UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Papel del complejo de las integrinas en la interacción entre la epidermis y el sistema respiratorio durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

IBT. LUIS EDUARDO SÁNCHEZ CISNEROS

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Luis Daniel Ríos Barrera

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Ingrid Annette Fetter Pruneda

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Fanis Missirlis

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV

Ciudad Universitaria, CD. MX. abril de 2023.

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

Agradecimientos académicos

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por brindarme las instalaciones para poder llevar a cabo mis estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme mi beca para estudiar en el Posgrado en Ciencias Bioquímicas.

Este trabajo recibió financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM-PAPIIT #IA201921 y #IA202923, así como del International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Italia, #CRP/MEX21-04_EC.

Agradecimientos personales

Al Dr. Daniel Ríos por su confianza al aceptarme como su alumno, por todas sus enseñanzas y apoyo para cumplir todos los objetivos de mi proyecto. Por su paciencia ante las diversas situaciones que se presentaron durante mis estudios y su total disposición para ayudarme a resolverlos.

A mi comité tutoral, la Dra. Ingrid Fetter y el Dr. Fanis Missirlis por sus correcciones, sus enseñanzas y discusiones, que siempre enriquecieron mi proyecto y me ayudaron a mejorar como estudiante.

A mis padres, Juan y Fernanda, quienes siempre me han apoyado de todas las formas posibles para seguir en el camino de la ciencia. Gracias por todo su amor y palabras de aliento, sin ustedes no podría estar haciendo lo que ahora.

A mis hermanos, Cesar, Julia, Emiliano y Juan Fer, así como a mi tía Chayo. Gracias por todo su apoyo y por hacer mi vida mas divertida e interesante. Pensar en ustedes siempre inspira a querer mejorar.

A mis amigas de Mazatlán, Fernanda, Kesia, Bromelia y Frida, por estar siempre conmigo a la distancia y todo su ánimo incondicional.

A mis amigos de CdMx, Ismael, Pablo, Gerardo, Ángel y Alan, gracias por todas las salidas, pláticas y momentos de apoyo, hicieron que dejara de sentirme solo al estar tan lejos de mi casa.

A mis amigos y excompañeros de laboratorio, Claudia y Eric, por todos sus consejos y palabras de apoyo durante los inicios de mi maestría y al llevar a cabo mi cambio de tutor. También, a mis compañeros y amigos del Tissue Interaction Lab, Mariana, Pablo, Juan Pablo, Erick, Melissa y Roberto, por todas las tardes divertidas en el laboratorio y todo su apoyo en la realización de mi proyecto.

Índice

Resumen 7

Abstract 8

Introducción 9

Generalidades del desarrollo de *Drosophila melanogaster* 10

Desarrollo del sistema respiratorio. 12

Cerrado dorsal de la epidermis. 14

Adhesiones célula-ECM. 16

Papel de las integrinas en el desarrollo. 18

Justificación 20

Hipótesis 22

Objetivo general 22

Objetivos específicos 22

Estrategia experimental 23

Sistema Gal4/UAS. 23

Procesamiento para experimentos de inmunofluorescencia. 23

Procesamiento para microscopía electrónica. 24

Microscopía confocal *in vivo*. 25

Knockdown basado en el sistema deGradFP. 26

Procesamiento de imágenes y análisis de la coordinación entre tejidos mediante Particle Velocimetry Analisys (PIV). 27

Inhibición de la expresión de los genes *mys* (β-integrina) y *rhea* (Talin). 27

Resultados 29

Existe una correlación entre el cerrado dorsal, el desarrollo del sistema respiratorio y el establecimiento de la matriz extracelular. 29

El sistema deGradPF funciona eficientemente para degradar la β-integrina en la epidermis y el sistema respiratorio. 35

La pérdida de β-integrina ocasiona malformaciones en el tronco dorsal del sistema respiratorio. 37

Las malformaciones ocasionadas por la pérdida del complejo de integrinas se mantienen hasta etapas larvarias de la mosca. 41

Discusión. 43

El tronco dorsal se encuentra unido a la epidermis a través de una matriz extracelular. 43

La pérdida de integrinas en el sistema respiratorio ocasiona malformaciones del tronco dorsal, sin afectar su coordinación con la remodelación de la epidermis. 44

El contacto entre el tronco dorsal y la epidermis podría proveer fuerzas significativas para que el cerrado dorsal se lleve a cabo correctamente. 47

El sistema respiratorio de *Drosophila melanogaster* es un modelo de gran relevancia para estudiar interacción entre tejidos. 48

Conclusiones 49

Perspectivas 50

Referencias 51

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de los diferentes estadios durante la embriogénesis de Drosophila melanogaster. 12
Figura 2. Desarrollo del sistema respiratorio. 13
Figura 3. Progresión del cerrado dorsal de la epidermis. 15
Figura 4. Diagrama del establecimiento y maduración de los complejos de integrina. IAC; Complejo de adhesión de integrina. 16
Figura 5. Distribución de los complejos de integrina y la matriz extracelular al inicio del cerrado dorsal..... 29
Figura 6. Distribución de los complejos de integrina y la matriz extracelular en una etapa intermedia del cerrado dorsal. 30
Figura 7. Distribución de los complejos de integrina y la matriz extracelular en una etapa tardía del cerrado dorsal..... 31
Figura 8. La señal de β-integrina se sobrepone con la de colágeno en gran proximidad con el tronco dorsal..... 32
Figura 9. El tronco dorsal mantiene contacto con las células tendón de la epidermis. 33
Figura 10. Modelo propuesto para la interacción entre la epidermis y el sistema respiratorio. 34
Figura 11. NslmbVhh degrada eficientemente a la β-integrinaGFP en la epidermis. 36
Figura 12. NslmbVhh degrada eficientemente a la β-integrinaGFP en el sistema respiratorio. 37
Figura 13. Microscopía in vivo control durante el cerrado dorsal..... 38
Figura 14. Microscopía in vivo de embriones sin β-integrina en el sistema respiratorio, durante el cerrado dorsal..... 39
Figura 15. La degradación de la β-integrinaGFP ocasiona tortuosidades y mayor longitud en los troncos dorsales. 40
Figura 16. La degradación de β-integrina no afecta a la coordinación entre la epidermis y el tronco dorsal..... 41

Figura 17. El silenciamiento de mys y rhea ocasionan malformaciones en el tronco dorsal en larvas. 42

Resumen

La remodelación de tejidos para formar órganos durante el desarrollo animal requiere mecanismos de comunicación y coordinación tisular. Durante la embriogénesis de *Drosophila* dos capas laterales de epidermis se extienden hasta converger y fusionarse en la línea dorsal; al mismo tiempo, los tubos principales del sistema respiratorio se desplazan hacia el lado dorsal del embrión. Los mecanismos que coordinan estos procesos de desarrollo paralelo, pero independiente, no han sido estudiados. Tomando en cuenta que el sistema respiratorio se encuentra justo debajo de la epidermis, es posible que el comportamiento de ambos tejidos esté acoplado mecánicamente. En este trabajo, utilizamos herramientas genéticas y de microscopía para mostrar que los tubos principales del sistema respiratorio se encuentran unidos a la epidermis a través de una capa de matriz extracelular que comparten ambos tejidos. Confirmamos que la remodelación de los tubos traqueales está altamente coordinada con el cerrado dorsal de la epidermis y mostramos que perturbar la función del complejo de integrinas (moléculas de adhesión hacia la matriz extracelular) en el sistema respiratorio resulta en defectos traqueales que se mantienen hasta estadios larvarios.

Abstract

During development, the rearrangement of different tissues to form functional structures depends on adequate intertissular communication and coordination. For example, halfway during *Drosophila* embryogenesis, two lateral epidermal sheets stretch to fuse at the dorsal midline; concomitant with this, the main tubes of the respiratory system also shift towards the dorsal side of the embryo. No mechanisms coordinating these parallel processes have been described but given that the tracheal system lies directly below the epidermis, it is possible that the movement of both tissues is mechanically coupled. In this work, we study this problem using genetics and microscopy. We show that the main tubes of the tracheal system are attached to the epidermis through a common layer of extracellular matrix. We confirm that tracheal tube rearrangements are highly coordinated with epidermal dorsal closure and demonstrate that perturbing the production of integrin complexes (key cellular interactors with extracellular matrix components) in the tracheal system result in tracheal defects that persist until larval stages of development.

Introducción

El sistema respiratorio de *Drosophila melanogaster*, también llamado sistema traqueal, está formado por tubos ramificados que se extienden por todo el cuerpo del animal, permitiendo el flujo e intercambio de gases en cada tejido (Hayashi y Kondo 2018). Diversos estudios han caracterizado a *branchless* (*bnl,* que codifica a un miembro de la familia de los factores de crecimiento de fibroblastos, FGF) como la principal molécula señalizadora que puede atraer a estas estructuras ramificadas, expresándose en tejidos blanco y que al unirse a su receptor *breathless* (*btl*) en el sistema traqueal, direccionan sus ramificaciones (Best 2019; Gervais & Casanova 2010). Aunque el sistema respiratorio ha sido ampliamente estudiado por su peculiar morfología y su dependencia en la señalización de Branchless/FGF, pocos estudios se han enfocado a entender cómo los tejidos aledaños participan en su morfogénesis. Debido a que estas interacciones son vitales para la función del sistema respiratorio, éste es un sistema muy útil para entender las interacciones entre tejidos durante el desarrollo y sus repercusiones en la morfogénesis.

Estudios morfológicos durante la embriogénesis han reportado que el desarrollo del sistema respiratorio ocurre en el mismo lapso en el cual se está llevando el cerrado dorsal de la epidermis. Observaciones en el laboratorio muestran que efectivamente estos dos procesos están altamente coordinados, llevando a cabo la elongación y desplazamiento de las ramas dorsales paralelamente al cerrado dorsal. Sin embargo, los mecanismos moleculares que participan en dicha coordinación no se han estudiado.

La epidermis en *Drosophila melanogaster* comienza a formarse durante la embriogénesis en la zona ventrolateral del embrión (Kiehart, y otros 2017). Posteriormente, ésta migrará hacia el extremo dorsal al mismo tiempo que la amnioserosa, un tejido extraembrionario encontrado en la porción dorsal, se contrae hasta ser reemplazada completamente por la epidermis. Para poder llevar a cabo este movimiento, la epidermis se encuentra anclada a una matriz extracelular (ECM) formada principalmente por proteínas fibrilares como lamininas y colágena IV

(Urbano, Torgler, y otros 2009), la cual le da soporte y permite la tracción de las células de la epidermis. Las células epidermales se anclan a dicha matriz extracelular a través de integrinas, proteínas transmembranales que median la formación de uniones adherentes célula-ECM (*Figura 1*). Los complejos de integrinas están formados por una subunidad α, una β y proteínas asociadas a integrinas que definen sus funciones intracelulares, como Talin, que asocia al complejo de integrinas con el citoesqueleto de actina permitiendo el anclaje a la ECM y la transducción de señales mecanosensoriales (Green y Brown 2019). Se ha reportado que mutaciones en el gen *mys*, que codifica a la subunidad de integrina βPS, producen fallos en el cerrado dorsal, resaltando la importancia de la interacción entre la epidermis y la ECM durante este proceso (Brown, Gregory y Martin-Bermudo 2000).

Por lo anterior mencionado y al observar que el desplazamiento del sistema traqueal ocurre de forma coordinada con el cerrado de la epidermis, este proyecto propone analizar a fondo cómo estos dos procesos interactúan entre sí, infiriendo que se encuentran relacionados a través de adhesiones con una misma lámina basal. Primero se describirá la interacción entre el sistema traqueal, la epidermis, y la matriz extracelular que los separa, mediante experimentos de inmunofluorescencia y microscopía confocal. Posteriormente se analizará cómo se afecta la coordinación de los cambios morfogenéticos de estos dos tejidos en ausencia del complejo de integrinas. Esto se determinará inhibiendo por diferentes enfoques dos de sus componentes principales, la subunidad β-integrina (induciendo silenciamiento por RNAi, y por nanobodies) y Talin (por RNAi).

Generalidades del desarrollo de *Drosophila melanogaster*.

El desarrollo temprano de *Drosophila* se caracteriza por la alta contribución de la madre con factores de transcripción y proteínas, además de la formación de un blastodermo sincicial, permitiendo que durante etapas tempranas, el desarrollo del animal sea dirigido por gradientes de concentración de factores maternos depositados durante la maduración del ovocito, los cuales definirán los ejes corporales del organismo en formación.

Posterior a la fertilización, ocurren varias divisiones nucleares en el cigoto, alternando entre la fase S y la fase M. Durante estas divisiones, los núcleos comienzan a migrar hacia la superficie del embrión rodeando una gran masa de vitelo, formando el blastodermo sincicial. Algunos núcleos quedan posicionados en el extremo posterior del embrión y se recubren de membrana, formando a las células polares que después se diferenciarán como células germinales. Después de trece divisiones nucleares, el embrión comienza un proceso de celularización, en donde su membrana celular comienza a invaginarse y a envolver cada núcleo formando células individuales hasta la formación de un blastodermo celular. Es en esta etapa donde inicia la activación del genoma cigótico y la degradación de los RNA mensajeros maternos (Tadros y Lipshitz 2009).

Una vez formado el blastodermo celular, inicia el proceso de gastrulación, donde se segregarán las tres capas germinales. Uno de los movimientos iniciales en la gastrulación es la formación del surco ventral, para lo cual el mesodermo se invagina a lo largo del eje ventral. En los extremos anterior y posterior de éste comienza a invaginarse el endodermo junto con las células polares (ubicadas originalmente en el extremo posterior) para dar lugar al intestino y a las células germinales respectivamente. Siguiendo con este proceso, las células del ectodermo y mesodermo comienzan a converger para la formación de la banda germinal, la cual se extiende hacia el extremo posterior y luego se enrolla dorsalmente. Una vez que la banda germinal da este giro se retrae, dando como resultado que el embrión quede recubierto en su extremo dorsal con una estructura extraembrionaria primitiva llamada amnioserosa, la cual se encontrará anclada al vitelo del animal (Gilbert y Barresi 2016).

Durante la retracción de la banda germinal se llevan a cabo movimientos morfogenéticos de gran importancia en el desarrollo, como la formación de segmentos. Al terminar la retracción de la banda germinal, se inicia la formación de la epidermis a partir del ectodermo localizado en el área ventrolateral del embrión. Una vez establecida, la epidermis comienza un proceso de migración y elongación hacia el extremo dorsal del embrión, hasta cubrirlo por un mismo epitelio, un proceso

denominado cerrado dorsal (*Figura 1*). A la par del cerrado dorsal ocurren diferentes procesos de organogénesis, como el desarrollo del sistema respiratorio, los cuales continuarán hasta que el embrión eclosione en su primer estadio larvario (Hartenstein y Chipman 2015).

