



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

“Caracterización de fenotipos mutantes de *piragua (prg)* en el sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*”

TESIS INDIVIDUAL
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
César Cano Zepeda

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar
Instituto de Neurobiología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda
Instituto de Neurobiología, UNAM

Dr. Mario Enrique Zurita Ortega
Instituto de Biotecnología, UNAM

Diciembre de 2023
Juriquilla, Querétaro.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

Se requiere críticamente del gen *piragua* (*prg*) para el desarrollo embrionario y para la formación de distintas estructuras de la mosca adulta de *Drosophila melanogaster*, como el tórax, los ojos y la cabeza. La pérdida de función de *prg* en estos tejidos produce fenotipos aberrantes que llevan a malformaciones o destrucción de las estructuras principales que los componen. En este estudio se caracterizaron los fenotipos resultantes de la falta de función del gen *prg* en el sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*. Mediante técnicas de inmunohistoquímica se marcaron los componentes principales del sistema nervioso embrionario y de larvas tempranas para poder ser observadas con microscopía óptica y de fluorescencia en mutantes a *prg*. En este trabajo demostramos que el gen *prg* es requerido para la formación del sistema nervioso de la mosca de la fruta. En particular encontramos que las células de la glía son las que se ven afectadas en mayor manera ante una falta de función del gen *prg*. También caracterizamos un fenotipo encontrado exclusivamente en el cerebro de las larvas homocigotas mutantes descrito como la pérdida de la Cadena Nerviosa Ventral. Finalmente encontramos que los cerebros de las larvas mutantes no replican los fenotipos tan aberrantes que se encontraron en las estructuras del sistema nervioso de los embriones.

Palabras clave: *piragua*, microscopía de fluorescencia, inmunohistoquímica, Cadena Nerviosa Ventral, células de la glía.

ABSTRACT

The *piragua* (*prg*) gene is critically required during embryonic development and for the formation of various structures in the adult fly *Drosophila melanogaster*, such as the thorax, eyes, and head. *prg* loss of function in these tissues leads to aberrant phenotypes resulting in malformations or destruction of the main structures they comprise. This study characterized the resulting phenotypes from the loss of *prg* gene function in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. Immunohistochemical techniques were used to label the major components of the embryonic nervous system and early larvae for observation using optical and fluorescence microscopy in *prg* mutant embryos and larvae. In this work, we assert that the *prg* gene is required for the formation of the fruit fly nervous system. Particularly, we found that glial cells are most significantly affected by a lack of *prg* gene function. We also characterized a phenotype found exclusively in the brains of homozygous mutant larvae, described as loss of the Ventral Nerve Cord. Finally, in mutant *prg* larvae escapers, we found that their brains do not replicate the highly aberrant phenotypes observed in the nervous system structures of the embryos.

Key words: *piragua*, *fluorescence microscopy*, *immunohistochemistry*, *Ventral Nerve Cord*, *glial cells*.

AGRADECIMIENTOS

Al CONCYT por brindar el apoyo económico durante mi posgrado para realizar este trabajo.

A PAPIIT por apoyar económicamente mediante el proyecto IN209622-3.

A la doctora Sofía Yolanda Díaz Miranda y al doctor Mario Enrique Zurita Ortega por aportar con conocimiento y consejos durante los exámenes tutorales.

A Elsa Nydia Hernández Ríos por todo su apoyo durante las sesiones de uso del microscopio confocal.

Al doctor Juan Manuel Murillo Maldonado por todo el apoyo brindado dentro del laboratorio, y por sus consejos que fueron cruciales para realizar mis experimentos.

A mis amigos de la maestría Juliana, Sara, Chuy, Leyma, Valeria, Richie, ya que sin ellos no hubiera sido ni la mitad de divertido el posgrado.

Al doctor Juan Rafael Riesgo Escovar, por el espacio, por los consejos, por la ayuda por su mentoría, por todo lo que ha aportado a mi formación académica; y finalmente, por su amistad.

***A mis padres y a mis hermanos.
Por siempre impulsarme a ser mejor
y seguir adelante con mis proyectos***

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
AGRADECIMIENTOS	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
ANTECEDENTES	11
<i>Drosophila melanogaster</i> como modelo genético	11
Estructura y composición del sistema nervioso del embrión.....	11
Desarrollo del sistema nervioso en <i>Drosophila melanogaster</i>	12
Características del gen <i>piragua</i>	15
<i>prg</i> en el desarrollo embrionario.....	15
El sistema nervioso de las larvas tempranas.....	16
La glía en el sistema nervioso de la mosca.....	17
Las comisuras axonales de <i>Drosophila melanogaster</i>	19
<i>prg</i> en el desarrollo del ojo adulto y tórax.....	20
Alelos mutantes <i>prg1</i> y <i>prg3</i>	21
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	23
Objetivo general.....	23
Objetivos particulares.....	23
MATERIALES Y REACTIVOS	23
Materiales	23
Reactivos	24
Equipos.....	24
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	25
Líneas de moscas	25
Obtención de embriones mutantes.....	25
Obtención de larvas homocigotas mutantes	26
Disección de cerebros de larva.....	27
Fijación de los embriones	27
Inmunohistoquímica de cerebros de larva.....	27
Fabricación de las canastillas para cerebros de larvas	28

Inmunohistoquímica de embriones	29
Observación de muestras en microscopio confocal	31
Montaje de cerebros de larvas y observación en microscopio óptico.....	31
Análisis estadístico.....	31
RESULTADOS	33
Estandarización de embriones heterocigotos	33
Anticuerpos para marcar el sistema nervioso durante la embriogénesis.....	35
Defectos en la formación del sistema nervioso durante la embriogénesis	36
La mutación al gen <i>piragua</i> induce defectos en los axones a distintos niveles ...	37
Defectos severos en las células de la glía en embriones mutantes a <i>piragua</i>	39
Caracterización de defectos externos en el cerebro de larvas mutantes a <i>prg</i>.....	42
Defectos de embriones y cerebros vistos en microscopio confocal	43
DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIONES.....	50
PERSPECTIVAS DEL TRABAJO	50
BIBLIOGRAFÍA.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Desarrollo del sistema nervioso de la mosca en las etapas embrionarias.	14
Figura 2 Características principales del gen <i>piragua</i>	21
Figura 3 Fabricación de canastillas para retener cerebros de larva.	29
Figura 4 Anticuerpos primarios utilizados en el marcaje de embriones y cerebros de larvas.	30
Figura 5 Esquemas de la metodología completa.	32
Figura 6 Estandarización de embriones mutantes seleccionados.	34
Figura 7 Anticuerpos primarios utilizados para teñir los diferentes componentes neuronales durante el desarrollo embrionario..	36
Figura 8 Fenotipos aberrantes en las diferentes etapas del desarrollo embrionario con marcaje de neuronas.	37
Figura 9 Descripción de fenotipos aberrantes en proyecciones neuronales.	38
Figura 10 Mutantes a <i>piragua</i> en células gliales.	40
Figura 11 Proporciones en los fenotipos mutantes cuantificados por anticuerpo..	41
Figura 12 Defectos externos en cerebros de larvas del primer estadio mutantes a <i>piragua</i>	43
Figura 13 Cerebros de primer estadio larvario mutantes a <i>piragua</i>	45

INTRODUCCIÓN

El uso de organismos modelo, como *Drosophila melanogaster*, para estudiar procesos genéticos y del desarrollo ha facilitado la resolución de diversas preguntas a lo largo de los años. Actualmente, son muchas las ventajas que se tienen al utilizar a la mosca de la fruta para trabajos de investigación, pues además de tener todo su genoma secuenciado, tienen un ciclo de vida corto, alta progenie en su descendencia, y bajos costos de mantenimiento, entre otros (Greenspan, 1997). Tal ha sido el impacto del trabajo utilizando *D. melanogaster* en el mundo de la investigación que ha sido acreedor de 6 premios Nobel. Se sabe que arriba de dos tercios de los genes cuyos alelos mutantes causan enfermedades en humanos tienen homólogos en *D. melanogaster*. De allí se deriva que es de gran utilidad e importancia caracterizar la función, estructura y defectos de estos genes y proteínas en modelos genéticos como *Drosophila* (Bier, 2005).

El desarrollo del sistema nervioso de la mosca es un proceso que ha sido ampliamente estudiado y del que se tiene una buena descripción durante todo el ciclo de vida de la mosca. La generación del anlagen neural, la formación de los neuroblastos y la diferenciación de las diferentes estructuras neuronales que conforman todo el sistema nervioso, entre otros, son procesos que dependen de una enorme colaboración genética, y se sabe que eso implica la participación y regulación de múltiples genes y proteínas (Campos-Ortega & Hartenstein, 1997; Campuzano & Modolell, 1992; Egger et al., 2008). Sin embargo, estos mecanismos reguladores aún están lejos de estar descritos por completo. En este trabajo caracterizaremos los fenotipos mutantes generados en el sistema nervioso por la pérdida de función del gen *piragua* (*prg*) en diferentes etapas del desarrollo y en las diversas estructuras que conforman el sistema nervioso. *El gen piragua* codifica para una proteína con un dominio asociado a zinc y nueve dedos de zinc de tipo C₂H₂. Los dedos de zinc son dominios que, mediante la interacción con iones de zinc, pueden formar estructuras parecidas a un dedo en la proteína y a partir de ellas facilitar la interacción con el ADN, ARN y proteínas. El dominio asociado a zinc

se especula que tiene la función de facilitar la interacción proteína-proteína (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017). Durante la embriogénesis, el gen *prg* es muy dinámico, pues su expresión, tanto del mRNA cómo de la proteína, cambia en diferentes estadios del desarrollo. Alelos mutantes en homocigosis del gen generan fenotipos de letalidad en aproximadamente la mitad de los embriones. Más adelante en el desarrollo, *prg* se expresa en tejidos imaginales como los discos del ojo-antena, ala y pata (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017). En trabajos recientes de nuestro laboratorio se han caracterizado a profundidad los defectos que se generan en moscas mutantes para *prg* en el tejido visual de la mosca adulta (Cano-Zepeda, tesis de licenciatura 2021). El sistema visual de los metazoarios forma parte del sistema nervioso periférico; los fenotipos aberrantes que presentan las moscas mutantes de *prg* en estas estructuras nos sugieren que podrían existir defectos mayores en el sistema nervioso de las moscas durante su desarrollo, posiblemente siendo estos defectos los causantes de la letalidad embrionaria en los homocigotos mutantes. Mediante técnicas de inmunohistoquímica, en este trabajo realizamos una amplia descripción del sistema nervioso de mutantes de *prg* y controles en *D. melanogaster* durante el desarrollo embrionario y en tejidos larvarios y adultos.

ANTECEDENTES

***Drosophila melanogaster* como modelo genético**

Drosophila melanogaster es un modelo genético de estudio por su facilidad de manejo, su rápido ciclo de vida, sus costos de mantenimiento bajos, y similitud genética con el humano, entre muchas otras cosas (Greenspan, 1997). Este modelo ha sido utilizado por más de cien años para estudiar los componentes genéticos y moleculares que forman parte del desarrollo del organismo (Bier, 2005) y, aunque hoy en día se conocen varios aspectos sobre su desarrollo, todavía hay varias preguntas y mucho trabajo por hacer en esta rama.

En particular, la mosca de la fruta ha servido para estudiar y caracterizar los genes que se requieren durante el desarrollo. Estos genes están evolutivamente conservados, y son los que guían, en general, el desarrollo de los metazoarios. La labor pionera de los laboratorios de Nüsslein-Volhard y Wieschaus en el aislamiento y caracterización de los primeros de estos genes fue objeto de un merecido premio Nobel (Nüsslein-Volhard & Wieschaus, 1980). En esta tesis caracterizamos los fenotipos mutantes en el sistema nervioso de *Drosophila melanogaster* en fondos mutantes para *piragua*.

Estructura y composición del sistema nervioso del embrión

El sistema nervioso de los embriones de la mosca está compartimentalizado con un total de 19 segmentos denominados neurómeros. Tres de ellos pertenecen a la parte del cerebro y el resto son los neurómeros del cordón nervioso ventral (CNV). Los neurómeros del cerebro son llamados: protocerebro, deutocerebro y tritocerebro; cada uno de estos neurómeros tendrán una diferente cantidad de neuroblastos: 160 para el protocerebro, 42 en el deutocerebro y 26 en el tritocerebro (Crews, 2019; Urbach & Technau, 2003). Los neuroblastos son células nerviosas

inmaduras que darán origen al tejido nervioso. Todos los neuroblastos del embrión de la mosca generarán diferentes tipos celulares; sin embargo, cada grupo de neuroblastos en los neurómeros formará grupos únicos de neuronas (Crews, 2019; Schmid et al., 1999).

Los neurómeros del cordón nervioso ventral se dividen en: tres sub-esofágales, tres torácicos, siete abdominales completos y tres abdominales con estructuras reducidas. Cada uno de los neurómeros del cordón nervioso ventral a su vez está dividido en la parte media ventral por células de la línea media, subdividiéndose así en dos hemi-neurómeros a cada lado (Crews, 2019). Como ejemplo de lo compleja que puede llegar a ser la composición del sistema nervioso de los embriones de la mosca, el primer neurómero abdominal de un embrión en la etapa 16 de su desarrollo tiene 715 neuronas (aproximado), 602 interneuronas y 26 células neurosecretoras (Wheeler et al., 2006).

Desarrollo del sistema nervioso en *Drosophila melanogaster*

El sistema nervioso de la mosca de la fruta se genera a partir de una agrupación de células conocido como anlagen neural, que serán las células precursoras del sistema nervioso (Campos-Ortega & Hartenstein, 1997). Para la especificación de estas células y del neuroectodermo, en general, se requiere de la expresión de morfógenos con actividad antagonista al gen morfógeno “*decapentaplegic*” (*dpp*) para evitar un efecto de dorsalización -el sistema nervioso de los invertebrados es ventral- (Gómez-Skarmeta et al., 2003).

Al inicio, en el embrión temprano se diferencian cuatro regiones en la dirección dorsal-ventral que darán origen a diferentes tejidos embrionarios: la amnioserosa, el epitelio dorsal, el neuroepitelio, -del que se diferenciarán el sistema nervioso y la epidermis ventral-, y el mesodermo. La diferenciación entre epidermis y neuronas en el neuroepitelio ventromedial del embrión se rige por medio de la señalización de la vía de Notch (Artavanis-Tsakonas et al., n.d.; Lehmann et al., 1983). La vía de Notch se basa en la señalización entre células vecinas, ya que tanto el ligando (Delta) como el receptor (Notch) son proteínas de membrana, de ahí que se requiere

que las células que están siendo reguladas de manera lateral estén en contacto (Egger et al., 2008; Gilbert, 2006). La regulación de destinos celulares a través de la vía de Notch se da entre grupos de células dispersas en el neuroepitelio en donde todas las células tienen potencial neural; estos grupos de células se conocen como grupos proneurales, porque expresan niveles bajos de genes proneurales (Kubo et al., 2005).

Las células que se van a diferenciar en neuroblastos, precursores del sistema nervioso, expresan mayor cantidad de Delta en sus membranas e inhiben a sus células vecinas en contacto a diferenciarse en neuroblastos, que es el destino de "default". Estas células que se diferencian en neuroblastos se delaminan del neuroepitelio, y se condensan por encima de los epidermoblastos, y por debajo del mesodermo, que se internalizó previamente durante la gastrulación (Crews, 2019; Hwang et al., n.d.).

