos de *Drosophila* envía axones motores a los músculos de las patas de su segmento torácico respectivo (Figura 7B, Nervios Torácicos) y recibe axones sensoriales de los receptores en los tarsos y en las articulaciones de las patas. Los ganglios meso- y meta-torácico envían proyecciones motoras a los músculos de las alas y alterios localizados en los segmentos meso- y meta-torácico respectivamente. Por su parte, el ganglio abdominal fusionado de la mosca inerva y recibe información sensorial de los diversos segmentos del abdomen (Figura 7B, Nervios Abdominales), incluyendo los más posteriores y donde se encuentran los órganos reproductivos internos. El ganglio abdominal en los insectos esta involucrado en el control de funciones básicas como la respiración, circulación, ritmo cardiaco, movilidad del intestino y función de la genitalia y el ovopositor (Miller, 1950; Nassel, 1996).

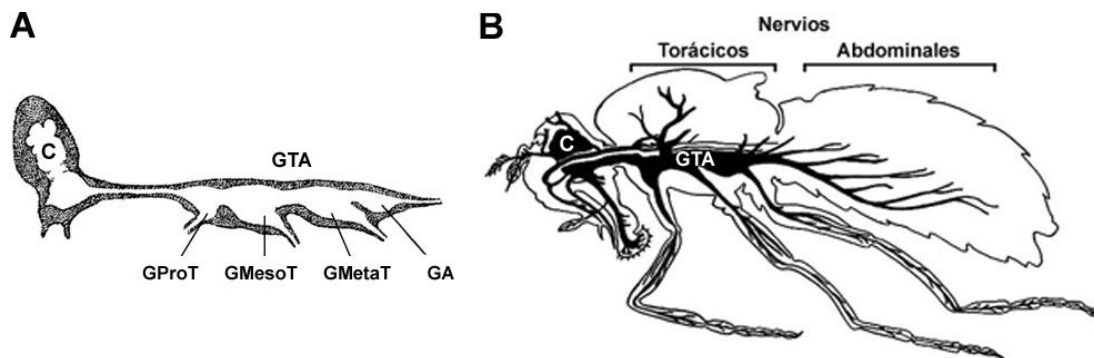


Figura 7. **Diagramas que muestran los componentes del GTA adulto y sus proyecciones nerviosas.** **A**, Vista lateral del SNC. El GTA está formado por los ganglios pro-torácico (GProT), meso-torácico (GMesoT), meta-torácico (GMetaT) y por el ganglio abdominal fusionado (GA). Los cuerpos celulares se encuentran formando una corteza (zona punteada) que envuelve a neurópila (zona clara). **B**, Vista lateral del SNC y sus inervaciones. Los nervios torácicos y los nervios abdominales se encuentran señalados. C-cerebro. Tomadas y modificadas de (Miller, 1950).

### **1.7. El estudio de las bases neurales del comportamiento en *Drosophila*.**

En los años 60's, trabajos pioneros del grupo del Dr. Seymour Benzer demostraron por primera vez que era posible obtener mutantes de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* con fenotipos conductuales como el insomnio, problemas de aprendizaje e incluso el cortejo homosexual. Estos trabajos marcaron el inicio de la neurogenética en la

mosca, con la premisa de que los comportamientos complejos como la habilidad para aprender y recordar, los ritmos biológicos internos del cuerpo y el cortejo y la sexualidad son controlados genéticamente (Vosshall, 2007). Gracias a la explosión de la genética molecular en las décadas pasadas, particularmente en *Drosophila*, ha sido posible la identificación de un gran número de genes, los cuales, cuando son mutados, afectan ya sea de manera directa o indirecta el comportamiento de la mosca (Sokolowski, 2001). Sin embargo, más allá de la caracterización molecular y genética de dichos genes así como de las vías moleculares asociadas a estos, en muy pocos casos se ha podido sugerir un papel específico de estos en el comportamiento pues la mayoría de las mutantes presenta efectos pleiotrópicos.

Tanto en los insectos como en los vertebrados, una aproximación general para explorar y entender el comportamiento como resultado de la función del sistema nervioso (SN) involucra la perturbación selectiva de los componentes moleculares y celulares de éste, y la determinación del efecto de dichas perturbaciones en su función. En este contexto, la enorme batería de variantes genéticas disponibles en *Drosophila* ha sido una herramienta de gran utilidad para el mapeo de ciertos aspectos del comportamiento a estructuras específicas en el SN. Aunque existen varios comportamientos para los cuales se ha demostrado que la función de regiones específicas en el SNC es importante para un comportamiento en particular, y aún cuando se ha podido definir parcialmente el papel que tienen estas regiones en dichos comportamientos, como es el caso del aprendizaje del canto en las aves (Bottjer, 1997) y el cortejo del macho (Greenspan, 1995), el aprendizaje olfativo (de Belle y Heisenberg, 1994; Heisenberg et al., 1985) y el comportamiento locomotor (Strauss y Heisenberg, 1993) en la mosca, existen muy pocos ejemplos específicos de circuitos neuronales identificados en el SNC dedicados a un comportamiento en particular. Entre los que se encuentran, el que controla el reflejo de cerrado de las trampas segmentales (“gin-trap”) en la pupa de *Manduca sexta* (Levine y Truman, 1983), el sistema estomatogástrico crustáceo (Selverston et al., 1976), y circuitos reflejo simples, como el involucrado en el mecanismo de cerrado de las mandíbulas en las hormigas (Gronenberg, 1996) y los relacionados al vuelo y a la resistencia de la pata en *Drosophila* (Trimarchi et al., 1999).

En particular, el análisis de la función de los circuitos neuronales en el SNC de la mosca se ha visto limitado por el tamaño y difícil accesibilidad a este, y por la consecuente imposibilidad de la aplicación de aproximaciones electrofisiológicas.

### **I.7.1. Sistemas de expresión genética dirigida: herramientas que permiten alterar la función neuronal y generar fenotipos dominantes.**

En los 90's, el desarrollo de nuevas herramientas de genética molecular en *Drosophila* marcó el inicio de una nueva etapa en el estudio de las bases neuronales del comportamiento. En particular, la conjunción del desarrollo de dos técnicas -el sistema de detección de elementos regulatorios ó “enhancer trap” (O'Kane y Gehring, 1987) y el sistema de expresión génica dirigida, basado en el activador transcripcional de levadura GAL4- permitió la generación del sistema de expresión binario “GAL4 enhancer trap/UASGenX” (Brand y Perrimon, 1993). Este último con gran potencial para la caracterización anatómica de los circuitos neuronales en el SNC de la mosca, y la investigación del papel que tienen neuronas específicas en determinados comportamientos mediante la alteración dirigida de su función.

#### **I.7.1.1. El sistema “enhancer trap”.**

Inicialmente el sistema “enhancer trap” se desarrolló como un medio para la identificación de elementos reguladores de la transcripción *in situ* en el genoma de *Drosophila* (O'Kane y Gehring, 1987). Los autores fusionaron el gen *lacZ* (el cual codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa) de *Escherichia coli* al promotor débil de la P-transposasa, localizado dentro de un transposón o elemento P. Ellos encontraron que esta fusión era capaz de “atrapar” ó ser activada por elementos reguladores de la transcripción contiguos, al insertarse azarosamente en el genoma de la mosca. Además, demostraron que la movilización del elemento P a nuevos sitios en el genoma por simple transposición podía usarse para generar un gran número de organismos transgénicos, cada uno con un patrón de expresión de *lacZ* distinto que se podía emplear como marcador de un tipo celular específico. En otras palabras, esta estrategia les permitió expresar un gen reportero en una gran variedad de patrones celulares definidos por la acción espacio-temporal de elementos regulatorios específicos. Inicialmente, los autores obtuvieron 49 líneas de moscas transformadas, de las cuales aproximadamente el 70% mostró algún tipo de expresión de *lacZ* espacialmente regulada en el estadio embrionario. Cerca del 50% de todas las líneas expresó *lacZ* específicamente en el SN del embrión. Y alrededor del 25% mostró expresión en grupos definidos de células en el SNC. Otro dato interesante es que solo el 20% de las inserciones fue letal en condición homocigótica.



Haciendo uso de la misma estrategia, y con el objetivo de caracterizar el cerebro de *Drosophila* con respecto a patrones de expresión génica, en un estudio independiente se generaron y analizaron 6000 líneas “enhancer trap”. El análisis de la expresión de *lacZ* en secciones seriales de las cabezas de las moscas demostró que el 90% de las líneas presentó expresión del gen reportero en la cabeza, y que en cerca del 15% de estas la expresión fue ubicua. Más del 50% de las líneas mostró expresión generalizada en el SNC, mientras que cerca del 15% de las líneas mostró expresión preferencial o exclusiva a un grupo limitado de neuronas. Es decir que alrededor del 80% de las líneas reportó expresión en el SNC (Han et al., 1996).

#### **I.7.1.2. El sistema GAL4/UAS.**

El sistema binario de expresión génica dirigida “GAL4 enhancer trap/UAS-GenX” se diseñó como un medio para alterar el destino celular y generar fenotipos dominantes en la mosca (Brand y Perrimon, 1993). Como su nombre lo indica, este sistema está basado en la estrategia “enhancer trap” y en el activador transcripcional de levadura GAL4, el cual no tiene blancos endógenos en *Drosophila*. El primer elemento del sistema, el “GAL4 enhancer trap” ó elemento *P(GAL4)* (pGAWB, Figura 8A), es capaz de insertarse azarosamente en el genoma de la mosca y de dirigir la expresión de GAL4 en un patrón espacio temporal definido por las secuencias regulatorias endógenas atrapadas contiguas a su sitio de inserción. El segundo elemento del sistema, el gen blanco responsivo a GAL4, puede crearse a conveniencia usando el vector pUAST (Figura 8B). Con este vector es posible subclonar cualquier secuencia río abajo de los sitios de unión a GAL4. De tal manera que al cruzar una línea portadora de un gen blanco responsivo a GAL4 con una línea “GAL4 enhancer trap” el gen blanco será activado en la progenie portadora de ambos elementos únicamente dentro de las células que expresan GAL4 (Figura 9).

Algunas de las ventajas del sistema GAL4/UAS son: 1) que este permite la generación rápida de líneas individuales en las cuales la expresión ectópica de un gen de interés se puede dirigir a diferentes tejidos o tipos celulares, 2) que separa el gen blanco de su activador transcripcional en dos líneas de moscas transgénicas distintas, en una línea el gen blanco no se expresa en ausencia del activador y en la otra línea la proteína activadora está presente pero no tiene ningún blanco que activar, asegurando así que las líneas parentales sean viables

y no presenten fenotipo y 3) que solo cuando las dos líneas se cruzan el gen blanco se expresa en la progenie y es posible estudiar las consecuencias fenotípicas.

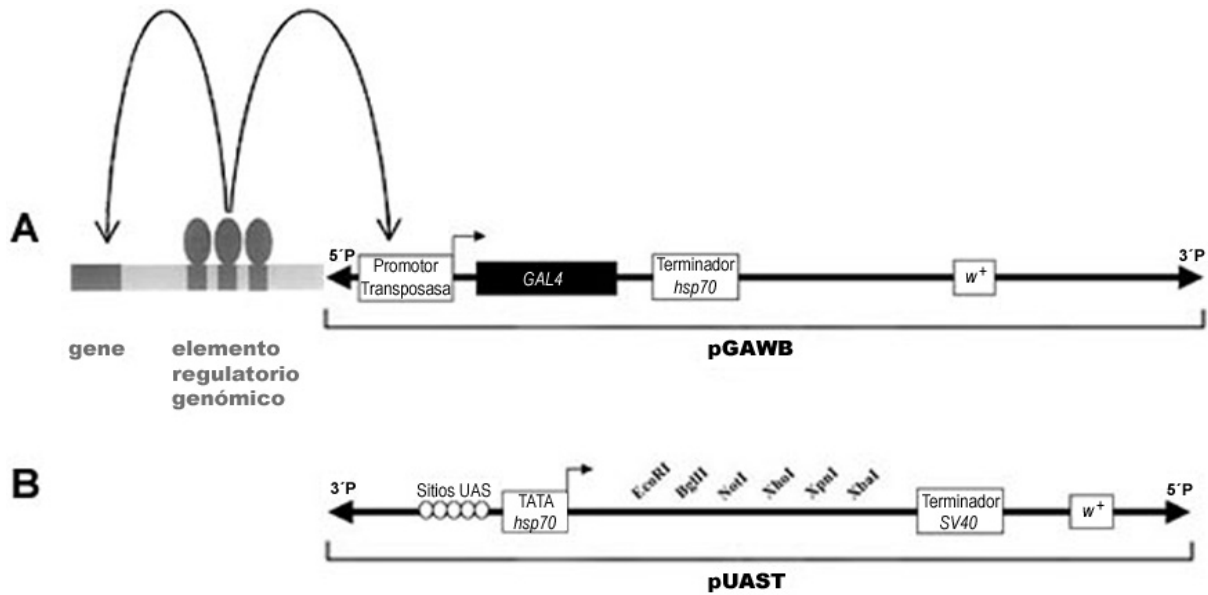


Figura 8. **Los componentes del sistema binario GAL4/UAS.** **A.** El vector pGAWB es un detector de elementos regulatorios ó “enhancer trap” que dirige la expresión de GAL4 en una forma dependiente del sitio de integración genómico. **B.** El pUAST está diseñado para dirigir la transcripción -dependiente de GAL4- de un gen blanco. En este vector es posible subclonar cualquier gen blanco río abajo de un arreglo de 5 sitios optimizados de unión a GAL4 llamados UAS (por *Upstream Activating Sequences*) y río arriba del terminador transcripcional SV40. Tomada y modificada de (Duffy, 2002).

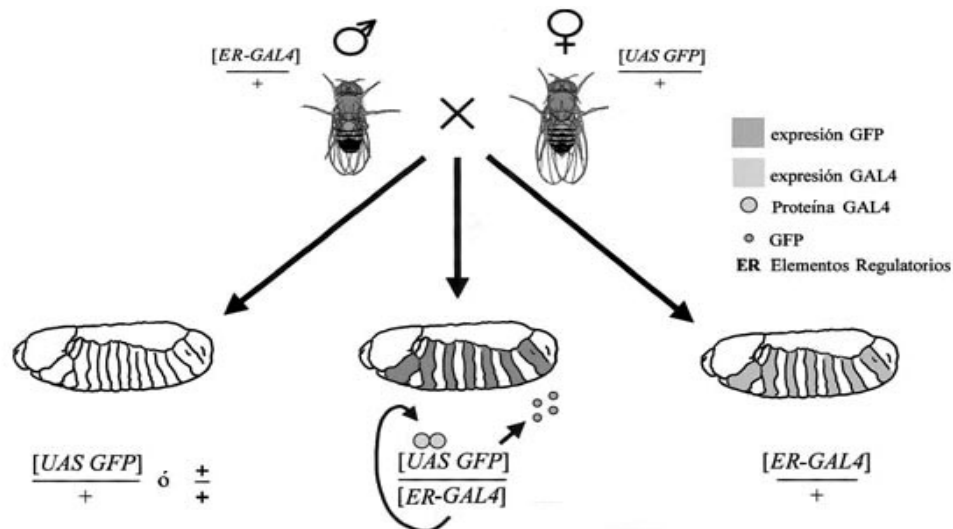


Figura 9. **El sistema binario GAL4/UAS en *Drosophila*.** Cuando machos portadores de un elemento “GAL4 enhancer trap” se aparean con hembras portadoras del elemento UAS-GFP se produce progenie que contiene ambos elementos del sistema. La presencia de GAL4 en un patrón segmentado alternado en el embrión (esquematizado a la derecha) dirige la expresión del gen fusionado a las UAS en un patrón correspondiente (esquematizado en la parte central). Modificada de (Duffy, 2002).

Empleando este sistema y la línea *UAS-lacZ*, Brand y Perrimon analizaron un total de 220 líneas “GAL enhancer trap” independientes, y demostraron que de manera consistente con los resultados obtenidos del análisis del patrón de expresión de los elementos “*lacZ* enhancer trap” en el embrión, el 61% de las inserciones *P(GAL4)* reportó un patrón de expresión de *lacZ* específico en el embrión.

El sistema GAL4/UAS también se ha empleado exitosamente para el estudio de la función neural y el comportamiento en *Drosophila*. La expresión de genes blanco responsivos a GAL4 que funcionan como marcadores celulares ha demostrado ser una herramienta indispensable para la caracterización anatómica de grupos específicos de neuronas [*UAS-GFP*, (Yeh et al., 1995)]. En particular, la expresión de genes blanco tóxicos ha probado tener un gran potencial para el estudio del efecto de la inhibición de la función neuronal en el comportamiento, pues estos ofrecen la posibilidad de silenciar ó desactivar [*UAS-Cadena Ligera de la Toxina de Tétanos*, (Sweeney et al., 1995)] e incluso eliminar [*UAS-reaper*, (Zhou et al., 1997)] grupos específicos de neuronas en el SN de la mosca. De igual manera, pero mediante la expresión de un gen blanco que tiene la propiedad de moverse de manera anterógrada y retrógrada a partir de las células que lo expresan, este sistema también se puede emplear para trazar vías neurales trans-sinápticas en el cerebro de *Drosophila* [*UAS-Wheat Germ Agglutinin*, (Tabuchi et al., 2000)].

### **I.7.1.3. Silenciamiento neuronal: Mecanismo de acción de la Cadena Ligera de la Toxina de Tétanos.**

La Cadena Ligera de la Toxina de Tétanos (TeTxLC) es una metaloproteasa dependiente de zinc que en *D. melanogaster* tiene un efecto de silenciamiento exclusivamente neuronal (Sweeney et al., 1995). Al expresarse intracelularmente en moscas transgénicas, la TeTxLC es capaz de bloquear específicamente la transmisión sináptica química inhibiendo la fusión de las vesículas sinápticas a la membrana durante la exocitosis neuronal (Figura 10A). La especificidad del efecto de esta proteasa en la mosca, se debe a que corta de manera exclusiva a la Sinaptobrevina neuronal, una de las tres proteínas que integran el complejo SNARE el cual forma parte central de la maquinaria de exocitosis sináptica (Figura 10B). La proteólisis de la sinaptobrevina neuronal bloquea la transmisión sináptica y produce el silenciamiento químico de la neurona que expresa la TeTxLC, sin afectar la transmisión

sináptica eléctrica de la misma. Estas propiedades han convertido a la TeTxLC en una herramienta muy importante para el mapeo de la estructura-función del sistema nervioso.

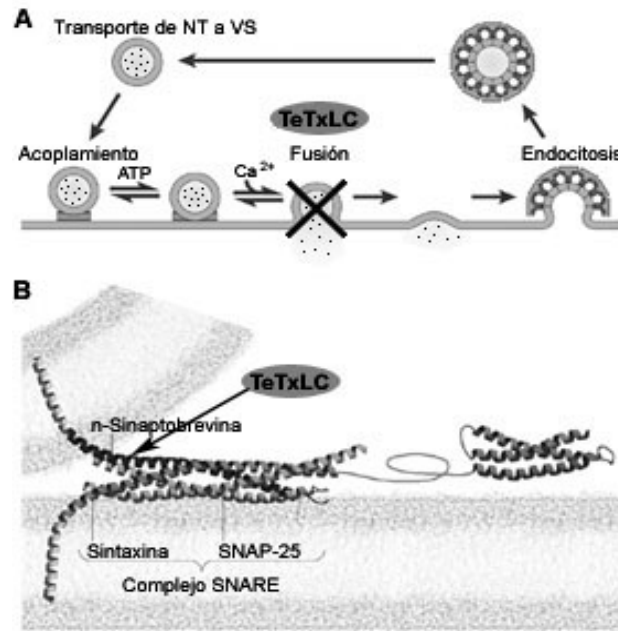


Figura 10. **La expresión de la TeTxLC en *Drosophila* inhibe la transmisión sináptica química.** **A**, Diagrama simplificado del proceso de exocitosis sináptica. La expresión del gen que codifica para la Cadena Ligera de la Toxina de Tétanos (TeTxLC) en moscas transgénicas inhibe la fusión de las vesículas sinápticas a la membrana plasmática y bloquea específicamente la exocitosis sináptica. NT-Neurotransmisor, VS-Vesícula Sináptica. **B**, Modelo a escala basado en la estructura cristalográfica de los componentes del complejo SNARE, el cual forma parte central de la maquinaria de exocitosis sináptica. En la mosca, la TeTxLC es una proteasa que corta de manera específica a la Sinaptobrevina neuronal (n-Sinaptobrevina), una de las tres proteínas que integran el complejo SNARE. Tomado y modificado de (Chapman, 2002).

El uso de la TeTxLC acoplado al sistema GAL4/UAS ha permitido alterar la función de grupos específicos de neuronas y correlacionar su silenciamiento con alteraciones en el comportamiento de la mosca. Su uso ha demostrado ser muy efectivo para el estudio de comportamientos relativamente simples, que van desde respuestas reflejo - como el reflejo de resistencia de la pata (Reddy et al., 1997) y la respuesta de salto olfativa (Sweeney et al., 1995)- hasta el papel de la contracción muscular en la alimentación (Tissot et al., 1998). Se han obtenido resultados similares usando la expresión de la toxina como una herramienta para el estudio de comportamientos mas complejos como el olfato y el gusto en la larva (Heimbeck et al., 1999), la función del cerebro central [como ejemplos, un tipo de aprendizaje visual llamado generalización de contexto (Liu et al., 1999) y el control de la locomoción (Martin et al., 1999a; Martin et al., 1999b)] y los ritmos circadianos (Kaneko et

al., 2000). Finalmente, la expresión de la TeTxLC también se ha empleado para la disección de los componentes del cerebro central involucrados en el abuso de sustancias como la cocaína (Li et al., 2000) y el etanol (Scholz et al., 2000).

En algunos casos, se ha reportado que la expresión dirigida de la TeTxLC en las neuronas puede causar defectos neuroanatómicos secundarios sutiles, relacionados posiblemente con procesos de desarrollo dependientes de actividad, los cuales pueden interferir con el comportamiento (Baines et al., 1999; Heimbeck et al., 1999; Hiesinger et al., 1999). Estos problemas pueden evitarse, con el uso de nuevas técnicas basadas en el sistema GAL4/UAS, que permiten controlar de manera condicional y temporal la expresión génica dirigida por GAL4 (McGuire et al., 2004). En particular, el sistema de expresión génica dirigida temporal y regional (TARGET por sus siglas en inglés) tiene el potencial de trabajar con cualquier línea *P(GAL4)* y *UAS-GenX* existente. Este sistema utiliza una mutante de GAL80 sensible a la temperatura para reprimir la actividad de GAL4. GAL80<sup>ts</sup> se expresa de manera ubicua y dependiendo de la temperatura es capaz de inhibir (19° C) o permitir (29° C) la transcripción del gen blanco responsivo a GAL4.

## **Sección II. La fertilidad y el comportamiento reproductivo de la hembra de *Drosophila melanogaster*.**

En los insectos, la fertilidad o capacidad de generar progenie viable depende de la coordinación de un gran número de actividades asociadas con el sistema reproductivo y el comportamiento de las hembras y los machos. Esta compleja serie de eventos incluye: el desarrollo y maduración de las estructuras involucradas, el reconocimiento de organismos conespecíficos (muy a menudo mediante comportamientos complejos de cortejo), la producción de secreciones por las glándulas accesorias del macho, la producción de espermatozoides y su transferencia del macho a la hembra durante la copulación, y los cambios fisiológicos y de comportamiento en la hembra posteriores a la copulación, los cuales culminan con la deposición de huevos viables y fertilizados en un ambiente apropiado para un desarrollo exitoso.

En *Drosophila melanogaster* como en muchos otros insectos, los comportamientos reproductivos más evidentes de la hembra son: (1) la receptividad al cortejo y (2) la ovoposición, un comportamiento que es independiente del apareamiento y es controlado

voluntariamente por la hembra. Las hembras vírgenes rechazan los intentos de apareamiento del macho durante su primer día posterior a la eclosión. Durante este tiempo los ovarios maduran, los perfiles de expresión de las feromonas en la cutícula cambian para que la hembra sea mas atractiva al macho y los flujos hormonales inducen el desarrollo de la receptividad sexual de la hembra. Las hembras que no se aparean retienen los huevos maduros pero eventualmente depositan los huevos sin fertilizar aproximadamente al quinto día posterior a su eclosión (Carney y Taylor, 2003).

Una vez que la hembra se aparea, su comportamiento se modifica de manera que rechaza nuevos intentos de cortejo. El apareamiento también induce una serie de cambios fisiológicos en la hembra que incluyen, el incremento en la ovogénesis y la ovulación, y el almacenamiento y la utilización del esperma. La ovulación y el almacenamiento del esperma ocurren en diferentes regiones del tracto reproductivo pero se coordinan para un fin común: la fertilización del huevo. Como resultado, el apareamiento induce un incremento en la deposición de los huevos (Wolfner, 1997). Se ha observado que las hembras apareadas son capaces de controlar la ovoposición para asegurar que los huevos sean depositados en el sustrato apropiado (Spradling, 1993).

Si bien los mecanismos de ovogénesis y fertilización se han estudiado ampliamente y se comprenden con gran detalle (Fuller, 1993; Primakoff y Myles, 2002; Spradling, 1993), se ha puesto menos atención al estudio de los procesos de ovoposición y almacenamiento del esperma, incluyendo las contracciones musculares a lo largo del tracto reproductivo involucradas en la preparación y unión eficiente de los gametos y la liberación del huevo fertilizado al medio exterior (Bloch Qazi et al., 2003).

## **II.1. Anatomía del tracto reproductivo femenino de *Drosophila*.**

Como en muchas otras especies de insectos, el tracto reproductivo de la hembra de *Drosophila* está conformado de acuerdo a un plan básico que incluye: dos ovarios, un sistema de conductos eferentes, órganos para el almacenamiento del esperma y glándulas accesorias (Figura 19). Los ovarios (Ov), localizados en la parte anterior del tracto reproductivo, están unidos a través de dos oviductos laterales (Odl) con el oviducto común (Odc), el cual a su vez se conecta con la cámara genital (CG). Esta última se abre al exterior a través de la vulva (Vul), situada entre los gonopodos (Gon), los cuales forman un ovopositor retráctil. Un

receptáculo seminífero (RcpSm), un par de espermatecas (Ept) y un par de glándulas accesorias (GIAc) están conectados al extremo anterior de la cámara genital.

Cada ovario está compuesto de 10 a 20 ovariolos (Ovl) (Figura 19B). Los ovariolos se mantienen unidos por una capa delgada de tejido conectivo, la membrana peritoneal (MP), que contiene una red de finas fibras musculares ramificadas, ligeramente estriadas. Los ovariolos están formados por una serie de cámaras de huevo ó folículos (Fol). El germario (Grm), en el extremo distal del ovario, contiene el oogonio. En el extremo proximal, el folículo basal (Fol´) contiene el ovocito maduro. Cada ovario está rodeado por una membrana epitelial (ME) delgada que contiene fibras estriadas, la cual se constriñe en la base para formar un conducto pequeño o pedicelo (Pdcl). Los pedicelos de los ovariolos convergen y se unen al cáliz (Clz) del oviducto lateral. Los oviductos laterales se fusionan formando un oviducto común, el cual a su vez entra dorsalmente al útero (Utr). En su extremo posterior el útero se vuelve angosto formando la vagina (Vag). La pared del oviducto está formada por una monocapa epitelial cubierta por una cutícula interna de quitina y rodeada por músculos circulares. Los músculos circulares también rodean el epitelio del útero pero no se extienden sobre la vagina posterior. Varias fibras musculares delgadas se extienden desde el útero y la vagina posterior hacia algunos segmentos del abdomen (Miller, 1950).

El receptáculo seminífero (RcpSm) es un tubo delgado, cerrado en uno de sus extremos, que se encuentra enrollado sobre la pared exterior del útero y debajo del oviducto común (Figura 19A). La pared del receptáculo está formada por una capa de células no secretorias cubierta con una delgada cutícula interna y rodeada por una membrana basal y una capa de músculos helicoidales. No se ha observado un esfínter entre el receptáculo y el útero. El receptáculo seminífero enrollado está cubierto por una membrana peritoneal que al parecer no contiene fibras musculares.

Las espermatecas (Ept) son un par de órganos con forma de hongo, cada una compuesta por una cápsula ovalada conectada al útero por un conducto delgado. Las cápsulas se localizan a cada lado del recto (Rct) (Figura 19A) y están rodeadas por una pequeña masa de grasa (TG) (Figura 19B). Cada cápsula está formada por una capa esclerotizada rodeada por una capa de células secretorias conectadas con el lumen de la cápsula. El conducto está formado por un epitelio delgado rodeado por una capa de fibras musculares helicoidales. El lumen del conducto también está cubierto por una capa cuticular.

Las glándulas accesorias son un par de pequeños cuerpos debajo de las espermatecas, rodeados por tejido graso y conectados al útero por delicados conductos (Figura 19B). La pared de cada glándula consiste de una monocapa de células secretorias cubierta por una delgada cutícula interna. Los conductos están compuestos por un epitelio delgado cubierto por una cutícula interna de quitina (Bloch Qazi et al., 2003; Miller, 1950).

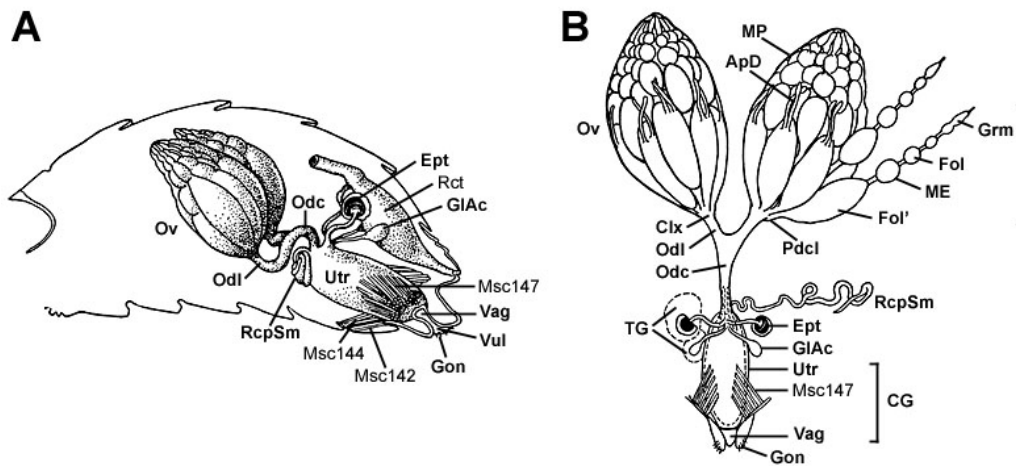


Figura 19. **El tracto reproductivo de la hembra de *Drosophila melanogaster***. **A**, Esquema lateral del abdomen que muestra la distribución de los órganos reproductivos femeninos y la posición del recto (Rct) y algunos músculos que se extienden de la cámara genital (CG) al abdomen (Msc 142, 144 y 147). **B**, Esquema dorsal de los órganos reproductivos que muestra dos ovariolos separados del ovario y el receptáculo semínifero extendido; las líneas discontinuas indican la presencia de un huevo en el útero y de tejido graso rodeando las espermatecas y las glándulas accesorias. MP-membrana peritoneal, Ov-ovario, Ovl-ovariolo, Grm-germario, Fol-folículo, ME-membrana epitelial, Fol'-folículo basal donde se ha completado la formación del huevo, ApD-apéndices dorsales, Pdcl- pedicelo, clz-cáliz, Odl-oviducto lateral, Odc-oviducto común, RcpSm-receptáculo semínifero, Ept-espermateca, GIAC-glándula accesoria, TG-tejido graso, Utr-útero, Vag-vagina, Vul-vulva, Gon-gonopodo. Tomada y modificada (Miller, 1950).

## II.2. La ovogénesis.

Se ha estudiado con gran detalle a la ovogénesis en *D. melanogaster* (Spradling, 1993). Brevemente, los ovocitos se desarrollan de forma secuencial dentro de los ovariolos. Cada ovariole contiene una serie de 6 a 7 cámaras de huevo en estadios de desarrollo en progresión (1-14), con la cámara más pequeña (estadio 1, proveniente del germario) en el ápex y la cámara más desarrollada (estadio 14, conteniendo el ovocito maduro) en la base del ovariole. Cada cámara de huevo está compuesta por una monocapa de células foliculares somáticas que rodea a un ovocito interconectado con 15 células nodrizas a través de puentes citoplásmicos. Durante los estadios tardíos de la ovogénesis (8-14) se producen los cambios más evidentes en la cámara de huevo. El huevo acumula grandes cantidades de yema



(vitelogénesis). Las células nodrizas transfieren su contenido citoplasmático (incluyendo una gran cantidad de ribosomas y mitocondrias) al ovocito y degeneran. Las células foliculares migran y se organizan en subgrupos especializados los cuales forman todos los componentes de la cubierta del huevo (membrana vitelina y corion). Un subgrupo en el extremo anterior de la cámara de huevo participa en la formación del micrópilo, el sitio a través del cual el esperma entrará al huevo. Otro subgrupo de células foliculares migra sobre las células nodriza para formar los apéndices dorsales (ApD, Figura 19), una región especializada del corion en la parte anterior dorsal del huevo involucrada en el intercambio gaseoso. Al término del estadio 14, el desarrollo del ovocito maduro sufre una pausa hasta que este es liberado del ovario.

Varios puntos de control y mecanismos de retroalimentación regulan la producción de los ovocitos maduros en *D. melanogaster*. La edad de la hembra, la disponibilidad de fuentes nutricionales, y otros factores ambientales como la humedad afectan la ovogénesis (Spradling, 1993). En las hembras jóvenes la hormona juvenil y la ecdisona son las principales hormonas implicadas en el control de la vitelogénesis y la maduración de los ovocitos al regular la síntesis de las proteínas de la yema y su captura dentro del ovario (Buszczak et al., 1999; Soller et al., 1999). Si las hembras no cuentan con una fuente de proteína adecuada, la producción de yema es baja y la progresión de las cámaras de huevo hacia la vitelogénesis se retrasa, independientemente de la edad. Debido a que las hembras nunca depositan huevos inmaduros se ha propuesto la existencia de un mecanismo de retroalimentación que previene la liberación precoz de los ovocitos inmaduros dentro del oviducto. Por otro lado, cuando las hembras no encuentran las condiciones ambientales propicias para el desarrollo de las larvas estas retienen los huevos maduros. Si los huevos maduros no son depositados los ovarios acumulan de 2 a 3 cámaras de huevo en el estadio 14. La progresión de las cámaras de huevo hacia la vitelogénesis se bloquea y las cámaras de huevo entre los estadios 7 y 14 desaparecen. Estas características también se observan en las hembras que no son fertilizadas, las cuales ponen pocos huevos (Spradling, 1993). Cuando las hembras se aparean, otro mecanismo de retroalimentación dependiente de la presencia de un péptido transferido a la hembra en el semen (Acp70 ó péptido sexual), regula la maduración de los huevos. Acp70 estimula la progresión de los ovocitos hacia los estadios tardíos de la vitelogénesis y en consecuencia incrementa la frecuencia de ovoposición (Soller et al., 1997; Soller et al., 1999).

### **II.3. La ovoposición.**

La ovoposición en los insectos, incluyendo *Drosophila melanogaster*, es un proceso de, al menos, tres pasos secuenciales acoplados dentro del tracto reproductivo de la hembra. El primer paso es la ovulación, la cual causa la transición de los ovocitos a huevos. Esta ocurre cuando se liberan los ovocitos de los ovarios hacia los oviductos laterales. Posteriormente, los huevos se movilizan a través del oviducto común hasta llegar al útero, donde pueden ser fertilizados por los espermatozoides liberados de los órganos de almacenamiento. Finalmente, los huevos se liberan del útero y se depositan en un sustrato (Heifetz et al., 2000; Miller, 1950).

Aunque se sabe poco acerca del proceso de ovulación en *Drosophila*, se ha propuesto que al igual que en otros insectos esta involucra dos pasos: el primero de ellos consiste en la liberación del ovocito del ovario mediante la apertura del folículo y la degeneración de las células más internas en la región del pedicelo (desintegración del tapón del pedicelo). El segundo paso corresponde al movimiento del ovocito hacia el interior de los oviductos laterales producido, muy probablemente, por la contracción de las redes musculares de la membrana peritoneal del ovario, las fibras contráctiles de la membrana epitelial del ovario y los músculos de las paredes del oviducto (Bloch Qazi et al., 2003; Miller, 1950). La ovulación estimula la progresión de la ovogénesis, regula el ritmo de liberación de los ovocitos, induce cambios en los ovocitos (activación) que los preparan para su fertilización, y coordina la liberación de los ovocitos con la liberación del esperma (Bloch Qazi et al., 2003).

Una vez que el huevo ha sido liberado dentro del oviducto, este es movilizado hacia el útero. Se ha sugerido la participación de las contracciones musculares del oviducto para el paso del huevo a través de este. Como el extremo posterior del ovocito deja el ovario primero, cuando el huevo llega al útero su extremo anterior está situado hacia arriba, con el micrópilo adyacente a la apertura de los órganos de almacenamiento del esperma, listo para ser fertilizado. Posteriormente, el huevo pasa a la vagina para ser finalmente liberado al medio exterior a través de la vulva (ovopositor). La deposición del huevo es efectuada por los músculos del útero y los segmentos genitales, los cuales están organizados para llevar a cabo la peristalsis, la extensión y la retracción de la vulva (Bloch Qazi et al., 2003; Miller, 1950).

#### **II.4. El almacenamiento y la utilización del esperma.**

El proceso de almacenamiento y utilización del esperma puede dividirse en una serie de pasos que incluyen: la progresión del esperma a través del tracto reproductivo femenino después del apareamiento, la entrada del esperma a los órganos de almacenamiento, la retención del esperma y la conservación de su viabilidad dentro de los mismos, y la liberación del esperma hacia el punto de fertilización.

En la hembra de *Drosophila*, el esperma se almacena en dos tipos de órganos especializados localizados en el extremo anterior del útero. El receptáculo seminífero en el lado ventral y un par de espermatecas en el lado dorsal del útero (Figura 19A). Estos dos tipos de órganos difieren en morfología (descrita previamente) y en el patrón de almacenamiento del esperma. En el receptáculo seminífero la mayoría de los espermatozoides se encuentran extendidos y alineados paralelamente dentro de la región distal. Este órgano retiene entre el 65 y 80% del esperma almacenado. En las cápsulas de las espermatecas, los espermatozoides se enrollan formando una masa toroidal. Las espermatecas son los órganos de almacenamiento a largo plazo. Se cree que las espermatecas secretan sustancias que mantienen la viabilidad de los espermatozoides, tanto dentro del receptáculo seminífero, como dentro de las espermatecas. Los espermatozoides son liberados casi exclusivamente del receptáculo seminífero por varios días después del apareamiento. Una vez que se agota el esperma de este órgano, se liberan los espermatozoides de las espermatecas.

El almacenamiento prolonga la disponibilidad del esperma cuando su transferencia no es seguida inmediatamente por la fertilización, incrementando así la fertilidad de la hembra. Las hembras que reciben cantidades normales de esperma, pero almacenan pocos espermatozoides, producen poca progenie. El almacenamiento del esperma también disminuye la receptividad de las hembras, evitando el costo asociado con múltiples apareamientos.

*D. melanogaster* usa el esperma muy eficientemente, uno o muy pocos espermatozoides abandonan los órganos de almacenamiento para fertilizar un huevo ovulado cuando este alcanza el útero. No se sabe si los espermatozoides nadan, son empujados o son succionados a través del micrópilo localizado en la parte anterior del huevo cerca de la entrada de los órganos de almacenamiento. Se ha especulado que el almacenamiento del esperma permite la coordinación de la liberación de los espermatozoides con la ovulación previniendo el desperdicio de gametos. Además se ha propuesto que la coordinación de

ambos procesos también puede disminuir la incidencia de la polispermia (Bloch Qazi et al., 2003).

## **II.5. Los mecanismos de regulación del tracto reproductivo de *Drosophila*.**

La producción de los huevos en el momento apropiado, el almacenamiento del esperma, la liberación coordinada de los ovocitos y del esperma para su fertilización, y la deposición de los huevos en el lugar apropiado son procesos estrictamente regulados que son esenciales para la fertilidad de la hembra de *Drosophila*. Las señales internas de apareamiento inducen la maduración de los huevos, la ovoposición y el almacenamiento del esperma. El tracto reproductivo de la hembra de *Drosophila* también está sujeto a un estricto control hormonal y neural que asegura el movimiento correcto y preciso de los músculos del tracto reproductivo para el paso de los huevos a través de este, para el correcto almacenamiento y liberación del esperma, y finalmente, para la deposición de los huevos fertilizados. Sin embargo, el conocimiento sobre los mecanismos moleculares y de desarrollo que sustentan el control de estos procesos es limitado.

### **II.5.1. Regulación dependiente del apareamiento.**

Los componentes del fluido seminal, transferido a la hembra durante la copulación, juegan un papel importante en la regulación de la función del tracto reproductivo de la mosca. Las proteínas del semen secretadas por las glándulas accesorias (Acps) y por el conducto eyaculatorio producen cambios inmediatos que incluyen la disminución de la receptividad de la hembra, la estimulación de la ovoposición, y el almacenamiento y la utilización del esperma. De los procesos antes mencionados, los dos primeros persisten por varios días debido a la presencia del esperma almacenado (“efecto esperma”).

Los péptidos sexuales Acp70A (SP) y DUP99B (péptido del conducto eyaculatorio) inducen la disminución de la receptividad de la hembra y la estimulación de la ovoposición (Aigaki et al., 1991). El SP es el principal factor involucrado en la producción de estos cambios posteriores al apareamiento a corto (1 día) y a largo plazo (1 semana). Se ha propuesto que la liberación del SP unido al esperma almacenado es necesaria para inducir los cambios a largo plazo (Chapman et al., 2003; Liu y Kubli, 2003). El SP promueve la vitelogénesis al estimular la síntesis de la hormona juvenil (Moshitzky et al., 1996). Los péptidos sexuales tienen sitios de unión en el cerebro, el GTA y el tracto reproductivo

(Ottiger et al., 2000). En el caso del SP, se ha propuesto que los cambios inducidos por el apareamiento se producen principalmente por la unión del péptido al sistema nervioso de la hembra (Nakayama et al., 1997).

Otra proteína del semen, la Acp26Aa (ovulina), se procesa dentro del tracto de la hembra, y estimula la ovulación y la ovoposición a corto plazo (Heifetz et al., 2000; Herndon y Wolfner, 1995). La ovulina se acumula en la base del ovario durante y justo después de la copulación (Heifetz et al., 2000). Además, esta proteína entra a la hemolinfa (Lung y Wolfner, 1999), por lo que se ha sugerido que puede actuar localmente dentro del tracto reproductivo y/o vía el sistema neuroendocrino para mediar la actividad contráctil del ovario y la musculatura del oviducto (Bloch Qazi et al., 2003).

Por otra parte, la proteína llamada Acp36DE es esencial para el correcto almacenamiento del esperma. Acp36DE facilita el almacenamiento del esperma, sin afectar su viabilidad. Consistentemente, esta glucoproteína se localiza en la pared del oviducto anterior a la entrada de los órganos de almacenamiento (como uno de los componentes de la barrera que mantiene al esperma en el útero) y en el extremo anterior del tapón de apareamiento generado por el macho. Además, Acp36DE entra a los órganos de almacenamiento (Neubaum y Wolfner, 1999a). Finalmente, Acp36DE se une al esperma. La Acp36DE localizada en el oviducto y el tapón de apareamiento se expulsa cuando el primer huevo se ovoposita (Bertram et al., 1996). Basados en estos datos se han planteado varios modelos no excluyentes para la acción de Acp36DE. Primero, esta proteína podría interaccionar con blancos en el tejido del tracto reproductivo de la hembra estimulándolos para empujar o succionar a los espermatozoides dentro de los órganos correspondientes mediante contracciones musculares. También podría estimular la liberación de moléculas quimioattractantes. Alternativamente, Acp36DE podría limitar los movimientos del esperma mediante su asociación con el oviducto, con el tapón de apareamiento y con el esperma facilitando su acumulación en regiones específicas. Finalmente, Acp36DE podría atraer al esperma formando un andamiaje o proporcionando señales guía para el movimiento del esperma (Bloch Qazi et al., 2003).

Una proteína secretada por el bulbo y conducto eyaculatorio, la carboxilo-esterasa, esterasa-6 (Est-6), también afecta el proceso de ovoposición y la receptividad, así como la liberación del esperma de su almacenamiento en el receptáculo seminífero. Aunque se ha especulado que la Est-6 debe causar la liberación del esperma afectando la movilidad de los

espermatozoides o catalizando la producción de moléculas necesarias para mantener su movilidad, la presencia de esta proteína en la hemolinfa sugiere la existencia de varios blancos de acción (Bloch Qazi et al., 2003).

