



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

“ CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN

DEL GEN *amigo de fos (amfos)* EN

EMBRIONES DE *Drosophila melanogaster*”

PROPIEDAD DE LA FACULTAD  
DE QUÍMICA DE LA U. A. Q.

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

NESTOR OCTAVIO NAZARIO YEPIZ

DIRIGIDA POR

Dr. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR

FACULTAD DE  
QUÍMICA



BIBLOTECA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2004.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN  
DEL GEN *amigo de fos* (*amfos*) EN  
EMBRIONES DE *Drosophila melanogaster*”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

NESTOR OCTAVIO NAZARIO YEPIZ

DIRIGIDA POR

Dr. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR

SINODALES

Dr. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR  
DIRECTOR

---

Dr. MARÍA TERESA PEÑA RANGEL  
SINODAL

---

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER  
SINODAL

---

Dr. LUIS MIGUEL SALGADO RODRÍGUEZ  
SINODAL

---

## ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
I. GENERALIDADES DE <i>Drosophila melanogaster</i>	2
A. Ciclo de vida	2
B. El genoma de <i>Drosophila melanogaster</i>	4
C. Cromosomas politénicos y mapa citológico	4
D. <i>Drosophila melanogaster</i> y el análisis celular	5
II. ETAPAS EMBRIONARIAS DE <i>Drosophila melanogaster</i>	6
A. Divisiones del blastodermo sincisial	8
B. Gastrulación	9
C. Extensión de la banda germinal	12
D. Neurulación	13
E. Retracción de la banda germinal	14
F. Cerrado dorsal	14
G. Involución de la cabeza	15
III. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES	15
A. Receptores con actividad tirosina cinasa	16
B. Ras y la vía MAPK	16
C. Vía JNK	19
IV. MUTANTES CON FENOTIPO DE APERTURA DORSAL	22
A. <i>Dfos</i>	22
B. <i>amigo de fos</i>	24

HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	28
↔ GENERAL	28
↔ ESPECÍFICOS	28
METODOLOGÍA	29
MATERIAL	29
MÉTODOS	29
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Etapas del desarrollo embrionario de <i>Drosophila melanogaster</i>	6

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	3
2. Eventos que ocurren durante el desarrollo embrionario de <i>Drosophila melanogaster</i>	10
3. Vía de señalización de tipo MAPK	18
4. Dominio zipper de leucina	21
5. Expresión de <i>Dfos</i> en embriones silvestres	23
6. Interacción genética entre <i>Dfos</i> y <i>amfos</i>	25
7. Western blot y Northern blot	26
8. Resultados de la hibridación <i>in situ</i>	36
9. Células de la amnioserosa de hibridación <i>in situ</i>	37
10. Células del <i>anl</i> agen cardiaco	38
11. Inmunohistoquímica en embriones fijados con formaldehído	39
12. Embriones tempranos	40
13. Células de la amnioserosa	41
14. Distribución nuclear	41
15. <i>Anl</i> agen cardiaco y sistema nervioso	42
16. Inmunohistoquímica en embriones fijados con glutaraldehído.	43
17. Amnioserosa de embrión fijado con glutaraldehído	43
18. Patrón segmentado	44
19. <i>Dfos</i> y <i>amfos</i>	48

## RESUMEN

Las cascadas de transducción de señales de tipo MAPK son indispensables para la activación de varios genes en respuesta a muchísimas señales. Estas vías se encuentran conservadas evolutivamente y median respuestas de proliferación, diferenciación, movimiento y muerte. Una clase de vía tipo MAPK es la vía de la cinasa de Jun (JNK). En *Drosophila melanogaster*, se han reportado varios de los genes de la vía JNK. La activación de esta vía en la embriogénesis, conlleva al cambio de forma celular en el epitelio lateral, lo que a su vez posibilita el proceso de cerrado dorsal. Las mutaciones en genes involucrados en esta vía producen un fenotipo letal llamado apertura dorsal. En el laboratorio de genética de transducción de señales del INB se han estudiado líneas mutantes con deficiencias en el cerrado dorsal. Recientemente se clonó y secuenció un nuevo gen, *amigo de fos* (*amfos*), que como su nombre indica, interactúa genéticamente con el gen *Dfos* de la vía. A partir de la secuencia de un cDNA se sintetizó una sonda de RNA y un polipéptido que se utilizó para generar anticuerpos policlonales. Con estas herramientas, en el presente trabajo se caracterizó el patrón de expresión de este gen en embriones de la línea silvestre *yw*, mediante técnicas inmunohistoquímicas e hibridación *in situ*. Se encontró que parte del patrón de expresión coincide con el patrón de expresión de *Dfos* lo cual sugiere que *Dfos* y *amfos* actúan de manera coordinada durante el cerrado dorsal y es consistente con la fuerte interacción genética de estos dos genes en la vía de la cinasa de Jun. Además, *amfos* se expresa en el sistema nervioso central y las células cardíacas, como una función independiente de *Dfos*.

## INTRODUCCIÓN

Parte del auge actual de la genética con las técnicas de Biología Molecular, resulta del conocimiento íntimo de la función de los genes, para fines científicos y terapéuticos. Muchas veces el estudio de algunos genes resulta inaccesible en los seres humanos y es de vital importancia el uso de animales como modelos experimentales, y dadas las características de *Drosophila melanogaster*, ésta es muy útil en el análisis genético. En el laboratorio se aisló una mutante nueva con deficiencia en el cerrado dorsal, un proceso que ocurre durante la embriogénesis. Este fenotipo es debido a la mutación de un gen nuevo que interacciona genéticamente con el gen *Dfos*, de la vía de la cinasa de Jun. Por medio de técnicas genéticas, incluyendo la recombinación en machos, se mapeó este gen nuevo, *amigo de fos (amfos)*, a la región proximal del brazo derecho del cromosoma 3 de *Drosophila*. Se obtuvo la secuencia del cDNA, y posteriormente con esta secuencia se sintetizó un péptido, que fue utilizado para la producción de anticuerpos en un conejo y una sonda de RNA. Con base en estos conocimientos y los antecedentes que se muestran más adelante, este trabajo consiste en descifrar la expresión de este nuevo gen descubierto en *Drosophila melanogaster*, *amfos*. Para ello se utilizaron técnicas como la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ* que permiten detectar la presencia de la proteína que codifica este gen, o de su transcrito, como un abordaje para entender de que forma podría intervenir este gen con los demás genes involucrados durante el cerrado dorsal.



## ANTECEDENTES

### I. GENERALIDADES DE *Drosophila melanogaster*

*Drosophila melanogaster*, también conocida como la mosca de la fruta, es uno de los organismos mejor estudiados, ya que se ha utilizado en la investigación como un modelo para esclarecer muchos procesos biológicos (Adams y col., 2000), tiene un tamaño aproximado de 3 mm de largo y se conoce con este nombre por que es del tipo de moscas que se acumula alrededor de la fruta madura (Manning, 2003). *Drosophila melanogaster*, ha sido utilizada como modelo experimental por su periodo de vida corto, y su tamaño que permite mantener una buena cantidad de individuos en un espacio muy pequeño. Además se cuenta con varias herramientas para poder hacer análisis genético, ya que existen muchas mutantes en distintos genes y el genoma completo se ha secuenciado (Adams y col., 2000), se utiliza en los análisis bioquímicos, y de conducta. A continuación se describen algunas características de *Drosophila*.

#### A. Ciclo de vida

Una ventaja de trabajar con *Drosophila* es que se pueden estudiar prácticamente tres diferentes individuos en un mismo organismo (embrión, larva y adulto). El ciclo de vida comienza cuando los adultos se aparean y se fecunda el huevo. Después de que se ha llevado a cabo el desarrollo embrionario (el cual se comentará con detalle más adelante), la larva eclosiona y pasa a una larva de 1er estadio, después a 2o estadio y 3er estadio; entonces se forma la prepupa y después en la etapa de pupa sufrirá la metamorfosis, para convertirse en un adulto (ver figura 1)(Manning, 2003).



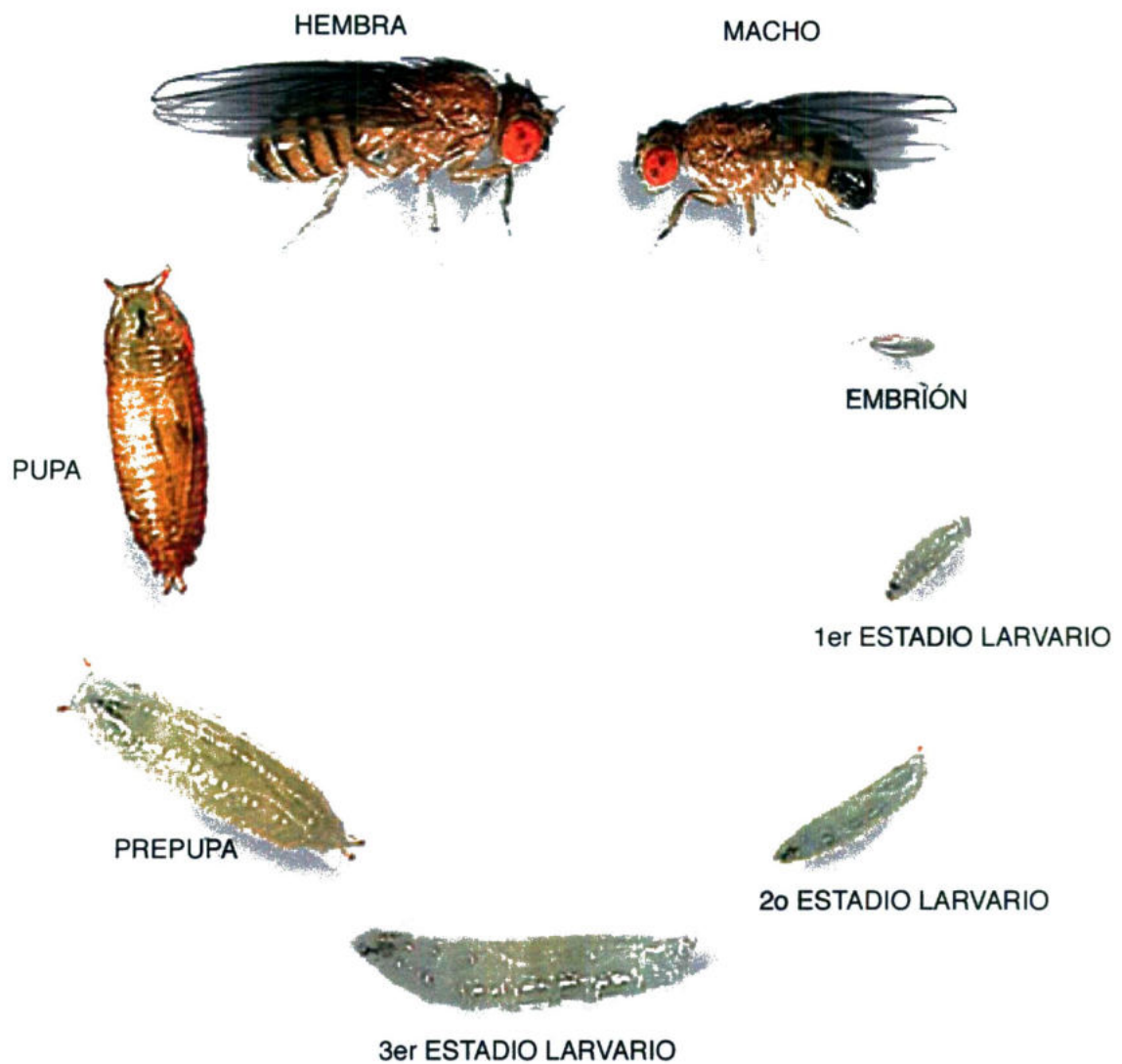


Figura 1. CICLO DE VIDA DE *Drosophila melanogaster*. Cuando el huevo es fertilizado, se forma el embrión, después una larva eclosiona, y esta madura pasando a través de sus diferentes estadios, hasta convertirse en pupa, en donde sufre la metamorfosis para dar origen a una mosca adulta (Imagen modificada de Weigmann y col., 2003).

## **B. El genoma de *Drosophila***

*Drosophila* tiene cuatro pares de cromosomas, un par de cromosomas sexuales y tres pares de cromosomas autosómicos. Por convención se numeran del uno al cuatro y el número uno se usa para designar a los cromosomas sexuales. El cromosoma X y el cromosoma 4 tienen el centrómero en un extremo a diferencia de los cromosomas 2 y 3 que son metacéntricos. El tamaño del cromosoma X, es relativamente comparable con los brazos izquierdo y derecho de los cromosomas 2 y 3 (2L,2R,3L,3R). El cromosoma 4 es aproximadamente 1/5 del tamaño de estos cromosomas (Greenspan, 1997).

El genoma de *Drosophila* contiene aproximadamente 180 mega bases con 13 600 genes, contenidos en estos cuatro cromosomas (Adams y col., 2000; Manning, 2003).

## **C. Cromosomas politénicos y mapa citológico**

Otra característica intrínseca de la mosca de la fruta es la presencia de cromosomas politénicos, estos son cromosomas gigantes que se encuentran en las glándulas salivales de las larvas. Se pueden observar por microscopia de luz y tienen un patrón de bandas que hace posible identificar la posición física de algunos genes (con técnicas de hibridación *in situ*). Cada uno de los brazos de los cromosomas grandes está dividido en 20 segmentos, numerados del 1-20 para el cromosoma X, 21-40 para el 2L, 41-60 para el 2R, 61-80 para el 3L y 81-100 para el 3R. El cromosoma 4 esta numerado como 101-104. Cada región es subdividida en letras (A, B, C, D, E), y cada subdivisión en número de bandas.

#### **D. *Drosophila melanogaster* y el análisis celular**

Se ha puesto mucho énfasis últimamente en Biología del Desarrollo con el análisis celular (con las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*), aunque había sido olvidado posiblemente por lo atrayente de la Biología Molecular, a pesar de que estas técnicas son muy eficientes y relativamente sencillas. Anticuerpos específicos proveen una manera fácil para el estudio de la distribución y localización de una proteína y esto nos puede dar pistas importantes acerca de su función (Roberts, 1998). A veces se puede complementar la utilidad de los anticuerpos, poniendo sondas de RNA y detectar así el transcrito para esa proteína en particular.

El desarrollo embrionario es particularmente favorable para este tipo de análisis celular, ya que se han caracterizado, los movimientos moleculares y morfológicos gracias a estas herramientas. El análisis de muestras fijadas permite analizar muchos embriones en una sola sesión al microscopio, y estas preparaciones son estables por periodos de tiempo muy largos.

Los embriones están protegidos por una capa externa y también por una capa opaca impermeable; el corion y la membrana vitelina, lo cual hace difícil la tinción, pero se pueden eliminar estas capas con tratamiento con solventes, lo cual se comentará mas adelante en las técnicas (Sullivan y col., 2000). A continuación se hablará mas a fondo acerca del desarrollo embrionario de *Drosophila*.



## II. ETAPAS EMBRIONARIAS DE *Drosophila melanogaster*

El desarrollo embrionario es un proceso continuo, con los consecuentes cambios de forma desde el huevo fertilizado. El desarrollo de la mosca procede a través de una compleja serie de periodos y procesos, algunos sucesivos, y otros simultáneos. El despliegue de cualquier vida nueva es una maravilla para contemplar; sobretodo cuando se entiende a nivel bioquímico o genético. Los estadios en el desarrollo de la mosca se clasifican de acuerdo a los eventos morfogenéticos que ocurren. Hay que recordar que la división de la embriogénesis en etapas es artificial, pero muy útil para describir el desarrollo embrionario.

Abajo se muestra una lista de los mismos, desde la fertilización hasta la eclosión de la larva (ver Cuadro 1). Se anotan el número correspondiente de la etapa y los límites de tiempo que enmarcan a cada evento.

Cuadro 1. ETAPAS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DE *Drosophila melanogaster*

Número de etapa	Tiempo después de la fertilización (hr:min)	Actividad de desarrollo
1	0 – 0:15	Fusión pro-núcleos
2	0:15 – 1:10	Pre-blastodermo (1-9 ciclos mitóticos) - división celular temprana – inicio de las divisiones blastodérmicas
3	1:10 - 1:30	Formación del brote polar, formación de las células polares– 9 divisiones nucleares
4	1:30 - 2:10	Blastodermo Sincisial ( 10-13 ciclos mitóticos) – fin de las divisiones blastodérmicas
5	2:10 – 3:00	Celularización del blastodermo
6	3:00 - 3:15	Gastrulación para formar el mesodermo y endodermo - células polares incluidas en el primordio del intestino medio
7	3:15 – 3:20	Elongación de la banda germinal – alargado de la epidermis

		ventral
8	3:20 – 3:50	Elongación rápida de la banda germinal - inicio de la primer mitosis post-blastodérmica - fin de la etapa de parasegmentación mesodérmica
9	3:50 – 4:20	Elongación lenta de la banda germinal - segmentación de neuroblastos – fin de la primera e inicio de la segunda mitosis post-blastodérmica - formación del surco cefálico
10	4:20 – 5:20	Formación del lóbulo gnathal y clypeolabral (características de la cabeza) - invaginación stomodeal – fin de la segunda e inicio de la tercera mitosis post-blastodérmica
11	5:20 – 7:20	Parasegmentación epidérmica evidente – hueco traqueal invaginado - ingreso de células mesectodérmicas – fin de la tercera mitosis post-blastodérmica - fin de formación neuroblástica
12	7:20 – 9:40	Retracción de la banda germinal - invaginación del lóbulo óptico - cerrado ventral – formación de segmentos - fusión del intestino medio anterior y posterior
13	9:20 – 10:20	Fin de la retracción de la banda germinal - diferenciación del sistema nervioso central y sistema nervioso periférico
14	10:20 – 11:20	Cerrado dorsal – comienza la involución de la cabeza
15	11:20 – 13:20	Fin del cerrado dorsal - involución de la cabeza - comienza deposición cuticular - segmentación epidérmica dorsal
16	13:20 – 15:00	Dentículos ventrales visibles – Acortamiento de la cadena nerviosa ventral
17	Antes de la eclosión	El árbol traqueal lleno de aire - Retracción de la cadena ventral continua
Eclosión	21-22 horas	Eclosión a larva de primer estadio

(Brody, 1996).

A continuación se describen los principales eventos que ocurren en el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster* en donde están incluidas las diferentes etapas.



### **A. Divisiones del blastodermo sincisial**

Después de la fertilización, el núcleo se divide trece veces antes de la celularización en la etapa del blastodermo sincisial.

La asincronía de las divisiones mitóticas en embriones es crucial para la embriogénesis temprana. Los primeros 13 ciclos mitóticos ocurren en sincronía, aunque la 12<sup>a</sup> y 13<sup>a</sup> mitosis se extienden a lo largo del eje anterior-posterior. Dentro de la 14<sup>a</sup> mitosis, ocurre un patrón con diferencial mitótico regional. Esta asincronía proviene del alargamiento de la interfase. Victoria Foe llamó a los distintos sincronismos mitóticos regionales del embrión, "dominios mitóticos". En cada una de estas regiones la 14<sup>a</sup> mitosis ocurre en sincronía. Se encontraron 25 dominios de este tipo. En cada dominio hay una orientación definida de las placas ecuatoriales relativas al eje anterior-posterior del embrión. Es aparente que la posición de los "dominios mitóticos" es coincidente con los segmentos y con los *anlagen* (el término *anlagen* se utiliza para las células progenitoras de un órgano), de las futuras y definitivas estructuras de la larva y del adulto. Durante este período se activan muchos genes cigóticos.

Las primeras 7 divisiones conducen a un sincisio de 128 núcleos. En las siguientes tres, los núcleos se aproximan a la superficie del huevo para formar el blastodermo sincisial. Después llevan a cabo cuatro ciclos más de división en la periferia hasta que ocurre la celularización (los núcleos se rodean de membrana plasmática) (Brody, 1996).

La formación de las células somáticas ocurre por extensión de la membrana plasmática que rodea los núcleos del blastodermo sincisial para dar origen al blastodermo celular, antes de que la gastrulación ocurra (ver Fig. 2-5). En esta etapa es en donde se completa la celularización (las células embrionarias se individualizan).

## B. Gastrulación

En la gastrulación la formación de las capas germinales ocurre por la invaginación gradual de un bloque de células medio-ventrales, las cuales formarán una estructura tubular en el interior del embrión. Esta estructura tubular incluye cuatro diferentes primordios (el término primordio se utiliza para nombrar a las células progenitoras de cada órgano una vez que este es reconocible), estos primordios son: el mesodermo, el proctodeum, el intestino medio anterior y el intestino medio posterior (Fig. 2-6).

La gastrulación ocurre en tres pasos:

- Invaginación del surco ventral
- Invaginación del intestino medio anterior
- Invaginación del intestino medio posterior

De los tres acontecimientos de la gastrulación uno está implicado en la formación del mesodermo (invaginación del surco ventral), y los otros dos implican la formación del endodermo (invaginación anterior y posterior del intestino medio).

El surco ventral, que marca el principio de la gastrulación, comienza a formarse conducido por cambios de forma celular. Después, un grupo de células del polo posterior comienzan a moverse en dirección anterior dorsal. Estas células son las células polares, la línea germinal de *Drosophila*. Este movimiento inicia la elongación de la banda germinal; más tarde, un grupo de células se hunde al interior como una continuación del surco ventral para formar la invaginación amnioproctodeal. Las células en la región media ventral experimentan una constricción apical. Una parte de la célula en la superficie del embrión se constriñe, conduciendo su citoplasma basalmente (es decir, hacia el interior del embrión), adquiriendo la forma de una cuña con el extremo estrecho señalando en dirección apical (hacia el exterior del embrión).



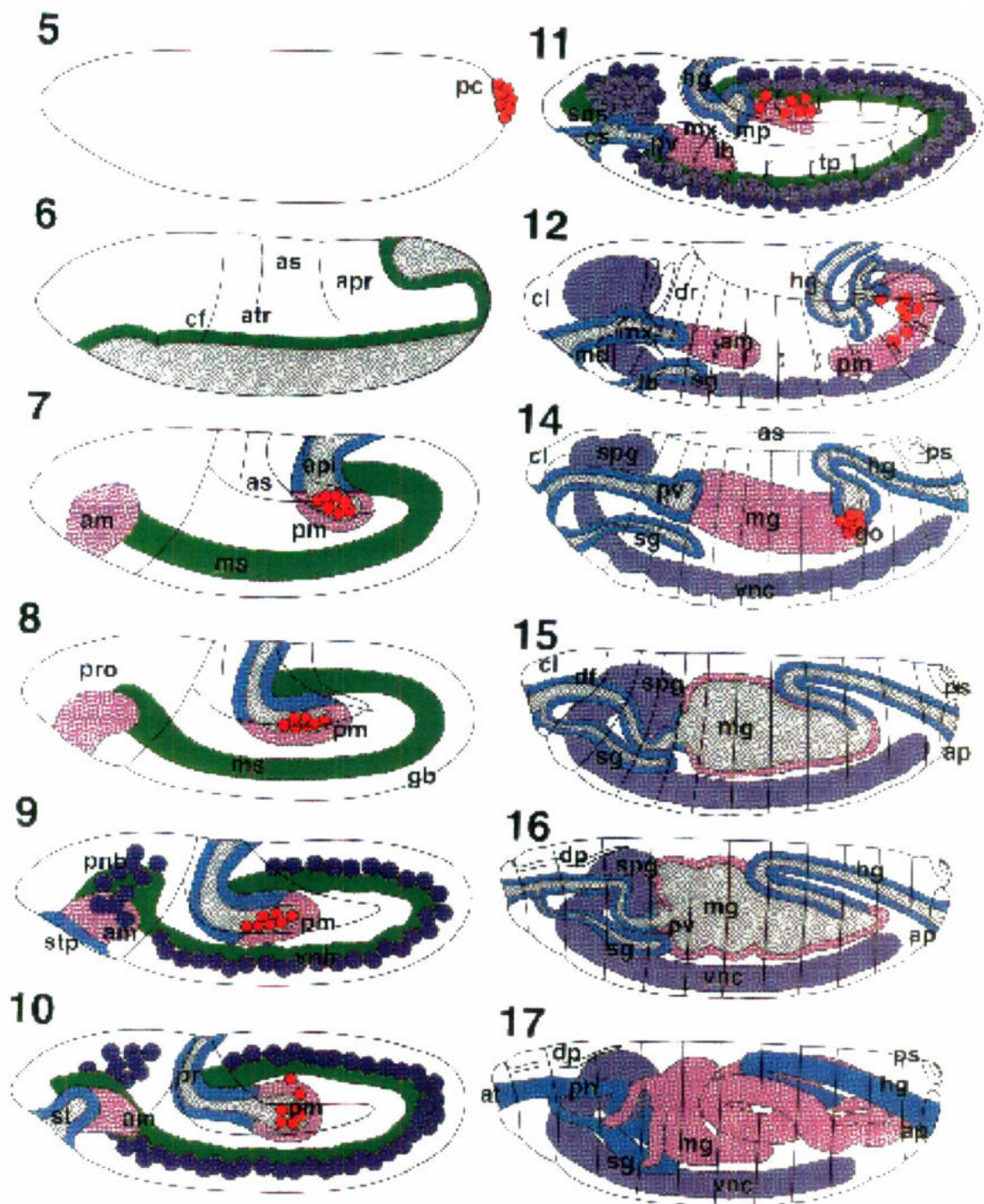


Figura 2. EVENTOS QUE OCURREN DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE *Drosophila melanogaster*. (tomado de Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).

El número de la izquierda de cada dibujo indica la etapa embrionaria.

Etapa 5.- **Blastodermo.** Células polares (*pc*).

Etapa 6.- **Gastrulación.** Surco cefálico (*cf*), surco transverso anterior (*atr*), surco transverso posterior (*apr*), amnioserosa (*as*).

Etapa 7.- **Comienzo de la elongación de la banda germinal.** Intestino medio anterior (*am*), Intestino medio posterior (*pm*), mesodermo (*ms*), invaginación amnioproctodeal (*api*).

Etapa 8.- **Elongación de la banda germinal.** Proctodeum (*pro*), banda germinal (*gb*).

Etapa 9.- **Elongación de la banda germinal en fase lenta.** Neuroblastos procefálicos (*pnb*), neuroblastos ventrales (*vnb*), placa stomodeal (*stp*).

Etapa 10.- **Primera división neuroblástica.** Invaginación stomodeal (*st*).

Etapa 11.- **Segregación epidérmica evidente.** Sistema nervioso stomogastrico (*sns*), (*cs*), proventrículo (*pv*), brote maxilar (*mx*), intestino medio posterior (*mp*), intestino trasero (*hg*), brote labial (*lb*).

Etapa 12.- **Retracción de la banda germinal.** Placa dorsal (*dr*), glándulas salivales (*sg*).

Etapa 14.- **Cerrado dorsal.** Espiráculos dorsales (*ps*), sistema nervioso ganglionar (*vnc*), ganglio supraesofágico (*spg*).

Etapa 15.- **Involución de la cabeza.** Clipeolabrum (*cl*), dobleses dorsales (*df*), placa anal (*ap*).

Etapa 16.- **Involución de la cabeza completa.**

Etapa 17.- **Desarrollo embrionario completo.** Atrio (*at*), faringe (*ph*) (tomado de Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).

Como consecuencia de este cambio de forma celular, las células adyacentes migran hacia el interior, desarrollando el surco. La actina, componente del citoesqueleto, es una de las proteínas que conducen estos cambios de forma en la célula. En el segundo paso la parte externa del surco ventral forma un canal estrecho transversal. Las células de esta invaginación constituirán el primordio del intestino medio anterior. En el último paso ocurre una compleja remodelación de la



invaginación amnioproctodeal que conduce a la formación del primordio del intestino medio posterior (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).

Hay otros siete acontecimientos que ocurren después de la invaginación del surco ventral, que se asemejan a la gastrulación en cuanto a la invaginación de células, y se enumeran abajo:

- 1) formación del surco cefálico
- 2) formación de dobleces transversales dorsales
- 3) extensión de la banda germinal
- 4) contracción de la banda germinal
- 5) segmentación
- 6) cerrado dorsal
- 7) involución de la cabeza (Campos-Ortega, 1997).

### **C. Extensión de la banda germinal**

Durante la extensión de la banda germinal el primordio ectodérmico habrá doblado su longitud y divide en dos su anchura. Este proceso de alargamiento comprime la amnioserosa, que es un tejido extraembrionario y es el más dorsal del embrión. El primer paso de la elongación de la banda germinal coincide en parte con la gastrulación, cuando se origina la invaginación amnioproctodeal. Este extremo empuja a las células vecinas adelante del surco formando una especie de recubrimiento; así la invaginación amnioproctodeal adquiere la forma de un saco invertido, el cual comprime el primordio del intestino medio posterior y del intestino trasero. Inicialmente este proceso es muy rápido (Fig. 2-7 y 8) y después lento (Fig.2-9). Durante la fase rápida (Fig.2-8) aparece una indentación en el lado de la apertura amnioproctodeal, llamada doblez paraproctodeal.



Durante la gastrulación y la extensión de la banda germinal aparecen tres surcos transitorios: uno de ellos es el surco cefálico. Este se comienza a formar al mismo tiempo que el surco ventral, a ambos lados del embrión de forma casi vertical y sigue un curso oblicuo dorso-ventral, que subdivide al embrión en procefalon y banda germinal metamérica. Este desaparece al término de la fase rápida. Este surco demarca la cabeza del tórax en el desarrollo de la mosca. Los otros dos surcos, el transverso anterior y el posterior, aparecen durante la gastrulación y persisten solo en el inicio de la fase rápida. Estos surcos aparecen como consecuencia de las modificaciones de la capa externa y ambos se aplanan en la amnioserosa.

Durante la fase lenta (Fig. 2-9) un grupo de células se invagina en el extremo anterior ventral del huevo para formar el stomodeum; esta invaginación se extiende hasta hacer contacto con el intestino medio anterior. Con esta elongación, el intestino delantero se divide en varios dominios, incluyendo el esófago y proventrículo, y crece a consecuencia de la incorporación de células ectodérmicas. La subdivisión de la banda germinal metamérica llevará a la segmentación. En la región procefálica se formará el clypeolabrum y el lóbulo procefálico.

#### **D. Neurulación**

La neurogénesis es el desarrollo del sistema nervioso central. Los neuroblastos se segregan de la capa ectodérmica en la fase rápida de la elongación de la banda germinal, de dos porciones de la capa externa germinal: el lóbulo pro-cefálico y la banda germinal. Después se arreglan en un patrón constante y se dividen para producir las células madres ganglionares, que más tarde se diferenciarán a neuronas (Fig. 2-10).

