



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

TESIS INDIVIDUAL

CARACTERIZACIÓN DE ALELOS MUTANTES DEL GEN
piragua EN EL TEJIDO VISUAL DE *Drosophila melanogaster*

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

CÉSAR CANO ZEPEDA

DIRIGIDA POR

DR. JUAN R. RIESGO ESCOVAR

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO 2021



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

CARACTERIZACIÓN DE ALELOS MUTANTES DEL GEN *piragua* EN EL TEJIDO VISUAL DE *Drosophila melanogaster*

TESIS INDIVIDUAL

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Biología

Presenta:

César Cano Zepeda

Dirigido por:

Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar

Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar
Director

Dr. Fausto Arellano Carbajal
Asesor

Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos
Asesor

Dr. Diego Josimar Hernández Silva
Asesor

Centro Universitario, Querétaro, Qro. 2021

RESUMEN

El organismo modelo de *Drosophila melanogaster* ha brindado un sinfín de información en diferentes ramas de investigación por más de cien años, desde los experimentos de Thomas Hunt Morgan a inicios del siglo pasado. Las ventajas que existen al trabajar con *Drosophila* en un laboratorio le han permitido establecerse hoy en día cómo uno de los organismos de modelaje experimental por excelencia. Las principales ventajas que posee este organismo son: tener un ciclo de vida corto, tener un alto número de descendencia, y su mantenimiento en laboratorio es de costos bajos. El estudio de *Drosophila melanogaster* ha permitido obtener información de la función, importancia y papel de una enorme variedad de genes que han sido bien caracterizados hasta el día de hoy. *piragua* (*prg*) es un gen que codifica para una proteína con nueve dedos de zinc (ZF) y un dominio asociado a zinc (ZAD) en su extremo N-terminal, formando parte de la familia de factores de transcripción ZAD-ZF. La información que se tiene de la función y efectos del gen es limitada; es por ello que se deben realizar más estudios para caracterizarlo. En el presente proyecto se realizó una caracterización de los efectos que generan la expresión de los alelos mutantes *prg*¹ y *prg*³ en el tejido visual en la etapa adulta de *Drosophila melanogaster*. Se obtuvieron imágenes con microscopía electrónica de barrido para describir los fenotipos aberrantes que son generados por clones mutantes expresados en el disco imaginal del ojo-antena. Además, se evaluó el efecto específico de los alelos mutantes en cada uno de los rabdómeros, mediante la cuantificación de la presencia o ausencia en clones mutantes con técnicas de microscopía óptica. En este trabajo se encontró un efecto mayor del mutante para *prg* en el fotorreceptor R7 en comparación al resto, se describieron nuevos fenotipos en el tejido ocular de la mosca adulta, y finalmente, se encontró que el gen tiene un efecto no autónomo en las células oculares. Estos resultados brindan una caracterización más cercana de la importancia que tiene este gen en el desarrollo del tejido visual de la mosca de la fruta.

(Palabras clave: *Drosophila melanogaster*, *piragua*, disco de ojo-antena, clones mutantes)

ABSTRACT

The *Drosophila melanogaster* model organism has provided a wealth of information in different branches of research for over a hundred years, since the experiments of Thomas Hunt Morgan at the beginning of the last century. The advantages of working with *Drosophila* in the laboratory have allowed it to establish itself today as one of the experimental model organisms par excellence. The main advantages of this organism are: it has a short life cycle, has a high number of offspring, and its maintenance in the laboratory is inexpensive. The study of *Drosophila melanogaster* has provided information on the function, importance and role of an enormous variety of genes that have been well characterized to date. *piragua* (*prg*) is a gene that encodes a protein with nine zinc fingers (ZF) and a zinc-associated domain (ZAD) at its N-terminal end, forming part of the ZAD-ZF family of transcription factors. Little information is available on the function and effects of the gene, which is why further studies are needed to characterize it. In the present project, we characterized the effects generated by the expression of the mutant alleles *prg*¹ and *prg*³ in the visual tissue in adult *Drosophila melanogaster*. Scanning electron microscopy images were obtained to describe the aberrant adult phenotypes generated by mutant clones expressed in the eye-antennal imaginal disc. In addition, the specific effect of mutant alleles on individual rhabdomeres was assessed by quantifying their presence or absence in mutant clones with light microscopy techniques. We found a greater effect of the *prg* mutation in the R7 photoreceptor compared to the rest. We also describe new phenotypes in the ocular tissue of the adult fly; and, finally, we found that the gene has a non-autonomous effect in this tissue. These results provide a better characterization of the gene and its importance during the development of fruit fly visual tissue.

(Key words: *Drosophila melanogaster*, *piragua*, eye-antennal disc, mutant clones.)

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por mi formación académica y en especial a la Facultad de Ciencias Naturales.

A todos mis profesores de la facultad, por brindarme su apoyo y conocimientos.

A mis amigos de la facultad, por distraerme y mostrarme su apoyo en mi vida personal y académica.

A mis padres, por siempre darme su apoyo en todo lo que necesité. Sin ellos, esta tesis no hubiera sido posible.

A Luis y Mike, por ser mis compañeros durante toda la licenciatura y darme un espacio para desenvolverme personalmente.

Al Instituto de Neurobiología de la UNAM por permitirme realizar mi servicio social y tesis en sus instalaciones.

A mis compañeros de laboratorio, por sus consejos y comentarios en mi estancia dentro del laboratorio.

A mis asesores de tesis: Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos, Dr. Fausto Arellano Carbajal, Dr. Diego Josimar Hernández Silva. Por sus comentarios, correcciones y aportaciones a esta tesis.

Al Dr. Juan Manuel Murillo Maldonado; por su apoyo, consejos y crítica en mi trabajo dentro del laboratorio.

Al Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar, por brindarme su apoyo, consejos, conocimientos, un espacio para trabajar, amistad y todos los esfuerzos que hizo para que yo aprendiera.

A mis padres y a la memoria de mi abuela

Dirección General de Bibliotecas UAQ

CONTENIDO

RESUMEN.....	3
Abstract	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	9
INTRODUCCIÓN	11
ANTECEDENTES.....	14
<i>Drosophila melanogaster</i> como modelo genético.....	14
Los discos imaginales y la metamorfosis.....	14
Dedos de zinc.....	16
<i>piragua</i> tiene dedos de zinc y dominio ZAD.....	17
Competencia celular e interacción de <i>piragua</i> con <i>flower</i>	18
Experimentos con clones.....	20
Sistema de recombinación FLP-FRT.....	20
Desarrollo del disco de Ojo-Antena y morfología del ojo adulto	21
Características del gen <i>piragua</i>	25
Alelos mutantes <i>prg¹</i> y <i>prg³</i>	26
JUSTIFICACIÓN.....	26
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	28
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVOS.....	30
Objetivo general.....	30
Objetivos específicos.....	30
METODOLOGÍA	31
Materiales	31
Reactivos.....	31
Equipos	31
Técnicas.....	32
Obtención de los stocks.....	32
Cultivo de cepas.....	33
Inducción y fijación de clones mutantes.....	34

Fijación y observación en microscopio electrónico de barrido.....	35
Fijación y cortes finos de clones mutantes en el ojo	36
Registro y cuantificación de fotorreceptores según su fenotipo y genotipo.....	36
Análisis del efecto de <i>piragua</i> en los fotorreceptores	37
Análisis del efecto mutante de <i>piragua</i> en células vecinas	37
Análisis estadístico.....	38
RESULTADOS	39
Descripción fenotípica de los clones mutantes usando imágenes de microscopía electrónica de barrido.	39
Fenotipos mutantes de omatidios y frons en clones de falta de función de <i>piragua</i>	39
Fenotipos mutantes de mecanorreceptores (cerdas) en clones de falta de función de <i>piragua</i>	41
Fenotipos mutantes de córneas en clones de falta de función de <i>piragua</i>	41
Fenotipos mutantes de fotorreceptores en clones de falta de función de <i>piragua</i>	43
<i>piragua</i> actúa de forma no autónoma en la célula.....	49
DISCUSIÓN	51
Fenotipos en las células del cono, frons y cerdas oculares	51
Efecto de <i>piragua</i> en la determinación de los fotorreceptores	52
<i>piragua</i> en la competencia celular.....	54
CONCLUSIONES.....	56
Perspectivas del trabajo	57
BIBLIOGRAFÍA.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1 Esquema del ojo compuesto de una mosca adulta. A) Ojo compuesto de la mosca formado por aproximadamente 750 omatidios. B) Cada omatidio contiene 8 fotorreceptores (marcados en cuadros) y un conjunto de células accesorias. C) esquema de un corte longitudinal de un omatidio y todas las células que conforman su arquitectura. Imagen original de Wolf y Ready (1993) modificada por Nazario-Yepiz (2018)..... 24

Figura 2 imágenes de ojos y cabeza de controles silvestres y de individuos con clones mutantes a *prg* (*prg¹*) obtenidas por SEM. A,B) Controles con fenotipo silvestre de los diferentes tejidos oculares de la mosca. A) muestra el ojo compuesto silvestre, y B) muestra las antenas, aristas, frons, ocelos, ojo y proboscis. C,D,E,F) defectos en el ojo generados por clones mutantes de *prg*. C) Imagen general del ojo con clones mutantes. D) Muestra la parte del frons en una mosca con clones mutantes al gen *piragua*. E y F) acercamiento a la zona del ojo compuesto de una mosca adulta, con clones mutantes al gen *piragua*. Se muestran agujeros al centro de los omatidios en la parte de la cornea de las células muantes. *El control de la Figura 1 B muestra una zona con pegamento de carbono en el ojo izquierdo, que no es el fenotipo de la mosca. Este pegamento cubre parte de la cabeza del lado izquierdo, incluyendo el ojo. 40

Figura 3 Imágenes de omatidios individuales obtenidas de moscas tratadas por secado de punto crítico con clones mutantes a *prg*. A) Omotidio con genotipo silvestre (flechas amarillas indican las cerdas de los omatidios). B,C,D) Omotidios individuales con genotipo mutante. B) Cambio de la forma hexagonal y presencia de un agujero al centro de un omotidio con genotipo mutante. C) Omotidio mutante con el agujero central expuesto y presencia de cerdas anormales (marcadas por flechas amarillas). D) acercamiento del omotidio C en donde resalta la profundidad del agujero central. E, F) Acercamientos a los pezones de las córneas, con deformidades y daños en su estructura. (A ambas imágenes E y F se les aplicó el filtro Sharpen-clarity, con el programa Affinity Photo de manera homogénea, para obtener una mayor nitidez)..... 42

Figura 4 Cortes histológicos de ojos de moscas adultas con clones mutantes a *prg*. A) ojo de mosca con fondo w- silvestre visto con contraste de fases. Se observa la disposición normal de los rabdómeros de los fotorreceptores en los omatidios. B, C, D) ojos con clones mutantes para el gen *prg*, los bordes que colindan las áreas mutantes y las silvestres pueden ser distinguidas por la presencia de pigmento alrededor de la zona silvestre de los omatidios. B) Ojo con clones mutantes a contraste de fases. C y D) Ojos con clones mutantes teñidos con azul de toluidina al 1%. Se obtuvieron 53 omatidios de 18 muestras en los bordes de los clones con el tejido silvestre. Estas muestras fueron utilizadas para el registro de la presencia y ausencia de los fotorreceptores. Las muestras que no pudimos teñir con azul de toluidina al 1% fueron observados a contraste de fases para poder ver los rabdómeros de manera clara. 44

Figura 5 Representación en código de colores de los omatidios con mosaicos genéticos. Cada recuadro representa un omatidio con zonas mutantes y zonas silvestres. Los círculos de colores representan los fotorreceptores enumerados desde la izquierda inferior (R1) hacia la derecha, siendo el de la derecha inferior (R6); el círculo del centro representa al fotorreceptor R7. Rojo=Silvestre/Presente, Amarillo=Silvestre/Ausente, Azul=Mutante/Presente, Blanco=Mutante/Ausente. Se encontraron 53 omatidios que cumplieran con las características determinadas: que se encontraran en el borde entre el

clon mutante y células silvestres, y presentaran zonas con pigmento y zonas sin pigmento.	45
Figura 6 Cuantificación de la presencia y ausencia de los fotorreceptores según su genotipo. Porcentajes de presencia y ausencia de cada fotorreceptor, del R1 al R7 según su fenotipo (n=53). Del total de omatidios se muestran por colores.	47
Figura 7 Porcentajes de presencia y ausencia de los fotorreceptores del R1 al R7 cuando son mutantes en el omatidio. R1 n=31; R2 n=24; R3 n=24, R4 n=19; R5 n=24; R6 n= 21, R7 n= 32. Para medir el efecto de mutaciones para <i>piragua</i> en cada uno de los fotorreceptores, seleccionamos aquellos que no mostraran pigmento en el borde y cuantificamos su presencia y ausencia. * prueba T (p<.05).	48
Figura 8 Pérdida de fotorreceptores por pares y genotipo. Los omatidios seleccionados se dividieron en grupos de acuerdo con los pares de fotorreceptores mostrados en el eje y. Los subgrupos de mutantes (azul) son aquellos omatidios que presentaran uno o ambos fotorreceptores mutantes. Los subgrupos silvestres (naranja) son aquellos omatidios que presentara ambos fotorreceptores silvestres. * Prueba Mann-Whitney (p<.05).	50
Tabla 1 Valores en la presencia y ausencia de cada rabdómero según su genotipo. Se cuantificó la presencia y ausencia de cada uno de los 7 fotorreceptores (lado derecho) según el genotipo que presentaban. Esta clasificación se determinó por la presencia de pigmento en los bordes del omatidio para las células silvestres y su ausencia en las mutantes (marcados con w-). Un total de 53 omatidios fueron seleccionados para la cuantificación en la que se obtuvieron 196 fotorreceptores silvestres y 175 mutantes.	47

INTRODUCCIÓN

Entre los organismos modelo, *Drosophila melanogaster* destaca por un número de razones como: facilidad de manejo, ciclo de vida corto, alta descendencia, bajos costos de mantenimiento, etc. (Greenspan, 1997). El estudio de genes en *D. melanogaster* ha permitido entender los procesos moleculares involucrados en enfermedades de humanos, trastornos del desarrollo, trastornos neuronales y cáncer; y hoy en día existen grandes áreas de investigación en las que se podría aplicar este conocimiento en humanos. Cerca de un tercio de las enfermedades humanas relacionadas a genes, tienen genes homólogos con *D. melanogaster* (Bier, 2005).