Como se mencionó anteriormente, otro factor que induce repuestas posteriores al apareamiento es el esperma contenido en el semen (“efecto esperma”). La transferencia y almacenamiento del esperma son esenciales para elevar la frecuencia de ovogénesis y ovoposición (Heifetz et al., 2001; Neubaum y Wolfner, 1999a). Se ha propuesto que el efecto del esperma en el tracto reproductivo femenino puede ser causado por sustancias propias de la hembra activadas por el esperma o por la liberación de sustancias derivadas del macho adheridas al esperma almacenado (Kubli, 1992). Alternativamente, la presencia de una gran cantidad de esperma podría estimular el SNC de la hembra a través de receptores que detectan la presión dentro de los órganos de almacenamiento o incluso el movimiento del esperma, y/o la distensión de las paredes del útero causada por el esperma y el semen (Quazi et al., 2003).

### **II.5.2. Regulación neural de la ovoposición.**

El tracto reproductivo de la hembra de *D. melanogaster*, de manera similar al de muchos insectos, está innervado bilateralmente por ramificaciones del nervio abdominal central que sale del GTA, sugiriendo la participación de regulación neural sobre la actividad contráctil de los músculos que lo conforman (Miller, 1950; Taylor, 1989). Además, se ha observado que los ovarios, la membrana peritoneal y el oviducto sufren contracciones miogénicas espontáneas en solución salina (Miller, 1950). A pesar de los estudios previos, la información que se tiene sobre la identidad de la innervación del tracto reproductivo de la hembra de *Drosophila* y su función en respuesta a distintas señales neurales es escasa. La importancia de la innervación neural en la función del tracto reproductivo quedó demostrada inicialmente en experimentos con animales mosaico. Con la ayuda de estos organismos se mapeó el sitio de control de la ovoposición al tórax de la hembra (Szabad y Fajszsi, 1982), donde se localiza el GTA. En años recientes, el uso de mutantes para diferentes genes y el desarrollo de herramientas genéticas que permiten alterar el destino celular, ha sido de gran ayuda para empezar a entender las bases neurales de procesos como la ovoposición y el almacenamiento del esperma. Se ha reportado que las hembras con mutaciones en uno de los genes de la cascada de determinación sexual, el gen que codifica para el factor transcripcional

*dissatisfaction* (*dsf*), presentan un defecto en la ovoposición correlacionado con la ausencia de innervación motoneuronal en los músculos uterinos (Finley et al., 1997). Sin embargo, no se han identificado las neuronas específicas, reguladas por *dsf*, responsables de dicha innervación.

Mutaciones en el gen *logjam* (*loj*), el cual comparte homología con componentes de la vía secretoria involucrada en el transporte de los neurotransmisores a su sitio de liberación, también afectan el proceso de ovoposición. Este gen se expresa en un número reducido de neuronas en el cerebro y el GTA. Los blancos innervados por estas neuronas aún no han sido identificados. Interesantemente, el tracto reproductivo de las hembras *loj* si está innervado, lo cual sugiere que el defecto en la ovoposición se debe a la pérdida de una señal requerida y no a la simple pérdida de innervación motoneuronal como en el caso de las hembras mutantes *dsf* (Carney y Taylor, 2003).

Un ejemplo de esterilidad ocasionado por la falta de un neuromodulador lo constituyen las moscas con la mutación nula *Tβh<sup>nM18</sup>* en el gen que codifica para la enzima *Tiramina β-hidroxilasa*, la cual convierte la tiramina a octopamina (OA). La OA es una amina biogénica que actúa como neuromodulador, neurotransmisor, y neurohormona en los invertebrados y es considerada como el homólogo funcional de la Noradrenalina en estas especies. Las neuronas octopaminérgicas en el SNC de los invertebrados, como sus contrapartes noradrenérgicas en los vertebrados, son pocas en número y llevan a cabo su función mediante la activación de múltiples receptores octopaminérgicos acoplados a proteínas G. En los insectos, la OA modula numerosos blancos dentro del SNC, así como la función de la mayoría de los órganos sensoriales y órganos periféricos, incluyendo los músculos esqueléticos y viscerales (como los de los órganos reproductivos femeninos) (Clark y Lange, 2003; Orchard y Lange, 1985; Roeder, 1999). Consistentemente con el papel reportado para la OA en la regulación de los órganos reproductivos, las hembras *Tβh<sup>nM18</sup>* no depositan huevos debido a la falta de este neuromodulador. A pesar de que las moscas si se aparean, los huevos maduros se retienen en los ovarios ocasionando que las hembras lleguen a tener abdómenes anormalmente grandes (Monastirioti et al., 1996). Las neuronas Tβh/OA localizadas en la línea media ventral de ganglio abdominal de la hembra, innervan los ovarios (incluyendo al cáliz), los oviductos laterales y el oviducto común. Adicionalmente, el rescate del fenotipo mutante *Tβh<sup>nM18</sup>*, mediante la expresión del gen *Tβh* de manera dirigida en un subgrupo de las neuronas Tβh localizadas en el ganglio abdominal, sustenta la

participación de estas neuronas en el control de la ovulación y explica el fenotipo de retención de huevos observado en las hembras *Tβh<sup>nM18</sup>* (Monastirioti, 2003).

De acuerdo con estos datos se ha propuesto que el receptor específico para la OA acoplado a la proteína G, llamado OAMB (por su alta expresión en los cuerpos fungiformes), el cual estimula la producción de AMP cíclico y el incremento  $Ca^{2+}$  intracelular (Han et al., 1998) está involucrado en el control de la ovulación en la mosca (Lee et al., 2003). Este receptor se expresa en el SNC y en los oviductos laterales y el oviducto común. Las hembras mutantes que presentan deleciones del gen *oamb*, cortejan y se aparean normalmente, pero son estériles pues presentan un fenotipo similar al de las hembras mutantes *TbH<sup>nM18</sup>*.

Se sabe muy poco sobre el papel fisiológico de la OA como modulador de la transmisión sináptica glutamatérgica en *Drosophila melanogaster*. En los insectos, el glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor excitatorio en la unión neuromuscular y está presente en todas las terminales nerviosas motoras (Jan y Jan, 1976). El Glu actúa como un neurotransmisor convencional induciendo un potencial de unión excitatorio y una contracción muscular asociada a este. La OA por su parte inhibe, tanto presinápticamente como postsinápticamente, la transmisión sináptica en la unión neuromuscular en la larva de la mosca (Nishikawa y Kidokoro, 1999), al ser liberada por los botones sinápticos de tipo II que contienen tanto Glu como OA (Monastirioti et al., 1995). Hasta el momento se desconoce la función exacta de la señalización octopaminérgica sobre el oviducto de *Drosophila*. La OA podría estar involucrada en la regulación de la actividad contráctil de la musculatura de los ovarios y el oviducto para inducir la liberación de los ovocitos maduros. Como el epitelio del tracto reproductivo de *Drosophila* tiene características secretorias, otra alternativa es que la OA liberada en el oviducto afecte la actividad secretoria del epitelio basal del ovario induciendo la desintegración del tapón del pedicelo para liberar a los ovocitos maduros.

### **II.5.3. Regulación neural de los órganos de almacenamiento del esperma de la hembra.**

La abundante inervación del receptáculo seminífero en *D. melanogaster* (Miller, 1950), sugiere que las contracciones locales de este órgano de almacenamiento deben ser importantes para la succión y/o distribución eficaz del esperma. En solución salina, el tubo del receptáculo seminífero sufre lentas contracciones transversales (Miller, 1950). En muchos animales, las contracciones musculares de la hembra aparentemente empujan al esperma del útero hacia dentro de los órganos de almacenamiento (Neubaum y Wolfner, 1999b). Otra



alternativa es que la inervación del receptáculo influya en el almacenamiento mediante la estimulación de células endocrinas que secreten sustancias quimioattractantes para el esperma. Por otra parte, las espermatecas sufren una rotación por la contracción del conducto que las une con el útero cuando se encuentran en solución salina (Miller, 1950).

Usando organismos mosaico se demostró que el SNC femenino tiene un papel indispensable en el control del almacenamiento del esperma (Arthur et al., 1998), sin embargo, hasta ahora no se ha identificado el sustrato neural responsable de inervar los órganos de almacenamiento del esperma en *Drosophila*. La expresión del receptor octopaminérgico OAMB en el receptáculo seminífero y en las espermatecas (Lee et al., 2003), sugiere la participación de modulación octopaminérgica sobre estos órganos.

#### **II.5.4. Otras evidencias: regulación de la contracción del oviducto y la espermateca en *Locusta migratoria*.**

La mayor parte de la información que se tiene sobre la identidad y función específica de los neurotransmisores, neuromoduladores o neurohormonas involucrados en la regulación de la ovoposición y los órganos de almacenamiento del esperma en los insectos proviene principalmente de estudios realizados en el insecto hemimetábolo *Locusta migratoria*.

##### **II.5.4.1. Glutamato, proctolina y octopamina.**

Al igual que en la mosca, el tracto reproductivo femenino del ortóptero *Locusta* está inervado por un grupo relativamente pequeño de neuronas localizadas en el ganglio abdominal del SNC. En este insecto, la contracción muscular del oviducto es controlada por sustancias neuroactivas tales como el Glu, la proctolina y la OA (Lange y Nykamp, 1996).

En *Locusta*, el Glu y la proctolina actúan como cotransmisores excitatorios en el oviducto (Orchard y Lange, 1986). En este insecto, la proctolina se localiza dentro de las regiones inervadas del oviducto. Este pentapéptido induce la contracción tónica del oviducto de *Locusta* con un incremento de las contracciones musculares (Lange et al., 1986), en ausencia de cambios importantes en la forma o amplitud del potencial de unión excitatorio o del potencial muscular (Orchard y Lange, 1986). Al parecer, la proctolina actúa a través de la vía del fosfoinositol, incrementando la concentración de calcio intracelular a partir del  $Ca^{2+}$  extracelular y de las pozas intracelulares (Lange, 1988; Lange et al., 1987; Wilcox y Lange, 1995). Se ha demostrado que la contracción muscular del oviducto es un evento mediado por

la calmodulina (Nykamp et al., 1994). El calcio se une y activa a la calmodulina, la cual puede activar a proteínas dependientes de ésta. Una posible proteína blanco es la cinasa que fosforila la cadena ligera de la miosina, permitiendo así el ciclo de interacciones actina-miosina y con ello la generación de fuerza en el músculo (Lange y Nykamp, 1996).

Además de la acción de la proctolina como un cotransmisor en la sinapsis en las regiones inervadas del oviducto de *Locusta*, se ha propuesto un papel para esta como neurohormona en las regiones no inervadas de los oviductos laterales (Lange, 2002).

La proctolina también se ha identificado en células y procesos del ganglio abdominal que inervan la espermateca (Lange, 1993). En este órgano, la proctolina también incrementa el tono basal y la contracción muscular (Lange, 1993).

Por su parte, las neuronas octopaminérgicas localizadas en la línea media del ganglio abdominal de *Locusta*, de manera similar a lo reportado en *Drosophila*, inervan la musculatura del oviducto (Orchard y Lange, 1985). La OA inhibe la contracción muscular y relaja el tono basal de los músculos del oviducto (Lange y Tsang, 1993; Orchard y Lange, 1985). Fisiológicamente, la OA reduce la amplitud de los potenciales de unión excitatorios e hiperpolariza el potencial de membrana muscular (Orchard y Lange, 1986). Al parecer, la OA se une a receptores octopaminérgicos presinápticos para reducir el contenido cuántico liberado de las terminales glutamatérgicas excitatorias (Lange y Nykamp, 1996). Además, esta se une a receptores postsinápticos (Lange y Nykamp, 1996; Orchard y Lange, 1986) que activan proteínas G (Nykamp y Lange, 1998), produciendo un incremento de AMP cíclico intracelular. En *Locusta*, se ha propuesto que este incremento puede activar a un número de proteínas potenciales involucradas en la relajación del músculo (Lange y Nykamp, 1996). Se cree que la terminación de la respuesta a OA puede ocurrir por la disociación de esta de su receptor y/o por la hidrólisis del AMP cíclico por una fosfodiesterasa dentro de las células del músculo del oviducto (Nykamp y Lange, 2000).

En *Locusta*, se ha sugerido que el Glu y la proctolina son liberados por la misma neurona para inducir la contracción muscular del oviducto, y que la OA es liberada por un grupo diferente de neuronas para inhibir pre y postsinápticamente dicha contracción (Lange y Nykamp, 1996). Además, se tiene evidencia que indica que la proctolina modula la respuesta de los oviductos a la OA al modificar los niveles de AMP (Nykamp y Lange, 2000). Con base en estos resultados se ha propuesto que la OA modula las contracciones del oviducto de

*Locusta* de manera conjunta con la proctolina, al inhibir la contracción basal sostenida producida por esta.

En contraste a los claros efectos excitatorios del glutamato y la proctolina en el tracto reproductivo de *L. migratoria*, la OA tiene un papel dual en la contracción muscular en este insecto. La espermateca de *Locusta* también recibe inervación octopaminérgica (Clark y Lange, 2003). Sin embargo, en este órgano, la OA muestra un efecto opuesto al observado en los oviductos incrementando la contracción muscular. Interesantemente, a pesar de tener un efecto opuesto sobre la contracción del oviducto y la espermateca, la OA parece modular la actividad de ambos órganos a través del mismo segundo mensajero, el AMP cíclico (Clark y Lange, 2003).

#### **II.5.4.2. Otros moduladores en *Locusta*.**

Otras sustancias neuroactivas menos estudiadas pero con efectos claros en la contracción muscular del tracto reproductivo de *Locusta* son, la amina biogénica serotonina, los péptidos relacionados a la FMRFamida (FaRPs), el péptido cardioactivo de crustáceo (CCAP) y las locustataquicininas.

La serotonina, induce un incremento en la contracción muscular del oviducto (Orchard y Lange, 1985) y la espermateca de *Locusta* (Clark y Lange, 2002a). Debido a que no se ha observado inervación serotoninérgica sobre el oviducto, se ha sugerido que esta amina debe actuar como neurohormona en este tejido (Orchard y Lange, 1985). Por el contrario, sí se ha detectado la presencia de serotonina sobre todas las regiones de la espermateca (Clark y Lange, 2002a).

Por otro lado, se han localizado péptidos relacionados a la SchistoFLRFamida en la región inervada del oviducto (Wang y Orchard, 1995) y se ha observado inmunoreactividad relacionada a los FaRPs en los procesos que inervan la espermateca (Clark y Lange, 2002b). En el oviducto, la SchistoFLRFamida disminuye la contracción muscular (Lange et al., 1991; Peeff et al., 1993) mediante la activación de receptores acoplados a proteínas G (Wang et al., 1995). La SchistoFLRFamida no induce la hiperpolarización del potencial de membrana muscular pero si disminuye la amplitud de los potenciales de unión excitatorios (Lange et al., 1991). La SchistoFLRFamida también disminuye la contracción de la espermateca, a diferencia de la FMRFamida que induce su incremento (Clark y Lange, 2002b).

Aunque no se ha detectado inmunoreactividad relacionada al CCAP en el oviducto de *Locusta*, se ha reportado que este nonapéptido es capaz de potenciar la contracción de este tejido, sugiriendo un posible papel neurohormonal para el CCAP en el oviducto de este insecto (Donini et al., 2001).

Otros neuropéptidos que inducen la actividad espontánea del oviducto son las locusta-taquicininas (LomTKs). Estos péptidos no se han detectado en los nervios y procesos que inervan el oviducto de *Locusta*, pero sí en el cuerpo graso y tejido conectivo que lo rodean, por lo que se ha sugerido que también deben actuar como neurohormonas en el oviducto (Kwok et al., 1999).

## JUSTIFICACIÓN

El conocimiento acerca de los circuitos neuronales, los procesos de desarrollo involucrados en su organización y su relación con el funcionamiento del cerebro y el comportamiento es muy limitado. Con el objetivo de entender más sobre estos aspectos en la mosca, diseñamos un tamizado genético de pérdida de función usando el sistema GAL4/UAS y la Cadena Ligera de la Toxina de Tétanos (TeTxLC), para identificar líneas *P(GAL4)* que nos permitieran aislar y caracterizar grupos discretos de neuronas en el sistema nervioso central (SNC) esenciales para la fertilidad. Con base en un par de reportes previos sobre el patrón de expresión de los “enhancer trap” (Han et al., 1996; O’Kane y Gehring, 1987), nosotros esperábamos que la mayoría de los elementos P de un banco de líneas *P(GAL4)* atraparía secuencias reguladoras de genes con funciones pleiotrópicas ó de mantenimiento (“house keeping”). Estas líneas tendrían una expresión generalizada de GAL4 y al cruzarse con la línea *UAS-TeTxLC*, la toxina se expresaría también generalizadamente incluyendo el Sistema Nervioso (SN), causando un fenotipo de letalidad en la progenie debido a la desactivación neuronal masiva (Figura 11A). Por otra parte, esperábamos que un número menor de elementos P atraparía secuencias reguladoras de genes con un patrón de expresión no neuronal. Debido a que la TeTxLC solo afecta la función neuronal, la progenie de las líneas portadoras de estos elementos sería viable sin fenotipo alguno (Figura 11B). Finalmente esperábamos que los elementos P de las líneas restantes atraparían secuencias reguladoras de genes con un patrón de expresión restringido a grupos pequeños de neuronas en el SN con una función específica. En estos casos, la expresión dirigida de GAL4 y de la TeTxLC produciría progenie viable con fenotipos específicos causados por la desactivación del grupo neuronal atrapado, incluyendo la esterilidad y algunos otros fenotipos evidentes como defectos motrices ó de desarrollo (Figura 11C).

La fertilidad es un proceso complejo, regulado por una gran cantidad de genes que participan en aspectos muy diversos que van desde el desarrollo del sistema reproductivo y el sistema nervioso hasta la regulación hormonal y neuronal necesaria para la generación del comportamiento sexual. En la mosca, el éxito de este proceso depende de la coordinación de un gran número de procesos también complejos como son el aprendizaje y la memoria, el cortejo, la copulación, la fertilización y la ovoposición. La importancia de la fertilidad en la supervivencia de los organismos, su fácil evaluación fenotípica y el gran número de elementos neuronales, fisiológicos y conductuales que la componen, hacen de este fenómeno

biológico un parámetro de evaluación ideal para la búsqueda genética de grupos discretos de neuronas involucrados en el comportamiento ó en procesos fisiológicos específicos. Bajo este contexto, es relevante mencionar que *fruitless*, un gen que controla el comportamiento sexual en la mosca, se aisló originalmente como una mutación que causaba esterilidad en los machos (Gill, 1963). De manera similar, la mutante llamada *dissatisfaction*, la cual afecta el comportamiento de cortejo y la diferenciación neural en ambos sexos, se aisló por su fenotipo de esterilidad en las hembras (Finley et al., 1997).

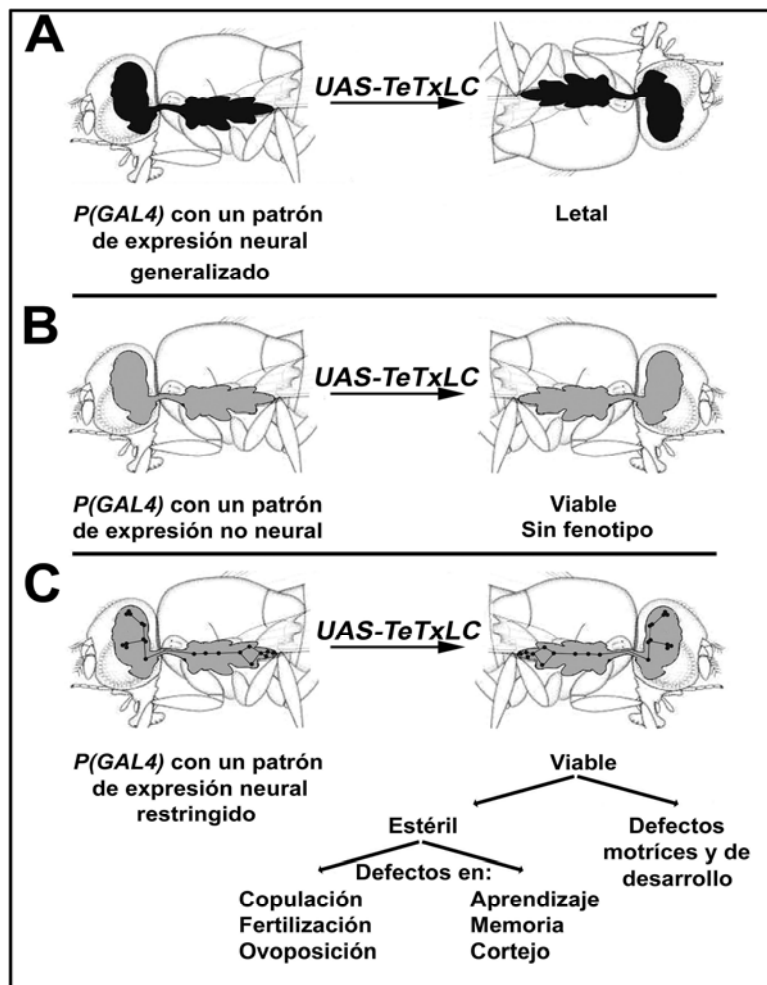


Figura 11. Lógica del tamizado genético para identificar líneas de elementos  $P(GAL4)$  que dirigen la expresión de la TeTxLC a grupos neurales discretos involucrados en la fertilidad y otros procesos fisiológicos de *Drosophila*. Las líneas  $P(GAL4)$  se cruzaron independientemente con la línea  $UAS-TeTxLC$  y la progenie se analizó para identificar: **A**, aquellas inserciones que presentaran un fenotipo de letalidad (con un patrón de expresión de GAL4 generalizado, negro sólido); **B**, que fueran viables y no presentaran fenotipo (la expresión no neural de GAL4 es irrelevante debido a que la TeTxLC no tiene efecto en tejidos no neurales); **C**, que fueran estériles ó presentaran algún otro fenotipo evidente (con expresión neuronal discreta de GAL4, trazos y puntos negros) en presencia de la TeTxLC. El SNC está representado por la zona gris.

## OBJETIVOS

### 1. Objetivo general del proyecto:

Identificar y caracterizar grupos neuronales discretos en el sistema nervioso central de *Drosophila melanogaster* involucrados en la fertilidad.

### 2. Objetivos particulares:

Identificar inserciones  $P(GAL4)$  que marcan grupos pequeños de neuronas en el sistema nervioso central de *D. melanogaster* esenciales para la fertilidad usando el sistema bipartito GAL4/UAS.

1. Generar un banco de inserciones  $P(GAL4)$  estables mediante la movilización por transposición de elementos  $P(GAL4)$  previamente insertados en líneas de moscas disponibles.
2. Aislar las líneas  $P(GAL4)$  que presentan fenotipo de esterilidad así como otros fenotipos evidentes al expresar de manera dirigida la cadena ligera de la toxina de tétanos ( $UAS-TeTxLC$ ).
3. Identificar las células del SNC atrapadas por las inserciones  $P(GAL4)$  en las líneas aisladas empleando la línea  $UAS-GFP$ .

Caracterizar una línea  $P(GAL4)$  con fenotipo de esterilidad dependiente de la expresión de la TeTxLC y patrón de expresión neural discreto.

1. Determinar el sitio de inserción del elemento  $P(GAL4)$  en la línea seleccionada usando PCR inverso.
2. Analizar el patrón de desarrollo del grupo neuronal marcado por el elemento  $P(GAL4)$  con ayuda de la línea  $UAS-GFP$ .
3. Identificar los blancos inervados por el grupo neuronal atrapado empleando la línea  $UAS-Nsyb-GFP$ .
4. Dilucidar la identidad de los neurotransmisores ó neuropéptidos empleados por el grupo neuronal atrapado mediante inmunohistoquímica.
5. Estudiar la fisiología del grupo neuronal atrapado.

## METODOLOGÍA

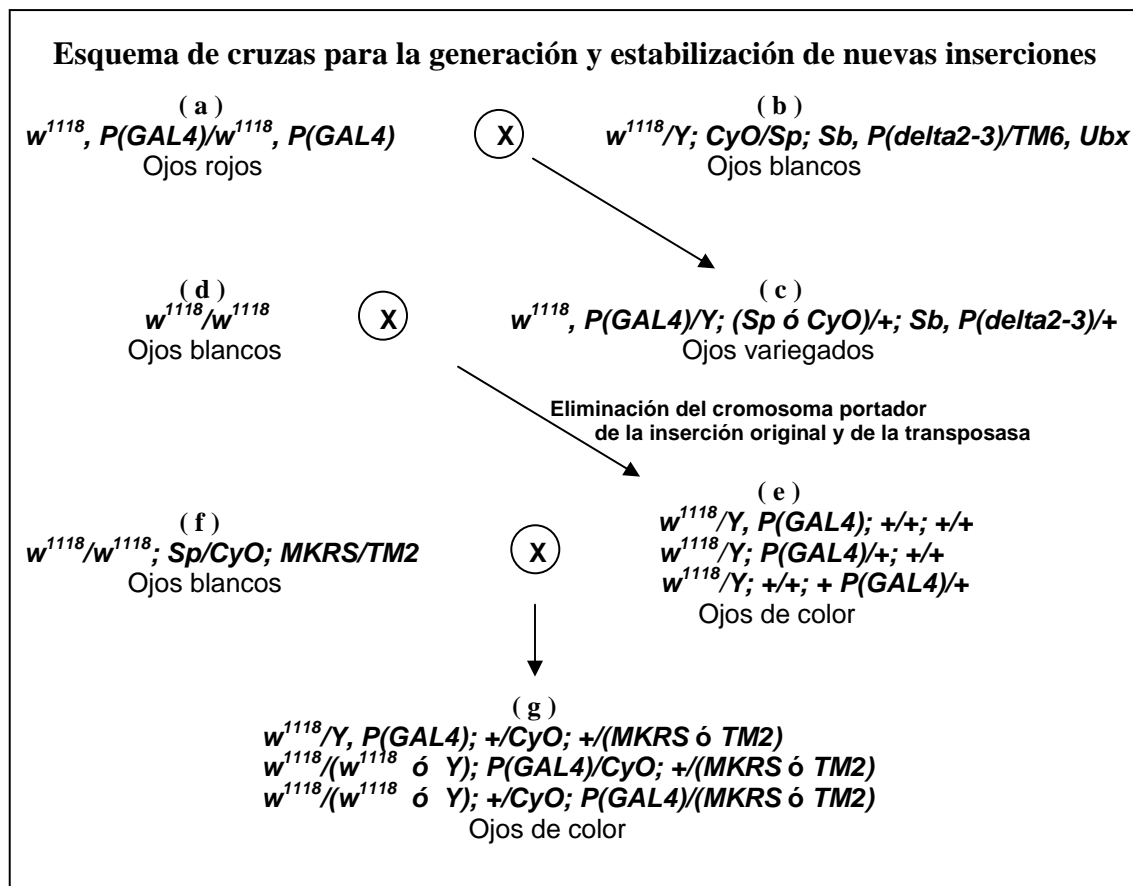
### 1. Líneas de *D. melanogaster* empleadas.

Para este trabajo se contó con un banco inicial de 31 líneas *P(GAL4)* generado por el Dr. E. Reynaud del Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M. Para la obtención de nuevas inserciones se usaron las líneas  $w^{1118}, P(GawB)I67Y$  (Bloomington Stock Center # 3741) y  $w^{1118}, P(GawB)c698a$  (Bloomington # 3739) como fuente de los elementos P y la línea  $w^{1118}; CyO/Sp; Sb, P(delta2-3)/TM6, Ubx$  donada por el Dr. J. Riesgo del Instituto de Neurobiología de la U.N.A.M como fuente de la transposasa. Para el aislamiento de nuevas inserciones se empleó el alelo  $w^{1118}$ . La línea doble balanceada  $w^{1118}; CyO/Sp; MKRS/TM2$  se utilizó para estabilizar y mapear las nuevas inserciones. Los cromosomas balanceadores *CyO* (cromosoma 2) y *MKRS, TM2, TM3* y *TM6B* (cromosomas 3) contienen rearrreglos genómicos que impiden la recombinación homóloga, permitiendo conservar cualquier alelo de manera estable (Lindsley y Zimm, 1992). Para la expresión de la Cadena Ligera de la Toxina de Tétanos (TeTxLC) se usó la línea homocigota  $w^{1118}; P(UAS-TeTxLC)$  [TNT-E, inserción en el cromosoma 2, (Sweeney et al., 1995)]. La expresión condicional de la TeTxLC se logró utilizando la línea  $w^{1118}; P(tubP-GAL80^{ts})2/TM2$  (Bloomington # 7017) que expresa el alelo termosensible del gen *GAL80* de manera ubicua. Para expresar la GFP y la sinaptobrevina neuronal fusionada a GFP se usaron las líneas homocigotas  $w^{1118}; P(UAS-EGFP)5a.2$  (inserción en el cromosoma 2, Bloomington # 5431) y  $w^{1118}; P(UAS-Nsyb-GFP)$  [inserción en el cromosoma 3, (Ito et al., 1998)] respectivamente. El análisis del almacenamiento del esperma se llevo a cabo con ayuda de la línea portadora de la fusión del gen *don Juan* y la *GFP*, que dirige la expresión de la GFP de manera específica a los espermatozoides [*dj-GFP*, (Santel et al., 1997)]. Para identificar las sinapsis glutamatérgicas se utilizó la línea portadora de la fusión del *Receptor de Glutamato IIA* con la *RFP* [*GluR-IIA<sup>RFP</sup>*, cromosoma 3, (Rasse et al., 2005)]. Para el análisis genético de la inserción *IHI2D* se usó el alelo del *locus capicua/fettucine/bullwinkle ry<sup>506</sup> P(PZ) bwk<sup>08482</sup>/TM3, ry<sup>RK</sup> Sb<sup>1</sup> Ser<sup>1</sup>* (Bloomington # 10309) y una deficiencia que afecta el mismo *locus* identificada como *Df(3R)DI-BX12, ss<sup>1</sup> e<sup>4</sup> ro<sup>1</sup>/TM6B, Tb<sup>1</sup>* (Bloomington # 3012). La línea *Oregon-R* se empleó para la evaluación de la fertilidad así como para el establecimiento de parámetros control en algunos experimentos.



## 2. Generación de nuevas inserciones *P(GAL4)*.

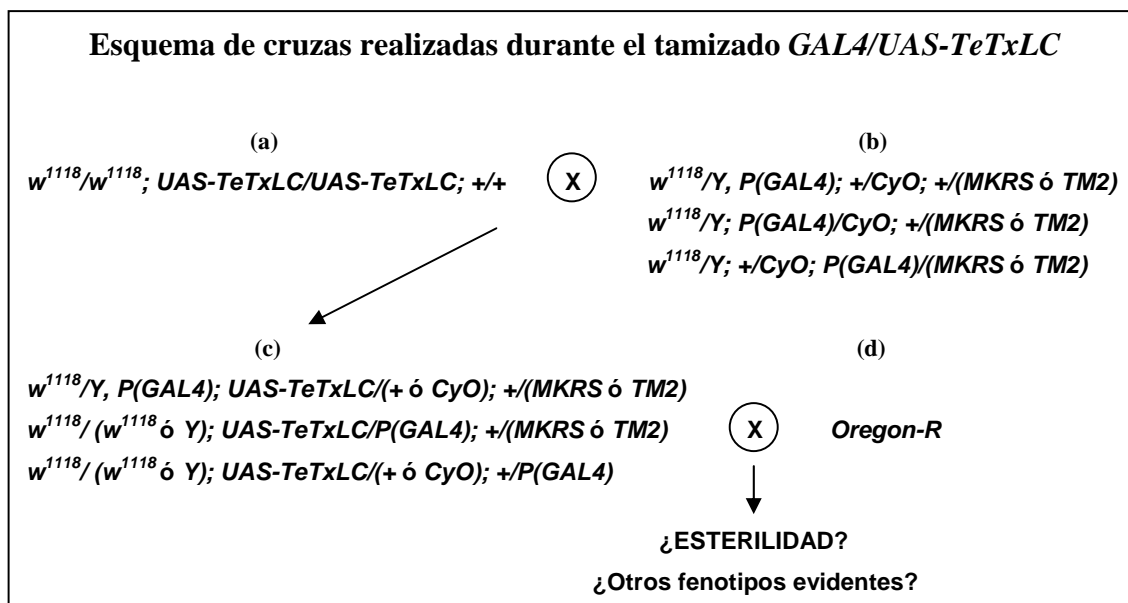
Para la generación del banco de inserciones *P(GAL4)* se siguió el esquema de cruzas descrito a continuación. Como fuente del elemento P se emplearon dos líneas homocigotas independientes cuya inserción *P(GAL4)* está localizada en el cromosoma X. Las hembras vírgenes portadoras del elemento P, identificadas por el color rojo de sus ojos (a), se cruzaron con machos de la línea transgénica que expresa constitutivamente la enzima transposasa (b). Una vez que se obtuvo la progenie, se seleccionaron los individuos disgénicos portadores de ambos elementos, identificados por la variegación en sus ojos (c). En estos organismos, el elemento P es movilizado por la transposasa en todas las células incluyendo la línea germinal. Esto causa que el elemento P se inserte de manera más o menos azarosa a lo largo de todo el genoma, atrapando otras secuencias reguladoras y generando gametos con nuevas inserciones independientes.



Para aislar cada nueva inserción, los machos disgénicos (c) se cruzaron individualmente con hembras  $w^{1118}$  vírgenes (d) y se seleccionaron los machos de la progenie que no fueran portadores de la transposasa y con inserciones  $P(GAL4)$  en cromosomas silvestres (e), descartando aquellos con el cromosoma parental  $w^{1118}$ ,  $P(GAL4)$ . La selección específica de los machos y la falta de recombinación en su genoma, también permitió mantener la estabilidad de las inserciones aún en ausencia de los cromosomas balanceadores. Finalmente, cada macho seleccionado (e) se cruzó con hembras doble balanceadas (f) para obtener líneas estables de cada inserción (g)

### 3. Tamizado $GAL4/UAS-TeTxLC$ para identificar líneas $P(GAL4)$ que definen grupos neuronales discretos en el SNC de la mosca involucrados en la fertilidad.

Se realizaron cruzas individuales entre un macho de cada línea  $P(GAL4)$  disponible (b) y 3 hembras vírgenes de la línea homocigota  $UAS-TeTxLC$  (a), y se analizó la progenie portadora de ambos elementos  $P(GAL4)/UAS-TeTxLC$  (c) para detectar cualquier fenotipo evidente como defectos motrices o de desarrollo. Para la identificación de líneas con fenotipo de esterilidad dependiente de la  $TeTxLC$  se realizaron cruzas individuales por quintuplicado entre una hembra ó un macho de la progenie (c) con 3 machos ó 3 hembras *Oregon-R* (d) respectivamente y se evaluó la presencia o ausencia de progenie. Para corroborar cualquier fenotipo observado las cruzas se repitieron un par de veces.



#### **4. Análisis del patrón de expresión neural de los elementos *P(GAL4)*.**

El patrón de expresión de las inserciones *P(GAL4)* en el SNC se analizó usando el gen blanco *UAS-GFP* como reportero. Se realizaron cruza individuales entre los machos de cada línea *P(GAL4)* y las hembras *UAS-GFP*. El SNC de las larvas del tercer estadio se disecó en un buffer salino de fosfato ( $\text{Na}_2\text{PO}_4$  0.1M, pH 7.4), se fijó por 20 minutos en 4% de paraformaldehído en el buffer de fosfato, y se lavó 3 veces en el mismo buffer sin paraformaldehído. La expresión de la GFP se visualizó directamente usando un microscopio de epifluorescencia.

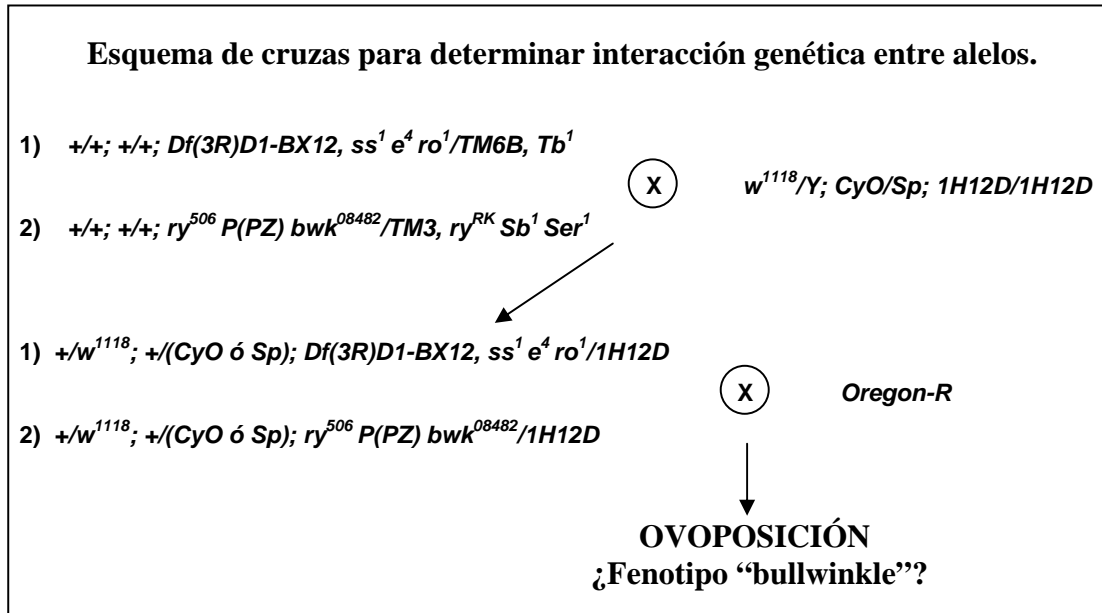
#### **5. Identificación del sitio de inserción del elemento *P(PGAL4)* en la línea *1H12D* también llamada *bwk<sup>tqs</sup>*.**

Para rescatar la secuencia de ADN que flanquea el extremo 3' del elemento *P(PGAL4)* en el genoma de las moscas *1H12D* se usó un método estándar de "PCR inverso" (Huang et al., 2000) sustituyendo la enzima de restricción *MspI* por *PstI*. El ADN genómico se purificó, se digirió con *PstI* y se amplificó usando los oligonucleótidos Ampli3'F (5'-CAATCATATCGCTGTCTCACTCA-3') y Ampli3'R (5'-CCTTAGCATGTCCGTGGGGTTTGAAT-3') diseñados en base a la secuencia del extremo 3' del elemento PGawB, y el protocolo descrito a continuación: 94° C-3min, (94° C-30seg, 55° C-1min, 68° C-2min)35 ciclos, 72° C-10min, 4° C. El DNA amplificado se secuenció en la Unidad de Secuenciación del Instituto de biotecnología de la UNAM usando los oligonucleótidos Sec3'F (5'-GACACTCAGAATACTATTC-3') y Sec3'R (5'-CGTGGGGTTTGAATTA ACTC-3'). Para conocer la identidad de la secuencia nucleotídica recuperada que flanquea el elemento P en el genoma de *Drosophila* se usó el programa BLAST (Altschul et al., 1997) y la base de datos del Flybase (<http://www.flybase.org>).

#### **6. Evaluación de interacción genética entre alelos de *bwk* y la inserción *1H12D*.**

Las hembras portadoras de la deficiencia que cubre el locus *bwk/cic/fet* (1) y las hembras con el alelo *bwk<sup>08482</sup>* (2) se cruzaron con machos homocigotos para la inserción *1H12D*, y se seleccionaron las hembras de la progenie transheterocigotas *Df(3R)<sup>D1-BX12</sup>/1H12D* y *bwk<sup>08482</sup>/1H12D*. Para evaluar una posible interacción genética, las hembras transheterocigotas se cruzaron con machos *Oregon-R* para inducir la ovoposición y

analizar el efecto en el fenotipo de los huevos depositados. Como controles, las hembras de las líneas heterocigotas *Df(3R)<sup>D1-BX12</sup>*, *bwk<sup>08482</sup>* y *1H12D* también se cruzaron con machos *Oregon-R* y se corroboró el fenotipo silvestre de los huevos depositados en cada caso.



## 7. Detección de β-galactosidasa en el SNC.

El SNC de las larvas hembra de tercer estadio *P(lacZ) bwk<sup>08482</sup>* se disecó en un buffer salino de fosfato ( $\text{Na}_2\text{PO}_4$  0.1M, pH 7.4). La detección de β-galactosidasa se logró con ayuda de un protocolo estándar (Hazelrigg, 2000). Las muestras se fijaron en un solución de fijado con 2.5% de glutaraldehido por 10 minutos, se lavaron 3 veces en el buffer de fosfato, se incubaron en la solución de tñido con 0.2% de X-gal por 30 minutos, se lavaron 3 veces en buffer de fosfato, y se montaron en glicerol.

## 8. Disección de ovarios.

Las hembras heterocigotas *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* y *bwk<sup>iqs</sup>* (control) de 5 días de edad se cruzaron con machos *Oregon-R* en comida estándar por 3 días. Posteriormente, se disecaron sus ovarios en buffer salino de fosfatos (PBS: 137 mM de NaCl, 2.68 mM de KCl, 10.14 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.76 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y pH=7.4), se fijaron en 4% de paraformaldehido en PBS y se montaron en Citifluor #0 (Ted Pella Inc, Redding, CA.) para ser analizados por microscopia estereoscópica convencional.

## **9. Evaluación de parámetros de fertilidad y apareamiento.**

Las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* heterocigotas representaron el genotipo experimental en todos los casos. Las hembras de los genotipos *UAS-TeTxLC* y *bwk<sup>tqs</sup>* heterocigotas se usaron como controles.

### **9.1. Cuantificación del número promedio de huevos puestos y del porcentaje de huevos eclosionados por hembra.**

Las hembras de 4 días de edad se cruzaron individualmente con 3 machos *Oregon-R* en viales con comida estándar por 1 día. Las moscas se transfirieron a viales frescos en donde se mantuvieron por 22 horas y se contó el número de huevos puestos en este lapso de tiempo. Se calculó el número promedio de huevos puestos por hembra para cada genotipo. Para determinar el porcentaje de huevos eclosionados, se formaron grupos de 5 hembras con sus respectivas parejas y se colocaron en viales con comida fresca por 24 horas. Se contó el número de huevos puestos y se calculó el porcentaje de eclosión como la fracción de huevos eclosionados del total de huevos para cada genotipo.

### **9.2. Evaluación de la presencia de huevos en el útero.**

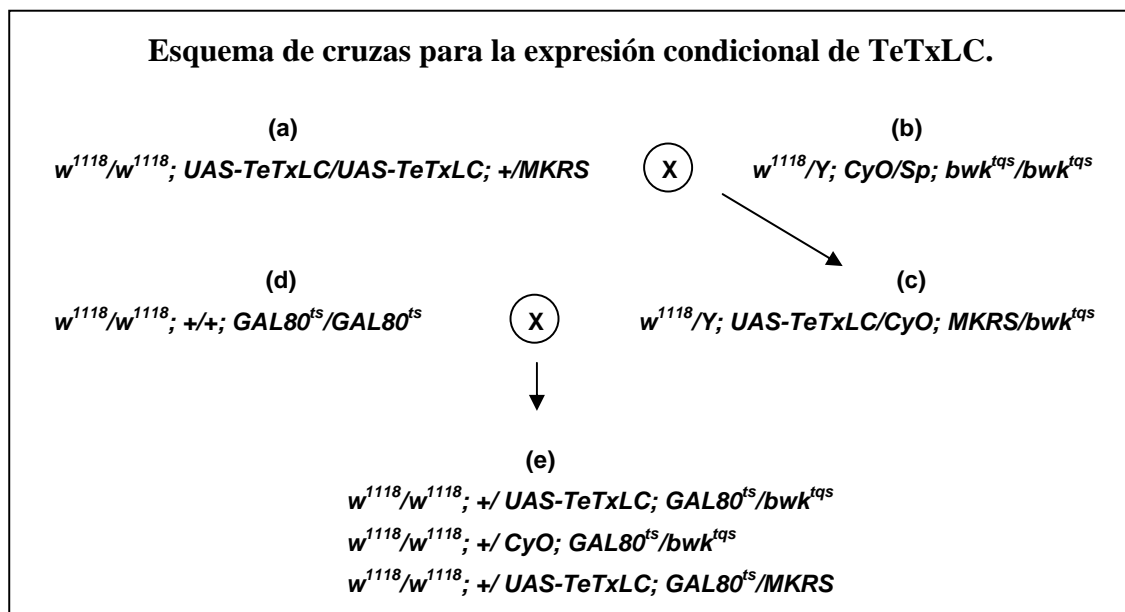
Las hembras vírgenes de 5 días de edad se colocaron individualmente con un macho *Oregon-R* en una cámara de apareamiento circular (1.5 cm de diámetro, 0.6 cm de altura) por 1 hora para asegurar la copulación y después se transfirieron sin los machos a viales con comida. Para evaluar la presencia de un huevo en el útero se presionó la punta del abdomen gentilmente, 12 horas después del apareamiento, cuando se alcanza el índice máximo de ovulación en *Drosophila* (Lee et al., 2003).