A su vez los neuroblastos se diferencian en glía y neuronas pasando por una etapa intermedia de células madre ganglionares. La adherencia celular juega un papel indispensable en el proceso de neurogénesis, pues aquellas células que se diferenciarán en neuroblastos tienen que separarse de sus vecinas para poder generar neuronas y aquellas que no formaron neuroblastos deberán compensar los nuevos espacios generados a través de nuevas adhesiones con otras células. Este proceso es regulado por proteínas reguladoras de la polaridad apical (PRPA) y proteínas reguladoras de la polaridad basal (PRPB) (Tepass, 2012).

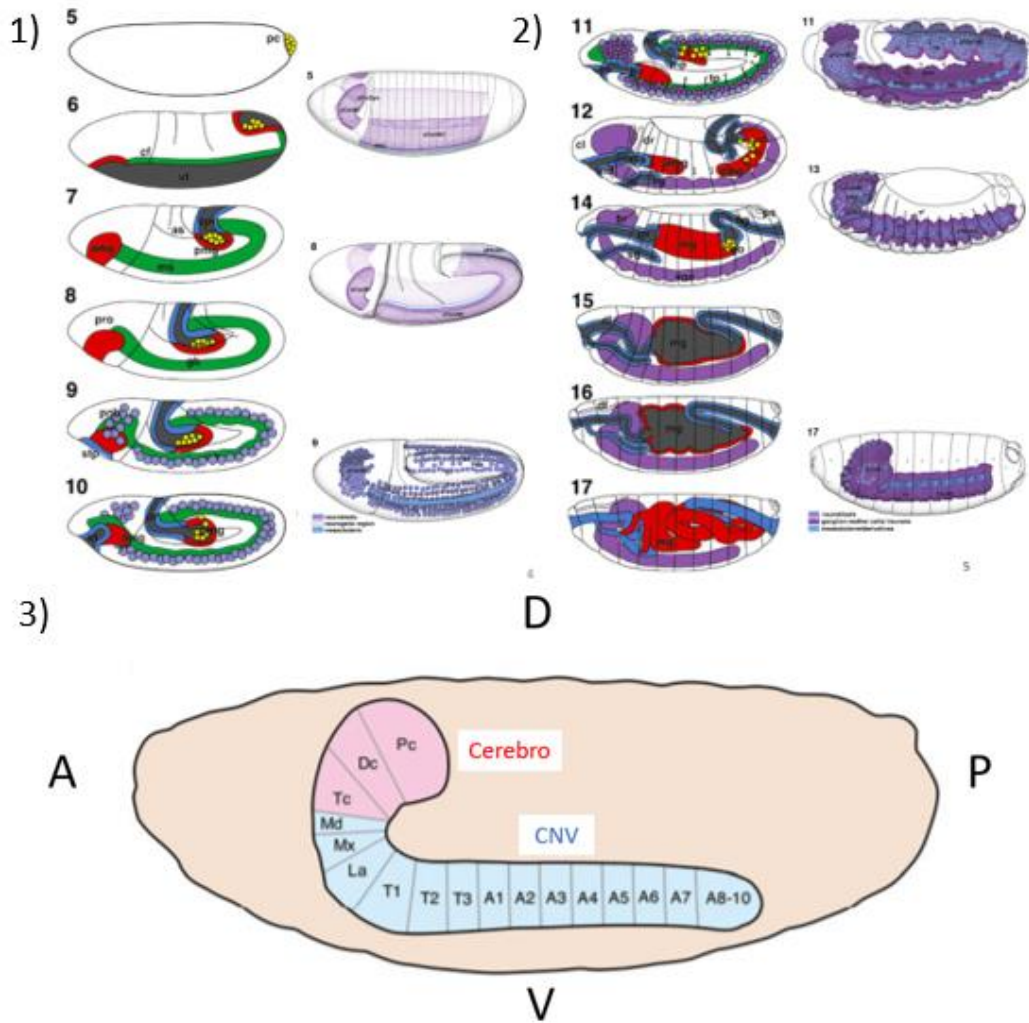


Figura 1 **Desarrollo del sistema nervioso de la mosca en las etapas embrionarias.** 1) Etapas 5 a 10 del desarrollo embrionario. 2) Etapas 11 a 17 del desarrollo embrionario. Durante la etapa 5 se determinan las regiones neurogénicas ventrales y cerebrales en el ectodermo, zonas que contienen neuroblastos y precursores de la epidermis. La etapa 8 ocurre después de la gastrulación, uniendo el mesectodermo y retrasando la mitosis en las regiones neurogénicas. De las etapas 9 a la 11 se delimitan los neuroblastos a partir del ectodermo, determinando las regiones procefálicas y la Cadena Nerviosa Ventral con todos sus neurómeros definidos. Posteriormente, hasta la etapa 13 los neuroblastos se dividirán dando origen a las células madre ganglionares, las cuales darán origen las células del sistema nervioso. A partir de la etapa 13 iniciará la diferenciación neuronal dando origen a células gliales, neuronas, proyecciones de axones y las comisuras nerviosas. En la etapa 14 ocurre la condensación de la Cadena Nerviosa Ventral reduciendo el espacio que esta ocupa en el embrión. Finalmente, en la etapa 17 la segmentación de la Cadena Nerviosa Ventral por neurómeros se pierde, dejando una sola estructura aparente. 3) La estructura en su acomodo dentro del embrión en una secuencia del eje anterior al posterior (A-P). En rojo se muestran los tres neurómeros del cerebro: protocerebro (Pc), deutocerebro (Dc), tritocerebro (Tc). En azul están los neurómeros correspondientes al Cordón Nervioso Ventral (CNV): los primeros tres, desde el eje anterior al posterior, corresponden a los subesofagales: mandibular (Mb), maxilar (Mx) y labial (Lb). T1-T3 corresponden a los

neurómeros torácicos. A1-A7 son los neurómeros abdominales completos y A8-A10 son los abdominales con estructuras reducidas. Obtenida y modificada de Campos-Ortega, J. A. & Hartenstein, V. (1997). *The embryonic development of Drosophila melanogaster*.

Características del gen *piragua*

El gen *piragua* (*prg*) se ha estudiado poco. Hay dos publicaciones que describen aspectos de la función y fenotipos mutantes de este gen (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017; Rhiner et al., 2010). Sin embargo, la información que se ha obtenido sirve de base para describir más detalladamente el funcionamiento, la importancia y el papel que desempeña este gen en el desarrollo de *Drosophila melanogaster*. *prg* tiene un dominio asociado a dedos de zinc (ZAD) en su extremo N-terminal y 9 dedos de zinc (ZF) de tipo C₂H₂ en su secuencia. Se piensa que los dominios de ZF de *prg* interactúan con el ADN, para desempeñar un papel como factor de transcripción (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017). El dominio ZAD sirve para interacciones proteína-proteína, por lo que es posible que Prg actúe como un dímero.

***prg* en el desarrollo embrionario**

En el desarrollo embrionario *prg* se expresa en diferentes momentos y tejidos, lo que sugiere múltiples funciones. Se ha encontrado una alta expresión de *prg* en el endodermo, la línea germinal, durante la extensión y retracción de la línea germinal, el mesodermo y en el epitelio lateral durante el cerrado dorsal. En los discos imaginales, se ha encontrado expresión tanto en el disco del ojo-antena como en los discos de patas, siendo el primero el que tiene una expresión mayor (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017). Todo esto es consistente con que *prg* sea un gen pleiotrópico. Otro aspecto importante se refiere a que hay expresión de *prg* (tanto de cDNA como de proteína) en el sistema nervioso embrionario (Nazario-Yépiz & Riesgo-Escovar, 2017).

Embriones homocigotos mutantes para *piragua* son letales y producen diversos fenotipos, desde muerte temprana antes de la formación de la cutícula, resultando en embriones con puros tejidos blandos que se ven como cubiertas vitelinas vacías en preparaciones de cutículas, y cutículas con fenotipos mutantes de apertura dorsal e involución de la cabeza. El fenotipo de apertura dorsal se observa cuando

el embrión falla en cerrar una brecha de células epidermales en la parte dorsal del embrión de la mosca, dejando un orificio por el que el contenido del embrión se sale y, por ende, muere (Jacinto et al., 2002). La involución de la cabeza es un proceso que ocurre de manera casi simultánea al cerrado dorsal, durante la retracción de la banda germinal (VanHook & Letsou, 2008), y consiste en la internalización de tejidos ectodermales en la zona anterior del embrión. Cuando este proceso falla en una mutante, la cutícula de los embriones muestra cambios drásticos que se pueden observar en un microscopio óptico.

También, durante el desarrollo embrionario, este gen interactúa con otro muy estudiado y de gran importancia durante la competencia celular llamado *flower (flw)* (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017) el cuál es un gen requerido para procesos de competencia celular, actuando como un código de reconocimiento de células ganadoras y perdedoras en un ambiente de selección celular dentro de un tejido (Casas-Tinto et al., 2011; Rhiner et al., 2010). Adicionalmente, los embriones mutantes para *prg* muestran un retraso importante en la cinética del cerrado dorsal; este efecto puede o no prevenir que se complete el cerrado dorsal (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017).

El sistema nervioso de las larvas tempranas

La estructura de la larva de la mosca se especializó para sentir, moverse, comer y crecer rápidamente; debido a que, en esta etapa de su ciclo de vida, el organismo se encuentra viviendo en su fuente de alimento (Hartenstein et al., 2015). El sistema nervioso de una larva es significativamente más pequeño en tamaño que el de una mosca adulta. En los primeros estadios de la larva, su cerebro se compone de aproximadamente 1400 células (Winding et al., 2023), y se observan de manera externa los dos hemisferios del cerebro, el ganglio sub-esófago y el Cordón Nervioso Ventral. En este último aún se encuentran los segmentos torácicos y abdominales que fueron delimitados durante el desarrollo embrionario (Cardona et al., 2009; Gowda et al., 2021; Hartenstein et al., 2008, 2015). La estructura anatómica de los hemisferios en estadios tempranos consta de una corteza formada

por células gliales y cuerpos de neuronas primarias y en el centro de cada hemisferio se encuentra el neuróplio que es una zona conformada por axones y dendritas altamente ramificados (Hartenstein et al., 2008). En este cerebro sencillo se encuentran ya los neuroblastos que darán origen a los principales lóbulos de sistemas sensoriales en el adulto, como los lóbulos óptico y olfatorio. En una larva de primer estadio solo hay neuronas y neuroblastos primarios, por lo que el cerebro deberá pasar por otra ola de neurogénesis, (la primera sucede durante el desarrollo embrionario) en la etapa larvaria para dejar una capa externa de neuronas y neuroblastos secundarios que, durante la metamorfosis, se diferenciarán en el cerebro más complejo del adulto (Hartenstein et al., 2008, 2015), que contiene un total de 127,978 neuronas (Schlegel et al., 2023). En el primer estadio de la larva los neuroblastos están quiescentes y su tamaño se reduce significativamente; la única excepción la constituyen los cuatro neuroblastos “mushroom body”, componentes esenciales del sistema olfatorio y memoria (Akmal et al., 2006; Davis, 2005), que continúan en proliferación, y un neuroblasto de los basales-anteriores. En etapas avanzadas de la larva todos los neuroblastos recuperan su capacidad para proliferar (Hartenstein et al., 2008).

Los embriones homocigotos mutantes al gen *prg* que llegan a larva, generalmente mueren en el primer estadio; de estas larvas mutantes, muy pocas llegan al segundo estadio y ninguna logra llegar al tercer estadio larvario (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017).

La glía en el sistema nervioso de la mosca

Al igual que las células gliales en mamíferos, las células gliales de *Drosophila* desempeñan funciones cruciales, como guiar el crecimiento de las neuritas, regular iones y neurotransmisores, eliminar neuronas moribundas, limpiar desechos después de lesiones y mantener la barrera hematoencefálica. Además, estas células desempeñan un papel clave en la remodelación del sistema nervioso durante la metamorfosis para formar el sistema nervioso adulto.

El sistema nervioso de *Drosophila* se divide en dos regiones principales: la corteza, que contiene los cuerpos celulares neuronales, y el neuropilo, que contiene las neuritas y las sinapsis (Spindler et al., 2009). Las células gliales del sistema nervioso central se organizan en torno a estas dos regiones, y se identifican mediante el factor de transcripción Repo (Corty & Coutinho-Budd, 2023; Halter et al., 1995). Las células gliales de tipo astroglia y las glías envoltentes componen las glías del neuropilo, mientras que las glías de la corteza se extienden por los cuerpos celulares neuronales y los neuroblastos. También existen glías superficiales que forman barreras, como la barrera hematoencefálica (Corty & Coutinho-Budd, 2023; Freeman, 2015).

Las células gliales ejercen un profundo impacto en la estructura del sistema nervioso de *Drosophila*. En primer lugar, las glías desempeñan un papel fundamental en la formación de las asociaciones neuronales, ya que su desarrollo y morfología adecuados son esenciales para establecer las conexiones adecuadas entre las neuronas. La glía del sistema nervioso central, como los astrocitos y las glías envoltentes, ocupan ubicaciones específicas en el neuropilo y la corteza, donde interactúan estrechamente con las sinapsis y las neuritas (Corty & Coutinho-Budd, 2023; Freeman, 2015). Su presencia y organización son críticas para la eficiente regulación de la actividad neuronal y la formación de circuitos funcionales (Ma et al., 2016). Cualquier alteración en el desarrollo o la morfología glial puede tener un impacto significativo en la conectividad neuronal, lo que podría conducir a defectos en el funcionamiento del sistema nervioso, como trastornos motores u otros problemas de comportamiento (Wilton & Stevens, 2020).

Además, las células gliales desempeñan un papel esencial en la regulación de la homeostasis del sistema nervioso, incluida la eliminación de células nerviosas moribundas y la limpieza de desechos después de lesiones. Estas funciones son cruciales para mantener un ambiente propicio para la función neuronal adecuada. Las glías también participan en la formación y mantenimiento de barreras, como la barrera hematoencefálica, esencial para proteger el sistema nervioso de sustancias nocivas y regular el suministro de nutrientes (Schwabe et al., 2005). En conjunto, el

papel de las células gliales en la estructura y la salud del sistema nervioso de *Drosophila* es fundamental y demuestra la complejidad de su influencia en el funcionamiento integral del sistema nervioso de este organismo modelo.

Las comisuras axonales de *Drosophila melanogaster*

La formación de las comisuras en *Drosophila melanogaster* desempeña un papel crucial en el establecimiento de la conectividad del sistema nervioso durante el desarrollo embrionario. Las comisuras son grupos de axones que cruzan la línea media del embrión, permitiendo la comunicación entre los hemisferios izquierdo y derecho. Este proceso está altamente regulado e implica una serie de eventos moleculares y celulares intrincados (Hummel et al., 1999; Menne & Klämbt, 1994).

Inicialmente, un grupo de glia pioneras conocidas como glia de la línea media son responsables de guiar y organizar la formación de los axones comisurales. Estas células de la línea media secretan señales de orientación que actúan como señales atractivas o repulsivas para el crecimiento axonal. Los conos de crecimiento en la punta de los axones en desarrollo navegan a lo largo de estas señales de orientación, dirigiendo su camino hacia la línea media (Hummel et al., 1999; Morales, 2018). Al llegar a la línea media, los axones se extienden hacia el lado contralateral, formando el puente comisural. El tiempo preciso y la coordinación del crecimiento y la guía axonal son regulados por una compleja interacción entre diversos factores moleculares, que incluyen factores de transcripción, moléculas de adhesión celular y vías de señalización extracelular (Menne & Klämbt, 1994).