El desarrollo del ojo ha sido un proceso altamente estudiado tanto en humanos como en los modelos genéticos; sin embargo, aún existen genes de los cuáles no se ha descrito su función cuya desregulación genera fenotipos mutantes en el tejido visual adulto en las moscas. Una gran cantidad de estos genes tienen homólogos en humanos. Un claro ejemplo son los trastornos de desarrollo generados por mutaciones del gen *Pax6* (cuyo homólogo en las moscas es el gen *eyeless*) en humanos. Su función es similar tanto en vertebrados como en invertebrados, como *D. melanogaster* (Bier, 2005).

El disco imaginal de ojo-antena es un epitelio de dos capas (la capa peripodial, y la capa del disco imaginal propiamente). Esta última capa da origen a los ojos, antenas y aristas, palpos maxilares, y ocelos, entre otros tejidos de la cabeza de la mosca adulta. La regulación en la proliferación y diferenciación de este epitelio depende de la correcta interacción de distintos morfógenos y vías de señalización dejando como producto final un ojo compuesto de 750 unidades (aproximadamente) llamados omatidios (Bate & Arias, 1994). Mutaciones en los genes involucrados en la regulación del crecimiento y diferenciación durante el desarrollo del ojo pueden generar fenotipos aberrantes y no funcionales en el tejido visual de la mosca adulta, como es el caso del gen *piragua* (*prg*).

piragua es un gen que codifica a una proteína con un dominio asociado a zinc y nueve dedos de zinc C2H2. Los dedos de zinc son dominios que, con la

interacción de iones de zinc, pueden formar estructuras parecidas a un dedo en la proteína y a partir de ellas facilitar la interacción con el ADN, ARN y proteínas. El dominio asociado a zinc se especula que tiene la función de facilitar la interacción proteína-proteína (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017). Sin embargo, es poca la información que hoy tenemos para explicar la(s) función(es) de genes que poseen dedos de zinc y los dominios asociados a zinc. Los resultados de este trabajo proporcionan información sobre la función que genes con estos dominios tienen durante el desarrollo del tejido visual.

Durante la embriogénesis, el gen *prg* es muy dinámico, pues su expresión, tanto del mRNA como de la proteína, cambia en diferentes estadios del desarrollo. Alelos mutantes en homocigosis del gen generan fenotipos de letalidad en aproximadamente la mitad de los embriones. Más adelante en el desarrollo, *prg* se expresa en tejidos imaginales como los discos del ojo-antena, ala y pata. En el disco de ojo-antena, *prg* se expresa en mayor cantidad en las zonas que darán origen al ojo. Al generar clones mutantes a *prg* en el ojo se observa un fenotipo mutante, presentando agujeros en las córneas de muchos omatidios, desarreglo en la estructura general del ojo, falta de cerdas sensoriales, malformaciones en los fotorreceptores y células pigmentarias del ojo compuesto (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017). En este trabajo se realizó una caracterización más detallada del fenotipo mutante en clones de ojo para *prg* y se describe el fenotipo que tiene la mutante en los rabdómeros y la córnea, mediante un estudio de microscopía electrónica de barrido esto último, y se encontró también que existe un efecto célula independiente dentro de los fotorreceptores.

En 2017, Nazario-Yepiz y Riesgo-Escovar, apuntaron a que existe una interacción genética entre *flower (flw)* y *prg* embrionaria después de observar un incremento significativo en la letalidad de los embriones con diferentes cepas con ambos genes mutados tanto en homocigosis como en fondos genéticos sensibilizados (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017). El gen *flw* ha sido utilizado como un claro ejemplo de genes que participan en la competencia celular, en la que células son seleccionadas como “ganadoras” y

“perdedoras” de acuerdo con que tan aptas son en su entorno celular (Casas-Tinto et al., 2011). En este trabajo también exploramos que papel tiene *prg* en la competencia celular en la formación del ojo compuesto.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ANTECEDENTES

***Drosophila melanogaster* como modelo genético**

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

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

Los discos imaginales y la metamorfosis

Diversos estudios en el desarrollo de los discos imaginales en *D. melanogaster* han permitido describir la función de distintos genes durante etapas críticas de la metamorfosis (Beira & Paro, 2016). Los discos imaginales son estructuras epiteliales que poseen los insectos holometábolos en su etapa larvaria cuya especificación se da en las etapas tempranas del ciclo de vida, durante la embriogénesis y su desarrollo y diferenciación durante la metamorfosis darán como resultado estructuras y órganos del organismo adulto (Baker, 2001; Beira & Paro, 2016). Existen en total 19 discos imaginales en la larva de la mosca de la fruta, 8 pares de ellos darán origen a tejidos epidermales y el disco imaginal genital que no está pareado. Los discos imaginales presentes en parejas en las moscas son (de anterior a posterior): labial, clipeolabral, ojo-antena, protórax, ala, halterio y 3 pares de discos de pata (un par pro cada segmento del tórax) (Beira & Paro, 2016). De un mismo epitelio de disco se pueden desarrollar diferentes estructuras, muy diferentes unas de otras. Esto se debe a que vías

de señalización intercelulares parcelan el territorio del disco, como la vía de *wingless* en el disco de ojo, el cuál marca la frontera entre el territorio que dará origen al ojo compuesto y el que dará origen a la cutícula peri orbicular (Zhu et al., 2017). En los dípteros, los discos imaginales tienen un origen embrionario. Las larvas generan apéndices larvarios, que durante la metamorfosis serán histolizados en su gran mayoría y reemplazados por tejidos formados a partir de los discos imaginales (Bate & Arias, 1994). Los discos imaginales se mantienen pequeños y de pocas células durante las primeras etapas del primer estadio larvario; al final de este estadio comienzan a dividirse de manera exponencial, durante el segundo y principalmente en el tercer estadio larvario (Beira & Paro, 2016; Nöthiger, 2002). Cada uno de estos discos se desarrolla de manera autónoma (hay excepciones) por la expresión y la regulación de diversas vías de transducción de señales en diferentes tiempos del desarrollo de la mosca. Algunas de las vías más importantes en el desarrollo de los discos imaginales son: Hh, Dpp, MAPK, JNK, Wnt, Notch, etc. Estas vías de señalización determinan tanto el patrón de diferenciación como la proliferación de los discos imaginales para convertirse en las estructuras adultas (Beira & Paro, 2016).

El estudio de estas estructuras tiene la ventaja, entre otras, de proveer información sobre el funcionamiento, desarrollo y algunas patologías de tejidos epiteliales homólogos que cubren diversos órganos en mamíferos (Jennings, 2011; Wangler et al., 2015).

Con el uso de distintas tecnologías (recombinación mitótica o irradiación con rayos X, por ejemplo), los discos imaginales de insectos pueden ser modificados de forma tal que se dirija la expresión de distintos alelos de genes de forma específica a un único tejido epitelial, generando mosaicos genéticos (clones) en donde se muestren células mutantes y silvestres en un solo epitelio. Esto permite observar funciones exactas y específicas de los genes, aislando la expresión a un único sitio y observando fenotipos mutantes de genes que pueden ser letales en homocigosis. Esto es particularmente útil cuando los genes en estudio son letales en estadios tempranos del desarrollo, por lo que

de otra manera no podrían ser estudiada su función en los discos imaginales (Chou & Perrimon, 1996; Chou & Perrimon, 1992; Golic & Lindquist, 1989).

Dedos de zinc

Las proteínas que contienen dominios de dedos de zinc fueron descritas hace más de 35 años a partir de extractos de ovocitos de *Xenopus* (Miller et al., 1985) y desde entonces han sido estudiadas extensamente, al ser proteínas con uno de los dominios proteicos más abundantes que existen. Estos dominios, a pesar de su pequeño tamaño, muestran una gran versatilidad en cuanto a su función y una alta variedad en su estructura; incluso han sido utilizadas recientemente con fines terapéuticos y de edición génica (Abbehausen, 2019; Paschon et al., 2019). Las funciones fisiológicas de las proteínas pertenecientes a esta familia son muy variadas. Algunas de las funciones que se conocen al día de hoy son la diferenciación celular, la proliferación celular, la apoptosis, la replicación y reparación, el metabolismo celular, siendo muchas veces activadores transcripcionales y coadyuvan al mantenimiento de la homeostasis en los tejidos, entre otras (Cassandri et al., 2017; Krishna, 2003). En cuanto a su interacción con otras moléculas, se ha descrito que estos dominios facilitan el anclaje de la proteína al ADN, ARN, o entre proteínas, con lípidos y que incluso pueden poseer funciones enzimáticas (Grishin, 2001; Krishna, 2003)

Las proteínas con dedos de zinc se clasifican por la estructura del dominio dando actualmente un total de 30 grupos diferentes, siendo el grupo C2H2 el más estudiado, abundante y común entre todos. En este grupo, el dominio de dedo de zinc consta de dos hojas beta plegadas y una porción de alfa hélice; tiene dos cisteínas y dos histidinas que coordinan un solo ión de zinc (Brayer et al., 2008; Cassandri et al., 2017; Krishna, 2003). La estructura de los dedos de zinc C2H2 es simple, pues está formada por una hélice- α y dos horquillas- β de forma antiparalela. La estructura de hélice- α de la proteína contiene en la punta residuos de cuatro amino ácidos que tienen la función de identificar al ADN con una preferencia de unión entre arginina con guanosina, ácido aspártico con

adenosina o citidina y leucina con timidina (R. S. Brown, 2005; Razin et al., 2012).

Este grupo de dedos de zinc C₂H₂ se puede dividir a su vez en 3 distintos grupos de acuerdo con la cantidad y posición de los dedos de zinc en la proteína. El primer grupo contiene un único racimo conformado por tres dedos de zinc casi pegados. El segundo grupo lo forman aquellas proteínas con uno o más pares de dedos de zinc que, en general, cuando son más de un par se encuentran separados. Y el tercer grupo lo conforman aquellas proteínas que tienen uno o varios racimos formados por cuatro o más dedos de zinc. Este último grupo resulta ser el más abundante, y el segundo, el menos abundante de los tres (Razin et al., 2012).

***piragua* tiene dedos de zinc y dominio ZAD**

Piragua pertenece a una familia dentro de las proteínas con dedos de zinc denominada ZAD-ZNF (*zinc associated domain - zinc finger protein*, en inglés). Estas proteínas tienen, además de múltiples dedos de zinc, un dominio asociado a zinc (ZAD) en su extremo N-terminal. El dominio ZAD es una estructura en forma de hoja de trébol que se forma por la coordinación de cuatro residuos de cisteína y el ion de zinc (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017). En el genoma de *D. melanogaster* existen 91 genes que codifican a proteínas ZAD-ZNF repartidos en el genoma (Kasinathan et al., 2020). La función del dominio ZAD es facilitar las interacciones entre proteína-proteína, delegando la función de unión al ADN a los dedos de zinc C₂H₂ (Jauch et al., 2003; Kasinathan et al., 2020). Esta familia de proteínas es la más abundante dentro de las que tienen dedos de zinc y funcionan como factores de transcripción. Sin embargo, son pocos los genes pertenecientes a ella que han sido caracterizados con profundidad, y estos se limitan a estudios en *Drosophila melanogaster* (Chung et al., 2002); es por esto que se requieren nuevos estudios para comprender el funcionamiento de este tipo de proteínas.