### **9.3. Determinación del índice de cortejo (IC).**

Las hembras de entre 4 y 5 días de edad se colocaron individualmente junto con un macho *Oregon-R* en una cámara de apareamiento circular (1.5 cm de diámetro, 0.6 cm de alto). Cada pareja se observó hasta que la copulación sucediera, siempre y cuando el tiempo no fuera mayor a 10 min. El índice de cortejo se definió como el porcentaje del tiempo que los machos invierten en cortejar a la hembra durante el periodo de observación. También se midió el tiempo de copulación.

## 10. Expresión condicional de la TeTxLC.

Para la generación de las moscas  $UAS-TeTxLC; GAL80^{ts}/bwk^{tqs}$  (genotipo experimental) y las moscas control  $UAS-TeTxLC; GAL80^{ts}/MKRS$  y  $CyO; GAL80^{ts}/bwk^{tqs}$  se siguió el esquema de cruzas descrito a continuación. Las hembras  $TeTxLC$  homocigotas portadoras del cromosoma balanceador  $MKRS$  (a) se cruzaron con machos  $bwk^{tqs}$  homocigotos portadores de los cromosomas  $CyO/Sp$  (b) para obtener moscas balanceadas  $TeTxLC/CyO; MKRS/bwk^{tqs}$ . Los machos con este genotipo (c) se cruzaron con hembras  $GAL80^{ts}$  homocigotas (d) para obtener el genotipo experimental  $w^{1118}; +/UAS-TeTxLC; GAL80^{ts}/bwk^{tqs}$  y los genotipos control  $w^{1118}; +/CyO; GAL80^{ts}/bwk^{tqs}$  y  $w^{1118}; +/UAS-TeTxLC; GAL80^{ts}/MKRS$  (e).



Para expresar condicionalmente la TeTxLC la última craza se incubó a 18° C y se transfirió a 29° C en diferentes momentos del desarrollo. En el primer caso, las pupas se transfirieron a 29° C justo antes de la eclosión. Las hembras se cruzaron con machos *Oregon-R* a 29° C por 3 días y se transfirieron a un vial fresco donde se dejaron por 3 días más. Después de descartar a los adultos, los viales se transfirieron a 25° C y la progenie obtenida se contó conforme fue emergiendo para calcular el número promedio de progenie por hembra para cada genotipo. En el segundo caso las moscas se desarrollaron, eclosionaron y se

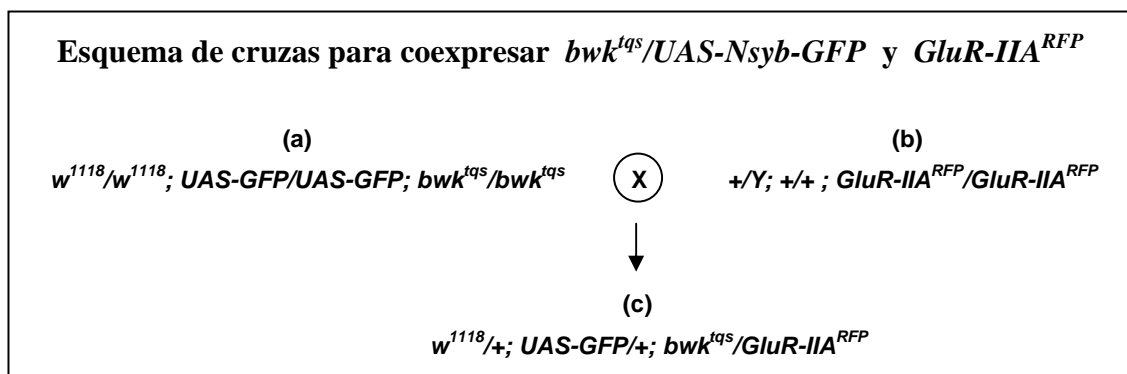
aparearon con machos *Oregon-R* por 3 días a 18° C. Posteriormente, las hembras y sus parejas se transfirieron a un vial nuevo (del 4º al 6º día posterior al apareamiento, 4 a 6 dpa). Después de 3 días las moscas se transfirieron nuevamente (7 a 9 dpa). Tres días más tarde las moscas se pasaron a otro vial y se incubaron a 29° C, la temperatura permisiva (10 a 12 dpa). Tres días después las moscas se cambiaron a un último vial a la misma temperatura (13 a 15 dpa). La progenie de cada vial se contó y el número promedio de progenie por hembra para cada genotipo se reportó en función del tiempo y la temperatura.

### 11. Análisis del patrón de expresión e inervación neuronal.

El patrón de expresión de *bwk<sup>tqs</sup>* en el SNC se analizó usando *UAS-GFP* como reportero. El SNC de las larvas de segundo estadio y de las pupas amarillas *UAS-GFP; bwk<sup>tqs</sup>* se disecó en el buffer de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1M, pH 7.4, se fijó por 20 minutos en 4% de paraformaldehído, y se lavó 3 veces en el buffer de disección. Todas las muestras se montaron en Citifluor. La expresión de la GFP se visualizó directamente. El patrón de expresión en el SNC de las larvas del tercer estadio y de las moscas adultas se visualizó mediante inmunofluorescencia (ver metodología en la sección de inmunohistoquímica).

Los blancos inervados por las neuronas *bwk<sup>tqs</sup>* se identificaron mediante la visualización de los botones sinápticos *bwk<sup>tqs</sup>* usando *UAS-Nsyb-GFP* como reportero. El tracto reproductivo de las hembras *bwk<sup>tqs</sup>/UAS-Nsyb-GFP* adultas se disecó, fijó y visualizó de la misma manera en que se hizo con el SNC de las larvas de segundo estadio.

Para identificar los sitios de sinapsis glutamatérgica y su localización con respecto a las terminales *UAS-GFP; bwk<sup>tqs</sup>* se usó la fusión del *Receptor de glutamato GluR-IIA* y la *Proteína Roja Fluorescente (GluR-IIA<sup>RFP</sup>)*. Las hembras homocigotas *UAS-GFP; bwk<sup>tqs</sup>* (a) se cruzaron con los machos homocigotos *GluR-IIA<sup>RFP</sup>* (b) para obtener las moscas *UAS-GFP; bwk<sup>tqs</sup>/GluR-IIA<sup>RFP</sup>* (c).



El tracto reproductivo de las hembras *UAS-GFP; bwk<sup>tqs</sup>/GluR-IIA<sup>RFP</sup>* se disecó y procesó igual que el SNC de las larvas de segundo estadio.

Todas las imágenes se obtuvieron usando un microscopio confocal Biorad MRC 600. Las secciones-Z de los tejidos se capturaron en intervalos de 1.98 a 5  $\mu$ m. Las proyecciones máximas se hicieron con ayuda del programa NIH ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

## **12. Inmunohistoquímica (dobles tinciones).**

Para los experimentos de coexpresión de la GFP y la OA en el SNC se usaron larvas de tercer estadio y moscas adultas de 4 días de edad *UAS-GFP; bwk<sup>tqs</sup>* heterocigotas. Para la coexpresión en el oviducto se usaron hembras adultas *bwk<sup>tqs</sup>/UAS-Nsyb-GFP*. En cada caso se siguió un protocolo de inmunohistoquímica específico (Monastirioti et al., 1995). El SNC de las larvas de tercer estadio se disecó en solución de Ringer para *Drosophila* libre de  $Ca^{2+}$  fría (Budnik et al., 1986) y se fijó en la solución de fijado (75% de una solución acuosa de ácido pícrico saturada, 6.25% de glutaraldehido, 0.5% de ácido acético glacial, y 1% de metabisulfito de sodio) fría por 3-4 horas. En el caso del SNC adulto, las moscas se enfriaron por 15-30 minutos, las cabezas y los cuerpos se fijaron por 2 horas a 4° C y los cerebros y ganglios torácicos abdominales se disecaron y fijaron por 1-2 horas. Con excepción de un paso en el que se aclara la temperatura empleada, el resto de los pasos del protocolo de tinción se realizó a 4° C. Una vez fijado, el SNC de larva y adulto se lavó en una solución de fosfatos 0.1M, pH 7.5, con 150 mM de NaCl y 1% de metabisulfito de sodio (PBS-S) durante 15 minutos 6 veces. Se incubó en PBS-S con 0.5% de borohidrato de sodio por 20-30 minutos a TA. Se lavó durante 20 minutos dos veces en PBS-S y por 30 minutos dos veces en PBS-S con 0.3% de Triton X-100 (PBS-SX). Se preincubó toda la noche con 2% de suero de cabra. Se incubó con los anticuerpos primarios anti-OA de conejo (Molecular Biologische, Technologie, Goettingen, Germany) y anti-GFP de ratón (Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA) diluidos 1:500 y 1:50 respectivamente en PBS-SX con 2% de suero por 24 horas. Se lavó durante 3-4 horas en PBS-X y se incubó con los anticuerpos secundarios anti-conejo-Cy3 y anti-ratón-Cy5 (Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, PA) diluidos 1:500 en PBS-X toda la noche. Se lavó en PBS-X por 30 minutos 6 veces y una vez más en PBS.

El oviducto de las hembras adultas se disecó en una solución salina de EGTA libre de  $Ca^{2+}$  (Budnik y Gorczyca, 1992) fría, y se fijó en una solución recién preparada (1% de glutaraldehido y 1% de metabisulfito de sodio en solución de fosfatos 0.1M, pH 7.4) por 3



horas. Se lavó dos veces en PBS-S, se incubó con 0.1% de borohidrato de sodio por 45 minutos a TA, se lavó una vez en PBS-SX, se bloqueó 4 horas en PBS-SX con 2% de suero de cabra y se incubó toda la noche con los anticuerpo primarios anti-OA y anti-GFP diluidos 1:500 y 1:50 respectivamente en PBS-SX con 2% de suero. Se lavó 3 veces en PBS-SX, se incubó con los anticuerpos secundarios por 2 horas, se lavó 3 veces en PBS-X y una vez más en PBS.

### **13. Visualización del destino de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo femenino.**

Las hembras vírgenes *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* y *bwk<sup>tqs</sup>* heterocigotas de 5 días de edad se aparearon con machos vírgenes *dj-GFP* de la misma edad por 1 día. Los machos fueron retirados 2 horas antes de la disección. El tracto reproductivo de las hembras se disecó en PBS, se fijó en PBS con 4% de paraformaldehido y se lavó en PBS. Los espermatozoides se visualizaron por su expresión de la GFP usando un microscopio de epifluorescencia.

### **14. Mediciones videométricas.**

El tracto reproductivo de las hembras *Oregon-R* y *bwk<sup>tqs</sup>* (controles) y *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* (genotipo experimental) de 3 días de edad (con ovarios maduros bien desarrollados) se disecó en medio HL3 sin  $\text{Ca}^{2+}$  (Stewart et al., 1994) y se colocó en el mismo medio en una cámara de registro cubierta con Sylgard. El extremo anterior de cada oviducto lateral y el extremo posterior del oviducto común se sujetaron a la cámara usando alfileres de fibra óptica, y el medio HL3 sin  $\text{Ca}^{2+}$  se perfundió con medio HL3 con 1.5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  para poder monitorear la contracción muscular. Para excitar las terminales nerviosas e inducir la contracción del oviducto, el nervio abdominal se succionó con un electrodo de vidrio (10-20  $\mu\text{m}$  de diámetro interior), y se estimuló a 10 Hz por 40 s aplicando pulsos eléctricos cuadrados de 0.5 ms de duración y  $\sim 1 \mu\text{A}$ . La contracción del músculo del oviducto se registró con un microscopio invertido equipado con una cámara digital. Las imágenes se analizaron usando el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). Para cuantificar la contracción del oviducto se calculó el siguiente parámetro estadístico:

$$\text{Razón de contracción muscular} = 1 - \frac{\text{tamaño}}{\text{tamaño}_0}$$

donde el tamaño representa el ancho de la región anterior del oviducto común ( $\mu\text{m}$ ) en cualquier momento durante el protocolo de estimulación eléctrica, y el tamaño<sub>0</sub> representa el

ancho del oviducto al inicio del experimento. El ácido L-glutámico (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), la OA (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), la proctolina (Peninsula Laboratories. Belmont, CA. USA), el IBMX (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), el D-AP4 (Tocris Biosciences, Ellisville, MO), y el ácido L-quiscuálico (Tocris Biosciences) se agregaron independientemente o en determinadas combinaciones al medio salino en el que se estimularon los oviductos.

### **15. Electrofisiología.**

Los registros intracelulares de los potenciales postsinápticos evocados por estimulación nerviosa en el oviducto de *Drosophila* se hicieron con ayuda de un amplificador OC-725 (Warner Instruments, Hamden, CT). Los microelectrodos tenían una resistencia de 50-70 megaOhms. Todos los experimentos se realizaron usando una solución estándar compuesta de (mM): NaCl 128, KCL 2, MgCl<sub>2</sub> 4, CaCl<sub>2</sub> 2, HEPES 5, sacarosa 36, pH 7.3. El nervio abdominal se succionó con una pipeta de estimulación llena de solución estándar. El nervio se estimuló a 10 Hz usando un estimulador programable (Master-8, A. M. P. I., Jerusalem, Israel). La adquisición de datos y el análisis se hizo con el software pClamp (Axon Instruments, Foster City, Ca).

### **16. Análisis estadístico.**

En el caso de los experimentos para la evaluación de la fertilidad y el apareamiento, las diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.0001$ ) entre los resultados se determinaron usando ANOVA. Para los experimentos videométricos el análisis estadístico se realizó usando la prueba t de Student y chi-cuadrada.

## RESULTADOS

### 1. Identificación de inserciones *P(GAL4)* que atrapan grupos pequeños de neuronas en el SNC esenciales para la fertilidad, la movilidad y el desarrollo de la mosca.

En este trabajo desarrollamos un tamizado genético de pérdida de función usando el sistema bipartito GAL4/UAS (Brand y Perrimon, 1993) y la Cadena Ligera de la Toxina de Tétanos para identificar líneas *P(GAL4)* que marcan grupos discretos de neuronas en el SNC de la mosca con un papel esencial en la fertilidad.

Como primer paso, generamos un banco de inserciones *P(GAL4)* nuevas mediante la movilización del elemento P insertado en el cromosoma X de dos líneas *P(GAL4)* disponibles en el Bloomington Stock Center. Usando estas líneas diseñamos un esquema de cruza que nos permitió aislar de manera exclusiva los eventos nuevos de inserción, mediante la simple selección de los individuos machos en uno de los pasos del esquema. De este modo, logramos generar 110 inserciones nuevas, estables e independientes, que se sumaron a un grupo de inserciones iniciales para formar un banco de 141 líneas *P(GAL4)*.

Cruzamos cada una de las líneas de moscas *P(GAL4)* de este banco con la línea homocigota *UAS-TeTxLC*, y una vez obtenida la progenie evaluamos su fertilidad. Colateralmente analizamos la presencia de otros fenotipos evidentes. La Tabla 1 resume todos los fenotipos observados causados por la desactivación neuronal en las 141 líneas.

Tabla 1. Fenotipos observados en la progenie de las cruza *P(GAL4)* x *UAS-TeTxLC*.

Letalidad temprana
Letalidad como faratos
Defectos en el desarrollo pupal
Deformaciones en patas y alas
Defectos motrices en adultos
Esterilidad
Esterilidad y semiletalidad temprana
Esterilidad en hembras
Esterilidad en machos

El 54 % (76) de todas las líneas presenta fenotipos de letalidad temprana en presencia de la *TeTxLC*. Cerca del 30 % (42) de las líneas tiene progenie viable, fértil y sin ningún fenotipo evidente. Solo alrededor del 16 % (23) de las líneas cruzadas con la *TeTxLC* genera progenie con fenotipos característicos como la esterilidad específica y no específica del sexo,

defectos durante el desarrollo pupal, letalidad como faratos, deformaciones en las patas y alas, y defectos motrices en el adulto. De las 23 líneas, seleccionamos 4 líneas representativas, incluyendo la línea que presenta esterilidad específica de las hembras, para una caracterización preliminar. Para identificar los grupos de neuronas atrapados por cada inserción *P(GAL4)*, desactivados en las moscas portadoras de la toxina, realizamos cruza independientes entre las moscas de cada línea *P(GAL4)* parental y las moscas de la línea portadora del gen reporte *UAS-GFP*. Como una primera aproximación y por la sencillez del proceso disecamos y analizamos el SNC de las larvas de tercer estadio de la progenie.

**Línea 2A2D:** los machos portadores de esta inserción que expresan la TeTxLC presentan defectos durante el desarrollo pupal. Cerca del 90% de los machos muestra la falta de la eversión de la cabeza, así como una elongación incompleta de las patas y alas (Figura 12B). El 10% restante de los machos emerge sin defectos aparentes.



Figura 12. **Fenotipo observado en los machos de la línea 2A2D que expresan la TeTxLC.** A, Pupa macho control con elongación completa de patas y alas (cabeza de flecha y flecha, panel superior) y correcta eversión de la cabeza (panel inferior). B, Pupa *UAS-TeTxLC; 2A2D* con elongación incompleta de patas y alas (cabeza de flecha y flecha, panel superior) y falta de eversión de la cabeza (panel inferior).

El patrón de expresión de la inserción 2A2D en el SNC de las larvas macho es complejo. Se observa expresión dispersa en todo el SNC así como la presencia de varias cadenas de células bilaterales a lo largo del lado dorsal del GV (Figura 13). No encontramos diferencias evidentes con respecto al patrón de expresión en las hembras.

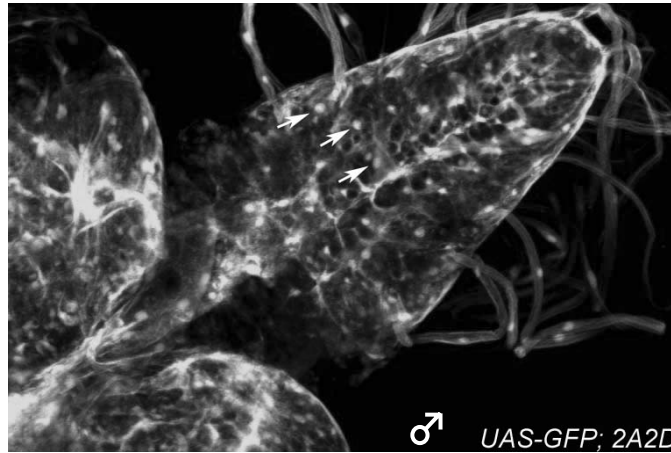


Figura 13. **Patrón de expresión de la GFP en el SNC de la larva macho de tercer estadio *UAS-GFP; 2A2D*.** Imagen de fluorescencia directa que muestra expresión extensa de GFP a través del SNC de la larva, incluyendo cadenas de células bilaterales dorsales a lo largo del GV (flechas).

**Línea 3A42:** las moscas de esta línea portadoras de la TeTxLC muestran deformaciones en el tercer par de patas y no son capaces de extender las alas después de su eclosión (Figura 14B). Además, el tórax y el abdomen de estas moscas no adquiere la forma y pigmentación características de las moscas control (Figura 14A). Solo el 30% de las hembras presenta los defectos descritos. Cerca del 80% de los machos intenta emerger pero muere como farato. La mayoría de los machos que logra emerger presenta los mismos defectos observados en las hembras.

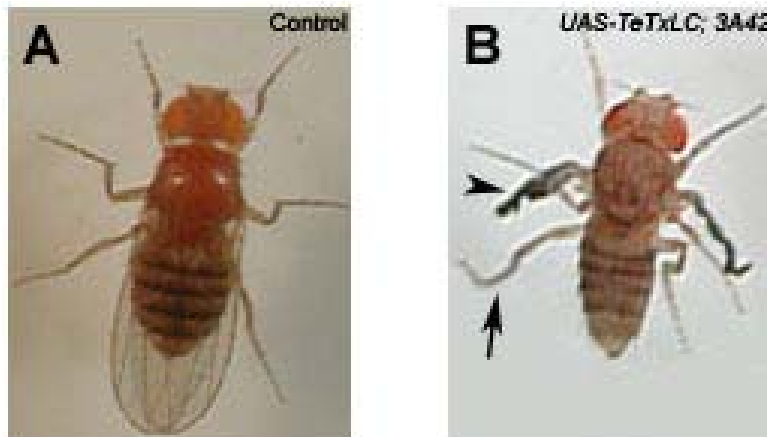


Figura 14. **Fenotipo observado en las moscas *UAS-TeTxLC; 3A42*.** **A,** Hembra control. **B,** Hembra *UAS-TeTxLC; 3A42* con deformaciones en el tercer par de patas (flecha), alas sin extender (cabeza de flecha) y forma y pigmentación anormal en tórax y abdomen.

La inserción *3A42* dirige la expresión de la GFP a un grupo pequeño de células apareadas y a unas cuantas células desapareadas a lo largo de la línea media dorsal del GV de las larvas de tercer estadio (Figura 15). También se observa expresión dispersa de la GFP en el SNC. No detectamos diferencias significativas entre el patrón de expresión de ambos sexos.

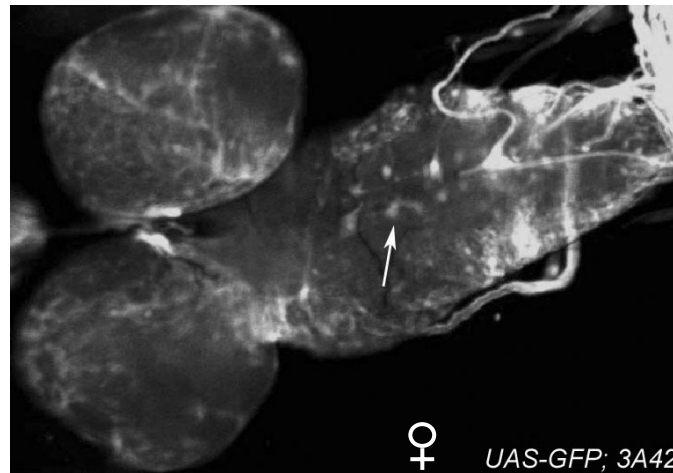


Figura 15. **Patrón de expresión de la GFP en el SNC de la larva hembra de tercer estadio *UAS-GFP; 3A42*.** La imagen muestra la expresión dispersa de la GFP en todo el SNC y también la expresión restringida a una cadena de células apareadas en la línea media dorsal del GV (flecha).

**Línea *IDB3A*:** todos los individuos que portan esta inserción y que expresan la TeTxLC emergen como adultos aparentemente normales, sin embargo, posteriormente sufren una disminución progresiva de la movilidad hasta llegar a la parálisis total durante su primera semana de vida (Figura 16).

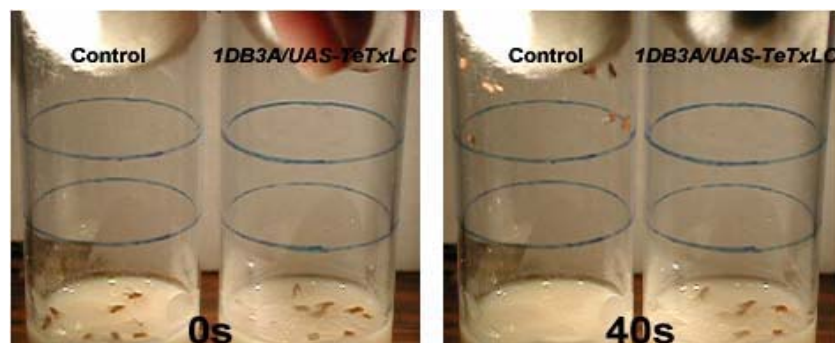


Figura 16. **Fenotipo observado en las moscas *IDB3A/TeTxLC*.** A la izquierda, moscas control y moscas *IDB3A/TeTxLC* sobre el fondo del vial después de sacudir los viales ligeramente (tiempo 0s). A la derecha, 40s más tarde, las moscas control se han desplazado a la parte superior del vial y las moscas *IDB3A/TeTxLC* permanecen inmóviles en el fondo del vial.

El análisis del SNC de las larvas *IDB3A/UAS-GFP* de ambos sexos reveló una fuerte expresión de la GFP dirigida a un grupo de 6 células en la línea media ventral del GV así como un poco de expresión dispersa (Figura 17).

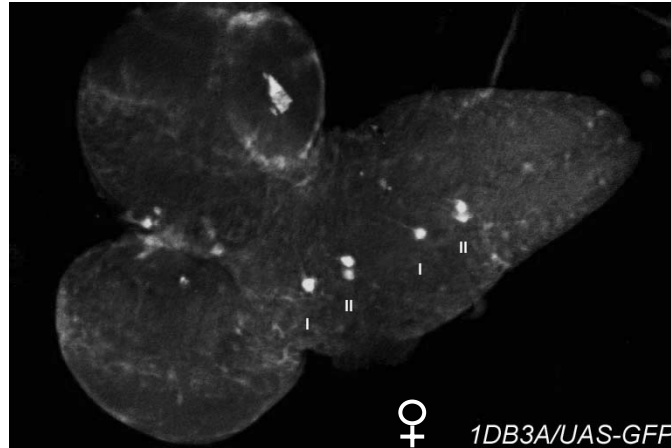


Figura 17. **Patrón de expresión de la GFP en el SNC de la larva hembra de tercer estadio *IDB3A/TeTxLC*.** La imagen muestra una fuerte expresión de la GFP en un grupo particular de células en la línea media ventral del GV (I, II, I, II).

**Línea *1H12D*:** la expresión de la TeTxLC dirigida por esta inserción causa un fenotipo de esterilidad específico de las hembras. Este fenotipo se observa en todas las hembras *UAS-TeTxLC; 1H12D* y se caracteriza por una falta casi total de la ovoposición y un aumento en el tamaño del abdomen. Los machos son fértiles y no muestran ningún fenotipo evidente.

Al analizar el patrón de expresión de la GFP en el SNC de las larvas de tercer estadio *UAS-GFP; 1H12D* observamos varios grupos pequeños de células con baja y alta expresión de GFP en ambos hemisferios del cerebro. También identificamos grupos discretos de células en ambos lados del GV así como un grupo con una fuerte expresión de la GFP en la línea media ventral del mismo. El patrón de expresión de la GFP es similar en el SNC de las larvas de ambos sexos (Figura 18).

Con el objetivo de elucidar el papel de estos pequeños grupos de neuronas en el control del comportamiento reproductivo y la fertilidad de la hembra de *Drosophila* llevamos a cabo una caracterización más detallada de la línea *1H12D*.

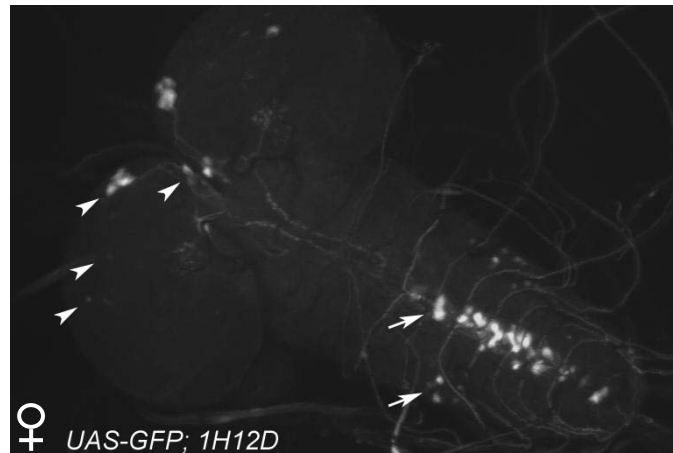


Figura 18. Patrón de expresión de la GFP en el SNC de la larva hembra de tercer estadio *UAS-GFP; 1H12D*. La imagen muestra grupos de células con expresión baja y fuerte de GFP en los dos hemisferios del cerebro (cabezas de flecha), grupos de células laterales y un grupo de células con alta expresión en la línea media ventral del GV (flechas).

## 2. Caracterización molecular de la inserción *1H12D*.

Para determinar el sitio de inserción del elemento *P(GAL4)* en el genoma de las moscas *1H12D* realizamos un PCR inverso empleando oligonucleótidos diseñados sobre el extremo 3' del elemento P de acuerdo a un protocolo estándar (Huang et al., 2000). Comparamos la secuencia de DNA genómico adyacente a la inserción, obtenida del producto de PCR, con la base de datos del genoma de *Drosophila* (<http://www.flybase.org>) utilizando el programa BLAST (Altschul et al., 1997). La inserción *1H12D* se localiza en la región 92E del cromosoma 3 en la base 16118090 del genoma de la mosca, a 897 pb del sitio de inicio de la transcripción del *locus capicua* (*cic*), también conocido como *fettucine* (*fet*) y *bullwinkle* (*bwk*) (Figura 20A). Este *locus* se ha caracterizado por ser genética y molecularmente complejo (Goff et al., 2001; Jimenez et al., 2000; Rittenhouse y Berg, 1995). Mutaciones en el *locus cic/fet/bwk*, el cual codifica para un factor transcripcional que contiene un dominio HMG, producen fenotipos pleiotrópicos. Un fenotipo característico de los alelos de este *locus* es la presencia de defectos en la polaridad de la cubierta del huevo y del embrión. Los huevos de las hembras homocigotas con mutaciones en este *locus* tienen apéndices dorsales más cortos y anchos que los silvestres y con extremos rasgados parecidos a los cuernos de un alce (fenotipo “bullwinkle”).

Para determinar si la inserción *1H12D* generó una nueva mutación en este *locus* revisamos si los huevos depositados por las hembras *1H12D* presentaban defectos parecidos a



los de las hembras *cic/fet/bwk*. Las hembras homocigotas para la inserción *IHI2D* ponen huevos con apéndices dorsales en forma de cuerno de alce (Figura 20B), sugiriendo que esta inserción alteró dicho *locus*, produciendo una mutación débil ya que a pesar de presentar el fenotipo “bullwinkle” la mayoría de los embriones es viable.

Para evaluar una posible interacción genética entre la inserción *IHI2D* y el *locus* *cic/fet/bwk*, cruzamos la inserción *IHI2D* con el alelo fuerte *bwk*<sup>08482</sup> (generado por la inserción de un elemento *P(lacZ)* a 214 pb del inicio de la transcripción de *cic*) y con una deficiencia que afecta este *locus* llamada *Df(3R)D*<sup>IBX12</sup>, ambos disponibles en el Bloomington Stock Center. Se ha reportado que los huevos de las moscas transheterocigotas *bwk*<sup>08482</sup>/*Df(3R)D*<sup>IBX12</sup> tienen defectos similares a los del fenotipo “bullwinkle” observado en los huevos de las hembras *bwk*<sup>08482</sup> homocigotas (Rittenhouse y Berg, 1995). En el caso de las moscas transheterocigotas *IHI2D/bwk*<sup>08482</sup> y *IHI2D/Df(3R)D*<sup>IBX12</sup> todos los huevos depositados presentan el fenotipo “bullwinkle”, probando que la inserción *IHI2D* interacciona genéticamente tanto con la deficiencia como con la inserción *bwk*<sup>08482</sup>. Los huevos depositados por las moscas control *IHI2D*, *bwk*<sup>08482</sup> y *Df(3R)D*<sup>IBX12</sup> heterocigotas son normales. Estos datos apoyan la hipótesis de que la inserción *IHI2D* es un alelo débil nuevo del *locus* *cic/fet/bwk*. Por esta razón, decidimos renombrar a la inserción *IHI2D* como *bwk*<sup>tqs</sup>.

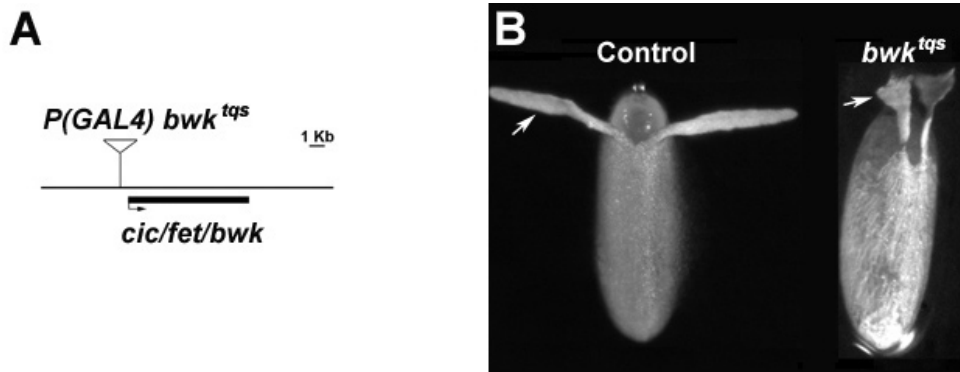


Figura 20. **La inserción *IHI2D* es un alelo del gen *bwk*.** **A**, Esquema que muestra el sitio de inserción de *IHI2D* (*bwk*<sup>tqs</sup>) en el genoma, a menos de 1Kb del *locus* *cic/fet/bwk*. **B**, Imagen dorsal de un huevo control que muestra los apéndices dorsales normales y extendidos (izquierda) y un huevo depositado por una hembra *bwk*<sup>tqs</sup> homocigota con apéndices dorsales en forma de cuerno de alce (derecha).

Resultados preliminares del análisis del patrón de expresión de las inserciones *P(GAL4) bwk*<sup>tqs</sup> (Figura 18) y *P(lacZ) bwk*<sup>08482</sup> (Figura 21B) muestran que tanto *bwk*<sup>tqs</sup> como *bwk*<sup>08482</sup> se expresan en el SNC de la larva de tercer estadio. Estos resultados junto con los

datos genéticos, indican que el *locus cic/fet/bwk* tiene una función desconocida en el SNC de la mosca. Aunque ignoramos si la inserción *bwk<sup>1qs</sup>* atrapó las secuencias regulatorias del *locus cic/fet/bwk*, la localización del sitio de inserción del elemento P en la línea *bwk<sup>1qs</sup>* y los datos genéticos, sugieren que las secuencias regulatorias de este *locus* podrían estar participando en dirigir la expresión de GAL4 en la línea *bwk<sup>1qs</sup>*.

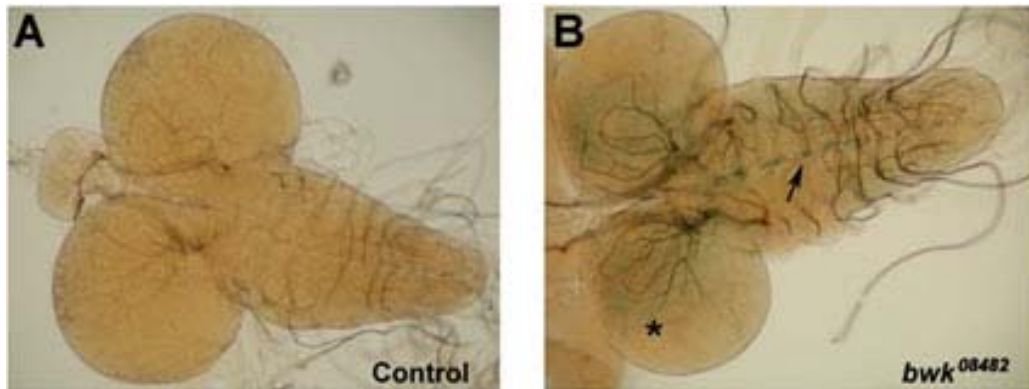


Figura 21. **Expresión de lacZ en el SNC de las moscas *bwk<sup>08482</sup>***. **A**, Micrografía del SNC de una larva *w<sup>1118</sup>* (control) de tercer estadio. **B**, Micrografía que muestra la expresión de  $\beta$ -galactosidasa en el SNC de una larva *bwk<sup>08482</sup>* de tercer estadio, incluyendo la expresión en los hemisferios cerebrales (\*) y en la línea media del GV (flecha).

### 3. La desactivación de las neuronas *bwk<sup>1qs</sup>* afecta el proceso de ovoposición y causa esterilidad en las hembras de *Drosophila*.

Inicialmente observamos que las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>1qs</sup>* ovopositan muy poco y llegan a tener abdómenes anormalmente grandes. Para cuantificar el fenotipo de esterilidad de las moscas *UAS-TeTxLC; bwk<sup>1qs</sup>*, realizamos cruza individuales de las hembras de este genotipo y las hembras control con los machos *Oregon-R* y contamos el número de huevos depositados en las siguientes 22 hrs. Comparadas con las moscas control *bwk<sup>1qs</sup>* y *UAS-TeTxLC*, las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>1qs</sup>* depositan muy pocos huevos, la mayoría de los cuales no eclosiona (Tabla 2). Para determinar si estas hembras son capaces de producir ovocitos maduros, disecamos sus ovarios y los comparamos con los ovarios de las hembras control *bwk<sup>1qs</sup>* heterocigotas. Los ovarios de las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>1qs</sup>* son dos veces más grandes comparados con los de las hembras control (Figura 22, paneles superiores). A diferencia de los ovarios control, los cuales contienen ovocitos en estadios secuenciales de desarrollo, los ovarios de las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>1qs</sup>* están conformados en su mayor parte por ovocitos maduros (estadio 14) y por algunos ovocitos de los estadios más tempranos

(Figura 22, paneles inferiores). Estas características también se observan en los ovarios de moscas cuya ovoposición se encuentra inhibida (Spradling, 1993). Estos datos indican que las moscas *UAS-TeTxLC; bwk<sup>lqs</sup>* son incapaces de ovular y retienen la mayoría de los ovocitos maduros que producen en los ovarios. Además, sugieren que las alteraciones observadas durante la ovogénesis en estas moscas no son causadas por la desactivación neuronal, sino que son producidas como una respuesta a la falta de ovoposición.

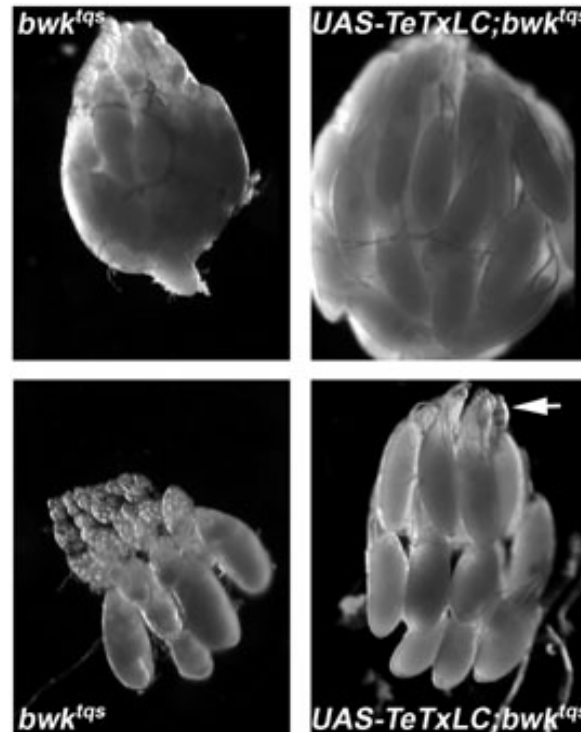


Figura 22. Los ovarios de las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>lqs</sup>* retienen los huevos maduros. Ovarios completos (paneles superiores) y disgregados (paneles inferiores) de hembras control *bwk<sup>lqs</sup>* (izquierda) y hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>lqs</sup>* (derecha) de 7-8 días de edad apareadas. Los ovarios de las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>lqs</sup>* son anormalmente grandes y están llenos de huevos maduros. Solo se observan algunos ovocitos en los estadios más tempranos del desarrollo (flecha).

Para determinar si la ausencia de ovoposición era un efecto secundario producido por un proceso de apareamiento anormal causado por la desactivación de las neuronas *bwk<sup>lqs</sup>*, medimos el índice de cortejo (IC) de los machos *Oregon-R* hacia las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>lqs</sup>*. El IC se define como el porcentaje del tiempo que un macho invierte en cortejar a una hembra durante un periodo de observación de 10 min. El IC inducido por las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>lqs</sup>* y el tiempo que ellas pasan copulando con los machos (TC)

son similares a los observados para las hembras control (Tabla 2), sugiriendo que el proceso de ovoposición en las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* está afectado intrínsecamente.

**Tabla 2. Cuantificación de los parámetros de fertilidad y apareamiento de las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* y de las hembras control *bwk<sup>iqs</sup>* y *UAS-TeTxLC* heterocigotas.**

Genotipo	Fertilidad			Apareamiento	
	Promedio de huevos puestos por hembra	Huevos eclosionados <sup>a</sup> (%)	Hembras con un huevo en el útero (%)	Índice de cortejo (IC) (%)	Tiempo de copulación (min)
<i>bwk<sup>iqs</sup></i>	47.4 ± 18.3 (n=12)	96.6 (n=1,137)	87.5 (n=24)	62.6 ± 28.0 (n=9)	21.3 ± 1.4 (n=8)
<i>UAS-TeTxLC</i>	60.8 ± 16.1 (n=10)	96.1 (n=990)	91.3 (n=23)	76.0 ± 20.1 (n=11)	20.4 ± 3.9 (n=8)
<i>UAS-TeTxLC;bwk<sup>iqs</sup></i>	4.2 ± 5.2 <sup>b</sup> (n=17)	4.9 (n=102)	33.3 (n=21)	77.5 ± 14.1 (n=10)	20.8 ± 3.1 (n=7)

Los datos representan promedios o porcentajes ± desviación estándar.

En casi todos los casos “n” corresponde al número de organismos evaluados.

<sup>a</sup>Los valores expresan el porcentaje de huevos eclosionados del total “n”.

<sup>b</sup>*P* < 0.0001 (vs *bwk<sup>iqs</sup>*; vs *UAS-TeTxLC*).

La ovoposición en *Drosophila* puede dividirse en tres procesos: la ovulación o liberación del ovocito de los ovarios hacia el oviducto, la movilización del huevo hacia el útero y la deposición del huevo en el medio exterior. Para entender como se afectan estos procesos en las moscas *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* evaluamos la presencia de huevos en el tracto reproductivo inferior 12 horas después del apareamiento de las hembras con los machos *Oregon-R*. El porcentaje de moscas *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* con un huevo en el útero es mucho menor comparado con el de las hembras control (Tabla 2). En algunos casos detectamos la presencia de huevos atorados en los oviductos laterales y en el oviducto común. Nuestros resultados indican que tanto el proceso de ovulación como el de transferencia del huevo hacia el útero están afectados en las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>*.

Interesantemente, el útero de las moscas control (*bwk<sup>iqs</sup>* y *UAS-TeTxLC*) está ocupado en promedio el ~89.4% del tiempo y el promedio de huevos depositados en 22 hrs. es de ~54. Por otro lado, el útero de las moscas *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* está ocupado solo el 33.3% del tiempo (Tabla 2). Si asumimos que todos los huevos que ocupan el útero en las moscas desactivadas son puestos tan eficientemente como en el caso de las moscas control esperaríamos una deposición de ~20 huevos en 22 horas. Contrariamente, en ese mismo tiempo las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* solo depositan en promedio ~4 huevos. Adicionalmente, encontramos que cuando se presiona ligeramente el abdomen de las hembras

*UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>*, el ovopositor se extiende pero las hembras son incapaces de retraerlo. Estas observaciones sugieren que el proceso de deposición también es afectado por la desactivación de las neuronas *bwk<sup>tqs</sup>*.

#### **4. El fenotipo de esterilidad de las moscas *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* no es causado por defectos ontológicos producidos por la falta de transmisión sináptica.**

La falta continua de transmisión sináptica durante el desarrollo puede causar defectos neuroanatómicos sutiles en la mosca (Baines et al., 1999; Heimbeck et al., 1999; Hiesinger et al., 1999). Para descartar la posibilidad de que el fenotipo de esterilidad observado en las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* fuera una consecuencia de algún defecto ontológico causado por la expresión constitutiva de la TeTxLC, evaluamos la fertilidad de las hembras en presencia de un alelo termosensible de GAL80 (*GAL80<sup>ts</sup>*). Este alelo reprime la expresión de GAL4 de manera ubicua (McGuire et al., 2004) lo cual nos permitió controlar mediante el cambio de la temperatura de incubación, el momento de expresión de la TeTxLC durante el desarrollo de la mosca. Usando este sistema, indujimos la expresión de la cadena ligera de la toxina de tétanos en los organismos *UAS-TeTxLC; GAL80<sup>ts</sup>/bwk<sup>tqs</sup>* y en los animales control (*UAS-TeTxLC; GAL80<sup>ts</sup>/MKRS* y *CyO; GAL80<sup>ts</sup>/bwk<sup>tqs</sup>*) justo antes de la eclosión de las pupas y evaluamos la fertilidad de las hembras adultas. Comparadas con las hembras control, las hembras *UAS-TeTxLC; GAL80<sup>ts</sup>/bwk<sup>tqs</sup>* son estériles por la falta de ovoposición (Figura 23A). A 18° C, donde la expresión de GAL4 es reprimida por GAL80 y por lo tanto no hay expresión de la TeTxLC, las hembras *UAS-TeTxLC; GAL80<sup>ts</sup>/bwk<sup>tqs</sup>* son fértiles (Figura 23B, 4-6 y 7-9 dpa). Sin embargo, cuando las moscas adultas son transferidas a 29° C, la ovoposición y la fertilidad disminuyen casi a 0 en pocos días (Figura 23B, 10-12 y 13-15 dpa).