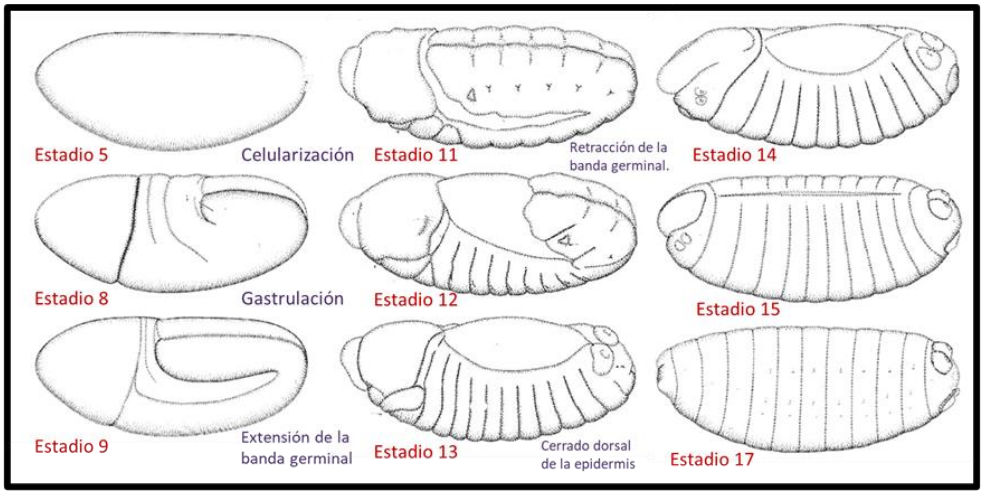

Figura 1. Esquema de los diferentes estadios durante la embriogénesis de Drosophila melanogaster. En ésta y el resto de las figuras, el embrión se encuentra orientado con el lado anterior a la izquierda y el lado dorsal hacia arriba. Editado de Flybase.org (consultado el 10 de Abril de 2023).

Desarrollo del sistema respiratorio.

En *Drosophila,* el sistema respiratorio comienza su desarrollo a partir del inicio de la retracción de la banda germinal con la especificación de las placas traqueales en el ectodermo, las cuales se identifican como células traqueales por la expresión del factor de transcripción *trachealess* (*trh*), en respuesta a los gradientes de señalización de Hedgehog (Hh), Wingless (Wg) y Decapentaplegic (Dpp) (Hartenstein y Chipman 2015). Una vez activado, Trh inducirá la expresión de *breathless* (*btl*), un receptor de FGF que responderá a su ligando *branchless* (*bnl*), siendo esta vía de señalización el principal mecanismo que define la direccionalidad de las ramificaciones del sistema respiratorio (Best 2019). Posterior al establecimiento de las placas traqueales, éstas se invaginarán formando un par de fosas traqueales en cada segmento, desde el T2 al A8 (*Figura 2A*).

Una vez que estas fosas traqueales se invaginan, éstas comienzan la elongación de sus ramas primarias, donde cada placa elongará seis ramas en direcciones estereotípicas, siendo estas las ramas: anterior del tronco dorsal, posterior del tronco dorsal, anterior del tronco lateral, ganglionica, visceral y la que se elongará como rama dorsal (Hayashi y Kondo 2018). Al continuar su elongación, las ramas anterior y posterior del tronco dorsal llevarán a cabo procesos de fusión generando los troncos dorsales, de los cuales, a su vez se estarán elongando las ramas dorsales y ventrales (*Figura 2B*). Se ha reportado que desde la especificación de las placas traqueales no se llevan a cabo procesos de proliferación celular en el sistema respiratorio, por lo que la formación de sus diferentes estructuras tubulares son producto de procesos de intercalación y adhesión celular que permiten la elongación, ramificación y fusión del sistema. (Uv, Cantera y Samakovlis 2003).

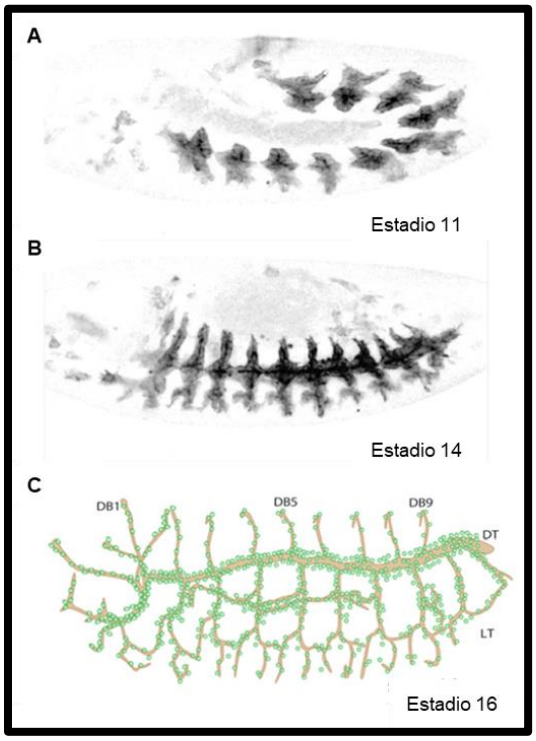

Figura 2. Desarrollo del sistema respiratorio. **A.** Invaginación de las fosas traqueales durante la retracción de la banda germinal. **B.** Fusión del tronco dorsal y elongación de las ramas dorsales. **C.** Representación del lumen (café) y los núcleos (verde) del sistema respiratorio en un embrión tardío. DT; Tronco dorsal. LT; Tronco lateral; DB; ramas dorsales (editado de Hayashi y Kondo 2018).

Posterior a la formación de los troncos dorsales, se continuará la elongación de las ramas dorsales y ventrales, las cuales extenderán procesos celulares ramificados que resultarán en la formación de los troncos laterales (*Figura 2C*). Una vez completada esta elongación, sus células terminales (células más distales) comienzan un proceso de ramificación, donde extienden procesos celulares hacia cada tejido, formando tubos unicelulares producto de tráfico vesicular y la invaginación de su membrana apical (Shaye, Casanova, y Llimargas 2008; Gervais y Casanova 2010). Como resultado de estos procesos, el sistema respiratorio de *Drosophila* será un conjunto de estructuras tubulares, cuyas ramificaciones se extienden por todo el cuerpo del animal y tendrán como objetivo facilitar el intercambio de gases y transportar oxígeno desde los espiráculos externos hacia cada tejido.

Cerrado dorsal de la epidermis.

Como se ha mencionado anteriormente, al completarse la retracción de la banda germinal (aproximadamente a la mitad del desarrollo embrionario), el embrión se encuentra cubierto en su extremo dorsal por una capa de amnioserosa, la cual se encuentra anclada al vitelo por medio de integrinas (Kiehart, y otros 2017). Durante esta etapa, la epidermis comienza a diferenciarse a partir del ectodermo ventrolateral del embrión. Una vez establecida la epidermis, las dos capas laterales de ésta se elongan hacia la línea media donde convergen hasta formar un epitelio continuo, en un proceso mediado por la vía de señalización de JNK y donde intervienen diferentes fuerzas, tanto de las células de la epidermis como de la amnioserosa (Hayes y Solon 2017; Kiehart, y otros 2017).

Al comenzar este proceso, se forma un anillo de actomiosina supracelular a lo largo del extremo de la epidermis, el cual se conecta entre células por complejos de cadherinas. La contracción de este anillo permite que los extremos de la epidermis se vuelvan regulares y el cerrado se complete de manera homogénea (*Figura 3*; Hayes y Solon 2017).

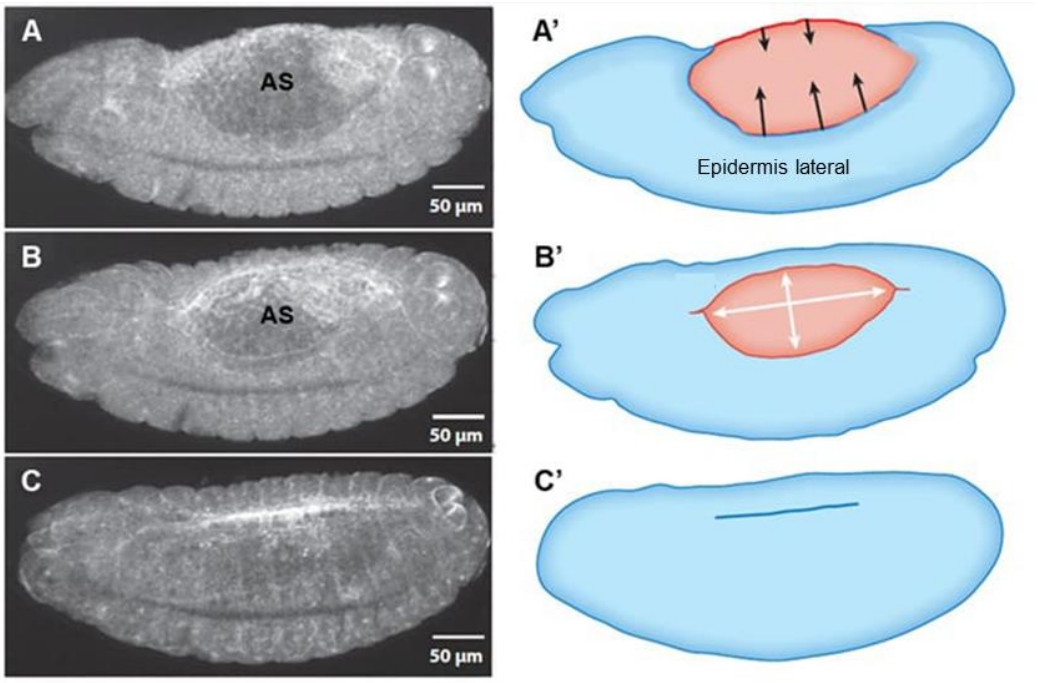

Figura 3. Progresión del cerrado dorsal de la epidermis. **A - A'.** Inicio del cerrado dorsal. AS; Amnioserosa. **B - B'.** Etapa intermedia del cerrado dorsal. AS; Amnioserosa. **C - C'.** Conclusión del cerrado dorsal (Editado de Kiehart, y otros 2017).

Por su parte, las células de la amnioserosa comienzan un proceso de contracción, con lo cual disminuyen su volumen y se internalizan a medida que la epidermis se va cerrando. La actomiosina tiene un papel importante en la contracción de las células de la amnioserosa, permitiendo la diferencia de fuerzas que dirige al cerrado dorsal (Pasakarnis, y otros 2016). Otro factor importante para el cerrado es la disminución de volumen de la amnioserosa, la cual reduce el tamaño individual de sus células por medio de canales iónicos y procesos mediados por caspasas, que posteriormente causarán la delaminación y apoptosis de sus células, resultando también en una disminución del área apical del tejido (Saias, y otros 2015).

Una vez que las células de extremos opuestos de la epidermis se encuentran en gran cercanía, estas extienden procesos celulares de tipo filopodio para poder llevar a cabo un cerrado sin cicatriz, estableciendo también uniones mediadas por cadherinas. Mientras tanto, las células de la amnioserosa ya internalizadas

continúan con procesos de apoptosis y son fagocitadas por los hemocitos del embrión (Jacinto, Woolner, y Martin 2002; Hayes y Solon 2017).

Adhesiones célula-ECM.

La matriz extracelular es un conjunto de proteínas y otras macromoléculas que cumple funciones de soporte y señalización celular, la cual permite a las células comunicarse entre ellas y organizarse en diferentes tejidos. Entre los componentes principales de la ECM en *Drosophila* se encuentran proteínas como perlecano, nidógeno, lamininas y colágena IV, de los cuales estos dos últimos son los ligandos principales de las integrinas, moléculas que permiten las adhesiones célula-ECM (*Figura 4*; Barrera-Velázquez y Ríos-Barrera 2021). Aunque se ha reportado que en *Drosophila* la matriz extracelular no se forma sino hasta estadios intermedios del desarrollo embrionario, ésta cumple funciones clave de migración celular, señalización, mantenimiento de tejidos, entre otras (Urbano, Torgler, y otros 2009).

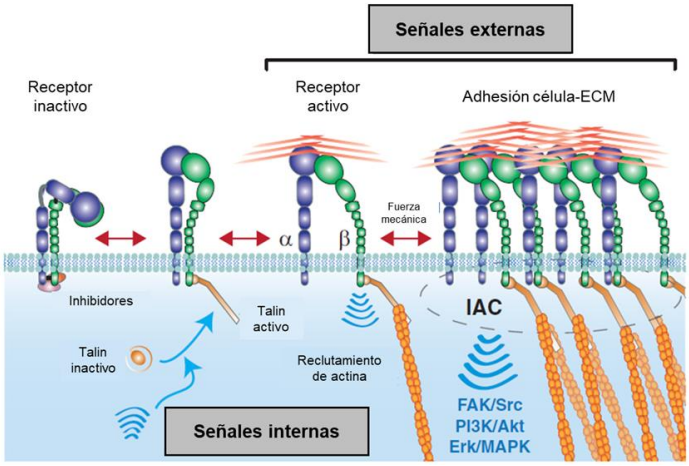

Figura 4. Diagrama del establecimiento y maduración de los complejos de integrina. IAC; Complejo de adhesión de integrina.

Como se mencionó anteriormente, las adhesiones célula-ECM (uniones hemiadherentes) son mediadas por complejos de integrinas, proteínas transmembranales que permiten la interacción entre la célula y la ECM. En *Drosophila* se han identificado 5 subunidades de integrina α (αPS1 – αPS5) y dos

subunidades β (βPS y βv), de las cuales sólo la subunidad βPS es indispensable para el desarrollo (Brown, Gregory y Martin-Bermudo 2000). Además de la formación del complejo transmembranal compuesto por una subunidad α y una β, las funciones de estas proteínas dependen de sus proteínas accesorias, las cuales le permitirán relacionarse con el citoesqueleto de actina, microtúbulos o con diferentes vías de señalización (Green y Brown 2019).

Para el caso específico de las uniones hemiadherentes, es necesario que el complejo de integrinas entre en contacto con el citoesqueleto de actina, en una interacción establecida por Talin, una proteína adaptadora cuya principal función es relacionar al complejo de integrina con los filamentos de actina, ya sea directamente o por medio de otras proteínas como la vinculina (Green y Brown 2019), de esta forma el complejo puede relacionarse con la actomiosina basal, reorganizándola y ocasionando una señalización mecánica en la célula (Santa-Cruz, y otros 2020). Por otro lado, los complejos de integrina funcionan como receptores bidireccionales, permitiendo que la célula tenga un papel activo en la organización de la matriz extracelular (Khadilkar, y otros 2020). Para llevar esto a cabo, es necesario la activación intracelular del complejo mediado por Talin, el cual se une a la cola intracelular de la subunidad βPS de integrina generando cambios conformacionales en el receptor extracelular del complejo, facilitando la unión de sus receptores en la matriz extracelular (Tadokoro, y otros 2003).