Competencia celular e interacción de *piragua* con *flower*

Entre los mecanismos de reparación celular que hay, el de la competencia celular entre las células sobrevivientes a una agresión tiene la particularidad de actuar cuando las vías intrínsecas de muerte celular son incapaces o insuficientes para eliminar células dañadas o menos aptas al entorno en el que existen. La competencia celular también existe durante el desarrollo normal, en donde se seleccionan positivamente células más competentes de entre un "pool" existente. El mecanismo de competencia celular se da a partir de interacciones célula - célula, en donde se compara la aptitud celular de las vecinas. Las células son seleccionadas como "ganadoras" y "perdedoras". Las perdedoras son aquellas células que, en el contexto en el que se encuentran, son menos aptas que sus vecinas y posteriormente son eliminadas. Las ganadoras son las que no son eliminadas por ser aptas en el contexto en el que se encuentran y muchas veces entran en proliferación compensatoria para suplir a las células perdedoras, y así mantener la homeostasis (Casas-Tinto et al., 2011; Di Gregorio et al., 2016). Eventos de competencia celular también han sido descritos en ratones (Oliver et al., 2004), sugiriendo que éste es un proceso altamente conservado.

En 1975 se describió primeramente este mecanismo al estudiar el comportamiento de células heterocigotas para un gen *Minute*. Los genes *Minute* codifican normalmente para proteínas ribosomales, y las células heterocigotas a *Minute* tienen una velocidad de proliferación menor a las silvestres. Morata y asociados observaron que al tener células *Minute*^{+/-} rodeadas por células silvestres, las mutantes eran seleccionadas en contra y por ende eliminadas (Di Gregorio et al., 2016; Morata & Ripoll, 1975; Moreno et al., 2002).

Otro ejemplo de competencia celular, que se da en un contexto diferente, es el de las células súper-competentes. Las células súper-competentes son aquellas que tienen una mayor velocidad de crecimiento que otro grupo de células (de fenotipo silvestre), que por sí solas, ya son competentes. En un disco imaginal de ala en el que se expresa ectópicamente el gen *dMyc* en parte de las células (creando clones de células súper-competentes en mosaicos genéticos), las

células con expresión ectópica de *dMyc* adquieren una mayor velocidad de crecimiento convirtiéndose en las súper-competentes. En estos experimentos las células vecinas con menor cantidad de *dMyc* y menor velocidad en su crecimiento son eliminadas por apoptosis (De La Cova et al., 2004; Moreno & Basler, 2004).

Sin importar que sea por células aptas o súper-competentes, en un proceso de competencia celular se deben de cumplir tres condiciones: 1) que exista una diferencia en la aptitud de las células, 2) que esta diferencia pueda ser percibida por las células vecinas y 3) que las células menos aptas mueran y las ganadoras entren en proliferación compensatoria (Di Gregorio et al., 2016). Se han propuesto distintos mecanismos para explicar cómo es que una célula percibe la aptitud de otra; uno de ellos es por comunicación celular a través de señalización molecular.

Los transcritos alternativos del locus *flower* codifican para canales transmembranales de calcio y parecen tener una función de “huella digital” para mostrarse como células “ganadoras” y células “perdedoras” en la mosca. *D. melanogaster* tiene en su genoma un solo gen *flower* con tres isoformas generadas por splicing alternativo. Experimentos en discos imaginales han mostrado que, en modelos experimentales de competencia celular, las células “perdedoras” expresan las isoformas *flw^{lose-A}* y *flw^{lose-B}*; mientras que las “ganadoras expresan la isoforma *flw^{ubi}* (Casas-Tinto et al., 2011; Di Gregorio et al., 2016; Merino et al., 2015; Christa Rhiner et al., 2010). Se sabe que las isoformas perdedoras de *flower* están implicadas en el proceso de competencia celular, pues al suprimir las isoformas perdedoras con RNAi, se evita la eliminación de las células (Rhiner et al., 2010).

El gen *prg* incrementa su expresión en las células “perdedoras” y es requerido para su eliminación vía apoptosis (Rhiner & Moreno, 2009; Rhiner et al., 2010). Recientemente se describió que existe una interacción genética entre *flw* y *prg*. Esto se concluyó al generar combinaciones genéticas, de dobles homocigotos mutantes, o un gen heterocigoto y el otro homocigoto mutante. En todas las

combinaciones hubo un incremento significativo en la letalidad embrionaria (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017).

Experimentos con clones

Los experimentos de mosaicos genéticos han sido utilizados en *Drosophila* por un largo tiempo; estos consisten en generar células con distintos genomas en un único tejido. Se han empleado técnicas como trasplante celular, cromosomas inestables, activación e inactivación local de genes, y recombinación mitótica inducida por radiación ionizante. Si bien todas estas técnicas son útiles, su uso se enfrenta a limitantes como: la inducción de muerte celular o del tejido completo, baja frecuencia de mosaicos generados, y el no siempre poder marcar los clones en el tejido en desarrollo, etc. (Ashburner, 1989; Garcia-Bellido & Dapena, 1974; Garcia-Bellido & Merriam, 1969; Newsome et al., 2000; Theodosiou & Xu, 1998). La tecnología FRT-FLP utiliza una enzima flipasa (FLP) que reconoce sitios específicos en los cromosomas (FRT) para generar recombinación mitótica y de esta forma hacer mosaicos genéticos por clones mitóticos (Theodosiou & Xu, 1998). Hoy en día los experimentos realizados con la tecnología FRT-FLP son muy comunes y rutinarios.

Sistema de recombinación FLP-FRT

Cuando una célula heterocigota tiene en la base de un brazo de un cromosoma sitios FRT, en el momento de la división celular una vez replicados los cromosomas, la enzima FLP podrá inducir recombinación mitótica justo en los sitios FRT. Como resultado de este proceso, se generarán dos células hijas: una que tendrá ambas copias del gen mutado, y una segunda que tendrá dos copias del alelo silvestre del gen. Posteriormente, las siguientes divisiones generarán clones de las primeras células hijas, como lo muestra Nicole A. Theodosiou y Tian Xu en su revisión de 1998 (Theodosiou & Xu, 1998); de esta forma se generan células silvestres y mutantes juntas en un mismo organismo o tejido. En el año de 1989, Kent G. Golic y Susan Lindquist, generaron una construcción de la recombinasa FLP controlada por las secuencias regulatorias de la proteína "heat shock" *hsp70* (Golic & Lindquist, 1989). Esta construcción permitió que la recombinación en los sitios FRT dependiera de la temperatura y

que el investigador tuviera el control del momento en que se generan estos clones.

En el año 2000 Timothy P. Newsome y colaboradores generaron otra construcción de este mismo sistema de recombinación sitio-específica FRT-FLP uniendo un fragmento del potenciador del gen *eye/less*, el cual tiene expresión específica en el ojo, antes del cADN de la recombinasa FLP (Newsome et al., 2000). El disco imaginal del ojo-antena resulta un modelo ideal para generar mosaicos genéticos con la tecnología FRT-FLP, ya que los resultados pueden observarse de manera clara en el ojo compuesto de la mosca adulta. Una de las grandes innovaciones que trajeron consigo estos experimentos fue la capacidad de discernir entre los efectos celulares autónomos y no autónomos en las células, remarcando la importancia de la comunicación celular en diferentes contextos (Theodosiou & Xu, 1998).

Desarrollo del disco de Ojo-Antena y morfología del ojo adulto

El disco imaginal de ojo-antena da origen a estructuras de la cabeza: los ojos, ocelos, antenas, palpos maxilares y epidermis de la cabeza (Zhu et al., 2017). Estudios detallados en mutantes y mapas genéticos han descrito la importancia fundamental de vía de señalización de EGFR (Freeman, 1997; Malatre, 2016) (Peverali et al., 1996) durante el desarrollo temprano del disco imaginal ojo-antena. Una gran cantidad de genes clave han sido encontrados para la determinación del destino y diferenciación de las células del epitelio de este tejido (Tsai et al., 2015; Zhu et al., 2017) e incluso se han encontrado enzimas fundamentales, que forman parte de las principales rutas metabólicas como: glucólisis, fosforilación oxidativa, síntesis de unión GPI, TCA, glutamina y pentosas fosfato, las cuales tienen un papel clave durante el desarrollo del ojo (Pletcher et al., 2019).

La parte más grande del disco de ojo-antena es la porción a partir de la cual se desarrollan los omatidios, que son las unidades oculares de las que se componen los ojos compuestos. El ojo compuesto comienza a desarrollarse a finales del primer instar larvario. En la porción del ojo del disco imaginal de ojo-

antena se llevan a cabo dos olas de proliferación denominadas “olas mitóticas” (“mitotic waves” en inglés) (Wolff & Ready, 1991). La primera ocurre antes de que se inicie la diferenciación celular y es la que determinará el número de omatidios que tendrá el ojo del organismo; después ocurrirá un arresto de las fases de síntesis y mitosis del ciclo celular, dando pase a una fase de crecimiento celular, y al inicio de la diferenciación. La segunda ola mitótica será la que aporte las células restantes para la conformación de los omatidios, y ocurrirá después del inicio de la diferenciación, después de la formación de los “pre-clusters” de cinco fotorreceptores, estructura nucleadora de los omatidios (Baker, 2001; Bate, M; Arias, 1994; Brennan & Moses, 2000; Wolff & Ready, 1991). Estos “pre-clusters” están compuestos de los fotorreceptores R8, R3, R4, R2 y R5 (el R8 es el primer elemento celular en diferenciarse, después R3 y R4, y en un tercer momento R2 y R5).

La segunda ola mitótica, que ocurre con la formación de los “pre-clusters”, está marcada también por la salida del surco morfogenético. El surco morfogenético es un fenómeno de cambio de forma celular, en donde hileras de células, a la vez, de la región posterior a la región anterior del disco imaginal, reducen significativamente su altura, pasando de células columnares a prácticamente escamosas, al tiempo que empieza la formación de los pre-clusters (Wolff & Ready, 1991). Después, las células se estiran de nuevo, hasta recuperar la talla original, y merced a la segunda ola mitótica, reclutan los fotorreceptores R1, R6 y R7, y después las células del cono y las células pigmentarias, para completar los omatidios (Bate & Arias, 1994) . De esta forma, en el disco imaginal de ojo en diferenciación en el tercer estadio larvario tardío, se tienen a un mismo tiempo todos los estadios de proliferación y diferenciación del ojo compuesto, puesto esto ocurre secuencialmente, por hileras de células, de la parte posterior a la parte anterior. Esto facilita enormemente los experimentos y el estudio de la diferenciación en el ojo. Cada hilera de células, a 25C, toma alrededor de dos horas para transitar por el fenómeno del surco morfogenético (Beira & Paro, 2016; Brennan & Moses, 2000).

El resto del disco imaginal también iniciará la diferenciación en el tercer estadio larvario. Formará la antena, los ocelos, los palpos maxilares y distintas placas faciales de la mosca (Kenyon et al., 2003).

La arquitectura del ojo se desarrolla de una manera sumamente controlada y repetitiva en cada una de sus unidades llamados omatidios. Cada omatidio es considerado una unidad del ojo compuesto de la mosca el cuál consta de 750 a 800 unidades. Dentro de cada omatidio se encuentran en el centro 8 fotorreceptores o rabdómeros, que tendrán un papel similar al de los conos y bastones en mamíferos, estos están rodeados por cuatro células de cono que son de un tamaño mayor en proporción a los fotorreceptores y que a su vez proporcionaran estructura al omatidio. Los rabdómeros llevan los nombres R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8 respectivamente de acuerdo con su posición en el omatidio. Las células de cono llevan los nombres de célula de cono anterior, célula de cono ecuatorial, célula de cono posterior y célula de cono polar. El resto de las células del omatidio son células de pigmento y 3 células de cerda (Baker, 2001; Bate & Arias, 1994). Cada fotorreceptor tiene un organelo fotosensible característico, la rabdómera, en donde se encuentran los pigmentos fotosensibles, las opsinas y el retinal. Además de los fotorreceptores y células del cono, cada omatidio tiene ocho células pigmentadas que están rodeando a los fotorreceptores (figura 1A y 1B) (Bate & Arias, 1994). El desarrollo del ojo es un proceso que ha sido estudiado extensamente por la facilidad y precisión de los trabajos que se pueden realizar manipulando a *D. melanogaster*.