### **E. Retracción de la banda germinal**

Durante la retracción de la banda germinal (Fig. 1-12) el intestino trasero se localiza en el extremo posterior de embrión (su posición anal definitiva); también ocurre la fusión de la parte anterior y la parte posterior del intestino medio. Se unen los segmentos que darán origen al árbol traqueal completo y se forman las gónadas. Después de esto, el embrión queda abierto dorsalmente, es decir la superficie dorsal esta cubierta solamente por la amnioserosa, la cual se extiende para cubrir el hueco de la superficie dorsal. En el proceso de segmentación se forman los canales ventrales profusos, que corresponden a los límites segmentales. El aspecto interior de estos límites segmentales son los sitios para las futuras uniones musculares. Durante la segmentación, tiene lugar la segregación de los discos imaginales. Los discos imaginales son sacos de células que dan crecimiento a estructuras adultas durante la metamorfosis.

### **F. Cerrado dorsal**

La elongación y retracción de la banda germinal llevan al embrión a una apertura en la epidermis dorsal, solo cubierta por la amnioserosa (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997). Subsecuentemente, el proceso del cerrado dorsal lleva a un alargamiento de la placa epidérmica sobre la amnioserosa para cubrir el embrión entero, estas células de la epidermis se unirán en la línea media dorsal, y la amnioserosa se absorbe (Fig. 2-14).

Durante este proceso, el cual ocurre en ausencia de mitosis, las células de la epidermis se alargan a lo largo del eje dorso-ventral. Este cambio de forma inicia en la fila de células epidérmicas más dorsales, las cuales forman las así llamadas células de "*leading-edge*". Una señal que emana de estas células controla y coordina el progreso del cerrado dorsal; algunos genes relacionados en el cerrado dorsal incluyen a *hemipterous* y *basket* que son genes involucrados directamente en la vía de señalización de la cinasa de Jun (Zeitlinger y col., 1997; Riesgo-Escovar y Hafen, 1997).



## **G. Involución de la cabeza**

Es el proceso del desarrollo que ocurre al final, y coincide parcialmente con el cerrado dorsal. En el proceso de la involución de la cabeza, el ectodermo anterior migra hacia el interior, comenzando con la invaginación stomodeal. El proceso toma 5 horas. El periodo más activo de involución es de corta duración, comienza a las 10.5 horas y transcurre por media o una hora (Fig. 2-15) (Brody, 1996). Cuando la involución de la cabeza está casi completa, se condensa el sistema nervioso ganglionar (Fig. 2-16), y así, termina el desarrollo embrionario (Fig. 2-17) (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).

## **III. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES**

La transducción de señales involucra la comunicación entre células a través de neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento y feromonas. Estas moléculas son secretadas por las células que mandan la señal a otras que van a responder alterando su comportamiento. La cascada de transducción de señales es el proceso por el cual las moléculas señalizadoras (ligando) se unen al receptor en su célula blanco, induciendo un cambio conformacional en el receptor que de alguna manera va a internalizar la señal (como fosforilación intrínseca del receptor), y esta señal se va a transducir por medio de moléculas intermediarias que participan en una cascada de señales intracelulares hasta obtener una respuesta celular (como el encendido y apagado de genes). El resultado de muchos fenómenos de transducción de señales es la fosforilación o desfosforilación de proteínas blanco. En el desarrollo se requiere el encendido y apagado de muchos genes, y estos a su vez son regulados por estas vías de señalización.

Se conocen tres tipos de proteínas receptoras de superficie celular: las asociadas a canales iónicos, las asociadas a proteínas G y las proteínas receptoras con actividad enzimática intrínseca.

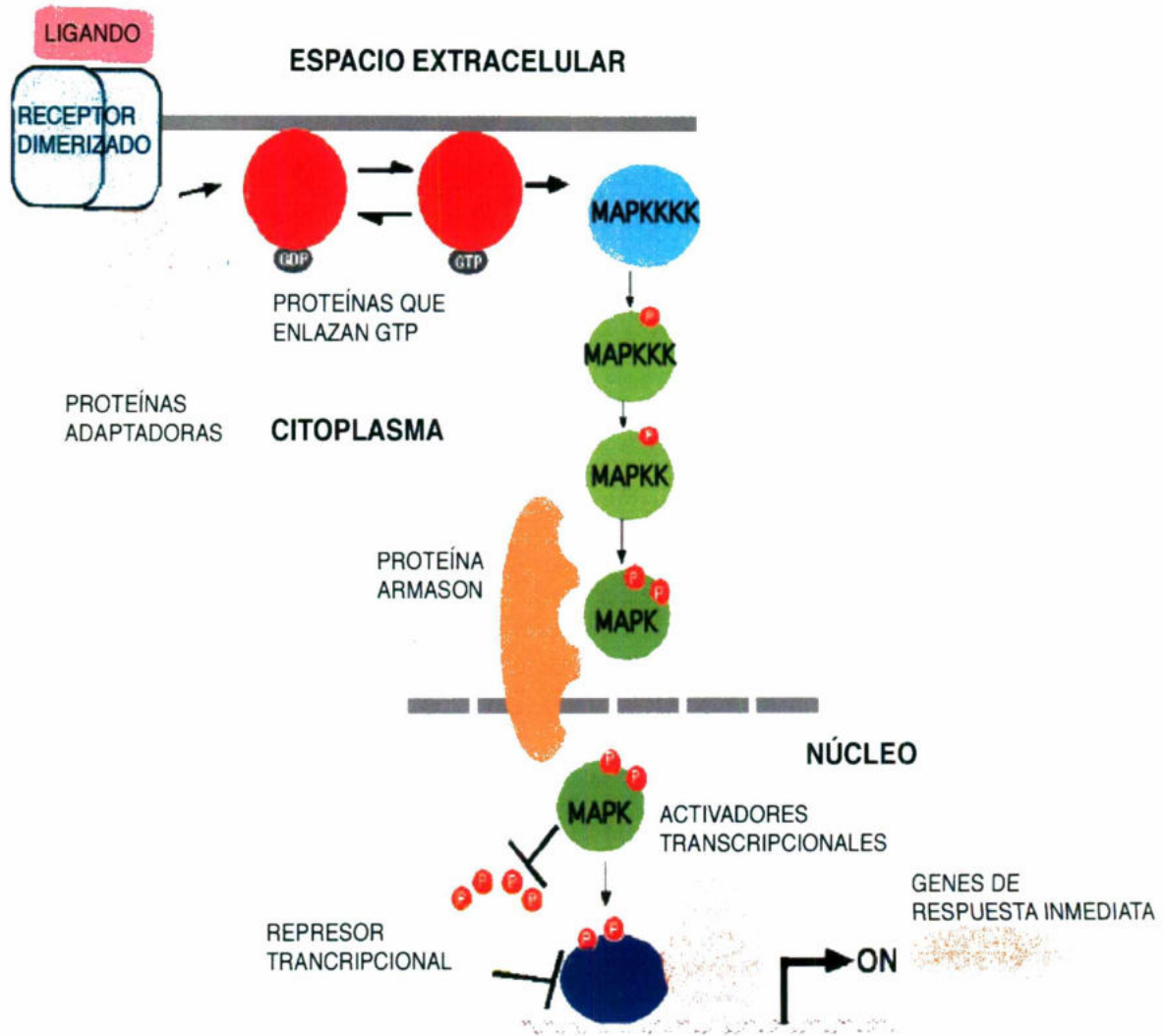


Figura 3. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE TIPO MAPK. La vía de señalización de tipo MAPK dirige la señal extracelular al núcleo a través de una serie de fosforilaciones en cascada, que activan a factores de transcripción, que finalmente regulan la transcripción de genes de respuesta inmediata.



### C. Vía JNK

JNK pertenece a la súper familia de proteínas MAPKs. La vía de transducción de señales JNK fue inicialmente descubierta en cultivo de tejidos de vertebrados y en levaduras como un mediador de la respuesta al estrés celular. En respuesta a la activación de esta cascada, JNK puede fosforilar factores de transcripción tales como Jun (Zeitlinger y col., 1997).

Una variedad de estímulos relacionados al estrés, así como también ciertas citocinas, pueden activar la vía JNK y responder de diversas maneras a esta activación, regulando diferentes procesos, como por ejemplo: la regulación de la muerte celular programada conocida como apoptosis (Igaki y col., 2002). Miembros de las familias de Rac y Cdc42 de pequeñas proteínas que unen GTP parece que están involucradas en este proceso, aunque el entendimiento de esta vía aún es fragmentario. *Drosophila melanogaster* es un organismo conveniente para la disección genética de la vía de señalización JNK (Riesgo-Escovar y col., 1996). En este organismo, la vía JNK se requiere durante la embriogénesis para llevar a cabo un proceso de cambio celular conocido como cerrado dorsal. En *Drosophila* se conoce un homólogo de JNKKKK, llamada *misshapen*, *msn*. Seis familias de JNKKKK emergen como posibles reguladoras río arriba de JNK en vertebrados y hay un solo homólogo de cada una de ellas en *Drosophila*; y de ellas, se ha caracterizado a una cinasa de tipo *mixed lineage kinase* (linaje mezclado de cinasas), abreviado como MLK llamada *slipper* en la vía JNK en *Drosophila* (Stronach y Perrimon, 2002).

La vía de transducción de señales activada por *dpp*, el homólogo de TGF-beta en *Drosophila* también es esencial en el cerrado dorsal; mutaciones en *tkv* y *put* los cuales codifican a receptores de membrana de Dpp (Affolter y col., 1994), resultan con fenotipos similares, y cuando se expresa *tkv* activo se rescata parcialmente el fenotipo mutante de genes de la vía JNK.

Esto ha llevado a concluir que la activación de Jun por JNK en las células del *leading-edge* del epitelio lateral durante el cerrado dorsal regula a *dpp*, a través de



una activación transcripcional directa del gen *dpp* por *Djun* y *Dfos* (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997).

Para activar la transcripción de genes blanco, Jun y Fos se unen a promotores específicos o elementos *enhancer*. Para esta interacción proteína-DNA, Jun y Fos pueden dimerizarse a través del dominio zipper de leucina, resultando un heterodímero que consiste de una molécula de Jun y otra molécula de Fos, o un heterodímero formado entre Jun y otra proteína zipper leucina. Jun y Fos pueden formar también homo-dímeros. El dominio zipper de leucina contiene cadenas de 35 aminoácidos en las cuales la leucina (Leu) se encuentra repetida en intervalos de 7 aminoácidos. Estas regiones de la proteína forma hélices anfifílicas, con Leu dentro de una cara.

Estas proteínas pueden formar un dímero, estabilizado por el enlace de estas hélices anfifílicas de una a otra, formando una espiral. Por lo tanto el zipper de leucina representa el dominio de enlace de la proteína.

El dominio que se une al DNA se encuentra en los primeros 30 aminoácidos a partir del N-terminal, los cuales son básicos y forman una alfa hélice cuando la proteína se enlaza al DNA. El dominio cierre de leucina une dos proteínas que enlazan DNA juntas, permitiendo a las bases de las hélices N-terminal interactuar con la mayor parte de DNA de una manera base-específica (ver Fig. 4) (Jakubowski, 2003). El heterodímero Jun-Fos es más estable que el homo-dímero Jun (Zeitlinger y col.,1997).

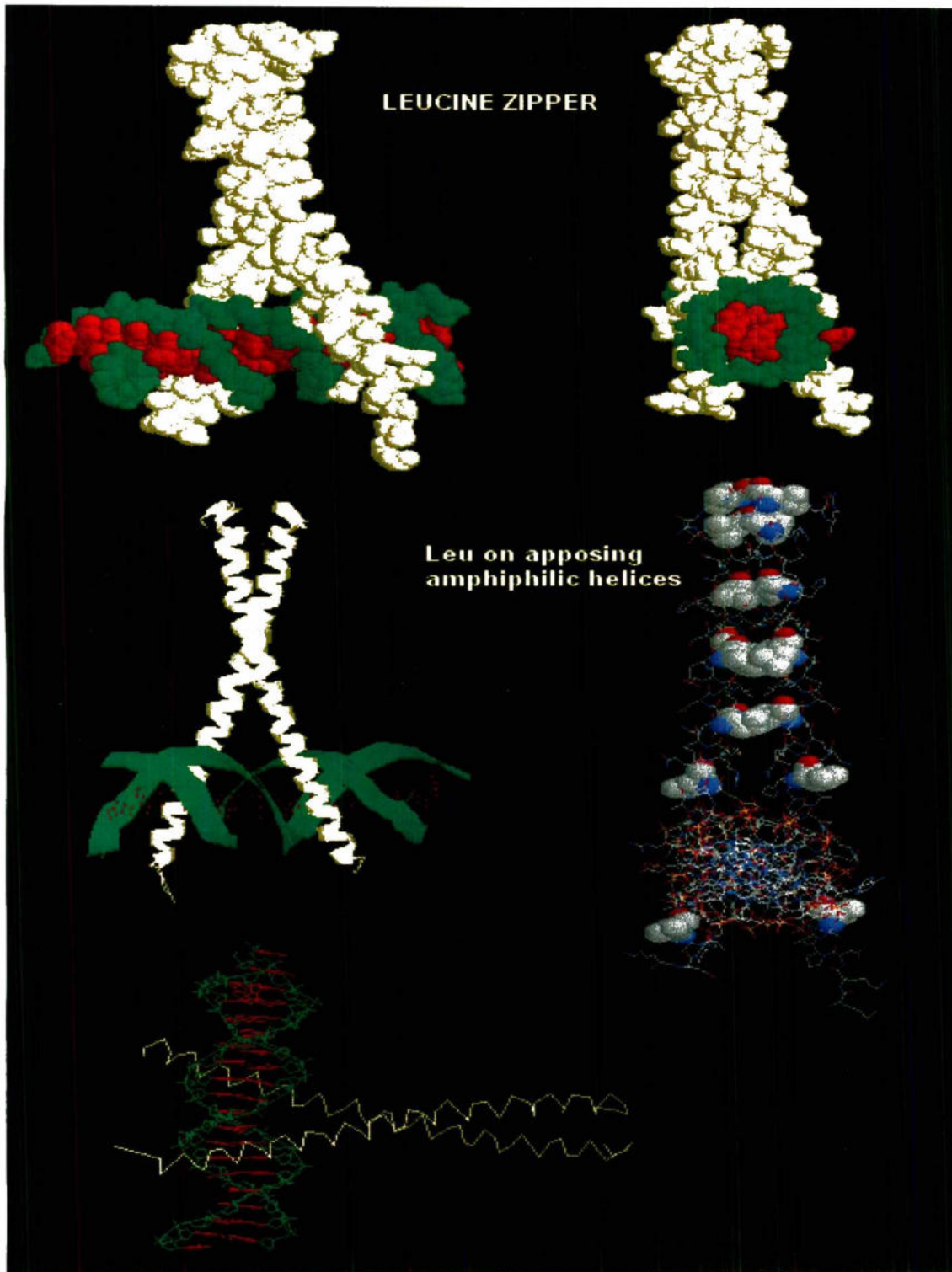


Figura 4. DOMINIO ZIPPER DE LEUCINA. Jun y Fos forman un hetero-dímero, unidos a través de los dominios zipper de leucina y la parte básica de las hélices se unen al DNA.



De los receptores con actividad enzimática intrínseca existen cinco clases conocidas: (1) el receptor guanilato ciclasa, (2) receptores tirosina cinasa, (3) receptores asociados a tirosina cinasa, (4) receptores tirosina fosfatasa, y (5) receptores serina/treonina cinasa (Alberts y col., 2002). A continuación se define la función del receptor tirosina cinasa, ya que este se encuentra involucrado en la vía de tipo MAPK.

### **A. Receptores con actividad tirosina cinasa**

Algunos receptores hormonales y de factores de crecimiento se distinguen por tener una actividad enzimática intrínseca (actividad de tirosina cinasa o serina/treonina cinasa) y un dominio único que se extiende de lado a lado de la membrana. La actividad de tirosina cinasa proteica se encuentra en algunos receptores de factores de crecimiento, como los del factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), del factor estimulador de colonias (CSF-1) y del factor de crecimiento fibroblástico (FGF), así como del péptido factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF-1) (Mathews, 1998). Estos receptores se activan al unirse a su ligando y dimerizarse. La conformación de sus subunidades en forma dimérica pone en cercanía los dominios con actividad de tirosina cinasa, de manera que pueden fosforilarse de forma cruzada e iniciar la señalización intracelular (Alberts y col., 2002; Gomperts y col., 2003).

### **B. Ras y la vía MAPK**

La proteína Ras desempeña un papel central en una ruta conservada a lo largo de la evolución que dirige señales extracelulares hacia el núcleo, en donde se activan genes específicos de respuesta inmediata para el crecimiento, la división y la diferenciación celular.

Se han descubierto proteínas relacionadas con Ras en organismos tan diversos como las levaduras, los nemátodos y *Drosophila* que controlan aspectos del crecimiento y del desarrollo embrionario. La investigación realizada en estos organismos ha permitido aclarar una ruta de control central en las células de los



mamíferos, lo cual ha justificado ampliamente el empleo de modelos biológicos para la investigación.

Actualmente sabemos que muchos de los receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina cinasa se fosforilan a sí mismos de manera cruzada. En el estado fosforilado, cada receptor interacciona con una o más proteínas que se unen a sus sitios fosforilados, y entre ellas, a algunas que a su vez activan a Ras mediante la estimulación del intercambio de GDP por GTP. Unas proteínas denominadas GAP (Proteínas Activadoras de GTPasa), también interactúan con Ras y limitan su actividad. Después de la activación de Ras, hay una cascada secuencial de cinasas, que conlleva a fosforilaciones, hasta que finalmente se activan proteínas denominadas factores de transcripción. Estos factores estimulan la expresión de genes de respuesta.

Una familia importante de cinasas de esta cascada son las denominadas **MAP cinasas (MAPK)**. El acrónimo MAP corresponde a *mitogen-activated protein* (proteína activada por mitógenos). Por encima de las MAPK se encuentra otra familia de cinasas, las MAPKK y aún más arriba en esta cascada de cinasas activadas originalmente por Ras (o proteínas semejantes a Ras) se encuentran las MAPKKK y MAPKKKK (Mathews, 1998).

La vía de tipo MAPK es activada a través de un ligando que se une a su receptor de membrana de tipo tirosina cinasa, este receptor se dimeriza y se activa, después se unen proteínas adaptadoras para unir a una proteína tipo Ras que intercambia GDP por GTP, cuando esta proteína tiene unido GTP se activa y activa a la MAPKKKK, se da una serie de fosforilaciones en cascada de MAPKKKK, luego a MAPKKK, esta a su vez a MAPKK, y finalmente se fosforila MAPK que se trasloca al núcleo y regula por fosforilación a factores de transcripción que inducirán la expresión de genes de respuesta inmediata (ver figura 3) (Gomperts y col., 2003; Harden, 2002).

#### IV. MUTANTES CON FENOTIPO DE APERTURA DORSAL

El cerrado dorsal es interrumpido en un número de mutantes de *Drosophila*. Algunas de estas mutaciones afectan componentes de la transducción de señales JNK, tales como *slipper* que pertenece a la familia de las MLK (JNKKK) (Stronach y Perrimon, 2002), *hemipterous (hep)* y *basket (bsk)*, los cuales codifican para una cinasa JNK de *Drosophila* (JNKK) y a JNK respectivamente, ya que se bloquea el cambio de forma celular y por lo tanto no se lleva a cabo el proceso de cerrado dorsal (Riesgo-Escovar *et al.*, 1996). Mutantes en *cka* (conector de cinasa a AP-1), un gen que codifica una proteína que forma un complejo con Hep, Bsk, DJun y DFos, actuando como un organizador (Chen y *col.*, 2002), y los alelos nulos del gen *Jun* de *Drosophila* (*Djun*) también son letales embrionarios y causan defectos similares en el cerrado dorsal (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997).

El fenotipo resultante de todas estas mutaciones es marcado por la ausencia de la elongación de las células en la epidermis lateral, lo que concuerda con la pérdida de expresión de *dpp* en las células del *leading-edge* (Zeitlinger y *col.*, 1997).

##### A. *Dfos*

El homólogo del proto-oncogen *fos* en *Drosophila melanogaster* es *Dfos*. Es el único homólogo de *fos* en el genoma de *Drosophila* (Rousseau, 2001). El locus de *kayak (kay)* esta mapeado en la posición 99B9-99B10, que es el locus del gen *Dfos*. Dos alelos están descritos en la literatura, *kay*<sup>1</sup> y *kay*<sup>2</sup>, el primero es un alelo nulo y el segundo es un alelo hipomorfo. *kay*<sup>1</sup> tiene una mutación a partir de la posición 1045. Los embriones homocigotos mutantes presentan deficiencia en el cerrado dorsal, y en estos embriones, cuando se expresa *Dfos* ectopicamente a partir de un transgen en el ectodermo, este revierte el fenotipo mutante.

También estos mutantes rescatados cuando llegan a adultos tienen un fenotipo de apertura torácica que es parecido a los que tienen un alelo hipomórfico de *hep*, lo cual implica que *hep* y *kay* se necesitan en el desarrollo del epitelio imaginal de la pupa (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997).



La expresión de *Dfos* en el epitelio lateral está regulado por *dpp*, ya que la expresión de *Dfos* está reducida en las mutantes de *tkv* (Riesgo-Escovar y Hafén, 1997). La expresión de *Dfos* es extensa con variaciones en el nivel de expresión en la embriogénesis (ver figura 5).

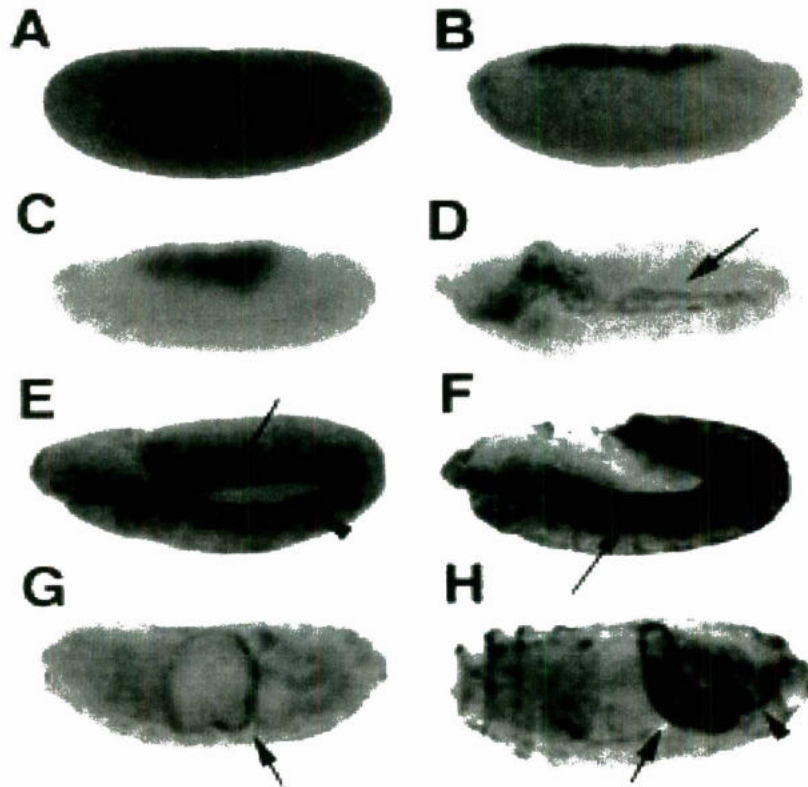


Figura 5. EXPRESIÓN DE *Dfos* EN EMBRIONES SILVESTRES. Se muestran embriones de tipo silvestre para la técnica de hibridación *in situ*, en diferentes etapas de la embriogénesis. Los embriones están colocados con la parte cefálica hacia la izquierda, de A-F, H con la parte dorsal hacia arriba y G con la parte dorsal hacia el frente. A. Contribución materna. B. Expresión en las células más dorsales. C. Expresión en las células *anlagen* de amnioserosa y epitelio lateral. D. Expresión en las células de la amnioserosa. E. Expresión en las células del epitelio lateral y principalmente en las células de *leading edge*. F. Etapa más avanzada con un patrón parecido al de (E). G. Tinción en una porción del endodermo, en la parte anterior del intestino medio. H. Tinción en el intestino trasero (Riesgo-Escovar y Hafén, 1997).

La proteína *Dfos* se expresa en niveles altos en la amnioserosa en el cerrado dorsal y la epidermis lateral, al inicio del cerrado dorsal *Dfos* se eleva en el núcleo de las células de *leading edge* ya que estas inician el alargado y también en las



células más ventrales. Después, la expresión se extiende lateralmente, hasta que se unen los bordes para dar fin al cerrado dorsal (Zeitlinger y col., 1997).

### **B. *amigo de fos***

En el laboratorio se caracterizó una mutante nueva de cerrado dorsal, *amigo de fos* (*amfos*). El nombre *amfos* proviene del hecho, de que mutaciones en este gen presentan el fenómeno de no complementación no alélica (ver Figura 6), o letalidad sintética con alelos del gen *Dfos*, el homólogo del factor de transcripción Fos en *Drosophila*. El gen *amfos* codifica para una proteína pionera con un dominio (aproximadamente de 200 aminoácidos) conservado. Este dominio conservado tiene homología con proteínas predichas de humanos, ratones y levaduras, por lo que es posible que proteínas con funciones semejantes existan en otros organismos. Sin embargo, se desconoce la función de este dominio y de la proteína. Se han caracterizado varios alelos de este gen, y todos ellos son homocigotos letales: cinco de ellos son letales en la etapa embrionaria, y uno de ellos es letal en el segundo estadio larvario. Los alelos más extremos tienen fenotipos de apertura dorsal (ver más abajo). Estos fenotipos son, para algunos alelos, prácticamente unas fenocopias perfectas de los fenotipos mutantes de alelos de *Dfos*. Alelos mutantes de *Dfos* presentan fenotipos embrionarios letales de apertura dorsal, como lo presentan alelos mutantes de todos los genes conocidos de la vía de la cinasa de Jun en *Drosophila*. Lo anterior sugiere que este nuevo gen, *amfos*, es un gen que participa en la vía de la cinasa de Jun, posiblemente regulando y/o interaccionando con *Dfos* (Riesgo-Escovar, datos no publicados).

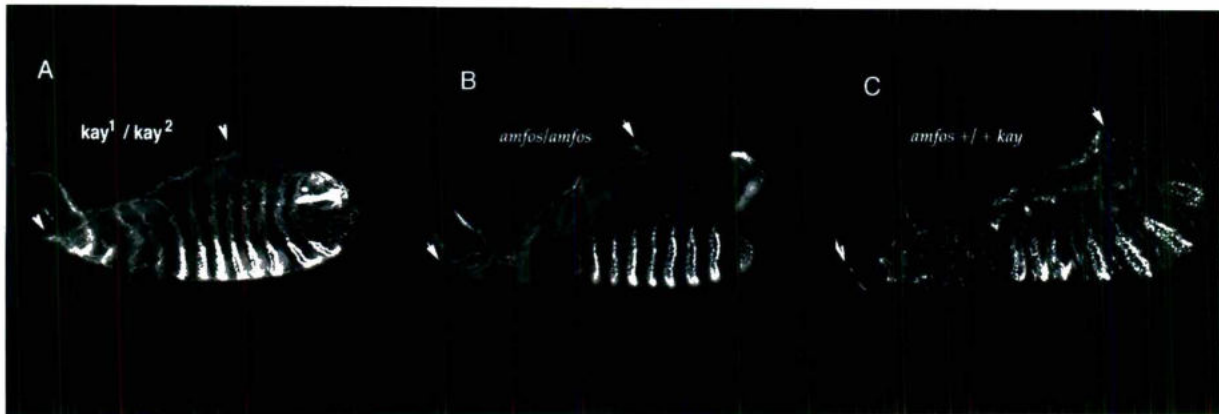


Figura 6. INTERACCIÓN GENÉTICA ENTRE *Dfos* Y *amfos*. En esta figura se muestran las cutículas de los embriones mutantes vistas por microscopía de campo oscuro: A. Embrión con combinación heteroalélica para los alelos mutantes de *Dfos* ( $kay^1$  es un alelo con actividad nula,  $kay^2$  es un alelo con actividad hipomórfica de *Dfos*). B. Embrión homocigoto para el gen *amfos*. C. Embrión doble heterocigoto para los genes *Dfos* y *amfos*. Las puntas de flecha señalan los límites de la apertura dorsal.

Hemos expresado en un sistema heterólogo un péptido derivado de la secuencia del cDNA de *amfos* y a partir del mismo hemos generado anticuerpos policlonales en conejo. Estos anticuerpos reconocen una sola banda en homogenados de *Drosophila* (ver el análisis de Western blot), y esta banda tiene un peso molecular consistente con el peso predicho para el producto proteico del cDNA de *amfos*. Utilizamos este anticuerpo para caracterizar la expresión de la proteína durante el desarrollo embrionario. También hemos generado sondas de RNA antisentido marcadas con digoxigenina a partir del cDNA de *amfos* para poder realizar experimentos de hibridación *in situ* (de igual forma el análisis de Northern blot muestra una sola banda que es reconocida por la sonda; ver Figura 7).