Se han realizado diversos experimentos de pérdida de función, inhibiendo a los diferentes componentes del complejo de las integrinas en distintos tejidos. En estos estudios se ha reportado que inhibir a la subunidad βPS de la integrina y a la proteína Talin ocasionan los defectos más severos, debido a que estos dos componentes son los que se encuentran conectando a todo el complejo (Urbano, Domínguez-Jimenez, Estrada, y Martín-Bermudo 2011; Klapholz, y otros 2015; Green y Brown 2019).

Papel de las integrinas en el desarrollo.

Durante el desarrollo se llevan a cabo una gran diversidad de movimientos morfogenéticos, los cuales son producto de eventos de señalización y diferentes rearreglos celulares. Dichos movimientos celulares son mediados en gran parte por interacciones célula-ECM, las cuales permiten polarizar a la célula y llevar a cabo cambios de forma necesarios para la morfogénesis del nuevo organismo, tanto durante su desarrollo embrionario como en su vida postnatal (Pulous, y otros 2021; Chau, y otros 2022, Preprint). Algunos de los procesos en los cuales participan este tipo de adhesiones son la polarización de cardioblastos (Vanderploeg, y otros 2012), la proliferación y diferenciación de células endoteliales (Pulous, y otros 2021), el recubrimiento de los axones por células de la glía (Xie y Auld 2011), la organización de las células foliculares en el ovario (O´Reilly, Lee y Simon 2008), entre otros.

En *Drosophila*, debido a que las primeras etapas del desarrollo temprano ocurren de forma unicelular, no es necesaria la presencia de una matriz extracelular y, por lo tanto, los complejos de integrina se establecen en etapas intermedias (Urbano, Torgler, y otros 2009). Se ha reportado que, durante la gastrulación estos complejos se encuentran anclando sitios específicos del embrión a su membrana vitelina, favoreciendo así la correcta organización del embrión (Munster, y otros 2019). De igual forma, las integrinas se encuentran mediando los movimientos morfogenéticos durante la retracción de la banda germinal, utilizando al mesodermo visceral como su sustrato (Urbano, Domínguez-Jimenez, y otros 2011).

Posterior a la retracción de la banda germinal comienza el cerrado dorsal de la epidermis, la cual fue anteriormente formada a partir del ectodermo ventrolateral del embrión. Para esto la amnioserosa, anclada al vitelo por medio de integrinas, utiliza estos complejos como un soporte mecánico, lo cual le permite contraer su citoesqueleto de actina y disminuir su superficie apical, favoreciendo así el cerrado de la epidermis. Por su parte, las células de la epidermis también se encuentran unidas a una matriz extracelular. Diferentes experimentos han reportado que al inducir un aumento en la actividad de Talin en las células de la epidermis, el cerrado dorsal ocurre más lentamente (Goodwin, Ellis, y otros 2016), mientras que cuando

este complejo se inhibe el cerrado falla en completarse (Brown, Gregory y Martin-Bermudo 2000). Por su parte, el complejo de integrinas también participa en la migración celular durante la elongación y ramificación del sistema traqueal, en el cual se ha reportado que embriones mutantes de integrina βPS (β-integrina) presentan malformaciones en el tronco dorsal, afectando también la ramificación global del sistema (Boube, y otros 2001). Por otro lado, mutantes de Talin presentan una desorganización en el lumen formado por las células terminales durante estadios larvarios (Levi, Ghabrial y Krasnow 2006). De igual forma, los experimentos realizados por Klussmann-Fricke, Martin-Bermudo, y Llimargas (2022) en donde analizan mutantes para los genes de las lamininas, se reportaron fenotipos aberrantes en el tronco dorsal, aumentando su longitud y presentando un mayor enrollamiento. Con esto, las interacciones célula-ECM se establecen como un factor importante durante la morfogénesis de *Drosophila melanogaster.*

Justificación

El sistema respiratorio de *Drosophila melanogaster* está conformado por ramificaciones con diferentes tipos de estructuras tubulares, por lo que ha sido comúnmente usado como modelo para entender los mecanismos celulares en la formación de órganos con este tipo de estructuras, como el riñón, glándulas mamarias, etc. (Goodwin y Nelson 2020). Aunque se ha reportado que durante el desarrollo de este sistema el principal mecanismo de direccionalidad de las ramificaciones es la quimioatracción por Bnl/FGF, aún falta investigar cómo su interacción con otros tejidos podría estar afectando el desarrollo del sistema respiratorio. Recientemente, en otros sistemas se ha reportado que el ambiente mecánico de la célula, es decir, la dureza del sustrato en el que las células se localizan, su elasticidad y otras propiedades similares, influyen de manera importante en el comportamiento celular. Por lo tanto, el estudiar estas propiedades en un sistema bien caracterizado desde el punto de vista de la señalización como es el sistema traqueal, nos permitirá tener una visión más global de la morfogénesis.

El sistema traqueal elonga sus ramificaciones primarias y desplaza sus troncos dorsales de forma paralela al cerrado dorsal durante la embriogénesis, por lo que resulta interesante estudiar de qué forma estos procesos podrían estar contribuyendo entre sí. Como es sabido, la epidermis se encuentra asociada a una matriz extracelular por medio de integrinas, las cuales permiten la tracción del tejido para llevar a cabo el cerrado dorsal. Al ser la interacción entre tejidos una de las funciones principales de la matriz extracelular, inferimos que la epidermis podría estar interaccionando con el sistema respiratorio a través de adhesiones célula-matriz, ocasionando que el desplazamiento de los troncos dorsales se lleve a cabo al mismo tiempo que el cerrado dorsal.

Debido a esto, el siguiente proyecto analiza cómo influye la formación de complejos de integrinas en la interacción entre la epidermis y el desarrollo del sistema respiratorio. Para esto, se describirá la interacción entre los dos tejidos por medio

de microscopía confocal utilizando diferentes marcadores para distinguir al sistema traqueal, las integrinas y la matriz extracelular.

Posteriormente se realizarán experimentos de pérdida de función donde se estudiarán los efectos que tendría la ausencia de complejos de integrinas en el desarrollo del sistema respiratorio. Por último, se analizarán cuantitativamente los cambios en la dinámica del desarrollo del sistema traqueal con respecto al cerrado dorsal de la epidermis en presencia y ausencia de complejos de integrinas.

Hipótesis

El desplazamiento dorsal de la epidermis y del sistema traqueal está coordinado por complejos de adhesión de tipo integrinas hacia la matriz extracelular que separa ambos tejidos.

Objetivo general

Analizar el papel del complejo de las integrinas en la interacción entre la epidermis y el sistema respiratorio de *Drosophila melanogaster*.

Objetivos específicos

1. Describir la relación entre la formación de la matriz extracelular y el desarrollo del sistema respiratorio durante el cerrado dorsal.
2. Cuantificar el acoplamiento del desplazamiento del sistema respiratorio con el cerrado de la epidermis, en moscas con y sin complejo de integrinas.
3. Analizar los efectos de la pérdida de función del complejo de las integrinas en el desarrollo del sistema respiratorio embrionario y larvario.

Estrategia experimental

Sistema Gal4/UAS.

Para los experimentos del presente proyecto se usó principalmente el sistema Gal4/UAS, el cual nos permitió dirigir las diferentes herramientas utilizadas a los tejidos de interés. Este sistema consiste en insertar el gen Gal4 río abajo de las secuencias regulatorias de cierto gen, al mismo tiempo que se inserta la secuencia reguladora UAS río arriba de una construcción de interés. Con esto, se puede dirigir la expresión del Gal4 a un tejido en particular, y éste a su vez se unirá a su secuencia de unión UAS, ocasionando que UAS induzca la expresión del segundo gen en las mismas células. Este tipo de sistemas binarios permiten combinar una gran cantidad de líneas Gal4 con distintas construcciones UAS, creando una gran cantidad de combinaciones posibles (Duffy 2002).

En este proyecto, utilizamos líneas que utilizan las secuencias regulatorias de *btl*, un gen específico del sistema respiratorio, para dirigir la expresión del factor de transcripción Gal4. Estas construcciones se utilizaron para inducir la expresión de numerosas herramientas, por ejemplo, reporteros fluorescentes que permiten visualizar con marcadores fluorescentes a las células del sistema respiratorio. Igualmente, para experimentos de caracterización utilizamos una línea Gal4 que se expresa en franjas de la epidermis, bajo el control del promotor del gen *engrailed*.

Procesamiento para experimentos de inmunofluorescencia.

Se realizaron análisis de microscopía confocal en embriones de la línea *vkg*-GFP/CyO*; btl*-moeRFP, con el fin de observar el sistema traqueal (*btl*-moeRFP*)* y la colágena IV (*vkg*-GFP) en el embrión. La línea *vkg*-GFP consiste en una inserción de la GFP en el locus de *vkg,* el gen que codifica para una de las cadenas de colágena IV de Drosophila, lo cual resulta en una expresión de la colágena IV fusionado a GFP expresado a niveles fisiológicos. La construcción de *btl*-moeRFP utiliza el promotor del gen *btl* dirigiendo directamente la expresión del reportero

moeRFP. En dichos embriones se realizó también una detección in situ por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti β-integrina.

Para la detección in situ de la proteína β-integrina se colectaron embriones de diferentes estadios los cuales fueron descorionados con cloro comercial y posteriormente contenidos en heptano donde se hizo una fijación con formaldehído 4% durante 25 min con agitación. Para deshacer la membrana vitelina, se retiró el formaldehído y se añadió metanol, con el cual se hizo un lavado con agitación vigorosa durante 1 min seguido de un lavado rápido con metanol. Después los embriones se permeabilizaron haciendo tres lavados de 10 min en PBS + Tritón X-100 0.3%, para poder llevar a cabo el bloqueo, el cual se hizo con BSA 1% por 1 h en agitación. Una vez terminado el bloqueo, los embriones se dejaron incubando con el anticuerpo primario, un IgG monoclonal anti β-integrina hecho en ratón (CF.6G11-s, DSHB) en una concentración de 1:10, durante toda la noche a 4°C. Después de la incubación se realizaron cuatro lavados de 15 min en PBS + Tritón X-100 0.3% para posteriormente incubar a los embriones con el anticuerpo secundario (Goat anti-ratón Alexa Fluor 647, Invitrogen) en una concentración de 1:300, durante 1.5 h en agitación. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a hacer 3 lavados de 10 min con PBS + Tritón X-100 0.3% y realizar el montaje en el medio Vectashield con DAPI. Durante el análisis en el microscopio confocal se seleccionaron los embriones que se encontraban en estadios de interés. Las imágenes se adquirieron utilizando un Microscopio Confocal Nikon A1R+ STORM, con un objetivo de inmersión de agua 60x, Apertura numérica de 1.2, en la modalidad resonante de rápida velocidad de adquisición.

Procesamiento para microscopía electrónica.

Los embriones fueron procesados según el método descrito por Tepass y Hartenstein (1994). Estos se recolectaron y descorionizaron en cloro comercial por 2 minutos. Posteriormente fueron fijados en una solución de 2 ml de glutaraldehído (2.5%) en buffer de cacodilatos (50 mM, pH 7) y 8 ml de heptano por 17 minutos en agitación. Una vez fijados, se procedió a quitar la membrana vitelina de manera

manual, para lo cual se colocó a los embriones en cinta adhesiva de doble cara, cubierta en la solución de glutaraldehído (2.5%) en buffer de cacodilatos (50 mM, pH 7) donde fueron desvitelinizados manualmente con una aguja de insulina. A dichos embriones se les realizó una segunda fijación en tetraóxido de osmio (0.5%) en buffer de cacodilatos (50 mM, pH7) por 2 h. Una vez transcurrido este tiempo, los embriones se lavaron varias veces con buffer de cacodilatos (50 mM, pH7) para ser postfijados en tetraóxido de osmio (1%). Posterior a las fijaciones, los embriones fueron deshidratados en concentraciones graduales de etanol (70, 80, 90, 95, 100%) y encubados en acetona por 15 min dos veces, seguido de incubación en una mezcla de acetona/Epón (1:1) durante toda la noche. Por último, los embriones fueron transferidos a un molde con Epón, donde fueron orientados e incubados a 65°C por 48h.

Una vez fijados en bloques de Epón se hicieron cortes semifinos con el fin de localizar sitios de interés en la estructura y posteriormente realizar cortes finos (50-100 nm) para conocer la ultraestructura de los sitios de unión del sistema respiratorio con la epidermis. Los experimentos de microscopía electrónica se hicieron en un microscopio electrónico modelo JEOL JEM 1200 EXII. Estos experimentos se llevaron a cabo bajo la colaboración del Dr. Horacio Merchant Larios y el Mtro. José Alejandro Marmolejo Valencia del Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Para trazar las células en las micrografías obtenidas, se utilizó el programa IMOD, el cual se especializa en analizar imágenes de microscopía electrónica y en hacer reconstrucciones digitales de las mismas.

Microscopía confocal *in vivo*.

Los embriones se colectaron y se descorionaron como se describe antes. Después de la descorionación, los embriones de los estadios de interés se seleccionaron a mano en placas de agar-jugo de manzana, y se transfirieron a cajas Petri con fondo de vidrio tratadas con pegamento de heptano. Una vez montados, los embriones se cubrieron con aceite de halocarburos para impedir que se desecaran. Después, las

imágenes se adquirieron utilizando un Microscopio Confocal Nikon A1R+ STORM, con un objetivo de inmersión de agua 60x, Apertura numérica de 1.2, en la modalidad Resonante, de alta velocidad de adquisición.

Knockdown basado en el sistema deGradFP.

Se indujo la degradación de la subunidad β-integrina asociada a GFP. Esto mediante el sistema deGradFP, desarrollado para inducir la degradación de proteínas de interés marcadas con GFP. Este sistema utiliza la construcción Nslmb-VhhGFP4, la cual consiste un fragmento de un anticuerpo anti GFP (vhhGFP4) fusionado a Nslmb, una ubiquitin ligasa de tipo E3 que lleva a degradación a los blancos con los que interactúa. Esta construcción se encuentra río abajo del promotor UAS, por lo que su expresión se puede controlar usando el sistema Gal4. Este sistema es más eficiente que otros tipos de silenciamiento como el RNAi, debido a que degrada directamente al producto proteico y no a los transcritos del gen de interés. Una limitación importante es que depende de que se cuente con una línea con la proteína a silenciar fusionada a GFP de manera endógena, de tal forma que el sistema logre remover toda la proteína blanco (Caussinus, Oguz y Affolter 2012). La proteína marcada con GFP debe además encontrarse en homocigosis, para lograr un silenciamiento completo.