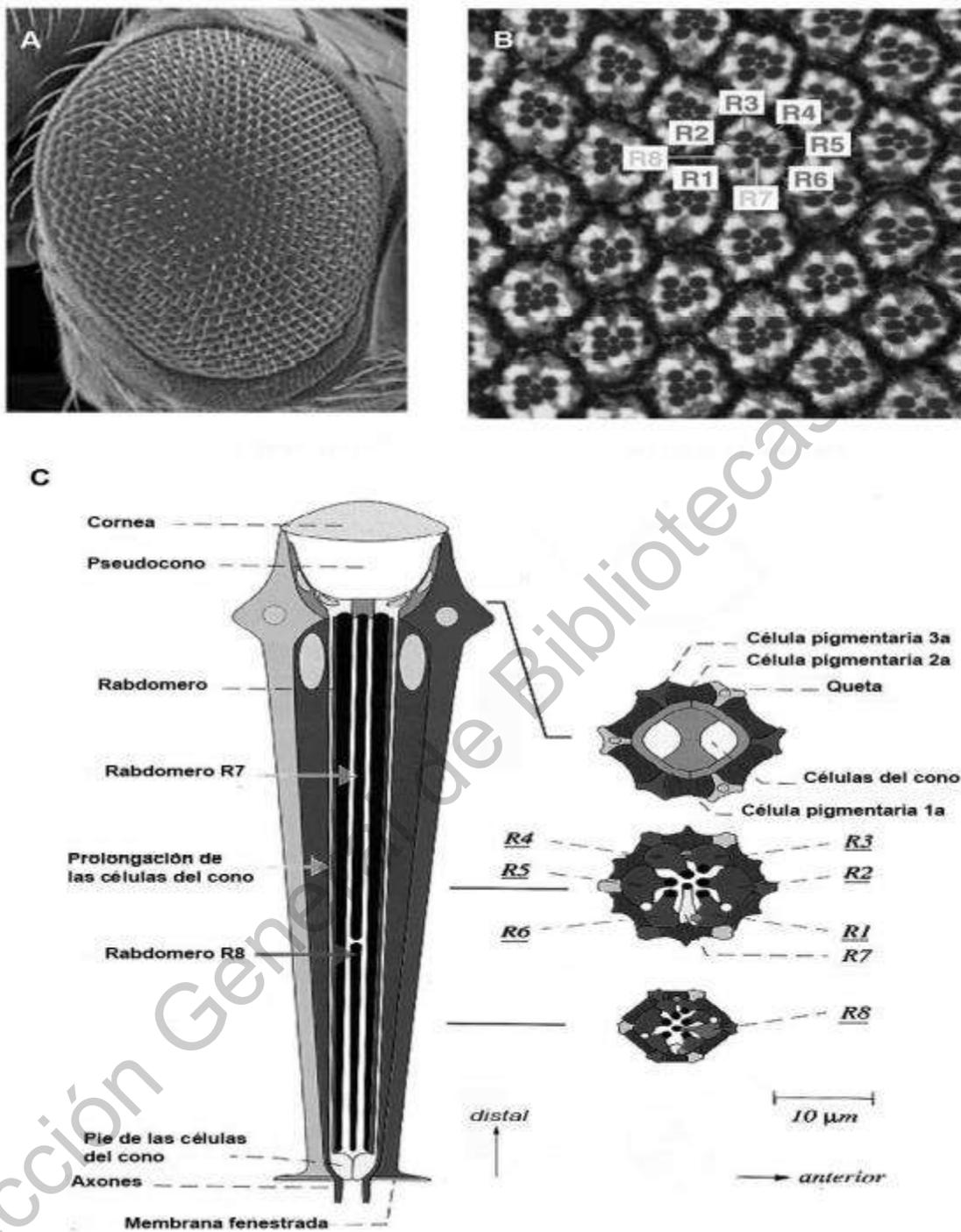


Figura 1 Esquema del ojo compuesto de una mosca adulta. A) Ojo compuesto de la mosca formado por aproximadamente 750 ommatidios. B) Cada ommatidio contiene 8 fotorreceptores (marcados en cuadros) y un conjunto de células accesorias. C) esquema de un corte longitudinal de un ommatidio y todas las células que conforman su arquitectura. Imagen original de Wolf y Ready (1993) modificada por Nazario-Yepiz (2018).

Características del gen *piragua*

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

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

Las moscas homocigotas mutantes al gen *piragua* son letales y producen diversos fenotipos letales en embriones, desde muerte temprana antes de la formación de la cutícula, dando embriones con puros tejidos blandos que se ven como cubiertas vitelinas vacías en preparaciones de cutículas, y cutículas con fenotipos mutantes de apertura dorsal e involución de la cabeza. Durante el desarrollo embrionario, este gen interactúa con otro muy estudiado y de gran importancia durante la competencia celular llamado *flower* (*flw*) (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017). También, los embriones mutantes para *prg* muestran un retraso importante en la cinética del cerrado dorsal; este efecto puede o no prevenir que se complete el cerrado dorsal (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017).

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

Alelos mutantes *prg*¹ y *prg*³

Los alelos mutantes del gen *prg*, *prg*¹ y *prg*³, fueron generados por una escisión de elementos P (transposones) en la unidad transcripcional de *piragua*. Ambos alelos son letales en homocigosis y fallan al complementar uno con el otro en pruebas de complementación (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017). Para el alelo *prg*¹ no se ha encontrado ningún daño en las regiones codificantes y no existe una reducción de ARNm cuando se induce su expresión, en cambio, el alelo *prg*³ si presenta una reducción significativa en el ARNm al inducir su expresión y se han encontrado cambios en las secuencias del locus. *prg*³ tiene dos mutaciones puntuales en el dominio ZAD (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017; Nazario-Yepiz, 2018)

JUSTIFICACIÓN

En invertebrados, pero particularmente en insectos, ha existido una expansión muy dramática en el número de genes que poseen la estructura de ZAD-dedos de zinc de tipo C2H2. Estos genes están conservados evolutivamente y también existen en vertebrados. Codifican para factores de transcripción. Muy poco se sabe de las funciones que desempeñan en el desarrollo; por eso contar con alelos mutantes de esta clase de genes permite su caracterización y

estudio. El gen *piragua*, que pertenece a esta clase de genes, presenta fenotipos mutantes muy dramáticos en el ojo compuesto de la mosca adulta, que caracterizamos en este trabajo. Obtener más información de la función de este tipo de factores de transcripción, específicamente *prg*, puede ser de gran utilidad para futuros trabajos enfocados en defectos visuales y alguna posible aplicación biomédica.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto que tiene la expresión de un alelo mutante del gen *piragua* al generar clones en el tejido ocular de *Drosophila melanogaster*?

¿Existe un efecto célula-independiente de los clones mutantes sobre los fotorreceptores en los ommatidios?

Dirección General de Bibliotecas UAQ

HIPÓTESIS

El gen *piragua* actúa de manera célula-independiente durante la formación del ojo compuesto del imago de *Drosophila melanogaster*, y no afecta a todas las células que componen los omatidios del ojo compuesto de la misma manera.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar una descripción detallada del fenotipo mutante causado por el gen *piragua* en clones dentro del tejido visual de *Drosophila melanogaster*.

Objetivos específicos

1. Generar líneas de moscas de *Drosophila melanogaster* que tengan en su genoma un FTR40A, una proteína flipasa unida al promotor de *eyeless* y los alelos mutantes del gen en cuestión, *prg*¹ y *prg*³ marcados con *w*.
2. Realizar una descripción morfológica del tejido visual externo en moscas adultas con clones mutantes a *prg* por medio de técnicas de microscopía óptica y de barrido.
3. Determinar el efecto que tienen los alelos mutantes de *prg* en los fotorreceptores del ojo de *Drosophila melanogaster*.
4. Describir si los defectos causados por los alelos del gen se dan de manera autónoma o no autónoma dentro de la célula.

METODOLOGÍA

Materiales

- Micropipetas 10-1000uL
- Puntas de micropipetas 10-1000uL
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Software iVision
- Pipetas Pasteur de cristal
- Tubos de ensayo de 1ml
- Cápsulas de infiltración para resina marca Beem
- Pizeta
- Navajas de cristal para microtomo
- Aguja de Tungsteno
- Navajas para afeitar
- Pinzas de disección
- Bases para montar objetos para microscopía electrónica de barrido

Reactivos

- Tetróxido de Osmio 2% en buffer de cacodilatos
- Buffer de cacodilatos 2x
- Glutaraldehído en H₂O 50%
- Azul de toluidina 1%
- Acetona
- Extrán
- Medio de montaje Entellan
- Resina Spurr
- Pegamento de carbón para microscopía electrónica de barrido

Equipos

- Microtomo marca Leica RM2265
- Microscopio óptico compuesto marca Nikon modelo Eclipse e600
- Parrilla caliente
- Microscopio estereoscópico binocular

- Equipo para hacer navajas de vidrio marca RMC
- Procesador de tejidos automático marca Leica
- Equipo para secado de punto crítico
- Equipo “sputter coater”
- Microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo 1010

TÉCNICAS

Obtención de los stocks

Para obtener líneas de moscas que contengan en su genoma tanto una mutación de falta de función para *prg* como el sitio de reconocimiento (FRT) para la flipasa Flp de levaduras en la base del mismo brazo del mismo cromosoma en donde se encuentra localizado *prg*; es decir, proximal a *prg*, se hicieron las cruzas delineadas abajo. De esta manera se pueden generar clones mitóticos en diferentes etapas del desarrollo y tejidos seleccionados, cruzando estas cepas con cepas que contengan el transgén de la flipasa Flp expresado en distintos patrones. En nuestro caso utilizamos la construcción *ey-flp*, que expresa a *flp* en las células precursoras del ojo compuesto.

Se cruzaron hembras vírgenes *prg*¹/CyO y *prg*³/CyO con machos FRT40A/CyO. CyO es un cromosoma balanceador, dado que contiene múltiples re-arreglos de tal forma que evita la recombinación meiótica, además de tener al menos un marcador dominante, para que se pueda saber que individuos lo poseen en heterocigosis, y al menos una mutación homocigota mutante letal, para evitar que se haga homocigoto en la cepa. De esta manera, este cromosoma puede estar en heterocigosis con otro que porte mutaciones de interés, incluidas mutaciones letales homocigóticas, generando así una cepa que sólo tiene individuos heterocigóticos, y sin recombinación. Los alelos mutantes de *prg* fueron marcados con *w* para poder observar los clones mutantes en omatidios

color blanco y sin pigmento en los cortes histológicos, de esta manera distinguir entre las zonas mutantes y las silvestres (sin pigmento y con pigmento)

Dado que, tanto el cromosoma balanceador *Cyo* como los alelos mutantes a *prg* son letales en homocigosis, las moscas con los genotipos deseados para las generar líneas de investigación pueden ser seleccionadas a través de la observación de fenotipos. De esta forma una mosca viable y sin el marcador *Cyo* nos indica que en su genoma posee el alelo mutante a *prg* deseado y el FRT40A necesario para la generación de clones (es la única forma viable sin presentar *Cyo*).

De esta primera cruce se seleccionaron hembras vírgenes sin el marcador *Cyo* para tener las hembras *prg*¹/*FRT40A* y *prg*³/*FRT40A* con genotipo deseado, en cuya línea germinal se pueda llevar a cabo la recombinación entre los dos cromosomas. Las hembras se cruzaron con machos *Sp/Cyo* (*Sp* es una mutación dominante letal en homocigosis), y se seleccionaron los machos con *Sp*⁺ (o sea, machos que tengan *Cyo* sobre el posible cromosoma recombinado), y se separaron en tubos individualmente, dado que cada macho representa un evento de recombinación distinto. Algunos de estos machos pudieron generar de manera aleatoria una copia del cromosoma deseado con el alelo mutante a *prg* y en el mismo cromosoma el FRT40A. A cada uno de los tubos con un macho se les colocó de una a cuatro hembras vírgenes con genotipo *eyFLP; FRT40A/Cyo*. Se observó en la descendencia de cada uno de los tubos para ver si aquellas moscas que no presentaran el cromosoma balanceador *Cyo* generaban clones de células homocigotas mutantes para *prg* en los ojos. Se seleccionaron y cruzaron *inter se* hembras y machos hermanos de estas líneas que poseían el balanceador *Cyo*. Los genotipos finales que se obtuvieron de estas cruces son: 1) *eyFLP; prg*¹/*Cyo* 2) *eyFLP; prg*³/*Cyo*. En el resto del trabajo se les llamará al stock 1) *prg*¹ y al stock 2) *prg*³.

Cultivo de cepas

Las moscas se mantuvieron a 25°C con 50% de humedad relativa en un cuarto aislado y fueron alimentadas con una dieta común basada en levadura de pan,

piloncillo, agar y grenetina. Tanto las cepas generadas, como las cruza para obtener moscas con mosaicos genéticos de clones mutantes para *prg* se cultivaron en las mismas condiciones.

Inducción y fijación de clones mutantes

Se realizaron cruza de hembras vírgenes de *prg*¹ y *prg*³ con stocks *eyFLP; FRT40A/CyO*. Se dejaron a 25°C por 3 días y se retiraron a los parentales del tubo. Una vez que las moscas llegaron a la etapa adulta, se seleccionaron aquellas que no mostraran el balanceador CyO; estas se observaron individualmente para verificar que presentaran clones mutantes marcados con *w* (sin pigmentos oculares). Estas moscas fueron separadas para la fijación. Esta técnica fue desarrollada en el año 2000 por Newsome y colaboradores (Newsome et al., 2000).

La disección y fijación de los ojos fue realizada siguiendo el procedimiento de tetróxido de osmio y Spurr como indica el manual (Franke et al., 1969) con algunas modificaciones mencionadas a continuación.