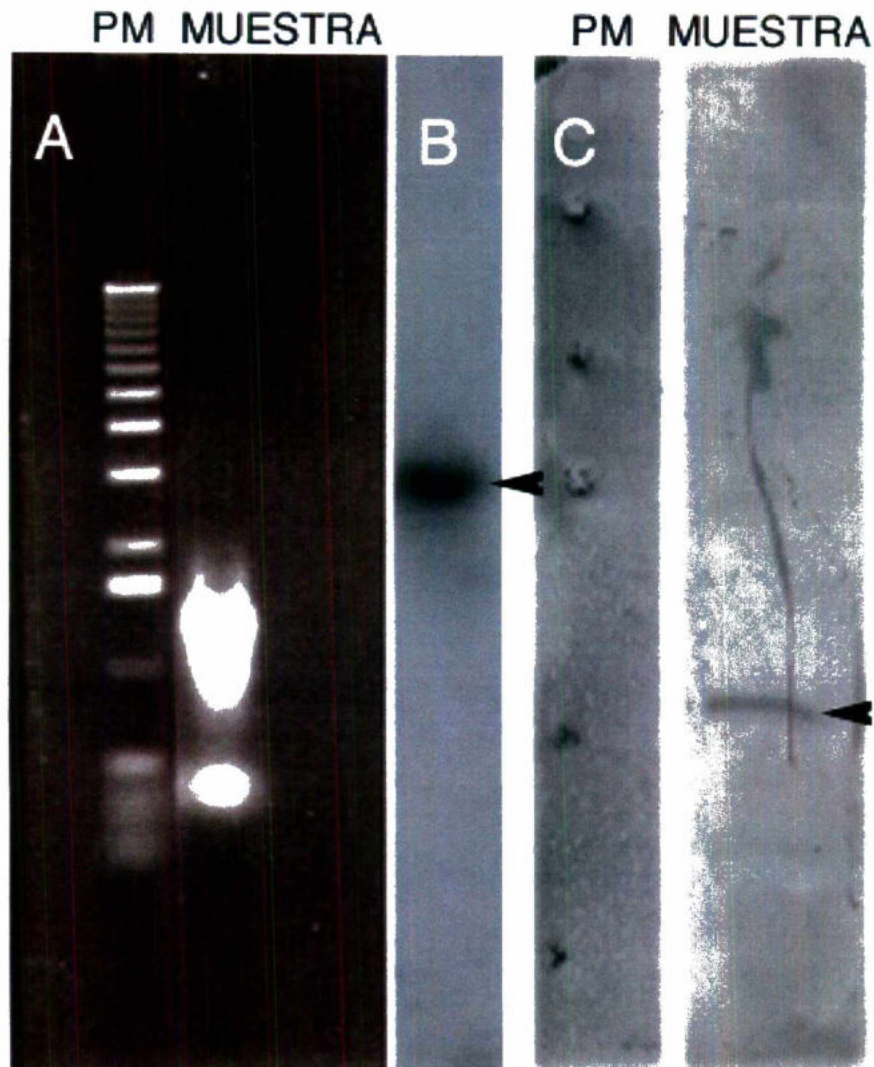


Figura 7. WESTERN BLOT Y NORTHERN BLOT. A. Muestra la electroforesis del RNA extraído de un homogenado de *Drosophila*. B. La punta de flecha muestra una sola banda para la sonda en el análisis de Northern blot. C. La punta de flecha muestra una sola banda que es reconocida por el anticuerpo anti-amfos para el análisis de Western blot. Los pesos moleculares a la izquierda son de arriba abajo, 177, 113, 81, 60 y 47 kD.



## HIPÓTESIS

Los embriones de *Drosophila melanogaster* expresan el transcrito y la proteína codificante del gen *amfos*, que participa en la vía JNK en un patrón consistente con su función durante el cerrado dorsal.

## OBJETIVOS

### GENERAL

Observar la expresión del transcrito y de la proteína codificante del gen *amfos* en embriones de *Drosophila melanogaster*.

### ESPECÍFICOS

- Describir el patrón de expresión del gen *amfos* durante la embriogénesis.
- Comparar la forma de tinción de la proteína por los diferentes métodos de fijación.
- De acuerdo al patrón de tinción inferir la localización de esta proteína.
- Comparar los datos de inmunohistoquímica con los de hibridación *in situ*.

## METODOLOGÍA

### MATERIALES

Tubos eppendorff (viales de 0.5 y 1.5 ml)

Vaso de precipitados de 150 ml

Malla con poro pequeño para que no se pasen los embriones

Cajas petri

3 Vasos de precipitado de plástico de 100 ml (1 perforado en la base)

Pizeta

Pincel de pelo de camello

Pipetas automáticas con puntas estériles de 1000, 100 y 10  $\mu$ l.

Papel absorbente

Portaobjetos

Cubreobjetos

Microscopio estereoscópico

Microscopio de campo claro

Baño María

Agitador de rotación (invierte los tubos girando 360° )

### MÉTODOS

#### OBTENCIÓN DE EMBRIONES (Puestas)

En un vaso de precipitado de plástico, con orificios pequeños en la base, se colocaron algunas moscas de la línea silvestre *yellow white* (*yw*) (hembras y machos), y se tapó con una caja Petri de tamaño igual al diámetro del vaso, la cual contenía una base de agarosa y jugo de uva, de forma sólida y en la superficie un poco de levadura en polvo.



Después se invirtió el vaso y se pusieron en un medio ambiente adecuado para su desarrollo (Temperatura = 25° C, Humedad = 50%).

#### RECOLECCIÓN DE EMBRIONES

Después de 24 horas de la puesta, se cambió la caja petri por una limpia, con un poco de levadura en polvo, y a la caja que contiene los embriones se le agregó agua destilada. Con un pincel de pelo de camello se despegaron los embriones, después se filtraron con una malla de poro adecuado para retener los embriones. Los embriones se enjuagaron varias veces hasta que la levadura quedo disuelta. Los embriones recolectados se pasaron a una solución 1:1 de hipoclorito de sodio con agua destilada, hasta que se descorionaron (se observan con ayuda del microscopio estereoscópico). Se sacó la malla de la solución y se enjuagaron los embriones con agua destilada, se quitó el exceso de agua, se transfirieron los embriones a un vial de 1.5 ml con 750  $\mu$ l de heptano con la ayuda del pincel remojado en heptano (las larvas que contenga el filtrado quedan atrapadas en el pincel).

#### INMUNOHISTOQUÍMICA

Los embriones se fijaron por tres métodos diferentes: con formaldehido, con acetona, o con glutaraldehido.

#### FIJACIÓN CON FORMALDEHIDO

Se agregaron 675  $\mu$ l de formaldehido al 37% y 75  $\mu$ l de EGTA 0.5 M pH 7 para fijar los embriones y se agitaron suavemente durante 5 min.

Posteriormente se dejaron sedimentar y se extrajo la fase inferior (orgánica) sin llevarse los embriones que están contenidos en la interfase. Después se adicionaron 750  $\mu$ l de MeOH al 100% y se agitó vigorosamente por 2 min. para eliminar las membranas vitelinas. Se dejaron sedimentar y se extrajo la mezcla

líquida (una forma de ver si ha sido removida la membrana adecuadamente es observando que los embriones se sedimentan en el fondo del tubo).

Se adicionó 1ml de MeOH al 100%, y se dejaron sedimentar los embriones, después se rehidrataron con soluciones consecutivas de MeOH al 70% con PBST y MeOH al 50% con PBST hasta llegar a una solución de PBST (PBS 1X con 0.3% de tritón).

#### FIJACIÓN CON ACETONA

Se agregaron 675  $\mu$ l de etanol al 70% y 75  $\mu$ l de EGTA 0.5 M pH 7 durante 5 minutos a los embriones colectados como está descrito arriba. Después se extrajo la mezcla y se lavaron 2 veces con etanol al 70 %, y luego se agregó etanol al 100%. Se decantó el sobrenadante y se pasaron por acetona al 100% para fijar los embriones a  $-20^{\circ}$  C durante 20 min.

Se pasaron por etanol al 100% y se hidratan con una solución de etanol al 50 % con PBS, y luego en PBST.

#### FIJACIÓN CON GLUTARALDEHIDO

A los embriones tratados como está descrito arriba contenidos en 750  $\mu$ l de heptano se les agregaron 750  $\mu$ l de glutaraldehido al 2.5% en PBS y 75  $\mu$ l de EGTA 0.5 M pH 7 para fijarlos y se agitaron suavemente durante 7 min.

Posteriormente se dejó reposar el tubo y se extrajeron las dos fases sin llevarse los embriones que están contenidos en la interfase. Después se lavaron dos veces con heptano al 100%, se eliminó el líquido y se adicionaron 750  $\mu$ l de MeOH al 100% con 750  $\mu$ l de heptano al 100% y se agitó vigorosamente por 2 minutos para eliminar las membranas vitelinas. Se dejaron sedimentar y se extrajo la mezcla líquida (de nuevo, una forma de ver si ha sido removida la membrana adecuadamente es observando que los embriones se sedimenten en el fondo del tubo).



Se adicionó 1ml de MeOH al 100%, y se dejaron sedimentar los embriones, después se rehidrataron con soluciones consecutivas de MeOH al 70% en PBST y MeOH al 50% en PBST hasta llegar a una solución de PBST.

#### BLOQUEO Y MARCAJE

Después de fijar los embriones se lavaron dos veces con PBST, se extrajo el líquido y se bloquearon con una solución de PBST y suero bovino fetal al 25%, agitando suavemente por rotación durante 1 hr a temperatura ambiente.

Se extrajo el sobrenadante y usando una pipeta automática, con el extremo distal cortada (para no dañar los embriones) se transfirieron los embriones a tres viales de 0.5 ml, cada uno marcado respectivamente como control (C), primario (1°) y secundario (2°). Se adicionó una mezcla de incubación: (500 µl) PBST y suero bovino fetal al 5%, con el anticuerpo correspondiente: al tubo marcado como C no se agregó anticuerpo, al tubo marcado como 1° se le agregó el anticuerpo anti-amfos, y al tubo marcado como 2° se le agregó el conjugado anti-conejo acoplado a la enzima fosfatasa alcalina, para preabsorber este segundo anticuerpo y evitar marcaje inespecífico (las diluciones de los anticuerpos en los tubos son las siguientes: 1° 1:100 y 2° 1:500). Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hr agitando por rotación, o alternativamente, toda la noche a 4° C.

Los tubos C y 1° se lavaron con la solución de incubación 4 veces con rotación durante 5 minutos cada vez a temperatura ambiente. Después se adicionaron 250 µl de solución de incubación y 250 µl del sobrenadante del tubo 2° (que contiene el anticuerpo 2° pre-absorbido 1:500 para llegar a una concentración final de 1:1000). Se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora agitando por rotación. Después se lavaron con la solución de incubación 4 veces con rotación durante 5 minutos cada vez a temperatura ambiente.

Se efectuó entonces un lavado con buffer de revelado por 5 minutos que contiene NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM y Tris-HCl pH 9.5 100 mM.



Se eliminó esta solución y se añadieron 500  $\mu$ l del mismo buffer de revelado con substrato NBT-BCIP (20  $\mu$ l de NBT-BCIP por cada ml de buffer de revelado) y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad. En este paso la enzima acoplada al segundo anticuerpo, que se ha unido al anticuerpo anti-amfos y este a su vez a la proteína *amfos*, degradará el sustrato, dando un producto de color azul, que reportará la presencia y el sitio donde se encuentra esta proteína.

Se monitoreó la reacción bajo el microscopio y se detuvo eliminando la solución de revelado y lavando con PBS. Se montaron entonces los embriones en laminillas, eliminando el exceso de agua y secando parcialmente con papel absorbente, para después agregar medio de montaje (PolyMount) y cubrir con un cubreobjetos. Las laminillas se observaron y fotografiaron en el microscopio óptico.

#### HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Se colectaron los embriones, se decorionaron y se fijaron como se describe para las técnicas de inmunohistoquímica (con formaldehído). Cuando los embriones ya se encuentran en metanol, se pueden guardar a  $-20^{\circ}$  C.

Para aclararlos, se dejaron a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con etanol. Después se pusieron en una mezcla etanol / xileno 1:1, y finalmente se cambiaron a xileno, con agitación suave por rotación durante 1 hora y media. Después se pasaron nuevamente por una mezcla etanol / xileno 1:1, y se lavaron tres veces con etanol. Se lavaron una o dos veces con metanol (se pueden guardar a  $-20^{\circ}$  C si no se usan de inmediato). Se pasaron los embriones entonces a un vial de 0.5 ml con una punta recortada. Se incubaron con agitación por 5 minutos en una mezcla de metanol y solución de fijación (PBT y 5% de formaldehído al 37% ). Después se incubaron en solución de fijación durante 25 minutos, con agitación, y luego se lavaron tres veces con PBT (PBS y 0.3% de Tween). Se incubaron entonces entre dos o tres minutos con proteinasa K (para permitir que penetre más fácilmente la sonda). Se detuvo la reacción lavando dos

o tres veces con PBT. Se volvieron a fijar con solución de fijación por 25 minutos con agitación. Se lavaron entonces tres veces por 2 minutos con PBT fresco. Se agitaron 10 minutos en solución de hibridación y PBT 1:1 (la solución de hibridación contiene: formamida al 50%, SSC 5X, esperma de salmón sonicado, y 0.1% de tween 20). Se pre-hibridaron por una hora en solución de hibridación a 55° C. Se desnaturalizó la sonda (RNA antisentido con digoxigenina acoplada) en solución de hibridación por 5 a 10 minutos a 80° C y se puso la sonda inmediatamente en hielo. Se removió la solución de prehibridación y adicionó la sonda desnaturalizada. Se hibridó toda la noche a 55° C. Al día siguiente se diluyó el anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina 1:200 en PBT y se incubó el anticuerpo con rotación a temperatura ambiente con embriones fijados para preabsorber el anticuerpo.

Se removió la solución de hibridación de los embriones incubados con la sonda (se puede reusar). Después se lavaron dos veces con solución de hibridación fresca, una vez con 1 ml de solución de hibridación / PBT 4:1, otra con solución de hibridación / PBT 3:2, una más con solución de hibridación / PBT 2:3, una vez con solución de hibridación / PBT 1:4 y finalmente dos más con PBT (todos estos lavados son por 15 minutos cada uno a 60° C).

Se incubaron los embriones por una hora con 45 minutos con el anticuerpo preabsorbido en dilución 1:2000 en PBT (esta parte y lo siguiente a temperatura ambiente). Se lavaron tres o cuatro veces por 15 minutos cada uno en PBT fresco. Se lavan dos veces por 5 minutos cada una en solución de revelado recién hecha (NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, TRIS-HCl 100 mM pH 9.5). Se removió la solución de los lavados y adicionó solución de revelado con el sustrato NBT-BCIP e incubó en la oscuridad. Se monitoreó la reacción, se detuvo lavando con PBT y se montaron los embriones. Se observaron al microscopio y tomaron las fotografías.



## RESULTADOS

Los resultados se basan principalmente en las imágenes obtenidas por microscopia de luz de acuerdo a la naturaleza de los experimentos. Cabe mencionar que los resultados que se presentan son representativos de varias repeticiones.

Los resultados de la técnica inmunohistoquímica por el método de fijación con acetona no fueron óptimos y por tal razón no se muestran las fotografías de la tinción.

### HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Para la hibridación *in situ* en los embriones en la etapa 6 se observa tinción en las células del *anlagen* del mesodermo que serán invaginadas durante la gastrulación, las células polares que son la línea germinal de *Drosophila melanogaster* y del surco cefálico (ver Figura 8-C1). Como se puede observar, la distribución del transcrito del gen *amfos* va cambiando conforme madura el embrión.



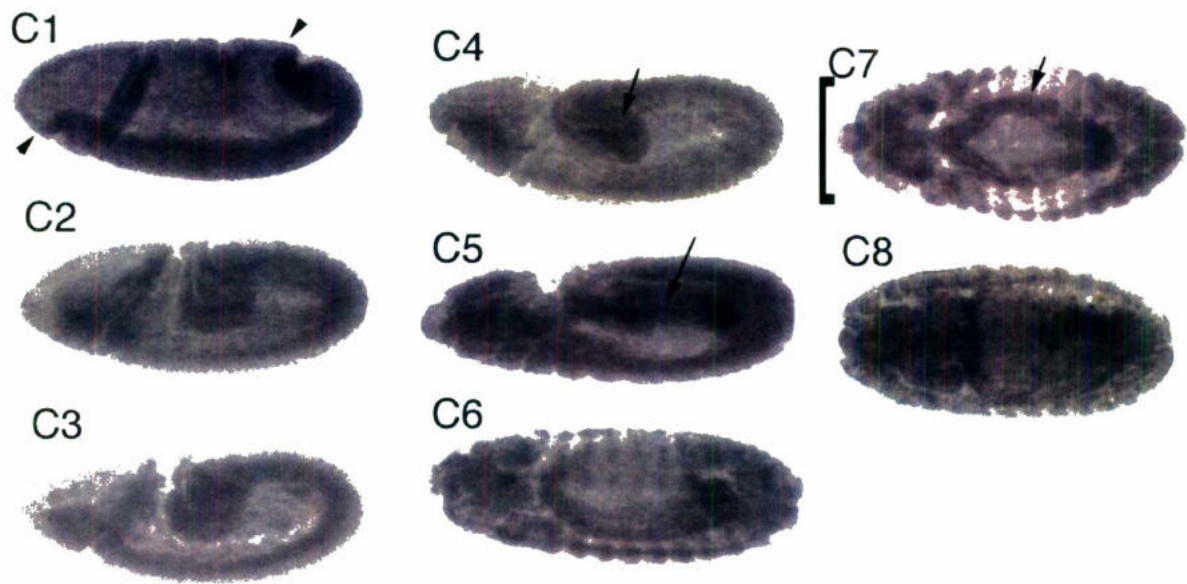


Figura 8. RESULTADOS DE LA HIBRIDACIÓN *IN SITU* . La expresión del mRNA de amfos es muy dinámica durante las diferentes etapas de la embriogénesis. Imágenes obtenidas por microscopia de luz, con objetivo de 20X. Los embriones están orientados con la parte cefálica hacia la izquierda. De C1 a C6 con la parte dorsal hacia arriba, C7 y C8 con la parte dorsal hacia el frente. En C1 el inicio y término de las puntas de flecha señalan las células que se invaginarán. En la figura C7 el corchete señala la parte cefálica en la cual se alcanza a distinguir los dos lóbulos del cerebro del embrión y la flecha señala las células del anlagen cardiaco.

Durante la extensión de la banda germinal se observa tinción en las células del mesodermo que han sido invaginadas, en la parte cefálica y en las células de la amnioserosa (ver Figura 8-C2,C3,C4). Aunque parece que la tinción sólo fue de las células del mesodermo y endodermo, a mayor aumento se pueden observar las células de la amnioserosa (ver figura 9). Después, la tinción en la amnioserosa, en la etapa 11 desaparece y también en esta etapa la tinción es más general en las células del ectodermo y en las células de leading edge como se observa en la Figura 8-C5. La flecha señala las células del borde interno que muestran una mayor tinción, estas células son aquellas que se encuentran en el extremo del epitelio lateral que se unen a la amnioserosa y sufren principalmente el cambio de forma en el proceso de cerrado dorsal.



Figura 9. CÉLULAS DE LA AMNIOSEROSA DE HIBRIDACIÓN *IN SITU*. Embrión en una vista lateral y la parte cefálica a la izquierda en donde se muestran las células de la amnioserosa señaladas con una flecha, y la parte mas oscura son las células del mesodermo y endodermo que han sido invaginadas. Acercamiento a 40X.

En las células epiteliales el patrón se resuelve en un patrón de tipo segmentado al final de la retracción de la banda germinal y al inicio del cerrado dorsal (ver figuras 8-C6, C7 y C8). Al inicio del cerrado dorsal también se observa tinción, en las células del *anlagen* cardiaco y las células que darán origen posteriormente al cerebro de la larva en etapas 13 y 14 de desarrollo, (ver Figuras 8-C6 y C7). A mayor aumento se pueden diferenciar estas células del *anlagen* cardiaco de las células de *leading edge*, que en un principio podrían confundirse (ver figura 10).



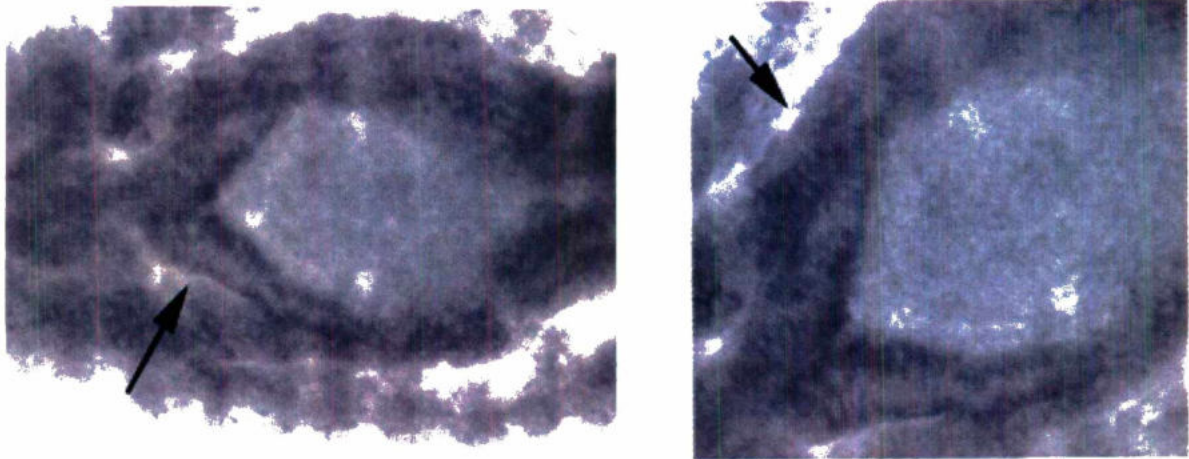


Figura 10. CÉLULAS DEL ANLAGEN CARDIACO. Los embriones están orientados con la parte cefálica hacia la derecha y en una vista dorsal, las flechas señalan las células que darán origen a las células cardíacas. Aumento a 40X

En embriones de la etapa 15 presentan tinción en las células del endodermo, en la parte anterior del intestino medio (ver figura 8-C8).

## INMUNOHISTOQUÍMICA

La distribución de la proteína en los diferentes estadios embrionarios es diferente (ver figura 11). Los embriones que se fijaron con formaldehído en etapas tempranas durante la formación del blastodermo celular muestran una distribución periférica de la proteína en el embrión (Figura 11-F1).



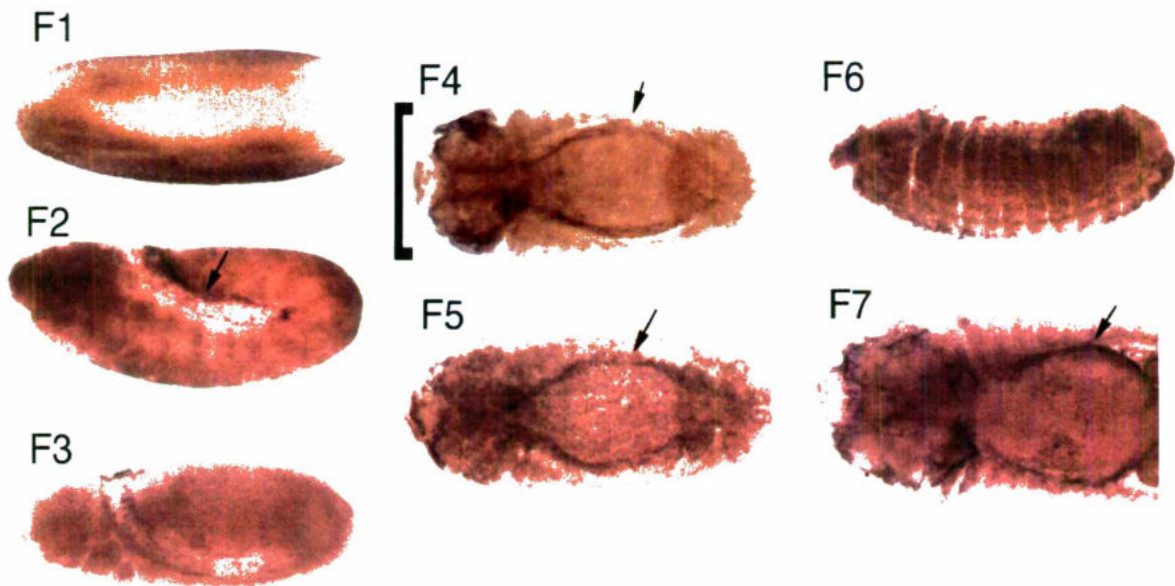


Figura 11. INMUNOHISTOQUÍMICA EN EMBRIONES FIJADOS CON FORMALDEHIDO. Los embriones nuevamente están orientados con la parte cefálica hacia la izquierda. F1, F2, F3 y F6 en una vista lateral con la parte dorsal hacia arriba. F4, F5 y F7 con la parte dorsal hacia en frente. La flecha en F2 señala las células de la amnioserosa, las cuales se distinguen de manera más clara que en la técnica de hibridación in situ. El corchete en F4 señala la tinción en los dos lóbulos del cerebro y las flechas en F4, F5 y F7 señalan las células del anlagen cardiaco.

La tinción de la proteína vista en estos embriones a mayor aumento parece ser que se distribuye de una manera citoplásmica, aunque esto no está muy claro con esta técnica, pero si se alcanza a observar que la tinción es como en halos y no puntual como se esperaría de una distribución nuclear (ver Figura 12).

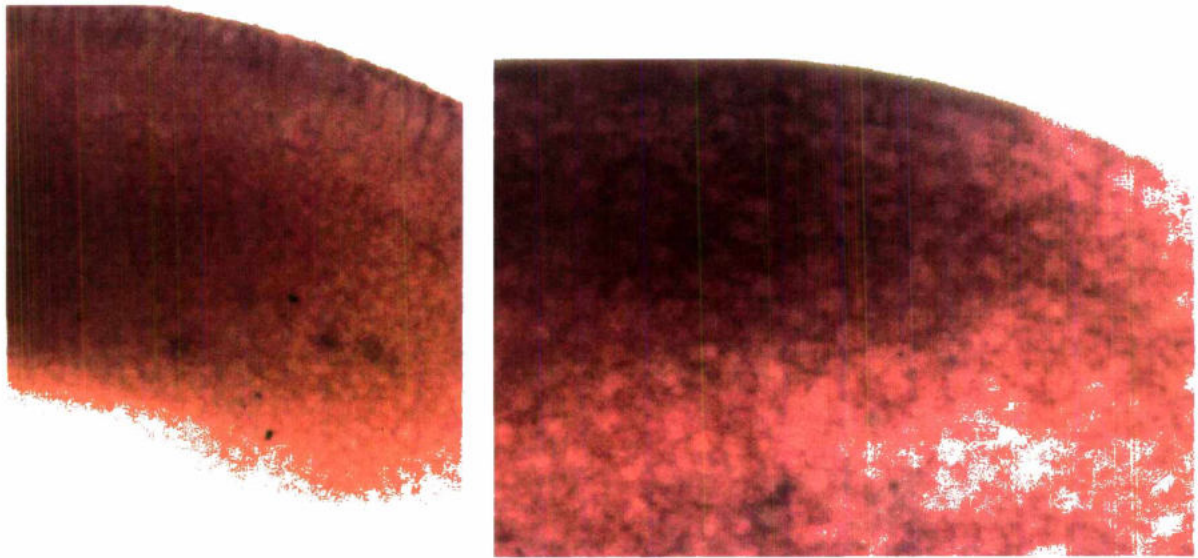


Figura 12. EMBRIONES TEMPRANOS. A diferencia de la tinción en las células de la amnioserosa en donde la tinción es puntual, aquí se observa que la distribución intracelular es citoplásmica. Embrión muy temprano con la parte cefálica hacia la derecha Aumento a 40X.

Durante la extensión de la banda germinal como en la técnica de hibridación *in situ* se observa tinción en las células de la amnioserosa, en la parte cefálica e incluso se alcanza a observar que las células que están en el borde, en donde se unen con la amnioserosa también se tiñen. (Figura 11-F2, F3). Vista a mayor aumento se puede distinguir más claramente que la tinción se presenta en las células de la amnioserosa, que son células con un mayor tamaño y con un núcleo grande (ver figura 13).



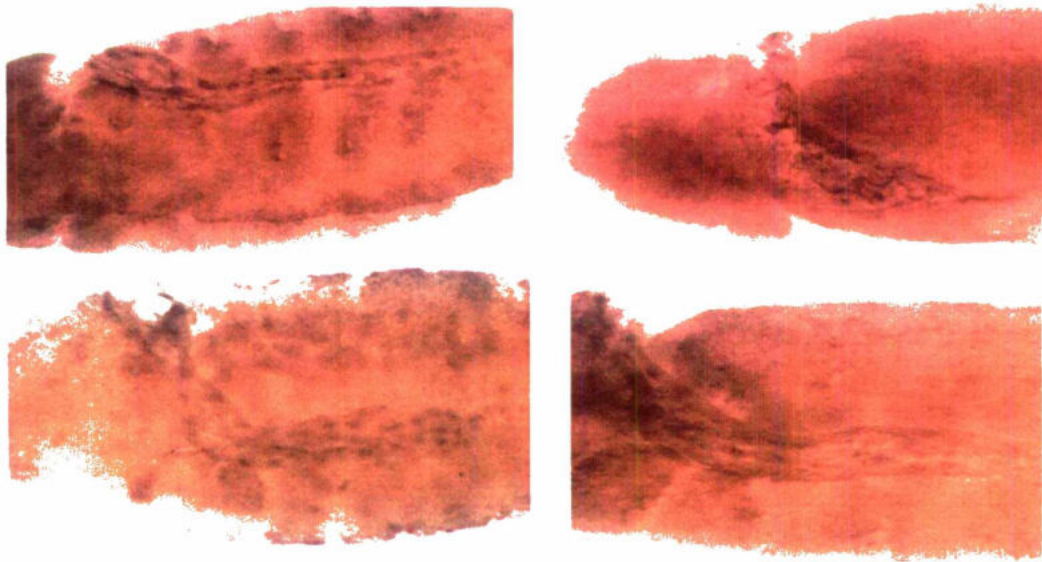


Figura 13. CÉLULAS DE LA AMNIOSEROSA. Los embriones están orientados con la parte cefálica hacia la izquierda y con la parte dorsal hacia arriba, la parte mas teñida indica la presencia de la proteína en las células de la amnioserosa. Aumentos a 20X.

Además en estas células de la amnioserosa se alcanza a observar que la distribución de la proteína es consistente con una distribución nuclear (ver Figura 14).

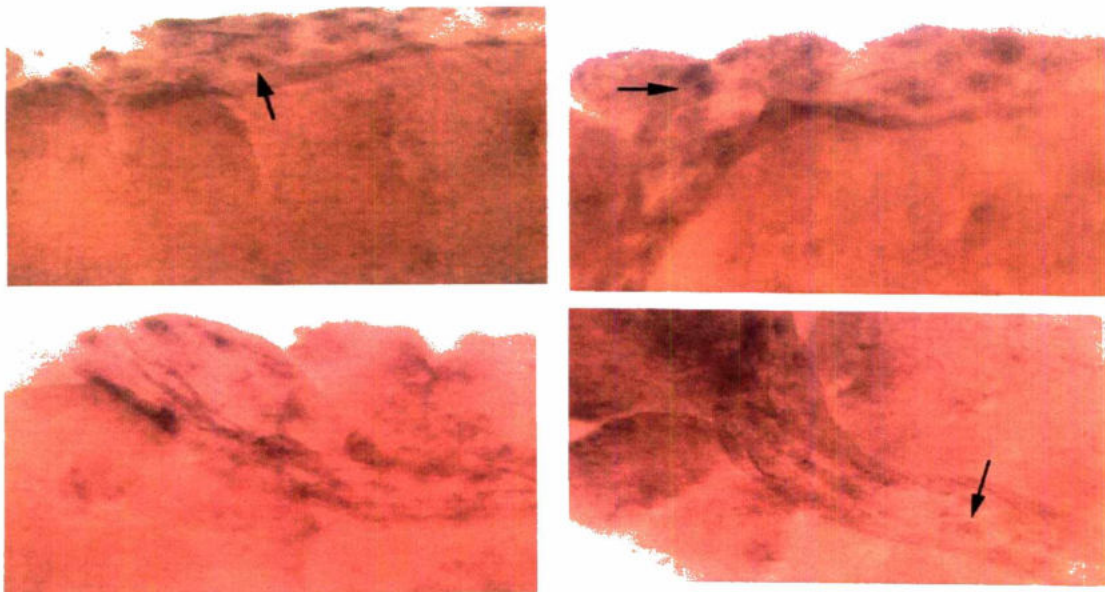


Figura 14. DISTRIBUCIÓN NUCLEAR. Las flechas señalan la distribución puntual de la tinción en las células de la amnioserosa. Aumentos de 40X.