Para estos experimentos, empleamos una inserción de la GFP en el gen de la β-integrina caracterizada previamente (Klapholz, y otros 2015). Al expresar Nslmb-VhhGFP4 en cepas que expresan la β-integrina fusionada con GFP de manera endógena, podemos degradar selectivamente la proteína β-integrina en el tejido de interés y observar los efectos en el desarrollo en ausencia de dicha subunidad.

Procesamiento de imágenes y análisis de la coordinación entre tejidos mediante Particle Image Velocimetry Analisys (PIV).

Mediante el análisis PIV se cuantificó la correlación entre el cerrado dorsal de la epidermis y el desplazamiento del tronco dorsal.

Una vez obtenidas las imágenes en el microscopio confocal, se generaron proyecciones cilíndricas de la superficie del embrión, las cuales además se desenrollaron para desplegar la superficie del embrión en una imagen 2D. Lo anterior con el fin de eliminar señal de fondo y proyectar el desplazamiento de los tejidos de interés en un solo plano. Posteriormente se utilizó la plugin de FIJI "PIV Analisys" la cual mide el desplazamiento de la señal de la imagen comparando los cambios en la fluorescencia a través del tiempo. Una vez completada esta medición, el programa genera vectores, los cuales pueden ser comparados entre ambos canales, obteniendo gráficas de correlación entre el desplazamiento del tronco dorsal y la epidermis durante el cerrado dorsal.

Inhibición de la expresión de los genes *mys* (β-integrina) y *rhea* (Talin).

Mientras que los experimentos con nanobodies nos permiten observar en tiempo real el efecto de eliminar componente de adhesión como β-integrina, el silenciamiento con RNAi nos permite observar efectos de largo plazo en estadios larvarios, los cuales podrían ser también informativos para el proyecto. Para observar los efectos de la pérdida de componentes de adhesión en el sistema respiratorio en estadios larvarios, se inhibió la expresión de *mys* y *rhea* por medio de RNAi, para lo cual se utilizaron las líneas P{TriP.JF02819} (Bloomington Drosophila Stock Center) y GD40399 (Vienna Drosophila Resource Center), respectivamente, las cuales poseen promotores UAS. Para esto se seleccionaron larvas de tercer estadío de las cruzas $\frac{btl-gal4,\ UAS-CD4::IFP}{CyO} x \frac{UAS-rheaRNAi}{UAS-rheaRNAi}$ y $\frac{btl-gal4,\ UAS-CD4::IFP}{CyO} x \frac{mysRNAi}{TM6B}$, las cuales se sacrificaron por temperatura (65°C) y se orientaron de forma dorsal en aceite de halocarburos. Estas larvas se analizaron en microscopio confocal con un objetivo 10x, apertura numérica de 0.25. Como

controles, se utilizó la cruza $w^{1118} x \frac{UAS-CD4::IFP}{CyO}$. La línea w^{1118} es una línea control que únicamente presenta defectos en la pigmentación de los ojos, y por lo tanto no presenta defectos en el sistema respiratorio.

Para medir los fenotipos encontrados en los troncos dorsales, se midió la longitud de los troncos dorsales manualmente utilizando el programa de procesamiento de imágenes Imaris, el cual nos permite realizar mediciones en 3D, y obtener resultados más precisos. La longitud de los troncos dorsales se normalizó al tamaño de la larva, utilizando la distancia mínima entre los extremos anterior y posterior de los mismos troncos como puntos de referencia.

Resultados

Existe una correlación entre el cerrado dorsal, el desarrollo del sistema respiratorio y el establecimiento de la matriz extracelular.

El desarrollo temprano en *Drosophila melanogaster* no requiere de una matriz extracelular, por lo que ésta comienza a producirse mientras la gastrulación se está llevando a cabo (Urbano, Torgler, y otros 2009). Para observar la distribución de estos complejos en los estadios de cerrado dorsal, empleamos una línea de moscas que expresa una cadena de la Colágena IV fusionada a GFP al mismo tiempo que expresa un marcador RFP en el sistema respiratorio, bajo el promotor del gen *btl.* Adicionalmente, en esta línea teñimos a la β-integrina en el epectro del infrarrojo.

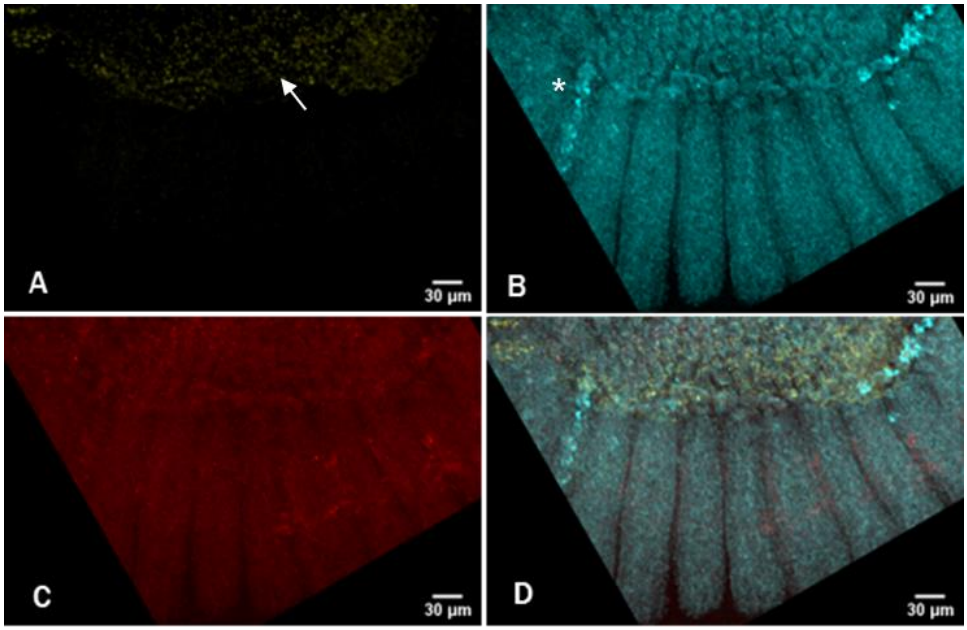

Figura 5. Distribución de los complejos de integrina y la matriz extracelular al inicio del cerrado dorsal (estadio 13). **A.** β-integrina (Alexa647), se muestra a la amnioserosa con señal de β-integrina (flecha). **B.** Colágena (*Vkg*-GFP), *****macrófagos. **C.** Sistema traqueal (*btl*-moeRFP). **D.** Sobrelape.

Previo al inicio del cerrado dorsal se pueden observar complejos de integrinas establecidos en la amnioserosa (*Figura 5A)*, adhiriéndola al vitelo del animal (Kiehart, y otros 2017). Por su parte, comienza la producción de la matriz

extracelular (*Figura 5B*), la cual puede distinguirse en la señal de Colágena-GFP en los hemocitos responsables de su secreción (*Figura 5B, **; Sánchez-Sánchez, y otros 2017). De igual forma comienza la expresión del reportero *btl*>moeRFP en las células del sistema traqueal (*Figura 5C*).

Una vez iniciado el cerrado dorsal, puede observarse cómo ya hay un aumento en la producción de matriz extracelular y en la señal de β-integrina asociada a la epidermis (*Figura 6*). Con base en observaciones previas, en este momento la elongación de las tráqueas ocurre de forma coordinada con el movimiento de la epidermis. Similarmente, cuando el embrión llega a un estadio tardío del cerrado dorsal puede observarse como la matriz extracelular ya se encuentra organizada, con un continuo aumento en la señal de la β-integrina asociado a la epidermis (*Figura 7*). Estos resultados muestran que la elongación del sistema traqueal y el cerrado dorsal correlacionan con la maduración de la matriz extracelular, y posiblemente con el establecimiento de complejos de integrinas que podrían facilitar el establecimiento de interacciones célula-ECM en ambos tejidos.

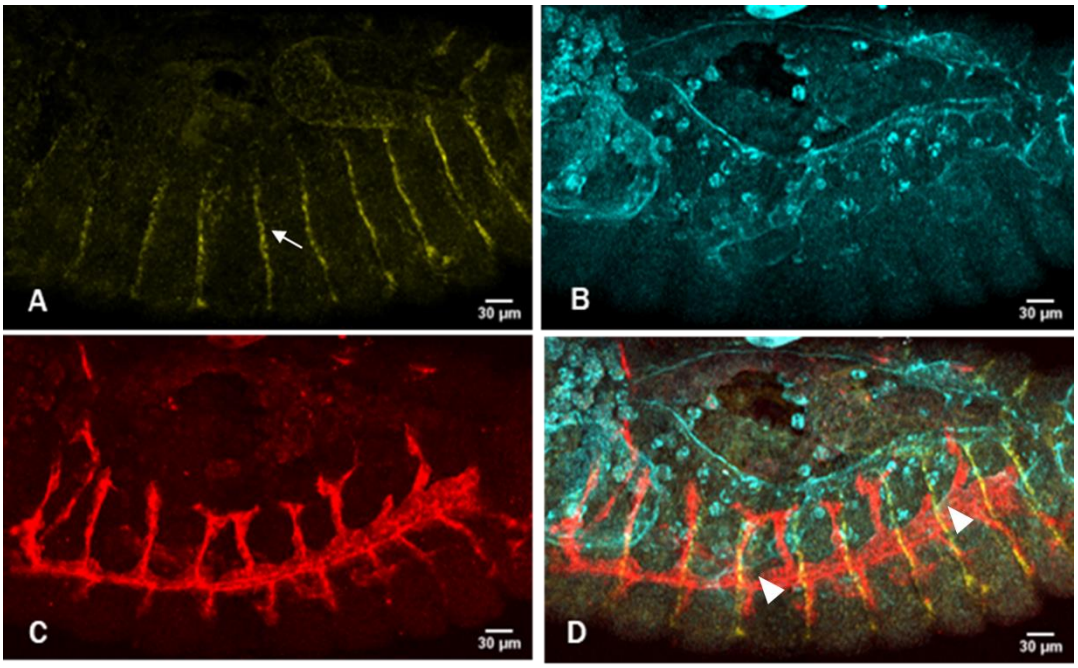

Figura 6. Distribución de los complejos de integrina y la matriz extracelular en una etapa intermedia del cerrado dorsal (estadio 14). **A.** β-integrina (Alexa647), se observa formación de complejos de b-integrina (flechas). **B.** Colágena (*vkg*-GFP).

C. Sistema traqueal (*btl*-moeRFP). **D.** Sobrelape. Acumulación de la ECM en el tronco dorsal (cabezas de flecha).

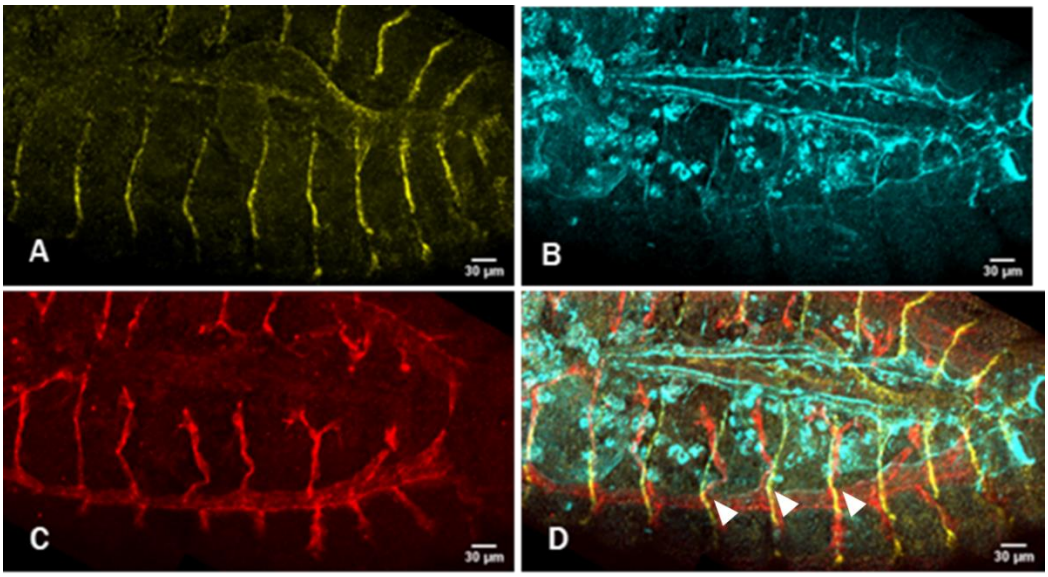

Figura 7. Distribución de los complejos de integrina y la matriz extracelular en una etapa tardía del cerrado dorsal (estadio 15). **A.** β-integrina (Alexa467). **B.** Colágena (*vkg*-GFP). **C.** Sistema traqueal (*btl*-moeRFP). **D.** Sobrelape, se muestra una sobreposición entre la señal de colágeno-GFP y señal de β-integrina (cabezas de flecha).

Con el objetivo de esclarecer la relación entre el sistema respiratorio y la epidermis a través de la matriz extracelular, obtuvimos imágenes con mayor resolución lateral y axial (*Figura 8A - D)*. En éstas se observa como una lámina de matriz extracelular se encuentra recubriendo todo el tronco dorsal (*Figura 8B*) y por su parte, hay una fuerte señal de β-integrina de forma perpendicular en sitios específicos del tronco. La alta señal observada en el canal de β-integrina es atribuida a la presencia de células tendón de la epidermis, las cuales son un subgrupo de células especializadas en el establecimiento de adhesiones focales y por esto, funcionan como el principal anclaje de la epidermis a la matriz extracelular y posteriormente contribuyen en la organización de los músculos (Weitkunat, y otros 2014). En proyecciones ortogonales (*Figura 8E - H*), se puede observar cómo la señal de β-

integrina se sobrepone con la de colágeno en regiones de proximidad con el tronco dorsal del sistema respiratorio (*Figura 8H, **), mostrando una posible interacción física entre la epidermis y el tronco dorsal a través de la matriz extracelular, tomando en cuenta que la zona con alta señal de β-integrina se atribuye a las adhesiones focales de las células tendón de la epidermis.