Se preparó una solución fijadora de la siguiente manera: para cada mililitro de solución se mezclaron 210µl de agua desionizada, 250µl de buffer 2x de cacodilatos, 40µl de 50% Glutaraldehído en H₂O y 500µl de OsO₄ al 2% en buffer de cacodilatos. Se anestesiaron a las moscas seleccionadas con dióxido de carbono y se decapitaron con pinzas de disección. Posteriormente, se cortaron las cabezas de la mosca con una incisión media sagitalmente con navajas de afeitar, separando los dos ojos y dejándolos intactos para colocarlos rápidamente en la solución fijadora durante media hora en hielo y en una campana de humos. Después de la media hora, se intercambié la solución fijadora por 400 µl de OsO₄ al 2% en buffer de cacodilatos y se dejó reposar durante dos horas en hielo. Se sustituyó el tetróxido de osmio por acetona al 30% y se colocaron los ojos en el procesador de tejidos automático Leica para pasar por un tren de deshidratación con acetonas al 30%, 50%, 70%, 90% cinco minutos en cada acetona, y 10 minutos en acetona al 100%, para finalmente dejarlas toda la noche en una solución de 50% Spurr y 50% acetona

al 100%. Al día siguiente se pasaron a solución de Spurr pura durante cuatro horas, y después fueron colocados en las cápsulas Beem con resina Spurr. Se orientaron las muestras con los ojos hacia abajo y luego se incubaron las capsulas en un horno a 65 °C durante 72 horas para que solidificaran los bloques de resina Spurr. La resina Spurr la preparamos con 7.5 gramos de 4-vinilciclohexano dióxido (ERL 4206), 19.5 gramos de anhídrido nonenilsuccínico (NSA), 3.75 gramos de resina DER 736 y 0.3 gramos de dimetiletanolamina. Se guardó la resina en un congelador a -20°C hasta su uso.

Fijación y observación en microscopio electrónico de barrido

Para observar las moscas en microscopio de barrido se anestesiaron. A las moscas que presentaban clones, se les dieron dos tratamientos: en un caso se fijaron y se procedió a realizar un secado de punto crítico, y en el otro caso las moscas anestesiadas con tratamiento térmico (en hielo) se montaron en “stubs” con pegamento de carbono y se observaron en el microscopio. En este último caso se hicieron observaciones a baja resolución, dado que a mayor resolución las muestras, que no están fijadas, se colapsan.

Las moscas que se prepararon con secado de punto crítico se trataron de la siguiente manera: bajo anestesia de atmósfera de dióxido de carbono se les realizó una incisión en la zona del cuello y de la cabeza para sacrificarlas y de esta manera sumergirlas en la misma solución fijadora que se utilizó en la fijación de ojos con tetróxido de osmio. Se dejaron reposar las muestras por al menos 3 horas en la solución fijadora, y posteriormente se cambió a acetona 100%. Las muestras deshidratadas fueron puestas en canastillas de metal con rejillas, e introducidas en un equipo de secado de punto crítico, donde se intercambié la acetona por bióxido de carbono líquido, y luego se llevó al punto crítico. Una vez secas, se colocaron en “stubs” de microscopio electrónico de barrido y se cubrieron con una fina capa de oro en un “sputter coater”. Las muestras así tratadas se pueden observar a mayor amplificación y a alta resolución.

Ambos tipos de muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo 1010 que está en el Servicio de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en el campus Juriquilla.

Fijación y cortes finos de clones mutantes en el ojo

Los bloques de Spurr con los ojos fueron cortados a distintas profundidades del ojo utilizando un microtomo Leica modelo RM2265 para obtener cortes semi-finos con navajas de vidrio de un grosor igual a una micra. Se colocaron los cortes en un portaobjetos y se fijaron con calor en una parrilla a 100°C durante un minuto. Se les colocó azul de toluidina 1% durante un minuto para teñir las estructuras celulares de los omatidios y se colocaron las muestras en la parrilla por 15 segundos aproximadamente. Se lavó el exceso de colorante con agua bidestilada, y se colocó un cubreobjetos sobre cada muestra con Entellan para poder ser observados con aceite de inmersión.

Las muestras fueron observadas en un microscopio óptico Nikon modelo Eclipse e600 y se obtuvieron fotografías con una cámara Photometrics CoolSnap cf en campo claro y en contraste de fases.

Registro y cuantificación de fotorreceptores según su fenotipo y genotipo

Con las imágenes obtenidas de los cortes finos, se buscaron zonas que se encontraran en los bordes colindantes de células silvestres (presencia de pigmento) y células mutantes (ausencia de pigmento) (Fig. 4). Se designaron cuatro categorías posibles para agrupar los fotorreceptores según su fenotipo y genotipo. Las cuatro categorías son: Silvestre/presente, Silvestre/ausente, Mutante/presente, Mutante/ausente. A cada una de las categorías se le asignó un color para llevar un registro del total de omatidios colindantes que se obtuvieron (53 omatidios) como se muestra en la figura 5. Se juntaron los datos y se cuantificaron en una tabla de Excel (Tabla 1).

Análisis del efecto de *piragua* en los fotorreceptores

Utilizando Excel, se obtuvieron las proporciones de fenotipos y genotipos en cada uno de los 7 fotorreceptores estudiados en este proyecto (Fig. 6). Posteriormente se analizó el efecto de los alelos mutantes en cada uno de los fotorreceptores cuando su genotipo es mutante, al cuantificar su presencia y ausencia; de esta forma se pudo determinar si el efecto es mayor en una célula en específico. Se corroboró que las diferencias fueran significativas mediante una prueba T de Student (* $p < .05$).

Análisis del efecto mutante de *piragua* en células vecinas

Para determinar si la expresión de un alelo mutante es capaz de afectar a otras células dentro de los omatidios de la mosca, cuantificamos y analizamos la cantidad de fotorreceptores presentes cuando los primeros en diferenciarse tienen genotipo silvestre o mutante como variables. Para esto se seleccionaron de la figura 5 aquellos omatidios que compartieran genotipo silvestre por los pares en los que se van diferenciando los fotorreceptores; siendo el primer par conformado por R3/R4, el segundo por R2/R5 y el tercero por R1/R6. De la misma manera se agruparon en los mismos pares aquellos omatidios que presentara genotipo mutante uno o ambos fotorreceptores de cada par. Por cada par se cuantificó la cantidad de fotorreceptores restantes que estuvieran presentes, tomando en cuenta las variables mutante y silvestre del par de cada grupo.

Para este análisis solo se cuantificaron los fotorreceptores que se desarrollaran después del par en el que se agruparon las células. Se realizó una prueba Mann-Whitney para corroborar si las diferencias en los grupos son significativas (* $p < .05$).

Análisis estadístico

Para analizar el efecto de *prg* en cada uno de los fotorreceptores se utilizó el programa Windows Excel, en cuál se realizó una prueba T de Student para comparar las diferencias entre el grupo mutante con su grupo control de cada uno de los fotorreceptores con sus respectivas *n*.

Para analizar las diferencias en los grupos de pares de fotorreceptores, y determinar si realmente existe un efecto de las células mutantes sobre el resto, se utilizó el software SigmaPlot 11.0. En este software se realizó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney para determinar si había diferencias entre la variable mutante y silvestre de cada par de fotorreceptores (* $p < .05$).

RESULTADOS

Descripción fenotípica de los clones mutantes usando imágenes de microscopía electrónica de barrido.

El objetivo de este trabajo fue realizar una descripción detallada de los fenotipos de clones mutantes en el tejido visual de la mosca adulta de *Drosophila melanogaster*. Para realizar una primera aproximación, obtuvimos micrografías usando microscopía electrónica de barrido de clones mutantes del alelo *prg*¹. A continuación se describen los fenotipos encontrados en las diferentes estructuras que conforman el ojo compuesto.

Fenotipos mutantes de omatidios y frons en clones de falta de función de *piragua*

Las características morfológicas que se observan en la figura 2 concuerdan con las descritas previamente (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017), en donde se observa una gran reducción en el número de cerdas sensoriales, un desarreglo en las hileras de omatidios, omatidios mal formados, agujeros en medio de los omatidios e irregularidades en las zonas clonales mutantes del ojo (Fig 2). Se observó una malformación en la parte del frons en moscas con clones mutantes. Se observa que el frons diferenciado es más corto, y la parte más distal está ocupada por tejido poco diferenciado de morfología anormal (Fig. 2D), comparado con los controles (Fig. 2A y 2B).

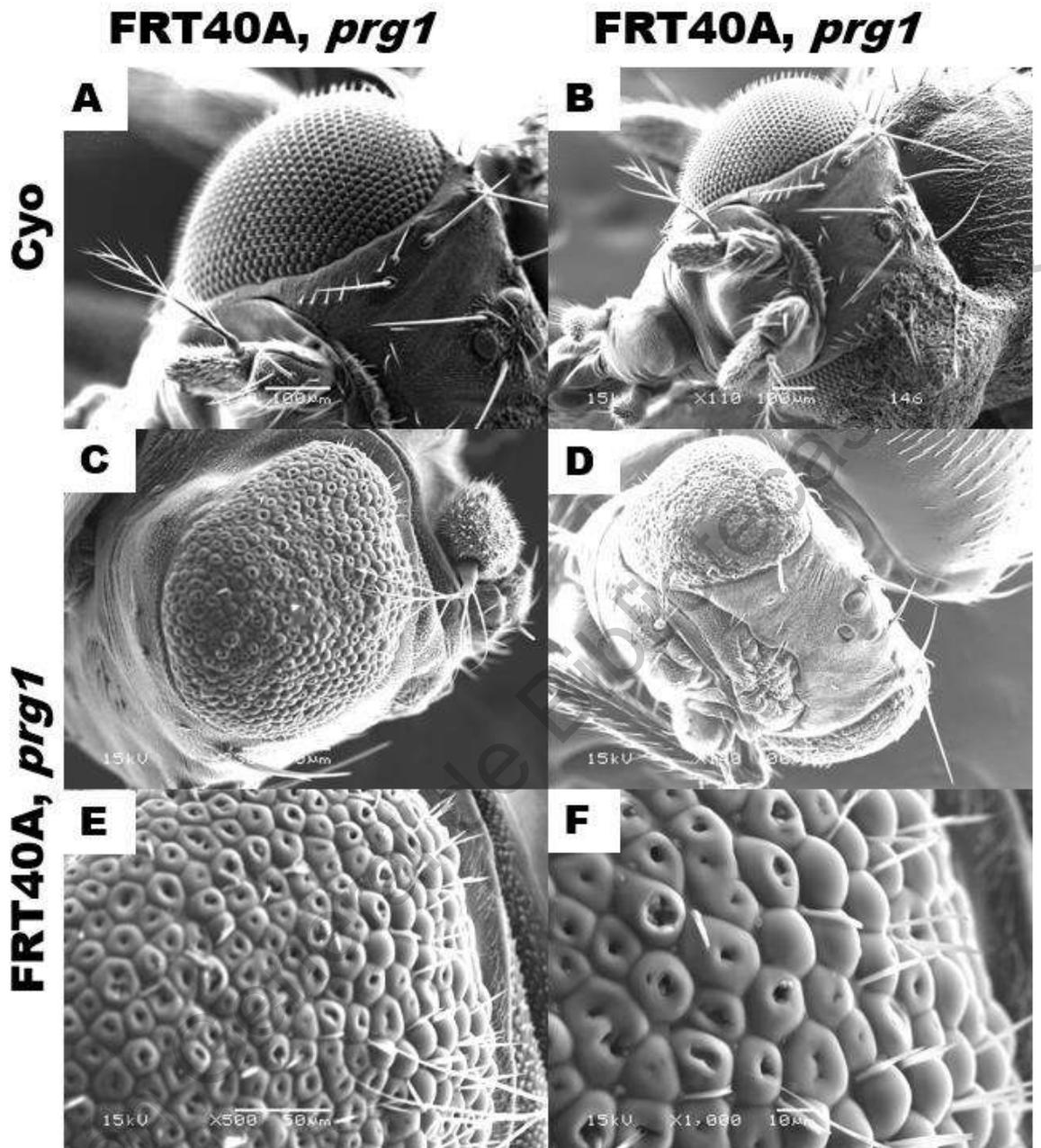


Figura 2 imágenes de ojos y cabeza de controles silvestres y de individuos con clones mutantes a *prg* (*prg¹*) obtenidas por SEM. A,B) Controles con fenotipo silvestre de los diferentes tejidos oculares de la mosca. A) muestra el ojo compuesto silvestre, y B) muestra las antenas, aristas, frons, ocelos, ojo y proboscis. C,D,E,F) defectos en el ojo generados por clones mutantes de *prg*. C) Imagen general del ojo con clones mutantes. D) Muestra la parte del frons en una mosca con clones mutantes al gen *piragua*. E y F) acercamiento a la zona del ojo compuesto de una mosca adulta, con clones mutantes al gen *piragua*. Se muestran agujeros al centro de los omatidios en la parte de la cornea de las células muantes. *El control de la Figura 1 B muestra una zona con pegamento de carbono en el ojo izquierdo, que no es el fenotipo de la mosca. Este pegamento cubre parte de la cabeza del lado izquierdo, incluyendo el ojo.