Una vez establecido el puente comisural, entran en juego mecanismos adicionales para asegurar la precisión y especificidad de las conexiones. Las células de la línea media y los tejidos circundantes proporcionan señales atractivas o repulsivas para guiar a los axones hacia sus objetivos apropiados. Estas señales son mediadas por interacciones receptor-ligando, que ayudan a refinar y restringir las proyecciones axonales. La formación de las comisuras es un proceso dinámico, que involucra una

regulación espacial y temporal precisa de las señales moleculares, las interacciones célula-célula y las reorganizaciones del citoesqueleto (Morales, 2018). Recientemente se ha descrito que la arquitectura de la cadena nerviosa ventral en las moscas requiere de la señalización de la vía de la cinasa de Jun (JNK) en neuronas pioneras para formarse de manera efectiva (Karkali et al., 2023). Defectos en cualquiera de estos procesos pueden conducir a un enrutamiento erróneo o pérdida de conexiones comisurales, lo que finalmente afecta el correcto funcionamiento del sistema nervioso (Hummel et al., 1999).

La formación de las comisuras en *Drosophila melanogaster* es un proceso complejo y altamente regulado. Comprender los mecanismos moleculares y celulares involucrados en este proceso no solo arroja luz sobre el desarrollo del sistema nervioso en las moscas, sino que también proporciona información sobre los principios generales de la orientación y conectividad axonal en otros organismos, incluidos los humanos.

***prg* en el desarrollo del ojo adulto y tórax**

Al ser un gen cuya falta de función devenga en letalidad embrionaria en homocigosis, se tienen que inducir clones mutantes a diferentes etapas del ciclo de vida, generando organismos mosaicos genéticos (clones de células homocigotas mutantes marcados dentro de un organismo mayoritariamente conformado por células heterocigotas) para estudiar requerimientos más tardíos de *prg*, más allá de la letalidad embrionaria. Los fenotipos encontrados en moscas adultas han sido muy dramáticos en el ojo compuesto (prácticamente destrucción del tejido ocular) y malformaciones en el tórax (Fig. 2). Un primer análisis preliminar de los ojos con clones mutantes muestra los siguientes fenotipos: pérdida de quetas del ojo, malformaciones en los omatidios, hoyos en los omatidios, y desarreglo general en la cito-arquitectura de la retina (Cano-Zepeda, tesis profesional). Los defectos en el tórax cursan con falta de quetas y problemas de cerrado torácico (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017).

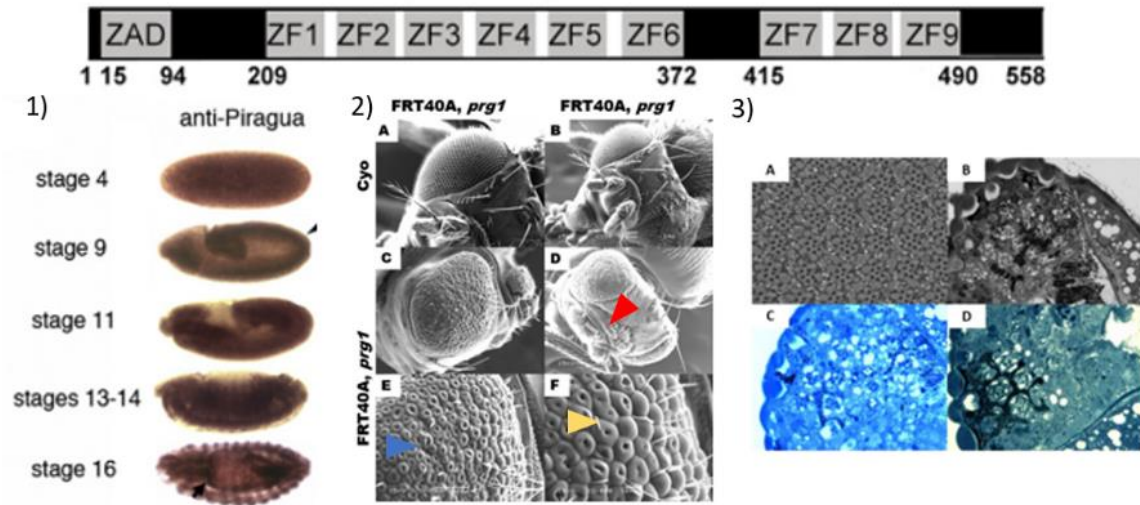


Figura 2 **Características principales del gen piragua**. En la parte superior se muestra la posición del dominio asociado a zinc (ZAD) y los nueve dominios de dedos de zinc que se encuentran en el gen piragua. 1) Hibridación in-situ para el transcrito del gen piragua en donde se muestra una expresión altamente dinámica durante el desarrollo embrionario, obtenida de (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017). 2) Defectos en mutantes a piragua en tejido visual adulto por la generación de clones mutantes. Se muestran defectos en los omatidios (flecha azul), frons (flecha roja), placas de la cabeza y cerdas oculares (flecha amarilla). 3) cortes finos de ojos de moscas adultas con clones mutantes a piragua. Los cortes muestran daños severos en las células que conforman a los omatidios tanto en fotorreceptores como en células del cono. Obtenida de (Cano-Zepeda, tesis profesional).

Alelos mutantes *prg1* y *prg3*

Los alelos mutantes del gen *prg*, *prg¹* y *prg³*, fueron generados por una escisión de elementos P (transposones) insertados en la unidad transcripcional de *piragua*. Ambos alelos son letales en homocigosis y fallan al complementar el uno con el otro en pruebas de complementación (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017). Para el alelo *prg¹* no se ha encontrado ningún daño en las regiones codificantes y no existe una reducción de ARNm cuando se induce su expresión; en cambio, el alelo *prg³* si presenta una reducción significativa en el ARNm y presenta lesiones moleculares. *prg³* tiene dos mutaciones puntuales en el dominio ZAD (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017; Nazario-Yepiz, 2018).

JUSTIFICACIÓN

Drosophila melanogaster, también conocida como la mosca de la fruta, es un organismo modelo ampliamente utilizado en investigaciones biológicas debido a su rápida tasa de reproducción y similitudes genéticas y biológicas con los seres humanos. Por lo tanto, cualquier descubrimiento en este organismo puede tener implicaciones importantes para nuestra comprensión de procesos biológicos similares en otros organismos, incluidos los humanos.

El gen *piragua*, al ser parte de la clase de genes que codifican para factores de transcripción con estructuras de ZAD-dedos de zinc de tipo C₂H₂, desempeña un papel crucial en la regulación de la expresión génica y, por ende, en el desarrollo y funcionamiento normal del organismo. Comprender en detalle su función y los fenotipos asociados a sus mutaciones puede proporcionar información valiosa sobre la forma en que estos factores de transcripción influyen en el desarrollo del ojo compuesto y, posiblemente, en otros procesos biológicos como el desarrollo del sistema nervioso y sus componentes.

Además, mutaciones en el gen *piragua* tienen efectos dramáticos en el ojo compuesto de la mosca adulta, lo que sugiere una función significativa en la morfogénesis ocular. Investigar estos efectos y su relación con otros genes y vías genéticas puede proporcionar información crucial sobre la biología subyacente de los sistemas visuales y, potencialmente, conducir a aplicaciones biomédicas en el tratamiento de trastornos oculares en humanos.

En resumen, investigar el gen *piragua* en *Drosophila melanogaster* es importante tanto desde una perspectiva biológica fundamental como desde una perspectiva translacional, ya que puede contribuir a nuestra comprensión de la biología del desarrollo y tener implicaciones en el campo de la biomedicina, especialmente en relación con los defectos visuales y posibles aplicaciones terapéuticas.

HIPÓTESIS

El gen *piragua* se requiere en diferentes estadios del desarrollo temprano del sistema nervioso de la mosca de la fruta y genera defectos importantes en los adultos cuando se generan clones mutantes para *piragua*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar una descripción detallada de los fenotipos causados por los alelos mutantes de *piragua* en las distintas etapas del desarrollo del sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*.

Objetivos particulares

Determinar las consecuencias de la pérdida de función de *piragua* en los tejidos que componen el sistema nervioso.

Estudiar los efectos de la falta de función del gen *piragua* en momentos posteriores a la letalidad embrionaria.

Determinar los momentos en los que se requiere del gen *piragua* para el desarrollo en embriones, larvas y moscas adultas, mediante el uso de anticuerpos específicos para el sistema nervioso.

Establecer las estructuras y tipos celulares del sistema nervioso que presenten un efecto en mutantes de *piragua*.

MATERIALES Y REACTIVOS

Materiales

- Micropipetas 0.25-1000 uL
- Puntas de micropipetas 0.25-1000 uL
- Tubos Eppendorf 0.6 ml y 1.5 ml
- Mallas para microscopía electrónica de barrido con apertura de 10 uM.
- Celdas para electroforesis
- Tubos de puestas para mosca

- 2 pinzas finas de relojero
- Portaobjetos cóncavo
- Portaobjetos lisos
- Cubreobjetos

Reactivos

- Metanol 100%
- Heptano 100%
- PBS 1x
- PBS 1x 0.3% Tritón X100
- Paraformaldehído 4%, 37%
- Suero fetal
- VectaShield
- Hipoclorito de sodio 5%
- Anticuerpos primarios Elav, Repo, 22C10 y BP102
- Anticuerpo secundario Alexa 488 de ratón y rata

Equipos

- Microscopio estereoscópico con lámpara de mercurio.
- Lámpara de fluorescencia Night Sea
- Microscopio óptico Nikon Eclipse
- Software iVision
- Microscopio confocal Zeiss

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Líneas de moscas

Todas las líneas de moscas que serán utilizadas serán cultivadas y resguardadas en un cuarto a 25 grados Celsius y 50% de humedad relativa, con alimento de mosca tradicional a base de levadura y piloncillo. Se usarán las líneas de moscas con los dos alelos del gen *piragua* descritos arriba, recombinados en el mismo cromosoma con una secuencia FRT40A en el segundo cromosoma. Estos cromosomas estarán en heterocigosis sobre el cromosoma balanceador CurlyO (CyO) marcado con GFP. El balanceador CyO es un cromosoma con múltiples rearrreglos que evitan la recombinación, pero que es homocigoto letal y está marcado con una mutación dominante, Cy, que hace que las alas de las moscas se curven y no puedan volar. Esto permite que se mantenga los alelos mutantes de *prg* en un mismo fondo genético como cepas de laboratorio; este balanceador es letal en homocigosis, lo que significa que todas aquellas moscas que presenten el fenotipo del balanceador serán heterocigotas en el cromosoma dos. Las moscas con CyO presentan un fenotipo muy evidente de alas curvadas, por lo que es sencillo identificar a las moscas (Greenspan, 1997).

Obtención de embriones mutantes

Para preparar cajas de puestas de huevos de mosca, utilizaremos gelatinas de jugo de arándano preparados; para cada 500 ml de gelatina, se usan 250 ml de agua bidestilada, 250 ml de jugo de arándano, 5 ml de ácido propiónico, 10 g de agar bacteriológico y 4.2 g de piloncillo. Las moscas utilizadas en este trabajo contienen un marcador con la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) para poder identificar el genotipo de cada embrión. La proteína GFP, de manera natural, es la responsable de la bioluminiscencia de la medusa *Aequorea victoria* y actualmente es ampliamente utilizada en todo tipo de estudios cualitativos y cuantitativos en ciencia (Prasher, 1995; Zimmer, 2002)

Se colocarán e incubarán moscas con genotipo *prg¹ FRT40A/CYO-GFP* o *prg³ FRT40A/CYO-GFP* en vasos de precipitados invertidos y tapados con cajas de puestas de huevos de mosca durante 24 horas a 25 grados Celsius, con 50% de

humedad relativa. Posteriormente, se retirarán las cajas de puestas y se observarán en un microscopio estereoscópico con luz azul para observar los embriones con GFP. Finalmente, se seleccionarán aquellos embriones que no presenten GFP pues estos serán homocigotos al alelo mutante de *piragua* que estamos utilizando. De esta forma podremos estudiar los efectos de la pérdida de función de *piragua* en embriones homocigotos mutantes para *prg* de mosca.

Se realizó una estandarización para determinar la cantidad de embriones falso positivos posteriores a la selección de los mutantes. Estos falso positivos son embriones heterocigotos que aún no presentan una señal de GFP y por ello son seleccionados como homocigotos mutantes. Para esta estandarización se repitió el proceso de obtención y selección de embriones mutantes. Las placas resultantes fueron colocadas a 4 grados Celsius durante 12 horas extras. Posteriormente se observaron con un microscopio estereoscópico con fluorescencia y se contó el porcentaje de los embriones que tenían presencia de GFP después de una selección de homocigotos.

Obtención de larvas homocigotas mutantes

Se colocarán las mismas puestas en las mismas condiciones que las que se utilizaron para los embriones. A las 24 horas se retirará la placa con gelatina y se dejará reposar por 24 horas extra; una vez transcurrido el tiempo se observarán las puestas en un microscopio estereoscópico de fluorescencia y se seleccionarán con pinzas de disección aquellas larvas de estadio uno que no presenten expresión de GFP. Estas larvas se colocarán en una placa de gelatina nueva para llevar a cabo la disección del cerebro. Se realizó un ensayo para determinar que cantidad de embriones seleccionados por la ausencia de GFP realmente tenían genotipo heterocigoto, puesto que el GFP puede tardar en expresarse. Se seleccionaron embriones sin GFP de la misma manera ya explicada y se dejaron 5 horas más en un cuarto a 25 grados Celsius, posteriormente se observaron nuevamente en el microscopio con fluorescencia y se contaron los embriones que presentaban GFP. Como se muestra en la figura 3, cerca del 13% de los embriones seleccionados eran de fenotipo heterocigoto, el 87% restante efectivamente fueron embriones homocigotos a la mutante de *piragua*.

Dissección de cerebros de larva

Para obtener los cerebros de larvas se colocaron aquellas larvas seleccionadas que alcanzaron el primer estadio siendo homocigotas mutantes a *prg* en PBS 1x en un cristal de reloj. Se utilizarán dos pinzas de disección para separar las larvas a la mitad; con una de las pinzas se sujeta la larva aproximadamente a un tercio de ella en sentido antero-posterior y con la otra se sujetan los ganchos bucales; una vez que se tiene esta posición se jalan ambos extremos de la larva, de esta forma el cerebro se verá expuesto y se colocará en una canasta de malla muy fina para continuar con la fijación.

Fijación de los embriones

Los embriones seleccionados en placas de gelatina se suspendieron con agua bidestilada y con un pincel en la misma placa para ser colocados en una canasta con fondo de malla fina, posteriormente se secaron y se colocaron 3 minutos en una solución 1:1 de agua bidestilada con cloro comercial para quitar la membrana coriónica. Utilizando un pincel remojado en heptano, se colectaron los embriones de la malla fina y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mililitros con 750 microlitros de heptano. Una vez que las muestras se encontraran en el heptano se agregan 750 microlitros de formaldehído al 37% para fijar a los embriones durante 3 minutos. Pasado el tiempo se retiró el formaldehído y se colocaron 750 microlitros de metanol y se agita vigorosamente el tubo Eppendorf durante un minuto para romper la membrana vitelina de los embriones. Posteriormente se retira toda la solución de metanol con heptano y se coloca metanol al 100% para terminar de romper la membrana vitelina y que los embriones pudieran ser guardados ya estando deshidratados y fijados.

Inmunohistoquímica de cerebros de larva

Debido al tamaño de los cerebros de larvas de estadio uno, los protocolos actuales para la inmunohistoquímica de cerebros no son los más efectivos pues se pueden perder las muestras en el proceso. Para solucionar este problema hicimos modificaciones al protocolo de inmunohistoquímica para cerebros de *Drosophila* de Wu y Luo (Wu & Luo, 2006). Se utilizaron cajas multipozos de 300 microlitros para espectrofotometría en las que se colocaron las soluciones del proceso de

inmunohistoquímica. También se fabricaron canastillas en la que los cerebros pueden ser colocados sin que se pierdan durante el cambio de soluciones; estas canastillas se hicieron cortando una punta de micropipeta de 200 microlitros, y en la punta recortada se adhirió con calor una rejilla para microscopía electrónica de transmisión de poro de 7.5 micrómetro en el extremo de la punta. (Fig. 3). Los cerebros de larvas de primer estadio miden alrededor de 250 micrómetros de largo.