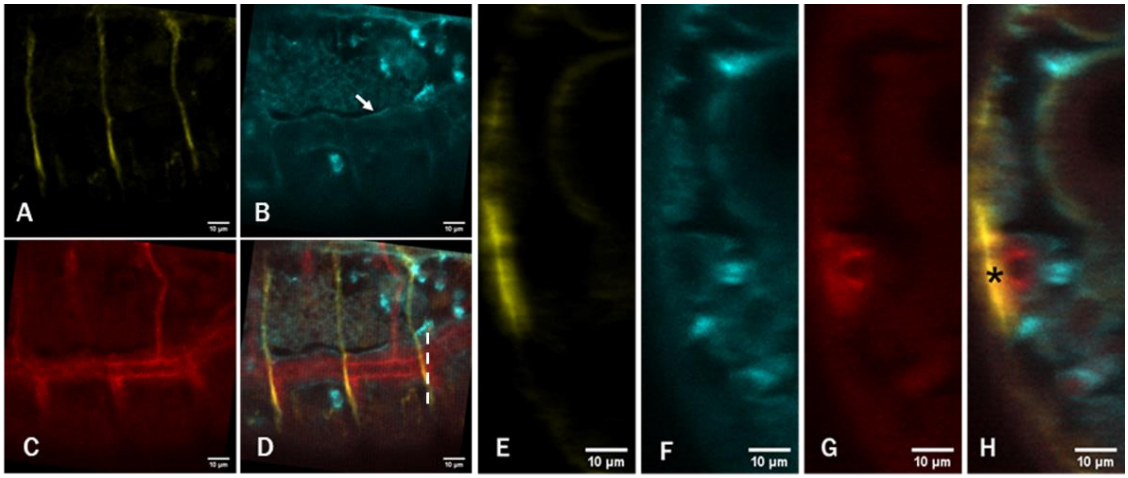

Figura 8. La señal de β-integrina se sobrepone con la de colágeno en gran proximidad con el tronco dorsal. **A.** β-integrina (Alexa647). **B.** Colágeno (*vkg*-GFP), se observa una capa de matriz extracelular recubriendo al tronco dorsal (flecha). **C.** Sistema traqueal (*btl*-moeRFP). **D.** Sobrelape. **E – H.** Proyección ortogonal de los diferentes canales, siguiendo la línea punteada marcada en D. Sitio de la célula tendón (*).

Con el fin de dilucidar la relación física entre la epidermis y el tronco dorsal, se procesaron embriones de la línea *vkg*-GFP*; blt*>moeRFP para poder realizar análisis de ultraestructura por microscopía electrónica. Para esto se seleccionaron embriones en un estadio intermedio del cerrado dorsal, de los cuales se obtuvieron cortes semifinos hasta llegar a un sitio de interés. En este caso se logró observar al tronco dorsal como dos líneas de células epiteliales unidas en la zona ventrolateral del embrión (*Figura 9A, cabeza de flecha)*. Una vez que se localizó esta estructura, se realizaron cortes finos en esta zona y se procesaron para microscopía electrónica. En estas imágenes se logra observar cómo en el extremo del segmento se encuentra una célula de la epidermis con una lámina basal robusta, donde

también se encuentran unidos los músculos del embrión, a la cual identificamos como una célula tendón (Weitkunat, y otros 2014). De igual forma, se identifican células del tronco dorsal que se encuentran extendiendo procesos celulares hacia esta robusta lámina basal, estableciendo contacto y permitiendo la interacción entre la epidermis y el sistema respiratorio *(Figura 9B, cabezas de flecha)*.

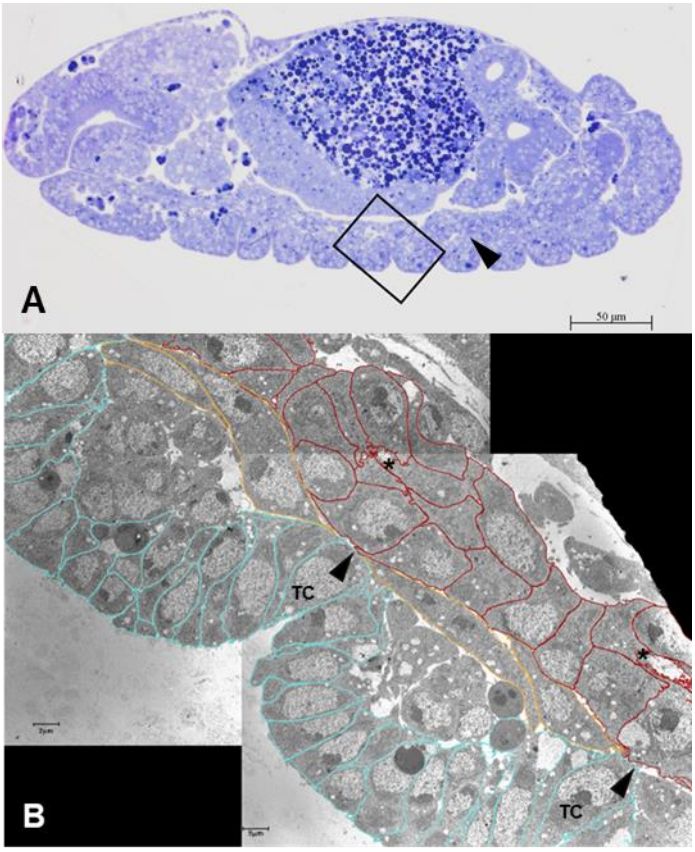

Figura 9. El tronco dorsal mantiene contacto con las células tendón de la epidermis. **A.** Corte semifino del embrión teñido con azul de toluidina. Se identificó al tronco dorsal como dos filas de células muy cercanas en la zona ventrolateral del embrión (cabeza de flecha), las cuales también delimitan un lumen (*). El rectángulo delimita el área a la que se le realizaron los cortes finos. **B.** Ultraestructura de la interacción entre la epidermis y el sistema respiratorio. Se pseudo-delinearon las células según al tejido que pertenecen (epidermis, azul; músculo, naranja; tronco dorsal, rojo). Se muestran los sitios de unión del tronco dorsal con la epidermis (cabeza de flecha). TC, célula tendón.

A partir de los resultados anteriores, se logró observar que el cerrado dorsal de la epidermis y el desarrollo del sistema respiratorio se están llevando a cabo al mismo tiempo, y que estos procesos coinciden con el establecimiento y organización de la matriz extracelular *(Figuras 5 – 8)*. Además de esto, el sistema respiratorio y la epidermis se encuentran unidos a una misma matriz extracelular *(Figura 9)*, siendo esta interacción física entre ambos tejidos una posible razón por la cual ambos procesos se encuentran coordinados. Con lo anterior, proponemos un modelo donde el tronco dorsal se encuentra en contacto con la epidermis en sitios específicos *(Figura 10)*, siendo estos los puntos de anclaje de las células tendón, las cuales están especializadas en formación de adhesiones focales y por lo tanto cuentan con gran enriquecimiento de matriz extracelular. De esta forma, además de la señalización por *bnl*, el tronco dorsal podría estar utilizando la fuerza de la epidermis para desplazarse hacia la misma dirección mientras se lleva a cabo el cerrado dorsal.

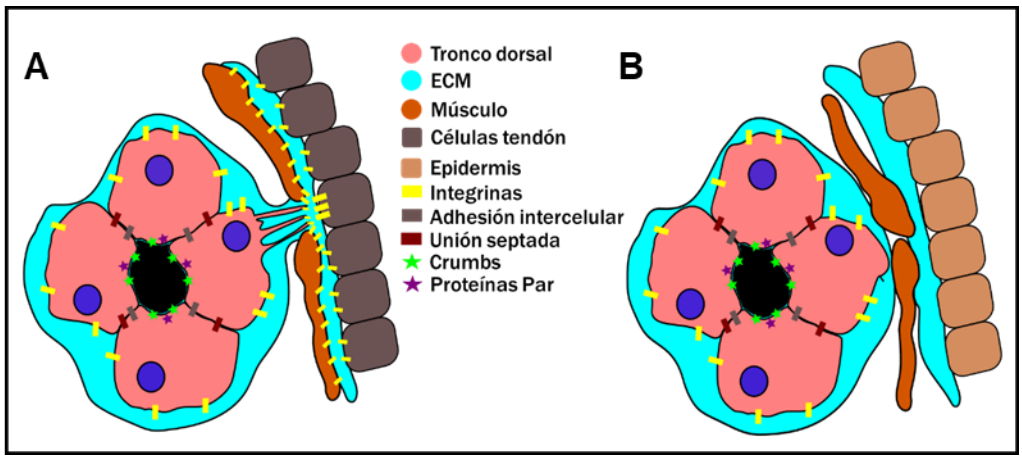

Figura 10. Modelo propuesto para la interacción entre la epidermis y el sistema respiratorio. **A.** Las células del tronco dorsal (rosa) extienden procesos celulares hacia la lámina basal de las células tendón de la epidermis (gris), la cual sirve también de anclaje para los músculos (naranja). **B.** En sitios de la epidermis donde no hay células tendón, el sistema respiratorio se encuentra separado de esta por células musculares y mesodermo.

El sistema deGradPF funciona eficientemente para degradar la β-integrina en la epidermis y el sistema respiratorio.

Una vez caracterizada la distribución de los complejos de adhesión del sistema respiratorio con respecto a la epidermis, realizamos experimentos de perturbación en los que removimos la función de las integrinas. Existen varias limitaciones para realizar estos experimentos de manera sencilla. Por un lado, las mutaciones en genes de los complejos de adhesión como el de la β-integrina (codificado por el gen *mys)*, resultan en letalidad embrionaria previa al cerrado dorsal de la epidermis, lo cual impide que observemos los rearreglos de interés para el proyecto. Un abordaje complementario es el uso de líneas de RNAi contra los genes de interés, pero estos suelen ser inefectivos en estadios embrionarios por la presencia de proteína depositada por la madre. Por estas razones, acudimos a un sistema novedoso basado en degradación selectiva de proteínas denominado deGradFP (ver métodos).

Para probar que el sistema de deGradFP es capaz de degradar a la β-integrina marcada con GFP se realizaron experimentos con la cruza $\frac{mysGFP}{mysGFP}\, x\, \frac{en-gal4,UAS-mCherry.nls}{>}; \frac{UAS-Nslmb-VhhGFP4}{TM3,Sb}$, la cual nos permitió dirigir el sistema de deGradFP en el patrón de expresión de *engrailed* en embriones que poseen la β-integrina marcada con GFP (*mysGFP*). Se decidió probar el sistema con esta línea Gal4 ya que *engrailed* se expresa en bandas en la epidermis, lo cual nos permite tener un control en el mismo tejido, haciendo más sencillo determinar si la degradación es eficiente. En este experimento, también marcamos las células que expresan *engrailed* con mCherry.

Se realizó microscopía *in vivo* en embriones de esta línea y las imágenes obtenidas fueron analizadas en el programa de procesamiento de imágenes FIJI, en el cual se trazó una línea recta a través del embrión y se midió la intensidad de la fluorescencia en cada canal, permitiendo calcular una correlación entre ambos marcadores (*Figura 11*).

Mediante microscopía confocal se observó una exclusión entre la señal de ambos canales en embriones experimentales (*Figura 11A*), los cuales al ser cuantificados presentaron una correlación negativa (*Figura 11C*), cumpliendo el objetivo del sistema de llevar a cabo una degradación de β-integrinaGFP en el patrón de expresión de *engrailed*. Por otro lado, para estos experimentos tomamos como controles a embriones de la misma cruza que no contaran con el cromosoma que contenía Nslmb-VhhGFP4. En dichos embriones no se observó la correlación negativa correspondiente a la degradación de β-integrinaGFP (*Figura 11B, D*).

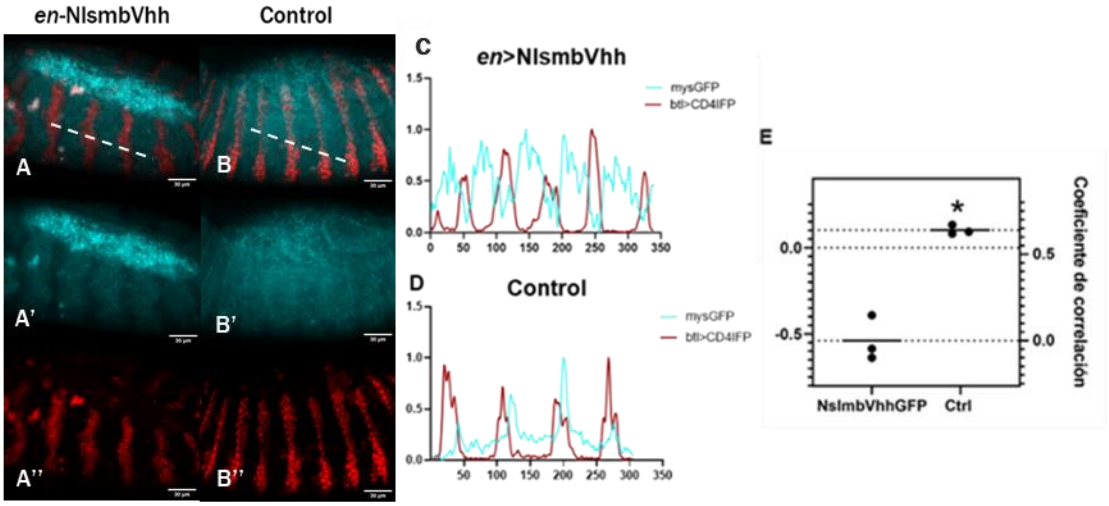

Figura 11. NslmbVhh degrada eficientemente a la β-integrinaGFP en la epidermis. **A, A', A''.** Embrión *en*>NslmbVhh. β-integrinaGFP (cian), *en*-mCherry (rojo). **B, B', B''.** Embrión control. β-integrinaGFP (cian), *en*-mCherry (rojo). **A-B.** La cuantificación se llevó a cabo atravesando el sitio de expresión del reportero. **C-D.** Gráficas de señal en ambos canales en embriones *btl*>NslmbVhh y control, respectivamente. **E.** Gráfica de correlación de embriones control y *btl*>NslmbVhh (n=3). *p=0.008, t de Student.

De la misma manera, se probó el sistema NslmbVhh en el sistema respiratorio, dirigiéndolo mediante la cruza $\frac{mysGFP}{mysGFP}; UAS-NlsmbVhhGFP\ x \frac{btl>CD4IFP}{Cyo}$. De una manera similar, se logró observar una correlación negativa entre la señal de ambos canales en los embriones *btl*>NslmbVhh *(Figura 12A, D)*. Dicha correlación negativa

resultó en una diferencia significativa en comparación con los embriones control (*Figura 12E*).