Estos resultados demuestran que la esterilidad observada al expresar constitutivamente la TeTxLC se puede reproducir por la expresión de la toxina en las hembras adultas completamente desarrolladas, descartando cualquier efecto ontológico y sugiriendo que el fenotipo de esterilidad en las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* es causado por la desactivación de las neuronas *bwk<sup>tqs</sup>*.

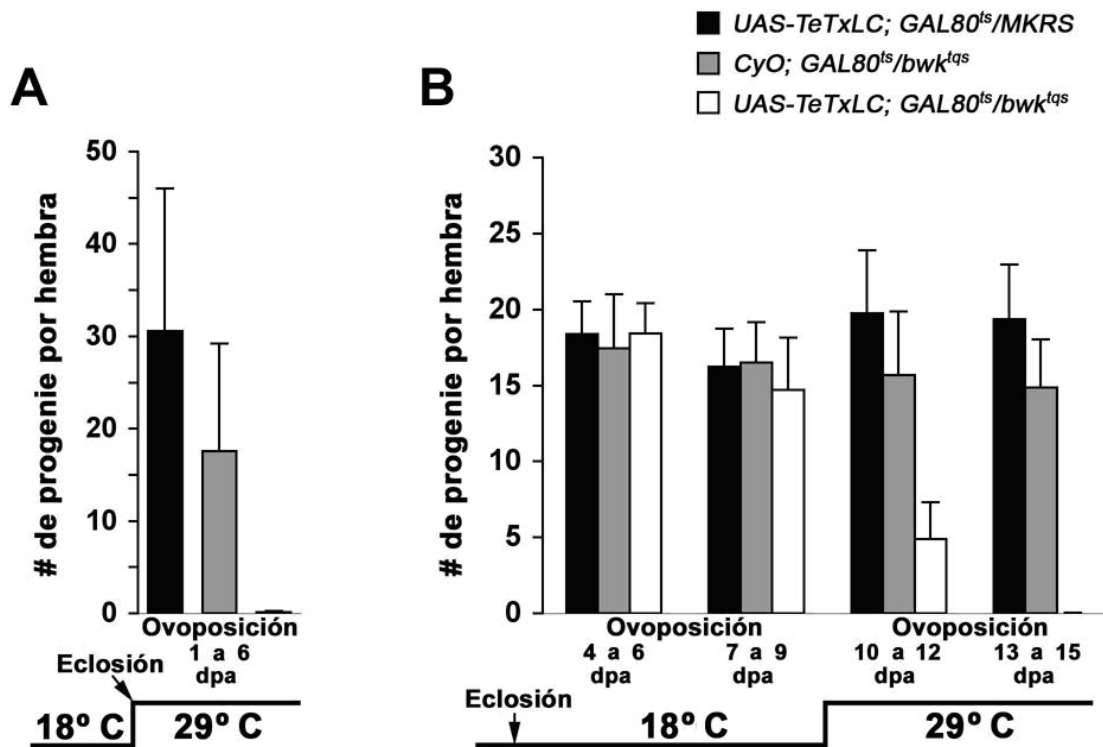


Figura 23. **Expresión condicional de la TeTxLC.** Las moscas *UAS-TeTxLC; GAL80<sup>ts</sup>/bwk<sup>lqs</sup>* y las moscas control *UAS-TeTxLC; GAL80<sup>ts</sup>/MKRS* y *CyO; GAL80<sup>ts</sup>/bwk<sup>lqs</sup>* se incubaron a 18° C y se transfirieron a 29° C en momentos específicos de desarrollo. **A,** Las pupas se transfirieron a 29° C justo antes de su eclosión (flecha). Las hembras se aparearon por 6 días a 29° C. Las hembras *UAS-TeTxLC; GAL80<sup>ts</sup>/bwk<sup>lqs</sup>* son estériles ( $P < 0.002$ ). **B,** A 18° C el número de progeñie por hembra es similar para los tres fenotipos (ovoposición 4-6 y 7-9 día posterior al apareamiento (dpa),  $P = 0.5$ ), pero cuando se transfieren a 29° C solo las hembras *UAS-TeTxLC; GAL80<sup>ts</sup>/bwk<sup>lqs</sup>* llegan a ser estériles (ovoposición 10-12 y 13-15 dpa,  $P < 0.0001$ ).

## 5. Patrón de expresión de *bwk<sup>lqs</sup>* durante el desarrollo del SNC de *Drosophila*.

Para identificar las neuronas atrapadas por la inserción *bwk<sup>lqs</sup>* responsables del fenotipo de desactivación, usamos *UAS-GFP* como reportero. Disecamos el SNC de los organismos *UAS-GFP; bwk<sup>lqs</sup>* en diferentes estadios del desarrollo y lo analizamos por microscopía confocal. En la larva de segundo instar observamos una fuerte expresión de la GFP en un grupo pequeño de células en la línea media ventral (CVM) del GV y en algunas células bilateralmente simétricas (CB) dentro del mismo (Figura 24, L2). También detectamos la expresión débil de la GFP en algunas células simétricas dentro de los dos hemisferios del cerebro (Figura 24, L2, cabezas de flecha). El número de células que expresan a la GFP incrementa a lo largo del desarrollo, sin embargo, el patrón de expresión general de las células *bwk<sup>lqs</sup>* GFP positivas en el SNC se conserva (Figura 24).

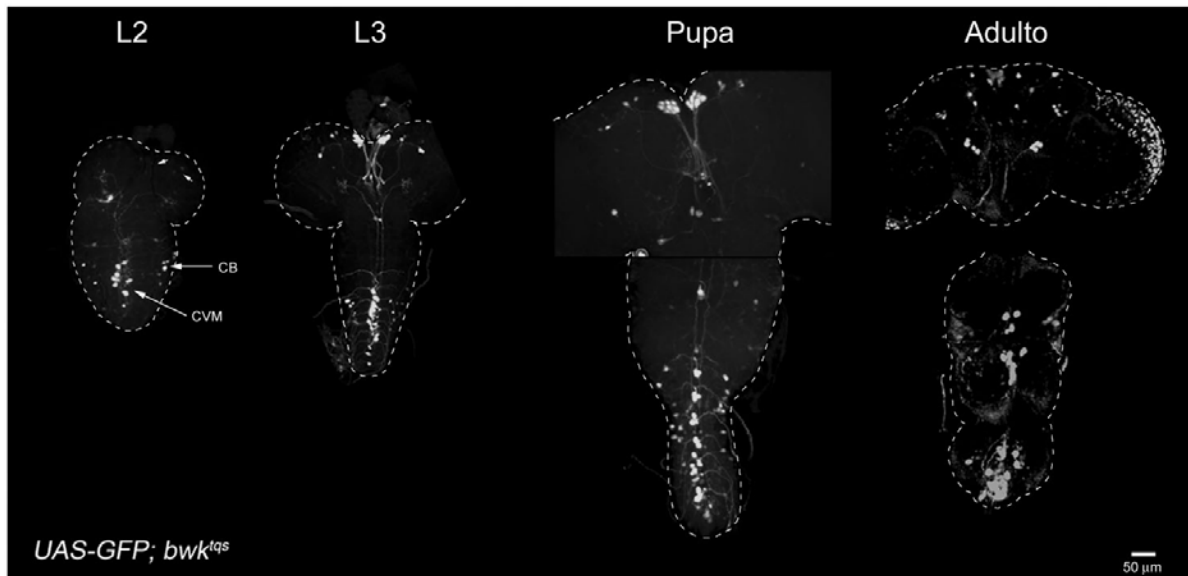


Figura 24. **Patrón de expresión de  $bwk^{tqs}$  durante el desarrollo del SNC.** El SNC de la larva de segundo estadio (L2) y de la pupa  $UAS-GFP; bwk^{tqs}$  se analizó visualizando directamente la fluorescencia de la GFP. El SNC de la larva de tercer estadio (L3) y de la mosca adulta se analizó mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo anti-GFP. Las imágenes corresponden a las proyecciones generadas a partir de las secciones-Z obtenidas por microscopía confocal. En el cerebro de la larva de segundo estadio (L2) es posible observar algunas células bilateralmente simétricas que expresan la GFP débilmente (indicadas por las cabezas de flecha). En el GV, un grupo pequeño de células en la línea media ventral (CVM) y algunas células bilateralmente simétricas (BC) muestran una mayor expresión de la GFP. El número de células que expresan la GFP incrementa a lo largo del desarrollo, pero el patrón de expresión general se conserva.

## 5. La inserción $bwk^{tqs}$ marca la mayoría de las neuronas octopaminérgicas del SNC de *Drosophila*.

Dos evidencias sugieren que las células atrapadas por la inserción  $bwk^{tqs}$  corresponden a las neuronas octopaminérgicas de *Drosophila*. Primero, el fenotipo producido por la desactivación de las neuronas  $bwk^{tqs}$  es similar al observado en las moscas mutantes  $T\beta h^{nM18}$  que no producen octopamina (Monastirioti et al., 1996). Segundo, el patrón de expresión neural de  $bwk^{tqs}$  es muy parecido al patrón neural octopaminérgico reportado en la mosca (Monastirioti et al., 1995). Para probar esta hipótesis, realizamos coimmunotinciones del SNC de las hembras  $UAS-GFP; bwk^{tqs}$  usando anticuerpos anti-GFP y anti-OA. Observamos un grado de solapamiento muy grande entre las neuronas  $bwk^{tqs}$  que expresan la GFP y las neuronas que expresan la OA en el SNC de la larva de tercer estadio (Figura 25A y B) y de la mosca adulta (Figura 25C-G).

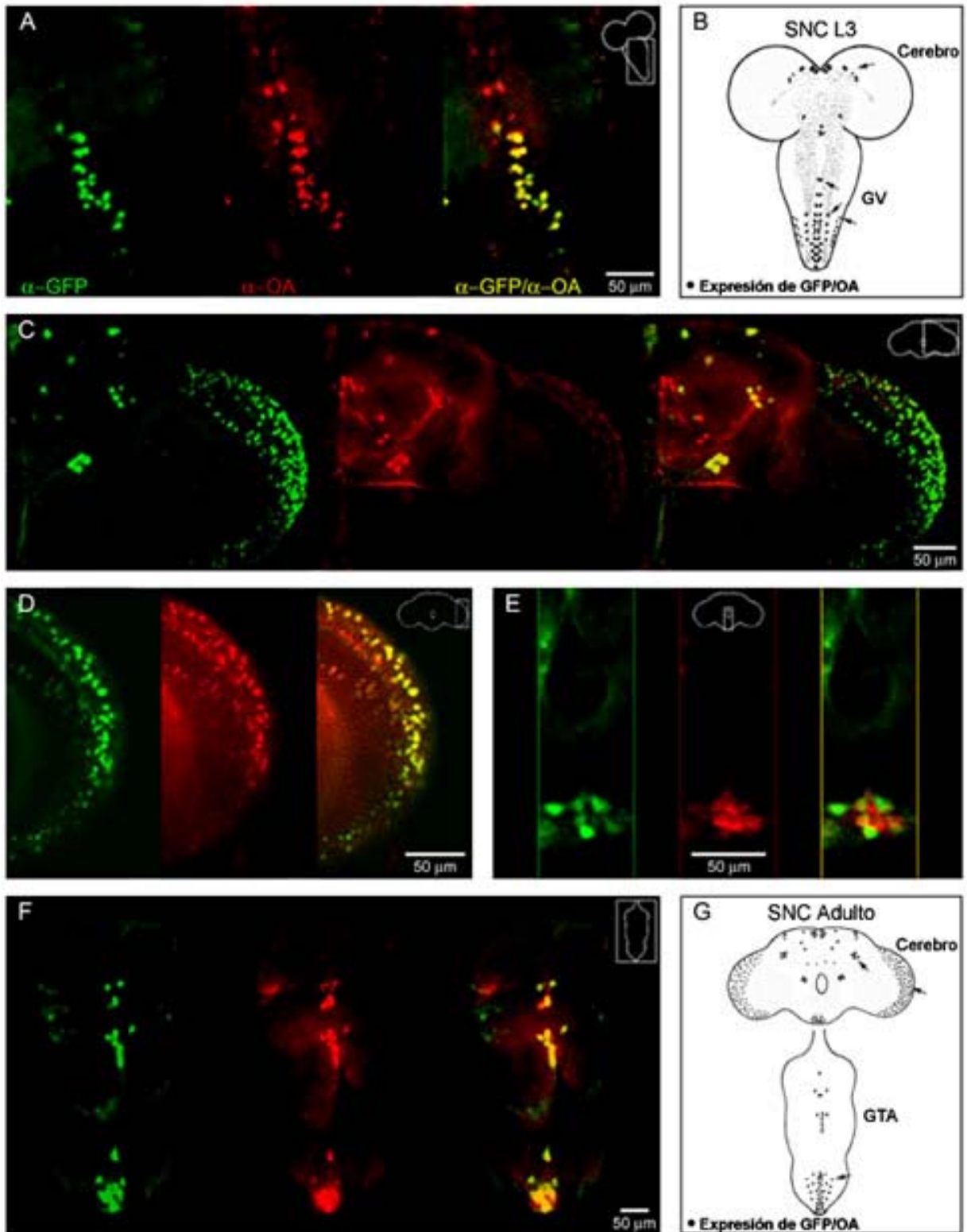


Figura 25. Las neuronas *bwk<sup>lqs</sup>* son octopaminérgicas. El SNC de las hembras *UAS-GFP; bwk<sup>lqs</sup>* se inmunotizó usando anticuerpos anti-GFP y anti-OA. Las imágenes de la señal de la GFP (verde) y de la OA (rojo), obtenidas como se describió en la Figura 3, se sobrelaparon para identificar los sitios de colocación (amarillo). A, Proyección confocal que muestra que la mayoría de las neuronas *bwk<sup>lqs</sup>* (verde) expresan OA



(rojo) en el GV de la larva de tercer estadio. **B**, Esquema que describe las neuronas octopaminérgicas marcadas por *bwk<sup>lqs</sup>* en el SNC de la larva de tercer estadio. Los puntos representan las neuronas que coexpresan OA y GFP. Las flechas señalan los nuevos *foci* octopaminérgicos identificados en este trabajo. La sombra gris representa las varicosidades octopaminérgicas. **C**, Proyección confocal que muestra que la mayoría de las neuronas *bwk<sup>lqs</sup>* (verde) expresa OA (rojo) en el hemisferio derecho del cerebro de la mosca adulta. **D**, Sección-Z confocal que revela la colocalización total de la OA y la GFP en el lóbulo óptico. **E**, Sección-Z confocal que muestra la colocalización OA/GFP en el ganglio subesofágico. **F**, Sección-Z confocal del GTA adulto. En este, casi todas las neuronas *bwk<sup>lqs</sup>* (verde) expresan OA (rojo). **G**, Representación esquemática de las neuronas octopaminérgicas/*bwk<sup>lqs</sup>* en el SNC de la mosca adulta.

La mayoría de los *foci* marcados por la GFP correlacionan con los *foci* octopaminérgicos previamente reportados, sin embargo, logramos identificar algunos nuevos con una expresión muy débil de la OA pero con una expresión evidente de la GFP en el SNC de la larva de tercer estadio (Figura 25B, flechas) y en el SNC del adulto (Figura 25G, flechas). Es probable que estos *foci* octopaminérgicos no hayan sido descritos anteriormente por razones técnicas. En muy pocos casos observamos neuronas con una expresión clara de la OA, que no parecen expresar la GFP, aunque no descartamos la posibilidad de que la GFP se este expresando en niveles técnicamente indetectables. La alta correlación entre la expresión de la GFP y la OA en el SNC de la larva y la mosca adulta sugiere que la línea “enhancer trap” *bwk<sup>lqs</sup>* es un marcador de la mayoría de las neuronas octopaminérgicas durante el desarrollo de *Drosophila*.

## **6. Las neuronas *bwk<sup>lqs</sup>* del ganglio torácico abdominal inervan el tracto reproductivo de la hembra de *Drosophila*.**

Los órganos reproductivos internos de la hembra de *Drosophila* son inervados por neuronas localizadas en el GTA (Miller, 1950; Taylor, 1989). Recientemente se reportó que parte de esta inervación proviene de las células que expresan la *Tβh* y la OA localizadas en la línea media ventral del GTA de la mosca; y que la expresión dirigida de la *Tβh* en algunas de las neuronas *Tβh* más posteriores del ganglio abdominal es suficiente para rescatar el fenotipo de esterilidad observado en las hembras mutantes *Tβh<sup>nM18</sup>* (Monastirioti, 2003). De manera consistente con estos datos, el receptor octopaminérgico OAMB se expresa en el tracto reproductivo de la hembra de *Drosophila* y su pérdida de función causa un fenotipo de esterilidad similar al observado en las mutantes *Tβh<sup>nM18</sup>* (Lee et al., 2003). Nuestros resultados muestran que la desactivación de las neuronas octopaminérgicas *bwk<sup>lqs</sup>* reproduce el fenotipo de retención de los huevos causado por la falta de ovulación observado en las

mutantes  $T\beta h^{nM18}$  y en las mutantes *oamb*, e indican que esta desactivación también afecta los procesos involucrados en la movilización y deposición del huevo. Todos estos datos sugieren que la inervación octopaminérgica sobre el tracto reproductivo es necesaria para el control de los procesos involucrados en la ovoposición.

Para demostrar que las neuronas octopaminérgicas *bwk<sup>1qs</sup>* inervan el tracto reproductivo de la hembra, hicimos preparaciones del GTA completo de las hembras *UAS-GFP; bwk<sup>1qs</sup>* con el nervio abdominal y los nervios derivados de este intactos y adheridos al tracto reproductivo (Figura 26A). Como se había predicho, observamos que las neuronas *bwk<sup>1qs</sup>* en la parte posterior del GTA envían proyecciones hacia el tracto reproductivo de la hembra (Figura 26B, flecha). Para identificar los blancos específicos inervados por las neuronas *bwk<sup>1qs</sup>* usamos la fusión de la sinaptobrevina neuronal y la GFP (*UAS-Nsyb-GFP*). La *Nsyb-GFP* tiene la propiedad de marcar los botones sinápticos de las neuronas que la expresan (Ito et al., 1998).

Nuestros datos muestran que las neuronas *bwk<sup>1qs</sup>* hacen sinapsis con el oviducto (Figura 26C panel superior y E), la espermateca (Figura 26D), el receptáculo seminífero, el útero y la base de los ovarios. Como se puede observar en la Figura 26E y 26F, las terminales sinápticas *bwk<sup>1qs</sup>* que inervan el oviducto son delgadas y contienen botones sinápticos pequeños similares a los botones sinápticos de 1-2  $\mu\text{m}$  que constituyen las terminales sinápticas de tipo II octopaminérgicas de la unión neuromuscular de la larva de *Drosophila* (Monastirioti et al., 1995). Para confirmar la identidad octopaminérgica de los botones sinápticos *bwk<sup>1qs</sup>* en el oviducto lateral y en el oviducto común de las moscas *bwk<sup>1qs</sup>/UAS-Nsyb-GFP* realizamos experimentos de doble inmunotinción usando los anticuerpos anti-GFP (Figura 26C, panel superior) y anti-OA (Figura 26C, panel central). La mayoría de los botones sinápticos que expresa la GFP (*bwk<sup>1qs</sup>*) también expresa la OA (Figura 26C, panel inferior).

Con base en estos resultados, proponemos que las neuronas *bwk<sup>1qs</sup>* localizadas en el extremo posterior del GTA controlan cada uno de los pasos involucrados en el proceso de ovoposición al inervar las diferentes regiones del tracto reproductivo de *Drosophila* con terminales sinápticas de tipo II octopaminérgicas.

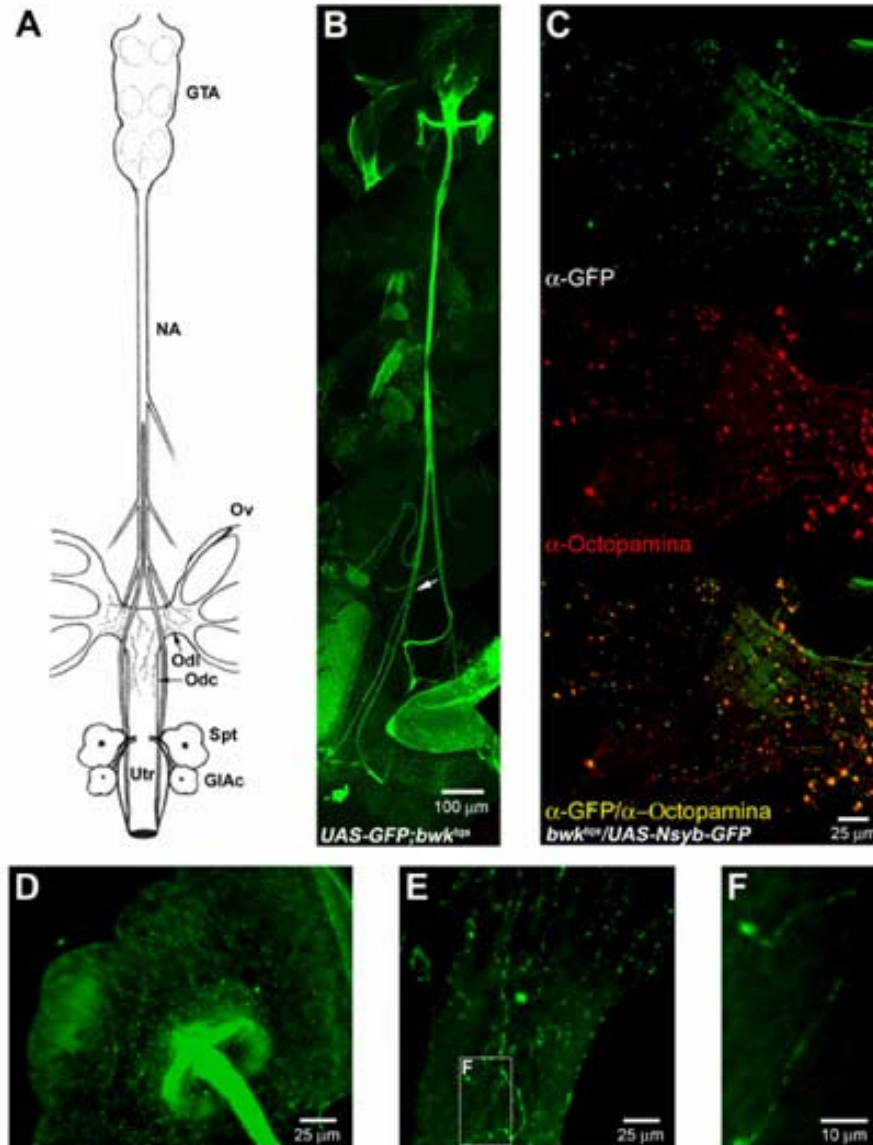


Figura 26. Las neuronas *bwk<sup>Δ</sup>* inervan todo el tracto reproductivo femenino de *Drosophila*. **A**, Esquema que muestra el GTA completo con el nervio abdominal (NA) unido al tracto reproductivo de la hembra. Ov-ovario, Odl-oviducto lateral, Odc-oviducto común, Spt-espermateca, GIAC-glándula accesoria, Utr-útero. **B**, Preparación del tracto reproductivo de una hembra *UAS-GFP; bwk<sup>Δ</sup>*. La fluorescencia de la GFP se visualizó directamente por microscopía confocal. La imagen es una reconstrucción hecha a partir de varias imágenes obtenidas como se describió en la Figura 3. Las neuronas *bwk<sup>Δ</sup>* en el extremo posterior del GTA envían el tracto reproductivo (flecha). **C**, Doble inmunotinción del oviducto de las hembras *bwk<sup>Δ</sup>/UAS-Nsyb-GFP* usando anticuerpos anti-GFP (verde) y anti-OA (rojo). Los botones sinápticos de las neuronas *bwk<sup>Δ</sup>* que inervan el oviducto son octopaminérgicos (sobrelape, amarillo). **D-F**, Imágenes de la espermateca y el oviducto de las hembras *bwk<sup>Δ</sup>/UAS-Nsyb-GFP* obtenidas por la visualización directa de la fluorescencia de la GFP. D y E son proyecciones confocales. Los botones sinápticos GFP positivos de las neuronas *bwk<sup>Δ</sup>* inervan la espermateca (D) y el oviducto común (E). F corresponde a una sección confocal de la región señalada por el recuadro en E. La imagen muestra que las terminales sinápticas de las neuronas *bwk<sup>Δ</sup>* en el oviducto contienen botones sinápticos pequeños, similares a los botones de 1-2  $\mu\text{m}$  observados en las terminales sinápticas de tipo II octopaminérgicas en la unión neuromuscular de la larva.

## **7. La desactivación de las neuronas *bwk<sup>iqs</sup>* afecta el proceso de almacenamiento de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo de la hembra de *Drosophila*.**

Las neuronas octopaminérgicas *bwk<sup>iqs</sup>* inervan el tracto reproductivo de la hembra, incluyendo los órganos de almacenamiento del esperma (Figura 26). Consistentemente, el receptor octopaminérgico OAMB se expresa en estos órganos en la hembra de *Drosophila* (Lee et al., 2003). Para analizar el efecto de la desactivación de las neuronas octopaminérgicas *bwk<sup>iqs</sup>* sobre el almacenamiento de los espermatozoides dentro de la hembra, cruzamos a las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* y a las hembras control *bwk<sup>iqs</sup>* con los machos de la línea *don juan-GFP (dj-GFP)*, los cuales producen espermatozoides fluorescentes (Santel et al., 1997). Esto nos permitió seguir la distribución de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo de las hembras después de la copulación. Aunque el tracto reproductivo de las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* es morfológicamente indistinguible del de las hembras control (Figura 27A y B), el patrón de distribución de los espermatozoides dentro de este muestra diferencias importantes con respecto al observado en las hembras control (Figura 27C y D). Mientras que en las moscas control el esperma se encuentra confinado dentro del receptáculo seminífero y las espermatecas (Figura 27C, cabezas de flecha), en las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* los espermatozoides tienen un patrón de distribución menos restringido. Los espermatozoides se concentran menos en los órganos de almacenamiento e invaden los oviductos laterales, el oviducto común y los ovarios (Figura 27D, flechas). Estos resultados sugieren que la función de las neuronas octopaminérgicas *bwk<sup>iqs</sup>* es esencial para el almacenamiento correcto de los espermatozoides dentro de los órganos correspondientes en el tracto reproductivo de la hembra de *Drosophila*. Nuestros datos indican que el fenotipo de esterilidad de las moscas *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* es causado en su mayor parte por la falta de ovoposición, sin embargo, también observamos que aunque estas moscas son capaces de depositar algunos huevos, solo un porcentaje pequeño de estos eclosiona (Tabla 2). Se ha propuesto que la coordinación entre la ovulación y la liberación del esperma de los órganos de almacenamiento es necesaria para prevenir la polispermia y asegurar una fertilización exitosa en la mosca (Chapman et al., 2001). Los defectos en el almacenamiento del esperma en las moscas *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* y sus posibles consecuencias en la coordinación de la liberación de los espermatozoides y la liberación del huevo podrían estar afectando la correcta fertilización de los huevos explicando así el hecho de que solo un pequeño porcentaje de los huevos depositados por estas hembras eclosiona.

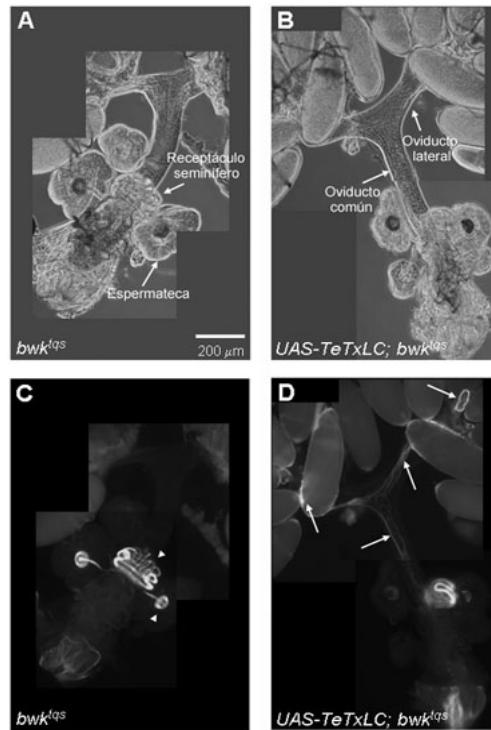


Figura 27. **Almacenamiento anormal del espermatozoide en las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>Δq</sup>***. **A y B**, Imágenes de contraste de fase y **C y D**, Imágenes de microscopía de fluorescencia del tracto reproductivo de una hembra control (**A y C**) y una hembra *UAS-TeTxLC; bwk<sup>Δq</sup>* (**B y D**) cruzadas con machos que producen espermatozoides GFP positivos. Las cabezas de flecha en **C** muestran la localización normal del espermatozoide en los órganos de almacenamiento. Las flechas en **D** indican la dispersión anormal del espermatozoide dentro del oviducto de las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>Δq</sup>*.

## 8. La octopamina modula la contracción del oviducto de *Drosophila*.

Los resultados expuestos en la sección anterior explican porque los huevos puestos por las hembras *UAS-TNTE; bwk<sup>Δq</sup>* no son viables, sin embargo, no explican porque estas hembras ovopositan tan poco y retienen la mayor parte de los ovocitos en sus ovarios. Se ha reportado que la OA modula la contracción de los músculos del oviducto en el insecto *Locusta migratoria* (Orchard y Lange, 1985). Para determinar si la desactivación de las neuronas octopaminérgicas *bwk<sup>Δq</sup>* afecta el proceso de contracción del oviducto y en consecuencia la ovoposición de la mosca, realizamos preparaciones del tracto reproductivo femenino completo para medir videométricamente y de manera cuantitativa la contracción del oviducto causada por la estimulación eléctrica del nervio abdominal en ausencia o presencia de diferentes agentes neuromoduladores. Como primer paso, caracterizamos la respuesta de contracción del oviducto silvestre de *Drosophila* (*wt = Oregon-R*) ante la estimulación eléctrica del nervio abdominal en ausencia de agentes neuromoduladores (Figura 28A y B,

control). En la ausencia de estimulación el oviducto se encuentra relajado (Figura 28A1). Cuando el nervio es estimulado, el oviducto sufre una serie de pequeñas contracciones progresivas hasta que este alcanza su contracción máxima (Figura 28A2). Después de 22 segundos de estimulación continua el músculo se relaja debido a la fatiga muscular (Figura 28A3). La historia de contracción promedio de los oviductos control en respuesta a la estimulación nerviosa se puede observar en la Figura 28B (panel izquierdo, círculos negros). En general, los músculos responden al estímulo eléctrico con una contracción-relajación pequeña y rápida llamada contracción muscular individual (CMI) (Figura 28B, panel central). Como se puede observar en esta figura, la estimulación eléctrica continua del músculo del oviducto a 10 Hz produce un fenómeno de sumación de las contracciones musculares individuales previamente descrito para diferentes tipos de músculos (Parmiggiani y Stein, 1981; Stein y Parmiggiani, 1981; van Zandwijk et al., 1998). El fenómeno de sumación sucede cuando se aplica un segundo estímulo antes de la terminación de una CMI previa. El segundo estímulo proporciona la señal para la siguiente CMI antes de la relajación completa del músculo, por lo tanto, el músculo se contrae cada vez más hasta que este alcanza el estado de máxima contracción. La Figura 28B (panel central) muestra una gráfica expandida de la fase de sumación de las CMIs de los oviductos control (círculos negros). El valor máximo de la razón de contracción durante la tetanización (pico de tetanización) es de  $0.26 \pm 0.04$  y se alcanza a los  $5.6 \pm 1.6$  s después del inicio de la estimulación nerviosa (Figura 28B, panel izquierdo, línea punteada y Tabla 3). Después de alcanzar la contracción máxima, el músculo comienza a relajarse a pesar de la estimulación continua del nervio, proceso descrito clásicamente como fatiga muscular (Fitts, 1994; Garland et al., 1988). Durante la fase de fatiga la amplitud de cada CMI disminuye consecutivamente causando la disminución de la razón de contracción muscular. El tiempo de relajación media o tiempo de fatiga ( $RT_{1/2}$ , definido como el tiempo en el cual el músculo se encuentra a la mitad de su fase de relajación) es de  $11.9 \pm 2$  s (Figura 28B, panel derecho, círculos negros y Tabla 3). La historia de contracción de los oviductos control tiene una duración de  $25 \pm 5$  s (Tabla 3). Después de este tiempo los oviductos se encuentran completamente fatigados (Figura 28B, panel izquierdo, círculos negros). El número promedio de CMIs (N) es de  $7.0 \pm 1.0$  (Tabla 3), donde N representa una medida de la actividad contráctil inducida en el oviducto.

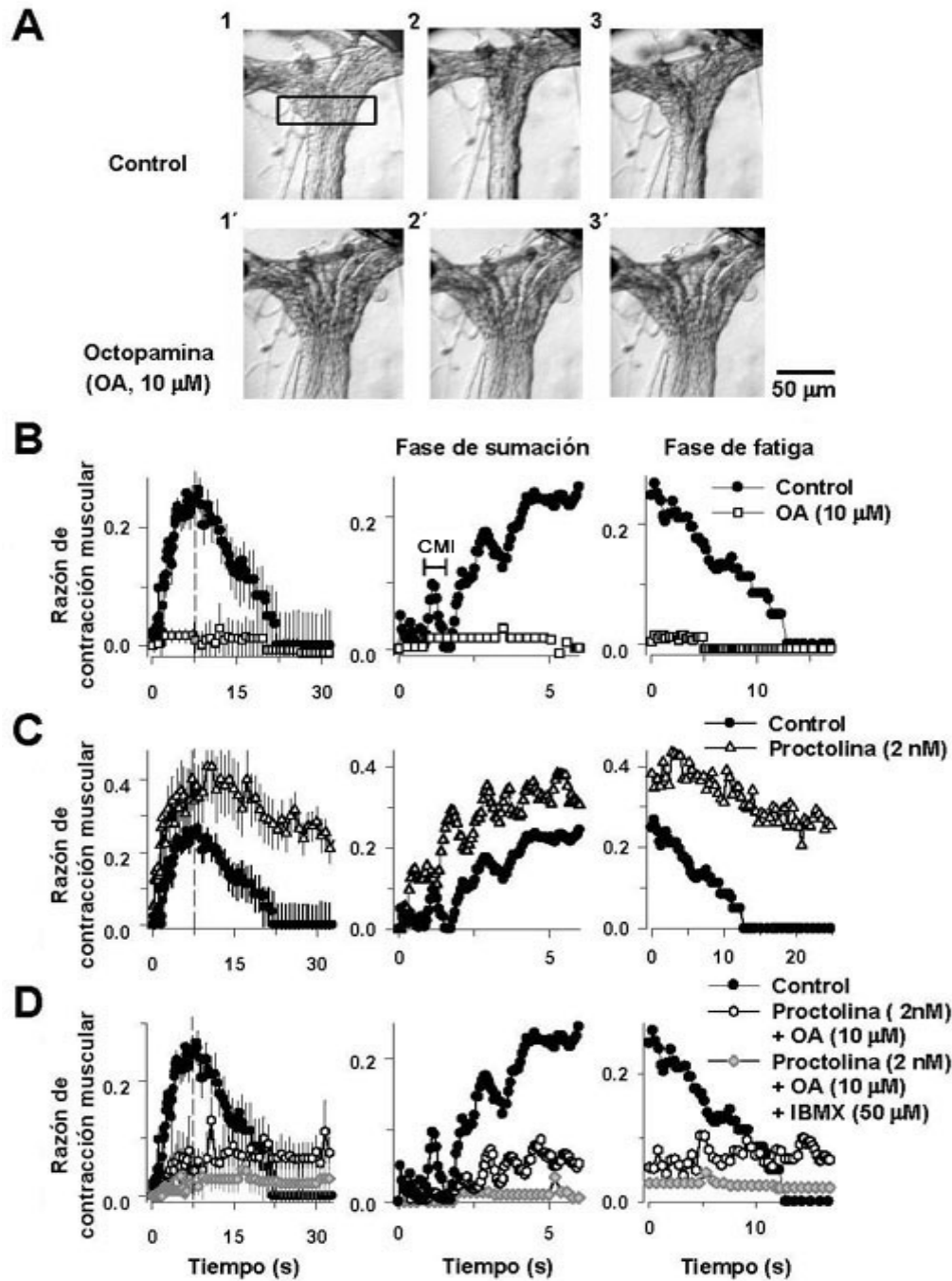


Figura 28. **La OA y la proctolina modulan la contracción del oviducto silvestre de *Drosophila*.** **A**, Imágenes representativas de la contracción del oviducto silvestre en ausencia (control, panel superior) y presencia de OA (panel inferior) antes del inicio del protocolo de estimulación eléctrica (0 s, A1 y A1') y después de 6 s (A2 y A2') y 22 s (A3 y A3') de estimulación continua. El recuadro en la parte A1 delimita la región del oviducto común que se midió videométricamente para calcular la razón de contracción muscular durante el protocolo de estimulación. Antes de la estimulación el oviducto se encuentra relajado (A1). Después de 6 s de estimulación el oviducto alcanza su máxima contracción (A2) y a los 22 s este se relaja debido a la fatiga muscular (A3). En presencia de OA el oviducto se mantiene relajado a pesar de ser estimulado. **B**, La OA inhibe la contracción del oviducto. El panel izquierdo muestra la historia de contracción y la razón de contracción muscular de los oviductos silvestres estimulados eléctricamente en ausencia (control, círculos negros) y presencia de OA (cuadrados vacíos). La línea vertical punteada en el panel izquierdo representa el punto de transición entre la

fase de contracción y la fase de relajación. El panel central muestra la cinética de la fase de contracción ó fase de sumación de las contracciones musculares individuales (CMI) correspondiente a los primeros 6 s del protocolo de estimulación. El panel derecho muestra la cinética de la fase de relajación o fase de fatiga del oviducto después de 6 s de estimulación continua. **C**, La proctolina potencia la contracción del oviducto. La razón de contracción muscular de los oviductos control (círculos negros) inducida por estimulación eléctrica incrementa en presencia de proctolina (triángulos vacíos). La adición de proctolina (triángulos vacíos, panel derecho) retarda la cinética de la fase de relajación o fase de fatiga de los oviductos control (círculos negros, panel derecho). **D**, La OA y el IBMX actúan sinérgicamente para inhibir el incremento de la contracción del oviducto inducido por la proctolina. La adición simultánea de OA y proctolina (hexágonos vacíos) disminuye en aprox. un 80% la razón de contracción muscular de los oviductos estimulados eléctricamente inducida por proctolina (triángulos vacíos en C). La adición de IBMX (proctolina/OA/IBMX, rombos grises) potencia el efecto inhibitorio de la OA sobre el incremento de la razón de contracción del oviducto inducido por la proctolina (proctolina/ OA, círculos vacíos). Para cada gráfica se usó una n de 6. Los símbolos representan promedios  $\pm$  el error estándar de la muestra (EEM).

Una vez caracterizada la respuesta del oviducto silvestre durante la estimulación nerviosa, proseguimos a analizar el papel de la OA en la modulación de este proceso (Figura 28A). La aplicación de OA en una concentración de 10  $\mu$ M inhibe drásticamente la contracción muscular de los oviductos control estimulados eléctricamente (Figura 28A1', 2', 3' y Figura 28B, cuadrados blancos). La máxima razón de contracción muscular y la N disminuyen en la presencia de OA (Tabla 3). En *Locusta*, el pentapéptido proctolina potencia la contracción del oviducto e induce su contracción tónica (Nykamp y Lange, 2000). Para evaluar el efecto de este pentapéptido sobre la contracción de los oviductos de *Drosophila*, adicionamos proctolina en una concentración de 2nM a los oviductos control estimulados eléctricamente. La proctolina incrementa la razón de contracción muscular (Figura 28C, panel izquierdo, triángulos blancos) y la N (Tabla 3). El tiempo al pico de tetanización en presencia de proctolina es estadísticamente similar al de los oviductos control estimulados eléctricamente en ausencia de neuromodulador (Tabla 3). Sin embargo, la proctolina retarda la cinética de la fase de relajación o fatiga (Figura 28C, panel derecho, triángulos blancos). La OA es capaz de contrarrestar el efecto de la proctolina sobre la contracción del oviducto control (Figura 28D, hexágonos blancos), disminuyendo la razón de contracción máxima cuando se agrega simultáneamente con la proctolina (Tabla 3). Consistentemente con el efecto antagónico de la OA, la N de los oviductos estimulados en presencia de ambos neuromoduladores es similar a la de los oviductos control (Tabla 3). El tiempo al pico de tetanización de los oviductos control después de la adición simultanea de estos neuromoduladores incrementa (Tabla 3). Interesantemente, en presencia de proctolina y OA la razón de contracción muscular alcanza un estado casi estacionario después de 5 s por lo que es imposible determinar el  $RT_{1/2}$  en esta condición (Figura 28D, panel derecho,



hexágonos blancos y Tabla 3). Se ha propuesto que el efecto antagónico de la OA sobre la contracción inducida por la proctolina en el oviducto de *Locusta* es mediado por un mecanismo molecular que involucra el incremento del AMPc intracelular (Lange y Nykamp, 1996). Para probar si este mecanismo se encuentra conservado en la mosca, estimulamos los oviductos control en presencia de OA/Proctolina y del inhibidor de las fosfodiesterasas IBMX a una concentración de 50  $\mu$ M. El IBMX potencia el efecto inhibitorio de la OA sobre la contracción inducida por proctolina (Figura 28D, rombos grises). La OA y el IBMX actúan sinérgicamente reduciendo la máxima razón de contracción muscular (Tabla 3). El IBMX potencia los efectos de la OA reduciendo aún más la N e incrementando el tiempo al pico de tetanización (Tabla 3). Estos resultados sugieren que tanto en *Drosophila* como en *Locusta*, la OA actúa a través de la cascada de señalización del AMPc para relajar los músculos del oviducto al antagonizar el efecto potenciador de la proctolina sobre la contracción de los mismos.

Tabla 3. **Parámetros de contracción del oviducto de *Drosophila*.**

Genotipo/ condición experimental	Máxima razón de contracción muscular	Número promedio de CMIs (N)	Tiempo al pico de tetanización (s)	Tiempo de relajación media (RT <sub>1/2</sub> ) (s)
<i>wt</i> control	0.26 ± 0.04	7.0 ± 1.0	5.6 ± 0.6	11.9 ± 2.0
<i>wt</i> OA (10 $\mu$ M)	0.07 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.6 ± 1.8 <sup>a</sup>	n.c.	n.c.
<i>wt</i> Proctolina (2 nM)	0.36 ± 0.07 <sup>a</sup>	21.5 ± 2.6 <sup>a</sup>	5.3 ± 2.3	n.c.
<i>wt</i> Proctolina (2 nM) + OA (10 $\mu$ M)	0.18 ± 0.04	8.2 ± 2.3	9.9 ± 4.5 <sup>a</sup>	n.c.
<i>wt</i> Proctolina (2 nM) + OA (10 $\mu$ M) + IBMX (50 $\mu$ M)	0.05 ± 0.02 <sup>a</sup>	2.2 ± 1.1 <sup>a</sup>	14.4 ± 2.4 <sup>a</sup>	n.c.
<i>bwk<sup>qs</sup></i>	0.29 ± 0.05	10.1 ± 1.8	7.6 ± 1.5	13.8 ± 2.2
<i>UAS-TeTxLC; bwk<sup>qs</sup></i>	0.07 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.6 ± 2.1	14.4 ± 3.4 <sup>a</sup>	n.c.
<i>UAS-TeTxLC; bwk<sup>qs</sup></i> + OA (10 $\mu$ M)	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	n.c.	n.c.
<i>UAS-TeTxLC; bwk<sup>qs</sup></i> + OA (10 $\mu$ M) + IBMX (50 $\mu$ M)	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	n.c.	n.c.
<i>UAS-TeTxLC; bwk<sup>qs</sup></i> + Proctolina (2 nM)	0.06 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.6 ± 1.2 <sup>a</sup>	12.0 ± 2.0 <sup>a</sup>	n.c.
<i>wt</i> Glu (16 $\mu$ M)	0.45 ± 0.07	3.4 ± 0.9	4.1 ± 0.5	11.4 ± 1.9
<i>UAS-TeTxLC; bwk<sup>qs</sup></i>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	n.c.	n.c.
<i>UAS-TeTxLC; bwk<sup>qs</sup></i> + Glu (16 $\mu$ M)	0.50 ± 0.05	2.8 ± 0.4	10.0 ± 2.0 <sup>a</sup>	n.c.
<i>UAS-TeTxLC; bwk<sup>qs</sup></i> + Glu (16 $\mu$ M) + OA (10 $\mu$ M)	0.39 ± 0.06	2.6 ± 0.9	4.9 ± 0.9	13.1 ± 2.9

Los valores corresponden a promedios ± EEM. *wt* = *Oregon-R*.