De esta forma, siguiendo el protocolo de Wu y Luo se colocaron 200 microlitros de cada una de las soluciones en pozos diferentes y se cambió la canastilla de celda respetando los tiempos que se mencionan en el protocolo de inmunohistoquímica de cerebros de *Drosophila* (Wu & Luo, 2006).

Fabricación de las canastillas para cerebros de larvas

Para la fabricación de una canasta es necesario cortar una punta de micropipeta p200 a un tercio de la longitud. Se coloca una rejilla de microscopía electrónica de transmisión con una apertura de 7.5 μM en un portaobjetos procurando que este no se mueva. Se enciende un mechero Bunsen y se aplica calor al extremo cortado de la punta p200 por no más de 2 segundos. Posteriormente, se coloca la punta calentada rápidamente encima de la malla de microscopía electrónica de transmisión y se deja enfriar para que esta solidifique. Para asegurarse de que las soluciones no se derramaran es necesario colocar barniz de uñas en los bordes de la rejilla, donde se pegó con la punta, y esperar a que éste seque.

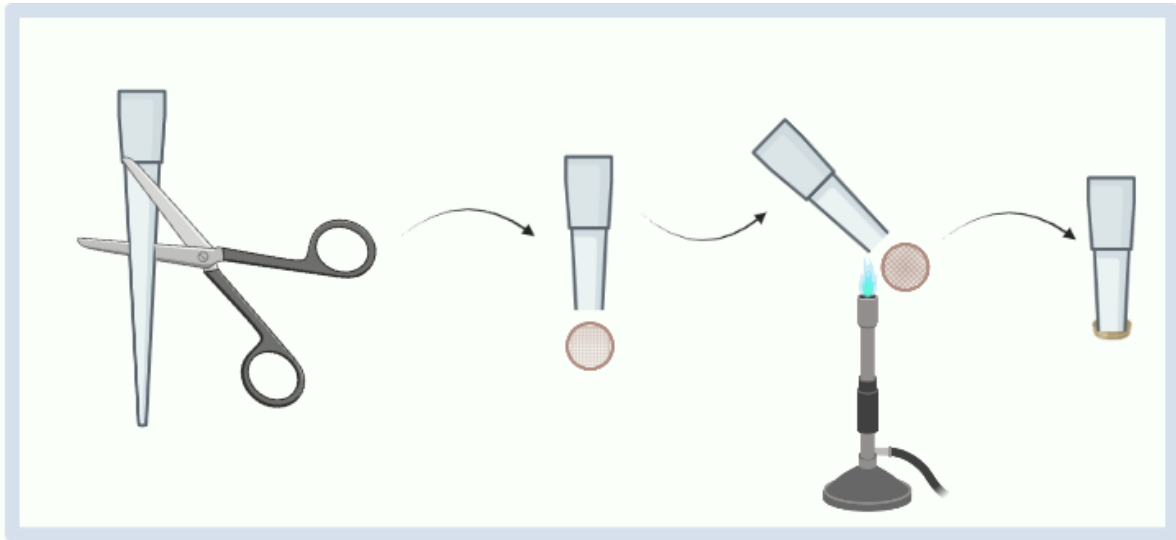


Figura 3 Fabricación de canastillas para retener cerebros de larva. Cortar punta de micropipeta p200. Colocar la rejilla de microscopía electrónica de transmisión en un portaobjetos. Aplicar calor al extremo de la punta y colocarla encima de la rejilla. Dejar enfriar y terminar de sellar con barniz para uñas transparente.

Inmunohistoquímica de embriones

Para la tinción de embriones se utilizó el protocolo publicado por Karr y Alberts con algunos cambios menores (Karr & Alberts, 1986). Se tiñen embriones control (*yw*) al mismo tiempo que embriones homocigotos mutantes al gen *prg*. Se utilizarán los siguientes anticuerpos primarios comprados al Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, EE.UU: (a) rata anti-ELAV (7E8A10) para marcar neuronas diferenciadas, (b) ratón anti-22C10 para marcar Sistema Nervioso Periférico, (c) ratón anti-BP102 para marcar fibras y axones del Sistema Nervioso Central, y (d) ratón anti-REPO (8D12) para marcar células gliales (excepto la glía de la línea media) (Fig. 4).

Para la inmunohistoquímica de los embriones se utilizaron aquellos embriones ya fijados y deshidratados y que se rehidratan pasándolos de metanol al 100%, a metanol al 75%, a metanol al 50% y finalmente en PBS (todas las diluciones fueron hechas con PBS). Los embriones rehidratados fueron bloqueados con una solución bloqueadora de Triton-X100 0.3% en PBS con 25% de suero fetal durante 1 hora. Después del bloqueo se realizó la incubación de los embriones con el anticuerpo primario en una concentración 1:100 en Tritón-X100 0.3% en PBS con 5% de suero fetal. La incubación se realizó durante 24 horas a 4 grados Celsius. Una vez

transcurridas las 24 horas se realizaron 3 lavados con Tritón-X100 0.3% en PBS de 15 minutos cada uno para colocar el anticuerpo secundario.

Cómo anticuerpo secundario se estandarizaron : (a) anti-rata Alexa 488, (b) anti-ratón Cy5, (C) anti-ratón Fluoresceína, y (d) anti-ratón Alexa 647. Los anticuerpos secundarios se incubaron... horas a ... grados Celsius, y después se lavaron como anteriormente descrito. Una vez completado el proceso de inmunohistoquímica se montaron las muestras en un portaobjetos con el medio para fluorescencia Vectashield.

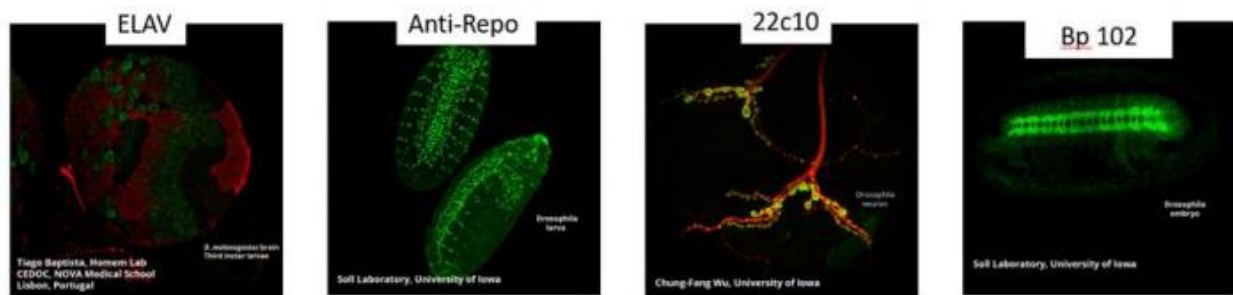


Figura 4 Anticuerpos primarios utilizados en el marcaje de embriones y cerebros de larvas. Se utilizaron anticuerpos primarios para marcar tipos celulares y estructuras específicas del sistema nervioso durante su desarrollo. Se utilizó: ELAV para marcar todas las neuronas, Anti-REPO para marcar las células de la glía, 22C10 para marcar los axones del sistema nervioso periférico y BP102 para marcar las comisuras nerviosas de los embrione. Ilustraciones tomadas del sitio web de Developmental Studies Hybridoma Bank de la Universidad de Iowa.

Observación de muestras en microscopio confocal

Las muestras fueron observadas en el microscopio Zeiss LSM 780 DUO de la unidad de microscopía del Instituto de Neurobiología. Se obtuvieron las imágenes tanto en 2 planos como reconstrucciones tridimensionales para poder observar todos los defectos en el embrión y en los tejidos nerviosos a detalle.

Montaje de cerebros de larvas y observación en microscopio óptico

Con el fin de observar los defectos externos en cerebros de larvas mutantes, se realizó una disección en larvas de primer estadio homocigotas. Se colocaron las larvas en un vidrio de reloj cóncavo con 200 uL de PBS 1X y se utilizaron dos pinzas de relojero finas para realizar la disección. Se sujetó cada larva a un tercio de su distancia desde el telson con una de las pinzas y con la otra se sujetaron con cuidado los ganchos bucales, se jalaban delicadamente hasta separar en dos la larva. Sin soltar la pinza colocada en los ganchos bucales, se limpió el cerebro dentro del PBS retirando los remanentes de la larva sin separarlos de los ganchos bucales. Una vez que los cerebros quedaron limpios, se colocaron en un portaobjetos con una gota del medio de montaje Polymount. Se colocó un cubreobjetos sobre la muestra y se observaron en el microscopio Nikon Eclipse con un objetivo 20X. Se fotografiaron con la cámara de microscopio.

Se utilizaron las técnicas de microscopía óptica de campo claro, campo oscuro y contraste de fases para poder observar todos los defectos externos que pudieran tener los cerebros mutantes.

Análisis estadístico

Se utilizaron los programas JMP y SigmaPlot 11.0 para realizar los análisis estadísticos correspondientes. Para la comparación en las proporciones de fenotipos mutantes se hizo mediante una prueba de Chi-cuadrada. Las frecuencias de defectos encontrados en las tinciones con los anticuerpos utilizados fueron analizadas mediante una prueba de T de student (Student, 1908). Finalmente, para los fenotipos encontrados en los cerebros se realizaron ANOVAs y pruebas Post-hoc Tukey (Fisher, 1915; Tukey, 1949) para determinar cambios significativos.

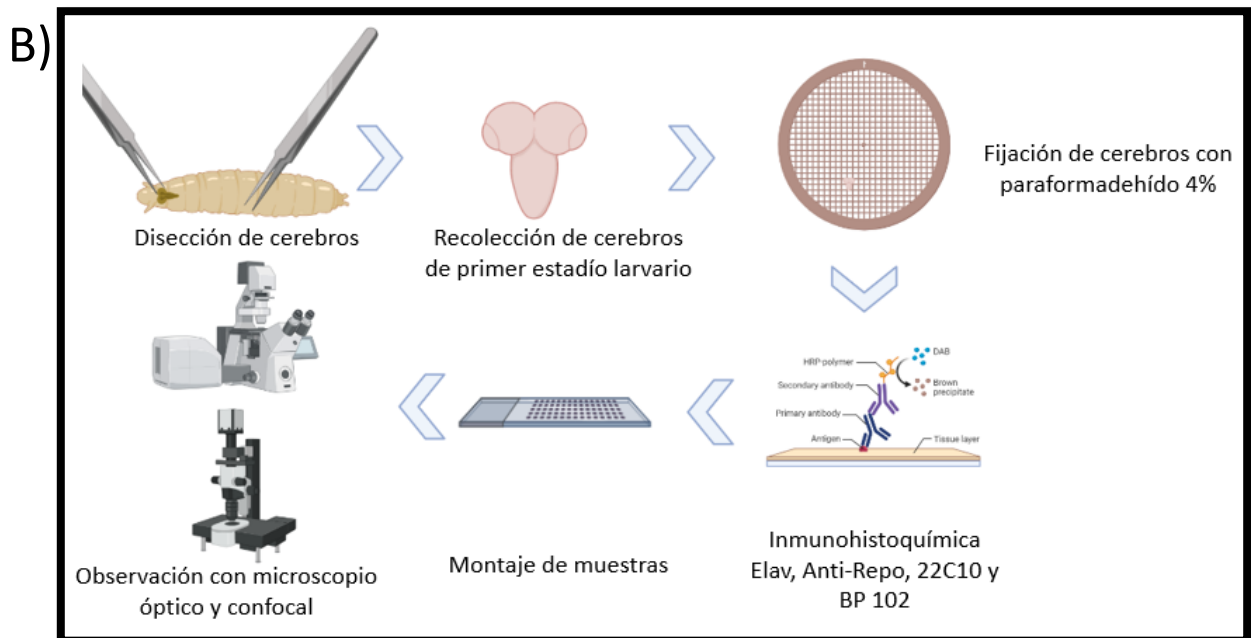
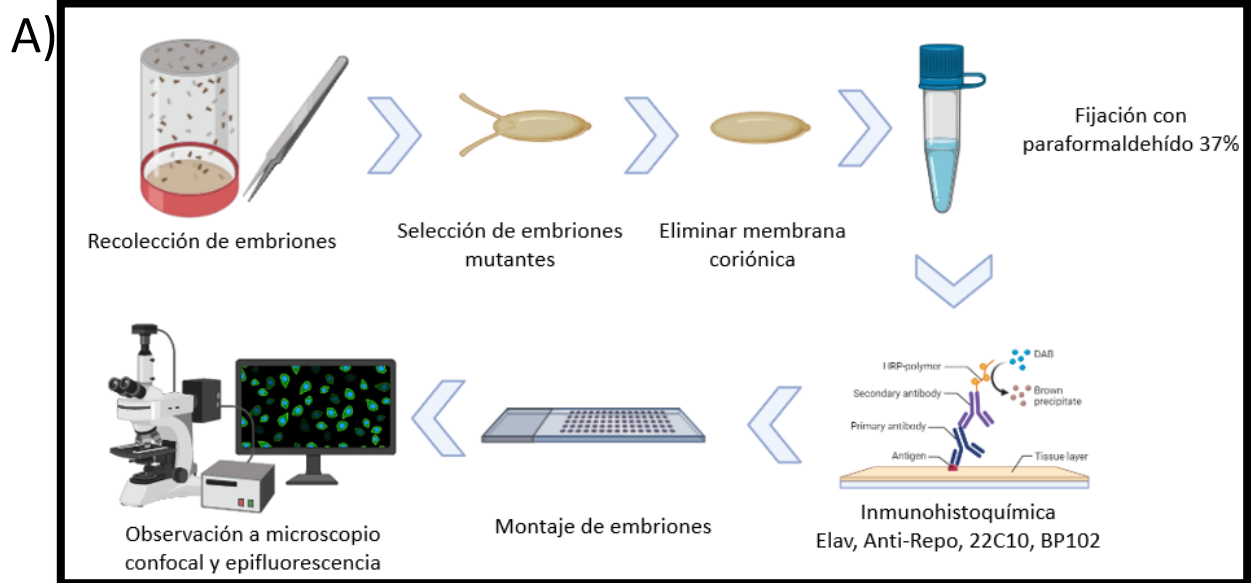


Figura 5 **Esquemas de la metodología completa.** A) Proceso de inmunohistoquímica para los embriones desde su recolección hasta la observación y toma de imágenes en el microscopio. B) Esquema general de la preparación de muestras obtenidas de cerebros de larva de primer estadio desde su disección hasta su observación y toma de imágenes en microscopio.

RESULTADOS

Estandarización de embriones heterocigotos

La Proteína Verde Fluorescente (GFP) tiene que acumularse (este tiempo va desde los 40 minutos a aproximadamente 2 horas y 30 minutos) hasta que sea suficiente en cantidad para sea posible visualizarla en el microscopio desde que empieza su expresión en tejidos de *D. melanogaster* (Hazelrigg et al., 1998). Al realizar la estandarización como se menciona en la estrategia experimental, se determinó que, en promedio, el 12.72% de los embriones seleccionados como mutantes en realidad son heterocigotos que no han presentado aún señal de GFP antes o durante la selección de embriones, el 87.27% de embriones restantes si son homocigotos mutantes. Para esta estandarización se realizaron 4 repeticiones con puestas de 24 horas con un promedio de 94.3 embriones seleccionados por puesta. Esta estandarización es necesaria, ya que se observó que el 13% de los embriones mostrados en la Fig11B con fenotipo silvestre en realidad son heterocigotos.