Fenotipos mutantes de mecanorreceptores (cerdas) en clones de falta de función de *piragua*

Para observar a mayor detalle y resolución la morfología de los omatidios en los clones, realizamos un secado de punto crítico de moscas obtenidas con la misma metodología utilizando el alelo *prg*¹. Como se observa en la figura 3, se pierde totalmente la forma hexagonal que presentan los omatidios en un fondo control *yw* (Fig. 3B, 3C). En las figuras 3C y 3D se muestra el agujero formado en el centro del omatidio. Se marca con flechas cerdas sensoriales que no se desarrollaron correctamente.

Los defectos observados en las cerdas del omatidio en clones mutantes fueron: la pérdida total de la cerda y el socket, cambio en la posición y orientación de los vértices del omatidio, y pérdida de la cerda con presencia del socket (Fig. 2F, 3A y 3C). Cuando el socket está presente, con la cerda o sin la cerda, ésta estructura está malformada en comparación con el silvestre (Fig. 3A y 3C).

Fenotipos mutantes de córneas en clones de falta de función de *piragua*

Por medio del secado de punto crítico y la adición de una capa de oro sobre la superficie, se pudieron observar detalles de las córneas de los omatidios. El secado de punto crítico evita deformaciones durante la deshidratación de las muestras, y el revestimiento con una capa homogénea de oro permite observar detalles a mayor aumento y resolución. De esta manera pudimos observar las estructuras llamadas “pezones” o “nano-revestimientos de la córnea” (Fig. 3E y 3F). Estas estructuras son producto de la secreción del material del lente por parte de las células de cono para formar la córnea de cada omatidio (Cagan & Ready, 1989). Los pezones del lente tienen funciones fotónicas, bactericidas, y anti-reflectantes, entre otras (Gorb & Gorb, 2018; Michail Kryuchkov et al., 2011; Mikhail Kryuchkov et al., 2020). En los omatidios mutantes, se observaron daños en el centro de los pezones e irregularidades en la disposición y distribución de los mismos comparado con las de los omatidios silvestres (Fig. 3A).

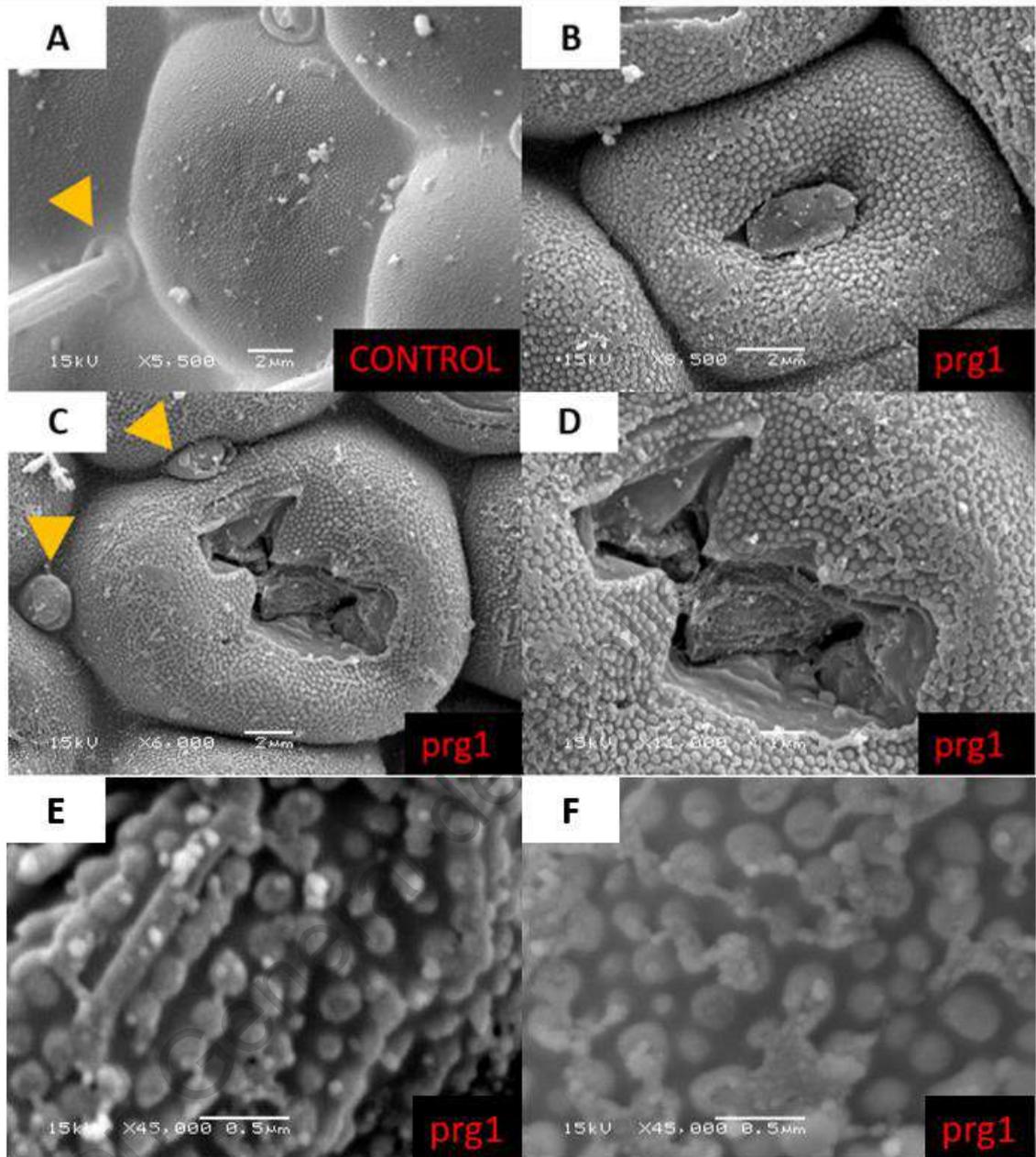


Figura 3 Imágenes de omatidios individuales obtenidas de moscas tratadas por secado de punto crítico con clones mutantes a *prg*. A) Omatidio con genotipo silvestre (flechas amarillas indican las cerdas de los omatidios). B,C,D) Omatidios individuales con genotipo mutante. B) Cambio de la forma hexagonal y presencia de un agujero al centro de un omatidio con genotipo mutante. C) Omatidio mutante con el agujero central expuesto y presencia de cerdas anormales (marcadas por flechas amarillas). D) acercamiento del omatidio C en donde resalta la profundidad del agujero central. E, F) Acercamientos a los pezones de las córneas, con deformidades y daños en su estructura. (A ambas imágenes E y F se les aplicó el filtro Sharpen-clarity, con el programa Affinity Photo de manera homogénea, para obtener una mayor nitidez).

Fenotipos mutantes de fotorreceptores en clones de falta de función de *piragua*

Además de los fenotipos descritos en (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017), y para identificar si el efecto que tiene el gen *piragua* en los fotorreceptores de la mosca adulta es distinto en cada uno de ellos, del R1 al R7, se realizaron cortes semi-finos tangenciales de ojos con clones mutantes y se buscaron en ellos omatidios que se encontraran entre el borde mutante y el silvestre (Fig. 4). Se encontraron 53 omatidios con estas características en los que se observó un claro desarreglo y ausencia de los fotorreceptores en las zonas mutantes del ojo. Posteriormente, se registró la presencia y ausencia de los fotorreceptores según su genotipo utilizando un código de colores (Fig. 5) y se cuantificaron para su análisis (Tabla. 1 y Figura. 6, 7 y 8). Encontramos que el fotorreceptor R1 fue el único que estuvo presente siempre que tuvo un genotipo silvestre (Fig. 6).

Para saber si el efecto de la mutación en *prg* es igual o diferente en todos los fotorreceptores, cuantificamos y comparamos la presencia y ausencia de ellos en un fondo mutante (Fig. 7). Los fotorreceptores R1, R2, R3, R4, R5, y R6 no presentaron diferencias significativas entre ellos en la frecuencia que presentan fenotipos mutantes cuando son homocigotos mutantes para *prg*. El fotorreceptor R7 fue el único que se vio significativamente menos afectado que el resto cuando era mutante ($p < .05$). Esto indica que, de entre todos los fotorreceptores, el R7 tiene mayor probabilidad de desarrollarse correctamente en la ausencia de *prg*, y que los requerimientos de *prg* de los fotorreceptores externos (R1-6), que son distintos al R7, son mayores para formarse correctamente. Es decir, que aunque todos los fotorreceptores estudiados requieren de *prg*, los requerimientos no son equivalentes; los fotorreceptores externos se afectan de manera equivalente debido a la falta de función de *prg*, lo que es consistente con que estos fotorreceptores son de la misma clase, expresando la misma opsina, y teniendo básicamente la misma morfología. En cambio, la clase de fotorreceptor R7, que expresa diferentes opsinas y que tiene una morfología distinta, tiene un requerimiento menor de *prg*.

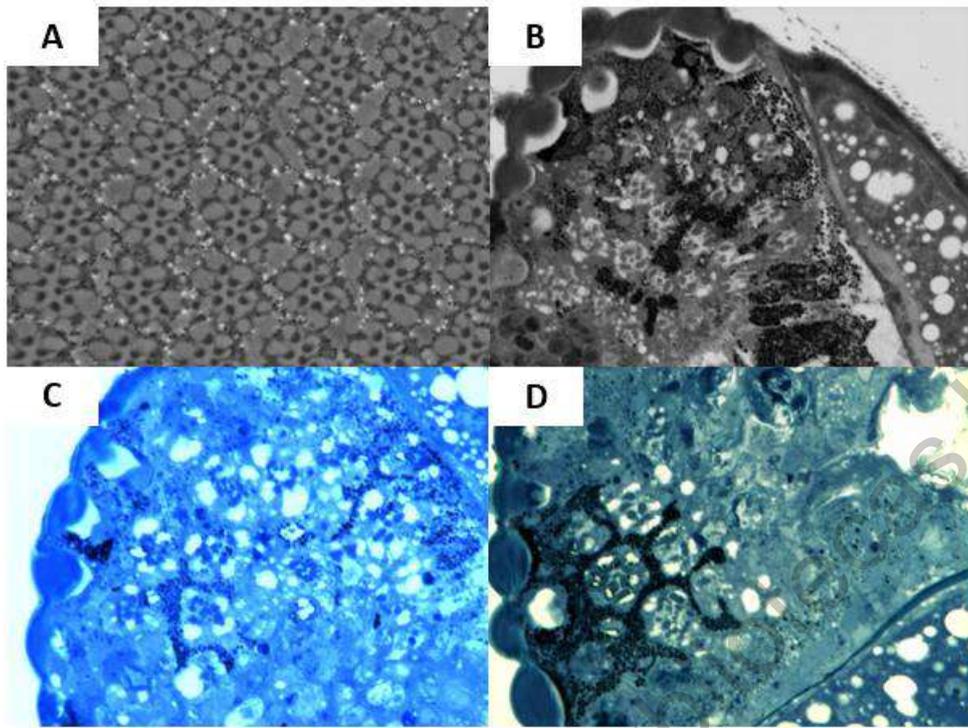


Figura 4 Cortes histológicos de ojos de moscas adultas con clones mutantes a *prg*. A) ojo de mosca con fondo *w-silvestre* visto con contraste de fases. Se observa la disposición normal de los rabdómeros de los fotorreceptores en los omatidios. B, C, D) ojos con clones mutantes para el gen *prg*, los bordes que colindan las áreas mutantes y las silvestres pueden ser distinguidas por la presencia de pigmento alrededor de la zona silvestre de los omatidios. B) Ojo con clones mutantes a contraste de fases. C y D) Ojos con clones mutantes teñidos con azul de toluidina al 1%. Se obtuvieron 53 omatidios de 18 muestras en los bordes de los clones con el tejido silvestre. Estas muestras fueron utilizadas para el registro de la presencia y ausencia de los fotorreceptores. Las muestras que no pudimos teñir con azul de toluidina al 1% fueron observados a contraste de fases para poder ver los rabdómeros de manera clara.