Hay una tinción más evidente en las células del sistema nervioso central y del *anlagen* cardiaco para los embriones de la etapa 14 de desarrollo (ver Figura 11-F4, F5 y F7). La tinción en estas estructuras es muy clara vistas a mayor aumento, como se puede apreciar en la figura 15. En las células del epitelio lateral el patrón de expresión es en forma de segmentos (Figura 11-F6).

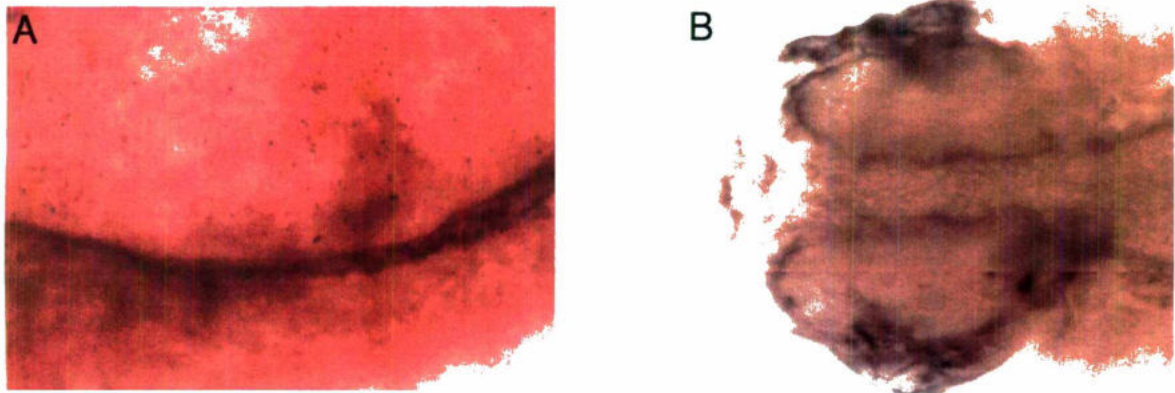


Figura 15. ANLAGEN CARDIACO Y SISTEMA NERVIOSO. A. Muestra un acercamiento del embrión en las células del *anlagen* cardiaco, para una vista media-dorsal. B. Es una foto compuesta de las imágenes tomadas con un objetivo de 40X, para las células de sistema nervioso, en una vista anterior-dorsal .

Los embriones fijados con glutaraldehído presentan los mismos patrones de tinción que los embriones fijados con formaldehído: para embriones tempranos la expresión periférica (Figura 16-G1), en la amnioserosa para embriones en la etapa de retracción de la banda germinal, *anlagen* cardiaco, sistema nervioso y células del epitelio lateral en el cerrado dorsal (Figura 16-G3, G4 y G5).

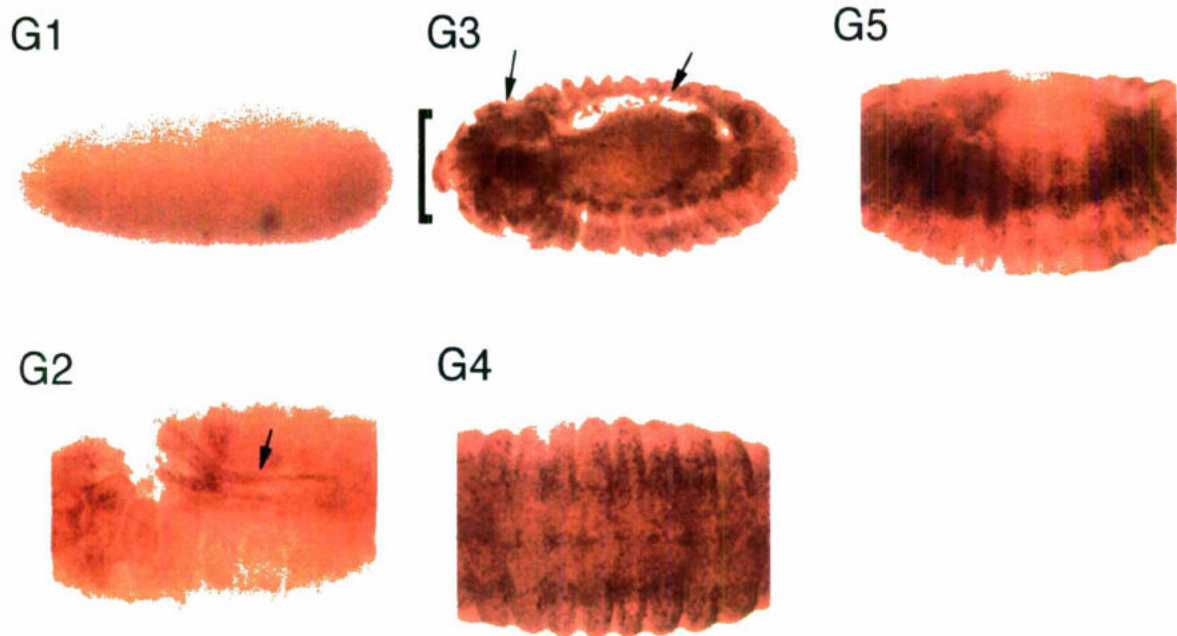


Figura16. INMUNOHISTOQUÍMICA EN EMBRIONES FIJADOS CON GLUTARALDEHIDO. Todos los embriones están colocados con la parte cefálica hacia la izquierda. A excepción de G4 que esta colocado en una vista ventral, y G3 en una vista dorsal los demás embriones están colocados con la parte dorsal hacia arriba. La flecha en G2 señala las células de la amnioserosa y en G3 las flechas señalan las células del cerebro y del *anlagen* cardiaco.

Parece que la tinción es más evidente en los embriones fijados con el formaldehído (ver Figura 17).

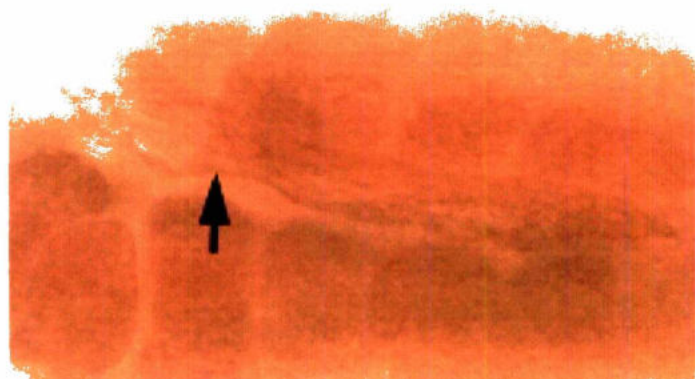


Figura 17. AMNIOSEROSA DE EMBRIÓN FIJADO CON GLUTARALDEHIDO. La flecha señala las células de la amnioserosa de un embrión fijado con glutaraldehido (imagen a 40X, de una vista anterior-dorsal).



Sin embargo, en estos embriones se alcanza a observar más claramente la distribución de tipo segmentada (ver figura 16-G3, G4 y G5) y se observa que la proteína se encuentra distribuida de una manera consistente con una distribución nuclear en las células del epitelio lateral (ver Figura 18).

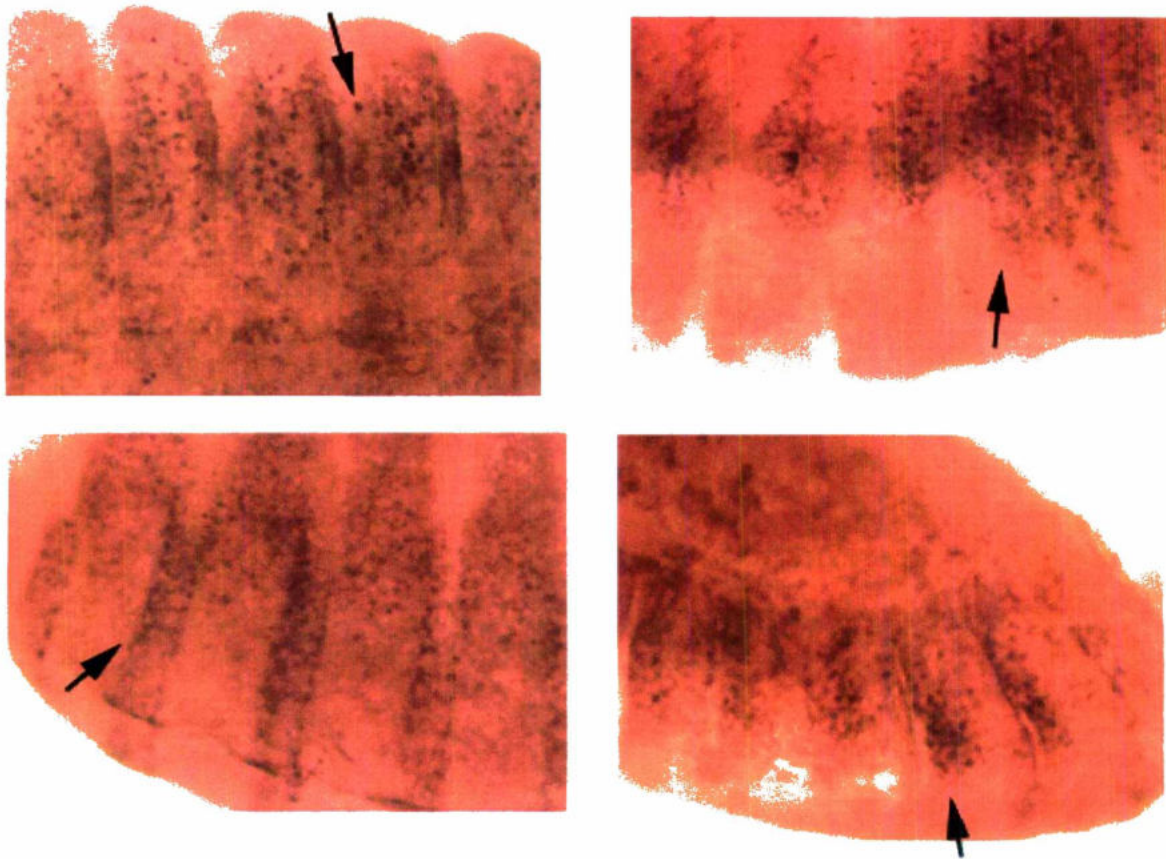


Figura 18. PATRÓN SEGMENTADO. Las flechas señalan la distribución segmentada de la proteína y el patrón de tinción puntual el cual sugiere que esta proteína se encuentra en el núcleo de la célula (las imágenes que se observan son de embriones orientados con la parte cefálica hacia la derecha). Aumento a 40X.



## DISCUSIÓN

### DISTRIBUCIÓN DEL TRANSCRITO

La distribución del transcrito del gen *amfos* es muy dinámica durante toda la embriogénesis. Partiendo desde etapas embrionarias muy tempranas; como es el inicio de la gastrulación, en las células del mesodermo y endodermo. Después durante la extensión de la banda germinal, ahora en las células de la amioserosa. Cuando se ha completado la extensión de la banda germinal, nuevamente la distribución cambia y la expresión se da en las células del ectodermo y también las células de *leading edge*. Durante todo el proceso de cerrado dorsal, etapa casi al final de la embriogénesis, este gen se expresa en las células del epitelio lateral con una distribución de tipo segmentada, en las células del cerebro, células cardíacas y del intestino medio anterior. Esto nos habla de la importancia y del papel que desempeña este gen en el desarrollo, de su participación y de cómo se va expresando en lugares clave respecto a su función, por ejemplo se expresa de inicio en las células que darán origen a estructuras derivadas del mesodermo y endodermo como son células cardíacas y el intestino medio anterior, lo cual se corrobora en etapas mas tardías casi al final de la embriogénesis, con la formación y expresión en estas estructuras. También se expresa en las células del ectodermo, las cuales darán origen posteriormente al cerebro y a las células del epitelio lateral, en donde se expresan durante el proceso de cerrado dorsal, sugiriendo su participación en el cambio de forma celular del epitelio lateral.

### DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA

La proteína al igual que el transcrito se distribuye según la expresión de este gen *amfos* en diferentes células durante toda la embriogénesis. El patrón de expresión para la proteína es consistente con el patrón de expresión del transcrito en todas las etapas, aún cuando las técnicas detectan dos cosas completamente diferentes (una técnica detecta la proteína y la otra técnica detecta el mRNA). Esto

quiere decir que efectivamente el lugar en donde se expresa el transcrito posteriormente expresará a la proteína.

También el patrón de expresión puntual en las células de la amnioserosa durante la extensión de la banda germinal y el epitelio lateral durante el cerrado dorsal nos hace pensar que la localización de esta proteína es nuclear, esto sugiere que su posible participación en una vía de transducción de señales se da río abajo de la cascada. No tenemos evidencias concretas de la localización intracelular de la proteína, pero en un futuro trabajo también sería conveniente hacer una doble tinción con algún anticuerpo nuclear y por microscopia de fluorescencia confocal, observar si hay co-localización, o incluso inmunotinción con microscopia electrónica de transmisión, para estar más seguros de la localización exacta de la proteína.

#### DIFERENCIAS EN LA TINCIÓN DEBIDO A LA FIJACIÓN

Una apropiada fijación, marcaje y detección puede hacer la diferencia enorme en la sensibilidad y claridad de los resultados (Roberts, 1998). Cuando se comparó la resolución de tinción de la inmunohistoquímica, se encontró que en los embriones fijados con formaldehído, la tinción es más clara que con glutaraldehído. Incluso los embriones que se fijaron con acetona ni siquiera presentaron tinción clara, y esto debido a que la membrana vitelina no se desprendió de estos embriones y por lo tanto ya que esta membrana es impermeable, no pudo penetrar el anticuerpo.

#### PARTICIPACIÓN DE *amfos* EN LA VÍA JNK

Se ha reportado la expresión de *Dfos* durante las diferentes etapas del desarrollo embrionario y este presenta, precisamente, tinción en las células de la amnioserosa para embriones tempranos y en las etapas 10-11. En embriones más tardíos desaparece la tinción, para después teñir células del epitelio lateral y mayoritariamente las células de "leading edge", cuando el cerrado dorsal ha sido completado las células del endodermo también expresan este gen. Mutaciones en el receptor de *dpp*, *tkv*, reducen la expresión de *Dfos* en las células del epitelio lateral durante la extensión de la banda germinal y mutaciones en *dpp* reducen la



expresión de *Dfos* en las células del endodermo. *amfos* también se expresa en este lugar. Esto nos hace pensar que *amfos* también podría estar regulado por *dpp* (Riesgo-Escovar y Hafén, 1997). Algunos de los patrones de expresión de *amfos* encontrados con la técnica de hibridación *in situ* en los embriones silvestres son parecido a los patrones de expresión de *Dfos*, aunque *amfos* también presenta tinción en la parte anterior debido a su expresión en la porción cefálica (ver figura 16). El gen *amfos* también se expresa en las células del epitelio lateral con un patrón de expresión segmentado durante el proceso de cerrado dorsal. Esto favorece la idea de que *Dfos* y *amfos* interactúan.

La proteína codificante del gen *amfos*, de manera diferente a la proteína *Dfos* no se expresa en las células de la amnioserosa durante el proceso del cerrado dorsal ni tampoco hay una mayor expresión en las células de leading edge (Zeitlinger y col., 1997). Sin embargo su patrón de expresión en las células del epitelio lateral sugiere que este gen participa en la vía de la cinasa de Jun, en el cambio de forma celular durante el proceso de cerrado dorsal, posiblemente regulado por la vía de Dpp, aunque no tenemos evidencias de esto, fuera del hecho de que Dpp actúa como molécula señalizadora para regular el cambio de forma celular en las células del epitelio lateral (Affolter y col., 1994).

Estos datos, los publicados y los de nuestro grupo de estos dos genes, muestran similitudes claras entre los genes; por ejemplo: el fenotipo mutante que estos dos genes presentan (apertura dorsal) y la interacción genética de no complementación no alélica, junto con el patrón de expresión, refuerzan la hipótesis de que interactúan en la función del cambio de forma celular, durante el proceso de cerrado dorsal y a través de la vía JNK.

También hay expresión diferente a *Dfos* tanto de transcrito como de proteína *Amfos* en la parte anterior del embrión en etapas muy tempranas, y en las células del anlagen cardiaco, y en el sistema nervioso central en embriones de etapas tardías, lo cual sugiere que esta involucrado en el desarrollo de estas estructuras, independientemente de la función de *Dfos*.



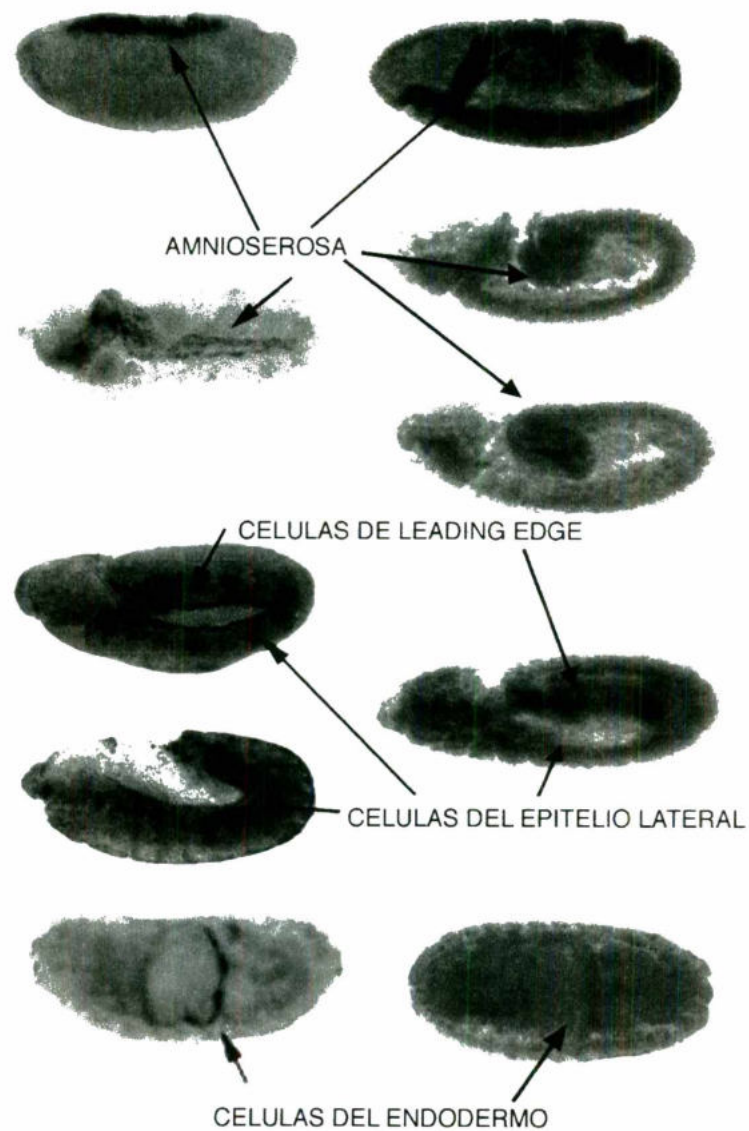


Figura 16. *Dfos* Y *amfos*. Imágenes de embriones teñidos por la técnica de hibridación *in situ*. Las imágenes de *Dfos* fueron tomadas de Riesgo-Escovar y Hafen, 1997 y arregladas para mostrar al lector la similitud con los patrones de expresión de *amfos* de las imágenes obtenidas en este trabajo. En los embriones de la columna izquierda se observa la expresión de *Dfos* y en los embriones de la columna derecha se observa la expresión de *amfos*.

Será conveniente examinar los fenotipos de estos tejidos en las mutantes en un trabajo posterior.

En resumen podemos afirmar que la expresión del transcrito y la proteína de *amfos* es consistente con su función en el cerrado dorsal y su interacción con *Dfos*. Además la débil expresión temprana es consistente con la falta de fenotipos tempranos en clones de línea germinal de un alelo mutante de *amfos* (Riesgo-Escovar, datos no publicados), y parte del patrón de expresión tardío sugiere su regulación por la vía de *dpp*, como ocurre con *Dfos*.



## CONCLUSIONES

*amfos* es un gen importante durante el desarrollo embrionario ya que se expresa y podría requerirse en diferentes etapas, desde la formación del blastodermo sincisial, pasando por la gastrulación, extensión y retracción de la banda germinal, hasta el cerrado dorsal, donde su participación es indispensable. El patrón de expresión del transcrito, así como de la proteína es consistente con la función de *amfos* en el cambio de forma celular. De acuerdo con los datos presentes y partiendo además del hecho de que los dos genes presentan el mismo fenotipo mutante, se puede concluir que hay una fuerte interacción entre *Dfos* y *amfos*.

También cubriendo los objetivos planteados se puede decir que el método de fijación que presentó mejores resultados fue utilizando formaldehído. Los datos de la hibridación *in situ* son consistentes con los encontrados con la técnica inmunohistoquímica.

## BIBLIOGRAFÍA

**Adams**, MD. Celniker, SE. Holt, RA. Evans, CA. Gocayne, JD. Amanatides, PG. Scherer, SE. Li, PW. Hoskins, RA. Galle, RF. George, RA. Lewis, SE. Richards, S. Ashburner, M. Henderson, SN. Sutton, GG. Wortman, JR. Yandell, MD. Zhang, Q. Chen, LX. Brandon, RC. Rogers, YH. Blazej, RG. Champe, M. Pfeiffer, BD. Wan, KH. Doyle, C. Baxter, EG. Helt, G. Nelson, CR. Gabor, GL. Abril, JF. Agbayani, A. An, HJ. Andrews-Pfannkoch, C. Baldwin, D. Ballew, RM. Basu, A. Baxendale, J. Bayraktaroglu, L. Beasley, EM. Beeson, KY. Benos, PV. Berman, BP. Bhandari, D. Bolshakov, S. Borkova, D. Botchan, MR. Bouck, J. Brokstein, P. Brottier, P. Burtis, KC. Busam, DA. Butler, H. Cadieu, E. Center, A. Chandra, I. Cherry, JM. Cawley, S. Dahlke, C. Davenport, LB. Davies, P. de Pablos, B. Delcher, A. Deng, Z. Mays, AD. Dew, I. Dietz, SM. Dodson, K. Doup, LE. Downes, M. Dugan-Rocha, S. Dunkov, BC. Dunn, P. Durbin, KJ. Evangelista, CC. Ferraz, C. Ferriera, S. Fleischmann, W. Fosler, C. Gabrielian, AE. Garg, NS. Gelbart, WM. Glasser, K. Glodek, A. Gong, F. Gorrell, JH. Gu, Z. Guan, P. Harris, M. Harris, NL. Harvey, D. Heiman, TJ. Hernandez, JR. Houck, J. Hostin, D. Houston, KA. Howland, TJ. Wei, MH. Ibegwam, C. Jalali, M. Kalush, F. Karpen, GH. Ke, Z. Kennison, JA. Ketchum, KA. Kimmel, BE. Kodira, CD. Kraft, C. Kravitz, S. Kulp, D. Lai, Z. Lasko, P. Lei, Y. Levitsky, AA. Li, J. Li, Z. Liang, Y. Lin, X. Liu, X. Mattei, B. McIntosh, TC. McLeod, MP. McPherson, D. Merkulov, G. Milshina, NV. Mobarry, C. Morris, J. Moshrefi, A. Mount, SM. Moy, M. Murphy, B. Murphy, L. Muzny, DM. Nelson, DL. Nelson, DR. Nelson, KA. Nixon, K. Nusskern, DR. Pacleb, JM. Palazzolo, M. Pittman, GS. Pan, S. Pollard, J. Puri, V. Reese, MG. Reinert, K. Remington, K. Saunders, RD. Scheeler, F. Shen, H. Shue, BC. Siden-Kiamos, I. Simpson, M. Skupski, MP. Smith, T. Spier, E. Spradling, AC. Stapleton, M. Strong, R. Sun, E. Svirskas, R. Tector, C. Turner, R. Venter, E. Wang, AH. Wang, X. Wang, ZY. Wassarman, DA. Weinstock, GM. Weissenbach, J. Williams, SM. Woodage, T, Worley, KC. Wu, D. Yang, S. Yao, QA. Ye, J. Yeh, RF. Zaveri, JS. Zhan, M. Zhang, G. Zhao, Q. Zheng, L. Zheng, XH. Zhong, FN. Zhong, W. Zhou, X. Zhu, S. Zhu, X. Smith, HO. Gibbs, RA. Myers, EW.



Rubin, GM. Venter, JC. **2000**. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*: Vol. 287: 2185-2195.

**Affolter**, M. Nellen, D. Nussbaumer, U y Basler, K. **1994**. Multiple requirements for the receptor serine/threonine kinase *thick veins* reveal novel functions of TGF $\beta$  homologs during *Drosophila* embryogenesis. *Development*: Vol. 120: 3105-3117.

**Alberts**, B. Jonson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, P. **2002**. Cell Communication. En: Molecular Biology of The Cell. Ari S, Heldin CH, Krauss G, Purton M, Eds. Garland Science, USA: 831-906.

**Brody**, TB. **1996**. Stages of Development and Mitotic Domains. En: The Interactive Fly. <http://flybase.bio.indiana.edu/allied-data/lk/interactive-fly/aimain/2stages.htm>.

**Campos-Ortega**, JA. y Hartenstein, V. **1997**. A summary of *Drosophila* Embryogenesis. En: The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer Verlag, Berlin: pp. 1-8.

**Chen**, HW. Marinissen, MJ. Oh, SW. Chen, X. Melnick, M. Perrimon, N. Gutkind, JS. Hou, SX. **2002**. CKA, a novel multidomain protein, regulates the JUN N-terminal kinase signal transduction pathway in *Drosophila*. *Mol Cell Biol*. Vol. 6: 1792-803.

**Gomperts**, B. Kramer, I. Tatham, P. **2003**. Signal transduction. Elsevier academic press, USA: 257-282.

**Greenspan**, R. **1997**. Fly Pushing. The Theory and Practice of *Drosophila* Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA: 3-7.

**Harden**, N. **2002**. Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lesson from dorsal closure in *Drosophila*. *Differentiation*: Vol. 70: 1-23.

**Hartenstein**, V. **1993**. ATLAS of *Drosophila* Development. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA: 2-4, 6-11, 46-47.

**Igaki**, T. Kanda, H. Yamamoto-Goto, Y. Kanuka, H. Kuranaga, E. Aigaki, T. Miura, M. **2002**. Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO J.*: Vol. 21: 3009-3018.

**Jakubowski**. **2003**. Binding and the control of gene transcription. <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/bind/olbindtranscription.html>



**Manning, G. 2003.** A quick and simple introduction to *Drosophila melanogaster*. <http://ceolas.org/vL/fly/intro.html>.

**Mathews, CK. 1998.** Coordinación Metabólica, Control Metabólico y Transducción de Señal. En: Bioquímica. Nishizuka Y, Fantl WJ, Marshall CJ, Egan SE, Eds. McGraw-Hill – Interamericana, España: 919-946.

**Riesgo-Escovar, JR y Hafen, E. 1997.** Common and distinct roles of DFos and DJun during *Drosophila* development. *Science*: Vol.278: 669-672.

**Riesgo-Escovar, JR y Hafen, E. 1997.** *Drosophila* Jun kinase regulates expression of decapentaplegic via the ETS-domain protein Aop and the AP-1 transcription factor, DJun, during dorsal closure. *Genes Dev.*: Vol. 11: 1717–1727.

**Riesgo-Escovar, JR, Jenni, M, Fritz, A y Hafen, E. 1996.** The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis, but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes Dev.*: Vol. 10: 2759–2768.

**Roberts, DB. 1998.** Immunolabeling of *Drosophila*. En: *Drosophila* a practical approach. White RA, Ed. Oxford University Press, USA: 215-240.

**Rousseau, E, Goldstein, ES. 2001.** The gene structure of the *Drosophila melanogaster* homolog of the human proto-oncogene fos. *Gene*: Vol. 11: 315-22.

**Stronach, B y Perrimon, N. 2002.** Activation of the JNK pathway during dorsal closure in *Drosophila* requires the mixed lineage kinase, *slipper*. *Genes Dev.*: Vol. 16: 377-387.

**Su, YC, Treisman, JE, Skolnik, EY. 1998.** The *Drosophila* Ste20-related kinase misshapen is required for embryonic dorsal closure and acts through a JNK MAPK module on an evolutionarily conserved signaling pathway. *Genes Dev.*: Vol.12: 2371-2380.

**Sullivan, W, Ashburner, M, Hawley, S. 2000.** Fluorescent Analysis of *Drosophila* Embryos. En: *Drosophila* Protocols. Rothwell, Sullivan, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA: 141-158.

**Weigmann, K, Klapper, R, Strasser, T, Rickert, C, Technau, GM, Jäckle, H, Janning, W, y Klämbt, C. 2003.** FlyMove – a new way to look at development of *Drosophila*. *Trends in Genetics*: Vol. 19: 310-311. <http://flymove.uni-muenster.de>

**Zeitlinger, J.** Kockel, Fiorenzo, L. Peverali, A. Jackson, DB. Mlodzik, M y Bohmann, D. **1997.** Defective dorsal closure and loss of epidermal *decapentaplegic* expression in *Drosophila fos* mutants. *EMBO J.*: Vol.16: 7393–7401.

**Zeitlinger**, J. Kockel, Fiorenzo, L. Peverali, A. Jackson, DB. Mlodzik, M y Bohmann, D. **1997**. Defective dorsal closure and loss of epidermal *decapentaplegic* expression in *Drosophila fos* mutants. *EMBO J.*: Vol.16: 7393–7401.