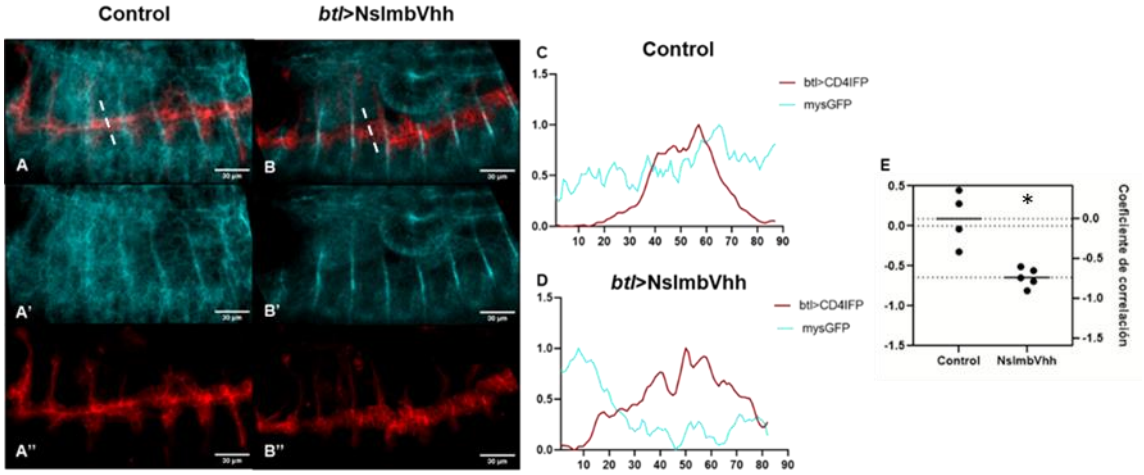

Figura 12. NslmbVhh degrada eficientemente a la β-integrinaGFP en el sistema respiratorio. **A, A', A''.** Embrión control. β-integrinaGFP (cian), sistema respiratorio (rojo). **B, B', B''.** Embrión *btl*>NslmbVhh. β-integrinaGFP (cian), sistema respiratorio (rojo). **A-B.** La cuantificación se llevó a cabo atravesando el sitio de expresión del reportero. **C-D.** Gráficas de señal en ambos canales en embriones control y *btl*>NslmbVhh respectivamente. **E.** Gráfica de correlación de embriones control (n=4) y *btl*>NslmbVhh (n=5). *p=0.0027, t de Student.

<u>La pérdida de β-integrina ocasiona malformaciones en el tronco dorsal del sistema respiratorio.</u>

Una vez confirmado que el sistema deGradFP es capaz de eliminar a la β-integrina del sistema respiratorio, realizamos microscopía en tiempo real para observar el comportamiento de ambos tejidos de interés. En estos experimentos, la misma β-integrinaGFP y la línea *btl-Gal4* nos permitieron también observar a la epidermis y al sistema respiratorio con mascadores verde e infrarrojo, respectivamente. En embriones control se observa como el tronco dorsal se encuentra desplazándose de forma coordinada con el sistema respiratorio (*Figura 13, cabezas de flecha*).

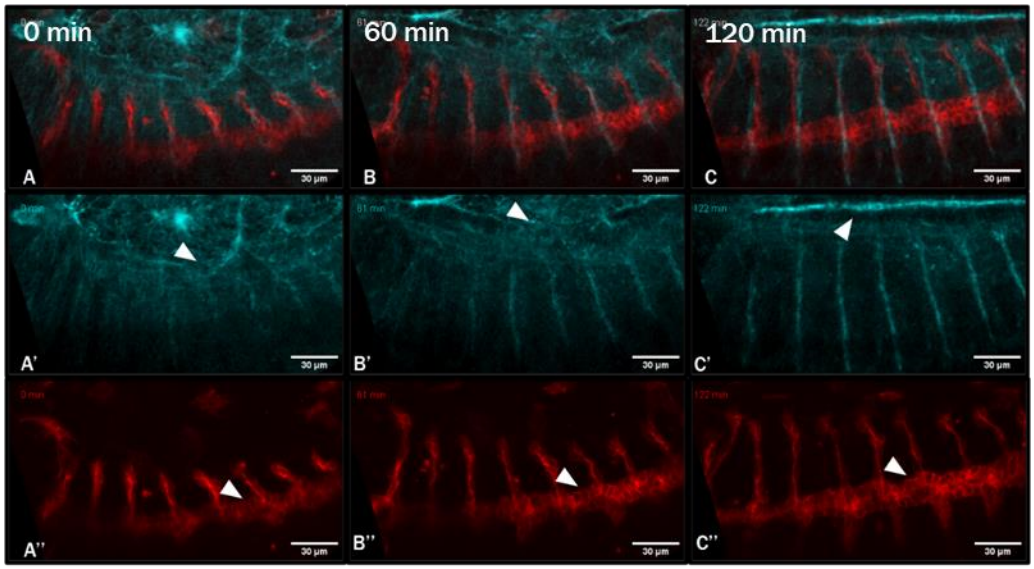

Figura 13. Microscopía *in vivo* control durante el cerrado dorsal. **A – A''.** Minuto 0. β-integrinaGFP (cian), sistema respiratorio (rojo). **B – B''.** Minuto 60. β-integrinaGFP (cian), sistema respiratorio (rojo). **C – C''.** Minuto 120. β-integrinaGFP (cian), sistema respiratorio (rojo). **A', B' C'.** Extremo de la epidermis (cabezas de flecha). **A'', B'', C''.** Tronco dorsal (cabezas de flecha).

Por su parte, los embriones en los que se degradó la β-integrina del sistema respiratorio, también presentan un desplazamiento del tronco dorsal (*Figura 14*). En dichos embriones puede observarse cómo la fusión del tronco dorsal y el desplazamiento de éste se llevan a cabo aún con una disminución significativa de β-integrina en el sistema respiratorio. De la misma manera, la elongación de las ramas dorsales del sistema respiratorio ocurre de forma normal. Una vez que el cerrado dorsal comienza, el tronco dorsal comienza a desplazarse de forma irregular, resultando en malformaciones y curvaturas (*Figura 14B'' – C''*).

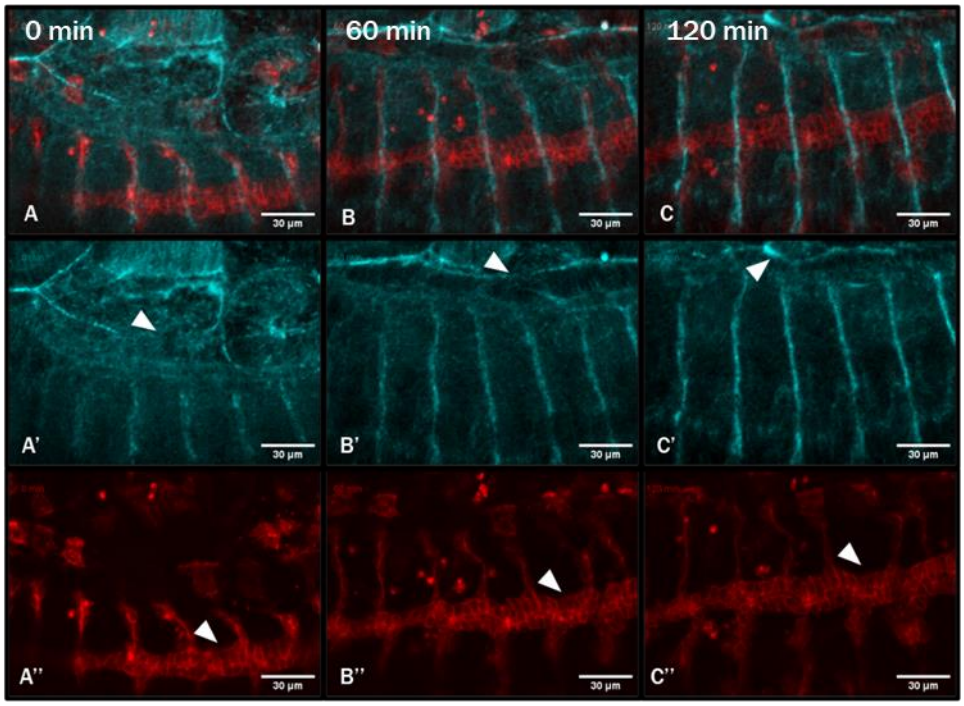

Figura 14. Microscopía *in vivo* de embriones sin β-integrina en el sistema respiratorio, durante el cerrado dorsal. **A – A''.** Minuto 0. β-integrinaGFP (cian), sistema respiratorio (rojo). **B – B''.** Minuto 60. β-integrinaGFP (cian), sistema respiratorio (rojo). **C – C''.** Minuto 120. β-integrinaGFP (cian), sistema respiratorio (rojo). **A', B' C'.** Extremo de la epidermis (cabezas de flecha). **A'', B'', C''.** Tronco dorsal (cabezas de flecha).

Dichas curvaturas son más evidentes en el lumen, el cual frecuentemente forma tortuosidades que no se observan en los controles (*Figura 15B'', línea punteada*). Estas observaciones son también consistentes con reportes recientes, que muestran que en embriones que carecen de laminina, el tronco dorsal del sistema traqueal adquiere una morfología de zigzag (Klussmann-Fricke, Martin-Bermudo and Llimargas 2022). De forma interesante, las curvaturas se encuentran orientadas hacia la misma dirección a donde se elongan las ramas secundarias (*Figura 15B'', cabezas de flecha*). Por lo anterior, proponemos que sin el soporte que representa para el tronco dorsal estar anclado a la epidermis, el movimiento y elongación de las ramas secundarias podría ocasionar estas malformaciones.

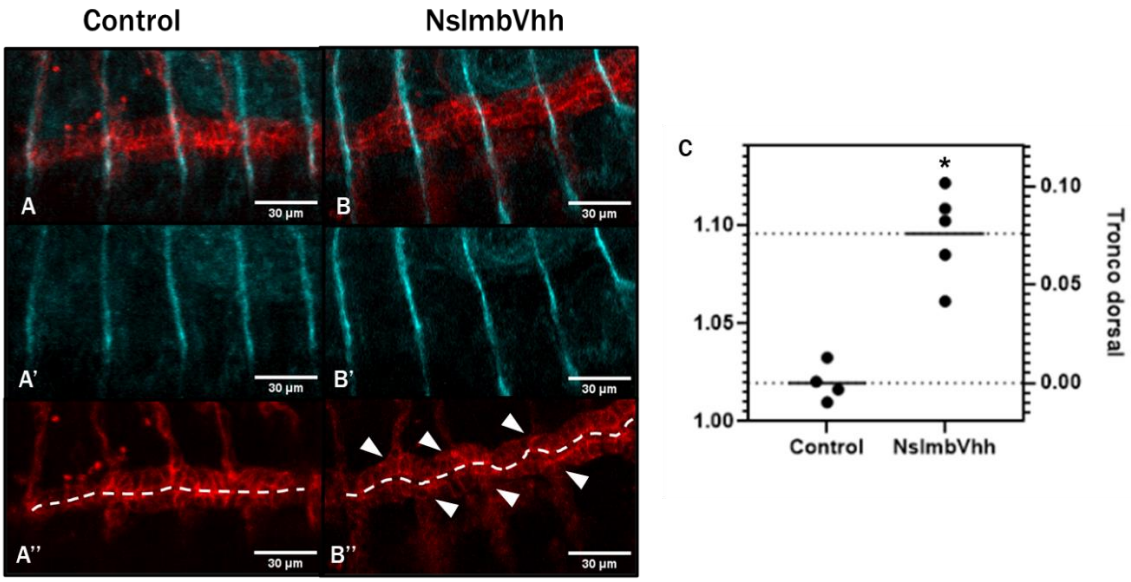

Figura 15. La degradación de la β-integrinaGFP ocasiona tortuosidades y mayor longitud en los troncos dorsales. **A – A''.** Embrión control. β-integrinaGFP (cian). Sistema respiratorio (rojo). **A''.** Lumen (línea punteada). **B – B''.** Embrión NslmbVhh. β-integrinaGFP (cian). Sistema respiratorio (rojo). **B''.** Lumen (línea punteada). Sitios de curvatura (cabezas de flecha). **C.** Gráfica de longitudes del tronco dorsal control vs. NslmbVhh. *p = 0.0005, t de Student.

Para observar los efectos de la degradación de β-integrina en la coordinación entre el desplazamiento del tronco dorsal y la epidermis se realizó un análisis de PIV, descrito anteriormente (*Figura 16*). En los embriones control se observa cómo el desplazamiento de la epidermis y del sistema traqueal tiene una alta correlación durante el cerrado dorsal (*Figura 16A*), en contraste con los embriones NslmbVhh, en los cuales se observaron mayores diferencias en la correlación entre ambos tejidos. Posteriormente se realizó un análisis de correlación cruzada, el cual nos permitió comparar el promedio de las correlaciones obtenidas en cada condición. Con esta última gráfica se concluyó que al degradar la β-integrina en el sistema respiratorio, éste no pierde su coordinación con la epidermis (*Figura 16C)*, al no presentar una diferencia significativa entre los embriones control y los NslmbVhh.

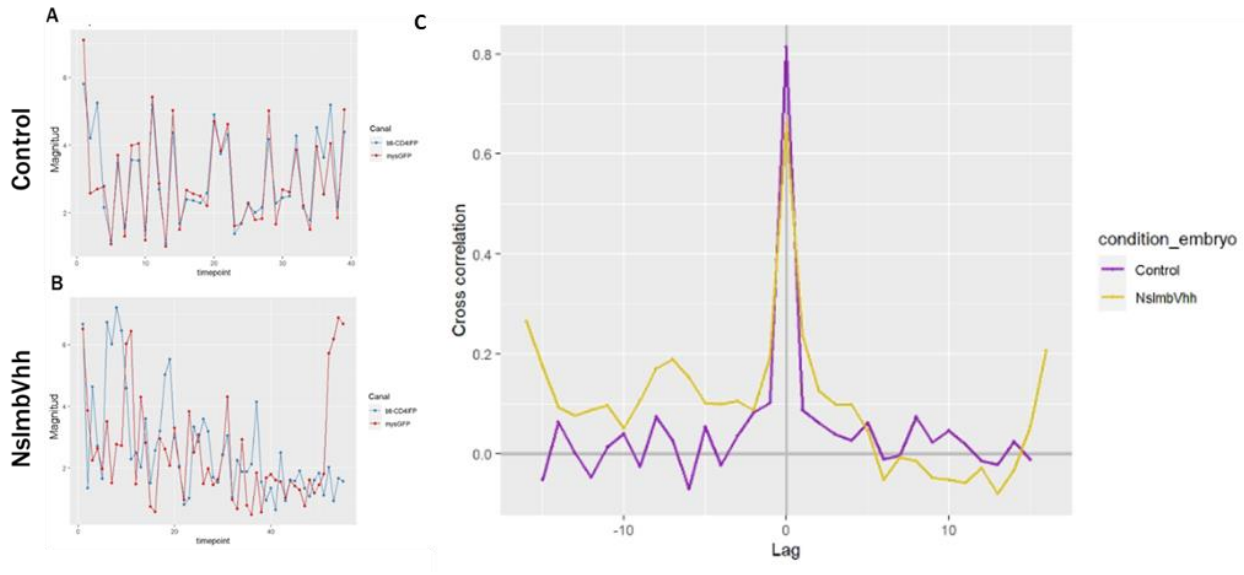

Figura 16. La degradación de β-integrina no afecta a la coordinación entre la epidermis y el tronco dorsal. **A.** Gráfica de correlación entre el sistema respiratorio y la epidermis en embriones control. **B.** Gráfica de correlación entre el sistema respiratorio y la epidermis en embriones *btl*>NslmbVhh. **C.** Gráfica de correlación cruzada entre embriones control (n=4) y *btl*>NslmbVhh (n=5). $^{ns}p = 0.3956$.