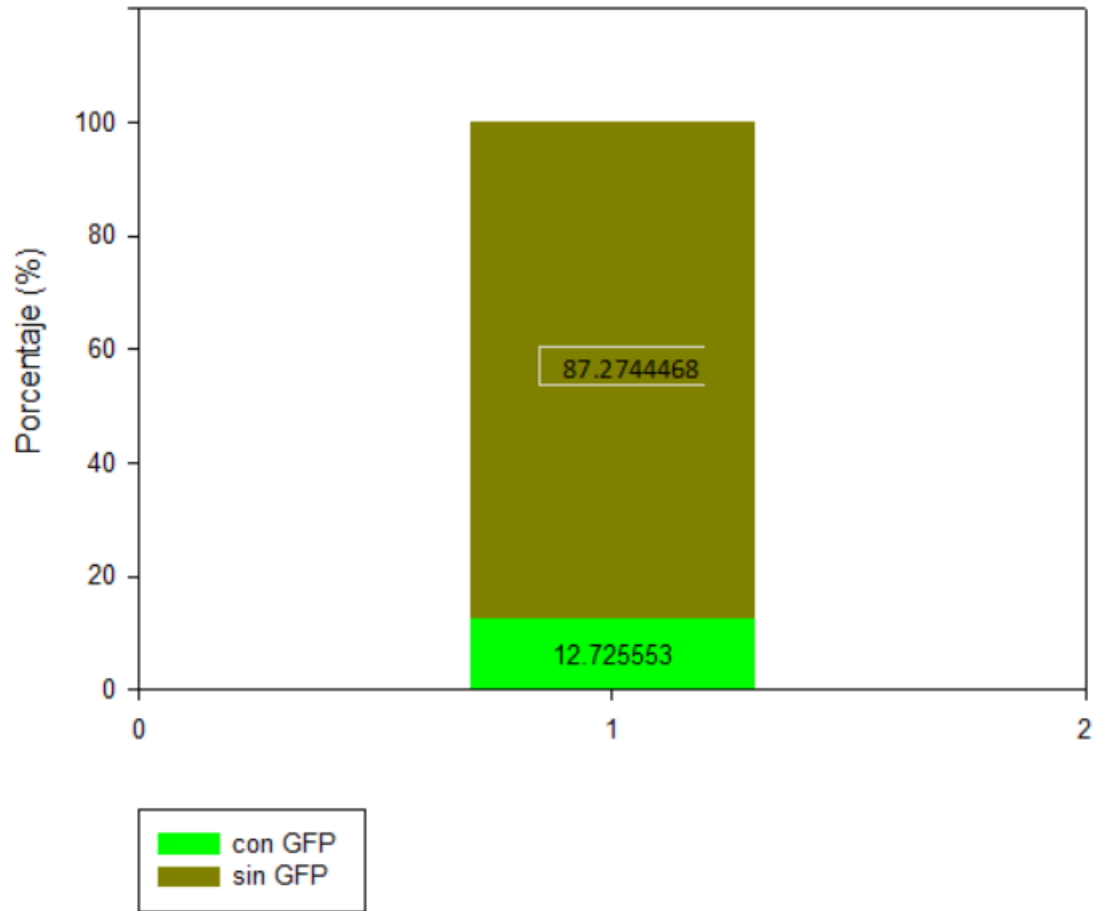


Figura 6 **Estandarización de embriones mutantes seleccionados.** Se realizó una estandarización para determinar qué porcentaje del total de embriones seleccionados como mutantes eran, en realidad, embriones heterocigotos al gen piragua. En promedio, un 12.75% (verde) de los embriones que son seleccionados como mutantes para el gen piragua presentaron GFP al dejarlos a 4°C durante 12 horas después de la selección. El 87.27% (café) restante eran embriones homocigotos mutantes, mostrado por la ausencia de GFP. Se obtuvo el promedio de cuatro repeticiones con puestas de embriones dejadas 24 horas a 25°C.

Anticuerpos para marcar el sistema nervioso durante la embriogénesis

Con los anticuerpos previamente mencionados se tiñeron embriones silvestres para generar una biblioteca de imágenes de las diferentes estructuras que conforman el sistema nervioso durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*. Se seleccionaron embriones que mostraron fluorescencia y se catalogaron en 3 grupos que comprenden las principales etapas del desarrollo embrionario del sistema nervioso: etapa 8-11 por la extensión de la banda germinal, 12-15 retracción de la banda germinal e involución de la cabeza y cerrado dorsal, y 16-17 la diferenciación embrionaria final. Las fotos fueron tomadas en un microscopio óptico con lámpara de epifluorescencia. De estas imágenes se generó un atlas del desarrollo de las diferentes estructuras nerviosas para ser comparadas con los embriones mutantes (Fig. 7). Durante el desarrollo de este trabajo fue necesario realizar numerosas repeticiones de las tinciones para asegurar que el procedimiento era efectivo y que se realizaba de manera correcta. Hasta que se pudieron obtener marcajes correctos de todos los anticuerpos primarios en embriones control con fondo genético *yw*, se prosiguió a realizar la inmunohistoquímica en embriones mutantes. En este paso se determinó que tanto los anticuerpos primarios (ELAV, Repo, 22C10 y BP102) como los secundarios (Alexa 488 de ratón y rata) funcionan correctamente.

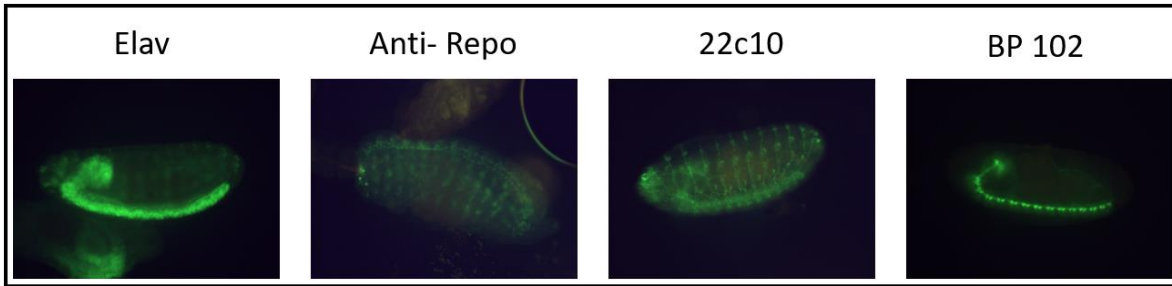


Figura 7 **Anticuerpos primarios utilizados para teñir los diferentes componentes neuronales durante el desarrollo embrionario.** Se tiñeron embriones silvestres con los anticuerpos Elav, Anti-Repo, 22c10 y BP102. Se obtuvieron imágenes de las diferentes etapas del desarrollo embrionario. Todos los embriones fueron teñidos con Alexa Fluor 488 como anticuerpo secundario. El anticuerpo primario Elav marca todas las neuronas del sistema nervioso. Anti-Repo marca células de la glía. 22c10 marca axones del sistema nervioso periférico. BP102 marca las comisuras nerviosas de la cadena nerviosa ventral.

Defectos en la formación del sistema nervioso durante la embriogénesis

Se compararon embriones con genotipo control *yw* con embriones homocigotos mutantes al gen *piragua* en las diferentes etapas del desarrollo embrionario previamente establecidas, todos marcados con el anticuerpo primario Elav. Entre los defectos se muestra un evidente desarreglo en la señal del marcaje por el anticuerpo, aparente en todas las etapas del desarrollo embrionario. De la misma forma se pueden observar cambios en la morfología de las zonas que pertenecen o que van a formar tanto los segmentos cerebrales, como los segmentos torácicos y abdominales. Los defectos en los segmentos abdominales suelen ser más fuertes y comunes que aquellos de los segmentos cerebrales, pudiéndose observar incluso la pérdida total de éstos como se muestra en la última columna de la figura 8 (Fig. 8A). Al observar desde diferentes ángulos a los embriones, se puede apreciar un cambio radical en el arreglo de los componentes neurales del embrión en aquellos que son mutantes al gen *piragua*. Al observar los embriones en microscopio confocal (Fig. 8B) se observa que tanto los hemisferios cerebrales como la Cadena Nerviosa Ventral tienen un desarreglo completo y una pérdida de la organización silvestre. El marcaje con ELAV nos permite observar el desarrollo del sistema nervioso desde las etapas tempranas (8-11) en las que se forma el neuroectodermo. Las proporciones de los fenotipos mantienen el mismo comportamiento en todas las etapas del desarrollo embrionario, siendo los defectos moderados los más comunes y presentando una menor cantidad de severos y poco profundos en comparación

con el fenotipo silvestre (Fig. 8C). Las proporciones en los fenotipos mutantes se muestran en la figura 10. Estos resultados demuestran que el gen *piragua* es requerido para la formación del sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*.

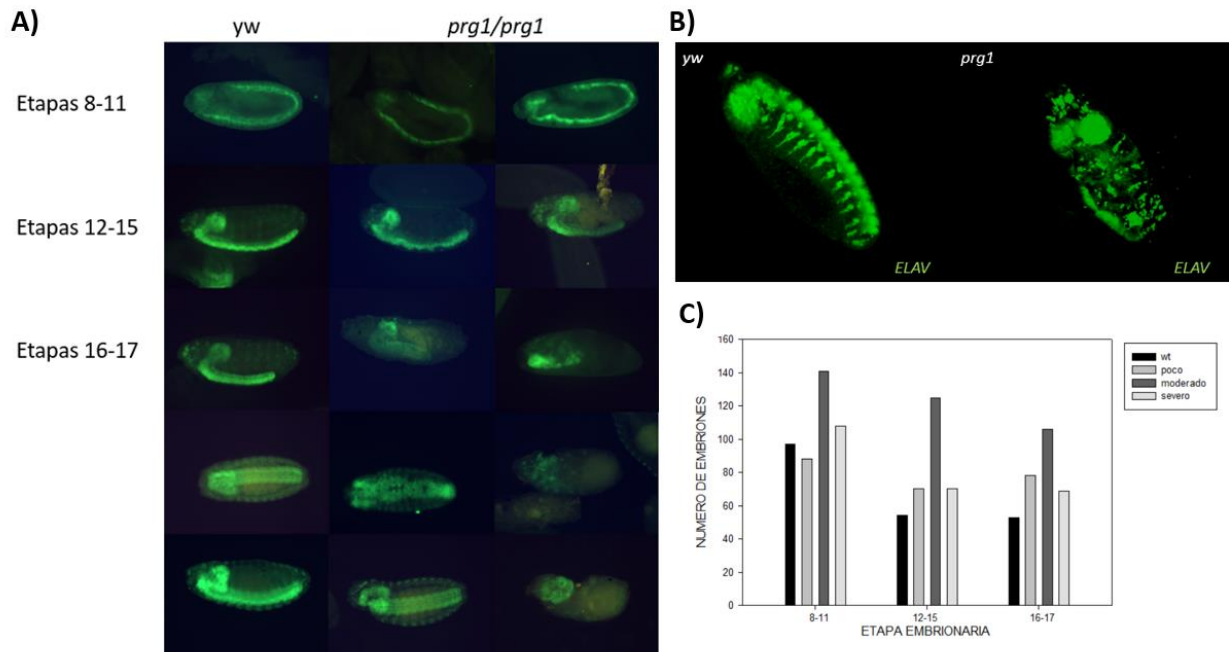


Figura 8 Fenotipos aberrantes en las diferentes etapas del desarrollo embrionario con marcaje de neuronas. A) Se utilizó el anticuerpo primario Elav para marcar las neuronas del sistema nervioso. En la primera columna del lado izquierdo se muestran embriones en las etapas de formación del sistema nervioso de la mosca y en ángulos dorsales y ventrales. Las columnas *prg1/prg1* muestran diferentes fenotipos encontrados en mutantes al gen *piragua* a diferentes etapas del desarrollo embrionario y en ángulos dorsales y ventrales. B) Imágenes de embriones marcados con ELAV vistas en microscopio confocal en donde se aprecia un desarreglo total de la estructura general del sistema nervioso. C) Cuantificación de los fenotipos mutantes en los diferentes estadios embrionarios mutantes para *piragua* en donde no hay diferencias significativas en los porcentajes entre las diferentes etapas embrionarias (*T* de student $p=0.05$). En esta y todas las figuras siguientes *yw* se refiere a embriones controles.

La mutación al gen *piragua* induce defectos en los axones a distintos niveles

Para observar si los defectos observados en las neuronas con ELAV eran recurrentes en otras estructuras y procesos de desarrollo del sistema nervioso, marcamos los axones tanto en las comisuras nerviosas (BP102) como en el sistema nervioso periférico (22C10). En la figura 9A se muestran los cambios morfológicos que fueron encontrados en las comisuras nerviosas en embriones mutantes a *piragua*. Estos defectos incluyen curvaturas en la cadena nerviosa ventral, agujeros

dentro de las comisuras, torcedura de la cadena nerviosa ventral y la pérdida total de ésta manteniendo la señal en los hemisferios cerebrales. Al observar algunos ejemplares de estos embriones en el microscopio confocal se observa cómo, en ocasiones, hay formación de proyecciones axonales que fallan al formar comisuras nerviosas como se observa en la figura 9B.

Al observar el sistema nervioso periférico con el anticuerpo 22C10 en embriones mutantes a *piragua*, se observa señal en todo el embrión. Sin embargo, la estructura organizada por neurómeros se pierde totalmente. Los fenotipos observados incluyen las curvaturas anormales en los axones, reducción de proyecciones, desorganización de las estructuras marcadas y compactación de la señal en las zonas anteriores del embrión (Fig. 9C). En los embriones marcados con 22C10 en el microscopio confocal, se observa cómo la organización segmentada del sistema nervioso periférico se ve altamente afectada (Fig. 9D); sin embargo, los defectos en los axones del sistema nervioso de la mosca parecen ser generalizados y no segmentados. Las proporciones de fenotipos mutantes en los axones se muestran en la figura 11.

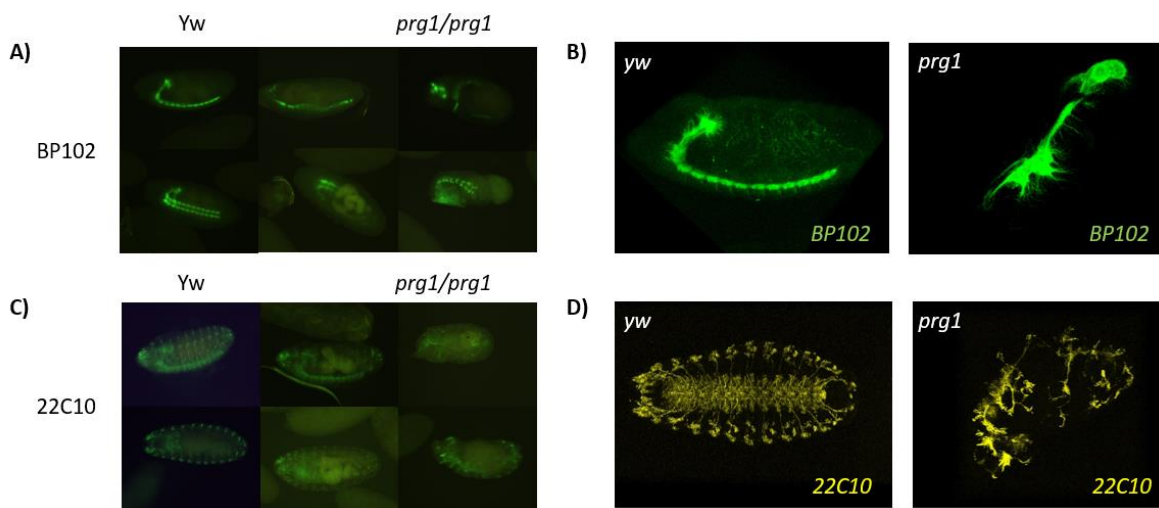


Figura 9 Descripción de fenotipos aberrantes en proyecciones neuronales. En la parte superior (A, B) se muestran embriones mutantes y silvestres marcados con el anticuerpo primario BP102 mostrando las comisuras nerviosas de la Cadena Nerviosa Ventral. A) imágenes de microscopio con epifluorescencia mostrando embriones con fenotipos, poco profundos, moderados y severos. B) Imágenes obtenidas con microscopio confocal en la que se observa la total falta de estructura silvestre en las proyecciones nerviosas para formar las comisuras anteriores y posteriores. En la parte inferior (C, D) se muestran embriones mutantes y silvestres marcados con el anticuerpo primario 22C10 mostrando los axones del SNC y SNP. C) Imágenes obtenidas en microscopio con epifluorescencia mostrando fenotipos poco profundos, moderados

y severos. D) Imágenes obtenidas con microscopio confocal en las que se observan proyecciones sin ninguna organización en la estructura del embrión.