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

" CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN

DEL GEN *amigo de fos (amfos)* EN

EMBRIONES DE *Drosophila melanogaster*"

PROPIEDAD DE LA FACULTAD  
DE QUÍMICA DE LA U. A. Q.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

NESTOR OCTAVIO NAZARIO YEPIZ

DIRIGIDA POR

Dr. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR

FACULTAD DE  
QUÍMICA



BIBLOTECA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2004.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

“CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN  
DEL GEN *amigo de fos* (*amfos*) EN  
EMBRIONES DE *Drosophila melanogaster*”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

NESTOR OCTAVIO NAZARIO YEPIZ

DIRIGIDA POR

Dr. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR

SINODALES

Dr. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR  
DIRECTOR

\_\_\_\_\_

Dr. MARÍA TERESA PEÑA RANGEL  
SINODAL

\_\_\_\_\_

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER  
SINODAL

\_\_\_\_\_

Dr. LUIS MIGUEL SALGADO RODRÍGUEZ  
SINODAL

\_\_\_\_\_

## ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
I. GENERALIDADES DE <i>Drosophila melanogaster</i>	2
A. Ciclo de vida	2
B. El genoma de <i>Drosophila melanogaster</i>	4
C. Cromosomas politénicos y mapa citológico	4
D. <i>Drosophila melanogaster</i> y el análisis celular	5
II. ETAPAS EMBRIONARIAS DE <i>Drosophila melanogaster</i>	6
A. Divisiones del blastodermo sincisial	8
B. Gastrulación	9
C. Extensión de la banda germinal	12
D. Neurulación	13
E. Retracción de la banda germinal	14
F. Cerrado dorsal	14
G. Involución de la cabeza	15
III. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES	15
A. Receptores con actividad tirosina cinasa	16
B. Ras y la vía MAPK	16
C. Vía JNK	19
IV. MUTANTES CON FENOTIPO DE APERTURA DORSAL	22
A. <i>Dfos</i>	22
B. <i>amigo de fos</i>	24



HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	28
↔ GENERAL	28
↔ ESPECÍFICOS	28
METODOLOGÍA	29
MATERIAL	29
MÉTODOS	29
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Etapas del desarrollo embrionario de <i>Drosophila melanogaster</i>	6

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	3
2. Eventos que ocurren durante el desarrollo embrionario de <i>Drosophila melanogaster</i>	10
3. Vía de señalización de tipo MAPK	18
4. Dominio zipper de leucina	21
5. Expresión de <i>Dfos</i> en embriones silvestres	23
6. Interacción genética entre <i>Dfos</i> y <i>amfos</i>	25
7. Western blot y Northern blot	26
8. Resultados de la hibridación <i>in situ</i>	36
9. Células de la amnioserosa de hibridación <i>in situ</i>	37
10. Células del <i>anl</i> agen cardiaco	38
11. Inmunohistoquímica en embriones fijados con formaldehído	39
12. Embriones tempranos	40
13. Células de la amnioserosa	41
14. Distribución nuclear	41
15. <i>Anl</i> agen cardiaco y sistema nervioso	42
16. Inmunohistoquímica en embriones fijados con glutaraldehído.	43
17. Amnioserosa de embrión fijado con glutaraldehído	43
18. Patrón segmentado	44
19. <i>Dfos</i> y <i>amfos</i>	48



## RESUMEN

Las cascadas de transducción de señales de tipo MAPK son indispensables para la activación de varios genes en respuesta a muchísimas señales. Estas vías se encuentran conservadas evolutivamente y median respuestas de proliferación, diferenciación, movimiento y muerte. Una clase de vía tipo MAPK es la vía de la cinasa de Jun (JNK). En *Drosophila melanogaster*, se han reportado varios de los genes de la vía JNK. La activación de esta vía en la embriogénesis, conlleva al cambio de forma celular en el epitelio lateral, lo que a su vez posibilita el proceso de cerrado dorsal. Las mutaciones en genes involucrados en esta vía producen un fenotipo letal llamado apertura dorsal. En el laboratorio de genética de transducción de señales del INB se han estudiado líneas mutantes con deficiencias en el cerrado dorsal. Recientemente se clonó y secuenció un nuevo gen, *amigo de fos* (*amfos*), que como su nombre indica, interactúa genéticamente con el gen *Dfos* de la vía. A partir de la secuencia de un cDNA se sintetizó una sonda de RNA y un polipéptido que se utilizó para generar anticuerpos policlonales. Con estas herramientas, en el presente trabajo se caracterizó el patrón de expresión de este gen en embriones de la línea silvestre *yw*, mediante técnicas inmunohistoquímicas e hibridación *in situ*. Se encontró que parte del patrón de expresión coincide con el patrón de expresión de *Dfos* lo cual sugiere que *Dfos* y *amfos* actúan de manera coordinada durante el cerrado dorsal y es consistente con la fuerte interacción genética de estos dos genes en la vía de la cinasa de Jun. Además, *amfos* se expresa en el sistema nervioso central y las células cardíacas, como una función independiente de *Dfos*.

## INTRODUCCIÓN

Parte del auge actual de la genética con las técnicas de Biología Molecular, resulta del conocimiento íntimo de la función de los genes, para fines científicos y terapéuticos. Muchas veces el estudio de algunos genes resulta inaccesible en los seres humanos y es de vital importancia el uso de animales como modelos experimentales, y dadas las características de *Drosophila melanogaster*, ésta es muy útil en el análisis genético. En el laboratorio se aisló una mutante nueva con deficiencia en el cerrado dorsal, un proceso que ocurre durante la embriogénesis. Este fenotipo es debido a la mutación de un gen nuevo que interacciona genéticamente con el gen *Dfos*, de la vía de la cinasa de Jun. Por medio de técnicas genéticas, incluyendo la recombinación en machos, se mapeó este gen nuevo, *amigo de fos (amfos)*, a la región proximal del brazo derecho del cromosoma 3 de *Drosophila*. Se obtuvo la secuencia del cDNA, y posteriormente con esta secuencia se sintetizó un péptido, que fue utilizado para la producción de anticuerpos en un conejo y una sonda de RNA. Con base en estos conocimientos y los antecedentes que se muestran más adelante, este trabajo consiste en descifrar la expresión de este nuevo gen descubierto en *Drosophila melanogaster*, *amfos*. Para ello se utilizaron técnicas como la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ* que permiten detectar la presencia de la proteína que codifica este gen, o de su transcrito, como un abordaje para entender de que forma podría intervenir este gen con los demás genes involucrados durante el cerrado dorsal.



## ANTECEDENTES

### I. GENERALIDADES DE *Drosophila melanogaster*

*Drosophila melanogaster*, también conocida como la mosca de la fruta, es uno de los organismos mejor estudiados, ya que se ha utilizado en la investigación como un modelo para esclarecer muchos procesos biológicos (Adams y col., 2000), tiene un tamaño aproximado de 3 mm de largo y se conoce con este nombre por que es del tipo de moscas que se acumula alrededor de la fruta madura (Manning, 2003). *Drosophila melanogaster*, ha sido utilizada como modelo experimental por su periodo de vida corto, y su tamaño que permite mantener una buena cantidad de individuos en un espacio muy pequeño. Además se cuenta con varias herramientas para poder hacer análisis genético, ya que existen muchas mutantes en distintos genes y el genoma completo se ha secuenciado (Adams y col., 2000), se utiliza en los análisis bioquímicos, y de conducta. A continuación se describen algunas características de *Drosophila*.

#### A. Ciclo de vida

Una ventaja de trabajar con *Drosophila* es que se pueden estudiar prácticamente tres diferentes individuos en un mismo organismo (embrión, larva y adulto). El ciclo de vida comienza cuando los adultos se aparean y se fecunda el huevo. Después de que se ha llevado a cabo el desarrollo embrionario (el cual se comentará con detalle más adelante), la larva eclosiona y pasa a una larva de 1er estadio, después a 2o estadio y 3er estadio; entonces se forma la prepupa y después en la etapa de pupa sufrirá la metamorfosis, para convertirse en un adulto (ver figura 1)(Manning, 2003).



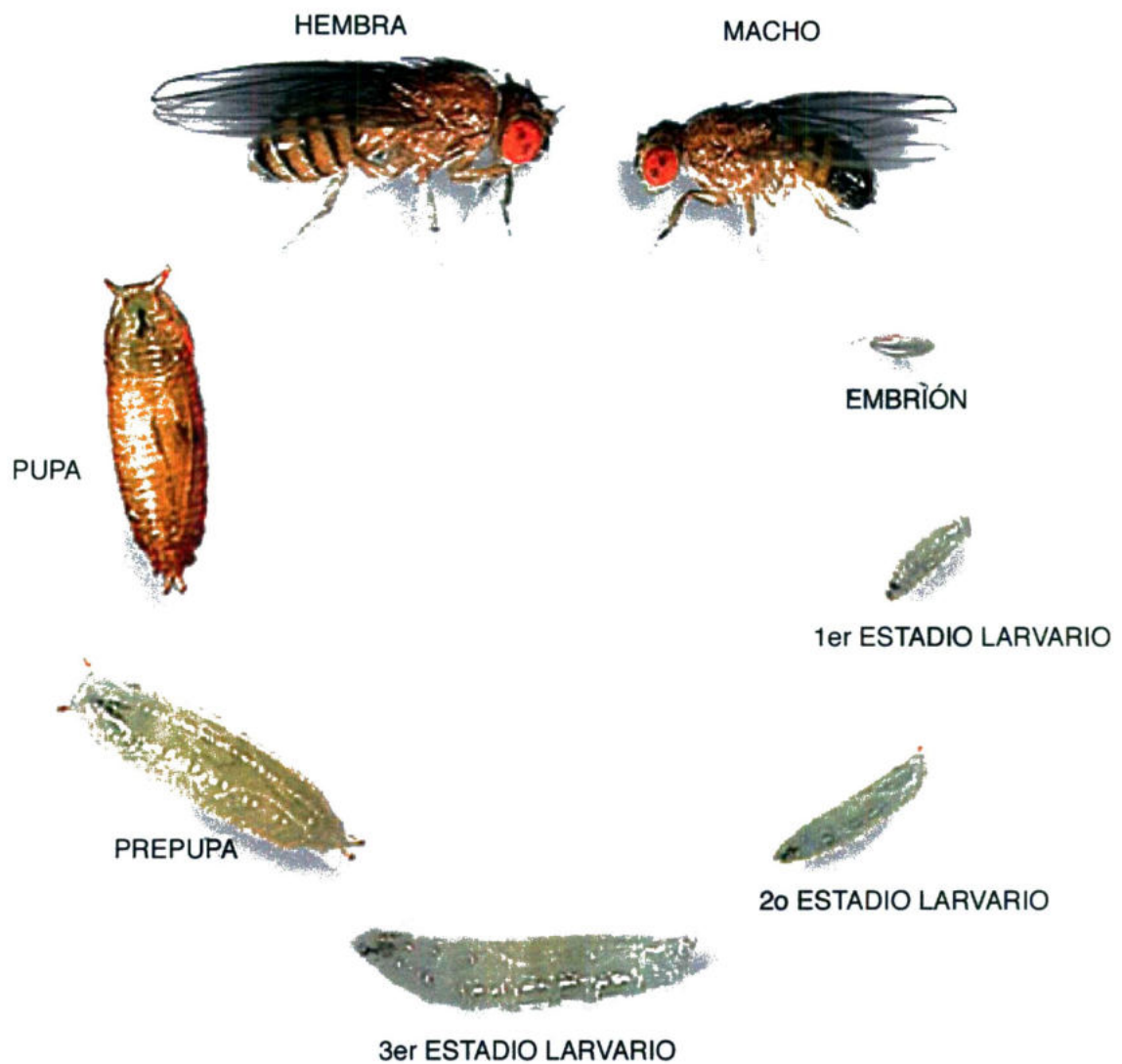


Figura 1. CICLO DE VIDA DE *Drosophila melanogaster*. Cuando el huevo es fertilizado, se forma el embrión, después una larva eclosiona, y esta madura pasando a través de sus diferentes estadios, hasta convertirse en pupa, en donde sufre la metamorfosis para dar origen a una mosca adulta (Imagen modificada de Weigmann y col., 2003).

## **B. El genoma de *Drosophila***

*Drosophila* tiene cuatro pares de cromosomas, un par de cromosomas sexuales y tres pares de cromosomas autosómicos. Por convención se numeran del uno al cuatro y el número uno se usa para designar a los cromosomas sexuales. El cromosoma X y el cromosoma 4 tienen el centrómero en un extremo a diferencia de los cromosomas 2 y 3 que son metacéntricos. El tamaño del cromosoma X, es relativamente comparable con los brazos izquierdo y derecho de los cromosomas 2 y 3 (2L,2R,3L,3R). El cromosoma 4 es aproximadamente 1/5 del tamaño de estos cromosomas (Greenspan, 1997).

El genoma de *Drosophila* contiene aproximadamente 180 mega bases con 13 600 genes, contenidos en estos cuatro cromosomas (Adams y col., 2000; Manning, 2003).

## **C. Cromosomas politénicos y mapa citológico**

Otra característica intrínseca de la mosca de la fruta es la presencia de cromosomas politénicos, estos son cromosomas gigantes que se encuentran en las glándulas salivales de las larvas. Se pueden observar por microscopia de luz y tienen un patrón de bandas que hace posible identificar la posición física de algunos genes (con técnicas de hibridación *in situ*). Cada uno de los brazos de los cromosomas grandes está dividido en 20 segmentos, numerados del 1-20 para el cromosoma X, 21-40 para el 2L, 41-60 para el 2R, 61-80 para el 3L y 81-100 para el 3R. El cromosoma 4 esta numerado como 101-104. Cada región es subdividida en letras (A, B, C, D, E), y cada subdivisión en número de bandas.

#### **D. *Drosophila melanogaster* y el análisis celular**

Se ha puesto mucho énfasis últimamente en Biología del Desarrollo con el análisis celular (con las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*), aunque había sido olvidado posiblemente por lo atrayente de la Biología Molecular, a pesar de que estas técnicas son muy eficientes y relativamente sencillas. Anticuerpos específicos proveen una manera fácil para el estudio de la distribución y localización de una proteína y esto nos puede dar pistas importantes acerca de su función (Roberts, 1998). A veces se puede complementar la utilidad de los anticuerpos, poniendo sondas de RNA y detectar así el transcrito para esa proteína en particular.

El desarrollo embrionario es particularmente favorable para este tipo de análisis celular, ya que se han caracterizado, los movimientos moleculares y morfológicos gracias a estas herramientas. El análisis de muestras fijadas permite analizar muchos embriones en una sola sesión al microscopio, y estas preparaciones son estables por periodos de tiempo muy largos.

Los embriones están protegidos por una capa externa y también por una capa opaca impermeable; el corion y la membrana vitelina, lo cual hace difícil la tinción, pero se pueden eliminar estas capas con tratamiento con solventes, lo cual se comentará mas adelante en las técnicas (Sullivan y col., 2000). A continuación se hablará mas a fondo acerca del desarrollo embrionario de *Drosophila*.



## II. ETAPAS EMBRIONARIAS DE *Drosophila melanogaster*

El desarrollo embrionario es un proceso continuo, con los consecuentes cambios de forma desde el huevo fertilizado. El desarrollo de la mosca procede a través de una compleja serie de periodos y procesos, algunos sucesivos, y otros simultáneos. El despliegue de cualquier vida nueva es una maravilla para contemplar; sobretodo cuando se entiende a nivel bioquímico o genético. Los estadios en el desarrollo de la mosca se clasifican de acuerdo a los eventos morfogénéticos que ocurren. Hay que recordar que la división de la embriogénesis en etapas es artificial, pero muy útil para describir el desarrollo embrionario.

Abajo se muestra una lista de los mismos, desde la fertilización hasta la eclosión de la larva (ver Cuadro 1). Se anotan el número correspondiente de la etapa y los límites de tiempo que enmarcan a cada evento.

Cuadro 1. ETAPAS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DE *Drosophila melanogaster*

Número de etapa	Tiempo después de la fertilización (hr:min)	Actividad de desarrollo
1	0 – 0:15	Fusión pro-núcleos
2	0:15 – 1:10	Pre-blastodermo (1-9 ciclos mitóticos) - división celular temprana – inicio de las divisiones blastodérmicas
3	1:10 - 1:30	Formación del brote polar, formación de las células polares– 9 divisiones nucleares
4	1:30 - 2:10	Blastodermo Sincisial ( 10-13 ciclos mitóticos) – fin de las divisiones blastodérmicas
5	2:10 – 3:00	Celularización del blastodermo
6	3:00 - 3:15	Gastrulación para formar el mesodermo y endodermo - células polares incluidas en el primordio del intestino medio
7	3:15 – 3:20	Elongación de la banda germinal – alargado de la epidermis

		ventral
8	3:20 – 3:50	Elongación rápida de la banda germinal - inicio de la primer mitosis post-blastodérmica - fin de la etapa de parasegmentación mesodérmica
9	3:50 – 4:20	Elongación lenta de la banda germinal - segmentación de neuroblastos – fin de la primera e inicio de la segunda mitosis post-blastodérmica - formación del surco cefálico
10	4:20 – 5:20	Formación del lóbulo gnathal y clypeolabral (características de la cabeza) - invaginación stomodeal – fin de la segunda e inicio de la tercera mitosis post-blastodérmica
11	5:20 – 7:20	Parasegmentación epidérmica evidente – hueco traqueal invaginado - ingreso de células mesectodérmicas – fin de la tercera mitosis post-blastodérmica - fin de formación neuroblástica
12	7:20 – 9:40	Retracción de la banda germinal - invaginación del lóbulo óptico - cerrado ventral – formación de segmentos - fusión del intestino medio anterior y posterior
13	9:20 – 10:20	Fin de la retracción de la banda germinal - diferenciación del sistema nervioso central y sistema nervioso periférico
14	10:20 – 11:20	Cerrado dorsal – comienza la involución de la cabeza
15	11:20 – 13:20	Fin del cerrado dorsal - involución de la cabeza - comienza deposición cuticular - segmentación epidérmica dorsal
16	13:20 – 15:00	Dentículos ventrales visibles – Acortamiento de la cadena nerviosa ventral
17	Antes de la eclosión	El árbol traqueal lleno de aire - Retracción de la cadena ventral continua
Eclosión	21-22 horas	Eclosión a larva de primer estadio

(Brody, 1996).

A continuación se describen los principales eventos que ocurren en el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster* en donde están incluidas las diferentes etapas.



### **A. Divisiones del blastodermo sincisial**

Después de la fertilización, el núcleo se divide trece veces antes de la celularización en la etapa del blastodermo sincisial.

La asincronía de las divisiones mitóticas en embriones es crucial para la embriogénesis temprana. Los primeros 13 ciclos mitóticos ocurren en sincronía, aunque la 12<sup>a</sup> y 13<sup>a</sup> mitosis se extienden a lo largo del eje anterior-posterior. Dentro de la 14<sup>a</sup> mitosis, ocurre un patrón con diferencial mitótico regional. Esta asincronía proviene del alargamiento de la interfase. Victoria Foe llamó a los distintos sincronismos mitóticos regionales del embrión, "dominios mitóticos". En cada una de estas regiones la 14<sup>a</sup> mitosis ocurre en sincronía. Se encontraron 25 dominios de este tipo. En cada dominio hay una orientación definida de las placas ecuatoriales relativas al eje anterior-posterior del embrión. Es aparente que la posición de los "dominios mitóticos" es coincidente con los segmentos y con los *anlagen* (el término *anlagen* se utiliza para las células progenitoras de un órgano), de las futuras y definitivas estructuras de la larva y del adulto. Durante este período se activan muchos genes cigóticos.

Las primeras 7 divisiones conducen a un sincisio de 128 núcleos. En las siguientes tres, los núcleos se aproximan a la superficie del huevo para formar el blastodermo sincisial. Después llevan a cabo cuatro ciclos más de división en la periferia hasta que ocurre la celularización (los núcleos se rodean de membrana plasmática) (Brody, 1996).

La formación de las células somáticas ocurre por extensión de la membrana plasmática que rodea los núcleos del blastodermo sincisial para dar origen al blastodermo celular, antes de que la gastrulación ocurra (ver Fig. 2-5). En esta etapa es en donde se completa la celularización (las células embrionarias se individualizan).



## B. Gastrulación

En la gastrulación la formación de las capas germinales ocurre por la invaginación gradual de un bloque de células medio-ventrales, las cuales formarán una estructura tubular en el interior del embrión. Esta estructura tubular incluye cuatro diferentes primordios (el término primordio se utiliza para nombrar a las células progenitoras de cada órgano una vez que este es reconocible), estos primordios son: el mesodermo, el proctodeum, el intestino medio anterior y el intestino medio posterior (Fig. 2-6).

La gastrulación ocurre en tres pasos:

- Invaginación del surco ventral
- Invaginación del intestino medio anterior
- Invaginación del intestino medio posterior

De los tres acontecimientos de la gastrulación uno está implicado en la formación del mesodermo (invaginación del surco ventral), y los otros dos implican la formación del endodermo (invaginación anterior y posterior del intestino medio).

El surco ventral, que marca el principio de la gastrulación, comienza a formarse conducido por cambios de forma celular. Después, un grupo de células del polo posterior comienzan a moverse en dirección anterior dorsal. Estas células son las células polares, la línea germinal de *Drosophila*. Este movimiento inicia la elongación de la banda germinal; más tarde, un grupo de células se hunde al interior como una continuación del surco ventral para formar la invaginación amnioproctodeal. Las células en la región media ventral experimentan una constricción apical. Una parte de la célula en la superficie del embrión se constriñe, conduciendo su citoplasma basalmente (es decir, hacia el interior del embrión), adquiriendo la forma de una cuña con el extremo estrecho señalando en dirección apical (hacia el exterior del embrión).

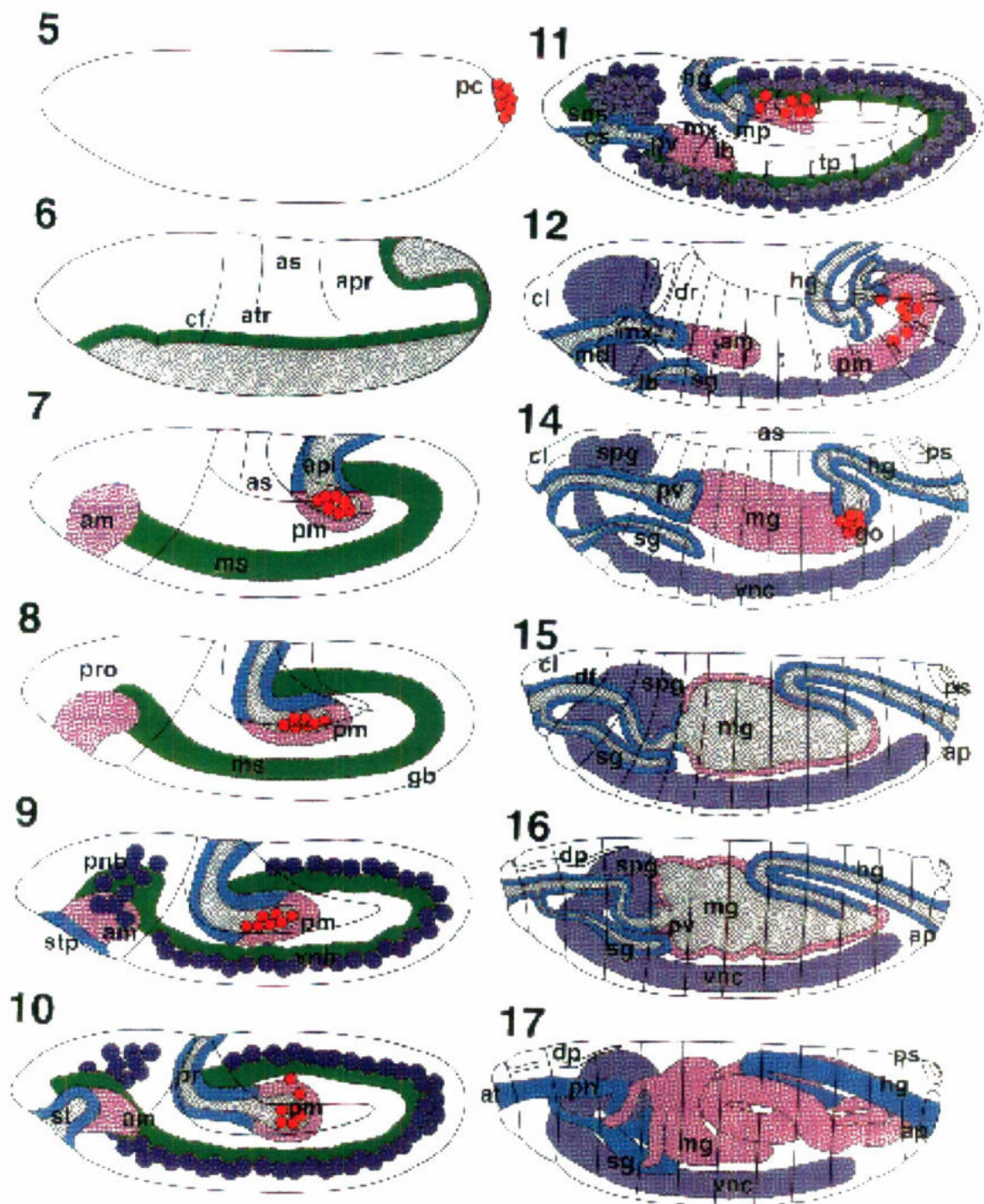


Figura 2. EVENTOS QUE OCURREN DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE *Drosophila melanogaster*. (tomado de Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).



El número de la izquierda de cada dibujo indica la etapa embrionaria.

Etapa 5.- **Blastodermo.** Células polares (*pc*).

Etapa 6.- **Gastrulación.** Surco cefálico (*cf*), surco transverso anterior (*atr*), surco transverso posterior (*apr*), amnioserosa (*as*).

Etapa 7.- **Comienzo de la elongación de la banda germinal.** Intestino medio anterior (*am*), Intestino medio posterior (*pm*), mesodermo (*ms*), invaginación amnioproctodeal (*api*).

Etapa 8.- **Elongación de la banda germinal.** Proctodeum (*pro*), banda germinal (*gb*).

Etapa 9.- **Elongación de la banda germinal en fase lenta.** Neuroblastos procefálicos (*pnb*), neuroblastos ventrales (*vnb*), placa stomodeal (*stp*).

Etapa 10.- **Primera división neuroblástica.** Invaginación stomodeal (*st*).

Etapa 11.- **Segregación epidérmica evidente.** Sistema nervioso stomogastrico (*sns*), (*cs*), proventrículo (*pv*), brote maxilar (*mx*), intestino medio posterior (*mp*), intestino trasero (*hg*), brote labial (*lb*).

Etapa 12.- **Retracción de la banda germinal.** Placa dorsal (*dr*), glándulas salivales (*sg*).

Etapa 14.- **Cerrado dorsal.** Espiráculos dorsales (*ps*), sistema nervioso ganglionar (*vnc*), ganglio supraesofágico (*spg*).

Etapa 15.- **Involución de la cabeza.** Clipeolabrum (*cl*), dobleses dorsales (*df*), placa anal (*ap*).

Etapa 16.- **Involución de la cabeza completa.**

Etapa 17.- **Desarrollo embrionario completo.** Atrio (*at*), faringe (*ph*) (tomado de Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).

Como consecuencia de este cambio de forma celular, las células adyacentes migran hacia el interior, desarrollando el surco. La actina, componente del citoesqueleto, es una de las proteínas que conducen estos cambios de forma en la célula. En el segundo paso la parte externa del surco ventral forma un canal estrecho transversal. Las células de esta invaginación constituirán el primordio del intestino medio anterior. En el último paso ocurre una compleja remodelación de la



invaginación amnioproctodeal que conduce a la formación del primordio del intestino medio posterior (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).

Hay otros siete acontecimientos que ocurren después de la invaginación del surco ventral, que se asemejan a la gastrulación en cuanto a la invaginación de células, y se enumeran abajo:

- 1) formación del surco cefálico
- 2) formación de dobleces transversales dorsales
- 3) extensión de la banda germinal
- 4) contracción de la banda germinal
- 5) segmentación
- 6) cerrado dorsal
- 7) involución de la cabeza (Campos-Ortega, 1997).

### **C. Extensión de la banda germinal**

Durante la extensión de la banda germinal el primordio ectodérmico habrá doblado su longitud y divide en dos su anchura. Este proceso de alargamiento comprime la amnioserosa, que es un tejido extraembrionario y es el más dorsal del embrión. El primer paso de la elongación de la banda germinal coincide en parte con la gastrulación, cuando se origina la invaginación amnioproctodeal. Este extremo empuja a las células vecinas adelante del surco formando una especie de recubrimiento; así la invaginación amnioproctodeal adquiere la forma de un saco invertido, el cual comprime el primordio del intestino medio posterior y del intestino trasero. Inicialmente este proceso es muy rápido (Fig. 2-7 y 8) y después lento (Fig.2-9). Durante la fase rápida (Fig.2-8) aparece una indentación en el lado de la apertura amnioproctodeal, llamada doblez paraproctodeal.

Durante la gastrulación y la extensión de la banda germinal aparecen tres surcos transitorios: uno de ellos es el surco cefálico. Este se comienza a formar al mismo tiempo que el surco ventral, a ambos lados del embrión de forma casi vertical y sigue un curso oblicuo dorso-ventral, que subdivide al embrión en procefalon y banda germinal metamérica. Este desaparece al término de la fase rápida. Este surco demarca la cabeza del tórax en el desarrollo de la mosca. Los otros dos surcos, el transverso anterior y el posterior, aparecen durante la gastrulación y persisten solo en el inicio de la fase rápida. Estos surcos aparecen como consecuencia de las modificaciones de la capa externa y ambos se aplanan en la amnioserosa.

Durante la fase lenta (Fig. 2-9) un grupo de células se invagina en el extremo anterior ventral del huevo para formar el stomodeum; esta invaginación se extiende hasta hacer contacto con el intestino medio anterior. Con esta elongación, el intestino delantero se divide en varios dominios, incluyendo el esófago y proventrículo, y crece a consecuencia de la incorporación de células ectodérmicas. La subdivisión de la banda germinal metamérica llevará a la segmentación. En la región procefálica se formará el clypeolabrum y el lóbulo procefálico.

#### **D. Neurulación**

La neurogénesis es el desarrollo del sistema nervioso central. Los neuroblastos se segregan de la capa ectodérmica en la fase rápida de la elongación de la banda germinal, de dos porciones de la capa externa germinal: el lóbulo pro-cefálico y la banda germinal. Después se arreglan en un patrón constante y se dividen para producir las células madres ganglionares, que más tarde se diferenciarán a neuronas (Fig. 2-10).