<u>Las malformaciones ocasionadas por la pérdida del complejo de integrinas se mantienen hasta etapas larvarias de la mosca.</u>

Con el fin de observar los efectos de la inhibición del complejo de las integrinas en el sistema respiratorio, se utilizaron líneas de RNAi para los genes *mys* y *rhea* que codifican a β-integrina y Talin respectivamente. Estas construcciones poseen un promotor UAS, por lo que su expresión se dirigió al sistema respiratorio con la línea *btl-Gal4*, que también expresaba el marcador fluorescente infrarrojo UAS-CD4mIFP. La inhibición de la expresión de estos genes causó morfologías aberrantes en el tronco dorsal en larvas (*Figura 17A – C*). Dichas larvas presentaron troncos dorsales con torciones anormales y de una mayor longitud. Para cuantificar este fenotipo se decidió medir el largo de los troncos dorsales en 3D, normalizándolos con la longitud total de la larva. Bajo este criterio, las larvas que expresaron *rhea* RNAi, mostraron una diferencia significativa con respecto al control. A pesar de que las larvas de *mys*

RNAi también mostraban tortuosidades en los troncos dorsales, bajo este criterio no encontramos diferencias significativas con respecto al control.

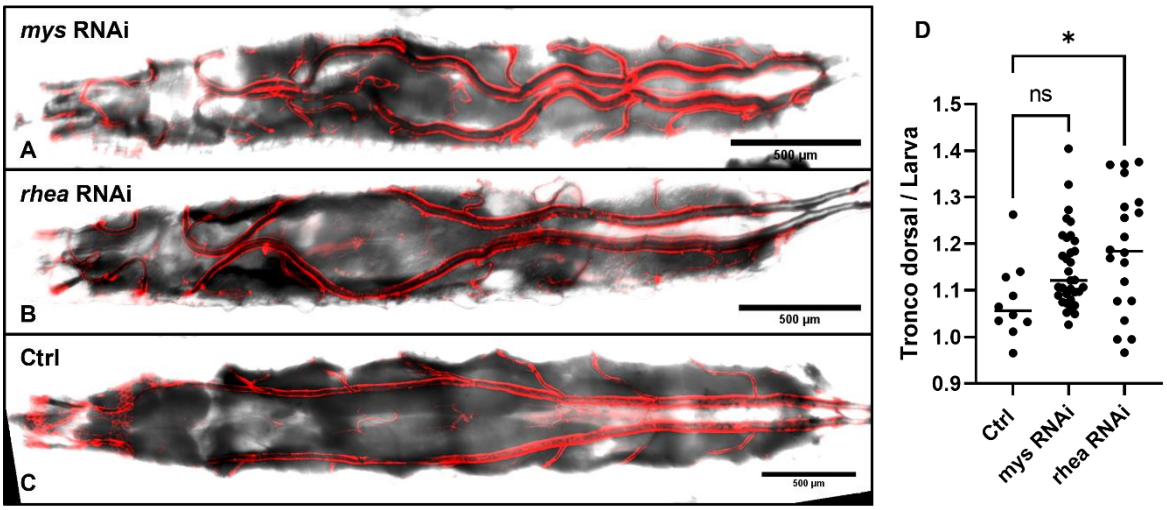

Figura 17. El silenciamiento de *mys* y *rhea* ocasionan malformaciones en el tronco dorsal en larvas. **A – B**. Se observa el sistema respiratorio en rojo, sobrelapado con imágenes de campo claro y con el silenciamiento de diferentes componentes del complejo de integrinas. **C**. Control. **D.** Gráfica de dispersión del cociente de la longitud del tronco dorsal entre la longitud de la larva. *p = 0.0143, Kruskal-Wallis.

Discusión.

El tronco dorsal se encuentra unido a la epidermis a través de una matriz extracelular.

Este proyecto propone la existencia de puntos de contacto entre la epidermis y el tronco dorsal del sistema respiratorio (*Figura 10*) como un factor importante en la remodelación coordinada de ambos tejidos durante el cerrado dorsal. Este contacto se lleva a cabo a través de una matriz extracelular que se encuentra en contacto con ambos tejidos *(Figura 8H)*, permitiendo el anclaje de ambos para su desplazamiento en conjunto. Dicho anclaje a la ECM es mediado por integrinas, las cuales son de gran importancia para la migración celular y el establecimiento de contacto entre tejidos (Reed, y otros 2004; Urbano, Domínguez-Jimenez, y otros 2011). Al remover el complejo de integrinas del sistema respiratorio, éste continúa su desarrollo presentando malformaciones que se observan desde el inicio del cerrado dorsal hasta etapas larvarias (*Figuras 14, 15, 17*), producto de la pérdida de los puntos de unión con la epidermis.

La vía clásica descrita de la morfogénesis del sistema respiratorio es la señalización por *bnl*, el cual atrae a las células terminales hacia su gradiente de concentración, ocasionando la remodelación de todo el sistema (Hayashi y Kondo 2018). Cabe señalar que el receptor a Bnl/FGF únicamente se expresa en las células de las puntas de las ramas traqueales (Centanin, y otros 2008) . Al ser los troncos dorsales una estructura que se extiende a lo largo de todo el embrión resultaría interesante estudiar qué otros factores se encuentran contribuyendo a su desplazamiento.

Por su parte, para el cerrado dorsal de la epidermis se han descrito varios factores que se encuentran contribuyendo activamente en su avance, como el anillo de actomiosina generado en los extremos de la epidermis, la contracción de las células de la epidermis y la amnioserosa, la muerte celular y delaminación de las células de la amnioserosa, entre otros (Pasakarnis, y otros 2016; Saias, y otros 2015; Hayes y Solon 2017). Al encontrarse el tronco dorsal también unido a la epidermis durante

su desplazamiento, éste podría añadirse como otro factor a tomar en cuenta al modelar el cerrado dorsal de la epidermis, como un factor de posible contrapeso.

La pérdida de integrinas en el sistema respiratorio ocasiona malformaciones del tronco dorsal, sin afectar su coordinación con la remodelación de la epidermis.

Se han estudiado embriones mutantes para varios componentes del complejo de las integrinas, en los cuales ambos tejidos fallan en su remodelación, sin embargo, este estudio es el primero en observar cuál es el efecto de remover la adhesión mediada por integrinas únicamente en un tejido, el sistema respiratorio, al mismo tiempo que observamos las consecuencias en tejidos no afectados directamente como sería la epidermis.

En embriones marcados con β-integrinaGFP se observa un enriquecimiento de dicha proteína en la amnioserosa y en los extremos de la epidermis (*Figura 13*), ya que como se ha reportado, el anclaje de la amnioserosa mediado por integrinas al saco vitelino permite la contracción de estas células (Reed, y otros 2004). De igual forma, las integrinas cumplen un papel importante en la interacción de la epidermis con las células de la amnioserosa, permitiendo la transferencia de fuerza entre ambos tejidos (Narasimha y Brown 2004). A lo largo de la epidermis también se observaron acumulaciones específicas de β-integrina, las cuales a su vez se encuentran enriquecidas de matriz extracelular (*Figuras 6 – 7*). En estos sitios de enriquecimiento es donde están ubicadas las células tendón de la epidermis; células especializadas en formar adhesiones focales que cumplen la función de anclar a los músculos del animal con el exoesqueleto (Weitkunat, y otros 2014). Nuestros resultados sugieren que además de esta función, las células tendón también sirven como puntos de adhesión para los troncos dorsales, dándoles estabilidad. Nuestros análisis de microscopía confocal y electrónica muestran que células específicas en el tronco dorsal se encuentran extendiendo filopodios hacia la lámina basal de las células tendón (*Figura 10B*), entrando en contacto con la epidermis. En otros sistemas, se ha caracterizado a este tipo de adhesiones en la punta de los filopodios

como formaciones necesarias para iniciar la interacción entre dos tejidos y posteriormente desarrollar adhesiones focales maduras (Miihkinen, y otros 2021).

Una vez que se estableció la correlación entre el cerrado dorsal de la epidermis y el desplazamiento del tronco dorsal, con ambos tejidos unidos a través de integrinas a una matriz celular en maduración, resultó interesante estudiar cómo se llevan a cabo estos procesos cuando se remueve la adhesión mediada por integrinas. Para esto utilizamos el sistema NslmbVhh que nos permitió degradar la β-integrina en el sistema respiratorio, con lo cual pudimos inhibir la función de todo el complejo de integrinas, al ser la única subunidad β presente en el sistema respiratorio. Aunque no hubo diferencias en la coordinación de ambos tejidos (*Figura 16*), se pudieron observar fenotipos importantes producto de la pérdida en el anclaje del tronco dorsal en la epidermis. A pesar de que algunas de las funciones mayormente descritas del complejo de integrinas es su papel en la migración y cambio de forma celular (Santa-Cruz, y otros 2020; Urbano, Domínguez-Jimenez, y otros 2011), éstas no parecen ser importantes en el proceso de formación del tronco dorsal. Los embriones en los que se degradó la β-integrina del sistema respiratorio presentaron una formación aparentemente normal del tronco dorsal (*Figura 14A*), mostrando que la elongación de las ramificaciones primarias, así como la fusión de estas para formar el tronco dorsal, no son procesos dependientes de integrinas. Sin embargo, aún faltan más estudios para corroborar esta observación. Es posible que el sistema de degradación NsImbVhh no haya eliminado por completo a la proteína β-integrinaGFP y que por eso no observemos un fenotipo severo en la morfología, sin embargo, este sistema ha mostrado ser rápido y efectivo en la remoción de proteínas blanco, incluyendo proteínas transmembranales como sería β-integrina (Caussinus, Oguz y Affolter 2012). Además, nuestros experimentos de expresión en bandas de la epidermis y en el mismo sistema respiratorio muestran una reducción significativa en los niveles de β-integrinaGFP. Un escenario alternativo sería que además de los complejos de integrinas, otras moléculas de adhesión participen en la adhesión del sistema respiratorio a la matriz extracelular. Un candidato interesante sería el complejo de Distroglicano, otro complejo de adhesión que una

a la matriz extracelular con el citoesqueleto de actina (Shcherbata, y otros 2007). Esto es consistente con el fenotipo mutante de las lamininas, en los cuales también se observan ondulaciones del sistema respiratorio pero con mayor severidad (Klussmann-Fricke y colaboradores, 2022). Las lamininas sirven como ligandos tanto para el complejo de las integrinas como para el de distroglicano (Walther y colaboradores, 2022 https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.11.28.518187v1). Es posible que eliminar a ambos complejos simultáneamente resultara en el mismo fenotipo que eliminar a las lamininas.

Aún con la degradación de la β-integrina, el tronco dorsal sigue desplazándose en la misma dirección que en los embriones control, pero mientras su desplazamiento ocurre, éste presenta curvaturas que se vuelven más pronunciadas a través del tiempo (*Figura 14 B – C*). Como se mencionó anteriormente, durante su proceso de elongación las células terminales están siendo atraídas a tejidos blanco lo cual ocasiona el movimiento de todo el sistema (Hayashi y Kondo 2018). La morfología aberrante del tronco dorsal durante su desplazamiento se puede atribuir a la pérdida del sostén de la epidermis, ocasionado que la fuerza ejercida por la elongación de las ramas dorsales se propague de manera aberrante. Esto se propone con base en la morfología que encontramos en los troncos dorsales: Las curvaturas se encuentran orientadas hacia la dirección en que se elongan las ramas dorsales (*Figura 15 B'*). Esta morfología aberrante puede observarse en mayor medida en el lumen, el cual resultó tener mayor longitud debido a su formación en zigzag (*Figura 15 B'' – C*), siendo este fenotipo anteriormente reportado en embriones mutantes para el complejo de Laminina (Klussmann-Fricke, Martin-Bermudo y Llimargas 2022). En el estudio anteriormente mencionado los embriones mutantes para genes de las lamininas presentan un lumen de mayor longitud en el tronco dorsal en etapas tardías del desarrollo, el cual, al observar nuestros experimentos podemos concluir que estos defectos son producto del desplazamiento del tronco dorsal sin la estabilización que representa el estar anclado a la matriz extracelular que también delimita a la epidermis (*Figura 14*).

En el estudio de Klussmann-Fricke y otros (2022) se propone el fenotipo de ondulación de los troncos dorsales que resulta por la falta de lamininas es consecuencia de fallas en la comunicación entre los compartimentos apical y basolateral de las células del sistema respiratorio. Sin embargo, la comunicación entre estos dos compartimentos no se conoce (Barrera-Velázquez y Ríos-Barrera 2021). Nosotros proponemos que este fenotipo resulta de la falta de adhesión del sistema respiratorio hacia las células tendón, lo cual produce que el tronco dorsal sea sometido a mayor tensión por las ramas dorsales y ventrales que se encuentran en procesos de migración en direcciones opuestas.

Al igual que en embriones, los efectos de la inhibición del complejo de las integrinas se extienden hasta las etapas larvarias de la mosca. Al inhibir las principales proteínas del complejo de las integrinas (β-integrina y Talin) mediante RNAi, el tronco dorsal presenta una mayor longitud y se encuentra extendiéndose por toda la larva, observándose también curvaturas y enrollamientos en dicha estructura, siendo el RNAi de Talin el que ocasionó fenotipos más severos (*Figura 17*). Pensamos que esto se debe a que el RNAi de Talin pueda ser más eficiente que el de β-integrina. Esto se deriva de que ambos genes forman parte del mismo complejo y en ninguno de los dos casos existen moléculas homólogas que pudieran estar enmascarando los fenotipos de interés. Cabe señalar que además de los defectos en el tronco dorsal, también se observa un efecto negativo en las células terminales, las cuales se presentan con enrollamientos y con una disminución en sus ramificaciones terminales. Este fenotipo se describió anteriormente en larvas cuyas células terminales tenían mutaciones para los genes *mys* y *rhea* (Levi, Ghabrial y Krasnow 2006).