Defectos severos en las células de la glía en embriones mutantes a *piragua*

Para determinar si existían defectos en células gen no neuronales en embriones mutantes a *prg* utilizamos el anticuerpo primario Anti-REPO que marca células de la glía específicamente. Como se muestra en la figura 10C, los embriones teñidos con Anti-REPO redujeron significativamente la cantidad de embriones con fluorescencia. Para asegurarnos de que éste no era un problema del anticuerpo primario realizamos tinciones en cerebros de primer estadio (Fig. 10B) y un conteo en embriones silvestres con el mismo Anti-REPO utilizado para embriones mutantes (Fig. 10C). Realizando una comparación entre estos grupos se observa que, efectivamente, la cantidad de embriones con marcaje en las células gliales se reducen muy significativamente en embriones mutantes.

Las proporciones de fenotipos muestran un cambio significativo en las células gliales, predominando aquellos que son severos (Fig. 10B). Al contar los embriones marcados con Anti-REPO en muy pocas ocasiones se observaron defectos poco profundos y moderados, en cambio los silvestres y severos fueron los predominantes. El fenotipo severo se observaba como una señal reducida y concentrada en el área de los hemisferios cerebrales como se observan en la figura 10A. Estos resultados indican que las células gliales son las más afectadas en los mutantes del gen *prg*.

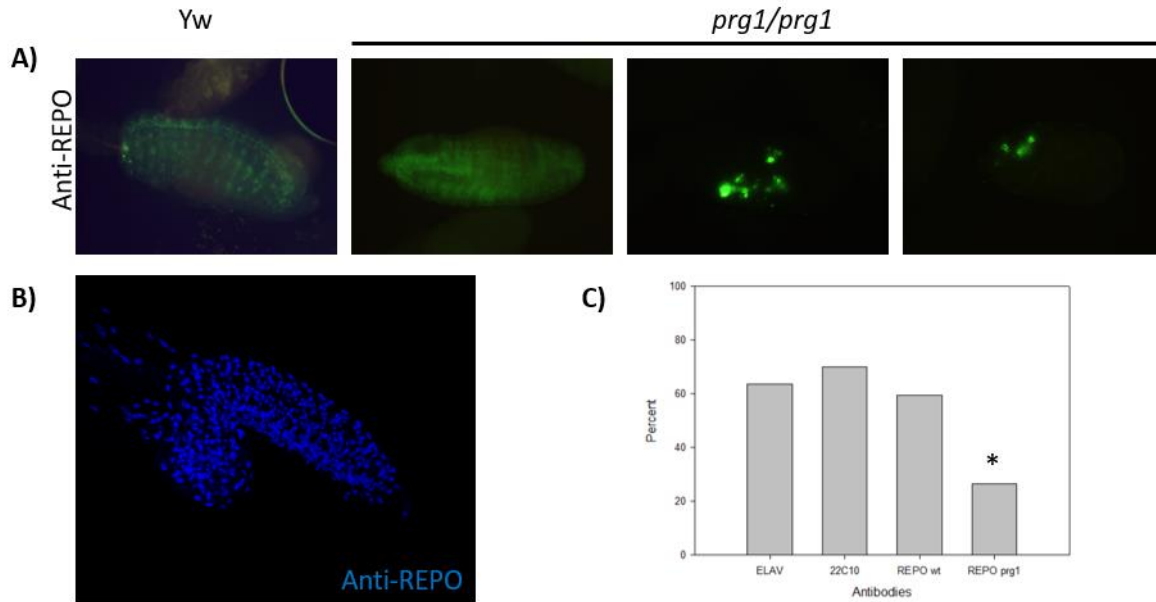


Figura 10 Mutantes a piragua en células gliales. En la parte superior A), se muestran los defectos en los embriones mutantes a prg predominando aquellos que son severos. B) cerebro de primer estadio larvario marcado con el anticuerpo Anti-REPO. C) proporción de embriones que presentan señal con cada anticuerpo (ELAV, 22C10, REPO), comparado con embriones mutantes marcados con REPO (glía), con la finalidad de determinar si la disminución de embriones con fluorescencia se debía al anticuerpo en lugar del genotipo de los embriones. Se realizaron 3 repeticiones de inmunohistoquímica con cada anticuerpo y se cuantificó el porcentaje de embriones con fluorescencia, estos datos fueron analizados mediante una prueba T de student (* $p=0.001$).

Fenotipos mutantes en el sistema nervioso de *D. melanogaster*

Para organizar los diferentes fenotipos mutantes encontrados en las diferentes estructuras y tipos celulares involucrados en el desarrollo embrionario del sistema nervioso se catalogaron los fenotipos encontrados y observados en el microscopio de epifluorescencia de la siguiente manera:

Silvestre: sin diferencias aparentes a las imágenes del grupo control.

Ligero: ligeras variaciones en la estructura principal del sistema nervioso, pero presencia total de ésta.

Moderado: daños mayores en la estructura del sistema nervioso ya sea agujeros, torceduras, pérdida de regiones, o morfología distinta al control.

Severo: cambio completo en la estructura del sistema nervioso central, ya sea en los hemisferios cerebrales, la cadena nerviosa ventral o ambas.

Las proporciones muestran cambios significativos entre los grupos, siendo los embriones marcados con Anti-REPO los más afectados, presentando principalmente un fenotipo severo en los embriones. Entre los dos anticuerpos que marcan axones (BP102 y 22C10) no hubo cambios significativos en cuanto al porcentaje de defectos encontrados, sugiriendo que los axones que se encuentran en las comisuras tienen el mismo nivel de afectación por la falta de función de *piragua* que los axones pertenecientes al sistema nervioso periférico. Las proporciones cuantificadas para ELAV, a diferencia del resto mostraron una mayor cantidad de defectos moderados que de fenotipos severos.

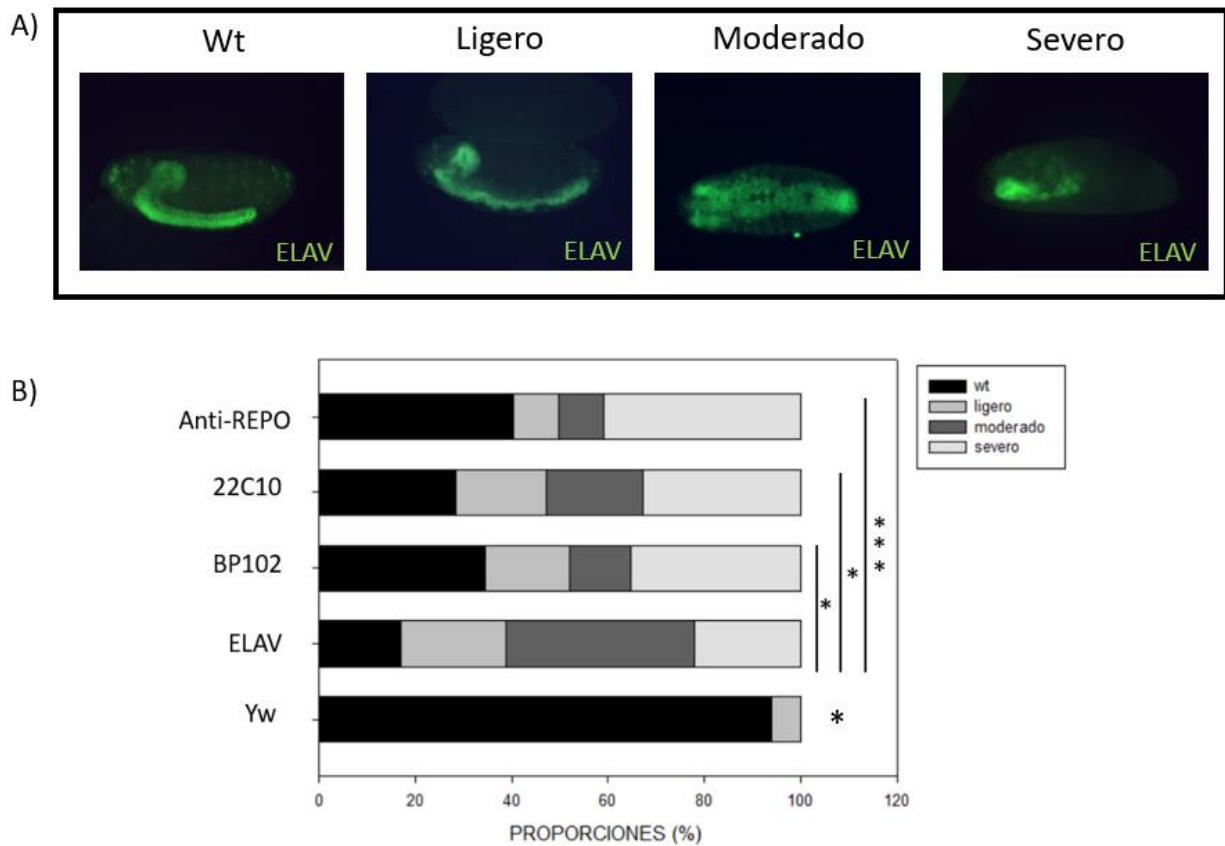


Figura 11 Proporciones en los fenotipos mutantes cuantificados por anticuerpo. A) Embriones marcados con ELAV pertenecientes a las diferentes categorías de gravedad en los mutantes: silvestre, ligero, moderado y severo. Las fotografías fueron obtenidas en un microscopio con fluorescencia. B) proporciones de los fenotipos cuantificados por cada anticuerpo. Se encontraron diferencias significativas entre los anticuerpos. Se realizó un análisis de Chi-cuadrada para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos. (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$) (Repo $n=152$, 22C10 $n=281$, ELAV $n=319$, BP102 $n=271$)

Caracterización de defectos externos en el cerebro de larvas mutantes a *prg*

Los organismos que son capaces de llegar al primer estadio larvario muestran diversos defectos cuando son homocigotos mutantes al gen *piragua*. Se utilizaron diferentes técnicas de microscopía óptica para poder observar la variedad de defectos presentes: contraste de fases (Fig. 12A, B, D, F, G), campo oscuro (C) y campo claro (E). Los defectos encontrados se muestran en una reducción del área total del cerebro (B, C, D, E), cambios en la morfología de la periferia del cordón nervioso ventral (B, D), agujeros en el cerebro (C, flecha azul), ruptura del cordón nervioso ventral en sus primeros segmentos (D), o hasta la pérdida total del cordón nervioso ventral (E). Estos resultados son concordantes con los encontrados durante la embriogénesis, pues la mayor cantidad de defectos que se encuentran son en la formación de la cadena nerviosa ventral. El fenotipo más aberrante en cerebros de primer estadio es la ruptura de la cadena nerviosa ventral siendo un 12% de los cerebros totales los que lo presentan (Fig. 12C).

En ningún momento se encontraron defectos moderados o severos en los cerebros de primer estadio larvario (Fig. 12B).

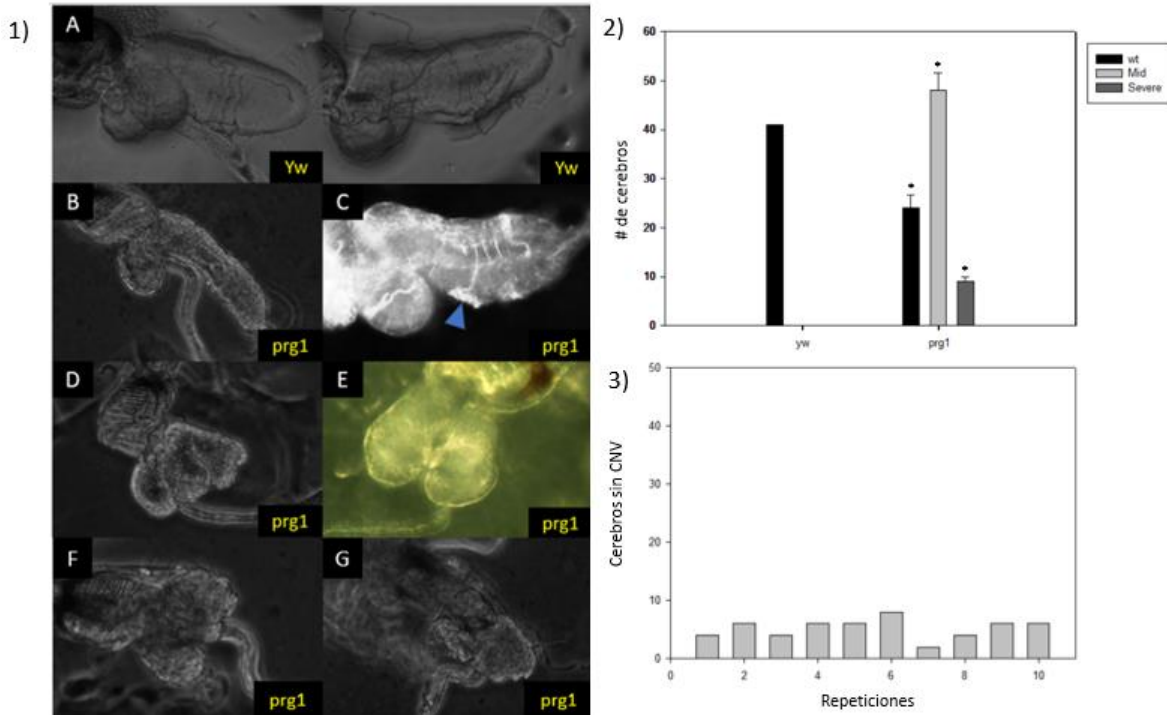


Figura 12 Defectos externos en cerebros de larvas del primer estadio mutantes a *piragua*. 1A) Cerebros de primer estadio larvario con genotipo control. Imágenes tomadas con microscopio de contraste de fases. (1B-G) Cerebros de primer estadio larvario mutantes al gen *piragua*. Fotografías utilizando diferentes técnicas de microscopía óptica para apreciar los defectos en los cerebros. 1B) cerebro de larva de primer estadio mutante a *piragua* en donde se aprecia un cambio en tamaño y en la periferia del cerebro. (1C) Cerebro de una larva de primer estadio mutante a *piragua*. La flecha azul indica la presencia de una lesión en el CNV. (1D, F, G) Imágenes de cerebros mutantes tomadas en contraste de fase. Los mayores defectos y más aberrantes se muestran en la zona del CNV donde hay rupturas en los primeros segmentos abdominales. (1E) Cerebro mutante a *piragua* observado en campo claro. Se observa una aparente pérdida total del CNV, solo se observan los dos hemisferios cerebrales. 2) Cuantificación de fenotipos mutantes en cerebros de primer estadio larvario, siendo moderado aquellos cerebros con agujeros, cambios en la forma o cambios en el tamaño de las estructuras cerebrales externas, y siendo severo aquellos cerebros con una pérdida total o parcial de la cadena nerviosa ventral. 3) Número de cerebros con pérdida de la cadena nerviosa ventral por cada 50 cerebros disecados.