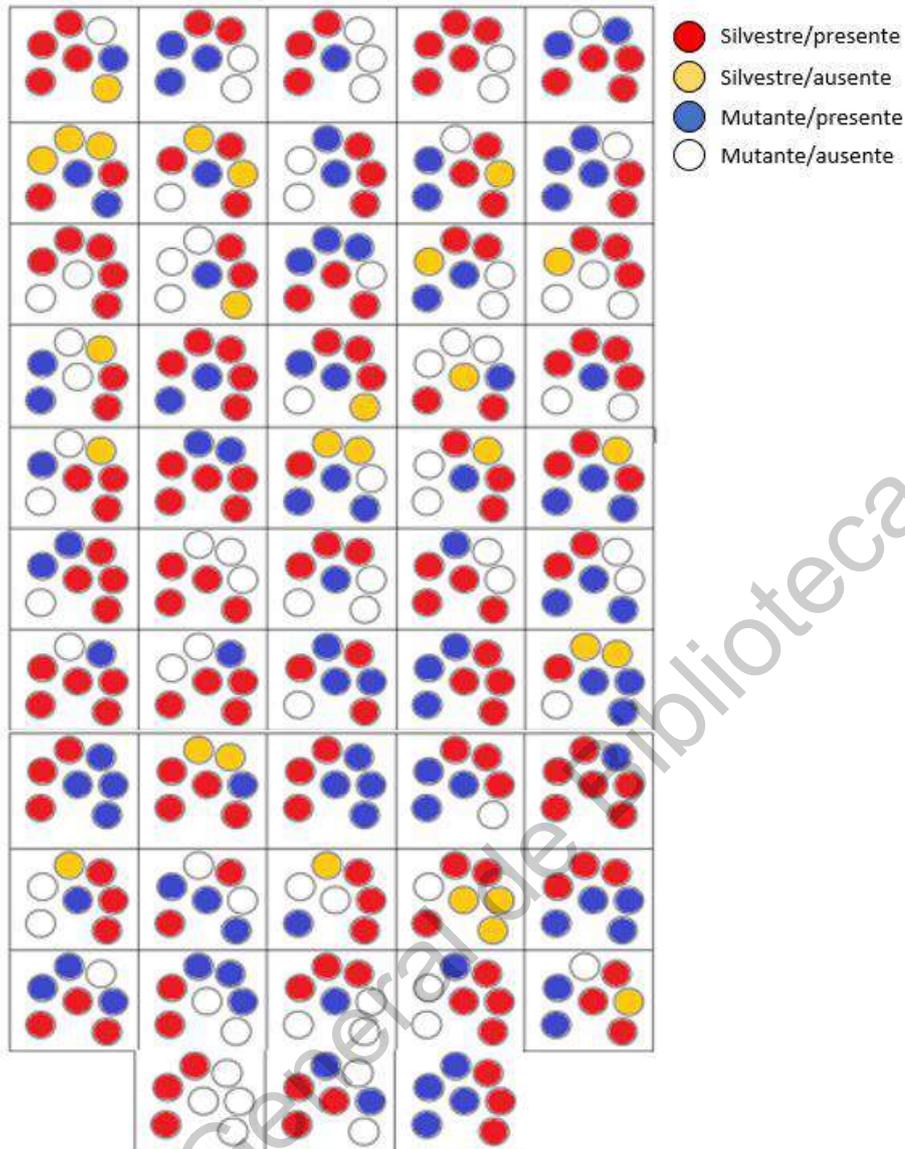


Figura 5 Representación en código de colores de los omatidios con mosaicos genéticos. Cada recuadro representa un omatidio con zonas mutantes y zonas silvestres. Los círculos de colores representan los fotorreceptores enumerados desde la izquierda inferior (R1) hacia la derecha, siendo el de la derecha inferior (R6); el círculo del centro representa al fotorreceptor R7. Rojo=Silvestre/Presente, Amarillo=Silvestre/Ausente, Azul=Mutante/Presente, Blanco=Mutante/Ausente. Se encontraron 53 omatidios que cumplieran con las características determinadas: que se encontraran en el borde entre el clon mutante y células silvestres, y presentaran zonas con pigmento y zonas sin pigmento.

Tabla 1 Valores en la presencia y ausencia de cada rabdómero según su genotipo. Se cuantificó la presencia y ausencia de cada uno de los 7 fotorreceptores (lado derecho) según el genotipo que presentaban. Esta clasificación se determinó por la presencia de pigmento en los bordes del omatidio para las células silvestres y su ausencia en las mutantes (marcados con w-). Un total de 53 omatidios fueron seleccionados para la cuantificación en la que se obtuvieron 196 fotorreceptores silvestres y 175 mutantes.

	Silvestre/Presente	Silvestre/Ausente	Mutante/Presente	Mutante/Ausente	Total
1	22	0	15	16	53
2	26	3	15	9	53
3	22	7	13	11	53
4	26	8	9	10	53
5	25	4	11	13	53
6	28	4	9	12	53
7	19	2	26	6	53
Total	168	28	98	77	371

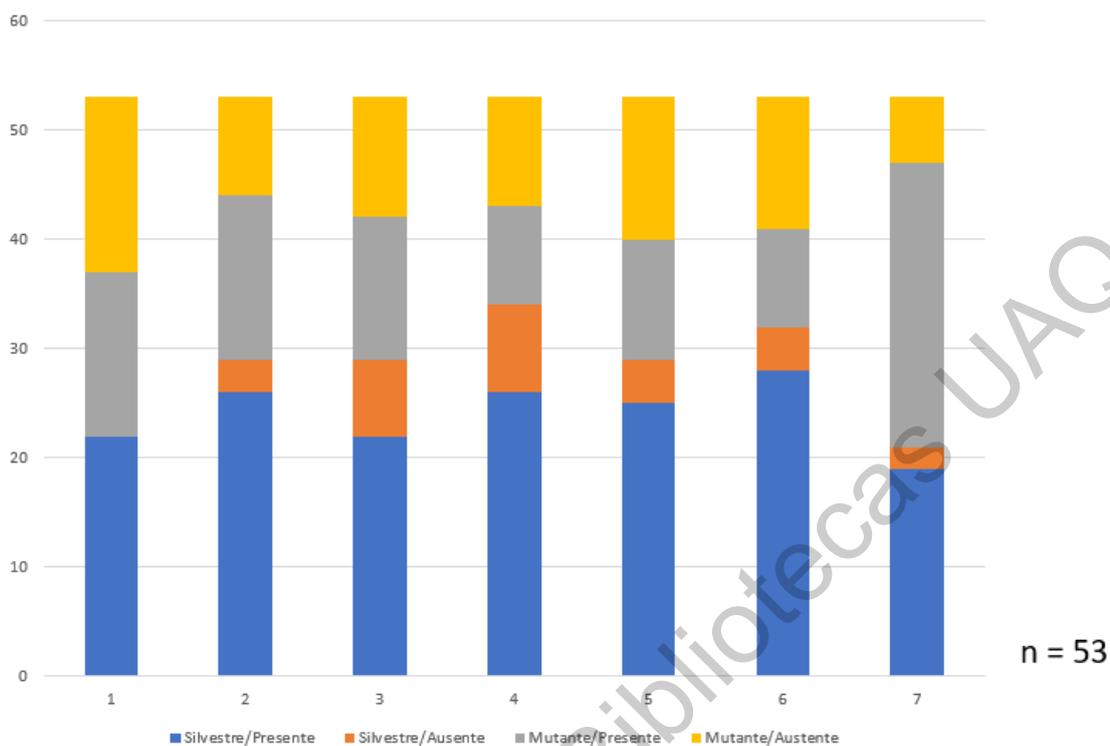


Figura 6 Cuantificación de la presencia y ausencia de los fotorreceptores según su genotipo. Porcentajes de presencia y ausencia de cada fotorreceptor, del R1 al R7 según su fenotipo (n=53). Del total de omatidios se muestran por colores.

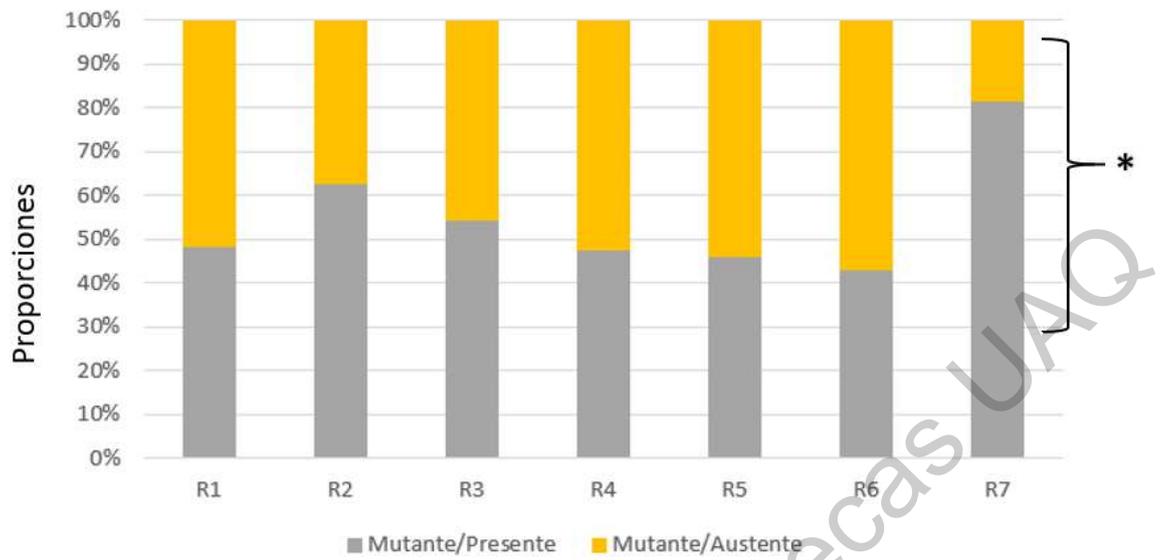


Figura 7 Porcentajes de presencia y ausencia de los fotorreceptores del R1 al R7 cuando son mutantes en el omatidio. R1 n=31; R2 n=24; R3 n=24, R4 n=19; R5 n=24; R6 n= 21, R7 n= 32. Para medir el efecto de mutaciones para *piragua* en cada uno de los fotorreceptores, seleccionamos aquellos que no mostraran pigmento en el borde y cuantificamos su presencia y ausencia. * prueba T ($p < .05$).

***piragua* actúa de forma no autónoma en la célula**

Con el fin de estudiar si el efecto que tiene *prg* sobre las células se da de una manera autónoma, cuantificamos la ausencia de receptores en distintos fondos. Tomando en cuenta el orden en el que los fotorreceptores se forman, dividimos los omatidios en grupos. Se dividieron por pares (cada par se diferencian al mismo tiempo) de acuerdo con el orden en el que se van diferenciando durante el desarrollo. Tenemos así 3 grupos de omatidios: el R3 y R4, el R2 y R5, y finalmente el R1 y R6. Estos grupos, al mismo tiempo, fueron subdivididos en dos: aquellos que tuvieran uno o ambos fotorreceptores mutantes (grupo mutantes) y aquellos que tuvieran ambos fotorreceptores silvestres (grupo silvestre). Una vez divididos los omatidios se registraron los fotorreceptores ausentes de todos aquellos que se formaran posteriormente a los seleccionados en cada grupo.

Una vez cuantificados los fotorreceptores ausentes de cada grupo, se obtuvo un promedio de cuantas ausencias de fotorreceptores se presentaban en cada ambiente y esto se graficó (Fig. 8). En los grupos R2 y R5, y R1 y R6 no se encontraron diferencias significativas entre los subgrupos silvestres y mutantes. El grupo R3 y R4 mostró una diferencia significativa (prueba Mann-Whitney, $p < .05$) perdiendo casi el doble de fotorreceptores en un fondo silvestre comparado al mutante. Esto indica que el primer par de fotorreceptores en diferenciarse tiene un efecto negativo sobre el resto cuando su genotipo es silvestre y están presentes en un ambiente con clones mutantes. Es decir, que aún entre los fotorreceptores externos, R1-6, la afectación de los que primero se forman (R3 y 4) influye en el destino de los fotorreceptores que se diferencian subsecuentemente, aunque la mayoría (R1, 2, 5 y 6) sean externos.