<sup>a</sup>P < 0.05. n.m. = no cuantificable. n ≥ 6

## 9. Las neuronas $bwk^{tqs}$ del ganglio abdominal modulan la contracción del oviducto de *Drosophila* de manera dependiente de glutamato y octopamina en conjunción con un grupo independiente de neuronas proctolinérgicas.

Después de caracterizar el papel neuromodulador de la OA sobre la contracción del oviducto de *Drosophila*, evaluamos el efecto de la desactivación de las neuronas octopaminérgicas  $bwk^{tqs}$  en la contracción de este tejido usando el mismo protocolo de análisis videométrico. La respuesta de los oviductos control  $bwk^{tqs}$  (Figura 29A, cuadrados blancos) estimulados eléctricamente es estadísticamente similar a la respuesta de los oviductos silvestres *Oregon-R* (Figura 29A, círculos negros). Sin embargo, la expresión de la TeTxLC en las neuronas  $bwk^{tqs}$  reduce la razón de contracción de los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* en aprox. un 70% (Figura 29A, triángulos grises y Tabla 3) al compararla con la de los oviductos control *Oregon-R* y  $bwk^{tqs}$  (Figura 29A, círculos negros y cuadrados blancos respectivamente y Tabla 3). La N de los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* es menor que la de los oviductos control pero el tiempo al pico máximo de tetanización es dos veces mayor que el de los controles (Tabla 3). Además, en los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* se observa una pequeña contracción sostenida debido a la ausencia de una fase de relajación o fatiga normal (Figura 29A, triángulos grises). El tamaño inicial de los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* es estadísticamente similar al de las moscas *Oregon-R*, sugiriendo que el tono muscular inicial es similar en ambos casos. Para elucidar la contribución de la falta de neuromodulación octopaminérgica producida por la desactivación de las neuronas  $bwk^{tqs}$  en el fenotipo de esterilidad observado en las moscas *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>*, evaluamos la contracción de los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* estimulados eléctricamente después de la adición de OA (Figura 29A, hexágonos blancos) y OA/IBMX (Tabla 3). En ningún caso observamos algún rescate de la contracción de estos oviductos. Más aún, la adición de OA y OA/IBMX inhibió completamente la pequeña contracción evocada que se observa en las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* (Figura 29A, hexágonos blancos y Tabla 3). Estos datos sugieren que la liberación de OA por las neuronas  $bwk^{tqs}$  no es necesaria o no es suficiente para inducir el proceso de contracción del oviducto. Por otro lado, la falta de contracción de los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* estimulados eléctricamente sustenta la idea de que la desactivación de las neuronas  $bwk^{tqs}$  también debe afectar la liberación del neurotransmisor excitatorio responsable de su contracción. Para confirmar esta hipótesis, realizamos registros intracelulares para medir los potenciales postsinápticos evocados por la estimulación nerviosa

en los oviductos control *bwk<sup>tqs</sup>* y en los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>*. El potencial en reposo (Er) de los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* es similar al de los oviductos control (gráficas representativas, Figura 29B). En los oviductos *bwk<sup>tqs</sup>* (gráfica representativa, Figura 29B parte superior) la estimulación nerviosa produce un potencial postsináptico robusto de  $9.7 \pm 3.7$  mV, n=10 (ver flecha), el cual a su vez induce un respectivo potencial de acción (ver cabeza de flecha). Por otro lado, en los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* (gráficas representativas, Figura 29B, parte inferior) la estimulación nerviosa solo induce una despolarización postsináptica muy pequeña de  $2.4 \pm 0.8$  mV, n=11 (ver flecha), que no es suficiente para inducir un potencial de acción. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la expresión de la TeTxLC en las moscas *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* disminuye dramáticamente la liberación del neurotransmisor excitatorio en las terminales nerviosas del oviducto. En el oviducto de *Locusta*, la proctolina actúa como un cotransmisor excitatorio junto con el Glu. En este organismo la proctolina incrementa el tono muscular del oviducto e induce una pequeña despolarización del potencial de membrana del oviducto que no es capaz de inducir potenciales de acción (Lange et al., 1986; Orchard y Lange, 1986). Nuestros resultados revelaron la presencia de una ligera contracción muscular sostenida (incremento del tono muscular) y una pequeña despolarización postsináptica en los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* estimulados eléctricamente, sugiriendo que la proctolina liberada por un grupo de neuronas independiente del grupo neuronal *bwk<sup>tqs</sup>* debe estar involucrada en el incremento del tono muscular en el oviducto de *Drosophila*. De acuerdo con esta propuesta, la adición de proctolina no produce efecto alguno sobre el fenotipo de los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* estimulados (Figura 29C, rombos blancos y Tabla 3). Por otro lado, se ha reportado que en los insectos el Glu es el principal neurotransmisor excitatorio en la unión neuromuscular (Jan y Jan, 1976). Para determinar si el Glu es el neurotransmisor excitatorio responsable de la contracción del oviducto en la mosca, medimos la contracción de los oviductos silvestres *Oregon-R* inducida por la adición de Glu en una concentración de 16  $\mu$ M en ausencia de estimulación eléctrica. El Glu es capaz de inducir la contracción del oviducto de *Drosophila*, incluyendo las fases de sumación y fatiga antes descritas (Figura 29D, círculos negros). La máxima razón de contracción muscular en presencia de Glu, el tiempo al pico de tetanización y el tiempo de relajación media son estadísticamente similares a los calculados durante la respuesta evocada por la estimulación nerviosa en los oviductos *Oregon-R* (Tabla 3), indicando que el Glu es el principal neurotransmisor excitatorio en el tracto reproductivo de

la mosca. La N en presencia de Glu es menor que la observada durante la estimulación eléctrica de los oviductos silvestres (Tabla 3), sugiriendo una saturación del sistema con Glu, que resulta en la inducción de una contracción continua en lugar de la serie de CMI's producidas por la liberación cuántica de Glu en respuesta a los pulsos eléctricos. Basándonos en estas evidencias, y con el objetivo de establecer el papel del Glu como el neurotransmisor liberado por las neuronas octopaminérgicas *bwk<sup>iqs</sup>* necesario para la contracción del oviducto, analizamos el efecto de la adición de este neurotransmisor sobre el fenotipo de los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>*. Los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* no muestran contracciones espontáneas (Figura 29D, cruces negras), sin embargo, en presencia de Glu estos se contraen fuertemente (Figura 29D, cuadrados grises) con una máxima razón de contracción muscular y una N similar a la de los oviductos *Oregon-R* con Glu (Tabla 3). Interesantemente, el tiempo al pico de tetanización de los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* en presencia de Glu es más largo que el de los oviductos silvestres con Glu (Tabla 3). Por otra parte, la fase de relajación o fatiga es abolida casi por completo en los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>*, probablemente por la falta del neuromodulador inhibitorio OA en la sinapsis neuromuscular (Figura 29D, cuadrados grises). Consistentemente con esta idea, la adición simultánea de Glu y OA a los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* reproduce el proceso de contracción de los oviductos silvestres inducido por Glu, incluyendo la fase de relajación o fatiga (Figura 29D, hexágonos blancos). Como se puede observar en la Tabla 3 los valores calculados para la máxima razón de contracción muscular, el tiempo al pico de tetanización, el tiempo de relajación media y la N de los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* tratados con Glu/OA y los oviductos *Oregon-R* en presencia de Glu son todos similares. Estos resultados sugieren que las neuronas *bwk<sup>iqs</sup>* liberan tanto Glu como OA para inducir la contracción del oviducto de *Drosophila*.

Para demostrar el papel esencial del Glu y sus receptores en la contracción del oviducto de *Drosophila* realizamos experimentos adicionales usando un antagonista del receptor de Glu específico pero no selectivo llamado D-AP4. Como es de esperarse, el D-AP4 bloquea fuertemente la contracción de los oviductos silvestres y los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* inducida por Glu (Figura 29E, comparar barras negras y blancas). Por el contrario, el ácido L-quiscuálico, un agonista del receptor de Glu no selectivo, induce una contracción fuerte en ambos genotipos (Figura 29E, comparar barras negras y grises).

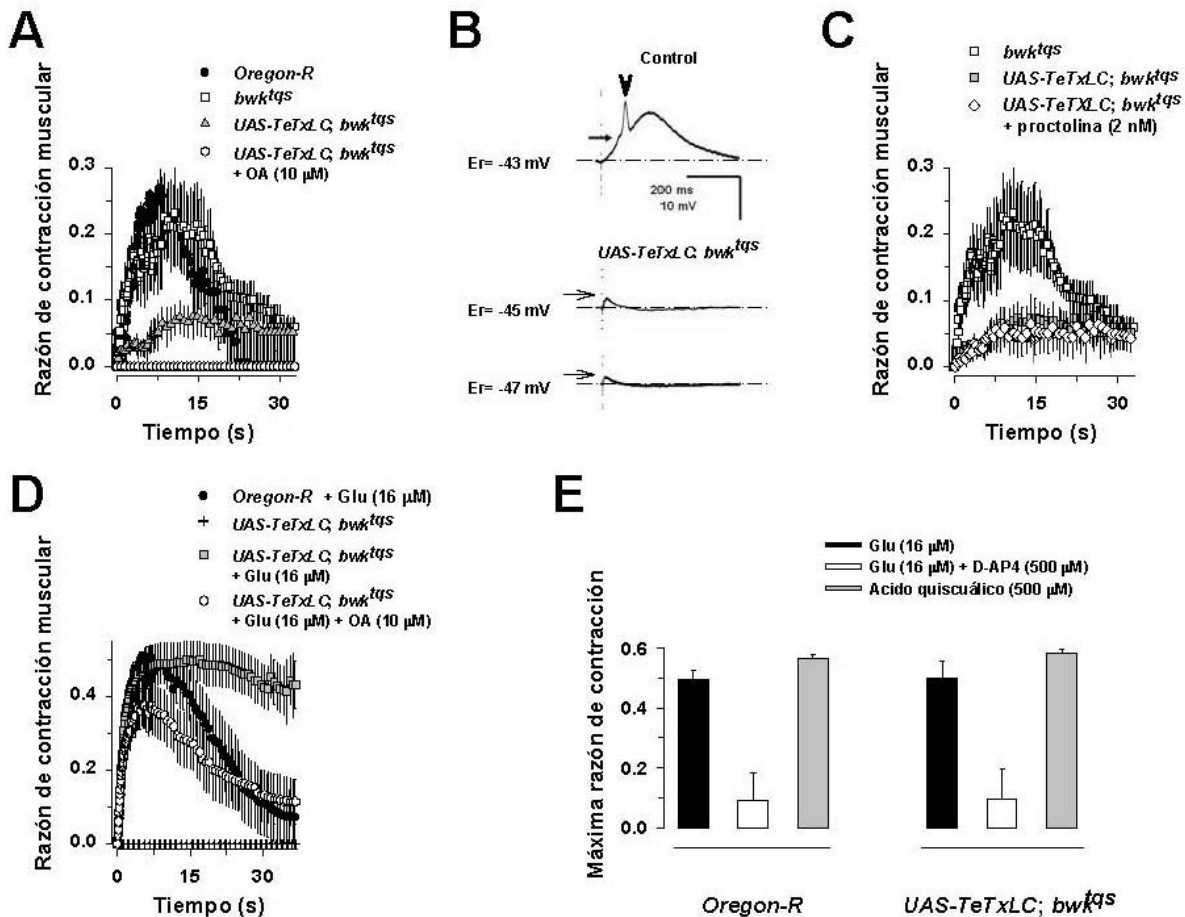


Figura 29. **La desactivación de las neuronas *bwk<sup>1qs</sup>* reduce dramáticamente la contracción del oviducto e inhibe los potenciales post sinápticos evocados, pero la adición de Glu/OA rescata el fenotipo de contracción.** **A**, La razón de contracción muscular de los oviductos *bwk<sup>1qs</sup>* (cuadros blancos) en respuesta a la estimulación nerviosa es estadísticamente similar a la de los oviductos silvestres *Oregon-R* (círculos negros). Comparada con los valores observados para los oviductos control *Oregon-R* y *bwk<sup>1qs</sup>*, la razón de contracción muscular de los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>1qs</sup>* inducida por estimulación nerviosa disminuye dramáticamente (triángulos grises) y es abolida completamente por la adición de OA (hexágonos blancos). **B**, Potencial post sináptico evocado por estimulación nerviosa (PPEN) en el músculo del oviducto. La parte superior muestra una gráfica representativa del PPEN en los oviductos silvestres. El potencial en reposo ( $E_r$ ) en este caso es de -43 mV, y la estimulación induce un PPEN de 6.3 mV (flecha) seguido por un potencial de acción correspondiente (cabeza de flecha). La parte inferior muestra dos gráficas representativas del PPEN en los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>1qs</sup>*. El potencial en reposo en ambos casos (-45 y -47 mV) es similar al de los oviductos control. Sin embargo, en estos oviductos la estimulación nerviosa solo induce despolarizaciones postsinápticas pequeñas (2.4 y 1.5 mV respectivamente) incapaces de producir potenciales de acción. **C**, La adición de proctolina no es suficiente para potenciar la razón de contracción de los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>1qs</sup>* (rombos blancos). **D**, El Glu induce una fuerte contracción en los oviductos silvestres en ausencia de estimulación nerviosa (círculos negros) pero no reproduce la contracción silvestre en los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>1qs</sup>* (cuadros grises). La adición simultánea de Glu/OA si rescata la contracción silvestre en los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>1qs</sup>* (hexágonos blancos). En ausencia de Glu y estimulación eléctrica, no se observan contracciones espontáneas en los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>1qs</sup>* (cruces negras). **E**, El antagonista del receptor de Glu D-AP4 inhibe la contracción de los oviductos silvestres y los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>1qs</sup>* inducida por Glu (barras blancas), mientras que el agonista del receptor de Glu ácido L-quiscuálico induce la contracción del oviducto en ausencia de Glu (barras grises). En todos los casos se usó una  $n=6$ . Los símbolos representan promedios  $\pm$  EEM.

Para corroborar la identidad glutamatérgica de las neuronas  $bwk^{Tqs}$  que inervan el oviducto usamos la fusión del receptor glutamatérgico GluR-IIA y la RFP ( $GluR-IIA^{RFP}$ ) como un marcador de las uniones musculares glutamatérgicas (Rasse et al., 2005). Analizamos la distribución del receptor  $GluR-IIA^{RFP}$  (Figura 30, rojo) con respecto a la localización de las terminales sinápticas  $bwk^{Tqs}$  marcadas por la GFP ( $bwk^{Tqs}$ , Figura 30, verde) en el oviducto de las moscas  $UAS-GFP; bwk^{Tqs}/GluR-IIA^{RFP}$  mediante microscopía confocal. Como se puede observar en la Figura 20, los botones sinápticos  $bwk^{Tqs}$  colocalizan con el receptor  $GluR-IIA$  ( $bwk^{Tqs}/GluR-IIA$ , Figura 30, amarillo). Con base en estas evidencias proponemos que las neuronas  $bwk^{Tqs}$  más posteriores del GTA constituyen la inervación glutamatérgica y octopaminérgica que integra el circuito neural responsable de controlar la contracción del tracto reproductivo de *Drosophila*.

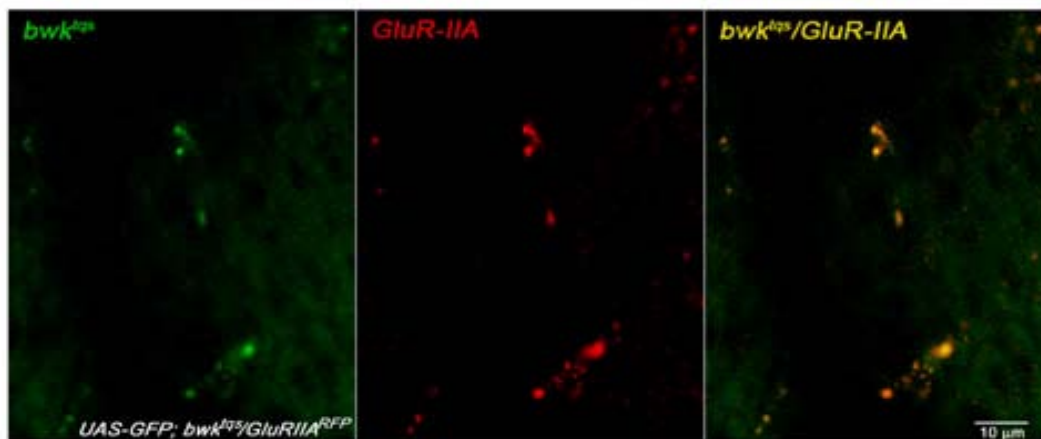


Figura 30. **Las terminales sinápticas  $bwk^{Tqs}$  colocalizan con el receptor glutamatérgico  $GluR-IIA^{RFP}$ .** Sección-Z confocal del oviducto común de la hembra  $UAS-GFP; bwk^{Tqs}/GluR-IIA^{RFP}$  que muestra los botones sinápticos  $bwk^{Tqs}$  marcados por la GFP (verde), los sitios de expresión del receptor  $GluR-IIA^{RFP}$  (rojo) y la colocalización entre ambos (amarillo).

## DISCUSIÓN

### 1. Identificación de inserciones *P(GAL4)* que marcan grupos de neuronas esenciales para la fertilidad y otros procesos específicos en *Drosophila*.

La desactivación neuronal mediante la expresión de la cadena ligera de la toxina de tétanos (TeTxLC) se ha convertido en una de las estrategias más empleadas para estudiar el papel que tienen grupos específicos de neuronas en la fisiología y el comportamiento de la mosca. Haciendo uso del sistema bipartito GAL4/UAS para expresar de manera dirigida y discreta la TeTxLC en el SN, desarrollamos un tamizado genético de pérdida de función con el objetivo de identificar inserciones *P(GAL4)* que marcan grupos neuronales en el SNC de *Drosophila* involucrados en un proceso esencial para la supervivencia de las especies integrado por múltiples comportamientos y procesos fisiológicos, como lo es la fertilidad. Después de analizar 141 líneas *P(GAL4)*, encontramos que más del 50% de estas tiene un fenotipo de letalidad temprana, probablemente ocasionado por la expresión generalizada de la TeTxLC en el SN. Un número menor de líneas, el 30%, es viable, fértil y no muestra fenotipos evidentes en presencia de la TeTxLC, lo que sugiere que podrían representar inserciones con un patrón de expresión no neural. Finalmente, el 16% de las líneas tiene progenie viable con fenotipos característicos (Tabla 1), muy probablemente producidos por la expresión dirigida de la TeTxLC a grupos discretos de neuronas en el SN. Estos resultados son consistentes con los datos obtenidos del análisis del patrón de expresión de un banco de 6000 líneas *P(lacZ)* en el SNC de la mosca, los cuales muestran que más del 50% de las inserciones tiene un patrón de expresión generalizado en el SNC, mientras que cerca del 15% se expresa de manera preferencial o exclusiva en grupos pequeños de neuronas (Han et al., 1996). De acuerdo con la hipótesis inicial, el tamizado de pérdida de función nos permitió aislar líneas *P(GAL4)* con un fenotipo de esterilidad dependiente de la expresión de la TeTxLC. Colateralmente, identificamos algunas líneas con otros fenotipos causados por la expresión de la TeTxLC. Estas líneas mostraron defectos durante el desarrollo pupal, letalidad como faratos, deformaciones en las patas y alas y defectos motrices en el adulto (Tabla 1). Después de analizar el patrón de expresión de una de las líneas con fenotipo de esterilidad identificada como *IH12D* y de 3 líneas con fenotipos específicos llamadas *2A2D*, *3A42* y *IDB3A*, encontramos que con excepción de la línea *2A2D*, el resto se expresa de manera discreta en el SNC de la larva de tercer estadio (Figuras 13, 15, 17 y 18). Estos

resultados indican que el tamizado de pérdida de función constituye una herramienta muy útil para el aislamiento de grupos pequeños de neuronas con una función específica.

Los machos portadores de la inserción *2A2D* que expresan la *TeTxLC* presentan anomalías en el proceso de eversión de la cabeza y elongación de las patas y alas durante el desarrollo pupal (Figura 12). En *Drosophila*, la transición entre la etapa de prepupa y pupa se induce por un pulso pequeño de la hormona 20-hidroxiecdisona (20E) secretada por la glándula protorácica. En respuesta a este pulso hormonal la cabeza asume su posición final y las alas y las patas se extienden por un proceso de eversión orquestado por contracciones de los músculos abdominales (Ashburner, 1989; Fristrom y Fristrom, 1993; Hartenstein, 1993). La ausencia de estos procesos en las pupas macho *UAS-TeTxLC; 2A2D* sugiere que algunas de las neuronas *2A2D* desactivadas podrían estar involucradas en regular la producción de 20E necesaria para inducir el desarrollo normal de la pupa. Otra posibilidad es que algunas de las neuronas *2A2D* que forman cadenas laterales en el GV de la larva (Figura 13) correspondan a las neuronas que secretan el péptido cardioactivo de crustáceo (CCAP) en la mosca. Este péptido se expresa en dos pares de neuronas en el cerebro y en neuronas dorsales que forman una cadena en cada lado del GV de la larva (Park et al., 2003). Además, se ha reportado que la eliminación de las neuronas que secretan el CCAP produce alteraciones en los procesos de eversión de la cabeza, alas y patas similares a las observadas en las pupas *UAS-TeTxLC; 2A2D* (Figura 12).

En el caso de la línea *3A42*, encontramos que la expresión de la *TeTxLC* causa un fenotipo que incluye la falta de extensión de las alas, deformaciones en el tercer par de patas, anomalías en la forma y pigmentación del tórax y abdomen, y en algunos casos letalidad como faratos (Figura 14). La eliminación de las neuronas CCAP produce defectos en las moscas adultas similares a los inducidos por la desactivación de las células *3A42*, con excepción de las deformaciones en el tercer par de patas (Park et al., 2003). Por otro lado, mutaciones puntuales en el gen que codifica para la hormona neuropeptídica *Bursicon*, la cual se expresa en un subgrupo de las neuronas CCAP, también causan la falta de extensión de las alas así como anomalías en la forma y pigmentación del tórax y abdomen (Dewey et al., 2004). La inserción *3A42* se expresa en un grupo pequeño de células apareadas y en unas cuantas células desapareadas a lo largo de la línea media dorsal del GV de las larvas de tercer estadio (Figura 15), las cuales no parecen corresponder a las neuronas CCAP. Sin embargo, existe la posibilidad de que las células *3A42* formen parte del circuito neuronal integrado por



las neuronas CCAP encargado de controlar la eclosión de la mosca adulta y de definir sus características finales.

En cuanto a la línea *IDB3A*, todos los individuos de la progenie que expresan la TeTxLC emergen como adultos aparentemente normales, pero posteriormente sufren una disminución progresiva de la movilidad hasta llegar a la parálisis total durante su primera semana de vida (Figura 16). La inserción *IDB3A* marca un grupo discreto de 6 células (I, II, I, II) en la línea media ventral del GV de la larva de tercer estadio (Figura 17), las cuales por su posición podrían estar involucradas en el control de las patas y las alas en los organismos adultos, lo que explicaría el fenotipo de parálisis observado por su desactivación.

## **2. La inserción *IHI2D*, también llamada *bwk<sup>tqs</sup>*, es un marcador genético de la mayoría de las neuronas octopaminérgicas a lo largo del desarrollo de *Drosophila*.**

Nuestros resultados indican que la inserción *IHI2D* generó un alelo débil del locus *cic/fet/bwk*. Por esta razón le dimos el nombre de *bwk<sup>tqs</sup>*. La inserción *bwk<sup>tqs</sup>* dirige la expresión de GAL4 a un grupo discreto de neuronas en el SNC de la larva, pupa y adulto de *Drosophila* (Figura 24). Otra inserción en el mismo locus llamada *P(Lacz)bwk<sup>8482</sup>* (Rittenhouse y Berg, 1995) también es capaz de dirigir la expresión de β-galactosidasa a un grupo de neuronas bien definido en el SNC de la larva (Figura 21). Consistentemente con estas observaciones, en el humano y en el ratón el locus *cic* se ha implicado en el desarrollo del SNC ya que los ortólogos de este gen se expresan predominantemente en neuronas inmaduras en zonas específicas del SNC (Lee et al., 2002). Estos datos sugieren que, de manera similar a lo reportado en los mamíferos, el locus *cic/fet/bwk* podría estar involucrado en el desarrollo de las neuronas *bwk<sup>tqs</sup>* en la mosca. La inserción *bwk<sup>tqs</sup>* se comporta como un marcador genético de casi todas las neuronas octopaminérgicas durante el desarrollo del SNC (Figura 25). Como en el caso de los grupos neurales aminérgicos serotoninérgico y dopaminérgico (Lundell y Hirsh, 1994), las neuronas *bwk<sup>tqs</sup>* se determinan muy temprano en el desarrollo. Aunque algunas neuronas se agregan durante la metamorfosis, la distribución del grupo neuronal *bwk<sup>tqs</sup>* durante el desarrollo del SNC en general se conserva, sugiriendo que muchas de las neuronas de la larva persisten hasta la etapa adulta.

### 3. La función de las neuronas *bwk<sup>tqs</sup>*.

El tracto reproductivo de la hembra de *D. melanogaster* está innervado bilateralmente por dos pares de ramificaciones del nervio abdominal central que sale del GTA en el SNC (Figura 26A). El primer par de nervios se proyecta hacia la unión de los ovarios y el oviducto lateral, donde se ramifica repetidamente. De ahí, los nervios se extienden radialmente a través de la superficie de la membrana peritoneal, formando procesos irregulares que alcanzan los dos tercios posteriores del ovario (Cole et al., 2005). No se ha observado ninguna innervación directa de la membrana epitelial de los ovarios. El segundo par de nervios inerva el oviducto lateral, el oviducto común y los músculos extrínsecos e intrínsecos del útero (Middleton et al., 2006).

Las neuronas octopaminérgicas *bwk<sup>tqs</sup>* que se encuentran en el ganglio abdominal envían proyecciones a través del primero y segundo par de nervios innervando todas las estructuras que componen el tracto reproductivo de la mosca, incluyendo los ovarios, los oviductos laterales, el oviducto común, el útero y los órganos de almacenamiento del esperma (Figura 26). De acuerdo con este patrón de innervación, la desactivación de las neuronas octopaminérgicas *bwk<sup>tqs</sup>* durante el desarrollo de la mosca produce un fenotipo de esterilidad en las hembras adultas. Nuestros datos muestran que este fenotipo no es el resultado de posibles defectos ontológicos causados por la expresión constitutiva de la *TeTxLC* durante el desarrollo de las neuronas *bwk<sup>tqs</sup>*. Usando el sistema TARGET (McGuire et al., 2004) y el represor GAL80<sup>ts</sup> para desactivar a las neuronas *bwk<sup>tqs</sup>* específicamente en la etapa adulta fuimos capaces de reproducir el fenotipo de esterilidad observado en las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* (Figura 23). Además, demostramos que la adición simultánea de Glu y OA es suficiente para rescatar la contracción silvestre de los oviductos desactivados *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* (Figura 29).

Varias evidencias sugieren que las neuronas octopaminérgicas están involucradas en el control de la ovulación. Las hembras con la mutación nula *Tβh<sup>vM18</sup>* en el gen que codifica para la enzima *Tiramina β-hidroxilasa*, la cual convierte la tiramina a OA retienen los ovocitos en los ovarios y son estériles (Monastirioti et al., 1996). Las neuronas Tβh/OA localizadas en la línea media ventral de ganglio abdominal de *Drosophila*, innervan los ovarios (incluyendo el cáliz), los oviductos laterales y el oviducto común; y la expresión dirigida del gen *Tβh* a un subgrupo de las neuronas Tβh localizadas en el ganglio abdominal rescata el fenotipo mutante *Tβh<sup>vM18</sup>* (Monastirioti, 2003). El receptor octopaminérgico

OAMB se expresa en el SNC y en los oviductos laterales y el oviducto común; y mutaciones en este gen producen un fenotipo de retención de los ovocitos similar al de las hembras mutantes *TbH<sup>nM18</sup>* (Lee et al., 2003). Por otro lado, nuestros resultados muestran que la desactivación de las neuronas octopaminérgicas *bwk<sup>iqs</sup>*, incluyendo aquellas que inervan el tracto reproductivo, también produce un fenotipo de retención y falta de ovulación en las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* (Figura 22 y Tabla 2).

A diferencia de las moscas mutantes *TbH<sup>nM18</sup>* y *oamb*, las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* son capaces de ovular con una frecuencia baja (Tabla 2). Esta característica nos permitió relacionar por primera vez la función de las neuronas octopaminérgicas *bwk<sup>iqs</sup>* con la regulación de otros procesos importantes para la ovoposición en la mosca. Después de analizar la presencia de huevos en el tracto reproductivo inferior de las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>*, encontramos que la mayoría de los huevos ovulados se quedan atorados en algún punto del oviducto ó el útero y no llegan a ser depositados. Adicionalmente, observamos que el ovopositor de las moscas *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* no es capaz de retraerse después de que se induce su extensión por presión mecánica. Interesantemente, aunque no hay evidencia fisiológica que muestre el efecto de la OA sobre el ovopositor, se ha reportado que esta amina controla el movimiento del agujijón, considerado como una estructura morfológicamente relacionada al ovopositor en la abeja *Apis mellifera* (Burrell y Smith, 1995). Todos estos resultados sugieren que la función de las neuronas octopaminérgicas *bwk<sup>iqs</sup>* es esencial para la modulación de la ovulación, para la regulación del paso de los huevos a través del oviducto y el útero y para el control de su deposición.

Al encontrar que los órganos de almacenamiento del esperma son inervados por las neuronas *bwk<sup>iqs</sup>* decidimos analizar si su desactivación tenía un efecto sobre el almacenamiento de los espermatozoides. Nuestros resultados muestran que la falta de señalización octopaminérgica sobre estos órganos en las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* afecta el control de los espermatozoides así como su almacenamiento (Figura 27). Se ha propuesto que para que se lleve a cabo exitosamente la fertilización del huevo, es necesaria la coordinación correcta entre la ovulación y la liberación de los espermatozoides de los órganos de almacenamiento en la hembra (Bloch Qazi et al., 2003; Chapman et al., 2001). Con base en estos datos sugerimos que el bajo porcentaje de eclosión de los huevos depositados por las hembras *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* (Tabla 2) puede ser el resultado de la ausencia de fertilización

ó por el contrario de polispermia causada por la falta de control sobre el almacenamiento y liberación del espermatozoide.

La inserción *bwk<sup>lqs</sup>* también marca las neuronas octopaminérgicas más anteriores en el GTA, así como las neuronas octopaminérgicas del cerebro (Figura 25). Estas neuronas podrían estar participando como moduladoras directas o indirectas de las neuronas más posteriores que regulan la contracción del oviducto y la función del tracto reproductivo. Otra opción es que algunas de ellas estén involucradas en la recepción de la información proveniente de los órganos sensoriales periféricos que a su vez perciben la información relevante para la etología de la ovoposición, por ejemplo, respondiendo a las proteínas del semen transferidas a la hembra durante la copulación, las cuales inducen el proceso de ovulación y almacenamiento de espermatozoide (Bloch Qazi et al., 2003; Nakayama et al., 1997). Una manera de disecar pequeños subgrupos de las neuronas *bwk<sup>lqs</sup>* para poder caracterizar su papel específico en el control del proceso de ovoposición y almacenamiento del espermatozoide podría ser usando el sistema de expresión en forma de mosaico llamado MARCM por sus siglas en inglés (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker). Este sistema se basa en la recombinación específica mediada por la FLP recombinasa y permite el aislamiento de subconjuntos de neuronas a partir de un grupo mayor (Lee y Luo, 1999).

La OA actúa como neuromodulador, neurotransmisor, y neurohormona en los invertebrados (Roeder, 1999). Considerada como el homólogo funcional de la Noradrenalina en estas especies, la OA, modula muchos aspectos de la fisiología y el comportamiento. Como sus contrapartes noradrenérgicas en los vertebrados, las neuronas octopaminérgicas en el SNC de los invertebrados son pocas en número y llevan a cabo su función mediante la activación de múltiples receptores octopaminérgicos acoplados a proteínas G. En los insectos, la OA modula numerosos blancos dentro del SNC, así como la función de la mayoría de los órganos sensoriales y órganos periféricos, incluyendo los músculos esqueléticos y viscerales (Clark y Lange, 2003; Orchard y Lange, 1985; Roeder, 1999). En la mosca, además de modular la función del tracto reproductivo, la OA regula la locomoción (Hardie et al., 2007; Lyle et al., 2006), la memoria olfativa (Schwaerzel et al., 2003), el desarrollo de la tolerancia al etanol (Scholz, 2005; Scholz et al., 2005) e incluso el comportamiento de agresión en los machos (Certel et al., 2007).

Debido a que la inserción *bwk<sup>iqs</sup>* atrapó casi todas las neuronas octopaminérgicas, las moscas *UAS-TeTxLC; bwk<sup>iqs</sup>* deben presentar alteraciones en prácticamente todos los procesos regulados por la OA.

#### **4. Neuromoduladores que regulan la contracción del oviducto de *Drosophila*.**

El tracto reproductivo femenino de *Drosophila* es un sistema muscular que se contrae de manera coordinada para inducir la ovulación, para regular el almacenamiento y liberación de los espermatozoides, para permitir el paso de los huevos a través del oviducto hasta que estos alcancen el útero, y para controlar la deposición de los huevos fertilizados. A pesar de su importancia obvia para la fertilidad de la mosca se sabe muy poco sobre los mecanismos neurohormonales que regulan estos procesos.

Para analizar de manera específica el papel de algunos neuromoduladores sobre la contracción del oviducto de *Drosophila*, nosotros desarrollamos preparaciones del tracto reproductivo femenino adherido al nervio abdominal, cuya actividad in vitro se podía registrar videométricamente. Esto nos permitió caracterizar por primera vez el proceso de contracción del oviducto silvestre de *Drosophila* inducido por estimulación nerviosa. Nuestros experimentos muestran que la contracción del oviducto evocada por estimulación eléctrica a 10 Hz está compuesta por varias contracciones musculares individuales (CMI) secuenciales (Figura 28B), las cuales describen un fenómeno de sumación no lineal, en el cual la contracción producida por un segundo estímulo no es igual en amplitud a la producida por el primer estímulo eléctrico causando así un aumento en la contracción del músculo a lo largo del tiempo que eventualmente llega al máximo de contracción posible (Baudry et al., 2005; Stein y Parmiggiani, 1981). Después de alcanzar la máxima razón de contracción muscular (pico de tetanización) el oviducto entra a la fase de fatiga y se relaja, aún cuando la estimulación nerviosa continúe (Figura 28B). Se han propuesto varios mecanismos para explicar la fatiga muscular (Fitts, 1994). Sin embargo, no se tiene información acerca de como neuromoduladores específicos podrían estar regulando las causas potenciales de la fatiga muscular. Dos de los neuromoduladores conocidos que regulan la contracción del oviducto en los insectos son la amina biogénica OA y su antagonista funcional, el pentapéptido proctolina (Lange y Nykamp, 1996; Nykamp y Lange, 2000). Sabiendo que las neuronas *bwk<sup>iqs</sup>* son octopaminérgicas, decidimos estudiar la respuesta del oviducto silvestre de *Drosophila* después de la adición de OA y/o de su antagonista. Consistentemente con lo

reportado en *Locusta*, encontramos que la OA inhibe la contracción del oviducto de *Drosophila* mientras que la proctolina aumenta la habilidad de este tejido para contraerse (Figura 28). Sorprendentemente, la adición de proctolina afecta fuertemente la fase de fatiga del oviducto estimulado eléctricamente aún cuando este pentapéptido induce normalmente una razón de contracción mayor (Figura 28C). La similitud entre la razón de contracción máxima de los oviductos silvestres inducida por la estimulación eléctrica en presencia de proctolina (Figura 28C) y la observada por la estimulación con Glu (Figura 29D), nos permite especular que la proctolina podría estar incrementando la razón de contracción máxima al potenciar la liberación de Glu presináptico durante la estimulación eléctrica. Esta idea es consistente con el incremento en el número promedio de contracciones musculares individuales (N) observadas en los oviductos silvestres estimulados eléctricamente en presencia de proctolina (Tabla 3), considerando a N como una medida de la actividad contráctil muscular inducida por la liberación de Glu. Sin embargo, el efecto de la proctolina en la fase de fatiga del oviducto es claramente un fenómeno más complicado que se debe estudiar. Diferentes estudios han sugerido que en los mamíferos, la fatiga muscular depende del número de excitaciones de la fibra muscular y/o de la frecuencia del estímulo (Ward y Robertson, 2000). En los humanos, la fatiga muscular incrementa con el número de estímulos (Garland et al., 1988). Contrariamente, encontramos que en los oviductos silvestres la fatiga se retrasa a pesar de que la proctolina incrementa el número de contracciones individuales (Figura 28C). Este resultado sugiere que el efecto de la proctolina en la fase de fatiga se debe a un estímulo químico más que a uno de naturaleza eléctrica. Es necesario realizar un estudio más detallado para elucidar los posibles efectos de la proctolina.

De manera consistente con los estudios realizados en *Locusta* (Nykamp y Lange, 2000) encontramos que en la mosca la OA puede inhibir parcialmente el incremento de la contracción del oviducto inducido por proctolina (Figura 28D). En la presencia de OA/proctolina, el valor de N es estadísticamente similar al del control, pero la máxima razón de contracción muscular disminuye (Tabla 3). Por lo tanto, la baja actividad de contracción podría estar contribuyendo a la eliminación de la fase de fatiga y al establecimiento del estado de contractura observado en los oviductos bajo esta condición (Figura 28D). Sin embargo, esta pequeña contracción sostenida inducida por proctolina es totalmente eliminada cuando se agrega OA más IBMX, un inhibidor de las fosfodiesterasas (Figura 28D). Estos resultados confirman la importancia de la OA y la vía del AMPc en la neuromodulación de la

contracción del oviducto en *Drosophila*. Y nos permiten proponer que en el tracto reproductivo de los insectos la OA es un neuromodulador central que induce la fase de fatiga en el músculo del oviducto para permitir que los huevos se desplacen a través de este. A diferencia de lo observado en el oviducto, la OA incrementa la amplitud de las contracciones espontáneas de la membrana peritoneal en la base de los ovarios de la mosca, las cuales se cree que podrían estar involucradas en la inducción de la ovulación (Middleton et al., 2006). Nosotros encontramos que las neuronas octopaminérgicas *bwk<sup>tqs</sup>* inervan el útero de las hembras, esto sugiere que la OA debe estar participando en la regulación de sus contracciones para la expulsión de los huevos fertilizados, sin embargo no se conoce el efecto de la OA sobre este órgano. Aunque la incapacidad de las moscas *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* para retraer el ovopositor indica que la liberación de OA de las neuronas *bwk<sup>tqs</sup>* es necesaria para este proceso desconocemos el papel específico que tiene esta amina sobre el mismo. Nuestros resultados indican que las neuronas octopaminérgicas *bwk<sup>tqs</sup>* inervan los órganos de almacenamiento del esperma (Figura 26D), y que la liberación de OA de estas neuronas también es esencial para el correcto almacenamiento del esperma en la mosca (Figura 27). No obstante estas evidencias, también desconocemos el mecanismo por el cual la OA regula dicho proceso. Se ha reportado que la OA modula la contracción de los músculos de la spermateca en *Locusta*, probablemente controlando de esta manera el almacenamiento del esperma (Clark y Lange, 2003). De manera similar, en la mosca la OA podría estar afectando la contracción de los órganos de almacenamiento para regular el almacenamiento del esperma. Por otro lado, se ha reportado que existe una barrera de composición desconocida en la base del oviducto que mantiene al esperma dentro del útero. Cuando esta barrera se deslocaliza o no se forma los espermatozoides llegan hasta los oviductos laterales y el oviducto común (Bloch Qazi et al., 2003). Debido a que en las moscas *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* se observa una distribución de los espermatozoides similar a la reportada por la falta de formación de la barrera en el oviducto, otra posibilidad que no es excluyente de la primera, es que la OA liberada por las neuronas *bwk<sup>tqs</sup>* sobre el oviducto también esté involucrada en la estimulación de la secreción de los componentes de dicha barrera.

Aunque en *Drosophila* existe una gran variedad de receptores octopaminérgicos (Balfanz et al., 2005; Han et al., 1998; Maqueira et al., 2005), en el tracto reproductivo solo se ha demostrado la expresión del receptor octopaminérgico OAMB (Lee et al., 2003). La existencia de múltiples receptores en la mosca sugiere que la respuesta específica de las

diferentes regiones del tracto reproductivo como el oviducto y la membrana peritoneal a la OA, podría ser una consecuencia de la expresión diferencial de los distintos tipos de receptores octopaminérgicos.

En conclusión, la OA podría estar actuando a través de receptores tejido específico para inducir la contracción de los ovarios y liberar los ovocitos maduros y al mismo tiempo para relajar el oviducto para el paso de los huevos a través de este. Simultáneamente, el efecto de la OA mediado por los receptores específicos podría estar regulando el almacenamiento y liberación del esperma de los respectivos órganos para garantizar la correcta fertilización de los huevos en el útero, y finalmente controlando su ovoposición.

En el insecto *Locusta* existen otros neuromoduladores ó neurohormonas que afectan la contracción muscular del tracto reproductivo. Entre estos se encuentran las aminas biogénicas tiramina y serotonina, los péptidos relacionados a la FMRFamida (FaRPs), el péptido cardioactivo de crustáceo (CCAP) y las locustataquicininas (Lange y da Silva, 2007). Si bien todas estas sustancias están presentes en la mosca (Lundell y Hirsh, 1994; Nässel, 2002), con excepción de la tiramina no se ha reportado la participación de ninguna de ellas en el control de la función del tracto reproductivo.

La tiramina tiene un claro efecto inhibitorio sobre la frecuencia y amplitud de las contracciones espontáneas del oviducto de *Locusta*. Se tiene evidencia que indica que la tiramina debe actuar a través de dos tipos de receptores en el oviducto de *Locusta*. En dosis bajas, la tiramina incrementa la amplitud de los potenciales de unión excitatorios evocados neuralmente. Mientras que dosis altas de tiramina reproducen los efectos inhibitorios de la OA, pero de manera independiente del AMP cíclico (Donini y Lange, 2004). Resultados preliminares muestran que la tiramina, al igual que la OA, incrementa la frecuencia de las contracciones espontáneas y el tono basal de la espermateca de *Locusta* (Lange y da Silva, 2007).

Al parecer, la tiramina también funciona como un neuromodulador independiente en la mosca. Esta amina inhibe la amplitud de los potenciales de unión excitatorios en la pared del cuerpo de la larva (Nagaya et al., 2002). Las hembras con una mutación en el gen que codifica para la enzima tirosina descarboxilasa (TDC), que sintetiza la tiramina, no producen tiramina ni OA y son estériles debido a un fenotipo de retención de huevos. Si bien las hembras *Tβh<sup>vM18</sup>* que son incapaces de ovular muestran niveles anormalmente altos de tiramina neural, la ovulación parece normal en las hembras *Tdc2<sup>RO54</sup>* que carecen de tiramina



neural. Sin embargo los huevos se retienen en el oviducto de estas hembras y no se depositan. El patrón de expresión de la inserción *dTdc2-GAL4* es muy similar al de las neuronas TBH y al de la inserción *P(GAL4) bwk<sup>tqs</sup>*. Las neuronas *dTdc2-GAL4* están localizadas en el ganglio abdominal e inervan la región posterior de los ovarios, el cáliz, los oviductos laterales y el oviducto común (Cole et al., 2005). A partir de estos resultados se ha propuesto que la tiramina es, por si misma, un modulador del proceso de ovoposición en la mosca. Sin embargo, dos evidencias independientes sugieren que si la tiramina realmente regula la contracción de los ovarios y el oviducto su efecto debe ser sutil. Primero, la tiramina no tiene efectos significativos sobre la amplitud y la frecuencia de las contracciones de la membrana peritoneal de los ovarios (Middleton et al., 2006). Segundo, la adición simultánea de Glu y OA es suficiente para rescatar la contracción silvestre de los oviductos “tetanizados” por la desactivación de las neuronas que expresan Glu/OA y que inervan el oviducto (Figura 29D). No se ha reportado la participación de la tiramina en el control de los órganos de almacenamiento, pero la inervación de estos órganos por las neuronas octopaminérgicas *bwk<sup>tqs</sup>* y en consecuencia por las neuronas tiraminérgicas, así como la evidencia reportada en *Locusta* sugiere un posible papel para esta amina en la regulación de su contracción.