Defectos de embriones y cerebros vistos en microscopio confocal

Para observar si los cerebros de aquellas larvas que alcanzaran el primer estadio larvario mantenían los defectos en las estructuras y tipos celulares que fueron observados en embriones, realizamos inmunohistoquímica en cerebros de primer estadio con los mismos anticuerpos que en los embriones. En la figura 13A se observa que en cerebros mutantes a *piragua* no hay un desarreglo similar ni cercano al que se observó en todas las estructuras en embriones, sugiriendo que los ejemplares que alcanzan este estadio no presentan más defectos en sus

estructuras, excepto por ese 12% que muestra una ruptura en la cadena nerviosa ventral.

Se aplicó un medio de montaje marca VectaShield con DAPI para marcar los núcleos de todas las células del cerebro y de esta forma observar si fuera de las estructuras marcadas con los anticuerpos se observarían defectos generales (Fig13 B). No se observaron defectos evidentes en cerebros marcados con ELAV y DAPI.

Si bien las estructuras no se observaron desarregladas en su mayoría se encontraron defectos moderados, principalmente en la cadena nerviosa ventral (Fig. 12B) los cuales, al cuantificar, se encontró una reducción significativa del tamaño de la cadena nerviosa ventral en el grosor (Fig. 13C), más no en la longitud (Fig. 13D). Al cuantificar el área total de los hemisferios cerebrales tanto de cerebros de primer estadio silvestre y mutantes a *piragua* no se encontró ninguna diferencia entre el control y los cerebros mutantes con defectos moderados y aquellos sin cadena nerviosa ventral.

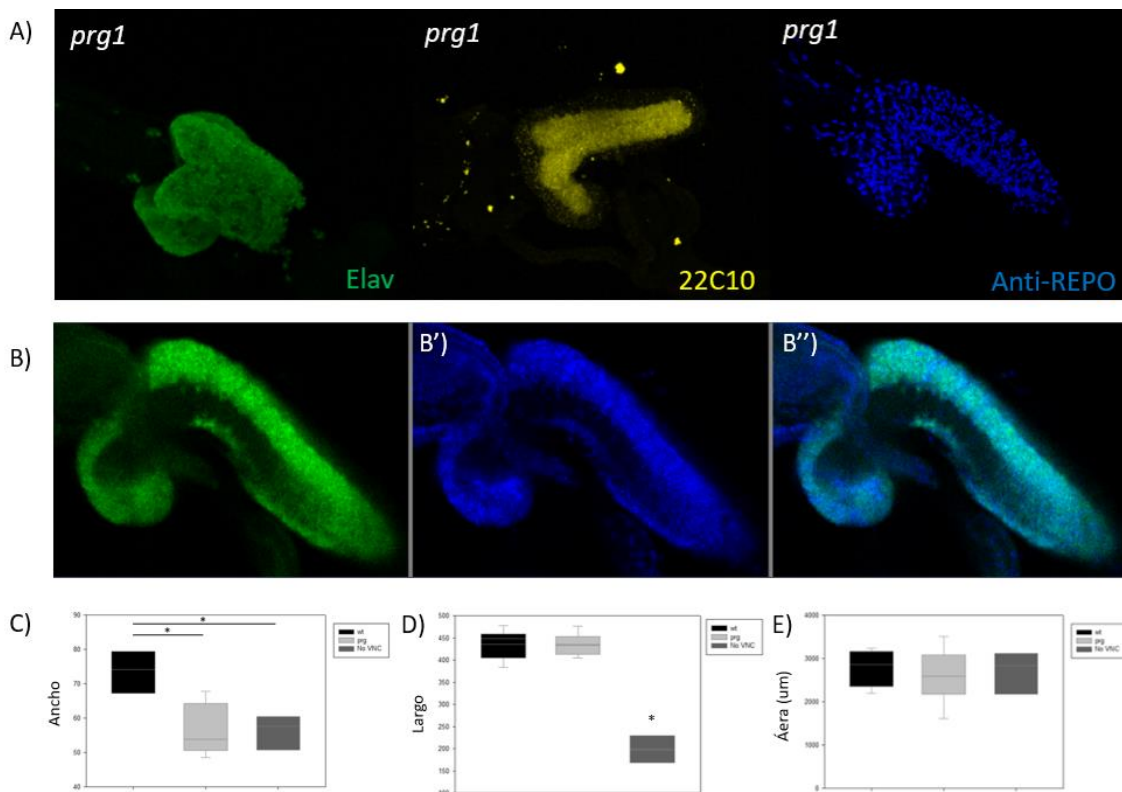


Figura 13 Cerebros de primer estadio larvario mutantes a *piragua*. A,B) imágenes de cerebros de primer estadio larvario obtenidas con microscopio confocal. A) Se muestran cerebros mutantes a *piragua* marcados con los anticuerpos primarios ELAV, 22C10 y Anti-REPO. B) Cerebro de primer estadio larvario marcado con ELAV (verde) y DAPI (azul). C) Cuantificación del grosor de la cadena nerviosa ventral en cerebros de organismos silvestres, mutantes con daños moderados y mutantes con daños severos. D) Cuantificación del largo de la cadena nerviosa ventral en cerebros de organismos silvestres, mutantes con daños moderados y mutantes con daños severos. E) Cuantificación del área total de los hemisferios cerebrales en cerebros de organismos silvestres, mutantes con daños moderados y mutantes con daños severos. Se realizó un ANOVA de una vía y Post-hoc Tukey ($p < 0.05$)

DISCUSIÓN

***piragua* es requerido para la formación del sistema nervioso durante la embriogénesis**

Previamente se ha reportado que las moscas adultas, a las cuales se les generaron clones mutantes a *prg*, presentan defectos en distintas estructuras como son la cabeza, el tórax y los ojos (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017), e incluso en

discos imaginales (Rhiner et al., 2010). En este trabajo mostramos que, durante la embriogénesis, los principales componentes del sistema nervioso de *Drosophila melanogaster* requieren de la expresión del gen *prg* para formarse de manera correcta. Encontramos defectos evidentes en las neuronas, comisuras axonales, axones y células de la glía en embriones mutantes a *piragua*.

Los defectos catalogados como “ligeros” y “moderados” en este trabajo con marcaje de neuronas (Elav), llegan a ser similares a defectos reportado en los que los embriones fallan en separar el sistema nervioso de la epidermis como lo son los embriones mutantes al gen *sim* (Page & Olofsson, 2008). Los defectos observados en las comisuras axonales asemejan mucho a los fenotipos reportados en mutantes de *single-minded* y *Notch* (Menne & Klämbt, 1994) en los que se llega a perder completamente la morfología simétrica de estas estructuras que se extienden a lo largo de toda la Cadena Ventral Nerviosa. Recientemente se ha descrito que la regulación de la vía de la cinasa de Jun (JNK) en neuronas pioneras de la cadena ventral nerviosa es requerida para mantener la arquitectura de esta área; esto mediante la regulación de la expresión de moléculas adherentes como Fas2 y NrX IV (Karkali et al., 2023); estos fenotipos asemejan a los fenotipos “ligeros” y “moderados” de las comisuras axonales reportados en este trabajo.

En un screening de ARN interferentes para genes que se requieren en la formación del sistema nervioso de la mosca de la fruta, realizado por Koizumi et al. en 2007, se reportaron fenotipos que son bastante similares a los “severos” en mutantes al gen *piragua* (Koizumi et al., 2007). Genes cuya función no ha sido caracterizada como A3-3, CG40497 y CG15765 presentan una gran similitud con los fenotipos “severos” marcados con 22C10 en este trabajo. Genes cuya función se conoce también presentan una pérdida de la estructura de los axones en los embriones como el gen *cactus*, *arrow*, *Tsp86D* y *armadillo*; estos genes participan en funciones como translocación nuclear, patrones de desarrollo, regulación de la vía de Notch, y adherencia celular respectivamente (Dornier et al., 2012; Kidd, 1992; Pai et al., 1996; Piddini et al., 2005). Esto nos da una idea de las posibles funciones que se

pueden poner a prueba para el gen *piragua* basado en los fenotipos descritos en este trabajo.

***piragua* es requerido durante diferentes etapas del desarrollo embrionario**

piragua es un gen letal en homocigosis mutante; sin embargo, no todos los embriones homocigotos mueren durante la embriogénesis pues un porcentaje de ellos llegan al primer estadio larvario y posteriormente mueren. Anteriormente se reportó que *piragua* tiene contribución materna (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017). En este trabajo reportamos que los defectos se encuentran durante todo el desarrollo embrionario, independientemente de la etapa en la que el embrión se encuentra. Es necesario realizar trabajos en los que se aisle a los embriones de la contribución materna de *piragua* que puedan tener estos y así poder determinar el periodo más temprano de requerimiento de este gen durante la embriogénesis.

Los defectos en las células gliales afectan al resto del sistema nervioso central

Las células gliales tienen un papel fundamental en modelar la arquitectura del sistema nervioso tanto en mamíferos como en artrópodos; en *Drosophila melanogaster* el rol que tienen las células gliales para la formación correcta del sistema nervioso ha sido ampliamente estudiado y va desde la misma formación de las neuronas a partir del Neuroglioblasto (Altenhein et al., 2006), en el que se involucran las células gliales anteriores de la línea media y las posteriores de la línea media (que sufrirán apoptosis en etapas avanzadas de la embriogénesis) (Beckervordersandforth et al., 2008; Crews, 2019), hasta el mantenimiento de estas mismas células mediante diferentes tipos celulares como la glía de recubrimiento, glía subperineural y glía perineural (Crews, 2019). Mutaciones en genes específicos y necesarios para la formación de la glía como *glial cells missing* y *repo*, llevan a la pérdida o mal formación de las células gliales del embrión (Beckervordersandforth et al., 2008; Xiong et al., 1994) o incluso de tipos específicos de células gliales

(Freeman, 2015; Mao et al., 2012; Schwabe et al., 2005) asemejando a los fenotipos descritos en este trabajo.

Los defectos mostrados en otras estructuras que conforman el sistema nervioso, como los axones del sistema nervioso periférico o las comisuras axonales, podrían ser causados indirectamente a partir de los defectos de las células gliales y no directamente de la mutación de *piragua* sobre las estructuras ya mencionadas. Defectos en los axones del embrión a causa de mutantes en la glía de recubrimiento han sido reportados en los que se ve un claro daño en los nervios segmentales e inter segmentales a causa de las mutantes (Banerjee & Bhat, 2008; Sepp et al., 2001) lo cual concuerda con los fenotipos descritos en este trabajo.

La formación de las comisuras axonales está íntimamente relacionada con el mantenimiento neuronal que brindan las células gliales. La cadena ventral nerviosa tiene una alta cantidad de cuerpos celulares de glía y células gliales de recubrimiento (Freeman, 2015; Yildirim et al., 2019). Se han caracterizado en mutantes de *glial cells missing* que la reducción de células gliales en la cadena nerviosa ventral lleva a un drástico cambio en la morfología simétrica de las comisuras axonales (Beckervordersandforth et al., 2008; Karkali et al., 2023); esto también ha sido observado en mutantes de *repo* en el que todo el sistema nervioso del embrión mutante se ve afectado (Trébuchet et al., 2019).

Sin duda el fenotipo encontrado en este trabajo sobre las células gliales merece ser explorado con diferentes trabajos en los que se observe la expresión de *piragua* y un marcaje con REPO de manera conjunta. Es necesario explorar este fenotipo de manera fisiológica directamente en las células gliales en mutantes a *piragua*.

Diferentes procesos fisiológicos pueden explicar el fenotipo de pérdida de la Cadena Nerviosa Ventral

Como se mencionó previamente, los fenotipos “severos” reportados en el presente proyecto se asemejan a mutaciones relacionadas con adherencia celular y muerte celular programada. En la región abdominal del cerebro ocurren diversos procesos

de muerte celular que deben ser finamente regulados para llevar a cabo la condensación del cerebro adulto (Pinto-Teixeira et al., 2016).

El gen *reaper* de *Drosophila melanogaster* es un indispensable contribuyente para la actividad de caspasa en el desarrollo de distintos tejidos (White et al., 1996). Se ha descrito la expresión de este gen en los primeros segmentos abdominales del cerebro de la mosca de la fruta y se lograron describir fenotipos de daños en estas zonas al mutar al gen *reaper*. Incluso, los mutantes a *reaper* en los discos imaginales del ojo antena generan un fenotipo de daño en el ojo similar al descrito en clones mutantes a *piragua* (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017; Peterson et al., 2002). Los cerebros de tercer estadio larvario mutantes a *reaper* presentan cambios en las células del borde justo en las zonas de los primeros segmentos abdominales (Peterson et al., 2002); estos segmentos son los que se pierden en el fenotipo de pérdida de la cadena ventral nerviosa descritos en este trabajo.

Para determinar si la muerte celular es causante de los fenotipos descritos en mutantes a *piragua* es necesario realizar nuevos experimentos con marcaje de apoptosis y la actividad de la caspasa-3 en mutantes a *piragua*. Es interesante explorar los procesos de adherencia celular en el fenotipo de pérdida de la cadena ventral nerviosa, puesto que estos procesos son indispensables en la interacción de las células gliales y los axones durante la guía de los axones (Banerjee & Bhat, 2008; Freeman, 2015).

Una estructura normal no necesariamente significa función normal

Los cerebros de larvas de primer estadio que fueron marcados con los anticuerpos específicos no mostraron los defectos que observamos en los embriones. La pérdida de la Cadena Nervios Ventral fue el único fenotipo encontrado en el 13% de los cerebros disecados, el resto de los cerebros mostraban un fenotipo silvestre; no obstante, las larvas terminaban muriendo sin llegar al segundo estadio larvario. Si bien los cerebros parecen estar bien, en este trabajo no se realizaron experimentos en cuanto a la funcionalidad del sistema nervioso. Para determinar si la causa de

muerte de estas larvas que alcanzan el primer estadio larvario se debe a defectos en la función del sistema nervioso, es necesario realizar estudios fisiológicos o de transcriptómica, de esta forma determinar el estado fisiológico de los cerebros que estructuralmente parecen estar “bien”.

CONCLUSIONES

1. El gen *piragua* es requerido para la formación del sistema nervioso de la mosca de la fruta durante la embriogénesis.
2. Todas las estructuras principales que comprenden el sistema nervioso central de *D. melanogaster* presentan defectos de distintas magnitudes de severidad.
3. No se encontraron diferencias en la presencia de defectos del sistema nervioso entre las diferentes etapas del desarrollo embrionario.
4. No existe una diferencia clara entre las proporciones de defectos en los hemisferios cerebrales y en la cadena nerviosa ventral.
5. Las células gliales son las que se ven afectadas de mayor manera ante la pérdida de función del gen *piragua*.
6. Algunos embriones pueden eclosionar y dar origen a larvas de primer estadio, sin embargo, estas nunca llegan a un segundo estadio larvario.
7. El 13% de los cerebros de las larvas mutantes a *piragua* presentan el defecto de la pérdida o ruptura de la cadena nerviosa ventral. Este defecto solo está presente en mutantes a *piragua*.
8. Los cerebros de larvas de primer estadio mutantes a *piragua* que no presentan la pérdida de la cadena nerviosa ventral no tienen defectos mayores en las estructuras observadas contrario a lo que se observó en los embriones.

PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

1. Realizar clones en los que se elimine la contribución materna de *prg* y observar los defectos.

2. Utilizar anticuerpos primarios que permitan observar a las células progenitoras de neuronas y de la glía.
3. Realizar marcajes para muerte celular embriones mutantes a *piragua* y observar estos marcajes en la cadena nerviosa ventral del cerebro de las larvas y en embriones.
4. Incrementar la cantidad de imágenes con marcaje de núcleos y así determinar con mayor discernimiento los defectos en el sistema nervioso.
5. Explorar las células gliales marcando con anticuerpo a Piragua y observar como es la presencia de la proteína en estas células.