<u>El contacto entre el tronco dorsal y la epidermis podría proveer fuerzas significativas para que el cerrado dorsal se lleve a cabo correctamente.</u>

Hasta este momento se ha hablado de cómo perder el contacto entre la epidermis y el sistema respiratorio afecta la morfología del tronco dorsal, pero resulta igual de

interesante saber cómo esta situación se encuentra afectando al cerrado dorsal de la epidermis. En los embriones a los cuales se les degradó la β-integrina en el sistema respiratorio se observan cambios en el cerrado dorsal de la epidermis, especialmente en los extremos de ésta. Dichos embriones presentan extremos más irregulares de la epidermis además de cambios de simetría en los patrones de señal en las células tendón, especialmente cerca de los extremos dorsales de la epidermis. Estos cambios en el cerrado dorsal de la epidermis podrían explicarse tomando en cuenta la estabilización que logran ambos tejidos al contar con puntos de contacto. En este caso, además de que la epidermis estabilice el desplazamiento del tronco dorsal, este último también estaría ejerciendo cierta resistencia para que el cerrado pueda llevarse a cabo de forma regular. Aunque no se ha descrito la participación de las células tendón en la progresión del cerrado dorsal, al contar con una lámina basal robusta que funciona como soporte para los músculos y el tronco dorsal (Weitkunat, y otros 2014), estas células podrían participar como un anclaje de la epidermis, brindando un contrapeso importante para la progresión del cerrado dorsal.

El sistema respiratorio de *Drosophila melanogaster* es un modelo de gran relevancia para estudiar interacción entre tejidos.

Por último, anteriormente se ha reportado cómo la elongación de las ramas del sistema respiratorio es necesaria para el correcto posicionamiento de las células precursoras del disco del ala, siendo esta interacción dependiente de integrinas (Inoue y Hayashi 2006). Por lo tanto, es necesario continuar estudiando los procesos mediante los cuales diferentes tejidos coordinan su desarrollo durante la embriogénesis. En este sentido, el sistema respiratorio se vuelve un modelo de gran relevancia, ya que éste se extiende por todo el embrión y entra en contacto con cada tejido de éste, siendo así un modelo útil para estudiar interacciones específicas con distintos tejidos de propiedades químico-mecánicas variables.

Conclusiones

1. El sistema respiratorio se encuentra en contacto con la lámina basal de las células tendón de la epidermis en sitios específicos de tronco dorsal.
2. Aun cuando se pierda el contacto entre epidermis y sistema respiratorio al degradar la β-integrina en el sistema respiratorio, se mantiene la coordinación en el desplazamiento de ambos tejidos.
3. La pérdida de puntos de contacto entre ambos tejidos ocasiona malformaciones en el tronco dorsal. Aunque éste mantiene su desplazamiento, presumiblemente siendo acarreado por las células terminales, la β-integrina es necesaria para la correcta morfogénesis del tronco dorsal al permitir el contacto con la epidermis y estabilizar su desplazamiento.

Perspectivas

1. Se propone realizar experimentos donde el cerrado dorsal de la epidermis no ocurra. Esto para poder observar los efectos en la morfogénesis del tronco dorsal, el cual aún conservaría sus sitios de contacto con la epidermis.
2. Como se observó en los experimentos de microscopía electrónica (*Figura 10B*), ciertas células en el tronco dorsal se encuentran extendiendo filopodios hacia la lámina basal de las células tendón. Evidencia de nuestro laboratorio sugiere que en efecto, existen células del tronco dorsal especializadas en la adhesión a las células tendón. De caracterizarse dichas células, se podría dirigir la degradación de integrinas exclusivamente a estas células, permitiendo analizar de forma más específica los efectos de la pérdida de contacto entre el tronco dorsal y la epidermis.
3. Hasta la fecha existen modelos matemáticos que describen el cerrado dorsal, tomando en cuenta las fuerzas ejercidas por los diferentes tejidos involucrados (Hutson, y otros 2003). Aunque estos modelos integran las fuerzas que promueven el cerrado, nunca se han tomado en cuenta contrafuerzas en la epidermis que permitan un cerrado más estable. Por esto, resultaría interesante cuantificar los cambios en el cerrado dorsal de la epidermis ocasionados por la separación del tronco dorsal.
4. Las células tendón de la epidermis se han caracterizado como puntos de anclaje importantes para los músculos y la cutícula. A pesar de que estas células han sido ampliamente estudiadas, aún no se ha descrito su contribución en la integridad de la epidermis y su remodelación. Sería interesante realizar experimentos que afecten las células tendón para observar las repercusiones en el cerrado dorsal de la epidermis.

Referencias

Barrera-Velázquez, Mariana, y Daniel Ríos-Barrera. «Crosstalk between basal extracellular matrix adhesion and building of apical aschitecture during morphogenesis.» *The Company of Biologist*, 2021: 1-12.

Best, Benedikt. «Single-cell branching morphoghenesis in the Drosophila trachea.» *Developmental Biology*, 2019: 5-15.

Boube, Muriel, Maria Martin-Bermudo, Nicholas Brown, y Jordi Casanova. «Specific tracheal migration is mediated by complementary expression of cell surface proteins.» *Genes & Development*, 2001: 1554-1562.

Brown, Nicholas, Stephen Gregory, y Maria Martin-Bermudo. «Integrins as Mediators of Morphogenesis in Drosophila.» *Developmental Biology*, 2000: 1-16.

Caussinus, Emmanuel, Kanca Oguz, y Markus Affolter. «Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody.» *Nature structural & molecular biology*, 2012: 117-122.

Centanin, Lázaro, Andrés Dekanty, Nuria Romero, Maximiliano Irisarri, Thomas Gorr, y Pablo Wappner. «Cell Autonomy to HIF effects in Drosophila: Tracheal Cells Sense Hypoxia and Induce Terminal Branch Sprouting.» *Developmental Cell*, 2008: 547-558.

Chau, Tevin, y otros. «Dinamically regulated focal adhesions coordinate endothelial cell remodelling in developing vasculature.» *Preprint*, 2022.

Duffy, Joseph. «GAL4 System in Drosophila: A Fly Geneticist's Swiss Army Knife.» *Genesis*, 2002: 1-15.

Gervais, Louis, y Jordi Casanova. «In Vivo Coupling of Cell Elongation and Lumen Formation in a Single Cell.» *Current Biology*, 2010: 359-366.

Gilbert, Scott., y Michael Barresi. *Developmental Biology.* Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2016.

Goodwin, Katherin, Stephanie Ellis, Emily Lostchuck, Teresa Zulueta-Coarasa, Rodrigo Fernandez-Gonzalez, y Guy Tanentzapf. «Basal Cell-Extracellular Matrix Adhesion Regulates force Transmission during Tissue Morphogenesis.» *Developmental Cell*, 2016: 611-625.

Goodwin, Katherin, y Celeste Nelson. «Branching morphogenesis .» *The Company of Biologists*, 2020: 1-6.

Green, Hannah, y Nicholas Brown. «Integrin intracellular machinery in action.» *Experimental Cell Research*, 2019: 226-231.

Hartenstein, Volker, y Ariel Chipman. «Hexapoda: A Drosophila´s View of Development.» En *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates 5: Ecdysozoa III: Hexapoda*, de Wanninger A., 1-91. Los Angeles, USA: Springer-Verlag Wien, 2015.

Hayashi, Shigeo, y Takefumi Kondo. «Development and Function of the Drosophila Tracheal System .» *Genetics*, 2018: 367-380.

Hayes, Peran, y Jérome Solon. «Drosophila doral closure: An orchestra of forces to sip shut the embryo.» *Mechanisms of Development*, 2017: 2-10.

Hutson, Shane, y otros. «Forces for Morphogenesis Investigated with laser Microsurgery and Quantitative Modeling.» *Science*, 2003: 145-149.

Inoue, Yoshiko, y Shigeo Hayashi. «Tissue-specific laminin expression facilitates integrin-dependent association of the embryonic wing disc with the trachea in Drosophila.» *Developmental Biology*, 2006: 90-101.

Jacinto, Antonio, Sarah Woolner, y Paul Matrin. «Dynamic Analysis of Dorsal Closure in Drosophila: Fron Genetics to Cell Biology.» *Developmental Cell*, 2002: 9-19.

Khadilkar, Rohan, Kevin Ho, Bhavya Venkatesh, y Guy Tanentzapf. «Integrins Modulate Extracellular Matrix Organization to Control Cell Signaling durin Hematopoiesis .» *Current Biology*, 2020: 3316-3329.

Kiehart, Daniel, Janice Carwford, Andreas Aristotelous, Stephanos Venakides, y Glenn Edwards. «Cell Sheet Morphogenesis: Dorsal Closure in Drosophila melanogaster as a Model System.» *The Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2017: 169-202.

Klapholz, Benjamin, Samantha Herbert, Jutta Wellmann, Johnson Robert, Maddy Parsons, y Nicholas Brown. «Alternative Mehanisms for Talin to Mediate Integrin Function.» *Current Biology*, 2015: 847-857.

Klussmann-Fricke, Bastian-Jesper, Maria Martin-Bermudo, y Marta Llimargas. «The basement membrane controls size and integrity of the Drosophila tracheal tubes.» *Cell Reports*, 2022: 1-15.

Levi, Boaz, Amin Ghabrial, y Mark Krasnow. «Drosophila talin and integrin genes are required for maintinance of tracheal terminal branches and luminal organization.» *Development*, 2006: 2383-2393.

Meitkunat, Manuela, Aynur Kaya-Copur, Stephan Grill, y Frank Schnorrer. «Tension and Force-Resistant attachment Are essential for Myofibrillogenesis in Drosophila Fligth Muscle.» *Current Biology*, 2014: 705-716.

Miihkinen, Mitro, y otros. «Myosin-X and talin modulate integrin activity at filopodia tips.» *CellPress*, 2021: 1-8.

Munster, Stefan, Akaksha Jain, Alexander Mietke, Anastasios Pavlopoulos, Stephan Grill, y Pavel Tomancak. «Attachment of blastoderm to the vitellina envelope affects gastrularion on insects .» *Nature*, 2019: 395-399.

Narasimha, Maithreyi, y Nicholas Brown. «Novel Functions of Integrins in Epithelial Morphogenesis .» *Current Biology*, 2004: 381-385.

O´Reilly, Alana, Hsiu-Hsiang Lee, y Michael Simon. «Integrins control the positioning and proliferation of follicle stem cells in the Drosophila ovary.» *The Journal of Cell Biology*, 2008: 801-815.

Pasakarnis, Laurynas, Erich Frei, Emmanuel Caussinus, Markus Affolter, y Damian Brunner. «Amnioserosa cell constriction but not epidermal actin cable tension automously drives dorsal closure.» *Naure cell biology*, 2016: 1161-1172.

Pulous, Fadi, y otros. «Talin-dependent integrin activation is required for endothelial proliferation and postnatal angiogenesis.» *Angiogenesis*, 2021: 177-190.

Reed, Bruce, Ronit Wilk, Friedrer Schock, y Howard Lipshitz. «Integrin-Dependent Apposition of Drosophila Extraembryonic Membranes Promotes Morphogenesis and Prevents Anoikis.» *Current Biology*, 2004: 372-380.

Saias, Laure, y otros. «Decrease in Cell Volume Generates Contractile Forces Driving Dorsal Closure.» *Developmental Cell*, 2015: 1-11.

Sánchez-Sánchez, Besaiz, y otros. «Drosophila Embryonic Hemocytes Produce Laminins to Strenthen Migratory Response.» *Cell Reports*, 2017: 1461-1470.

Santa-Cruz, Carmen, Andrea Valencia-Expósito, Palacios Isabel, y María Martín-Bermudo. «Integrins regulate ephitelial cell shape by controlling the architecture and mechanical properties of basal actomyosin networks.» *PLoS Genetics*, 2020: 1-24.

Shaye, Daniel, Jordi Casanova, y Marta Llimargas. «Modulation of intracellular trafficking regulates cell intercalation in the Drosophila trachea.» *Nature Cell Biology*, 2008: 964-970.

Shcherbata, Halyna, y otros. «Dissecting muscle and neuronal disorders in a Drosophila model of muscular dystrophy.» *The EMBO Journal*, 2007: 481-493.

Tadokoro, Seiji, y otros. «Talin Binding to Integrin b Tails: A Final Common Step in Integrin Activation.» *American Association for the Advancement of Science*, 2003: 103-106.

Tadros, Wael, y Howard Lipshitz. «The maternal-to-zygotic transition: a play of two acts.» *Development*, 2009: 3033-3042.

Tepass, Ulrich, y Volker Hartenstein. «The development of celular junctions in the Drosophila embryo.» *Developmental biology*, 1994: 563-596.

Tiklová, Katarína, Vasilios Tsarouhas, y Christos Samakovlis. «Control of Airway Tube Diameter and Integrity by Secreted Chitin-Binding Proteins in Drosophila.» *PLoS ONE*, 2013: 1-9.

Urbano, Jose, Paloma Domínguez-Jimenez, Beatriz Estrada, y María Martín-Bermudo. «PS Integrins and Laminins: Key Regulators of Cell Migration during Drosophila Embryogenesis.» *Plos one*, 2011: 1-14.

Urbano, Jose, y otros. «Drosophila laminins act as key regulators of basement membrane assembly and morphogenesis.» *Development*, 2009: 4165-4176.

Uv, Anne, Rafael Cantera, y Christos Samakovlis. «drosophila tracheal morphogenesis: intrincate cellular solutions to basic plimbing problems.» *TRENDS in cell biology*, 2003: 301-309.

Vanderploeg, Jessica, Lourdes Vazquez, Allison MacMullin, y Roger Jacobs. «Integrins are required for cardioblast polarisation in Drosophila.» *BioMed Central*, 2012: 1-11.

Weitkunat, Manuela, Aynur Kaya-Copur, Stephan Grill, y Frank Schnorrer. «Tension And Force-Resistant Attachment are Essential for Myofibrillogenesis in Drosophila Flight Muscle.» *Current Biology*, 2014: 705-716.

Xie, Xiaojun, y Vanessa Auld. «Integrins are necessary for the development and maintinance of the glial layers in the Drosophila peripheral nerve.» *Development*, 2011: 3813-3822.