### **5. Las neuronas octopaminérgicas *bwk<sup>tqs</sup>* constituyen la inervación glutamatérgica que regula la contracción del oviducto de *Drosophila*.**

Tres evidencias sugieren fuertemente que de manera similar a lo reportado en la unión neuromuscular de la larva de *Drosophila*, las terminales sinápticas *bwk<sup>tqs</sup>* de tipo II que inervan el oviducto de la mosca adulta coexpresan Glu y OA. Primero, logramos reconstituir farmacológicamente la contracción silvestre de los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* mediante la adición simultánea de OA y Glu (Figura 29D). Segundo, la adición de un agonista o un antagonista del receptor de Glu afecta la contracción de los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* (Figura 29E). Tercero, el receptor de glutamato GluR IIA colocaliza con las terminales sinápticas *bwk<sup>tqs</sup>* GFP positivas en el oviducto lateral y en el oviducto común de la mosca (Figura 30). El uso del Acido L-quisquálico como un agonista selectivo para los receptores de Glu de tipo AMPA y de tipo metabotrópicos sustenta la participación de esta clase de receptores en la generación de la respuesta del oviducto al Glu. Aunque observamos la presencia del receptor GluR IIA en el oviducto, no se descarta la presencia de otro tipo de receptores.

Aunque existen datos que sugieren la presencia de terminales sinápticas de tipo I glutamatergicas y de tipo II octopaminérgicas sobre algunas regiones del tracto reproductivo de la mosca (Middleton et al., 2006), nuestros resultados indican que las neuronas *bwk<sup>tqs</sup>* que lo inervan son tanto glutamatergicas como octopaminérgicas (Figura 29). Debido a que se ha reportado que las terminales torácicas de tipo II no son glutamatergicas en las moscas adultas (Rivlin et al., 2004), nuestros resultados sugieren que el proceso de maduración de la unión neuromuscular en *Drosophila* es diferente en las regiones torácicas y abdominales. Considerando que la desactivación de las neuronas *bwk<sup>tqs</sup>* elimina al rededor del 70% de la respuesta del oviducto a la estimulación eléctrica, nosotros proponemos el siguiente modelo (Figura 31). La OA y el glutamato se liberan simultáneamente de las terminales sinápticas *bwk<sup>tqs</sup>* cuando el nervio que se proyecta hacia el oviducto es estimulado. Postsinápticamente, el Glu induce la contracción del oviducto y la OA modula la respuesta a este, vía el AMPc. La pequeña contracción observada en los oviductos *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* puede ser interpretada como un incremento en el tono muscular que prepara al oviducto para un ciclo completo de contracción. Este aumento en el tono muscular posiblemente correlaciona con la pequeña despolarización, incapaz de inducir un potencial de acción, observada en el potencial del músculo cuando se estimulan los oviductos desactivados *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>*. El incremento en el tono muscular, sugiere fuertemente que la proctolina se puede producir y liberar de un grupo diferente de neuronas ya que es insensible a la desactivación de las neuronas *bwk<sup>tqs</sup>*. En este modelo, la OA funcionaría como un antagonista de Glu y proctolina, y su liberación promovería la fatiga muscular o la relajación. La liberación simultanea de OA y Glu fue probablemente seleccionada porque la señal octopaminérgica es más lenta que la glutamatergica lo que permite que el músculo se contraiga antes de entrar en fatiga proporcionando un mecanismo simple pero robusto para inducir fatiga en el momento correcto después de la contracción, eliminando así, la necesidad de una liberación continua y pulsátil de neurotransmisor, garantizando que una vez que el huevo empieza a ser puesto, el proceso llegue a ser irreversible.

En conclusión, el uso de un sistema genético como el que desarrollamos en este trabajo nos permitió reevaluar el modelo previamente descrito de la contracción del oviducto, que proponía que las neuronas excitatorias que controlan la contracción del oviducto de *Locusta* coexpresan proctolina y Glu (Lange y Nykamp, 1996). A pesar de estas diferencias aparentes con respecto a la identidad de las neuronas que inervan el oviducto de *Drosophila*,

las evidencias sugieren que el papel de estas sustancias neuroactivas en el oviducto de ambos insectos está conservado.

Además, nuestros datos demuestran que la mosca de la fruta ofrece ventajas experimentales para estudiar la fisiología de procesos complejos como la fertilidad. En este trabajo presentamos un paradigma que nos permite estudiar grupos de neuronas funcionales, de una manera integral que incluye aspectos de genética, desarrollo, morfología y fisiología. En un futuro, este tipo de aproximación nos permitirá entender la dinámica de las redes neurales y el papel de los neuromoduladores y de sus receptores en el comportamiento.

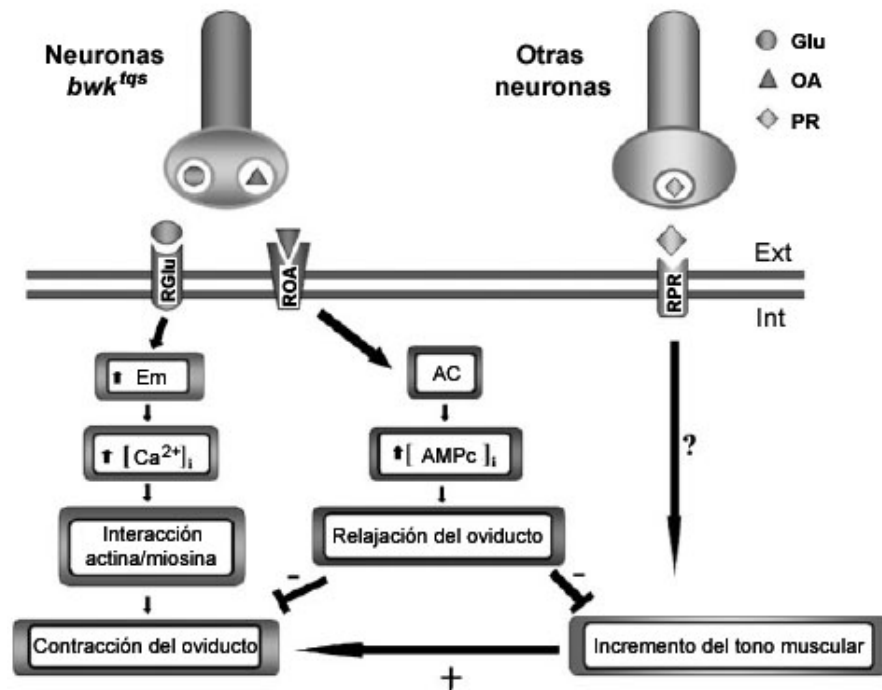


Figura 31. **Modelo que describe el posible papel del neurotransmisor excitatorio Glu y los neuromoduladores proctolina y OA en la contracción del oviducto de *Drosophila*.** El Glu y la OA son liberados por las terminales sinápticas *bwk<sup>tgs</sup>* que inervan el oviducto. El Glu induce un potencial de acción en el músculo del oviducto. Esta respuesta es rápida y genera una serie de CMI que resultan en un proceso de contracción muscular clásica. Simultáneamente, la OA estimula la producción de AMPc. La cascada de señalización del AMPc es lenta y sus efectos son aparentes hasta después de varios segundos, cuando la señal del AMPc es lo suficientemente grande para inducir la relajación muscular o la fatiga. La proctolina liberada por terminales sinápticas independientes incrementa el tono muscular y potencia la contracción del oviducto. La OA inhibe la contracción del oviducto al antagonizar el efecto inductor de la contracción del Glu y la proctolina.

## PERSPECTIVAS

- Proseguir con la caracterización de las líneas aisladas que muestran un fenotipo específico causado por la desactivación neuronal y un patrón de expresión neuronal restringido en el SNC.
- Realizar experimentos videométricos estimulando el nervio que inerva el oviducto antes y después de la aplicación de bloqueadores de los receptores de glutamato para corroborar que las neuronas *bwk<sup>tqs</sup>* inducen la contracción del oviducto al liberar este neurotransmisor.
- Determinar la presencia de otros receptores de Glu en el tracto reproductivo.
- Comprobar que la proctolina se produce en neuronas independientes del grupo neuronal octopaminérgico *bwk<sup>tqs</sup>*.
- Determinar el efecto presináptico y postsináptico de la OA y la proctolina en la unión neuromuscular de la mosca adulta.
- Investigar el papel específico de las neuronas *bwk<sup>tqs</sup>* en el control del almacenamiento del esperma y analizar su efecto sobre la fertilización de los huevos.
- Disecar el ó los subgrupos de neuronas esenciales para la regulación de los procesos de ovoposición y almacenamiento del esperma, mediante el empleo de un sistema de expresión en forma de mosaico (MARCM).
- Identificar otros componentes del circuito neural involucrado en el control del tracto reproductivo, como las neuronas centrales que señalizan a las neuronas *bwk<sup>tqs</sup>*, usando un reportero que pasa a través de las sinapsis tanto retrógrada como anterógradamente.
- Evaluar el efecto de la desactivación de las neuronas octopaminérgicas *bwk<sup>tqs</sup>* en otros procesos fisiológicos en la mosca.

## REFERENCIAS

- Aigaki, T., Fleischmann, I., Chen, P. S., y Kubli, E.** (1991). Ectopic expression of sex peptide alters reproductive behavior of female *D. melanogaster*. *Neuron* **7**, 557-63.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402.
- Arthur, B. I. J., Hauschteck-Jungen, E., Nothiger, R., y Ward, P. I.** (1998). A female nervous system is necessary for normal sperm storage in *Drosophila melanogaster*: a masculinized nervous system is as good as none. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **265**, 1749-1753.
- Ashburner, M.** (1989). *Drosophila: A laboratory handbook*. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Baines, R. A., Robinson, S. G., Fujioka, M., Jaynes, J. B., y Bate, M.** (1999). Postsynaptic expression of tetanus toxin light chain blocks synaptogenesis in *Drosophila*. *Curr Biol* **9**, 1267-70.
- Baker, B. S., Taylor, B. J., y Hall, J. C.** (2001). Are complex behaviors specified by dedicated regulatory genes? Reasoning from *Drosophila*. *Cell* **105**, 13-24.
- Balfanz, S., Strunker, T., Frings, S., y Baumann, A.** (2005). A family of octopamine [corrected] receptors that specifically induce cyclic AMP production or Ca<sup>2+</sup> release in *Drosophila melanogaster*. *J Neurochem* **93**, 440-51.
- Baudry, S., Klass, M., y Duchateau, J.** (2005). Postactivation potentiation influences differently the nonlinear summation of contractions in young and elderly adults. *J Appl Physiol* **98**, 1243-50.
- Bertram, M. J., Neubaum, D. M., y Wolfner, M. F.** (1996). Localization of the *Drosophila* male accessory gland protein Acp36DE in the mated female suggests a role in sperm storage. *Insect Biochem Mol Biol* **26**, 971-80.
- Bier, E.** (2005). *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet* **6**, 9-23.
- Bloch Qazi, M. C., Heifetz, Y., y Wolfner, M. F.** (2003). The developments between gametogenesis and fertilization: ovulation and female sperm storage in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **256**, 195-211.
- Bottjer, S. W.** (1997). Building a bird brain: sculpting neural circuits for a learned behavior. *Bioessays* **19**, 1109-1116.
- Brand, A. H. y Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Budnik, V. y Gorczyca, M.** (1992). SSB, an antigen that selectively labels morphologically distinct synaptic boutons at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *J Neurobiol* **23**, 1054-65.
- Budnik, V., Martin-Morris, L., y White, K.** (1986). Perturbed pattern of catecholamine-containing neurons in mutant *Drosophila* deficient in the enzyme dopa decarboxylase. *J Neurosci* **6**, 3682-91.
- Burrel, B. D. y Smith, B. H.** (1995). Modulation of the honey bee (*Apis mellifera*) sting response by octopamine. *J Insect Physiol* **41**, 671-680.

- Buszczak, M., Freeman, M. R., Carlson, J. R., Bender, M., Cooley, L., y SeGRAves, W. A.** (1999). Ecdysone response genes govern egg chamber development during mid-oogenesis in *Drosophila*. *Development* **126**, 4581-9.
- Carney, G. E. y Taylor, B. J.** (2003). Logjam encodes a predicted EMP24/GP25 protein that is required for *Drosophila* oviposition behavior. *Genetics* **164**, 173-86.
- Certel, S., Savella, M., Schlegel, D., y Kravitz, E.** (2007). Modulation of *Drosophila* male behavioral choice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4706-4711.
- Clark, J. y Lange, A. B.** (2002a). The association of serotonin with the spermatheca of the locust, *Locusta migratoria*. *Biogenic Amines* **17**, 43-60.
- Clark, J. y Lange, A. B.** (2002b). Evidence for the association of FMRFamide-related peptides with the spermatheca of *Locusta migratoria*. *Peptides* **23**, 613-9.
- Clark, J. y Lange, A. B.** (2003). Octopamine modulates spermathecal muscle contractions in *Locusta migratoria*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **189**, 105-14.
- Cole, S. H., Carney, G. E., McClung, C. A., Willard, S. S., Taylor, B. J., y Hirsh, J.** (2005). Two functional but noncomplementing *Drosophila* tyrosine decarboxylase genes: distinct roles for neural tyramine and octopamine in female fertility. *J Biol Chem* **280**, 14948-55.
- Chapman, E. R.** (2002). Synaptotagmin: a Ca<sup>2+</sup> sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 498-508.
- Chapman, T., Bangham, J., Vinti, G., Seifried, B., Lung, O., Wolfner, M. F., Smith, H. K., y Partridge, L.** (2003). The sex peptide of *Drosophila melanogaster*: female post-mating responses analyzed by using RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9923-8.
- Chapman, T., Herndon, L. A., Heifetz, Y., Partridge, L., y Wolfner, M. F.** (2001). The Acp26Aa seminal fluid protein is a modulator of early egg hatchability in *Drosophila melanogaster*. *Proc Biol Sci* **268**, 1647-54.
- de Belle, J. S. y Heisenberg, M.** (1994). Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* **263**, 692-5.
- Dewey, E. M., McNabb, S. L., Ewer, J., Kuo, G. R., Takanishi, C. L., Truman, J. W., y Honegger, H. W.** (2004). Identification of the gene encoding bursicon, an insect neuropeptide responsible for cuticle sclerotization and wing spreading. *Curr Biol* **14**, 1208-13.
- Donini, A., Agricola, H., y Lange, A. B.** (2001). Crustacean cardioactive peptide is a modulator of oviduct contractions in *Locusta migratoria*. *J Insect Physiol* **47**, 277-285.
- Donini, A. y Lange, A. B.** (2004). Evidence for a possible neurotransmitter/neuromodulator role of tyramine on the locust oviducts. *J Insect Physiol* **50**, 351-61.
- Duffy, J. B.** (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* **34**, 1-15.
- Finley, K. D., Taylor, B. J., Milstein, M., y McKeown, M.** (1997). dissatisfaction, a gene involved in sex-specific behavior and neural development of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 913-8.
- Fitts, R. H.** (1994). Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiol Rev* **74**, 49-94.
- Fristrom, D. y Fristrom, J.** (1993). The Metamorphic Development of the adult epidermis. In *The Development of Drosophila melanogaster*, vol. 2 (ed. M. Bate and A. Martinez-Arias). Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Fuller, M.** (1993). Spermatogenesis. In *The Development of Drosophila melanogaster*, vol. 1 (ed. M. Bate and A. Martinez-Arias). Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Garland, S. J., Garner, S. H., y McComas, A. J.** (1988). Relationship between numbers and frequencies of stimuli in human muscle fatigue. *J Appl Physiol* **65**, 89-93.
- Gill, K.** (1963). A mutation causing abnormal courtship and mating behavior in males of *Drosophila melanogaster*. *A. Zool.* **3**, 507.
- Goff, D. J., Nilson, L. A., y Morisato, D.** (2001). Establishment of dorsal-ventral polarity of the *Drosophila* egg requires capicua action in ovarian follicle cells. *Development* **128**, 4553-62.
- Greenspan, R. J.** (1995). Understanding the genetic construction of behavior. *Sci Am* **272**, 72-8.
- Greenspan, R. J. y Ferveur, J. F.** (2000). Courtship in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* **34**, 205-232.
- Gronenberg, W.** (1996). The trap-jaw mechanism in the dacetine ants *Daceton armigerum* and *Strumigenys* sp. *J Exp Biol* **199**, 2021-33.
- Han, K. A., Millar, N. S., y Davis, R. L.** (1998). A novel octopamine receptor with preferential expression in *Drosophila* mushroom bodies. *J Neurosci* **18**, 3650-8.
- Han, P. L., Meller, V., y Davis, R. L.** (1996). The *Drosophila* brain revisited by enhancer detection. *J Neurobiol* **31**, 88-102.
- Hardie, S. L., Zhang, J. X., y Hirsh, J.** (2007). Trace amines differentially regulate adult locomotor activity, cocaine sensitivity, and female fertility in *Drosophila melanogaster*. *Develop Neurobiol* **67**, 1396-1405.
- Hartenstein, V.** (1993). Atlas of *Drosophila* development. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hazelrigg, T.** (2000). GFP and Other Reporters In *Drosophila protocols*, (ed. W. Sullivan M. Ashburner and R. S. Hawley). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Heifetz, Y., Lung, O., Frongillo, E. A., Jr., y Wolfner, M. F.** (2000). The *Drosophila* seminal fluid protein Acp26Aa stimulates release of oocytes by the ovary. *Curr Biol* **10**, 99-102.
- Heifetz, Y., Tram, U., y Wolfner, M. F.** (2001). Male contributions to egg production: the role of accessory gland products and sperm in *Drosophila melanogaster*. *Proc Biol Sci* **268**, 175-80.
- Heimbeck, G., Bugnon, V., Gendre, N., Haberlin, C., y Stocker, R. F.** (1999). Smell and taste perception in *Drosophila melanogaster* larva: toxin expression studies in chemosensory neurons. *J Neurosci* **19**, 6599-609.
- Heisenberg, M., Borst, A., Wagner, S., y Byers, D.** (1985). *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J Neurogenet* **2**, 1-30.
- Herndon, L. A. y Wolfner, M. F.** (1995). A *Drosophila* seminal fluid protein, Acp26Aa, stimulates egg laying in females for 1 day after mating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10114-8.
- Hiesinger, P. R., Reiter, C., Schau, H., y Fischbach, K. F.** (1999). Neuropil pattern formation and regulation of cell adhesion molecules in *Drosophila* optic lobe development depend on synaptobrevin. *J Neurosci* **19**, 7548-56.
- Huang, A. M., Rehm, E. J., y Rubin, G. M.** (2000). Recovery of DNA Sequences Flanking P-element Insertions: Inverse PCR and Plasmid Rescue In *Drosophila protocols*, (ed. W. Sullivan M. Ashburner and R. S. Hawley). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Ito, K., Suzuki, K., Estes, P., Ramaswami, M., Yamamoto, D., y Strausfeld, N. J.** (1998). The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn Mem* **5**, 52-77.
- Jan, L. Y. y Jan, Y. N.** (1976). L-glutamate as an excitatory transmitter at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *J Physiol* **262**, 215-36.
- Jimenez, G., Guichet, A., Ephrussi, A., y Casanova, J.** (2000). Relief of gene repression by torso RTK signaling: role of capicua in *Drosophila* terminal and dorsoventral patterning. *Genes Dev* **14**, 224-31.
- Kaneko, M., Park, J. H., Cheng, Y., Hardin, P. E., y Hall, J. C.** (2000). Disruption of synaptic transmission or clock-gene-product oscillations in circadian pacemaker cells of *Drosophila* cause abnormal behavioral rhythms. *J Neurobiol* **43**, 207-33.
- Kubli, E.** (1992). The sex-peptide. *Bioessays* **14**, 779-84.
- Kwok, R., Nassel, D. R., Lange, A. B., y Orchard, I.** (1999). Locustatachykinin isoforms in the locust: distribution and quantification in the central nervous system and action on the oviduct muscle. *Peptides* **20**, 687-94.
- Lange, A. B.** (1988). Inositol phospholipid hydrolysis may mediate the action of proctolin on insect visceral muscle. *Arch Insect Biochem Physiol* **1**, 201-209.
- Lange, A. B.** (1993). The association of proctolin with the spermatheca of the locust, *Locusta migratoria*. *J Insect Physiol* **39**, 517-522.
- Lange, A. B.** (2002). A review of the involvement of proctolin as a cotransmitter and local neurohormone in the oviduct of the locust, *Locusta migratoria*. *Peptides* **23**, 2063-70.
- Lange, A. B. y da Silva, R.** (2007). Neural and hormonal control of muscular activity of the spermatheca in the locust, *Locusta migratoria*. *Peptides* **28**, 174-84.
- Lange, A. B. y Nykamp, D. A.** (1996). Signal transduction pathways regulating the contraction of an insect visceral muscle. *Arch Insect Biochem Physiol* **33**, 183-196.
- Lange, A. B., O'Kane, C. J., y Lam, W.** (1987). Mode of action of proctolin on locust visceral muscle. *Arch Insect Biochem Physiol* **5**, 285-295.
- Lange, A. B., Orchard, I., y M.E., A.** (1986). Peptidergic innervation of insect reproductive tissue: The association of proctolin with oviduct visceral musculature. *J Comp Neurol* **254**, 279-286.
- Lange, A. B., Orchard, I., y Te Brugge, V. A.** (1991). Evidence for the involvement of a Schisto-FLRFamide-like peptide in the nueral control of locust oviduct. *Comp Biochem Physiol A* **168**, 383-391.
- Lange, A. B. y Tsang, P. K. C.** (1993). Biochemical and physiological effects of octopamine and selected octopamine agonists on the oviducts of *Locusta migratoria*. *J Insect Physiol* **39**, 393-400.
- Lee, C. J., Chan, W. I., Cheung, M., Cheng, Y. C., Appleby, V. J., Orme, A. T., y Scotting, P. J.** (2002). CIC, a member of a novel subfamily of the HMG-box superfamily, is transiently expressed in developing granule neurons. *Brain Res Mol Brain Res* **106**, 151-6.
- Lee, H. G., Seong, C. S., Kim, Y. C., Davis, R. L., y Han, K. A.** (2003). Octopamine receptor OAMB is required for ovulation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **264**, 179-90.
- Lee, T. y Luo, L.** (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-61.



- Levine, R. B. y Truman, J. W.** (1983). Peptide activation of a simple neural circuit. *Brain Res* **279**, 335-8.
- Leyssen, M. y Hassan, B. A.** (2007). A fruitfly's guide to keeping the brain wired. *EMBO Rep* **8**, 46-50.
- Li, H., Chaney, S., Roberts, I. J., Forte, M., y Hirsh, J.** (2000). Ectopic G-protein expression in dopamine and serotonin neurons blocks cocaine sensitization in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* **10**, 211-4.
- Lindsley, D. L. y Zimm, G. G.** (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. San Diego, California: Academic Press.
- Liu, H. y Kubli, E.** (2003). Sex-peptide is the molecular basis of the sperm effect in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9929-33.
- Liu, L., Wolf, R., Ernst, R., y Heisenberg, M.** (1999). Context generalization in *Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies. *Nature* **400**, 753-6.
- Lundell, M. J. y Hirsh, J.** (1994). Temporal and spatial development of serotonin and dopamine neurons in the *Drosophila* CNS. *Dev Biol* **165**, 385-96.
- Lung, O. y Wolfner, M. F.** (1999). *Drosophila* seminal fluid proteins enter the circulatory system of the mated female fly by crossing the posterior vaginal wall. *Insect Biochem Mol Biol* **29**, 1043-52.
- Lyle, E. F., David, R. S., y Chun-Fang, W.** (2006). Coordination and modulation of locomotion pattern generators in *Drosophila* larvae: effects of altered biogenic amine levels by the Tyramine  $\beta$  Hydroxylase mutation *J Neurosci* **26**, 1486-1498.
- Maqueira, B., Chatwin, H., y Evans, P. D.** (2005). Identification and characterization of a novel family of *Drosophila* beta-adrenergic-like octopamine G-protein coupled receptors. *J Neurochem* **94**, 547-60.
- Martin, J. R., Ernst, R., y Heisenberg, M.** (1999a). Temporal pattern of locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol [A]* **184**, 73-84.
- Martin, J. R., Raabe, T., y Heisenberg, M.** (1999b). Central complex substructures are required for the maintenance of locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol [A]* **185**, 277-88.
- McGuire, S. E., Mao, Z., y Davis, R. L.** (2004). Spatiotemporal gene expression targeting with the TARGET and gene-switch systems in *Drosophila*. *Sci STKE* **2004**, pl6.
- Middleton, C. A., Nongthomba, U., Parry, K., Sweeney, S. T., Sparrow, J. C., y Elliott, C. J.** (2006). Neuromuscular organization and aminergic modulation of contractions in the *Drosophila* ovary. *BMC Biol* **4**, 17.
- Miller, A.** (1950). The internal Anatomy and Histology of the Imago of *Drosophila melanogaster* In *Biology of Drosophila*, (ed. M. Demerec). New York: John Wiley and Sons.
- Monastirioti, M.** (2003). Distinct octopamine cell population residing in the CNS abdominal ganglion controls ovulation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **264**, 38-49.
- Monastirioti, M., Gorczyca, M., Rapus, J., Eckert, M., White, K., y Budnik, V.** (1995). Octopamine immunoreactivity in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* **356**, 275-87.
- Monastirioti, M., Linn, C. E., Jr., y White, K.** (1996). Characterization of *Drosophila* tyramine beta-hydroxylase gene and isolation of mutant flies lacking octopamine. *J Neurosci* **16**, 3900-11.
- Moshitzky, P., Fleischmann, I., Chaimov, N., Saudan, P., Klausner, S., Kubli, E., y Applebaum, S. W.** (1996). Sex-peptide activates juvenile hormone biosynthesis in the *Drosophila melanogaster* corpus allatum. *Arch Insect Biochem Physiol* **32**, 363-74.

- Nagaya, Y., Kutsukake, M., Chigusa, S. I., y Komatsu, A.** (2002). A trace amine, tyramine, functions as a neuromodulator in *Drosophila melanogaster*. *Neurosci Lett* **329**, 324-8.
- Nakayama, S., Kaiser, K., y Aigaki, T.** (1997). Ectopic expression of sex-peptide in a variety of tissues in *Drosophila* females using the P[GAL4] enhancer-trap system. *Mol Gen Genet* **254**, 449-55.
- Nassel, D. R.** (1996). Neuropeptides, amines and amino acids in an elementary insect ganglion: functional and chemical anatomy of the unfused abdominal ganglion. *Prog Neurobiol* **48**, 325-420.
- Nässel, D. R.** (2002). Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Prog Neurobiol* **68**, 1-84.
- Nassif, C., Noveen, A., y Hartenstein, V.** (1998). Embryonic development of the *Drosophila* brain. I. Pattern of pioneer tracts. *J Comp Neurol* **402**, 10-31.
- Nation, J. L.** (2002). *Insect physiology and biochemistry*. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC.
- Neubaum, D. M. y Wolfner, M. F.** (1999a). Mated *Drosophila melanogaster* females require a seminal fluid protein, Acp36DE, to store sperm efficiently. *Genetics* **153**, 845-57.
- Neubaum, D. M. y Wolfner, M. F.** (1999b). Wise, winsome, or weird? Mechanisms of sperm storage in female animals. *Curr Top Dev Biol* **41**, 67-97.
- Nishikawa, K. y Kidokoro, Y.** (1999). Octopamine inhibits synaptic transmission at the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. *Brain Res* **837**, 67-74.
- Nykamp, D. A. y Lange, A. B.** (1998). The effects of octopamine are mediated via a G protein in the oviducts of *Locusta migratoria*. *Biogenic Amines* **14**, 177-190.
- Nykamp, D. A. y Lange, A. B.** (2000). Interaction between octopamine and proctolin on the oviducts of *Locusta migratoria*. *J Insect Physiol* **46**, 809-816.
- Nykamp, D. A., Lydan, M. A., O'Day, D. H., y Lange, A. B.** (1994). Calmodulin mediates contraction of the oviducts of *Locusta migratoria*. *Insect Biochem Mol Biol* **24**, 507-516.
- O'Kane, C. J. y Gehring, W. J.** (1987). Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 9123-7.
- Orchard, I. y Lange, A. B.** (1985). Evidence for octopaminergic modulation of an insect visceral muscle. *J Neurobiol* **16**, 171-81.
- Orchard, I. y Lange, A. B.** (1986). Neuromuscular transmission in an insect visceral muscle. *J Neurobiol* **17**, 359-72.
- Ottiger, M., Soller, M., Stocker, R. F., y Kubli, E.** (2000). Binding sites of *Drosophila melanogaster* sex peptide pheromones. *J Neurobiol* **44**, 57-71.
- Park, J. H., Schroeder, A. J., Helfrich-Forster, C., Jackson, F. R., y Ewer, J.** (2003). Targeted ablation of CCAP neuropeptide-containing neurons of *Drosophila* causes specific defects in execution and circadian timing of ecdysis behavior. *Development* **130**, 2645-56.
- Parmiggiani, F. y Stein, R. B.** (1981). Nonlinear summation of contractions in cat muscles. II. Later facilitation and stiffness changes. *J Gen Physiol* **78**, 295-311.
- Peeff, N. M., Orchard, I., y Lange, A. B.** (1993). The effects of FMRFamide-related peptides on an insect (*Locusta migratoria*) visceral muscle. *J Insect Physiol* **39**, 207-215.

- Power, M.** (1943). The brain of *Drosophila melanogaster*. *J Morph* **72**, 517-559.
- Primakoff, P. y Myles, D. G.** (2002). Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* **296**, 2183-5.
- Rasse, T. M., Fouquet, W., Schmid, A., Kittel, R. J., Mertel, S., Sigrist, C. B., Schmidt, M., Guzman, A., Merino, C., Qin, G. et al.** (2005). Glutamate receptor dynamics organizing synapse formation in vivo. *Nat Neurosci* **8**, 898-905.
- Reddy, S., Jin, P., Trimarchi, J., Caruccio, P., Phillis, R., y Murphey, R. K.** (1997). Mutant molecular motors disrupt neural circuits in *Drosophila*. *J Neurobiol* **33**, 711-23.
- Rittenhouse, K. R. y Berg, C. A.** (1995). Mutations in the *Drosophila* gene *bullwinkle* cause the formation of abnormal eggshell structures and bicaudal embryos. *Development* **121**, 3023-33.
- Rivlin, P. K., St Clair, R. M., Vilinsky, I., y Deitcher, D. L.** (2004). Morphology and molecular organization of the adult neuromuscular junction of *Drosophila*. *J Comp Neurol* **468**, 596-613.
- Roeder, T.** (1999). Octopamine in invertebrates. *Prog Neurobiol* **59**, 533-61.
- Santel, A., Winhauer, T., Blumer, N., y Renkawitz-Pohl, R.** (1997). The *Drosophila* *don juan* (*dj*) gene encodes a novel sperm specific protein component characterized by an unusual domain of a repetitive amino acid motif. *Mech Dev* **64**, 19-30.
- Scholz, H.** (2005). Influence of the biogenic amine tyramine on ethanol-induced behaviors in *Drosophila*. *J Neurobiol* **63**, 199-214.
- Scholz, H., Franz, M., y Heberlein, U.** (2005). The hangover gene defines a stress pathway required for ethanol tolerance development. *Nature* **436**, 845-847.
- Scholz, H., Ramond, J., Singh, C. M., y Heberlein, U.** (2000). Functional ethanol tolerance in *Drosophila*. *Neuron* **28**, 261-71.
- Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S., y Heisenberg, M.** (2003). Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J Neurosci* **23**, 10495-10502.
- Selverston, A. I., Russell, D. F., y Miller, J. P.** (1976). The stomatogastric nervous system: structure and function of a small neural network. *Prog Neurobiol* **7**, 215-90.
- Sokolowski, M. B.** (2001). *Drosophila*: genetics meets behaviour. *Nat Rev Genet* **2**, 879-90.
- Soller, M., Bownes, M., y Kubli, E.** (1997). Mating and sex peptide stimulate the accumulation of yolk in oocytes of *Drosophila melanogaster*. *Eur J Biochem* **243**, 732-8.
- Soller, M., Bownes, M., y Kubli, E.** (1999). Control of oocyte maturation in sexually mature *Drosophila* females. *Dev Biol* **208**, 337-51.
- Spradling, A.** (1993). Developmental Genetics of Oogenesis. In *The Development of Drosophila melanogaster*, vol. 1 (ed. M. Bate and A. Martinez-Arias). Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Stein, R. B. y Parmiggiani, F.** (1981). Nonlinear summation of contractions in cat muscles. I. Early depression. *J Gen Physiol* **78**, 277-93.

- Stewart, B. A., Atwood, H. L., Renger, J. J., Wang, J., y Wu, C. F.** (1994). Improved stability of *Drosophila* larval neuromuscular preparations in haemolymph-like physiological solutions. *J Comp Physiol [A]* **175**, 179-91.
- Strauss, R. y Heisenberg, M.** (1993). A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J Neurosci* **13**, 1852-61.
- Sweeney, S. T., Broadie, K., Keane, J., Niemann, H., y O'Kane, C. J.** (1995). Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron* **14**, 341-51.
- Szabad, J. y Fajsz, C.** (1982). Control of female reproduction in *Drosophila*: genetic dissection using gynandromorphs. *Genetics* **100**, 61-78.
- Tabuchi, K., Sawamoto, K., Suzuki, E., Ozaki, K., Sone, M., Hama, C., Tanifuji-Morimoto, T., Yuasa, Y., Yoshihara, Y., Nose, A. et al.** (2000). GAL4/UAS-WGA system as a powerful tool for tracing *Drosophila* transsynaptic neural pathways. *J Neurosci Res* **59**, 94-9.
- Taylor, B. J.** (1989). Sexually dimorphic neurons of the terminalia of *Drosophila melanogaster*: II. Sex-specific axonal arborizations in the central nervous system. *J Neurogenet* **5**, 193-213.
- Thor, S.** (1995). The genetics of brain development: conserved programs in flies and mice. *Neuron* **15**, 975-7.
- Tissot, M., Gendre, N., y Stocker, R. F.** (1998). *Drosophila* P[Gal4] lines reveal that motor neurons involved in feeding persist through metamorphosis. *J Neurobiol* **37**, 237-50.
- Trimarchi, J. R., Jin, P., y Murphey, R. K.** (1999). Controlling the motor neuron. *Int Rev Neurobiol* **43**, 241-64.
- Truman, J., Taylor, B., y Awad, T.** (1993). Formation of the Adult Nervous System. In *The Development of Drosophila melanogaster*, vol. 2 (ed. B. M. and M.-A. A.). Plainview, New York Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- van Zandwijk, J. P., Bobbert, M. F., Harlaar, J., y Hof, A. L.** (1998). From twitch to tetanus for human muscle: experimental data and model predictions for m. triceps surae. *Biol Cybern* **79**, 121-30.
- Venken, K. J. y Bellen, H. J.** (2005). Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* **6**, 167-78.
- Vosshall, L. B.** (2007). Into the mind of a fly. *Nature* **450**, 193-7.
- Wang, Z., Lange, A. B., y Orchard, I.** (1995). Coupling of a single receptor to two different G proteins in the signal transduction of FMRFamide-related peptides. *Biochem Biophys Res Commun* **212**, 531-8.
- Wang, Z. y Orchard, I.** (1995). Ultrastructural and immunocytochemical studies of neuromuscular junctions in oviduct of *Locusta migratoria*. *Cell Tissue Res* **279**, 591-599.
- Ward, A. R. y Robertson, V. J.** (2000). The variation in fatigue rate with frequency using kHz frequency alternating current. *Med Eng Phys* **22**, 637-46.
- Wilcox, C. L. y Lange, A. B.** (1995). Role of extracellular and intracellular calcium on proctolin-induced contractions in an insect visceral muscle. *Regul Pept* **56**, 49-59.
- Wolfner, M. F.** (1997). Tokens of love: functions and regulation of *Drosophila* male accessory gland products. *Insect Biochem Mol Biol* **27**, 179-92.

**Yamamoto, D., Fujitani, K., Usui, K., Ito, H., y Nakano, Y.** (1998). From behavior to development: genes for sexual behavior define the neuronal sexual switch in *Drosophila*. *Mech Dev* **73**, 135-46.

**Yeh, E., Gustafson, K., y Boulianne, G. L.** (1995). Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7036-40.

**Zhou, L., Schnitzler, A., Agapite, J., Schwartz, L. M., Steller, H., y Nambu, J. R.** (1997). Cooperative functions of the reaper and head involution defective genes in the programmed cell death of *Drosophila* central nervous system midline cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5131-6.

**Zipursky, S. L., Wojtowicz, W. M., y Hattori, D.** (2006). Got diversity? Wiring the fly brain with Dscam. *Trends Biochem Sci* **31**, 581-8.

## APÉNDICE I

# Oviduct Contraction in *Drosophila* Is Modulated by a Neural Network That Is Both, Octopaminergic and Glutamatergic

ROCÍO RODRÍGUEZ-VALENTÍN,<sup>1</sup> IGNACIO LÓPEZ-GONZÁLEZ,<sup>1</sup> RAMÓN JORQUERA,<sup>2</sup>  
PEDRO LABARCA,<sup>2</sup> MARIO ZURITA,<sup>1</sup> AND ENRIQUE REYNAUD<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular,  
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México,  
Cuernavaca, México

<sup>2</sup>Departamento de Biofísica y Fisiología Molecular,  
Centro de Estudios Científicos, Casilla, Valdivia, Chile

Fertility is a highly complex and regulated phenomenon essential for the survival of any species. To identify *Drosophila* fertility-specific neural networks, we used a GAL4/UAS enhancer trap genetic screen that selectively inactivates groups of neurons. We identified a GAL4 line (*bwk<sup>lqs</sup>*) that has a female sterile phenotype only when it expresses the tetanus toxin light chain (TeTxLC). These flies lack oviduct contraction, lay almost no eggs, sperm accumulate in the oviducts, and fewer than normal are seen in the storage organs. In insects, two neuroactive substances are important for oviduct contraction: octopamine (OA), a monoamine that inhibits oviduct contraction, and glutamate (Glu), a neurotransmitter that induces contraction. It is known that octopaminergic neurons of the thoracic abdominal ganglion (TAG) modulate oviduct contraction, however, the glutamatergic neurons that innervate the oviduct have not been identified yet and the interaction between these two neuroactive substances is not well understood. Immunostaining experiments revealed that the *bwk<sup>lqs</sup>* line trapped an octopaminergic neural network that innervates the genital tract. We show that *wt* like oviduct contraction in TeTxLC-inactivated flies can only be rescued by simultaneous application of Glu and OA suggesting that the abdominal *bwk<sup>lqs</sup>* neurons are both octopaminergic and glutamatergic, the use of an agonist and an antagonist for Glu receptors as well as their direct visualization confirmed its participation in this phenomenon. Our work provides the first evidence that adult abdominal type II visceral innervations co-express Glu and OA and allows us to re-evaluate the previous model of neuronal network controlling insect oviduct contraction. *J. Cell. Physiol.* 209: 183–198, 2006.

© 2006 Wiley-Liss, Inc.

The properties of neural networks, the functional modules of central nervous systems, are poorly understood because there are few strategies to genetically isolate and manipulate them. In an effort to better understand neural networks, we developed a functional genetic screen using an enhancer trap strategy to identify neuronal groups in the CNS involved in fertility and define their function. We used the bipartite GAL4/UAS system (Brand and Perrimon, 1993) to target the expression of the tetanus toxin light chain (TeTxLC) to inactivate discrete groups of neurons in the fly CNS. With this approach, we isolated a GAL4 line (*bwk<sup>lqs</sup>*) that presents a female sterile phenotype only when it expresses the TeTxLC. The inactivation of *bwk<sup>lqs</sup>* neurons produce a female sterile phenotype caused by defective oviposition and improper sperm storage.

Oviposition in insects is mainly regulated by octopamine (OA) and glutamate (Glu). OA is a neurohormone, neuromodulator, and neurotransmitter in invertebrates (Roeder, 1999) that modulates many aspects of physiology, behavior, and female fertility. In orthopteran insects, OA modulates oviduct muscle contractions when liberated from the unpaired median octopaminergic neurons of the thoracic abdominal ganglion (TAG) (Orchard and Lange, 1985; Kalogianni and Theophilidis, 1993). In locusts, OA binds to type 2B OA receptors (Orchard and Lange, 1986) activating the cAMP transduction signal cascade thus inhibiting oviduct contraction (Lange and Nykamp, 1996; Nykamp and Lange, 2000). Also in locusts, octopaminergic neurons in the TAG innervate the spermathecae modulating its contractions (Clark and Lange, 2003). *Drosophila*

females that are null mutants for Tyramine  $\beta$ -hydroxylase (*T $\beta$ h<sup>nM18</sup>*) are viable and do not show any abnormal external morphology but are sterile. These flies copulate but retain their eggs in the ovaries (Monastiriotti et al., 1996; Monastiriotti, 2003). Similar but not identical phenotypes were observed in mutants for the tyrosine decarboxylase (*dTdc2*) gene (Cole et al., 2005) and the *oamb* gene that codes for a high affinity OA receptor (Lee et al., 2003). It has also been reported that Glu is important for oviduct contraction and that it causes a dose-dependent depolarization of membrane

This article includes Supplementary Material available from the authors upon request or via the Internet at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/0021-9541/suppmat>.

**Abbreviations:** *T $\beta$ h*, tyramine  $\beta$ -hydroxylase; OAMB, octopamine receptor in the mushroom bodies; TeTxLC, tetanus toxin light chain; Nsyb, nsynaptobrevin; OA, octopamine; TAG, thoracic abdominal ganglion; D-AP4, D-2-amino-4-phosphonobutyric acid.

Contract grant sponsor: CONACYT; Contract grant number: J-36866-N; Contract grant sponsor: PAPIIT/UNAM; Contract grant numbers: IN213003, IX209904.

\*Correspondence to: Enrique Reynaud, Instituto de Biotecnología, UNAM, A.P. 510-3, Cuernavaca, Mor., 62210, México.  
E-mail: [enrique@ibt.unam.mx](mailto:enrique@ibt.unam.mx)

Received 4 April 2006; Accepted 5 June 2006

DOI: 10.1002/jcp.20722

potential (Orchard and Lange, 1986). However, the glutamatergic neurons involved in this process have not been identified yet. The lack of a genetic model where the function of specific neurons can be probed, makes the interactions between the different neurochemical pathways that control oviduct contraction unknown.

In this work we show that the posterior *bwk<sup>iqs</sup>* neurons of the TAG innervate the oviduct and sperm storage organs. The expression pattern of *bwk<sup>iqs</sup>* defines an octopaminergic and glutamatergic neural network in the *Drosophila* CNS. We found out that Glu is the main excitatory neurotransmitter used in *Drosophila* for egg laying and that it must act in conjunction with OA to modulate oviduct contraction. We found that the neurons trapped by *bwk<sup>iqs</sup>* constitute a defined, functional, and discrete neural network that controls egg deposition that we characterized in an integrative way, taking into account molecular, developmental, and physiological aspects.

## MATERIALS AND METHODS

### Stocks and crosses

Flies were raised on yeast standard medium at 25°C.

*P(UAS-TeTxLC)* (TNT-E, second chromosome), *P(UAS-Nsyb-GFP)* (third chromosome), and *don juan-GFP* (*dj-GFP*) lines were respectively provided by Dr. S. Sweeney, University of York, York, CA, United Kingdom (Sweeney et al., 1995), Dr. D. Yamamoto, Waseda University, Nishi-Tokyo, Japan (Ito et al., 1998), and Dr. A. Santel, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA. (Santel et al., 1997). *P(UAS-EGFP)* 5a.2 (second Chromosome), *P(tubP-GAL80<sup>ts</sup>)2/TM2* (McGuire et al., 2003), *GluR-IIA<sup>RFP</sup>* (third chromosome) was kindly provided by Dr. Carlos Merino (Rasse et al., 2005), *Oregon-R* and *w<sup>1118</sup>* strains were obtained from the *Drosophila* stock center in Bloomington, Indiana. Over 100 GAL4 lines generated by E. Reynaud (unpublished) were used in this study.

### GAL4/UAS-TeTxLC screen to identify P(PGAL4) elements that define discrete neural groups involved in fertility

Independent crosses of the collection of 100 GAL4 lines to the *UAS-TeTxLC/UAS-TeTxLC* strain were performed. *UAS-TeTxLC*-dependent sterile strains were identified by mating the resulting progeny with *Oregon-R* flies. The rationale for the screen is as follows: *P(PGAL4)* lines with a generalized expression pattern would be lethal in the presence of the *UAS-TeTxLC* (Fig. 1A, upper part). *P(PGAL4)* lines with non-neural expression pattern would be viable but do not have any phenotype (Fig. 1A, middle part). *P(PGAL4)* lines with a discrete neural expression pattern would be viable and would present specific defects like sterility, caused by the *UAS-TeTxLC* expression (Fig. 1A, lower part).