### **E. Retracción de la banda germinal**

Durante la retracción de la banda germinal (Fig. 1-12) el intestino trasero se localiza en el extremo posterior de embrión (su posición anal definitiva); también ocurre la fusión de la parte anterior y la parte posterior del intestino medio. Se unen los segmentos que darán origen al árbol traqueal completo y se forman las gónadas. Después de esto, el embrión queda abierto dorsalmente, es decir la superficie dorsal esta cubierta solamente por la amnioserosa, la cual se extiende para cubrir el hueco de la superficie dorsal. En el proceso de segmentación se forman los canales ventrales profusos, que corresponden a los límites segmentales. El aspecto interior de estos límites segmentales son los sitios para las futuras uniones musculares. Durante la segmentación, tiene lugar la segregación de los discos imaginales. Los discos imaginales son sacos de células que dan crecimiento a estructuras adultas durante la metamorfosis.

### **F. Cerrado dorsal**

La elongación y retracción de la banda germinal llevan al embrión a una apertura en la epidermis dorsal, solo cubierta por la amnioserosa (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997). Subsecuentemente, el proceso del cerrado dorsal lleva a un alargamiento de la placa epidérmica sobre la amnioserosa para cubrir el embrión entero, estas células de la epidermis se unirán en la línea media dorsal, y la amnioserosa se absorbe (Fig. 2-14).

Durante este proceso, el cual ocurre en ausencia de mitosis, las células de la epidermis se alargan a lo largo del eje dorso-ventral. Este cambio de forma inicia en la fila de células epidérmicas más dorsales, las cuales forman las así llamadas células de "*leading-edge*". Una señal que emana de estas células controla y coordina el progreso del cerrado dorsal; algunos genes relacionados en el cerrado dorsal incluyen a *hemipterous* y *basket* que son genes involucrados directamente en la vía de señalización de la cinasa de Jun (Zeitlinger y col., 1997; Riesgo-Escovar y Hafen, 1997).



## **G. Involución de la cabeza**

Es el proceso del desarrollo que ocurre al final, y coincide parcialmente con el cerrado dorsal. En el proceso de la involución de la cabeza, el ectodermo anterior migra hacia el interior, comenzando con la invaginación stomodeal. El proceso toma 5 horas. El periodo más activo de involución es de corta duración, comienza a las 10.5 horas y transcurre por media o una hora (Fig. 2-15) (Brody, 1996). Cuando la involución de la cabeza está casi completa, se condensa el sistema nervioso ganglionar (Fig. 2-16), y así, termina el desarrollo embrionario (Fig. 2-17) (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).

## **III. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES**

La transducción de señales involucra la comunicación entre células a través de neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento y feromonas. Estas moléculas son secretadas por las células que mandan la señal a otras que van a responder alterando su comportamiento. La cascada de transducción de señales es el proceso por el cual las moléculas señalizadoras (ligando) se unen al receptor en su célula blanco, induciendo un cambio conformacional en el receptor que de alguna manera va a internalizar la señal (como fosforilación intrínseca del receptor), y esta señal se va a transducir por medio de moléculas intermediarias que participan en una cascada de señales intracelulares hasta obtener una respuesta celular (como el encendido y apagado de genes). El resultado de muchos fenómenos de transducción de señales es la fosforilación o desfosforilación de proteínas blanco. En el desarrollo se requiere el encendido y apagado de muchos genes, y estos a su vez son regulados por estas vías de señalización.

Se conocen tres tipos de proteínas receptoras de superficie celular: las asociadas a canales iónicos, las asociadas a proteínas G y las proteínas receptoras con actividad enzimática intrínseca.

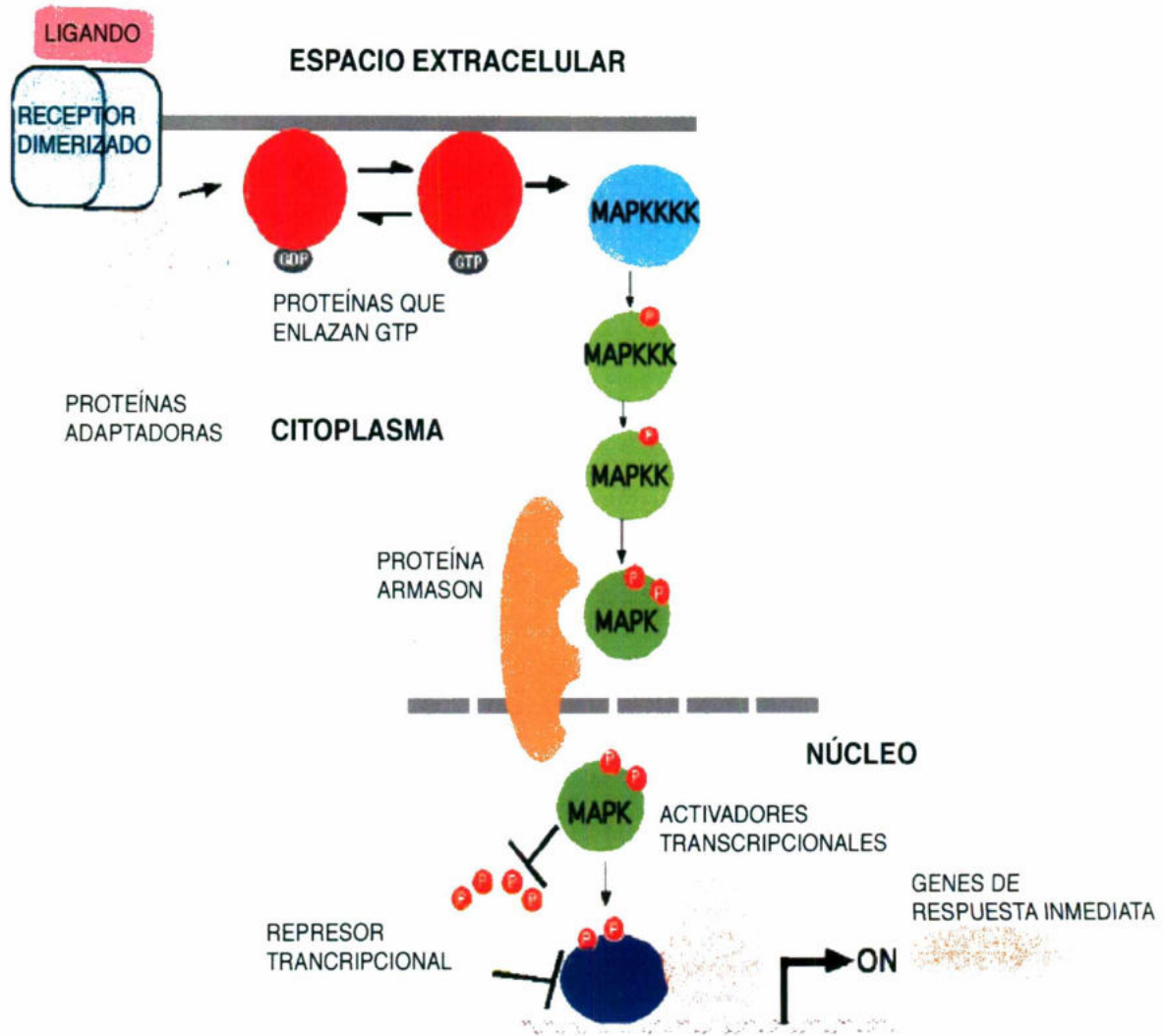


Figura 3. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE TIPO MAPK. La vía de señalización de tipo MAPK dirige la señal extracelular al núcleo a través de una serie de fosforilaciones en cascada, que activan a factores de transcripción, que finalmente regulan la transcripción de genes de respuesta inmediata.



### C. Vía JNK

JNK pertenece a la súper familia de proteínas MAPKs. La vía de transducción de señales JNK fue inicialmente descubierta en cultivo de tejidos de vertebrados y en levaduras como un mediador de la respuesta al estrés celular. En respuesta a la activación de esta cascada, JNK puede fosforilar factores de transcripción tales como Jun (Zeitlinger y col., 1997).

Una variedad de estímulos relacionados al estrés, así como también ciertas citocinas, pueden activar la vía JNK y responder de diversas maneras a esta activación, regulando diferentes procesos, como por ejemplo: la regulación de la muerte celular programada conocida como apoptosis (Igaki y col., 2002). Miembros de las familias de Rac y Cdc42 de pequeñas proteínas que unen GTP parece que están involucradas en este proceso, aunque el entendimiento de esta vía aún es fragmentario. *Drosophila melanogaster* es un organismo conveniente para la disección genética de la vía de señalización JNK (Riesgo-Escovar y col., 1996). En este organismo, la vía JNK se requiere durante la embriogénesis para llevar a cabo un proceso de cambio celular conocido como cerrado dorsal. En *Drosophila* se conoce un homólogo de JNKKKK, llamada *misshapen*, *msn*. Seis familias de JNKKK emergen como posibles reguladoras río arriba de JNK en vertebrados y hay un solo homólogo de cada una de ellas en *Drosophila*; y de ellas, se ha caracterizado a una cinasa de tipo *mixed lineage kinase* (linaje mezclado de cinasas), abreviado como MLK llamada *slipper* en la vía JNK en *Drosophila* (Stronach y Perrimon, 2002).

La vía de transducción de señales activada por *dpp*, el homólogo de TGF-beta en *Drosophila* también es esencial en el cerrado dorsal; mutaciones en *tkv* y *put* los cuales codifican a receptores de membrana de Dpp (Affolter y col., 1994), resultan con fenotipos similares, y cuando se expresa *tkv* activo se rescata parcialmente el fenotipo mutante de genes de la vía JNK.

Esto ha llevado a concluir que la activación de Jun por JNK en las células del *leading-edge* del epitelio lateral durante el cerrado dorsal regula a *dpp*, a través de



una activación transcripcional directa del gen *dpp* por *Djun* y *Dfos* (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997).

Para activar la transcripción de genes blanco, Jun y Fos se unen a promotores específicos o elementos *enhancer*. Para esta interacción proteína-DNA, Jun y Fos pueden dimerizarse a través del dominio zipper de leucina, resultando un heterodímero que consiste de una molécula de Jun y otra molécula de Fos, o un heterodímero formado entre Jun y otra proteína zipper leucina. Jun y Fos pueden formar también homo-dímeros. El dominio zipper de leucina contiene cadenas de 35 aminoácidos en las cuales la leucina (Leu) se encuentra repetida en intervalos de 7 aminoácidos. Estas regiones de la proteína forma hélices anfifílicas, con Leu dentro de una cara.

Estas proteínas pueden formar un dímero, estabilizado por el enlace de estas hélices anfifílicas de una a otra, formando una espiral. Por lo tanto el zipper de leucina representa el dominio de enlace de la proteína.

El dominio que se une al DNA se encuentra en los primeros 30 aminoácidos a partir del N-terminal, los cuales son básicos y forman una alfa hélice cuando la proteína se enlaza al DNA. El dominio cierre de leucina une dos proteínas que enlazan DNA juntas, permitiendo a las bases de las hélices N-terminal interactuar con la mayor parte de DNA de una manera base-específica (ver Fig. 4) (Jakubowski, 2003). El heterodímero Jun-Fos es más estable que el homo-dímero Jun (Zeitlinger y col., 1997).

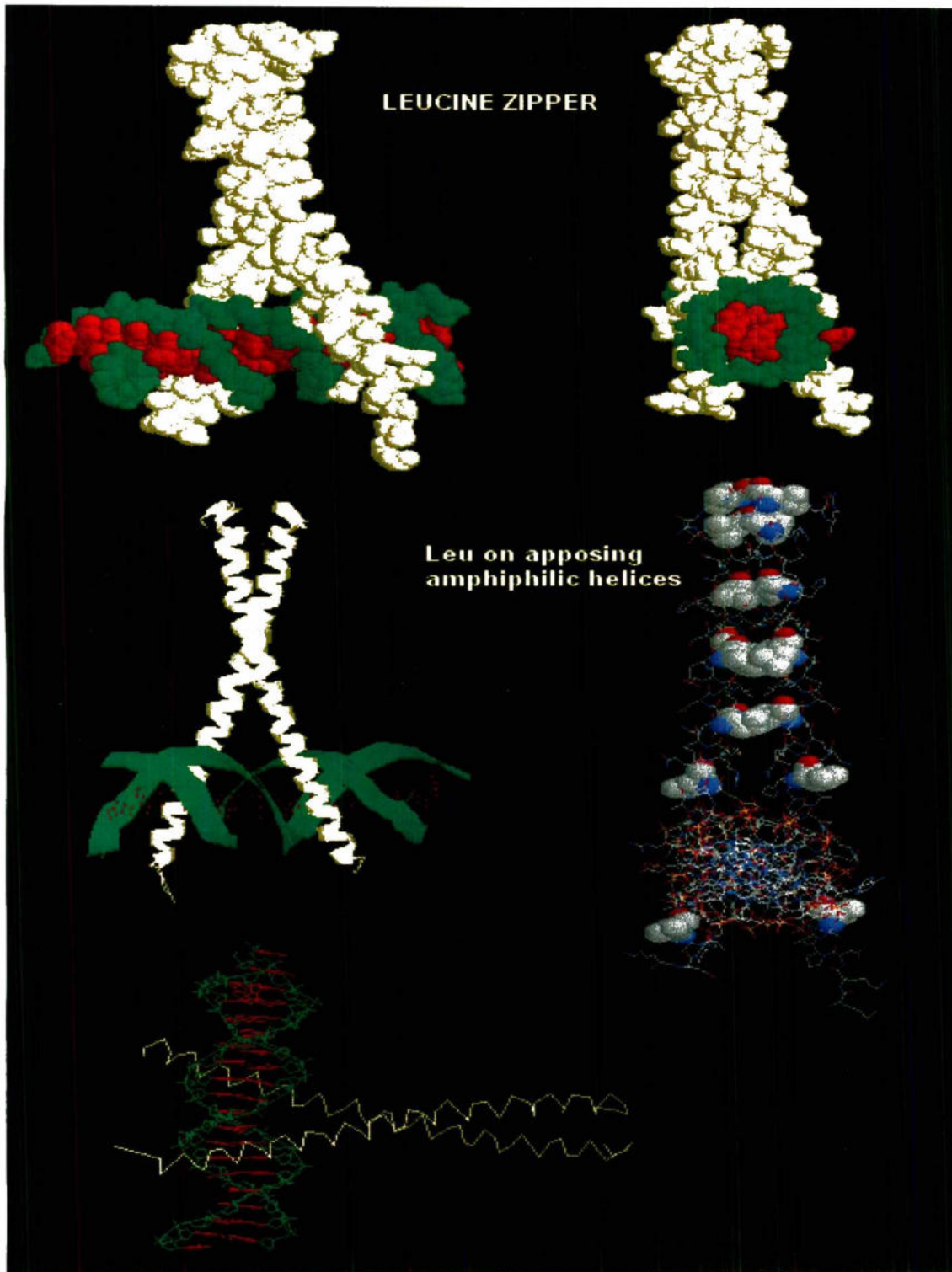


Figura 4. DOMINIO ZIPPER DE LEUCINA. Jun y Fos forman un hetero-dímero, unidos a través de los dominios zipper de leucina y la parte básica de las hélices se unen al DNA.



De los receptores con actividad enzimática intrínseca existen cinco clases conocidas: (1) el receptor guanilato ciclasa, (2) receptores tirosina cinasa, (3) receptores asociados a tirosina cinasa, (4) receptores tirosina fosfatasa, y (5) receptores serina/treonina cinasa (Alberts y *col.*, 2002). A continuación se define la función del receptor tirosina cinasa, ya que este se encuentra involucrado en la vía de tipo MAPK.

### **A. Receptores con actividad tirosina cinasa**

Algunos receptores hormonales y de factores de crecimiento se distinguen por tener una actividad enzimática intrínseca (actividad de tirosina cinasa o serina/treonina cinasa) y un dominio único que se extiende de lado a lado de la membrana. La actividad de tirosina cinasa proteica se encuentra en algunos receptores de factores de crecimiento, como los del factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), del factor estimulador de colonias (CSF-1) y del factor de crecimiento fibroblástico (FGF), así como del péptido factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF-1) (Mathews, 1998). Estos receptores se activan al unirse a su ligando y dimerizarse. La conformación de sus subunidades en forma dimérica pone en cercanía los dominios con actividad de tirosina cinasa, de manera que pueden fosforilarse de forma cruzada e iniciar la señalización intracelular (Alberts y *col.*, 2002; Gomperts y *col.*, 2003).

### **B. Ras y la vía MAPK**

La proteína Ras desempeña un papel central en una ruta conservada a lo largo de la evolución que dirige señales extracelulares hacia el núcleo, en donde se activan genes específicos de respuesta inmediata para el crecimiento, la división y la diferenciación celular.

Se han descubierto proteínas relacionadas con Ras en organismos tan diversos como las levaduras, los nemátodos y *Drosophila* que controlan aspectos del crecimiento y del desarrollo embrionario. La investigación realizada en estos organismos ha permitido aclarar una ruta de control central en las células de los



mamíferos, lo cual ha justificado ampliamente el empleo de modelos biológicos para la investigación.

Actualmente sabemos que muchos de los receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina cinasa se fosforilan a sí mismos de manera cruzada. En el estado fosforilado, cada receptor interacciona con una o más proteínas que se unen a sus sitios fosforilados, y entre ellas, a algunas que a su vez activan a Ras mediante la estimulación del intercambio de GDP por GTP. Unas proteínas denominadas GAP (Proteínas Activadoras de GTPasa), también interactúan con Ras y limitan su actividad. Después de la activación de Ras, hay una cascada secuencial de cinasas, que conlleva a fosforilaciones, hasta que finalmente se activan proteínas denominadas factores de transcripción. Estos factores estimulan la expresión de genes de respuesta.

Una familia importante de cinasas de esta cascada son las denominadas **MAP cinasas (MAPK)**. El acrónimo MAP corresponde a *mitogen-activated protein* (proteína activada por mitógenos). Por encima de las MAPK se encuentra otra familia de cinasas, las MAPKK y aún más arriba en esta cascada de cinasas activadas originalmente por Ras (o proteínas semejantes a Ras) se encuentran las MAPKKK y MAPKKKK (Mathews, 1998).

La vía de tipo MAPK es activada a través de un ligando que se une a su receptor de membrana de tipo tirosina cinasa, este receptor se dimeriza y se activa, después se unen proteínas adaptadoras para unir a una proteína tipo Ras que intercambia GDP por GTP, cuando esta proteína tiene unido GTP se activa y activa a la MAPKKKK, se da una serie de fosforilaciones en cascada de MAPKKKK, luego a MAPKKK, esta a su vez a MAPKK, y finalmente se fosforila MAPK que se trasloca al núcleo y regula por fosforilación a factores de transcripción que inducirán la expresión de genes de respuesta inmediata (ver figura 3) (Gomperts y col., 2003; Harden, 2002).

#### IV. MUTANTES CON FENOTIPO DE APERTURA DORSAL

El cerrado dorsal es interrumpido en un número de mutantes de *Drosophila*. Algunas de estas mutaciones afectan componentes de la transducción de señales JNK, tales como *slipper* que pertenece a la familia de las MLK (JNKKK) (Stronach y Perrimon, 2002), *hemipterous (hep)* y *basket (bsk)*, los cuales codifican para una cinasa JNK de *Drosophila* (JNKK) y a JNK respectivamente, ya que se bloquea el cambio de forma celular y por lo tanto no se lleva a cabo el proceso de cerrado dorsal (Riesgo-Escovar *et al.*, 1996). Mutantes en *cka* (conector de cinasa a AP-1), un gen que codifica una proteína que forma un complejo con Hep, Bsk, DJun y DFos, actuando como un organizador (Chen y *col.*, 2002), y los alelos nulos del gen *Jun* de *Drosophila* (*Djun*) también son letales embrionarios y causan defectos similares en el cerrado dorsal (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997).

El fenotipo resultante de todas estas mutaciones es marcado por la ausencia de la elongación de las células en la epidermis lateral, lo que concuerda con la pérdida de expresión de *dpp* en las células del *leading-edge* (Zeitlinger y *col.*, 1997).

##### A. *Dfos*

El homólogo del proto-oncogen *fos* en *Drosophila melanogaster* es *Dfos*. Es el único homólogo de *fos* en el genoma de *Drosophila* (Rousseau, 2001). El locus de *kayak (kay)* esta mapeado en la posición 99B9-99B10, que es el locus del gen *Dfos*. Dos alelos están descritos en la literatura, *kay*<sup>1</sup> y *kay*<sup>2</sup>, el primero es un alelo nulo y el segundo es un alelo hipomorfo. *kay*<sup>1</sup> tiene una mutación a partir de la posición 1045. Los embriones homocigotos mutantes presentan deficiencia en el cerrado dorsal, y en estos embriones, cuando se expresa *Dfos* ectopicamente a partir de un transgen en el ectodermo, este revierte el fenotipo mutante.

También estos mutantes rescatados cuando llegan a adultos tienen un fenotipo de apertura torácica que es parecido a los que tienen un alelo hipomórfico de *hep*, lo cual implica que *hep* y *kay* se necesitan en el desarrollo del epitelio imaginal de la pupa (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997).



La expresión de *Dfos* en el epitelio lateral esta regulado por *dpp*, ya que la expresión de *Dfos* esta reducido en las mutantes de *tkv* (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997). La expresión de *Dfos* es extensa con variaciones en el nivel de expresión en la embriogénesis (ver figura 5).

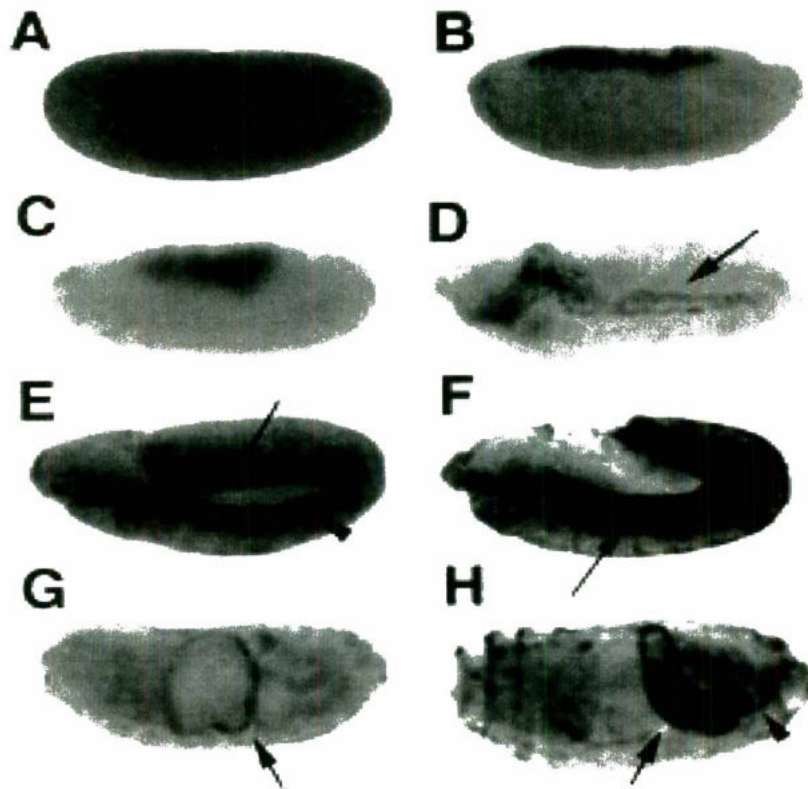


Figura 5. EXPRESIÓN DE *Dfos* EN EMBRIONES SILVESTRES. Se muestran embriones de tipo silvestre para la técnica de hibridación *in situ*, en diferentes etapas de la embriogénesis. Los embriones están colocados con la parte cefálica hacia la izquierda, de A-F, H con la parte dorsal hacia arriba y G con la parte dorsal hacia el frente. A. Contribución materna. B. Expresión en las células más dorsales. C. Expresión en las células *anlagen* de amnioserosa y epitelio lateral. D. Expresión en las células de la amnioserosa. E. Expresión en las células del epitelio lateral y principalmente en las células de *leading edge*. F. Etapa más avanzada con un patrón parecido al de (E). G. Tinción en una porción del endodermo, en la parte anterior del intestino medio. H. Tinción en el intestino trasero (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997).

La proteína *Dfos* se expresa en niveles altos en la amnioserosa en el cerrado dorsal y la epidermis lateral, al inicio del cerrado dorsal *Dfos* se eleva en el núcleo de las células de *leading edge* ya que estas inician el alargado y también en las



células más ventrales. Después, la expresión se extiende lateralmente, hasta que se unen los bordes para dar fin al cerrado dorsal (Zeitlinger y col., 1997).

### **B. *amigo de fos***

En el laboratorio se caracterizó una mutante nueva de cerrado dorsal, *amigo de fos* (*amfos*). El nombre *amfos* proviene del hecho, de que mutaciones en este gen presentan el fenómeno de no complementación no alélica (ver Figura 6), o letalidad sintética con alelos del gen *Dfos*, el homólogo del factor de transcripción Fos en *Drosophila*. El gen *amfos* codifica para una proteína pionera con un dominio (aproximadamente de 200 aminoácidos) conservado. Este dominio conservado tiene homología con proteínas predichas de humanos, ratones y levaduras, por lo que es posible que proteínas con funciones semejantes existan en otros organismos. Sin embargo, se desconoce la función de este dominio y de la proteína. Se han caracterizado varios alelos de este gen, y todos ellos son homocigotos letales: cinco de ellos son letales en la etapa embrionaria, y uno de ellos es letal en el segundo estadio larvario. Los alelos más extremos tienen fenotipos de apertura dorsal (ver más abajo). Estos fenotipos son, para algunos alelos, prácticamente unas fenocopias perfectas de los fenotipos mutantes de alelos de *Dfos*. Alelos mutantes de *Dfos* presentan fenotipos embrionarios letales de apertura dorsal, como lo presentan alelos mutantes de todos los genes conocidos de la vía de la cinasa de Jun en *Drosophila*. Lo anterior sugiere que este nuevo gen, *amfos*, es un gen que participa en la vía de la cinasa de Jun, posiblemente regulando y/o interaccionando con *Dfos* (Riesgo-Escovar, datos no publicados).

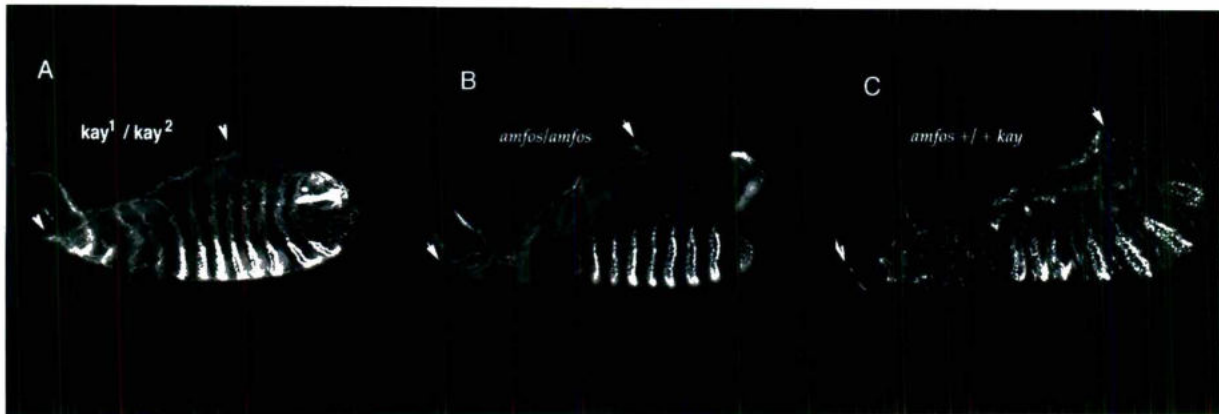


Figura 6. INTERACCIÓN GENÉTICA ENTRE *Dfos* Y *amfos*. En esta figura se muestran las cutículas de los embriones mutantes vistas por microscopía de campo oscuro: A. Embrión con combinación heteroalélica para los alelos mutantes de *Dfos* ( $kay^1$  es un alelo con actividad nula,  $kay^2$  es un alelo con actividad hipomórfica de *Dfos*). B. Embrión homocigoto para el gen *amfos*. C. Embrión doble heterocigoto para los genes *Dfos* y *amfos*. Las puntas de flecha señalan los límites de la apertura dorsal.

Hemos expresado en un sistema heterólogo un péptido derivado de la secuencia del cDNA de *amfos* y a partir del mismo hemos generado anticuerpos policlonales en conejo. Estos anticuerpos reconocen una sola banda en homogenados de *Drosophila* (ver el análisis de Western blot), y esta banda tiene un peso molecular consistente con el peso predicho para el producto proteico del cDNA de *amfos*. Utilizamos este anticuerpo para caracterizar la expresión de la proteína durante el desarrollo embrionario. También hemos generado sondas de RNA antisentido marcadas con digoxigenina a partir del cDNA de *amfos* para poder realizar experimentos de hibridación *in situ* (de igual forma el análisis de Northern blot muestra una sola banda que es reconocida por la sonda; ver Figura 7).