BIBLIOGRAFÍA

- Akalal, D. B. G., Wilson, C. F., Zong, L., Tanaka, N. K., Ito, K., & Davis, R. L. (2006). Roles for *Drosophila* mushroom body neurons in olfactory learning and memory. *Learning and Memory*, 13(5). <https://doi.org/10.1101/lm.221206>
- Altenhein, B., Becker, A., Busold, C., Beckmann, B., Hoheisel, J. D., & Technau, G. M. (2006). Expression profiling of glial genes during *Drosophila* embryogenesis. *Developmental Biology*, 296(2). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.04.460>
- Artavanis-Tsakonas, S., developmental, M. M.-C. topics in, & 2010, undefined. (n.d.). Notch: the past, the present, and the future. *Elsevier*. Retrieved November 30, 2021, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0070215310920012>
- Banerjee, S., & Bhat, M. A. (2008). Glial ensheathment of peripheral axons in *Drosophila*. In *Journal of Neuroscience Research* (Vol. 86, Issue 6). <https://doi.org/10.1002/jnr.21574>
- Beckervordersandforth, R. M., Rickert, C., Altenhein, B., & Technau, G. M. (2008). Subtypes of glial cells in the *Drosophila* embryonic ventral nerve cord as related to lineage and gene expression. *Mechanisms of Development*, 125(5–6). <https://doi.org/10.1016/j.mod.2007.12.004>

- Bier, E. (2005). *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/nrg1503>
- Campos-Ortega, J. A. (José A., & Hartenstein, V. (1997). *The embryonic development of Drosophila melanogaster*. 405. https://books.google.com/books/about/The_Embryonic_Development_of_Drosophila.html?id=A_vvCAAQBAJ
- Campuzano, S., & Modolell, J. (1992). Patterning of the *Drosophila* nervous system: the achaete-scute gene complex. *Trends in Genetics*, 8(6), 202–208. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(92\)90234-U](https://doi.org/10.1016/0168-9525(92)90234-U)
- Cardona, A., Larsen, C., & Hartenstein, V. (2009). Neuronal fiber tracts connecting the brain and ventral nerve cord of the early *Drosophila* larva. *Journal of Comparative Neurology*, 515(4). <https://doi.org/10.1002/cne.22086>
- Casas-Tinto, S., Torres, M., & Moreno, E. (2011). The flower code and cancer development. *Clinical and Translational Oncology*, 13(1). <https://doi.org/10.1007/s12094-011-0610-4>
- Corty, M. M., & Coutinho-Budd, J. (2023). *Drosophila* glia take shape to sculpt the nervous system. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 79). <https://doi.org/10.1016/j.conb.2023.102689>
- Crews, S. T. (2019). *Drosophila Embryonic CNS Development: Neurogenesis, Gliogenesis, Cell Fate, and Differentiation*. <https://doi.org/10.1534/genetics.119.300974>
- Davis, R. L. (2005). Olfactory memory formation in *Drosophila*: From molecular to systems neuroscience. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 28). <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135651>
- Dornier, E., Coumailleau, F., Ottavi, J. F., Moretti, J., Boucheix, C., Mauduit, P., Schweisguth, F., & Rubinstein, E. (2012). Tspanc8 tetraspanins regulate ADAM10/Kuzbanian trafficking and promote Notch activation in flies and mammals. *Journal of Cell Biology*, 199(3).

<https://doi.org/10.1083/jcb.201201133>

Egger, B., Chell, J. M., & Brand, A. H. (2008). Insights into neural stem cell biology from flies. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 363, Issue 1489). <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.2011>

Fisher, R. A. (1915). Frequency Distribution of the Values of the Correlation Coefficient in Samples from an Indefinitely Large Population. *Biometrika*, 10(4). <https://doi.org/10.2307/2331838>

Freeman, M. R. (2015). Drosophila central nervous system glia. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Vol. 7, Issue 11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020552>

Gilbert, S. F. (2006). Developmental Biology. *Russian Journal of Developmental Biology*, 10(5). <https://doi.org/10.1134/s1062360411050043>

Gómez-Skarmeta, J. L., Campuzano, S., & Modolell, J. (2003). Half a century of neural pre patterning: The story of a few bristles and many genes. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(7). <https://doi.org/10.1038/nrn1142>

Gowda, S. B. M., Salim, S., & Mohammad, F. (2021). Anatomy and neural pathways modulating distinct locomotor behaviors in Drosophila larva. In *Biology* (Vol. 10, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/biology10020090>

Greenspan, R. J. (1997). Fly pushing: The theory and practice of Drosophila genetics. *Trends in Genetics*, 13(10). [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(97\)89749-1](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(97)89749-1)

Halter, D. A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S. S., Ito, K., Travers, A. A., & Technau, G. M. (1995). The homeobox gene repo is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of Drosophila melanogaster. *Development*, 121(2). <https://doi.org/10.1242/dev.121.2.317>

Hartenstein, V., Spindler, S., Peraanu, W., & Fung, S. (2008). The development of the drosophila larval brain. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 628). https://doi.org/10.1007/978-0-387-78261-4_1

- Hartenstein, V., Younossi-Hartenstein, A., Lovick, J. K., Kong, A., Omoto, J. J., Ngo, K. T., & Viktorin, G. (2015). Lineage-associated tracts defining the anatomy of the *Drosophila* first instar larval brain. *Developmental Biology*, 406(1). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.06.021>
- Hazlerigg, T., Liu, N., Hong, Y., & Wang, S. (1998). GFP expression in drosophila tissues: Tissue requirements for formation of a fluorescent product. *Developmental Biology*, 199(2). <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.8922>
- Hummel, T., Schimmelpfeng, K., & Klämbt, C. (1999). Commissure Formation in the Embryonic CNS of *Drosophila*. *Developmental Biology*, 209(2). <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9235>
- Hwang, H., Development, E. R., & 2011, undefined. (n.d.). Serial specification of diverse neuroblast identities from a neurogenic placode by Notch and Egfr signaling. *Journals.Biologists.Com*. Retrieved November 30, 2021, from <https://journals.biologists.com/dev/article-abstract/138/14/2883/44548>
- Jacinto, A., Woolner, S., & Martin, P. (2002). Dynamic analysis of dorsal closure in *Drosophila*: From genetics to cell biology. *Developmental Cell*, 3(1). [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00208-3](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00208-3)
- Karkali, K., Saunders, T. E., Panayotou, G., & Martín-Blanco, E. (2023). JNK signaling in pioneer neurons organizes ventral nerve cord architecture in *Drosophila* embryos. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36388-1>
- Karr, T. L., & Alberts, B. M. (1986). Organization of the cytoskeleton in early *Drosophila* embryos. *Journal of Cell Biology*, 102(4). <https://doi.org/10.1083/jcb.102.4.1494>
- Kidd, S. (1992). Characterization of the *Drosophila* cactus locus and analysis of interactions between cactus and dorsal proteins. *Cell*, 71(4). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90596-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90596-5)
- Koizumi, K., Higashida, H., Yoo, S., Islam, M. S., Ivanov, A. I., Guo, V., Pozzi, P.,

- Yu, S. H., Rovescalli, A. C., Tang, D., & Nirenberg, M. (2007). RNA interference screen to identify genes required for *Drosophila* embryonic nervous system development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(13).
<https://doi.org/10.1073/pnas.0611687104>
- Kubo, F., Takeichi, M., & Nakagawa, S. (2005). Wnt2b inhibits differentiation of retinal progenitor cells in the absence of Notch activity by downregulating the expression of proneural genes. *Development*, *132*(12), 2759–2770.
<https://doi.org/10.1242/DEV.01856>
- Lehmann, R., Jimenez, F., Dietrich, U., & Campos-Ortega, J. A. (1983). Roux's Archives of Developmental Biology On the Phenotype and Development of Mutants of Early Neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Arch Dev Biol*, *192*, 62–74.
- Ma, Z., Stork, T., Bergles, D. E., & Freeman, M. R. (2016). Neuromodulators signal through astrocytes to alter neural circuit activity and behaviour. *Nature*, *539*(7629). <https://doi.org/10.1038/nature20145>
- Mao, H., Lv, Z., & Ho, M. S. (2012). Gcm proteins function in the developing nervous system. *Developmental Biology*, *370*(1).
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.07.018>
- Menne, T. V., & Klämbt, C. (1994). The formation of commissures in the *Drosophila* CNS depends on the midline cells and on the Notch gene. *Development*, *120*(1), 123–133. <https://doi.org/10.1242/DEV.120.1.123>
- Morales, D. (2018). A new model for netrin1 in commissural axon guidance. In *Journal of Neuroscience Research* (Vol. 96, Issue 2).
<https://doi.org/10.1002/jnr.24117>
- Nazario-Yepiz, N. O., & Riesgo-Escovar, J. R. (2017). piragua encodes a zinc finger protein required for development in *Drosophila*. *Mechanisms of Development*, *144*. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2016.12.003>

- Nüsslein-volhard, C., & Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in drosophila. *Nature*, *287*(5785), 795–801.
<https://doi.org/10.1038/287795a0>
- Page, D. T., & Olofsson, B. (2008). Multiple roles for apoptosis facilitating condensation of the Drosophila ventral nerve cord. *Genesis*, *46*(2).
<https://doi.org/10.1002/dvg.20365>
- Pai, L. M., Kirkpatrick, C., Blanton, J., Oda, H., Takeichi, M., & Peifer, M. (1996). Drosophila α -catenin and E-cadherin bind to distinct regions of Drosophila Armadillo. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(50).
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.50.32411>
- Peterson, C., Carney, G. E., Taylor, B. J., & White, K. (2002). reaper is required for neuroblast apoptosis during Drosophila development. *Development*, *129*(6).
<https://doi.org/10.1242/dev.129.6.1467>
- Piddini, E., Marshall, F., Dubois, L., Hirst, E., & Vincent, J. P. (2005). Arrow (LRP6) and Frizzled2 cooperate to degrade Wingless in Drosophila imaginal discs. *Development*, *132*(24). <https://doi.org/10.1242/dev.02145>
- Pinto-Teixeira, F., Konstantinides, N., & Desplan, C. (2016). Programmed cell death acts at different stages of Drosophila neurodevelopment to shape the central nervous system. In *FEBS Letters*. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12298>
- Prasher, D. C. (1995). Using GFP to see the light. *Trends in Genetics*, *11*(8).
[https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)89090-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)89090-3)
- Rhiner, C., López-Gay, J. M., Soldini, D., Casas-Tinto, S., Martín, F. A., Lombardía, L., & Moreno, E. (2010). Flower forms an extracellular code that reveals the fitness of a cell to its neighbors in Drosophila. *Developmental Cell*, *18*(6), 985–998. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.010>
- Schlegel, P., Yin, Y., Bates, A. S., Dorkenwald, S., Eichler, K., Brooks, P., Han, D. S., Gkantia, M., Dos Santos, M., Munnely, E. J., Badalamente, G., Capdevila,

- L. S., Sane, V. A., Pleijzier, M. W., Tamimi, I. F. M., Dunne, C. R., Salgarella, I., Javier, A., Fang, S., ... Jefferis, G. S. X. E. (2023). Whole-brain annotation and multi-connectome cell typing quantifies circuit stereotypy in *Drosophila*. *BioRxiv: The Preprint Server for Biology*.
<https://doi.org/10.1101/2023.06.27.546055>
- Schmid, A., Chiba, A., & Doe, C. Q. (1999). Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: Neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development*, 126(21). <https://doi.org/10.1242/dev.126.21.4653>
- Schwabe, T., Bainton, R. J., Fetter, R. D., Heberlein, U., & Gaul, U. (2005). GPCR signaling is required for blood-brain barrier formation in *Drosophila*. *Cell*, 123(1). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.037>
- Sepp, K. J., Schulte, J., & Auld, V. J. (2001). Peripheral glia direct axon guidance across the CNS/PNS transition zone. *Developmental Biology*, 238(1).
<https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0411>
- Spindler, S. R., Ortiz, I., Fung, S., Takashima, S., & Hartenstein, V. (2009). *Drosophila* cortex and neuropile glia influence secondary axon tract growth, pathfinding, and fasciculation in the developing larval brain. *Developmental Biology*, 334(2). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.07.035>
- Student. (1908). The Probable Error of a Mean. *Biometrika*, 6(1).
<https://doi.org/10.2307/2331554>
- Tepass, U. (2012). The apical polarity protein network in *Drosophila* epithelial cells: Regulation of polarity, junctions, morphogenesis, cell growth, and survival. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Vol. 28).
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154033>
- Trébuchet, G., Cattenoz, P. B., Zsámboki, J., Mazaud, D., Siekhaus, D. E., Fanto, M., & Giangrande, A. (2019). The repo homeodomain transcription factor suppresses hematopoiesis in *Drosophila* and preserves the glial fate. *Journal of Neuroscience*, 39(2). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1059-18.2018>

- Tukey, J. W. (1949). Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics*, 5(2). <https://doi.org/10.2307/3001913>
- Urbach, R., & Technau, G. M. (2003). Segment polarity and DV patterning gene expression reveals segmental organization of the Drosophila brain. In *Development* (Vol. 130, Issue 16). <https://doi.org/10.1242/dev.00532>
- VanHook, A., & Letsou, A. (2008). Head involution in Drosophila: Genetic and morphogenetic connections to dorsal closure. In *Developmental Dynamics* (Vol. 237, Issue 1). <https://doi.org/10.1002/dvdy.21405>
- Wheeler, S. R., Kearney, J. B., Guardiola, A. R., & Crews, S. T. (2006). Single-cell mapping of neural and glial gene expression in the developing Drosophila CNS midline cells. *Developmental Biology*, 294(2). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.016>
- White, K., Tahaoglu, E., & Steller, H. (1996). Cell killing by the Drosophila gene reaper. *Science*, 271(5250). <https://doi.org/10.1126/science.271.5250.805>
- Wilton, D. K., & Stevens, B. (2020). The contribution of glial cells to Huntington's disease pathogenesis. In *Neurobiology of Disease* (Vol. 143). <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104963>
- Winding, M., Pedigo, B. D., Barnes, C. L., Patsolic, H. G., Park, Y., Kazimiers, T., Fushiki, A., Andrade, I. V., Khandelwal, A., Valdes-Aleman, J., Li, F., Randel, N., Barsotti, E., Correia, A., Fetter, R. D., Hartenstein, V., Priebe, C. E., Vogelstein, J. T., Cardona, A., & Zlatic, M. (2023). The connectome of an insect brain. *Science*, 379(6636). <https://doi.org/10.1126/science.add9330>
- Wu, J. S., & Luo, L. (2006). A protocol for dissecting Drosophila melanogaster brains for live imaging or immunostaining. *Nature Protocols*, 1(4). <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.336>
- Xiong, W. C., Okano, H., Patel, N. H., Blendy, J. A., & Montell, C. (1994). repo encodes a glial-specific homeo domain protein required in the Drosophila nervous system. *Genes and Development*, 8(8).

<https://doi.org/10.1101/gad.8.8.981>

Yildirim, K., Petri, J., Kottmeier, R., & Klämbt, C. (2019). *Drosophila* glia: Few cell types and many conserved functions. In *GLIA* (Vol. 67, Issue 1).

<https://doi.org/10.1002/glia.23459>

Zimmer, M. (2002). Green fluorescent protein (GFP): Applications, structure, and related photophysical behavior. *Chemical Reviews*, 102(3).

<https://doi.org/10.1021/cr010142r>