### Identification of the P(PGAL4)*bwk<sup>iqs</sup>* element insertion site

The recovery of the DNA sequence flanking the 3' end of the *P(PGAL4)bwk<sup>iqs</sup>* element was done using a modified version of inverse PCR (Sullivan et al., 2000), briefly, genomic DNA digestion was done with *Pst*I restriction enzyme instead of *Msp*I and the following PCR primers were used: Ampli3'F: 5'-CAATCATATCGCTGTCTCACTCA-3 and Ampli3'R: 5'-CCTTAGCATGTCCGTGGGGTTTGAAT-3. Sequencing primers: Sec3'F: 5'-GACACTCAGAATACTATTC-3 and Sec3'R: 5'-CGTGGGGTTTGAATTAAC-3'. The identification of the location in the *Drosophila* genome of the recovered nucleotide sequence flanking the P-element was determined using the BLAST program (Altschul et al., 1997) on the Flybase Database (2003).

### Dissection of ovaries

*UAS-TeTxLC*; *bwk<sup>iqs</sup>* and *bwk<sup>iqs</sup>* heterozygous 5-day-old females were mated with *Oregon-R* males on standard food for 3 days and their ovaries were dissected in phosphate-buffered saline (PBS), fixed in 4% formaldehyde/PBS, and mounted in Citifluor (Ted Pella, Inc., Redding, CA).

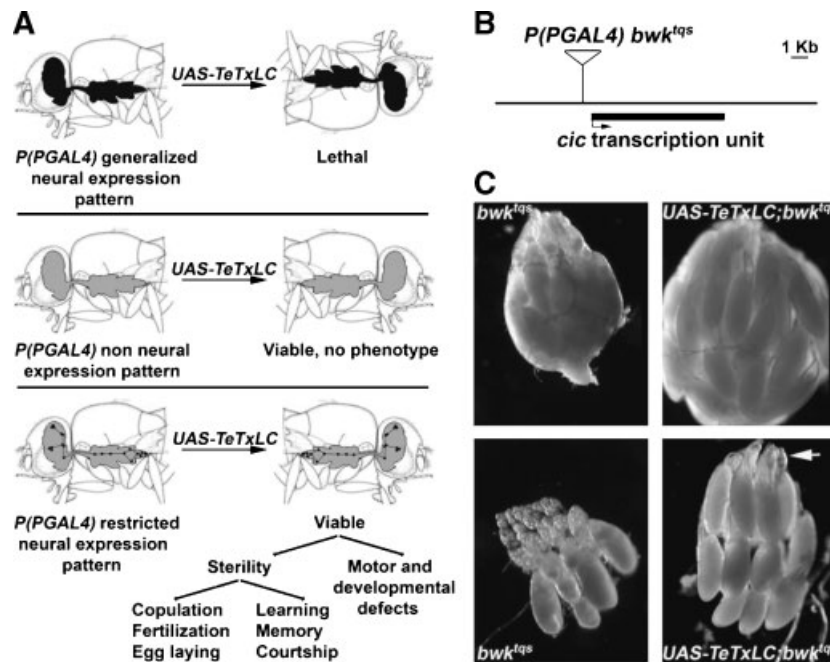


Fig. 1. Rationale of the genetic screen and genomic insertion site of *bwk<sup>iqs</sup>*. **A:** Genetic screen to identify *P(PGAL4)* element lines that label discrete neural networks involved in fertility. *P(PGAL4)* element lines were crossed with the *UAS-TeTxLC* line and sterile individuals carrying both insertions were identified. The CNS is colored in gray, black represents neural expression of GAL4. Non-neural expression of GAL4 is irrelevant since tetanus toxin light chain does not have a phenotype in non-neural tissue. **B:** Schematic map of the genomic insertion site of *bwk<sup>iqs</sup>*. The *P(PGAL4)bwk<sup>iqs</sup>* element landed 914-bp

upstream of the *capicua* (*cic*) gene. P-element is represented as an inverted triangle. **C:** Dissected intact ovaries (upper parts) and disaggregated ovaries (lower parts) of *bwk<sup>iqs</sup>* (left) control and *UAS-TeTxLC;bwk<sup>iqs</sup>* (right) mated females 7–8 days old. The ovaries of the *UAS-TeTxLC;bwk<sup>iqs</sup>* females are full of mature eggs and are abnormally big. Only the earliest developmental stages (arrow) and mature eggs can be identified, while control ovaries have oocytes from all developmental stages.



### Fertility and mating essays

*UAS-TeTxLC*; *bwk<sup>tqs</sup>* (heterozygous for each insertion) was the experimental genotype. *UAS-TeTxLC* and *bwk<sup>tqs</sup>* (heterozygous parental lines) were used as controls.

**Measurement of average of eggs laid per fly and hatched eggs percentage.** Four-day-old individual females were mated with three *Oregon-R* males on standard food for 1 day. Flies were transferred to fresh vials for 22 h and the eggs laid in this period were counted. The number of eggs per female was reported as the average number of eggs per female produced by each genotype assayed. To determine the hatching egg percentage single females and their partners were put together in fresh food vials for 24 h and the eggs laid were counted. The hatching percentage was calculated as the fraction of eggs that hatched from the total of eggs laid by each genotype.

**Presence of eggs in the uterus.** Five-day-old virgin females were individually crossed with *Oregon-R* males in circular mating chambers (1.5-cm diameter, 0.6-cm height) for 1 h to ensure copulation and transferred to standard food vials. Egg presence in the uteri was measured by gently pushing the tip of the female abdomens 12 h after mating (Lee et al., 2003).

**Courtship index determination.** Four to 5-day-old females were individually paired with *Oregon-R* males in circular mating chambers (1.5-cm diameter, 0.6-cm height). Couples were observed for 10 min or until copulation ensued, whichever occurred first. Courtship index (CI) was defined as the percentage of time that males spent courting during the observation time. Copulation time was also measured.

### Conditional expression of TeTxLC

*UAS-TeTxLC*; *GAL80<sup>ts</sup>/MKRS* and *CyO*; *GAL80<sup>ts</sup>/bwk<sup>tqs</sup>* females were used as controls. *UAS-TeTxLC*; *GAL80<sup>ts</sup>/bwk<sup>tqs</sup>* was the experimental genotype.

The flies were reared at 18°C and transferred to 29°C at different times in development. In the first group, the pupae were transferred to 29°C just before eclosion. Females were mated with *Oregon-R* males at 29°C, they were allowed to lay eggs for 3 days and transferred to a fresh vial for 3 days more, after this, the vials were cleared of adults, transferred to 25°C and the progeny was counted as it emerged; the average number of progeny per female for each genotype was reported. In the second group, females were allowed to eclose at 18°C and were mated with *Oregon-R* males for 3 days. Females and males were transferred to a new vial at 18°C, the first vial was discarded. After 3 days the flies were transferred again. Three days later the flies were passed to a fresh vial shifting the temperature to 29°C. After 3 days flies were transferred again. The progeny of each vial were counted and the average number of progeny per female for each genotype was reported as a function of time and temperature.

### *bwk<sup>tqs</sup>* expression and innervation pattern

The expression pattern of *bwk<sup>tqs</sup>* in the CNS was examined using *UAS-GFP* as reporter. CNSs of the *UAS-GFP*; *bwk<sup>tqs</sup>* heterozygous second instar larvae and yellow pupae were dissected in Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer 0.1 M, pH 7.4 and fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde in the same buffer (fix buffer), and washed three times in the same buffer without formaldehyde. GFP fluorescence was visualized directly. Third instar larval and adult expression patterns were visualized by immunofluorescence (see immunohistochemistry section).

GFP fluorescence of synaptic boutons was directly detected. The adult reproductive tracts of *bwk<sup>tqs</sup>/UAS-Nsyb-GFP* females were dissected in Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer 0.1 M, pH 7.4 and fixed for 20 min in fix buffer, and washed three times. Glu receptor IIA fused to Red fluorescent protein (GluR-IIA<sup>RFP</sup>) was visualized directly with a confocal microscope. All tissues were mounted in Citifluor.

Images were obtained using a Biorad MRC600 confocal microscope. Z-sections of tissues were obtained at 1.98–5 μm intervals. Maximal projections were done using the public domain NIH ImageJ program (available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry experiments were done as reported elsewhere (Monastirioti et al., 1995), *UAS-GFP*; *bwk<sup>tqs</sup>* heterozygous individuals were used to visualize the co-expression of GFP and OA in the CNS. *bwk<sup>tqs</sup>/UAS-Nsynaptobrevine-GFP* (*UAS-Nsyb-GFP*) adult females were used for oviduct immunostaining experiments. In this case, a protocol for body wall muscles was used (Monastirioti et al., 1995). The primary antibodies used were mouse anti-GFP (1:50) (Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA), rabbit anti-OA (1:500) (Molecular Biologische, Technologie, Goettingen, Germany). Secondary antibodies, fluorescently conjugated (1:500) (Cy3/Cy5-conjugated, Rockland Immunochemicals, Inc., Gilbertsville, PA) were used. Images were obtained as described before.

### Visualization of sperm destiny

Virgin 5-day-old *UAS-TeTxLC*; *bwk<sup>tqs</sup>* and *bwk<sup>tqs</sup>* females were allowed to mate for 1 day to same age virgin *dj-GFP* males. Males were removed 2 h before the dissection. The reproductive tracts were dissected, fixed in PBS 4% paraformaldehyde, and washed in PBS. The GFP fluorescence was detected using an epifluorescence microscope.

### Videometrical measurements of oviduct contraction

Flies of the appropriate phenotypes were raised on 12 h light/dark cycle. Oviducts were obtained only from flies with well-developed mature ovaries. *Oregon-R* and heterozygous *bwk<sup>tqs</sup>* flies were controls. The experimental genotype was *UAS-TeTxLC*; *bwk<sup>tqs</sup>*. Oviducts were dissected in Ca<sup>2+</sup> free modified hemolymph-like 3 saline solution (Stewart et al., 1994) through a dorsal incision in the abdomen and placed in classic hemolymph-like 3 saline solution in a Sylgard-coated recording chamber. The anterior end of the lateral oviducts and the posterior end of the common oviduct were pinned to the chamber using glass fiber pins, so the muscle contraction could be monitored. To excite nerve terminals and induce the oviduct contraction, squared electrical pulses (0.5 msec in duration and ~1 μA) were applied to the posterior abdominal nerve with a glass suction electrode (10–20 μm inside diameter) at 10 Hz for 40 sec. The oviduct muscle contraction was recorded with an inverted microscope equipped with a digital camera. Images were analyzed using the ImageJ program. To quantify the extent of the oviduct contraction, we calculated the following statistical parameter:

$$\text{Muscle contraction} = 1 - \text{size}/\text{size}_0$$

Where size represents the oviduct size (μm) in the start level of the common oviduct at any time during the electrical stimulation protocol, size<sub>0</sub> represents the oviduct size (μm) at the beginning of the physiological assay. L-glutamic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), OA (Sigma Chemical Co.), proctolin (Peninsula Laboratories, Belmont, CA), IBMX (Sigma Chemical Co.), D-AP4 (Tocris Biosciences, Ellisville, MO), and L-quisqualic acid (Tocris Biosciences) were added, from stock solutions, independently or mixed to the bath saline at the reported doses.

### Electrophysiology

Intracellular recording of nerve-evoked post-synaptic potentials from *Drosophila* oviducts were done using the voltage headstage of an OC-725 amplifier (Warner Instruments, Hamden, CT). Microelectrodes had resistances of 50–70 MΩ. All experiments were performed in a standard solution made of (in mM): 128 NaCl; 2 KCl; 4 MgCl<sub>2</sub>; 2 CaCl<sub>2</sub>; 5 HEPES; 36 sucrose; pH 7.3. The posterior abdominal nerve was dissected and sucked into a stimulation pipette filled with standard solution. The nerve was stimulated at 10 Hz using a programmable stimulator (Master-8, A. M. P. I., Jerusalem, Israel). Data acquisition and analysis were performed using pClamp software (Axon Instruments, Foster City, CA).

### Statistical analysis

In fertility and mating assays, statistically significant differences between the results were determined using ANOVA.

In videometrical measurements, the statistical analysis was performed using the Student's *t*-test and chi-square goodness of fit. Statistical differences were assumed to a significance level of  $P = 0.05$ .

## RESULTS

### Identification of *bwk<sup>tqs</sup>* line

To understand how putative neural networks control specific behaviors or functions, we did a genetic screen using the bipartite GAL4/UAS system (Brand and Perrimon, 1993) that consists in crossing GAL4 enhancer trap lines with a *UAS-TeTxLC* line (Sweeney et al., 1995). This strategy allows us to test and identify specific subsets of neurons and correlate their loss of function with defined phenotypes such as sterility (Fig. 1A). We tested 100 GAL4 lines and found a *P(PGAL4)* element insertion that only in the presence of a *UAS-TeTxLC* insertion, causes female-specific sterility. We were unable to find any obvious phenotype in the male. In view of the fact that the TeTxLC only produces pre-synaptic phenotypes, we can therefore conclude that the sterility phenotype is neuronal (Sweeney et al., 1995). Inverse PCR (Materials and Methods) showed that the P-element landed in the third chromosome in the *Drosophila* genomic base 1611809, 914-bp upstream of a known gene called *capicua* (*cic*). This insertion genetically interacts with the allele of the *bullwinkle* (*bwk*) gene *bwk<sup>8482</sup>*. This line is a very mild hypomorphic *bwk* allele that is viable and fertile when homozygous (data not shown), we called this line *bwk<sup>tqs</sup>* (Fig. 1B).

### The inactivation of the *bwk<sup>tqs</sup>* neurons causes female sterility due to defective egg laying

The *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* females lay very few eggs and their abdomens grow abnormally. To confirm if these flies produced eggs, we dissected ovaries of control (*bwk<sup>tqs</sup>* heterozygous) and *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* organisms. The ovaries of *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* females are twice as big as the control's (Fig. 1C, upper part), and they have mostly late stage oocytes while in the control, most of the developmental stages can be identified (Fig. 1C, lower part). These data strongly suggest that oogenesis is normal in *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* females but that they retain most of the eggs produced.

To quantify the sterility of *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* females, individuals were mated with *Oregon-R* males and the eggs laid were counted. Compared to controls, *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* females lay very few eggs and most of these do not hatch (Table 1). Egg laying can be divided into at least three processes: ovulation that consists in

the liberation of the egg from the ovaries into the oviducts, the transfer of the egg to the uteri, and egg deposition. To characterize how these processes are affected, we measured the presence of eggs in the lower reproductive tract. Individual females were mated and the presence of an egg in their lower reproductive tract was examined 12 h after mating when maximum amount of eggs in the lower reproductive tract was reached in the controls. In *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* flies, the number of eggs in the uteri is much smaller than in the controls (Table 1), suggesting that these flies are defective in either ovulation or in the transfer of the eggs to the lower reproductive tract. To reject the hypothesis that the lack of ovulation was due to a defect in mating caused by inactivation of the *bwk<sup>tqs</sup>* neurons, CI was measured using *Oregon-R* males. The CI induced by the *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* experimental females and the time they spent copulating were similar to the control females (Table 1). Since *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* ovaries are filled with eggs in spite of normal mating and a smaller percentage of these flies showed eggs in their uteri ovulation and egg transfer to the uteri seem to be intrinsically affected. Furthermore, in control flies (*bwk<sup>tqs</sup>* and *UAS-TeTxLC*) uteri are occupied ~89.4% of the time and these flies are able to lay on average ~54 eggs in 22 h (Table 1). On the other hand, in the *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* flies, uteri are occupied 33.3% of the time. If we assume that all the eggs that occupy the uteri in the inactivated class are laid as efficiently as in the wt classes we would expect about 21 eggs laid in 22 h, this is not the case, we observe only ~four eggs. These observations demonstrate that eggs are not transferred efficiently to the lower reproductive tract, they are not laid at the same rate as in the wt suggesting that egg deposition is also under the control of *bwk<sup>tqs</sup>* neurons.

### The sterility phenotype of *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* is not caused by ontological defects due to the lack of synaptic transmission

The continuous lack of synaptic transmission during development could cause developmental post-synaptic compensations or defects in *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* females. To avoid these potential caveats we measured fertility in the presence of a thermosensitive GAL80 allele, a GAL4 repressor that is expressed ubiquitously (McGuire et al., 2003). This allowed us to control, by changing the temperature, the developmental moment in which the TeTxLC would be expressed in the *UAS-TeTxLC; GAL80<sup>ts</sup>/bwk<sup>tqs</sup>* flies. We found that *UAS-TeTxLC; GAL80<sup>ts</sup>/bwk<sup>tqs</sup>* flies that express TeTxLC just before eclosion were sterile (Fig. 2, left part). At 18°C, where GAL4 is inactivated by GAL80 and TeTxLC is not expressed *UAS-TeTxLC; GAL80<sup>ts</sup>/bwk<sup>tqs</sup>* flies were fertile, however, when the flies were transferred to

TABLE 1. Quantification of the fertility parameters of *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* females

Genotype	Fertility			Mating	
	Average of eggs laid per fly	Hatched eggs <sup>a</sup> (%)	Presence of eggs in the uterus (%)	Courtship index (%)	Copulating time (min)
<i>bwk<sup>tqs</sup></i>	47.4 ± 18.3 (n=12)	96.6 (n = 1,137)	87.5 (n = 24)	62.6 ± 27.9 (n=9)	21.3 ± 1.4 (n=8)
<i>UAS-TeTxLC</i>	60.8 ± 16.1 (n = 10)	96.1 (n = 990)	91.3 (n = 23)	76.0 ± 20.1 (n = 11)	20.4 ± 3.9 (n = 8)
<i>UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup></i>	4.2 ± 5.2 <sup>b</sup> (n = 17)	4.9 (n = 102)	33.3 (n = 21)	77.5 ± 14.1 (n = 10)	20.8 ± 3.1 (n = 7)

Heterozygous individuals from the *bwk<sup>tqs</sup>* and *UAS-TeTxLC* strains were used as controls. Values are given as means or percentages ± SD.

<sup>a</sup>Numbers express the percentage of eggs hatched from the total "n."

<sup>b</sup> $P < 0.0001$ .

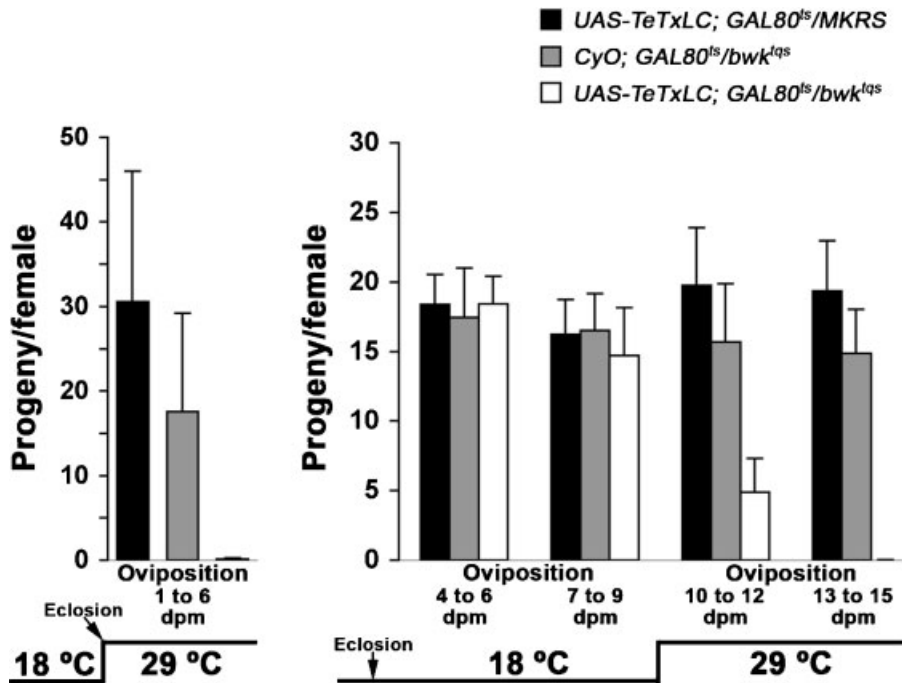


Fig. 2. Conditional expression of TeTxLC. *UAS-TeTxLC; GAL80<sup>ts</sup>/bwk<sup>ts</sup>* (experimental) and *UAS-TeTxLC; GAL80<sup>ts</sup>/MKRS* and *CyO; GAL80<sup>ts</sup>/bwk<sup>ts</sup>* (controls) flies were reared at 18°C and transferred to 29°C at the developmental times indicated. Left part, pupae were transferred to 29°C just before eclosion. Females were mated for 6 days at 29°C, experimental genotype is sterile ( $P < 0.002$ ). Right part, at 18°C the number of progeny per female of the three genotypes is similar (oviposition 4–6 and 7–9 days post-mating (dpm),  $P = 0.5$ ), however when transferred to 29°C only the *UAS-TeTxLC; GAL80<sup>ts</sup>; bwk<sup>ts</sup>* females become sterile (oviposition 10–12 and 13–15 dpm,  $P < 0.0001$ ).

29°C they became unable to lay eggs (Fig. 2, right part) thus ruling out any ontological effect.

### Development of the *bwk<sup>ts</sup>* neural network

To visualize the neurons trapped by *bwk<sup>ts</sup>* we used *UAS-GFP* as a reporter. This allows us to directly identify neurons that are responsible for the inactivation phenotype. Figure 3 shows confocal projections of the CNS of *UAS-GFP; bwk<sup>ts</sup>* flies during different stages of development. We were able to detect GFP expression in CNS from second instar larvae (L2). The first labeled neurons are a small cluster in the ventral midline (VM) and a small symmetrical bilateral cluster (BC) in the TAG. A few faintly labeled symmetrical bilateral neurons can also be detected in the brain (arrows). The general structure of the *bwk<sup>ts</sup>* neural network is generally maintained throughout development although GFP expressing cell number increases.

### *bwk<sup>ts</sup>* tags an octopaminergic neural network

The fact that the inactivation phenotype of *bwk<sup>ts</sup>* neurons is similar to that of flies that cannot produce OA (*Tβh<sup>nM18</sup>*) (Monastiriotti et al., 1996) and that the structure of the trapped neural network is similar to the one reported for OA (Monastiriotti et al., 1995) suggested that the *bwk<sup>ts</sup>* neurons are octopaminergic. To test this hypothesis, we co-immunostained CNSs of *UAS-GFP; bwk<sup>ts</sup>* females using anti-GFP and anti-OA antibodies and found out that there is a large degree of overlap between the *bwk<sup>ts</sup>* neurons, which express GFP and the ones that express OA; both in the third instar larval CNS (Fig. 4A,B) and in the adult CNS (Fig. 4C–F,G). Interestingly, most of the foci labeled with GFP correlate with the previously reported foci that express

OA. However, our experiments allowed us to identify some new foci that express OA weakly but were clearly labeled by GFP in the larval CNS (arrows in Fig. 4B) and also some new foci in the adult CNS (arrows in Fig. 4G). The difference in the levels of expression of both antigens makes hard to document in a single photograph the co-expression of both antigens in all cells. Our data suggest that the *bwk<sup>ts</sup>* enhancer trap line is a developmental marker for most octopaminergic neurons. There are very few GFP positive cells that have a very faint OA staining, this could be due to a very low octopaminergic activity or could be a GAL4 artifact. The very small percentage of cells that are in this situation do not affect further conclusions.

### The *bwk<sup>ts</sup>* neurons in the abdominal ganglion innervate the female reproductive tract

Earlier studies showed that the internal reproductive organs in the female *Drosophila* are innervated by neurons located in the TAG (Demerec, 1950; Taylor, 1989). Furthermore, it was recently reported that at least part of this innervation derives from *Tβh*-expressing cells that are located in the VM of the TAG of *Drosophila*. It has also been suggested that the targeted expression of *UAS-Tβh* in a few posterior TAG neurons can rescue the sterility phenotype of the *Tβh<sup>nM18</sup>* mutant (Monastiriotti, 2003). The OA receptor OAMB is expressed in the reproductive tract and its loss of function causes the identical phenotype (Lee et al., 2003). Our data show that the inactivation of the *bwk<sup>ts</sup>* octopaminergic neurons reproduces the egg retention phenotype caused by the lack of OA in *Tβh<sup>nM18</sup>* and *oamb* mutant flies. To confirm if the *bwk<sup>ts</sup>* neurons innervate the female reproductive tract, we used

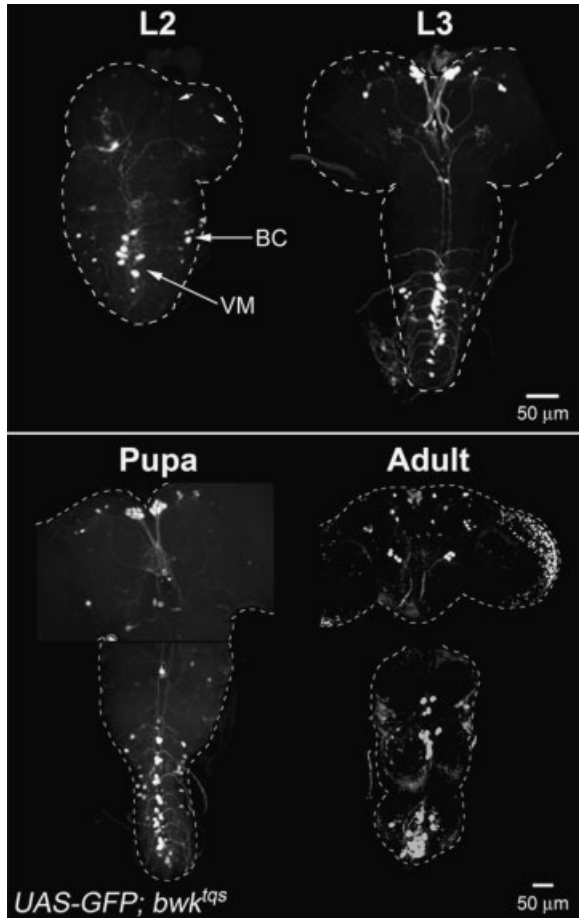


Fig. 3. Expression pattern of *bwk<sup>tqs</sup>* throughout CNS development. *UAS-GFP; bwk<sup>tqs</sup>* second instar larval (L2) and pupal CNSs were imaged using GFP fluorescence (GFP). CNS of third instar larvae (L3) and adults were imaged by immunofluorescence using an anti-GFP antibody. Images were obtained using a Biorad MRC 600 confocal microscope and Z-sections were used to make maximal projections. In second instar larval brains some cells are faintly labeled (arrows), in the posterior TAG, a symmetric small set of bilateral cells (BC) and several ventral midline cells (VM) are strongly labeled. As it can be seen, the number of GFP expressing cells increases throughout development, but the expression pattern is roughly conserved. Top = anterior.

whole-mount preparations of the TAG of *UAS-GFP; bwk<sup>tqs</sup>* females with their intact abdominal nerves attached to the reproductive system (See schematic, Fig. 5A). We observed the most posterior *bwk<sup>tqs</sup>* neurons in the TAG do innervate the reproductive tract (Fig. 5B, arrow). To corroborate if the *bwk<sup>tqs</sup>* neurons have synapses with the reproductive tract *bwk<sup>tqs</sup>/UAS-Nsyb-GFP* females were used. *Nsyb-GFP* preferentially labels synaptic boutons of neurons expressing it (Ito et al., 1998). We found that the *bwk<sup>tqs</sup>* neurons innervate the oviduct (Fig. 5C top part and E), the spermathecae (Fig. 5D), the seminal receptacle, the uterus, and the base of the ovaries (data not shown). The morphology of the synaptic boutons on the oviduct is characteristic of type II boutons (Fig. 5E,F), that are known to be octopaminergic (Rivlin et al., 2004). Double labeling experiments in reproductive tracts of the same genotype using anti-GFP (Fig. 5C, top part) and anti-OA antibodies (Fig. 5C, middle part) confirmed the octopaminergic identity of the *bwk<sup>tqs</sup>* synaptic boutons in the

lateral and common oviducts (Fig. 5C, bottom part). In conclusion, *bwk<sup>tqs</sup>* neurons in the TAG innervate the oviduct with type II synaptic boutons as well as the rest of the reproductive tract. This innervation pattern is similar to the one found in *Locusta* (Lange and Orchard, 1984; Clark and Lange, 2003) suggesting that it is very likely that the neural machinery that controls egg is ancestral and conserved between holometabolous and hemimetabolous insects.

### The inactivation of the *bwk<sup>tqs</sup>* neurons affects the normal storage of sperm in the *Drosophila* female reproductive tracts

The *bwk<sup>tqs</sup>* neurons innervate the female genital tract, including the sperm storage organs (Fig. 6). Moreover, the OAMB receptor is expressed in the sperm storage organs of the *Drosophila* female (Lee et al., 2003) and it has been reported that OA modulates spermathecae muscle contraction in *Locusta* (Clark and Lange, 2003). Our data suggest that an egg laying defect is the main cause for the sterility phenotype of *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>*, however, these flies are able to lay some eggs but only a small percentage of them hatch (Table 1). These facts made us ask if there was a problem with the transfer or storage of sperm, because it is known that this kind of defects cause defective fertilization (Chapman et al., 2001). In order to answer this question, *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* females were mated with *dj-GFP* males. Male *dj-GFP* flies produce fluorescent spermatozoa (Santel et al., 1997). This allowed us to follow their destiny inside the female reproductive tract. Figure 6B shows that the female reproductive tract of a *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* animal is morphologically indistinguishable from the control *bwk<sup>tqs</sup>* heterozygous reproductive tract (Fig. 6A). The distribution of the fluorescent spermatozoa in the wt reproductive tracts showed that most of them are stored in the seminal receptacle and in the spermathecae (Fig. 6C, arrowheads) while in the *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* reproductive tracts, the spermatozoa seems to be widely distributed through the tract and less concentrated in the storage organs, invading the common and lateral oviducts and the ovaries (Fig. 6D, arrows). It has been proposed that coordination between ovulation and sperm release from the storage organs is needed to prevent polyspermy and to assure normal fertilization (Chapman et al., 2001), since this coordination is probably lacking in *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* flies it is likely that most of the eggs laid do not hatch because of lack of fertilization or, possibly, polyspermy. We also found that when the abdomen of the *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* females is gently pressed with a rounded needle, they extrude their ovipositor but they are unable to retract it as control animals do (data not shown). In view of these results, we propose that the octopaminergic *bwk<sup>tqs</sup>* neurons modulate the whole genital tract.

### Octopamine modulates the oviduct contraction in *Drosophila*

The data exposed in the previous section explains why a majority of the few eggs laid by the *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* flies are not viable. However, it does not explain why the *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* flies retain most eggs they make or, in other words, why they do not ovulate correctly (Table 1). To answer this question we developed a whole-mount preparation of the female genital tract that allows us to perform quantitative videometrical measurements to quantify oviduct contraction caused by direct electrical stimulation of the abdominal

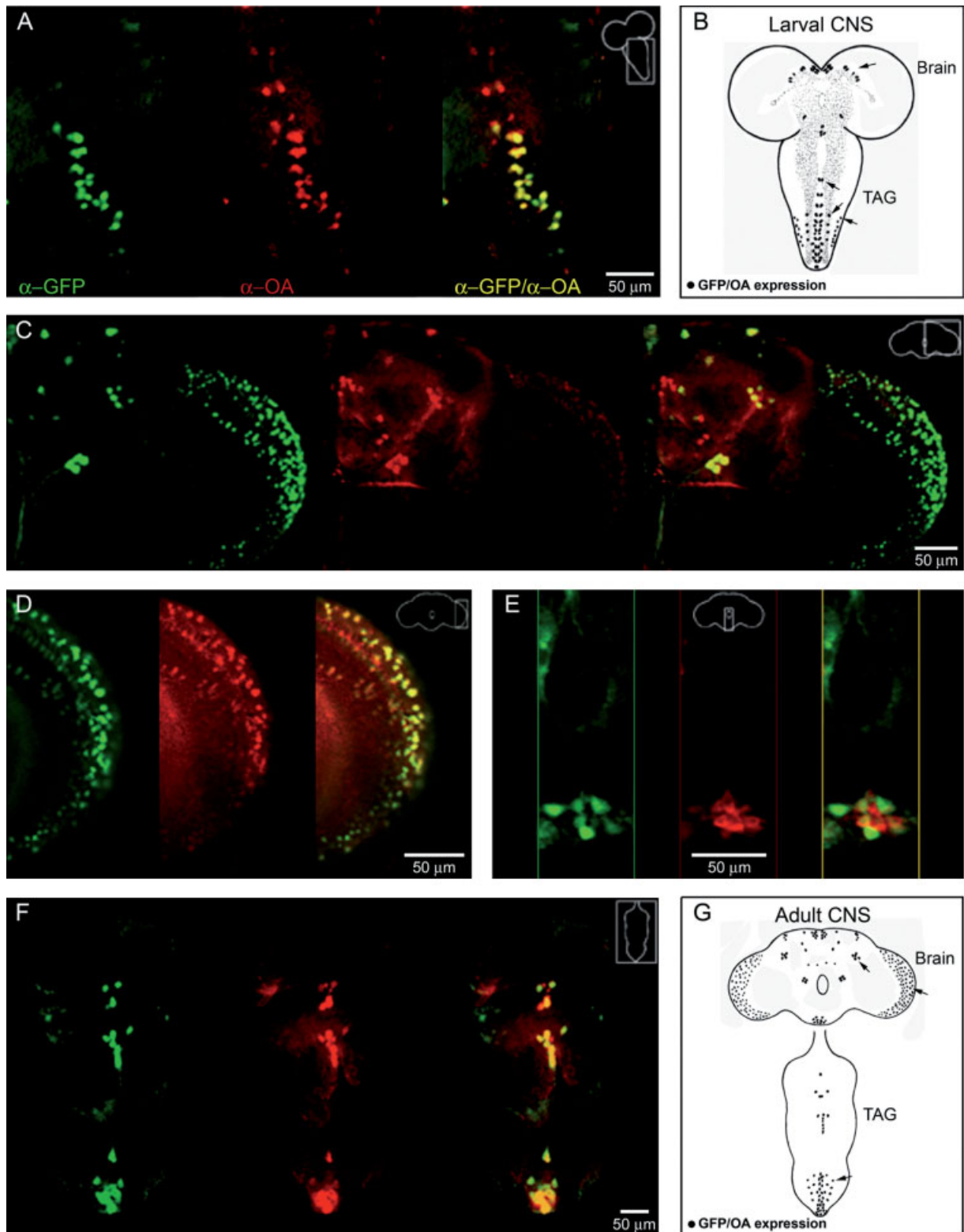


Fig. 4. *bwk<sup>tqs</sup>* neurons are octopaminergic. Anti-GFP (green) and anti-OA (red) double labeling experiment of female *UAS-GFP; bwk<sup>tqs</sup>* CNSs. Anti-GFP and anti-OA images were obtained as in Figure 3 and both signals were superimposed (yellow). **A:** Confocal Z projection of a third instar larval TAG. All *bwk<sup>tqs</sup>* cells (green) in the TAG express OA (red). **B:** Schematic representation of the octopaminergic network labeled by *bwk<sup>tqs</sup>* in the third instar larvae CNS. Solid dots represent neurons that co-express OA and GFP, arrows point at previously unidentified octopaminergic foci. Gray shades represent octopaminergic

varicosities. **C:** Confocal Z projection of an adult brain. Only the right hemisphere is shown, although expression is symmetrical. All *bwk<sup>tqs</sup>* neurons (green) express OA (red). **D:** Confocal section of the adult brain analyzed in (C) showing complete OA/GFP co-localization in the optic lobe. **E:** Confocal section of an adult brain showing OA/GFP co-localization in the subesophageal ganglion. **F:** Confocal section of an adult TAG. In the adult TAG all *bwk<sup>tqs</sup>* neurons (green) express OA (red). **G:** Schematic representation of the adult octopaminergic/*bwk<sup>tqs</sup>* neural network. Top = anterior.

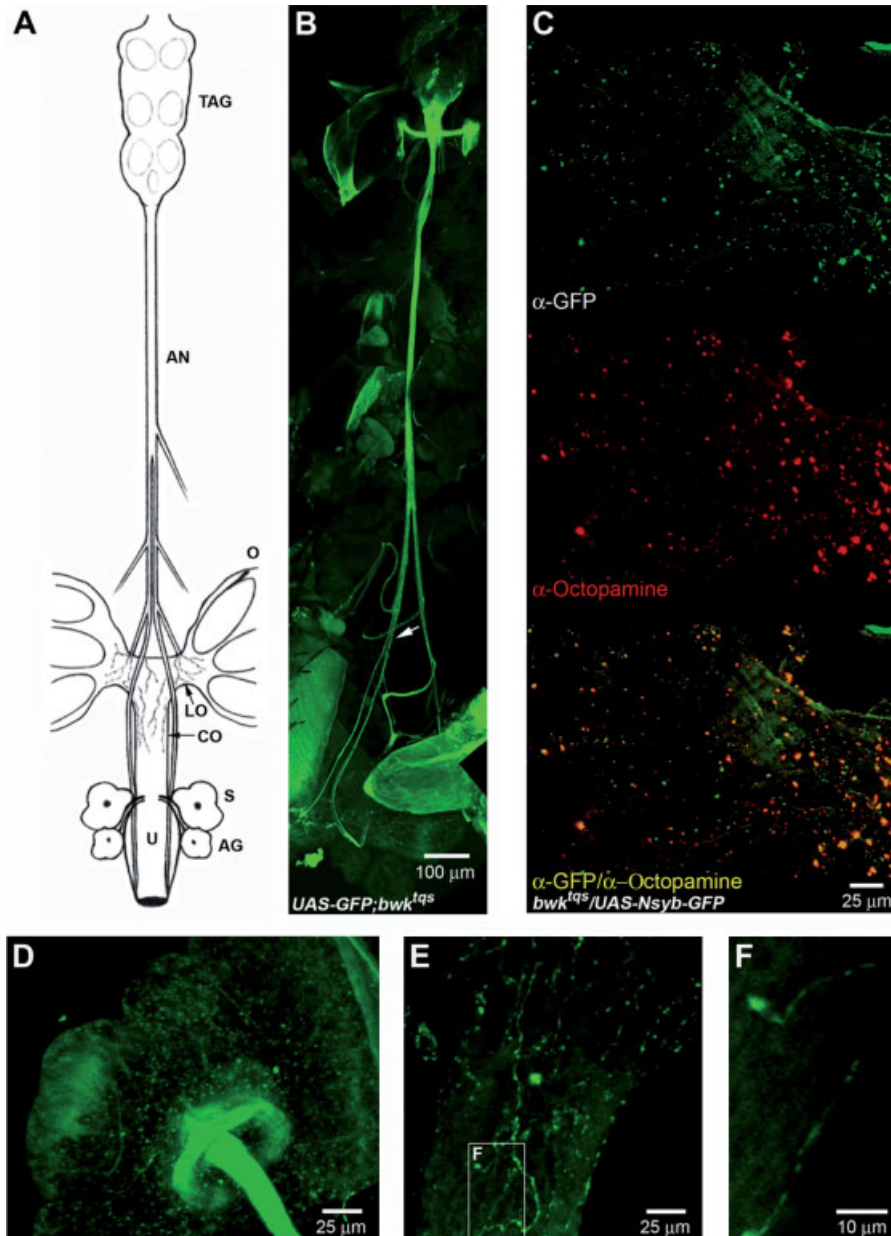


Fig. 5. **A:** Schematic representation of TAG with the abdominal nerve joined to the reproductive female tract. TAG, thoracic abdominal ganglion; AN, abdominal nerve; O, ovary; CO, common oviduct; S, spermathecae; AG, accessory gland; U, uterus. **B:** Actual reproductive tract preparation of a *UAS-GFP;bwk<sup>tqs</sup>* adult female visualized with GFP fluorescence. The image is a reconstruction of several confocal images obtained as in Figure 3. The *bwk<sup>tqs</sup>* neurons in TAG send projections (GFP, arrow) to the reproductive tract. **C:** Oviducts of *bwk<sup>tqs</sup>/UAS-Nsyb-GFP* adult females were double stained as in Figure 4. The synaptic boutons of the *bwk<sup>tqs</sup>* neurons (green)

innervate the oviduct and are octopaminergic (red), overlapping signal in yellow. **D–F:** Spermathecae and oviduct of a *bwk<sup>tqs</sup>/UAS-Nsyb-GFP* adult female imaged directly to visualize GFP fluorescence as in Figure 3. **D, E:** Confocal Z projection of the spermathecae (**D**) and the common oviduct (**E**), the synaptic boutons of the *bwk<sup>tqs</sup>* neurons (GFP<sup>+</sup>) innervate these tissues, the white rectangle represents the region shown in (**F**). Single confocal section of the common oviduct showing that *bwk<sup>tqs</sup>* neurons synaptic boutons are type II (**F**). Top = anterior.

nerve close to the bifurcation that innervates the genital tract in the presence or absence of different neuromodulatory agents (Materials and Methods). Figure 7A,B illustrate the wt (*Oregon-R*) oviduct response to electrical stimulation of the nerve. Before stimulation, the oviduct is relaxed (part 7A1). When the nerve is stimulated, the oviduct contracts with a series of twitches until it reaches maximal contraction. Part 7A2 shows the oviduct when maximal contraction is achieved, this phase is called nerve-evoked tetany. Part

7A3 shows that after 22 sec of continuous stimulation the muscle relaxes again due to muscle fatigue (Fitts, 1994). The mean contraction history (time course of muscle contraction) of wt oviducts in response to nerve stimulation is illustrated in Figure 7B (left part) (closed circles). In general, muscles respond to an electrical stimulus with a quick contraction and relaxation called a single muscle twitch (Fig. 7B, middle part, st). As shown in this part, the repetitive electrical stimulation at 10 Hz of the oviduct muscle produces a twitch

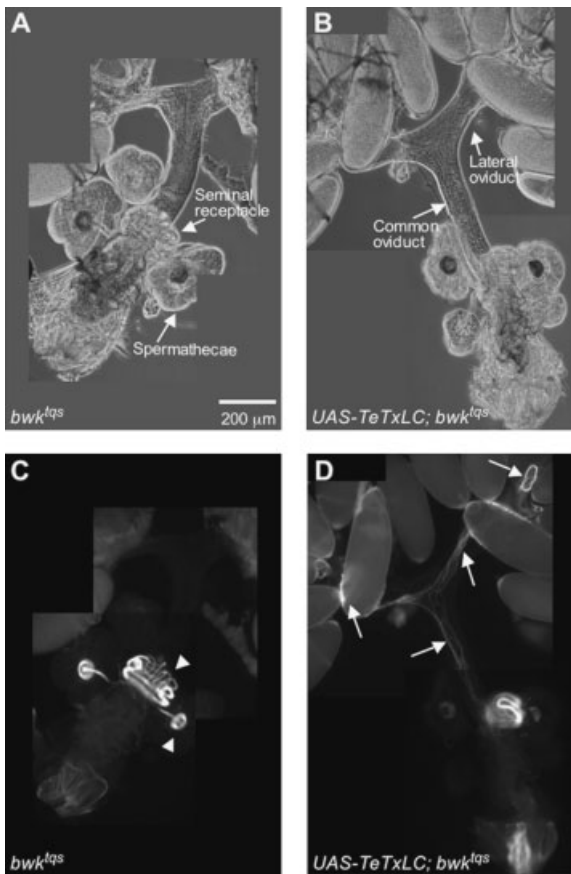


Fig. 6. The *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* heterozygous females have defective sperm storage. Dissected reproductive tracts of control *bwk<sup>tqs</sup>* heterozygous (A and C) and *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* (B and D) females were imaged using phase contrast microscopy (A and B) and fluorescence microscopy (C and D) to visualize sperm GFP fluorescence. Arrowheads in (C) show the normal localization of sperm in the storage organs. Arrows in (D) indicate abnormal localization in the whole oviduct of the *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* females. Top = anterior.

summation phenomenon previously described for different muscle types (Parmiggiani and Stein, 1981; Stein and Parmiggiani, 1981; Riener, 1997; van Zandwijk et al., 1998; Baudry et al., 2005). A twitch summation phenomenon happens when a second stimulus is applied before a muscle twitch is over, the second stimulus provides a signal for a second muscle twitch before the muscle is able to relax completely, therefore, the muscle contracts even more until it arrives to the maximal contraction stage. Figure 7B (middle part) shows an expanded view of the twitch summation phase of wt oviducts (closed circles). The maximal value of the contraction ratio during tetany (tetany peak) is  $0.26 \pm 0.04$  and is achieved within  $5.6 \pm 1.6$  sec after nerve stimulation began (Fig. 7B dashed line in left part and Table 2). After reaching maximal contraction, the muscle begins to relax, in spite of continuous nerve stimulation this is classically described as muscle fatigue (Garland et al., 1988; Fitts, 1994). During the fatigue phase, the amplitude of every single twitch becomes smaller than in the macroscopic contraction phase causing a diminishment on the muscle contraction ratio. The half relaxation or fatigue time ( $RT_{1/2}$ ) was  $11.9 \pm 2.0$  sec for wt flies (right part of Fig. 7B closed circles and Table 2). In control conditions,

the whole oviduct contraction history of *wt* flies lasts around  $25 \pm 5$  sec and the oviduct gets completely fatigued (Fig. 7B, left part closed circles). In addition, the average number of observed single twitches (N) was  $7.0 \pm 1.0$  (Table 2), where N represents a measurement of contractile activity induced in the oviduct.