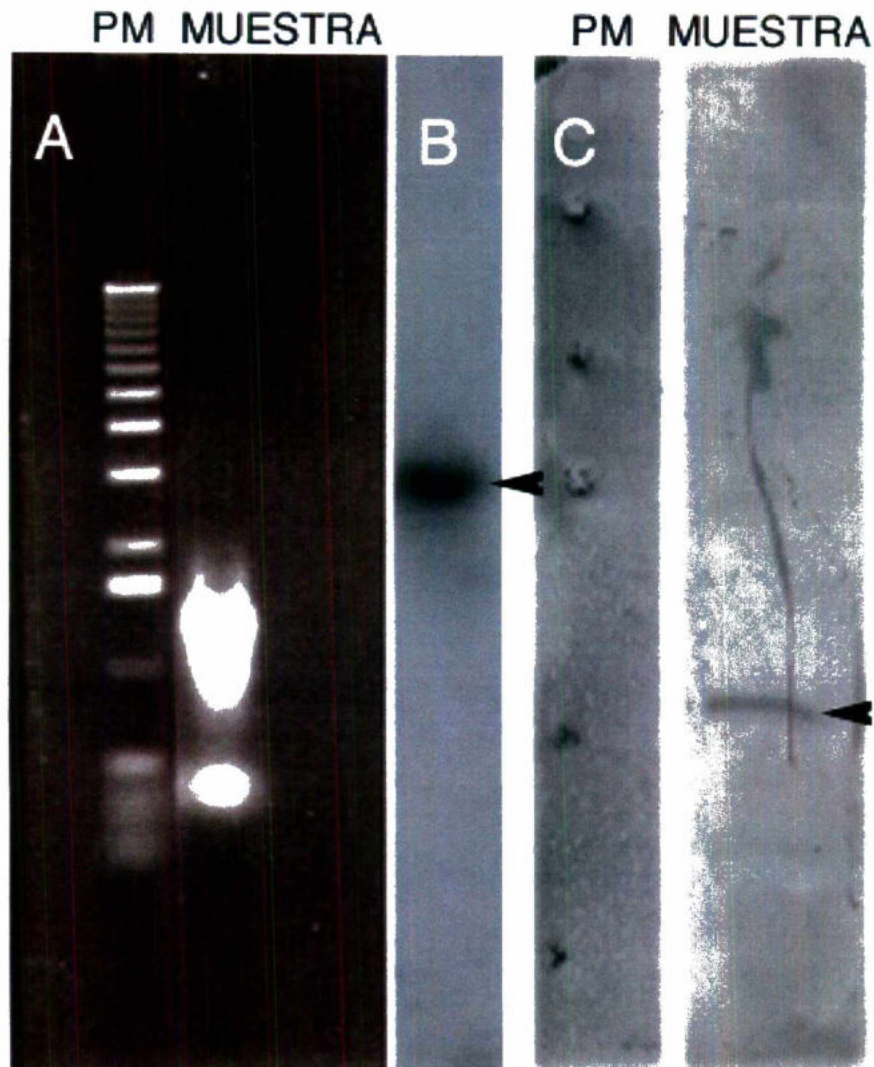


Figura 7. WESTERN BLOT Y NORTHERN BLOT. A. Muestra la electroforesis del RNA extraído de un homogenado de *Drosophila*. B. La punta de flecha muestra una sola banda para la sonda en el análisis de Northern blot. C. La punta de flecha muestra una sola banda que es reconocida por el anticuerpo anti-amfos para el análisis de Western blot. Los pesos moleculares a la izquierda son de arriba abajo, 177, 113, 81, 60 y 47 kD.



## HIPÓTESIS

Los embriones de *Drosophila melanogaster* expresan el transcrito y la proteína codificante del gen *amfos*, que participa en la vía JNK en un patrón consistente con su función durante el cerrado dorsal.

## OBJETIVOS

### GENERAL

Observar la expresión del transcrito y de la proteína codificante del gen *amfos* en embriones de *Drosophila melanogaster*.

### ESPECÍFICOS

- Describir el patrón de expresión del gen *amfos* durante la embriogénesis.
- Comparar la forma de tinción de la proteína por los diferentes métodos de fijación.
- De acuerdo al patrón de tinción inferir la localización de esta proteína.
- Comparar los datos de inmunohistoquímica con los de hibridación *in situ*.

## METODOLOGÍA

### MATERIALES

Tubos eppendorff (viales de 0.5 y 1.5 ml)

Vaso de precipitados de 150 ml

Malla con poro pequeño para que no se pasen los embriones

Cajas petri

3 Vasos de precipitado de plástico de 100 ml (1 perforado en la base)

Pizeta

Pincel de pelo de camello

Pipetas automáticas con puntas estériles de 1000, 100 y 10  $\mu$ l.

Papel absorbente

Portaobjetos

Cubreobjetos

Microscopio estereoscópico

Microscopio de campo claro

Baño María

Agitador de rotación (invierte los tubos girando 360° )

### MÉTODOS

#### OBTENCIÓN DE EMBRIONES (Puestas)

En un vaso de precipitado de plástico, con orificios pequeños en la base, se colocaron algunas moscas de la línea silvestre *yellow white* (*yw*) (hembras y machos), y se tapó con una caja Petri de tamaño igual al diámetro del vaso, la cual contenía una base de agarosa y jugo de uva, de forma sólida y en la superficie un poco de levadura en polvo.



Después se invirtió el vaso y se pusieron en un medio ambiente adecuado para su desarrollo (Temperatura = 25° C, Humedad = 50%).

#### RECOLECCIÓN DE EMBRIONES

Después de 24 horas de la puesta, se cambio la caja petri por una limpia, con un poco de levadura en polvo, y a la caja que contiene los embriones se le agregó agua destilada. Con un pincel de pelo de camello se despegaron los embriones, después se filtraron con una malla de poro adecuado para retener los embriones. Los embriones se enjuagaron varias veces hasta que la levadura quedo disuelta. Los embriones recolectados se pasaron a una solución 1:1 de hipoclorito de sodio con agua destilada, hasta que se descorionaron (se observan con ayuda del microscopio estereoscópico). Se sacó la malla de la solución y se enjuagaron los embriones con agua destilada, se quitó el exceso de agua, se transfirieron los embriones a un vial de 1.5 ml con 750  $\mu$ l de heptano con la ayuda del pincel remojado en heptano (las larvas que contenga el filtrado quedan atrapadas en el pincel).

#### INMUNOHISTOQUÍMICA

Los embriones se fijaron por tres métodos diferentes: con formaldehido, con acetona, o con glutaraldehido.

#### FIJACIÓN CON FORMALDEHIDO

Se agregaron 675  $\mu$ l de formaldehido al 37% y 75  $\mu$ l de EGTA 0.5 M pH 7 para fijar los embriones y se agitaron suavemente durante 5 min.

Posteriormente se dejaron sedimentar y se extrajo la fase inferior (orgánica) sin llevarse los embriones que están contenidos en la interfase. Después se adicionaron 750  $\mu$ l de MeOH al 100% y se agitó vigorosamente por 2 min. para eliminar las membranas vitelinas. Se dejaron sedimentar y se extrajo la mezcla

líquida (una forma de ver si ha sido removida la membrana adecuadamente es observando que los embriones se sedimentan en el fondo del tubo).

Se adicionó 1ml de MeOH al 100%, y se dejaron sedimentar los embriones, después se rehidrataron con soluciones consecutivas de MeOH al 70% con PBST y MeOH al 50% con PBST hasta llegar a una solución de PBST (PBS 1X con 0.3% de tritón).

#### FIJACIÓN CON ACETONA

Se agregaron 675  $\mu$ l de etanol al 70% y 75  $\mu$ l de EGTA 0.5 M pH 7 durante 5 minutos a los embriones colectados como está descrito arriba. Después se extrajo la mezcla y se lavaron 2 veces con etanol al 70 %, y luego se agregó etanol al 100%. Se decantó el sobrenadante y se pasaron por acetona al 100% para fijar los embriones a  $-20^{\circ}$  C durante 20 min.

Se pasaron por etanol al 100% y se hidratan con una solución de etanol al 50 % con PBS, y luego en PBST.

#### FIJACIÓN CON GLUTARALDEHIDO

A los embriones tratados como está descrito arriba contenidos en 750  $\mu$ l de heptano se les agregaron 750  $\mu$ l de glutaraldehido al 2.5% en PBS y 75  $\mu$ l de EGTA 0.5 M pH 7 para fijarlos y se agitaron suavemente durante 7 min.

Posteriormente se dejó reposar el tubo y se extrajeron las dos fases sin llevarse los embriones que están contenidos en la interfase. Después se lavaron dos veces con heptano al 100%, se eliminó el líquido y se adicionaron 750  $\mu$ l de MeOH al 100% con 750  $\mu$ l de heptano al 100% y se agitó vigorosamente por 2 minutos para eliminar las membranas vitelinas. Se dejaron sedimentar y se extrajo la mezcla líquida (de nuevo, una forma de ver si ha sido removida la membrana adecuadamente es observando que los embriones se sedimenten en el fondo del tubo).



Se adicionó 1ml de MeOH al 100%, y se dejaron sedimentar los embriones, después se rehidrataron con soluciones consecutivas de MeOH al 70% en PBST y MeOH al 50% en PBST hasta llegar a una solución de PBST.

#### BLOQUEO Y MARCAJE

Después de fijar los embriones se lavaron dos veces con PBST, se extrajo el líquido y se bloquearon con una solución de PBST y suero bovino fetal al 25%, agitando suavemente por rotación durante 1 hr a temperatura ambiente.

Se extrajo el sobrenadante y usando una pipeta automática, con el extremo distal cortada (para no dañar los embriones) se transfirieron los embriones a tres viales de 0.5 ml, cada uno marcado respectivamente como control (C), primario (1°) y secundario (2°). Se adicionó una mezcla de incubación: (500 µl) PBST y suero bovino fetal al 5%, con el anticuerpo correspondiente: al tubo marcado como C no se agregó anticuerpo, al tubo marcado como 1° se le agregó el anticuerpo anti-amfos, y al tubo marcado como 2° se le agregó el conjugado anti-conejo acoplado a la enzima fosfatasa alcalina, para preabsorber este segundo anticuerpo y evitar marcaje inespecífico (las diluciones de los anticuerpos en los tubos son las siguientes: 1° 1:100 y 2° 1:500). Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hr agitando por rotación, o alternativamente, toda la noche a 4° C.

Los tubos C y 1° se lavaron con la solución de incubación 4 veces con rotación durante 5 minutos cada vez a temperatura ambiente. Después se adicionaron 250 µl de solución de incubación y 250 µl del sobrenadante del tubo 2° (que contiene el anticuerpo 2° pre-absorbido 1:500 para llegar a una concentración final de 1:1000). Se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora agitando por rotación. Después se lavaron con la solución de incubación 4 veces con rotación durante 5 minutos cada vez a temperatura ambiente.

Se efectuó entonces un lavado con buffer de revelado por 5 minutos que contiene NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM y Tris-HCl pH 9.5 100 mM.



Se eliminó esta solución y se añadieron 500  $\mu$ l del mismo buffer de revelado con substrato NBT-BCIP (20  $\mu$ l de NBT-BCIP por cada ml de buffer de revelado) y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad. En este paso la enzima acoplada al segundo anticuerpo, que se ha unido al anticuerpo anti-amfos y este a su vez a la proteína *amfos*, degradará el sustrato, dando un producto de color azul, que reportará la presencia y el sitio donde se encuentra esta proteína.

Se monitoreó la reacción bajo el microscopio y se detuvo eliminando la solución de revelado y lavando con PBS. Se montaron entonces los embriones en laminillas, eliminando el exceso de agua y secando parcialmente con papel absorbente, para después agregar medio de montaje (PolyMount) y cubrir con un cubreobjetos. Las laminillas se observaron y fotografiaron en el microscopio óptico.

#### HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Se colectaron los embriones, se decorionaron y se fijaron como se describe para las técnicas de inmunohistoquímica (con formaldehído). Cuando los embriones ya se encuentran en metanol, se pueden guardar a  $-20^{\circ}$  C.

Para aclararlos, se dejaron a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con etanol. Después se pusieron en una mezcla etanol / xileno 1:1, y finalmente se cambiaron a xileno, con agitación suave por rotación durante 1 hora y media. Después se pasaron nuevamente por una mezcla etanol / xileno 1:1, y se lavaron tres veces con etanol. Se lavaron una o dos veces con metanol (se pueden guardar a  $-20^{\circ}$  C si no se usan de inmediato). Se pasaron los embriones entonces a un vial de 0.5 ml con una punta recortada. Se incubaron con agitación por 5 minutos en una mezcla de metanol y solución de fijación (PBT y 5% de formaldehído al 37% ). Después se incubaron en solución de fijación durante 25 minutos, con agitación, y luego se lavaron tres veces con PBT (PBS y 0.3% de Tween). Se incubaron entonces entre dos o tres minutos con proteinasa K (para permitir que penetre más fácilmente la sonda). Se detuvo la reacción lavando dos

o tres veces con PBT. Se volvieron a fijar con solución de fijación por 25 minutos con agitación. Se lavaron entonces tres veces por 2 minutos con PBT fresco. Se agitaron 10 minutos en solución de hibridación y PBT 1:1 (la solución de hibridación contiene: formamida al 50%, SSC 5X, esperma de salmón sonicado, y 0.1% de tween 20). Se pre-hibridaron por una hora en solución de hibridación a 55° C. Se desnaturalizó la sonda (RNA antisentido con digoxigenina acoplada) en solución de hibridación por 5 a 10 minutos a 80° C y se puso la sonda inmediatamente en hielo. Se removió la solución de prehibridación y adicionó la sonda desnaturalizada. Se hibridó toda la noche a 55° C. Al día siguiente se diluyó el anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina 1:200 en PBT y se incubó el anticuerpo con rotación a temperatura ambiente con embriones fijados para preabsorber el anticuerpo.

Se removió la solución de hibridación de los embriones incubados con la sonda (se puede reusar). Después se lavaron dos veces con solución de hibridación fresca, una vez con 1 ml de solución de hibridación / PBT 4:1, otra con solución de hibridación / PBT 3:2, una más con solución de hibridación / PBT 2:3, una vez con solución de hibridación / PBT 1:4 y finalmente dos más con PBT (todos estos lavados son por 15 minutos cada uno a 60° C).

Se incubaron los embriones por una hora con 45 minutos con el anticuerpo preabsorbido en dilución 1:2000 en PBT (esta parte y lo siguiente a temperatura ambiente). Se lavaron tres o cuatro veces por 15 minutos cada uno en PBT fresco. Se lavan dos veces por 5 minutos cada una en solución de revelado recién hecha (NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, TRIS-HCl 100 mM pH 9.5). Se removió la solución de los lavados y adicionó solución de revelado con el sustrato NBT-BCIP e incubó en la oscuridad. Se monitoreó la reacción, se detuvo lavando con PBT y se montaron los embriones. Se observaron al microscopio y tomaron las fotografías.



## RESULTADOS

Los resultados se basan principalmente en las imágenes obtenidas por microscopia de luz de acuerdo a la naturaleza de los experimentos. Cabe mencionar que los resultados que se presentan son representativos de varias repeticiones.

Los resultados de la técnica inmunohistoquímica por el método de fijación con acetona no fueron óptimos y por tal razón no se muestran las fotografías de la tinción.

### HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Para la hibridación *in situ* en los embriones en la etapa 6 se observa tinción en las células del *anlagen* del mesodermo que serán invaginadas durante la gastrulación, las células polares que son la línea germinal de *Drosophila melanogaster* y del surco cefálico (ver Figura 8-C1). Como se puede observar, la distribución del transcrito del gen *amfos* va cambiando conforme madura el embrión.



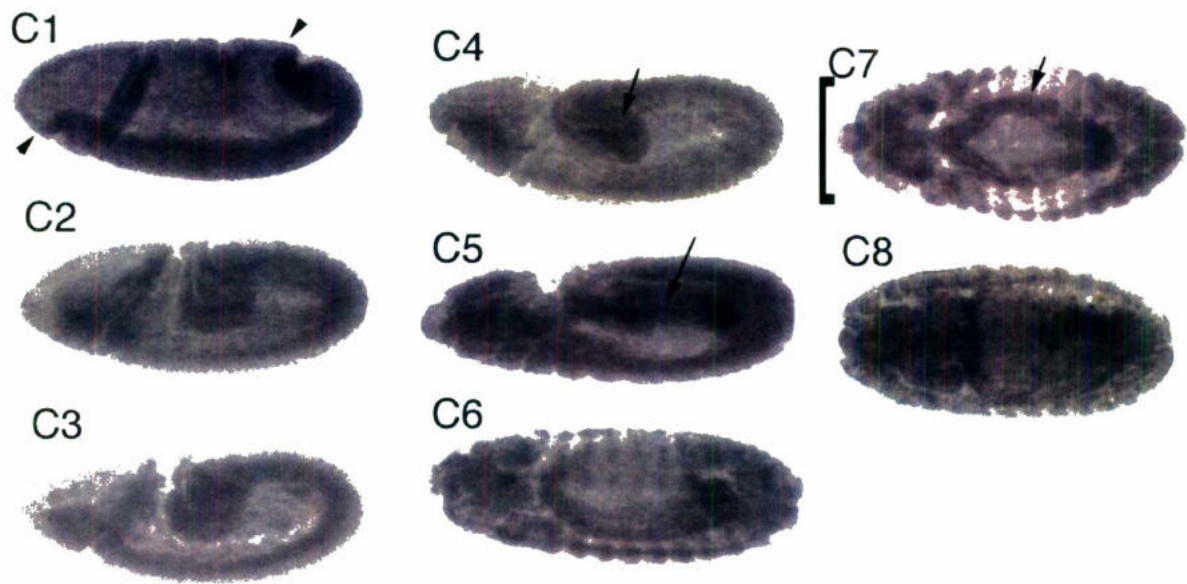


Figura 8. RESULTADOS DE LA HIBRIDACIÓN *IN SITU* . La expresión del mRNA de amfos es muy dinámica durante las diferentes etapas de la embriogénesis. Imágenes obtenidas por microscopia de luz, con objetivo de 20X. Los embriones están orientados con la parte cefálica hacia la izquierda. De C1 a C6 con la parte dorsal hacia arriba, C7 y C8 con la parte dorsal hacia el frente. En C1 el inicio y término de las puntas de flecha señalan las células que se invaginarán. En la figura C7 el corchete señala la parte cefálica en la cual se alcanza a distinguir los dos lóbulos del cerebro del embrión y la flecha señala las células del anlagen cardiaco.

Durante la extensión de la banda germinal se observa tinción en las células del mesodermo que han sido invaginadas, en la parte cefálica y en las células de la amnioserosa (ver Figura 8-C2,C3,C4). Aunque parece que la tinción sólo fue de las células del mesodermo y endodermo, a mayor aumento se pueden observar las células de la amnioserosa (ver figura 9). Después, la tinción en la amnioserosa, en la etapa 11 desaparece y también en esta etapa la tinción es más general en las células del ectodermo y en las células de leading edge como se observa en la Figura 8-C5. La flecha señala las células del borde interno que muestran una mayor tinción, estas células son aquellas que se encuentran en el extremo del epitelio lateral que se unen a la amnioserosa y sufren principalmente el cambio de forma en el proceso de cerrado dorsal.



Figura 9. CÉLULAS DE LA AMNIOSEROSA DE HIBRIDACIÓN *IN SITU*. Embrión en una vista lateral y la parte cefálica a la izquierda en donde se muestran las células de la amnioserosa señaladas con una flecha, y la parte mas oscura son las células del mesodermo y endodermo que han sido invaginadas. Acercamiento a 40X.

En las células epiteliales el patrón se resuelve en un patrón de tipo segmentado al final de la retracción de la banda germinal y al inicio del cerrado dorsal (ver figuras 8-C6, C7 y C8). Al inicio del cerrado dorsal también se observa tinción, en las células del *anlagen* cardiaco y las células que darán origen posteriormente al cerebro de la larva en etapas 13 y 14 de desarrollo, (ver Figuras 8-C6 y C7). A mayor aumento se pueden diferenciar estas células del *anlagen* cardiaco de las células de *leading edge*, que en un principio podrían confundirse (ver figura 10).



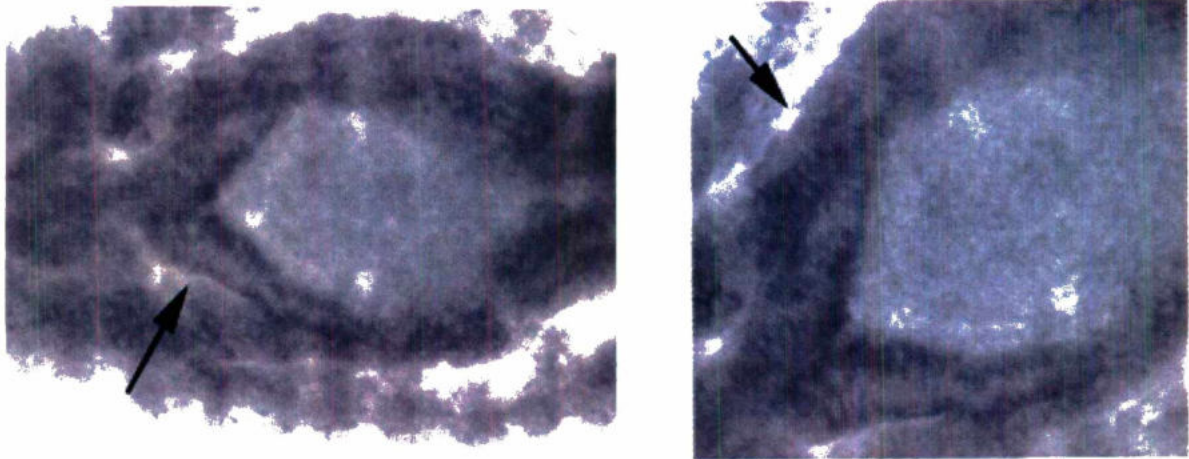


Figura 10. CÉLULAS DEL ANLAGEN CARDIACO. Los embriones están orientados con la parte cefálica hacia la derecha y en una vista dorsal, las flechas señalan las células que darán origen a las células cardíacas. Aumento a 40X

En embriones de la etapa 15 presentan tinción en las células del endodermo, en la parte anterior del intestino medio (ver figura 8-C8).

## INMUNOHISTOQUÍMICA

La distribución de la proteína en los diferentes estadios embrionarios es diferente (ver figura 11). Los embriones que se fijaron con formaldehído en etapas tempranas durante la formación del blastodermo celular muestran una distribución periférica de la proteína en el embrión (Figura 11-F1).



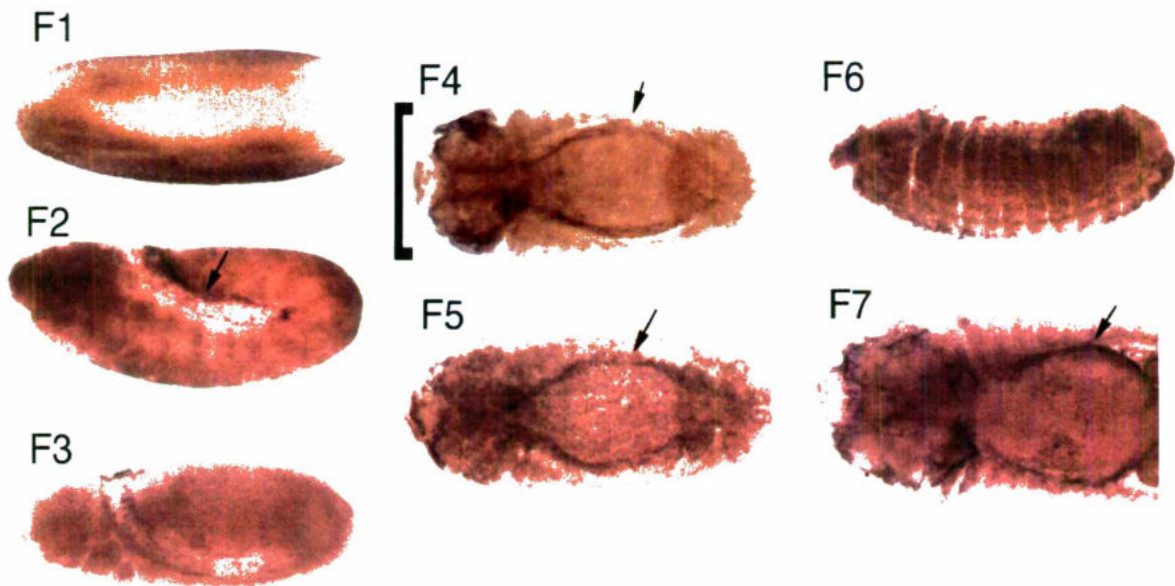


Figura 11. INMUNOHISTOQUÍMICA EN EMBRIONES FIJADOS CON FORMALDEHIDO. Los embriones nuevamente están orientados con la parte cefálica hacia la izquierda. F1, F2, F3 y F6 en una vista lateral con la parte dorsal hacia arriba. F4, F5 y F7 con la parte dorsal hacia en frente. La flecha en F2 señala las células de la amnioserosa, las cuales se distinguen de manera más clara que en la técnica de hibridación in situ. El corchete en F4 señala la tinción en los dos lóbulos del cerebro y las flechas en F4, F5 y F7 señalan las células del anlagen cardiaco.

La tinción de la proteína vista en estos embriones a mayor aumento parece ser que se distribuye de una manera citoplásmica, aunque esto no está muy claro con esta técnica, pero si se alcanza a observar que la tinción es como en halos y no puntual como se esperaría de una distribución nuclear (ver Figura 12).

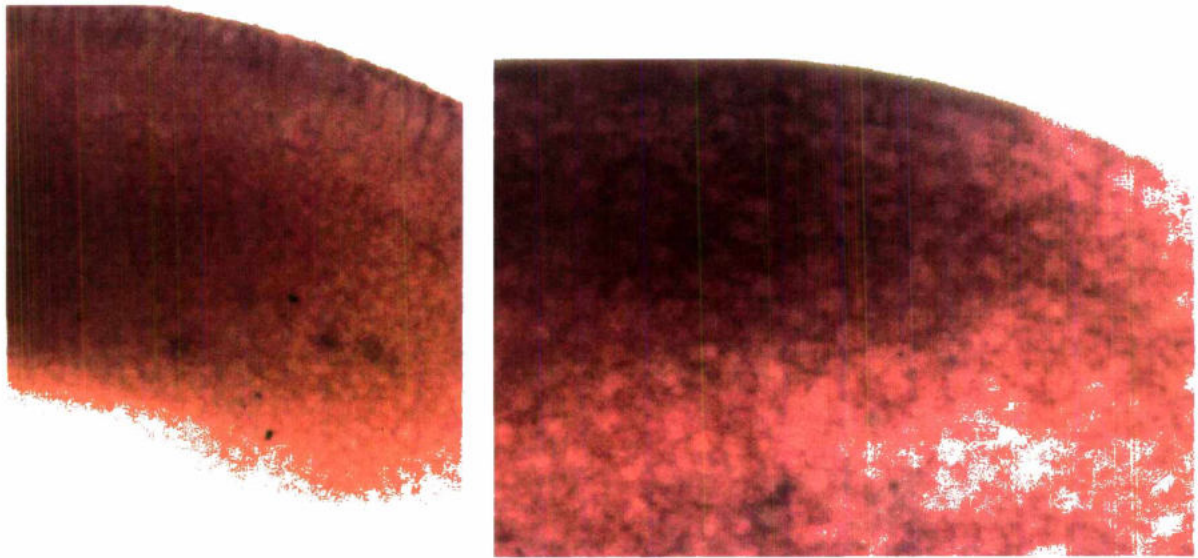


Figura 12. EMBRIONES TEMPRANOS. A diferencia de la tinción en las células de la amnioserosa en donde la tinción es puntual, aquí se observa que la distribución intracelular es citoplásmica. Embrión muy temprano con la parte cefálica hacia la derecha Aumento a 40X.

Durante la extensión de la banda germinal como en la técnica de hibridación *in situ* se observa tinción en las células de la amnioserosa, en la parte cefálica e incluso se alcanza a observar que las células que están en el borde, en donde se unen con la amnioserosa también se tiñen. (Figura 11-F2, F3). Vista a mayor aumento se puede distinguir más claramente que la tinción se presenta en las células de la amnioserosa, que son células con un mayor tamaño y con un núcleo grande (ver figura 13).



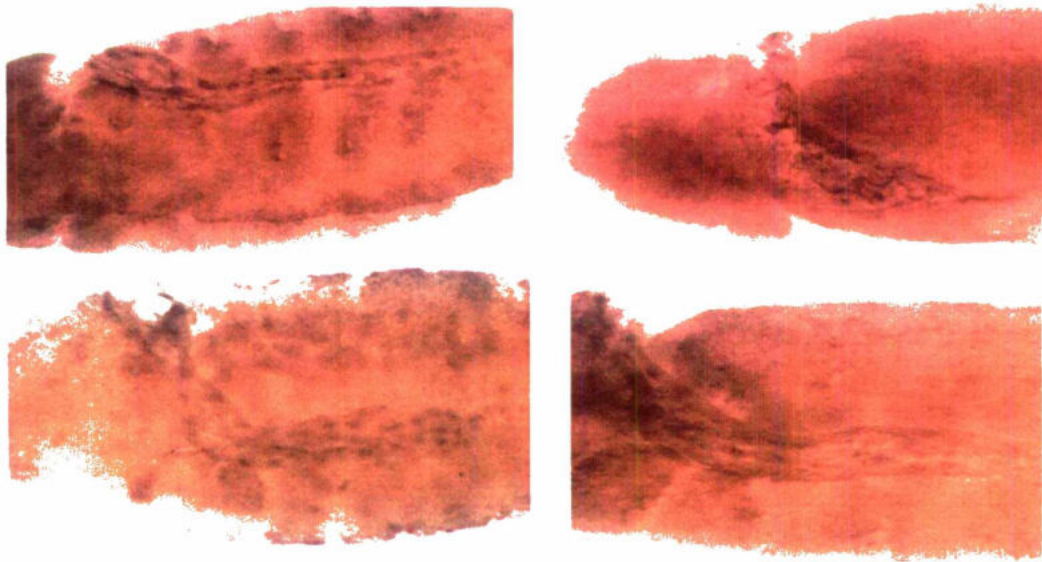


Figura 13. CÉLULAS DE LA AMNIOSEROSA. Los embriones están orientados con la parte cefálica hacia la izquierda y con la parte dorsal hacia arriba, la parte mas teñida indica la presencia de la proteína en las células de la amnioserosa. Aumentos a 20X.

Además en estas células de la amnioserosa se alcanza a observar que la distribución de la proteína es consistente con una distribución nuclear (ver Figura 14).

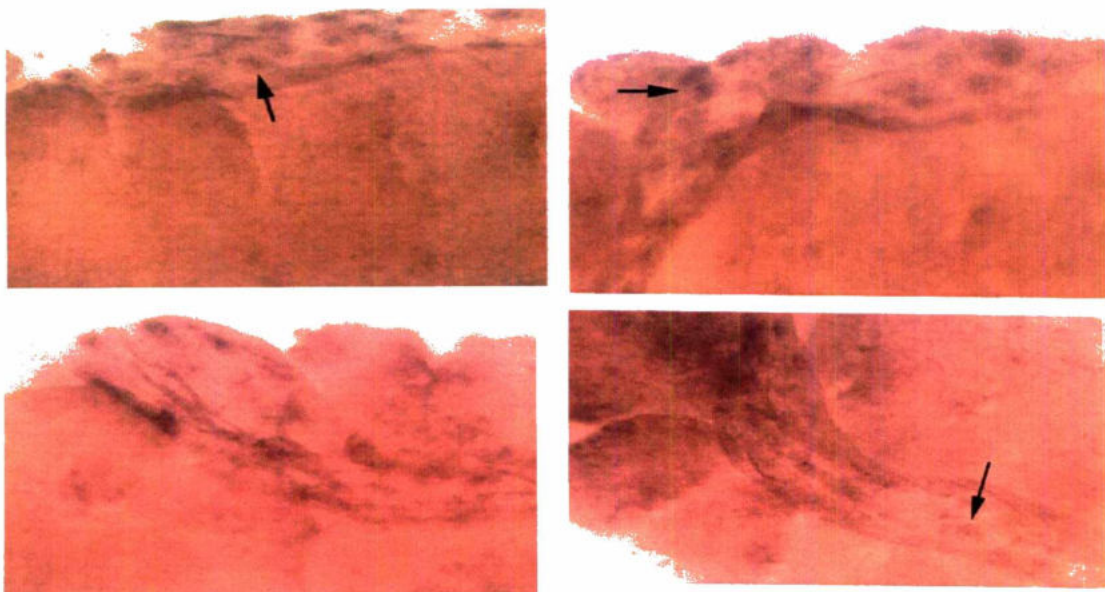


Figura 14. DISTRIBUCIÓN NUCLEAR. Las flechas señalan la distribución puntual de la tinción en las células de la amnioserosa. Aumentos de 40X.