Having characterized the response of wt muscles to nerve stimulation, we proceeded to investigate the effect of OA on this phenomenon (Fig. 7A). In electrically stimulated oviducts, the application of  $10 \mu\text{M}$  OA drastically inhibited muscular contraction (Fig. 7A1', 2', 3' and parts 7B open squares). When OA was applied to the bath, maximal muscle contraction ratio diminished to about one-fourth of the control (Table 2). The average number of observed single twitches was also reduced (Table 2). Therefore, OA inhibits nerve-evoked oviduct contraction. In *Locusta*, proctolin potentiates oviduct contraction (Nykamp and Lange, 2000). We tested the effect of proctolin on the *Drosophila* oviduct. Figure 7C (open triangles) shows that  $2 \text{ nM}$  proctolin enhances the oviduct contraction ratio. The time to tetany peak in presence of proctolin (Table 2) was statistically similar to the electrically stimulated control flies. However, proctolin slows down the time course of muscular relaxation phase or fatigue (Fig. 7C, right part open triangles). Proctolin also increased significantly the number of single twitches per experiment (Table 2). Parts 7D (open hexagons) show that OA prevents the effect of proctolin when both agents are added simultaneously (Table 2). The time to tetany peak corresponding to the simultaneous addition of the neuromodulators is showed in Table 2. Interestingly, the muscle contraction ratio reached a plateau after 5 sec when both neuromodulators were present, therefore, it was not possible to determine a  $RT_{1/2}$  for this experimental condition (Fig. 7D, right part open hexagons and Table 2). The number of single twitches was similar to the control condition. It has been suggested that the antagonistic effect of OA is mediated through a molecular mechanism that involves the increment of intracellular cAMP (Lange and Nykamp, 1996). To test this hypothesis we added  $50 \mu\text{M}$  of IBMX to the OA/proctolin treatment. IBMX potentiates the inhibition of OA on the effect of proctolin (Fig. 7D, gray diamonds). Simultaneous addition of OA and IBMX reduces the maximal muscle contraction ratio synergistically, totally inhibiting the effect of proctolin (Table 2). Likewise, IBMX also reduces the number of observed single twitches and increased the time to tetany peak (Table 2). Altogether, these observations are similar to those reported in *Locusta* (Nykamp and Lange, 2000) and support the notion that OA acts via a cAMP cascade to relax the oviduct.

**The octopaminergic *bwk<sup>tqs</sup>* neurons control oviduct contraction in *Drosophila* in a way that is dependent of glutamate and octopamine together with an independent group of proctolinergic neurons**

To understand the role of the *bwk<sup>tqs</sup>* neurons we decided to use our preparation to study the effect of their inactivation on oviduct contraction. The response to electrical stimulation of heterozygous *bwk<sup>tqs</sup>* oviducts was undistinguishable from wt and therefore they were used as controls (Fig. 8A, open squares: *bwk<sup>tqs</sup>*, closed circles: *wt*, Table 2). In *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* oviducts, there is a 70% reduction in the contraction ratio (Fig. 8A, gray triangles, Table 2). The average number of single twitches was reduced and the time to tetany peak

duplicated (Table 2). In these animals, the relaxation or fatigue phase was almost abolished and instead, a contraction plateau was observed (Fig. 8A, gray triangles). In *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tg</sup>* flies the oviduct initial size was statistically similar to wt. This result suggests that the initial muscle tone is similar in both cases. In order to elucidate if the lack of OA is the underlying

cause of the observed sterility phenotype, we asked whether both applied OA or OA plus IBMX could rescue contraction in *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tg</sup>* oviducts. In neither case, we were able to rescue the effect of the expression to the TeTxLC. Moreover, the addition of OA or OA plus IBMX completely inhibited the slight muscle contraction evoked in the *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tg</sup>* organism

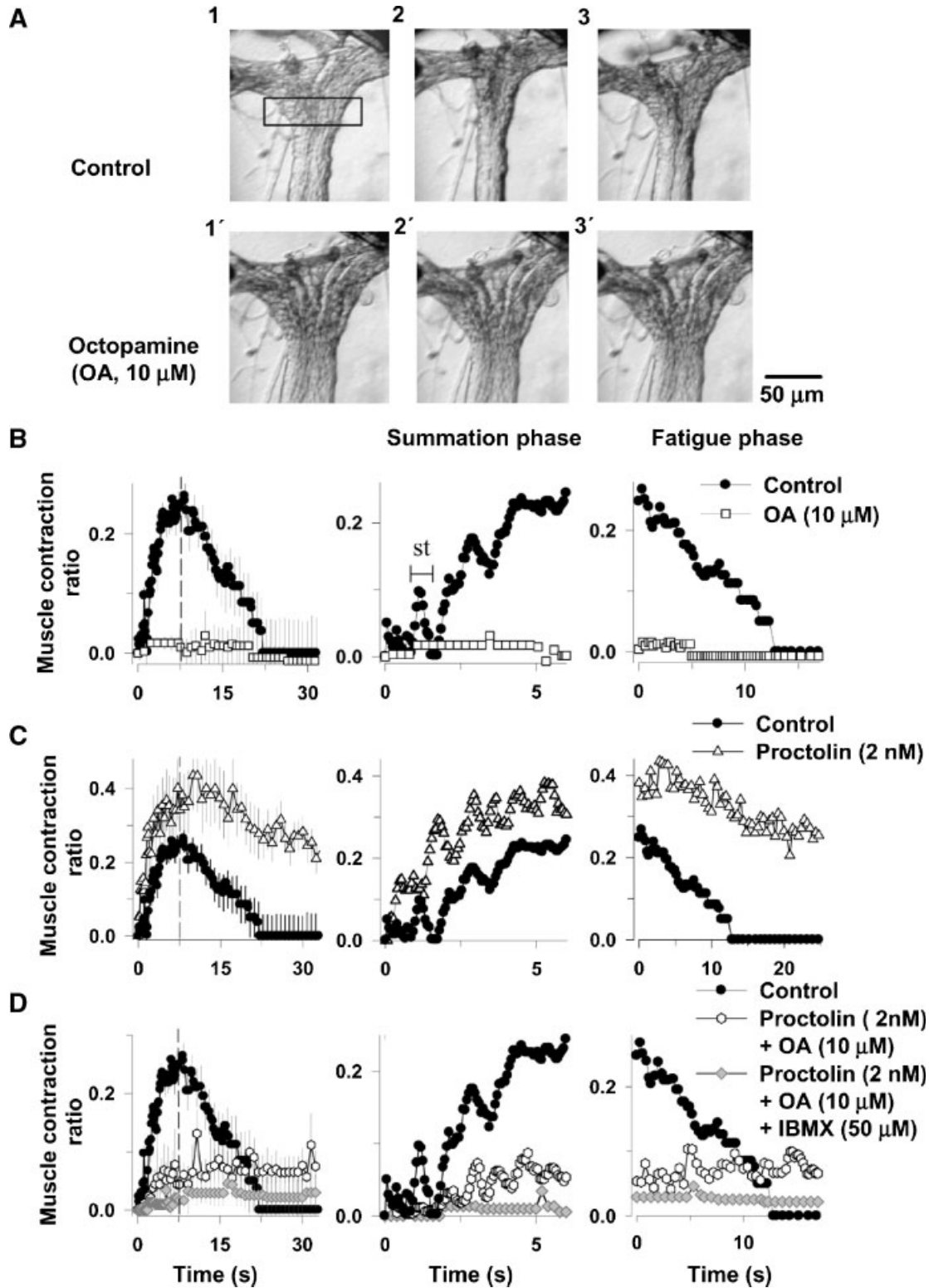


Fig. 7.



TABLE 2. Oviduct contraction parameters of *Drosophila*

Genotype/experimental condition	Maximal muscle contraction ratio	Number of observed single twitches per experiment (N)	Time to tetany peak (sec)	Half-relaxation time (RT <sub>1/2</sub> ) (sec)
<i>wt</i> /control	0.26 ± 0.04	7.0 ± 1.0	5.6 ± 0.6	11.9 ± 2.0
<i>wt</i> /OA (10 μM)	0.07 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.6 ± 1.8 <sup>a</sup>	n.m.	n.m.
<i>wt</i> /proctolin (2 nM)	0.36 ± 0.07 <sup>a</sup>	21.5 ± 2.6 <sup>a</sup>	5.3 ± 2.3	n.m.
<i>wt</i> /proctolin (2 nM) + OA (10 μM)	0.18 ± 0.04	8.2 ± 2.3	9.9 ± 4.5 <sup>a</sup>	n.m.
<i>wt</i> /proctolin (2 nM) + OA (10 μM) + IBMX (50 μM)	0.05 ± 0.02 <sup>a</sup>	2.2 ± 1.1 <sup>a</sup>	14.4 ± 2.4 <sup>a</sup>	n.m.
<i>bwk<sup>tqs</sup></i>	0.29 ± 0.05	10.1 ± 1.8	7.6 ± 1.5	13.8 ± 2.2
<i>UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup></i>	0.07 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.6 ± 2.1	14.4 ± 3.4 <sup>a</sup>	n.m.
<i>UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup></i> + OA (10 μM)	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	n.m.	n.m.
<i>UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup></i> + OA (10 μM) + IBMX (50 μM)	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	n.m.	n.m.
<i>UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup></i> + proctolin (2 nM)	0.06 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.6 ± 1.2 <sup>a</sup>	12.0 ± 2.0 <sup>a</sup>	n.m.
<i>wt</i> /glutamate (16 μM)	0.45 ± 0.07	3.4 ± 0.9	4.1 ± 0.5	11.4 ± 1.9
<i>UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup></i>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	n.m.	n.m.
<i>UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup></i> + glutamate (16 μM)	0.50 ± 0.05	2.8 ± 0.4	10.0 ± 2.0 <sup>a</sup>	n.m.
<i>UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup></i> + glutamate (16 μM) + OA (10 μM)	0.39 ± 0.06	2.6 ± 0.9	4.9 ± 0.9	13.1 ± 2.9

Values are given as means ± SEM. *wt* = *Oregon-R*.  
<sup>a</sup>*P* < 0.05. n.m., non-measurable. *n* ≥ 6.

(Fig. 8A, open hexagons, and Table 2). The inability of OA to rescue the contraction phenotype opposes to the hypothesis that the release of this transmitter was critical for this phenomenon, suggesting that other neurotransmitter could also be involved. If this was the case, and the release of another excitatory neurotransmitter is also prevented in the *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* genotype, a failure to induce nerve-evoked action potentials would be expected. We therefore used intracellular recording to monitor post-synaptic potentials evoked by nerve stimulation in *bwk<sup>tqs</sup>* (control) and *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* flies. Figure 8B (upper part) shows a representative trace of intracellular recording of nerve-evoked post-synaptic potentials in *bwk<sup>tqs</sup>* oviducts, stimulation produced a robust post-synaptic potential of 9.7 ± 3.7 mV, *n* = 10 (arrow) which in turn induced a subsequent action potential (arrowhead). On the other hand, in *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* oviducts (Fig. 8B, lower part), nerve stimulation produced a very reduced post-synaptic depolarization (2.4 ± 0.8 mV, indicated by arrows, *n* = 11) that was not enough to trigger an action potential. The oviduct resting potential (Er) was similar in both groups (Fig. 8B). These results validate the hypothesis that the expression of *TeTxLC* in transgenic flies dramatically diminishes neurotransmitter release at oviduct nerve endings. The reduced contraction and the small post-synaptic depolarizations that are observed in the *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* oviducts could be explained as the release of proctolin from

neurons other than *bwk<sup>tqs</sup>*, for the reason that this neuromodulator can increase muscle tone but cannot induce action potentials (Lange and Nykamp, 1996). In accordance with these results, the addition of proctolin to the external solution did not produce any effect on the phenotype of the *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* flies (Fig. 8C, open diamonds and Table 2). On the other hand, in insects, the main peripheral excitatory neurotransmitter is Glu, this could lead to the possibility that the *bwk<sup>tqs</sup>* neurons could be both octopaminergic and glutamatergic. If so, the inactivation of *bwk<sup>tqs</sup>* neurons would block simultaneously the nerve-evoked neurotransmitter and neuromodulator release. Hence, the addition of OA in the absence of Glu would not be enough to rescue the *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* contraction phenotype. Taking in account these results, we measured wt oviduct contraction induced by the addition of Glu (16 μM) to the external solution in absence of any electrical stimulus. Glu induces oviduct contraction on wt flies including the twitch summation and relaxation phases described above (Fig. 8D, closed circles). The maximal contraction ratio in presence of Glu, the time to peak and the half relaxation time induced by Glu were statistically similar to the nerve-evoked wt response (Table 2) suggesting that Glu is the excitatory neurotransmitter in the fly genital tract. The number of observed single twitches was smaller in presence of this neurotransmitter than when the contraction was induced by nerve stimulation. In *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* organisms, there

Fig. 7. Octopamine and proctolin modulate oviduct contraction in wild-type *Drosophila*. **A:** Representative images of an oviduct contraction paired-experiment in absence (control, upper parts) and presence of OA, (10 μM; lower parts). The black box on part A1 represents the common oviduct region used for the videometrical measurement of the oviduct size at the beginning of the high frequency electrical stimulation protocol (0s). Parts A2 and A3 represent the maximal oviduct contraction after 6 and 22 sec of continuous stimulation in control condition, respectively. A1', A2', and A3' images correspond to the same time as the upper parts but in presence of OA (10 μM). **B:** OA inhibits oviduct contraction. Left part shows the contraction history and muscle contraction ratio of the wild-type oviduct in absence (control, closed circles) and presence of OA (open squares) from the images shown on part A. The vertical dashed line on left part B represents the edge of the two phases of oviduct contraction: the kinetics the contraction phase corresponds to the first 6 sec (shown also on middle part B). The relaxation phase is showed on the right part B and it represents the kinetics of the oviduct contraction after 6 sec of continuous stimulation (dashed line in left

part), st = single twich. **C:** Proctolin enhances the oviduct contraction. The addition of proctolin (open triangles in left, middle, and right parts) enhances the muscle contraction ratio compared to control (closed circles; left, middle, and right parts). In the presence of proctolin (open triangles, right part), the relaxation or fatigue phase shows slower kinetics compared to control (closed circles, right part). **D:** OA inhibits the proctolin enhancement of the oviduct contraction. Proctolin was applied to the oviducts in presence of OA. The co-application of both neuromodulators diminishes the muscle contraction ratio (open hexagons; left, middle, and right parts) to around 80% compared to the proctolin-induced enhancement of the oviduct contraction (open triangles in C parts). IBMX enhances the OA inhibition of the proctolin-induced increase of the oviduct contraction ratio. The simultaneous addition of IBMX and OA causes a stronger inhibition of the proctolin-induced oviduct contraction modulation (gray diamonds) compared to inhibition produced by OA alone (B parts, open squares). All plots, *n* = 6 for each experimental condition. The symbols represent mean ± SEM.

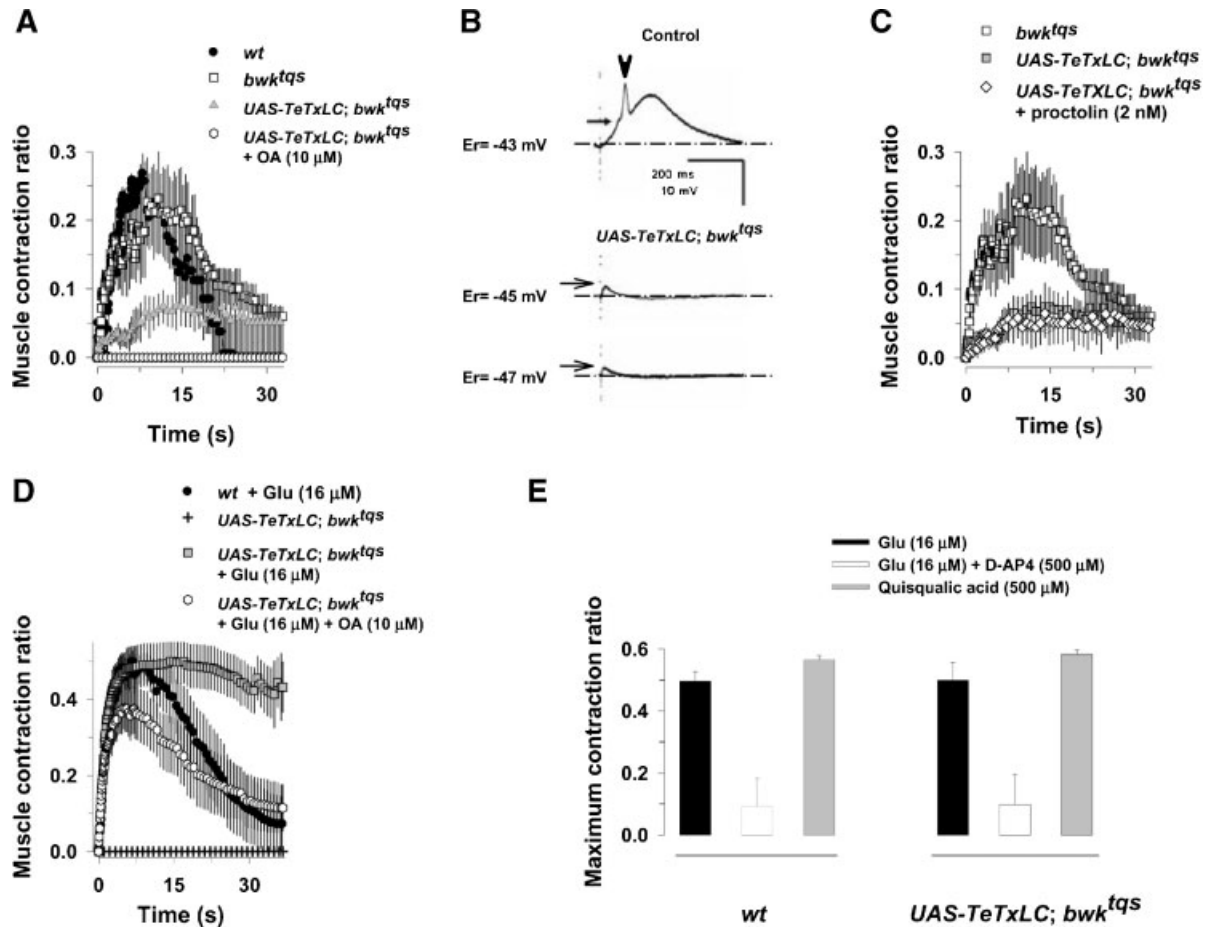


Fig. 8. The inactivation of *bwk<sup>tqs</sup>* neurons reduces dramatically oviduct contraction, inhibits nerve-evoked post-synaptic potentials but a glutamate/octopamine treatment rescues the phenotype. **A**: Oviduct contraction between the *wt* (closed circles) and *bwk<sup>tqs</sup>* insertion (*bwk<sup>tqs</sup>* heterozygous, open squares) flies is statistically similar. The expression of *TeTxLC* derived by *bwk<sup>tqs</sup>* (*UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* flies, gray triangles) on octopaminergic neurons decreases the muscle contraction ratio compared to control (open squares). As previously shown, OA inhibits the contraction ratio of *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* flies (open hexagons). **B**: Nerve-evoked post-synaptic potential (NEPP) in oviduct muscle, upper part shows NEPP in *wt*, at a resting potential ( $E_r$ ) of  $-43$  mV stimulation induces a NEPP of 6.3 mV (arrow), followed by a biphasic action potential (arrowhead). Lower part shows two traces recorded in *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* oviducts. Traces were selected because in both experiments  $E_r$  values were similar to the *wt* recording shown in the upper part. Post-synaptic depolarization

values were 2.4 and 1.5 mV respectively and unable to trigger the firing of an action potential. **C**: The addition of proctolin is not enough to enhance the oviduct contraction ratio of *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* (open diamonds). **D**: Glutamate induced a strong oviduct contraction in *wt* in absence of electrical stimulation (closed circles) but does not reproduce a wild-type oviduct contraction in *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* flies (gray squares). The wild-type oviduct contraction is reproduced with a glutamate/OA treatment in *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* flies (open hexagons). In absence of glutamate or electrical stimulus, spontaneous oviduct contraction is not observed in *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* flies (black crosses). **E**: The glutamate receptor antagonist, D-AP4 (500  $\mu$ M) inhibits glutamate induced oviduct contraction in both *wt* and *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* flies (open bars), whereas the glutamate receptor agonist L-quisqualic acid (500  $\mu$ M) induces oviduct contraction in absence of glutamate (gray bars). All plots,  $n=6$ . The symbols represent mean  $\pm$  SEM.

were no spontaneous oviduct contractions (Fig. 8D, black crosses). The addition of Glu to the external solution induces a strong oviduct contraction in *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* flies (Fig. 8D, gray squares). The maximal muscle contraction in these organisms was similar to *wt* flies. The number of single twitches in *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* animals was also similar to *wt*. The time of tetany peak of *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* flies in presence of Glu was longer than in control flies (Table 2). The relaxation or fatigue phase in presence of Glu is almost completely abolished in *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* flies probably due to the lack of OA in the synapses of these oviducts (Fig. 8D, gray squares). Interestingly, the simultaneous addition of Glu and OA reproduces the whole *wt* oviduct contraction process in *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* flies (Fig. 8D, open hexagons). In these experiments the maximal oviduct contraction of *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* flies treated with Glu/OA is similar to *wt* when

treated only with Glu (Table 2). In these conditions, time to tetany peak is also similar between *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* and *wt* flies (Table 2). The half-relaxation time ( $RT_{1/2}$ ) was statistically similar in both organisms (Table 2). Lastly, the number of single twitches per experiment is also similar in *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* flies treated with Glu plus OA and in *wt* flies (Table 2). These results suggest that *bwk<sup>tqs</sup>* neurons do produce both, Glu and OA, and that both neuroactive substances are necessary to induce an appropriate oviduct contraction in *Drosophila*. To corroborate these data, we did confocal imaging experiments in oviducts from the *UAS-GFP; bwk<sup>tqs</sup>/GluRIIA<sup>RFP</sup>* genotype and found that the *bwk<sup>tqs</sup>* synaptic boutons co-localize with Glu receptor IIA (supplemental Fig. 1) which is a marker of glutamatergic neuromuscular junctions (Rasse et al., 2005). To demonstrate that Glu and its receptors have a central role in oviduct contraction we conducted additional

experiments using D-AP4, a specific but not selective Glu receptor antagonist which strongly blocked Glu-induced oviduct contraction in both genotypes, *wt* and *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* (Fig. 8E, open bars). In accordance with this experiment, L-quisqualic acid a non-selective Glu receptor agonist induced a strong contraction in both genotypes (Fig. 8E, gray bars). Altogether, these data allow us to propose that the TAG neuronal network trapped by *bwk<sup>tqs</sup>* indeed constitute the glutamatergic and octopaminergic input in the genital tract in *Drosophila*.

## DISCUSSION

### The insertion *bwk<sup>tqs</sup>* is a genetic marker of a set of octopaminergic neurons

The *bwk<sup>tqs</sup>* insertion line directs the expression of GAL4 to the octopaminergic neurons of the CNS. A previously reported insertion *P(LacZ)bwk<sup>S482</sup>* (Rittenhouse and Berg, 1995) is also capable of driving, although faintly, the expression of  $\beta$ -GAL to a well-defined group of neurons in the CNS (data not shown). These data suggest for the first time that *bwk* could have a neural function. The insertion *bwk<sup>tqs</sup>* behaves as a genetic marker of octopaminergic neurons during development. The octopaminergic neurons are determined very early in development and the pattern of expression is roughly conserved throughout development, suggesting that in this way it is similar to the development of the serotonergic and dopaminergic neurons (Lundell and Hirsh, 1994).

### The posterior *bwk<sup>tqs</sup>* neurons innervate the female reproductive tract

The *bwk<sup>tqs</sup>* neurons in the posterior TAG innervate the female reproductive tract, explaining the sterility phenotype that is obtained when these neurons are inactivated with the TeTxLC. We discarded any ontological effects of the inactivation of the *bwk<sup>tqs</sup>* neurons through out development by conditionally inactivating them after the whole developmental program was achieved thus demonstrating that the activity of these neurons is necessary for egg laying. These neurons have abundant type II synapses that are positive for OA in the oviduct therefore being consistent with the pattern of expression of the OAMB receptor (Lee et al., 2003). This suggests that the octopaminergic activity of these neurons is indispensable for the control and modulation of the female reproductive tract. Other works have shown that the targeted expression of *T $\beta$ h* to small posterior subsets of neurons in the TAG can rescue sterility phenotype caused by the lack of OA in *T $\beta$ h<sup>nM18</sup>* mutant (Monastirioti, 2003). These data suggest that the most posterior *bwk<sup>tqs</sup>* neurons directly control egg laying and allow us propose that the *bwk<sup>tqs</sup>* neurons may have functional redundancy thus guaranteeing fertilization. The *bwk<sup>tqs</sup>* insertion also traps the most anterior neurons in the thoracic ganglion that innervate other organs and the octopaminergic neurons that are present in the brain and acquire this phenotype late in development. The function of these adult brain octopaminergic neurons remains to be investigated. These neurons could also modulate directly or indirectly the more posterior neurons that regulate oviduct contraction and the function of the whole female reproductive tract. The role of these subgroups of neurons may be further characterized using mosaic expression systems, such as the MARCM (Lee and Luo, 1999). Coordination of ovulation and sperm release from storage is needed for proper egg fertilization (Chapman et al., 2001; Bloch

Qazi et al., 2003). Seeing that the organs responsible for the storage of the spermatozoa are profusely innervated by the *bwk<sup>tqs</sup>* neurons we decided to see if the inactivation of these neurons has an effect on the sperm storage, thus explaining the progeny hatching defect of the *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* females. Our results suggest that the deregulation of the storage organs causes a lack of control of the spermatozoa with the possible consequences of either non-fertilized eggs or polyspermy.

### Oviduct contraction and neuromodulators in the fly

Our experiments show that, in *wt* conditions, the oviduct contraction evoked by stimulation at 10 Hz is actually composed by several sequential contractions, the contraction of the second stimulus is not equal in amplitude to the one produced by the first electrical stimulus, this contraction pattern is called non-linear twitch summation (Stein and Parmiggiani, 1981; Baudry et al., 2005). After reaching maximum contraction (tetany peak) the oviduct relaxes, entering into the fatigue phase, even if nerve-stimulation continues. Many of the cellular mechanisms of muscle fatigue remain unknown (Fitts, 1994; Myburgh and Cooke, 1997) and several mechanisms have been proposed, reviewed in Fitts (1994). However, nothing is known about how different neuromodulators could regulate these potential causes of fatigue in insects. There are several endogenous monoamines that act as neurotransmitters or neuromodulators in *Drosophila*, at least two of them, serotonin and dopamine, and their inactivation has been shown to affect behavior but they are not involved in fertility or oviduct modulation (Li et al., 2000; Monastirioti, 2003). Of the known neuromodulators that do modulate insect oviduct contraction are OA and its agonist proctolin. Knowing that the *bwk<sup>tqs</sup>* neurons are octopaminergic, we decided to study the response to this neuromodulator and its antagonist, proctolin, on the *wt* (*Oregon-R*) *Drosophila* oviduct. Consistent with previous reports in *Locusta*, we found that OA inhibits oviduct contraction while proctolin augments the ability of this tissue to contract. Counter-intuitively, the addition of proctolin strongly affects the fatigue phase of the nerve-evoked oviduct even when this pentapeptide normally induces a bigger contraction ratio. Comparing the maximal *wt* muscle contraction ratio between the nerve-evoked oviduct contraction in presence of proctolin and the Glu-induced oviduct response, it would seem that proctolin increases the average maximal muscle contraction ratio by enhancing pre-synaptic Glu release during electrical stimulation. This idea is consistent with an increase in the number of single twitches (*N*) observed in *wt* nerve-evoked oviduct contraction in the presence of proctolin, considering *N* as a measure of the contractile activity experienced by the muscle induced by the Glu release. However, the effect of proctolin on oviduct fatigue phase is clearly a more complicated phenomenon that should be further studied and the etiology of muscle fatigue have not been clearly established (Fitts, 1994; Myburgh and Cooke, 1997). Different studies have suggested that in mammals, muscle fatigue depends on the number of muscle fiber excitations and/or stimulus frequency (Ward and Robertson, 2000). For instance in humans, the extent of muscle fatigue increases with the stimulus number (Garland et al., 1988). However in *wt* flies, the fatigue phase slows down despite the fact that proctolin increased the number of observed single twitches. This result suggests that the effect of proctolin on the fatigue

phase would probably be due to a chemical stimuli rather than one of electrical nature. A more detailed study is necessary to identify the potential effects of proctolin. Not surprisingly, OA can partially inhibit the enhancement of contraction induced by proctolin, consistent with previously reported studies in *Locusta* (Nykamp and Lange, 2000). In the presence of OA/proctolin, the *N*-value is statistically similar to the control but the maximal muscle contraction ratio is diminished. Therefore, low maximal oviduct contraction activity could contribute to the abolishment of the fatigue phase and the establishment of a contracture state. The enhancement in contraction induced by proctolin is totally abated when IBMX is added together with OA. All together, these data confirm the importance of OA and the cAMP pathway in the neuromodulation of oviduct contraction in *Drosophila* and other insects. These data strongly suggest that at least in the *Drosophila* reproductive tract OA could be central for inducing the fatigue phase in the oviduct thus allowing eggs to move through it.

**Identification of glutamatergic neurons that innervate oviducts**

Interestingly, the fact that we were able to pharmacologically reconstitute with OA/Glu a *wt*-like contraction of *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* oviducts; and that a Glu receptor agonist and an antagonist affect this process, strongly suggests that even when *bwk<sup>tqs</sup>* neurons clearly have type II synaptic terminals, they co-express Glu and OA as it happens in the larvae neuromuscular junction.

These results are also supported by the co-localization in the common and lateral oviducts of Glu-IIA receptor with GFP expressed in the *bwk<sup>tqs</sup>* varicosities. Oviduct response to Glu seems to be at least partially mediated by AMPA and/or metabotropic Glu receptors since L-quisqualic acid is selective for both receptor types (Porter et al., 1992; Schulte et al., 1994; Littman et al., 1995). This work shows that Glu-IIA receptors are expressed in this organ, however, if other types of Glu receptors are expressed remains to be investigated and is beyond the scope of this work. On the other hand, our results suggest that the maturation process of the neuromuscular junction in *Drosophila* is different in the thoracic and abdominal regions, since thoracic type II ending terminals have been reported not to be glutamatergic in adult flies (Rivlin et al., 2004). Considering that the inactivation of the *bwk<sup>tqs</sup>* neurons abolishes about 70% of the oviduct response to electrical stimulation we can propose the following model (Fig. 9). OA and Glu are simultaneously released from the *bwk<sup>tqs</sup>* synaptic terminals when the nerve is stimulated. Post-synaptically, Glu induces oviduct contraction and OA modulates the response to it via cAMP. The small contraction seen in *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* oviducts can be interpreted as an increase in muscular tone that does not induce a large change in muscle potential thus preparing the oviduct for a full contraction cycle. The increase in muscular tone, strongly suggests that proctolin may be produced and released by a different set of neurons. In this model, OA would function as an antagonist for Glu and proctolin and its release would

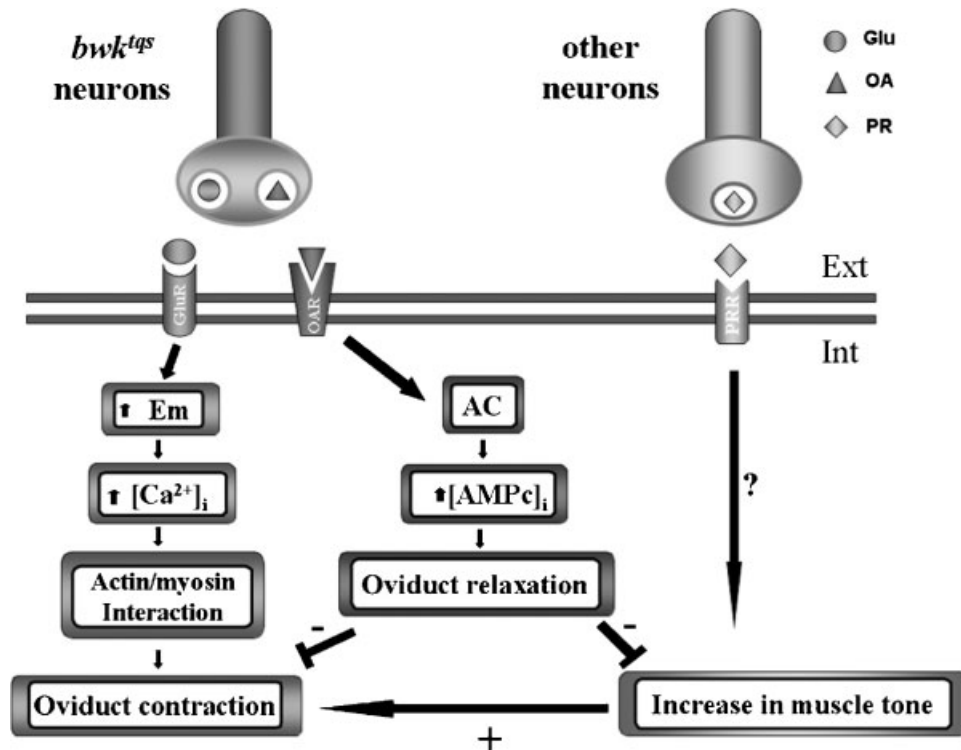


Fig. 9. A model depicting the possible interactions between octopamine, glutamate, and proctolin in the *Drosophila* oviduct. Octopamine and glutamate are released simultaneously from the same *bwk<sup>tqs</sup>* synaptic terminal. In *wt*, glutamate induces an action potential in the oviduct muscle, this response is fast causing a series of twitches, thus inducing a classical muscle contraction process. Simultaneously, octopamine stimulates the production of cAMP, this signal cascade is slower so its effects are only apparent after several seconds, when

the cAMP signal grows strong enough to induce muscle relaxation or fatigue. Proctolin is released from some other synaptic terminal increasing muscular tone, thus explaining the fact that in *UAS-TeTxLC; bwk<sup>tqs</sup>* oviducts nerve stimulation only produces an increase in muscular tone but no contraction. In this model the effect of octopamine is antagonist to both, glutamate and proctolin. GluR, glutamate receptor; OAR, octopamine receptor; PRR, proctolin receptor.

promote muscle fatigue or relaxation. The simultaneous liberation of OA with Glu was probably selected because the octopaminergic signal is slower than the glutamatergic allowing the muscle to contract before entering fatigue thus providing a simple yet robust mechanism to induce fatigue at the correct moment after contraction, thus abolishing the need of a continuous pulsatile neurotransmitter release, this would guaranteed that once an egg begins to be laid the process would become irreversible and involuntary so the egg would be laid regardless of the environmental conditions. Our results are in accordance with a negative feedback loop such as the one proposed by Nishikawa et al., where they demonstrate that OA inhibits Glu pre-synaptic release and post-synaptic muscle response (Nishikawa and Kidokoro, 1999). The use of a genetic system allows us to evaluate previous models of insect oviduct contraction that propose that the excitatory neurons controlling oviduct contraction co-express Glu and proctolin (Lange and Nykamp, 1996) in contrast to this model, our data show that at least in *Drosophila* OA is co-expressed with Glu and that proctolin is probably expressed in an independent set of neurons.

In conclusion, our results show that the adult posterior TAG neurons trapped by the *bwk<sup>lqs</sup>* insertion co-express OA and Glu in type II visceral innervations and are central for the modulation of egg laying.

It is important to remark that the study of insect neural circuits has been difficult mostly because of the small size of the neurons and because the CNS is protected by a hard cuticle. The study of the insect reproductive tract has also been difficult for the same reasons restricting it basically to *Locusta*, which is relatively big, but it is not a good genetic model. Our data demonstrate that the fruit fly is an ideal model to study the physiology of oviposition because it allows us to attack the problem from a genetic point of view and has a physiological behavior that is similar to other insects where it is impossible to do genetic manipulations. In this work we present a paradigm that allows the study of neural networks, in a comprehensive way that includes genetics, development, morphology, and physiology. This kind of integrative approach will allow us to further understand the overall dynamics of neural networks and the role of neuromodulators and their receptors in behavior.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the technical support of the DNA sequence and DNA synthesis facilities of the Instituto de Biotecnología. Also, we thank Alma Valle and Ricardo Ciria for computer technical support and Andres Saralegui for confocal microscopy technical support. Dr. Reynaud also wants to acknowledge the Pew Charitable Trust for his Latin American Pew fellowship. Dr. Labarca and Dr. Zurita are supported by a Howard Hughes Medical Institute grant.

#### LITERATURE CITED

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25(17):3389–3402.

Baudry S, Klass M, Duchateau J. 2005. Postactivation potentiation influences differently the nonlinear summation of contractions in young and elderly adults. *J Appl Physiol* 98(4):1243–1250.

Bloch Qazi MC, Heifetz Y, Wolfner MF. 2003. The developments between gametogenesis and fertilization: Ovulation and female sperm storage in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 256(2):195–211.

Brand AH, Perrimon N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118(2):401–415.

Chapman T, Herndon LA, Heifetz Y, Partridge L, Wolfner MF. 2001. The Acp26Aa seminal fluid protein is a modulator of early egg hatchability in *Drosophila melanogaster*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 268(1477):1647–1654.

Clark J, Lange AB. 2003. Octopamine modulates spermathecal muscle contractions in *Locusta migratoria*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 189(2):105–114.

Cole SH, Carney GE, McClung CA, Willard SS, Taylor BJ, Hirsh J. 2005. Two functional but non-complementing *Drosophila* tyrosine decarboxylase genes: Distinct roles for neural tyramine and octopamine in female fertility. *J Biol Chem* 280:14948–14955.

Demerec M. 1950. *Biology of Drosophila*. New York: Wiley. x, 632p.

Fitts RH. 1994. Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiol Rev* 74(1):49–94.

Flybase Database. 2003. The FlyBase database of the *Drosophila* genome projects and community literature. *Nucleic Acids Res* 31(1):172–175.

Garland SJ, Garner SH, McComas AJ. 1988. Relationship between numbers and frequencies of stimuli in human muscle fatigue. *J Appl Physiol* 65(1):89–93.

Itō K, Suzuki K, Estes P, Ramaswami M, Yamamoto D, Strausfeld NJ. 1998. The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn Mem* 5(1–2):52–77.

Kalogianni E, Theophilidis G. 1993. Centrally generated rhythmic activity and modulatory function of the oviductal dorsal unpaired median (DUM) neurons in two orthopteran species (*Calliptamus* sp. and *Decticus albifrons*). *J Exp Biol* 174:123–138.

Lange AB, Nykamp DA. 1996. Signal transduction pathways regulating the contraction of an insect visceral muscle. *Arch Insect Biochem Physiol* 33(3–4):183–196.

Lange AB, Orchard I. 1984. Dorsal unpaired median neurons, and ventral bilaterally paired neurons, project to a visceral muscle in an insect. *J Neurobiol* 15(6):441–453.

Lee T, Luo L. 1999. Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* 22(3):451–461.

Lee HG, Seong CS, Kim YC, Davis RL, Han KA. 2003. Octopamine receptor OAMB is required for ovulation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 264(1):179–190.

Li H, Chaney S, Roberts LJ, Forte M, Hirsh J. 2000. Ectopic G-protein expression in dopamine and serotonin neurons blocks cocaine sensitization in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* 10(4):211–214.

Littman L, Chase LA, Renzi M, Garlin AB, Koerner JF, Johnson RL, Robinson MB. 1995. Effects of quisqualic acid analogs on metabotropic glutamate receptors coupled to phosphoinositide hydrolysis in rat hippocampus. *Neuropharmacology* 34(8):829–841.

Lundell MJ, Hirsh J. 1994. Temporal and spatial development of serotonin and dopamine neurons in the *Drosophila* CNS. *Dev Biol* 165(2):385–396.

McGuire SE, Le PT, Osborn AJ, Matsumoto K, Davis RL. 2003. Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* 302(5651):1765–1768.

Monastirioti M. 2003. Distinct octopamine cell population residing in the CNS abdominal ganglion controls ovulation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 264(1):38–49.

Monastirioti M, Gorczyca M, Rapus J, Eckert M, White K, Budnik V. 1995. Octopamine immunoreactivity in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 356(2):275–287.

Monastirioti M, Linn CE Jr, White K. 1996. Characterization of *Drosophila* tyramine beta-hydroxylase gene and isolation of mutant flies lacking octopamine. *J Neurosci* 16(12):3900–3911.

Myburgh KH, Cooke R. 1997. Response of compressed skinned skeletal muscle fibers to conditions that simulate fatigue. *J Appl Physiol* 82(4):1297–1304.

Nishikawa K, Kidokoro Y. 1999. Octopamine inhibits synaptic transmission at the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. *Brain Res* 837(1–2):67–74.

Nykamp DA, Lange AB. 2000. Interaction between octopamine and proctolin on the oviducts of *Locusta migratoria*. *J Insect Physiol* 46(5):809–816.

Orchard I, Lange AB. 1985. Evidence for octopaminergic modulation of an insect visceral muscle. *J Neurobiol* 16(3):171–181.

Orchard I, Lange AB. 1986. Neuromuscular transmission in an insect visceral muscle. *J Neurobiol* 17(5):359–372.

Parmiggiani F, Stein RB. 1981. Nonlinear summation of contractions in cat muscles. II. Later facilitation and stiffness changes. *J Gen Physiol* 78(3):295–311.

Porter RH, Roberts PJ, Jane DE, Watkins JC. 1992. (S)-homoquisqualate: A potent agonist at the glutamate metabotropic receptor. *Br J Pharmacol* 106(3):509–510.

Rasse TM, Fouquet W, Schmid A, Kittel RJ, Mertel S, Sigrist CB, Schmidt M, Guzman A, Merino C, Qin G, Quentin C, Madoe FF, Heckmann M, Sigrist SJ. 2005. Glutamate receptor dynamics organizing synapse formation in vivo. *Nat Neurosci* 8(7):898–905.

Riener RajQ. 1997. A physiologically based model of muscle activation verified by electrical stimulation. *Bioelectrochem Bioenerg* 43(2):257–264.

Rittenhouse KR, Berg CA. 1995. Mutations in the *Drosophila* gene *bullwinkle* cause the formation of abnormal eggshell structures and bicaudal embryos. *Development* 121(9):3023–3033.

Rivlin PK, St Clair RM, Vilinsky I, Deitcher DL. 2004. Morphology and molecular organization of the adult neuromuscular junction of *Drosophila*. *J Comp Neurol* 468(4):596–613.

Roeder T. 1999. Octopamine in invertebrates. *Prog Neurobiol* 59(5):533–561.

Santel A, Winhauer T, Blumer N, Renkawitz-Pohl R. 1997. The *Drosophila* *don juan* (*dj*) gene encodes a novel sperm specific protein component characterized by an unusual domain of a repetitive amino acid motif. *Mech Dev* 64(1–2):19–30.

Schulte MK, Roon RJ, Chalmers DJ, Sunter DC, Koerner JF. 1994. Utilization of the resolved L-isomer of 2-amino-6-phosphonohexanoic acid (L-AP6) as a selective agonist for a quisqualate-sensitized site in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Brain Res* 649(1–2):203–207.

Stein RB, Parmiggiani F. 1981. Nonlinear summation of contractions in cat muscles. I. Early depression. *J Gen Physiol* 78(3):277–293.

- Stewart BA, Atwood HL, Renger JJ, Wang J, Wu CF. 1994. Improved stability of *Drosophila* larval neuromuscular preparations in haemolymph-like physiological solutions. *J Comp Physiol [A]* 175(2):179–191.
- Sullivan W, Ashburner M, Hawley RS. 2000. *Drosophila* protocols. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. xiv, 697p.
- Sweeney ST, Broadie K, Keane J, Niemann H, O’Kane CJ. 1995. Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron* 14(2):341–351.
- Taylor BJ. 1989. Sexually dimorphic neurons of the terminalia of *Drosophila melanogaster*: II. Sex-specific axonal arborizations in the central nervous system. *J Neurogenet* 5(3):193–213.
- van Zandwijk JP, Bobbert MF, Harlaar J, Hof AL. 1998. From twitch to tetanus for human muscle: Experimental data and model predictions for *m. triceps surae*. *Biol Cybern* 79(2):121–130.
- Ward AR, Robertson VJ. 2000. The variation in fatigue rate with frequency using kHz frequency alternating current. *Med Eng Phys* 22(9):637–646.