Hay una tinción más evidente en las células del sistema nervioso central y del *anlagen* cardiaco para los embriones de la etapa 14 de desarrollo (ver Figura 11-F4, F5 y F7). La tinción en estas estructuras es muy clara vistas a mayor aumento, como se puede apreciar en la figura 15. En las células del epitelio lateral el patrón de expresión es en forma de segmentos (Figura 11-F6).

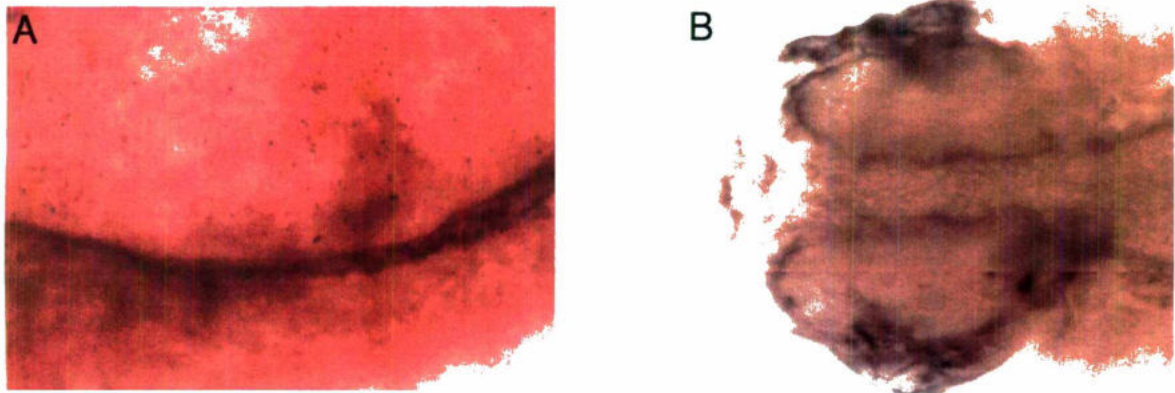


Figura 15. ANLAGEN CARDIACO Y SISTEMA NERVIOSO. A. Muestra un acercamiento del embrión en las células del *anlagen* cardiaco, para una vista media-dorsal. B. Es una foto compuesta de las imágenes tomadas con un objetivo de 40X, para las células de sistema nervioso, en una vista anterior-dorsal .

Los embriones fijados con glutaraldehído presentan los mismos patrones de tinción que los embriones fijados con formaldehído: para embriones tempranos la expresión periférica (Figura 16-G1), en la amnioserosa para embriones en la etapa de retracción de la banda germinal, *anlagen* cardiaco, sistema nervioso y células del epitelio lateral en el cerrado dorsal (Figura 16-G3, G4 y G5).

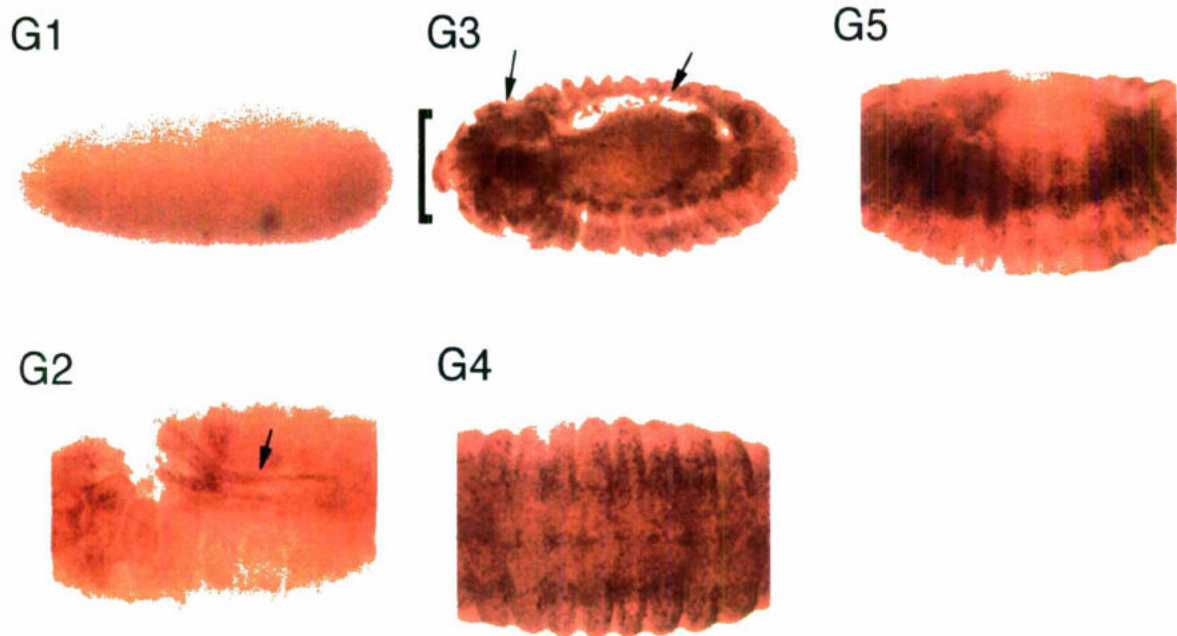


Figura16. INMUNOHISTOQUÍMICA EN EMBRIONES FIJADOS CON GLUTARALDEHIDO. Todos los embriones están colocados con la parte cefálica hacia la izquierda. A excepción de G4 que esta colocado en una vista ventral, y G3 en una vista dorsal los demás embriones están colocados con la parte dorsal hacia arriba. La flecha en G2 señala las células de la amnioserosa y en G3 las flechas señalan las células del cerebro y del *anlagen* cardiaco.

Parece que la tinción es más evidente en los embriones fijados con el formaldehído (ver Figura 17).

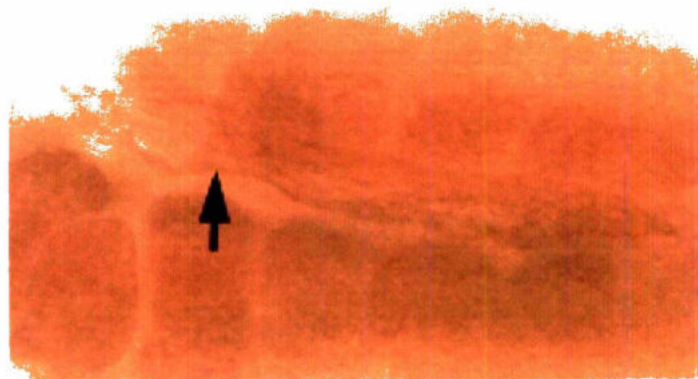


Figura 17. AMNIOSEROSA DE EMBRIÓN FIJADO CON GLUTARALDEHIDO. La flecha señala las células de la amnioserosa de un embrión fijado con glutaraldehido (imagen a 40X, de una vista anterior-dorsal).



Sin embargo, en estos embriones se alcanza a observar más claramente la distribución de tipo segmentada (ver figura 16-G3, G4 y G5) y se observa que la proteína se encuentra distribuida de una manera consistente con una distribución nuclear en las células del epitelio lateral (ver Figura 18).

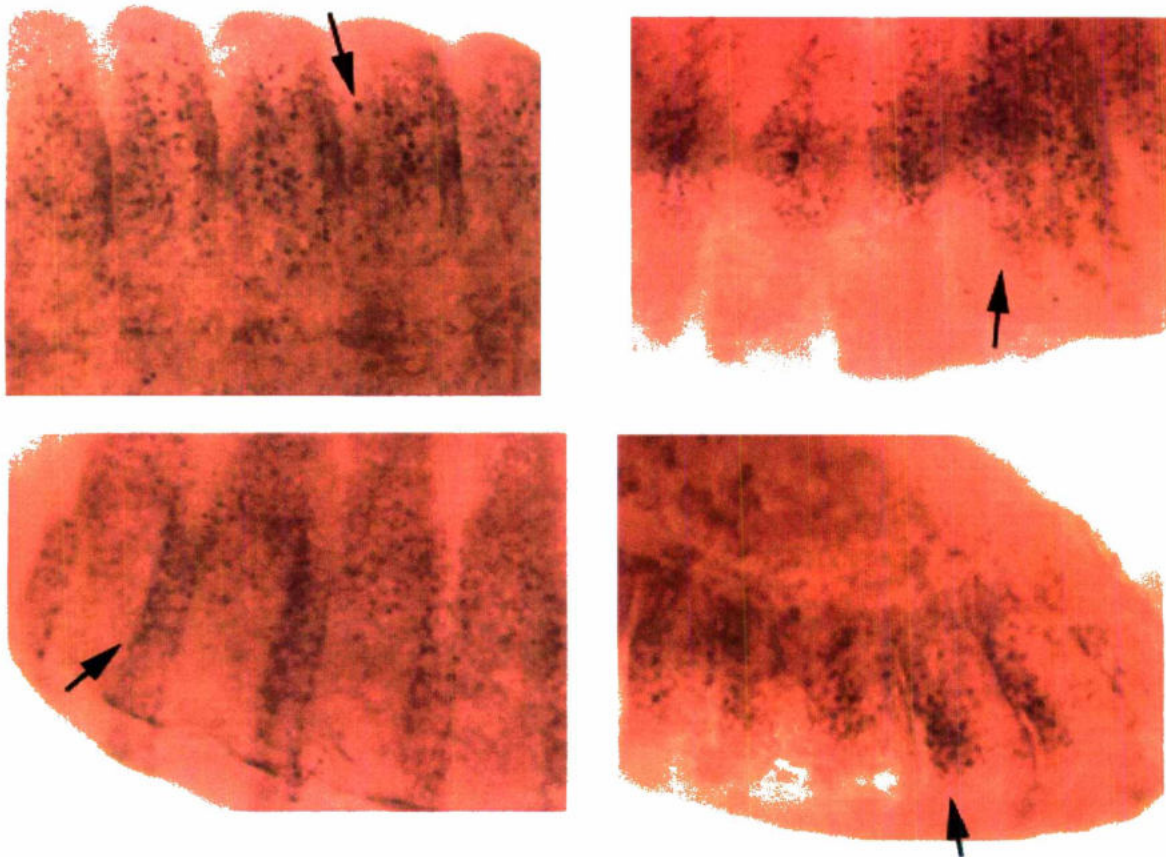


Figura 18. PATRÓN SEGMENTADO. Las flechas señalan la distribución segmentada de la proteína y el patrón de tinción puntual el cual sugiere que esta proteína se encuentra en el núcleo de la célula (las imágenes que se observan son de embriones orientados con la parte cefálica hacia la derecha). Aumento a 40X.



## DISCUSIÓN

### DISTRIBUCIÓN DEL TRANSCRITO

La distribución del transcrito del gen *amfos* es muy dinámica durante toda la embriogénesis. Partiendo desde etapas embrionarias muy tempranas; como es el inicio de la gastrulación, en las células del mesodermo y endodermo. Después durante la extensión de la banda germinal, ahora en las células de la amioserosa. Cuando se ha completado la extensión de la banda germinal, nuevamente la distribución cambia y la expresión se da en las células del ectodermo y también las células de *leading edge*. Durante todo el proceso de cerrado dorsal, etapa casi al final de la embriogénesis, este gen se expresa en las células del epitelio lateral con una distribución de tipo segmentada, en las células del cerebro, células cardíacas y del intestino medio anterior. Esto nos habla de la importancia y del papel que desempeña este gen en el desarrollo, de su participación y de cómo se va expresando en lugares clave respecto a su función, por ejemplo se expresa de inicio en las células que darán origen a estructuras derivadas del mesodermo y endodermo como son células cardíacas y el intestino medio anterior, lo cual se corrobora en etapas mas tardías casi al final de la embriogénesis, con la formación y expresión en estas estructuras. También se expresa en las células del ectodermo, las cuales darán origen posteriormente al cerebro y a las células del epitelio lateral, en donde se expresan durante el proceso de cerrado dorsal, sugiriendo su participación en el cambio de forma celular del epitelio lateral.

### DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA

La proteína al igual que el transcrito se distribuye según la expresión de este gen *amfos* en diferentes células durante toda la embriogénesis. El patrón de expresión para la proteína es consistente con el patrón de expresión del transcrito en todas las etapas, aún cuando las técnicas detectan dos cosas completamente diferentes (una técnica detecta la proteína y la otra técnica detecta el mRNA). Esto

quiere decir que efectivamente el lugar en donde se expresa el transcrito posteriormente expresará a la proteína.

También el patrón de expresión puntual en las células de la amnioserosa durante la extensión de la banda germinal y el epitelio lateral durante el cerrado dorsal nos hace pensar que la localización de esta proteína es nuclear, esto sugiere que su posible participación en una vía de transducción de señales se da río abajo de la cascada. No tenemos evidencias concretas de la localización intracelular de la proteína, pero en un futuro trabajo también sería conveniente hacer una doble tinción con algún anticuerpo nuclear y por microscopia de fluorescencia confocal, observar si hay co-localización, o incluso inmunotinción con microscopia electrónica de transmisión, para estar más seguros de la localización exacta de la proteína.

#### DIFERENCIAS EN LA TINCIÓN DEBIDO A LA FIJACIÓN

Una apropiada fijación, marcaje y detección puede hacer la diferencia enorme en la sensibilidad y claridad de los resultados (Roberts, 1998). Cuando se comparó la resolución de tinción de la inmunohistoquímica, se encontró que en los embriones fijados con formaldehído, la tinción es más clara que con glutaraldehído. Incluso los embriones que se fijaron con acetona ni siquiera presentaron tinción clara, y esto debido a que la membrana vitelina no se desprendió de estos embriones y por lo tanto ya que esta membrana es impermeable, no pudo penetrar el anticuerpo.

#### PARTICIPACIÓN DE *amfos* EN LA VÍA JNK

Se ha reportado la expresión de *Dfos* durante las diferentes etapas del desarrollo embrionario y este presenta, precisamente, tinción en las células de la amnioserosa para embriones tempranos y en las etapas 10-11. En embriones más tardíos desaparece la tinción, para después teñir células del epitelio lateral y mayoritariamente las células de "leading edge", cuando el cerrado dorsal ha sido completado las células del endodermo también expresan este gen. Mutaciones en el receptor de *dpp*, *tkv*, reducen la expresión de *Dfos* en las células del epitelio lateral durante la extensión de la banda germinal y mutaciones en *dpp* reducen la



expresión de *Dfos* en las células del endodermo. *amfos* también se expresa en este lugar. Esto nos hace pensar que *amfos* también podría estar regulado por *dpp* (Riesgo-Escovar y Hafén, 1997). Algunos de los patrones de expresión de *amfos* encontrados con la técnica de hibridación *in situ* en los embriones silvestres son parecido a los patrones de expresión de *Dfos*, aunque *amfos* también presenta tinción en la parte anterior debido a su expresión en la porción cefálica (ver figura 16). El gen *amfos* también se expresa en las células del epitelio lateral con un patrón de expresión segmentado durante el proceso de cerrado dorsal. Esto favorece la idea de que *Dfos* y *amfos* interactúan.

La proteína codificante del gen *amfos*, de manera diferente a la proteína *Dfos* no se expresa en las células de la amnioserosa durante el proceso del cerrado dorsal ni tampoco hay una mayor expresión en las células de leading edge (Zeitlinger y col., 1997). Sin embargo su patrón de expresión en las células del epitelio lateral sugiere que este gen participa en la vía de la cinasa de Jun, en el cambio de forma celular durante el proceso de cerrado dorsal, posiblemente regulado por la vía de Dpp, aunque no tenemos evidencias de esto, fuera del hecho de que Dpp actúa como molécula señalizadora para regular el cambio de forma celular en las células del epitelio lateral (Affolter y col., 1994).

Estos datos, los publicados y los de nuestro grupo de estos dos genes, muestran similitudes claras entre los genes; por ejemplo: el fenotipo mutante que estos dos genes presentan (apertura dorsal) y la interacción genética de no complementación no alélica, junto con el patrón de expresión, refuerzan la hipótesis de que interactúan en la función del cambio de forma celular, durante el proceso de cerrado dorsal y a través de la vía JNK.

También hay expresión diferente a *Dfos* tanto de transcrito como de proteína *Amfos* en la parte anterior del embrión en etapas muy tempranas, y en las células del anlagen cardiaco, y en el sistema nervioso central en embriones de etapas tardías, lo cual sugiere que esta involucrado en el desarrollo de estas estructuras, independientemente de la función de *Dfos*.



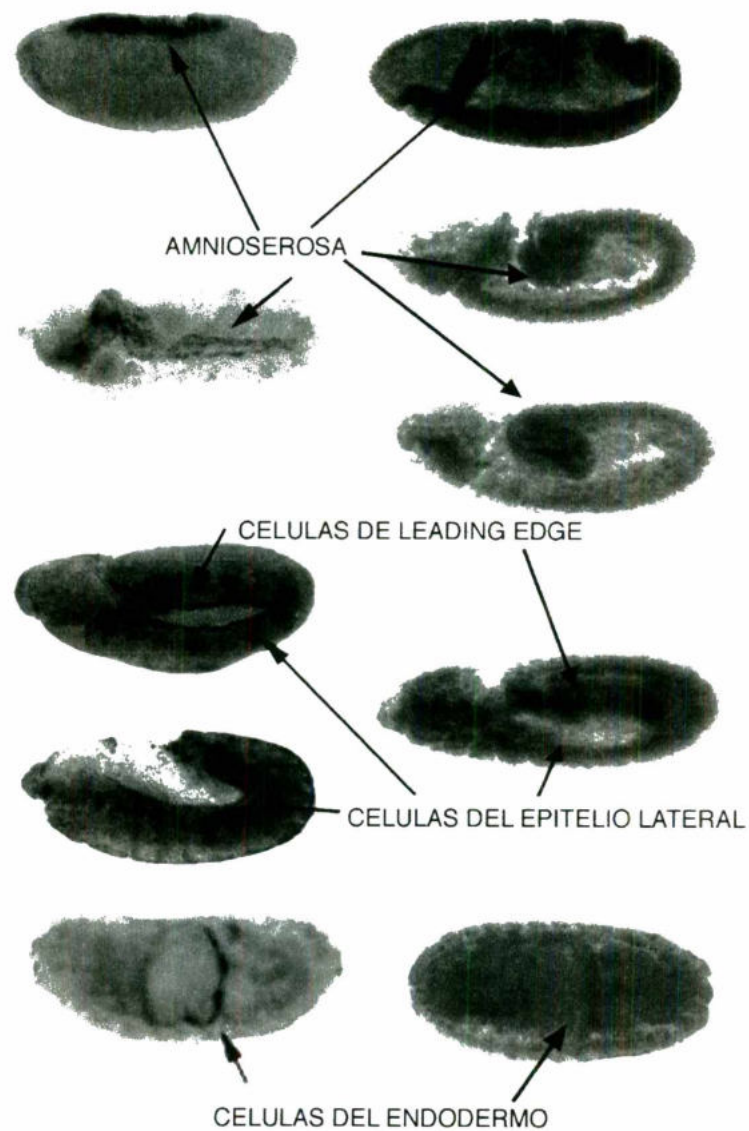


Figura 16. *Dfos* Y *amfos*. Imágenes de embriones teñidos por la técnica de hibridación *in situ*. Las imágenes de *Dfos* fueron tomadas de Riesgo-Escovar y Hafen, 1997 y arregladas para mostrar al lector la similitud con los patrones de expresión de *amfos* de las imágenes obtenidas en este trabajo. En los embriones de la columna izquierda se observa la expresión de *Dfos* y en los embriones de la columna derecha se observa la expresión de *amfos*.

Será conveniente examinar los fenotipos de estos tejidos en las mutantes en un trabajo posterior.

En resumen podemos afirmar que la expresión del transcrito y la proteína de *amfos* es consistente con su función en el cerrado dorsal y su interacción con *Dfos*. Además la débil expresión temprana es consistente con la falta de fenotipos tempranos en clones de línea germinal de un alelo mutante de *amfos* (Riesgo-Escovar, datos no publicados), y parte del patrón de expresión tardío sugiere su regulación por la vía de *dpp*, como ocurre con *Dfos*.

## CONCLUSIONES

*amfos* es un gen importante durante el desarrollo embrionario ya que se expresa y podría requerirse en diferentes etapas, desde la formación del blastodermo sincisial, pasando por la gastrulación, extensión y retracción de la banda germinal, hasta el cerrado dorsal, donde su participación es indispensable. El patrón de expresión del transcrito, así como de la proteína es consistente con la función de *amfos* en el cambio de forma celular. De acuerdo con los datos presentes y partiendo además del hecho de que los dos genes presentan el mismo fenotipo mutante, se puede concluir que hay una fuerte interacción entre *Dfos* y *amfos*.

También cubriendo los objetivos planteados se puede decir que el método de fijación que presentó mejores resultados fue utilizando formaldehído. Los datos de la hibridación *in situ* son consistentes con los encontrados con la técnica inmunohistoquímica.



## BIBLIOGRAFÍA

**Adams**, MD. Celniker, SE. Holt, RA. Evans, CA. Gocayne, JD. Amanatides, PG. Scherer, SE. Li, PW. Hoskins, RA. Galle, RF. George, RA. Lewis, SE. Richards, S. Ashburner, M. Henderson, SN. Sutton, GG. Wortman, JR. Yandell, MD. Zhang, Q. Chen, LX. Brandon, RC. Rogers, YH. Blazej, RG. Champe, M. Pfeiffer, BD. Wan, KH. Doyle, C. Baxter, EG. Helt, G. Nelson, CR. Gabor, GL. Abril, JF. Agbayani, A. An, HJ. Andrews-Pfannkoch, C. Baldwin, D. Ballew, RM. Basu, A. Baxendale, J. Bayraktaroglu, L. Beasley, EM. Beeson, KY. Benos, PV. Berman, BP. Bhandari, D. Bolshakov, S. Borkova, D. Botchan, MR. Bouck, J. Brokstein, P. Brottier, P. Burtis, KC. Busam, DA. Butler, H. Cadieu, E. Center, A. Chandra, I. Cherry, JM. Cawley, S. Dahlke, C. Davenport, LB. Davies, P. de Pablos, B. Delcher, A. Deng, Z. Mays, AD. Dew, I. Dietz, SM. Dodson, K. Doup, LE. Downes, M. Dugan-Rocha, S. Dunkov, BC. Dunn, P. Durbin, KJ. Evangelista, CC. Ferraz, C. Ferriera, S. Fleischmann, W. Fosler, C. Gabrielian, AE. Garg, NS. Gelbart, WM. Glasser, K. Glodek, A. Gong, F. Gorrell, JH. Gu, Z. Guan, P. Harris, M. Harris, NL. Harvey, D. Heiman, TJ. Hernandez, JR. Houck, J. Hostin, D. Houston, KA. Howland, TJ. Wei, MH. Ibegwam, C. Jalali, M. Kalush, F. Karpen, GH. Ke, Z. Kennison, JA. Ketchum, KA. Kimmel, BE. Kodira, CD. Kraft, C. Kravitz, S. Kulp, D. Lai, Z. Lasko, P. Lei, Y. Levitsky, AA. Li, J. Li, Z. Liang, Y. Lin, X. Liu, X. Mattei, B. McIntosh, TC. McLeod, MP. McPherson, D. Merkulov, G. Milshina, NV. Mobarry, C. Morris, J. Moshrefi, A. Mount, SM. Moy, M. Murphy, B. Murphy, L. Muzny, DM. Nelson, DL. Nelson, DR. Nelson, KA. Nixon, K. Nusskern, DR. Pacleb, JM. Palazzolo, M. Pittman, GS. Pan, S. Pollard, J. Puri, V. Reese, MG. Reinert, K. Remington, K. Saunders, RD. Scheeler, F. Shen, H. Shue, BC. Siden-Kiamos, I. Simpson, M. Skupski, MP. Smith, T. Spier, E. Spradling, AC. Stapleton, M. Strong, R. Sun, E. Svirskas, R. Tector, C. Turner, R. Venter, E. Wang, AH. Wang, X. Wang, ZY. Wassarman, DA. Weinstock, GM. Weissenbach, J. Williams, SM. Woodage, T. Worley, KC. Wu, D. Yang, S. Yao, QA. Ye, J. Yeh, RF. Zaveri, JS. Zhan, M. Zhang, G. Zhao, Q. Zheng, L. Zheng, XH. Zhong, FN. Zhong, W. Zhou, X. Zhu, S. Zhu, X. Smith, HO. Gibbs, RA. Myers, EW.

Rubin, GM. Venter, JC. **2000**. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*: Vol. 287: 2185-2195.

**Affolter**, M. Nellen, D. Nussbaumer, U y Basler, K. **1994**. Multiple requirements for the receptor serine/threonine kinase *thick veins* reveal novel functions of TGF $\beta$  homologs during *Drosophila* embryogenesis. *Development*: Vol. 120: 3105-3117.

**Alberts**, B. Jonson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, P. **2002**. Cell Communication. En: Molecular Biology of The Cell. Ari S, Heldin CH, Krauss G, Purton M, Eds. Garland Science, USA: 831-906.

**Brody**, TB. **1996**. Stages of Development and Mitotic Domains. En: The Interactive Fly. <http://flybase.bio.indiana.edu/allied-data/lk/interactive-fly/aimain/2stages.htm>.

**Campos-Ortega**, JA. y Hartenstein, V. **1997**. A summary of *Drosophila* Embryogenesis. En: The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer Verlag, Berlin: pp. 1-8.

**Chen**, HW. Marinissen, MJ. Oh, SW. Chen, X. Melnick, M. Perrimon, N. Gutkind, JS. Hou, SX. **2002**. CKA, a novel multidomain protein, regulates the JUN N-terminal kinase signal transduction pathway in *Drosophila*. *Mol Cell Biol*. Vol. 6: 1792-803.

**Gomperts**, B. Kramer, I. Tatham, P. **2003**. Signal transduction. Elsevier academic press, USA: 257-282.

**Greenspan**, R. **1997**. Fly Pushing. The Theory and Practice of *Drosophila* Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA: 3-7.

**Harden**, N. **2002**. Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lesson from dorsal closure in *Drosophila*. *Differentiation*: Vol. 70: 1-23.

**Hartenstein**, V. **1993**. ATLAS of *Drosophila* Development. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA: 2-4, 6-11, 46-47.

**Igaki**, T. Kanda, H. Yamamoto-Goto, Y. Kanuka, H. Kuranaga, E. Aigaki, T. Miura, M. **2002**. Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO J.*: Vol. 21: 3009-3018.

**Jakubowski**. **2003**. Binding and the control of gene transcription. <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/bind/olbindtranscription.html>



**Manning, G. 2003.** A quick and simple introduction to *Drosophila melanogaster*. <http://ceolas.org/vL/fly/intro.html>.

**Mathews, CK. 1998.** Coordinación Metabólica, Control Metabólico y Transducción de Señal. En: Bioquímica. Nishizuka Y, Fantl WJ, Marshall CJ, Egan SE, Eds. McGraw-Hill – Interamericana, España: 919-946.

**Riesgo-Escovar, JR y Hafen, E. 1997.** Common and distinct roles of DFos and DJun during *Drosophila* development. *Science*: Vol.278: 669-672.

**Riesgo-Escovar, JR y Hafen, E. 1997.** *Drosophila* Jun kinase regulates expression of decapentaplegic via the ETS-domain protein Aop and the AP-1 transcription factor, DJun, during dorsal closure. *Genes Dev.*: Vol. 11: 1717–1727.

**Riesgo-Escovar, JR, Jenni, M, Fritz, A y Hafen, E. 1996.** The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis, but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes Dev.*: Vol. 10: 2759–2768.

**Roberts, DB. 1998.** Immunolabeling of *Drosophila*. En: *Drosophila* a practical approach. White RA, Ed. Oxford University Press, USA: 215-240.

**Rousseau, E, Goldstein, ES. 2001.** The gene structure of the *Drosophila melanogaster* homolog of the human proto-oncogene fos. *Gene*: Vol. 11: 315-22.

**Stronach, B y Perrimon, N. 2002.** Activation of the JNK pathway during dorsal closure in *Drosophila* requires the mixed lineage kinase, *slipper*. *Genes Dev.*: Vol. 16: 377-387.

**Su, YC, Treisman, JE, Skolnik, EY. 1998.** The *Drosophila* Ste20-related kinase misshapen is required for embryonic dorsal closure and acts through a JNK MAPK module on an evolutionarily conserved signaling pathway. *Genes Dev.*: Vol.12: 2371-2380.

**Sullivan, W, Ashburner, M, Hawley, S. 2000.** Fluorescent Analysis of *Drosophila* Embryos. En: *Drosophila* Protocols. Rothwell, Sullivan, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA: 141-158.

**Weigmann, K, Klapper, R, Strasser, T, Rickert, C, Technau, GM, Jäckle, H, Janning, W, y Klämbt, C. 2003.** FlyMove – a new way to look at development of *Drosophila*. *Trends in Genetics*: Vol. 19: 310-311. <http://flymove.uni-muenster.de>



**Zeitlinger, J.** Kockel, Fiorenzo, L. Peverali, A. Jackson, DB. Mlodzik, M y Bohmann, D. **1997.** Defective dorsal closure and loss of epidermal *decapentaplegic* expression in *Drosophila fos* mutants. *EMBO J.*: Vol.16: 7393–7401.

**Zeitlinger**, J. Kockel, Fiorenzo, L. Peverali, A. Jackson, DB. Mlodzik, M y Bohmann, D. **1997**. Defective dorsal closure and loss of epidermal *decapentaplegic* expression in *Drosophila fos* mutants. *EMBO J.*: Vol.16: 7393–7401.