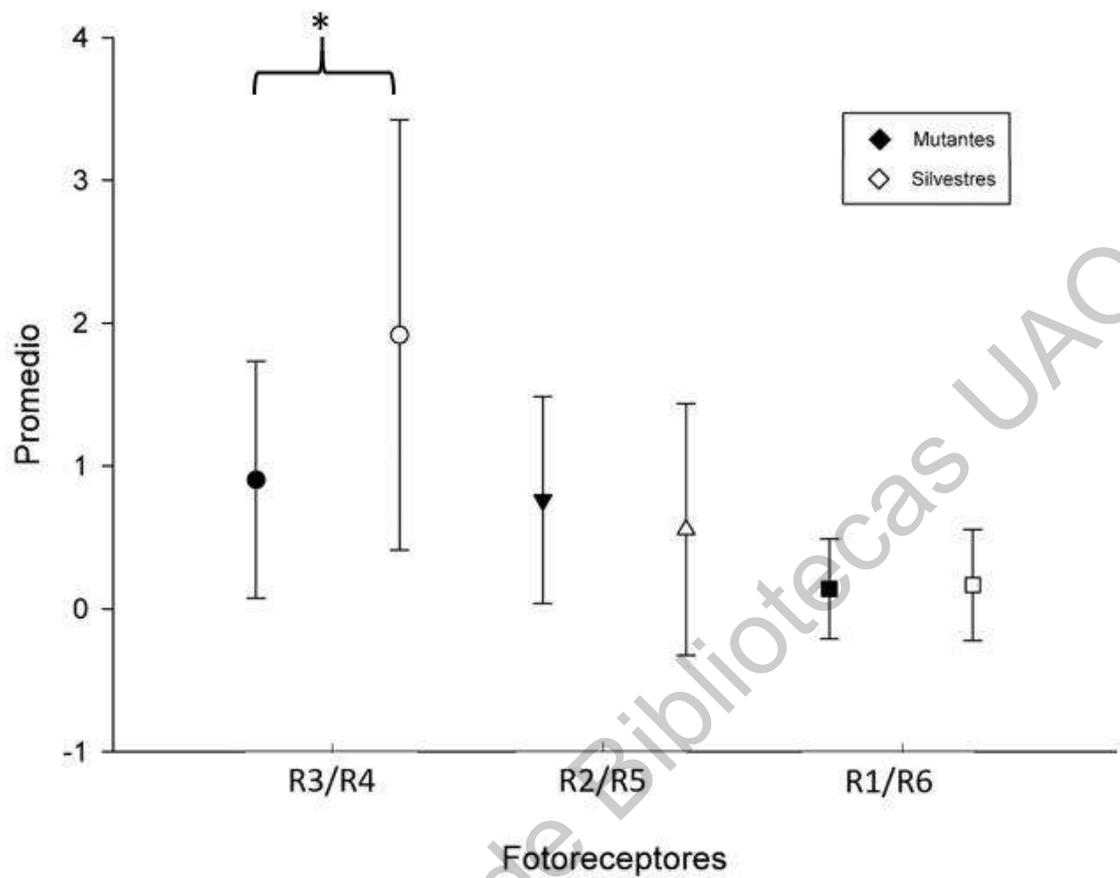


Figura 8 Pérdida de fotorreceptores por pares y genotipo. Los omatidios seleccionados se dividieron en grupos de acuerdo con los pares de fotorreceptores mostrados en el eje y. Los subgrupos de mutantes (azul) son aquellos omatidios que presentaran uno o ambos fotorreceptores mutantes. Los subgrupos silvestres (naranja) son aquellos omatidios que presentara ambos fotorreceptores silvestres. * Prueba Mann-Whitney ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Fenotipos en las células del cono, frons y cerdas oculares

En este trabajo se reportan fenotipos mutantes en las estructuras externas del tejido visual mutante para *prg* de moscas adultas, algunos de los cuales se habían notado anteriormente, y que concuerdan con los reportados por Nazario-Yepiz y Riesgo-Escovar (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017) y otros no descritos previamente, que se describen aquí por primera vez. De estos fenotipos resaltan la córnea, cerdas oculares y el frons.

En las cerdas oculares observamos fenotipos como: pérdida total, deformaciones, desarreglo en su orientación y posición, y presencia únicamente del socket de cerda. Fenotipos similares en las cerdas oculares se observaron en mutantes al gen *bereft* en el 2002 por Hardiman K. y colaboradores. El gen *bereft* se expresa en los órganos sensoriales externos de *D. melanogaster* y se ha mostrado que está directamente relacionado con la morfogénesis de las cerdas oculares y otros órganos sensoriales externos (Hardiman et al., 2002). Si bien los fenotipos mutantes de *prg* en estas estructuras concuerdan con los reportados con mutantes de *bereft*, es necesario realizar más trabajos para mostrar si tiene alguna función directa para formar las cerdas oculares, y si los dos genes interactúan genéticamente.

En las células mutantes de la córnea del ojo adulto observamos la misma formación de un agujero en la zona central de los omatidios previamente reportada por Nazario-Yepiz y Riesgo-Escovar (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017). Sin embargo, al realizar un tratamiento de secado de punto crítico y cubrir las muestras con una capa de oro en nuestras muestras, pudimos observar defectos en los pezones de los omatidios. Los pezones de los omatidios mostraron una especie de agujero en el centro y una aparente desorganización comparada con un omatidio control (OrR). Estas microestructuras que se forman en la córnea de los invertebrados son producto de la secreción del material del lente por parte de las células del cono (Brennan & Moses, 2000), lo que podría indicar que *prg* está afectando este proceso en las células del cono. Actualmente se estudian estos arreglos en *D.*

melanogaster utilizando tecnología de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) (Michail Kryuchkov et al., 2011; Mikhail Kryuchkov et al., 2020) y la información que actualmente existe de ellos es escasa. Un trabajo en mutantes de *prg* utilizando (AFM) podría brindar resultados interesantes en cuanto a la formación de estos arreglos en la córnea.

Los efectos de la mutante al gen *prg* en la córnea y sus microestructuras pueden indicar defectos en las células del cono y células pigmentarias por su implicación en la formación del lente (Cagan & Ready, 1989). En este trabajo pudimos observar efectos aberrantes en todo el omatidio, incluyendo las células del cono mediante microscopía óptica, en las zonas mutantes del ojo adulto en comparación con el control (w-). Esto apunta a que el gen *piragua* se requiere también para la formación de las células del cono durante el desarrollo del ojo, además de las cerdas mecanorreceptoras referidas arriba.

Los cambios en la morfología del frons en moscas con clones mutantes de *prg* reportados en este trabajo, por el momento son preliminares y se requiere realizar nuevos estudios enfocados en la expresión de este gen en la zona para tener una mejor aproximación de cuál podría ser su función en la formación del frons. Sin embargo, los fenotipos reportados implican que la estructura también requiere de *prg*, de modo que todas las estructuras externas del ojo, así como el tejido circundante (frons), todos, se ven afectados por la falta de función de *prg*.

Efecto de *piragua* en la determinación de los fotorreceptores

En este trabajo se encontró que el fotorreceptor R7 es menos sensible a los efectos mutantes del gen *piragua* en comparación con el resto de los fotorreceptores. Los fotorreceptores del omatidio son determinados a partir del fotorreceptor R8, siendo ésta la célula fundadora indispensable para dar origen al resto de los fotorreceptores (Brennan & Moses, 2000). Para que el primer fotorreceptor (R8) se pueda diferenciar, es necesaria la expresión de la proteína proneural *Atonal (Ato)* y *Daughterless (Da)* en la zona anterior del surco morfogenético en el disco del ojo-antena, siendo la vía de Notch el

principal regulador de su expresión (Brennan & Moses, 2000; Brown et al., 1996; Jarman et al., 1995). El resto de los fotorreceptores se diferencian en pares empezando por el R3 y R4, luego R2 y R5, R1 y R6, y finalmente se forma el fotorreceptor central R7. Todos los fotorreceptores, a excepción del R8, requieren la actividad del receptor del factor de crecimiento epidermal (*Egfr*), la fosforilación de MAP quinasas (MAPK) y activación de Ras para poder diferenciarse; en otras palabras, todos requieren de la vía de las MAPK para diferenciarse. Los fotorreceptores R1-R6 reciben la señal del ligando secretado *Spitz* (*Sp*), el cual activa al receptor de tirosín-cinasa DER (Drosophila Epidermal growth factor Receptor, o *Egfr*), que es indispensable para la formación de estos fotorreceptores, siendo regulados negativamente por el ligando inhibidor de *Egfr*, *Argos* (*Aos*) (Brennan & Moses, 2000; Rutledge et al., 1992; Tio & Moses, 1997). En contraste, para diferenciarse, el R7 necesita la activación en dos momentos del desarrollo de la cascada de señalización MAPK, la primera vez activando la DER y la segunda mediante la unión del ligando *Bride of sevenless*, que es un ligando membranal expresado en el R8, a su receptor *Sevenless* presente en las membranas plasmáticas del futuro R7 (Rubin, 1991); y una señal de Delta inducida por los R6 y R1 para unirse al receptor de Notch en el precursor de R7 y poder diferenciarse (Brennan & Moses, 2000; Tomlinson & Struhl, 2001).

prg, al ser un factor de transcripción, pudiera estar influenciando la formación de los fotorreceptores a nivel del ligando que utilizan para su especificación. Una de las maneras en la que esto puede ocurrir es incrementando de manera indirecta la cantidad de ligando en el medio tras inducir muerte celular en células receptoras de él, o en otras células productoras; o regulando la transcripción de los ligandos utilizados, directa o indirectamente. De esta manera se podría explicar el efecto mutante de *prg* diferencialmente en los fotorreceptores. Estudios enfocados en la transcriptómica de *prg* podrán generar información detallada de la función específica de esta proteína en el desarrollo del tejido visual.

Otra particularidad que posee el fotorreceptor R7 durante su desarrollo, es la disponibilidad de un grupo de células con el potencial de generar receptores

tipo R7. Este grupo de células, llamado grupo de equivalencia es generado en la segunda ola mitótica del disco imaginal y dan origen a los fotorreceptores R1, R6, R7 y a las células del cono (Crew et al., 1997; Dickson, 1995; Shi & Noll, 2009). El grupo de equivalencia de R7 consta de 5 células capaces de diferenciarse en fotorreceptores R7. R1 y R6 evitan convertirse en R7 por la presencia del receptor a hormonas esteroides *seven-up* (Crew et al., 1997; Mlodzik et al., 1990). Las células del cono evitan diferenciarse en fotorreceptores evitando el contacto con R8, de esta forma *boss* es incapaz de activar a *sevenless* y comenzar la diferenciación de R7. En base a esta explicación se ha encontrado que con un fondo mutante de *sevenless*, R7 se desarrolla cómo célula de cono y la activación ectópica de *sevenless* lleva a que las células de cono se desarrollen como fotorreceptores R7 (Dickson, 1995; Dickson et al., 1992; Tomlinson & Ready, 1987). La existencia del grupo de equivalencia de R7 puede ser una explicación del porqué el efecto mutante de *prg* es menor en el fotorreceptor R7, pues este tiene células de “reserva” para poder formarse. Sin embargo, es necesaria la señal de *boss* por parte del R8. Este origen distinto puede explicar porqué el R7 es menos sensible a la falta de función de *prg*.

En el estudio presente no se pudieron observar los efectos que la mutante de *prg* pudiera tener en el fotorreceptor fundador (R8), porque el rabdómero está localizado por debajo del del R7 y no aparece en cortes tangenciales superficiales (el tipo de cortes que se hicieron); por esa misma razón, no se podrían observar ambos fotorreceptores (R7 y R8). Para poder caracterizarlo, sugerimos continuar este trabajo en explantes ex-vivo de discos imaginales de ojo antena, realizar cortes a mayor profundidad para estudiar el R8 y centrar los estudios en el grupo de equivalencia de R7.

***piragua* en la competencia celular**

Los resultados de este trabajo mostraron que el genotipo silvestre de los dos fotorreceptores R3 y R4, generan una mayor pérdida de fotorreceptores en omatidios con clones mutantes. Este par de células, son los primeros fotorreceptores en diferenciarse después del R8 fundador (Bate & Arias, 1994; Brennan & Moses, 2000), requieren la activación de la vía MAPK a través del

ligando *spitz*, y una vez desarrollados, se inactiva al receptor por el ligando inactivador de EgfR, *argos* (Brennan & Moses, 2000; Freeman, 1997). En un entorno mutante, cómo es en los clones de *prg* en este trabajo, pueden generarse un ambiente adverso para el desarrollo de las células presentes, y de esta forma generar un proceso de competencia celular diferente al normal.

La competencia celular es una interacción entre células en la que se seleccionan a las más aptas y se eliminan a las menos aptas (Di Gregorio et al., 2016; Morata & Ripoll, 1975). La interacción de *prg* con *flw* publicada en 2017 por Nazario-Yepiz y Riesgo Escovar (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017) muestra una función directa del gen *prg* en la competencia celular; puesto que *flw* es el encargado de formar un código extracelular capaz de informar a las células vecinas la capacidad de otras para desarrollarse en el entorno (Casas-Tinto et al., 2011; Christa Rhiner et al., 2010).

La competencia celular puede trabajar de dos principales maneras, ya sea seleccionando en contra las células que simplemente son menos aptas que las vecinas; o seleccionando aquellas que, por algún cambio en su fisiología, adquieren mejores aptitudes que las vecinas (Di Gregorio et al., 2016). En el caso de nuestro trabajo estamos generando un ambiente con células menos aptas en lugar de generar células super competidoras. Los fotorreceptores R3 y R4, al tener un fenotipo silvestre y ser las primeras en diferenciarse, pudieran estar usando el ligando *Spitz* y promoviendo la eliminación de células menos aptas, que en este caso serían los fotorreceptores mutados a *prg*.

El simple retraso en la diferenciación de las otras células precursoras a fotorreceptores podría dar tiempo a la acumulación del ligando inhibitorio *Argos*, algo que evitaría la diferenciación de estos otros fotorreceptores, y dado que el R7 requiere de la estimulación con otro sistema diferente al par *Spitz/DER*, esto podría explicar porque es menos sensible a la falta de *prg*. Se reportó que el cerrado dorsal embrionario para mutantes de *prg* tarda más que en los controles, y esto ocasiona que no se cierre bien o no se alcance a cerrar completamente (Nazario-Yepiz & Riesgo-Escovar, 2017). Si algo semejante ocurre durante la formación del ojo, esto podría explicar cabalmente el fenotipo

observado. Se sabe que el surco morfogenético, que es donde se inicia la diferenciación de los omatidios, se “nueve” de posterior a anterior, y que cada hilera tarda aproximadamente dos horas en pasar por la etapa del surco morfogenético, de tal suerte que retrasos en los procesos de diferenciación, a manera semejante de lo que ocurre con el cerrado dorsal, podrían causar una cascada de fenotipos, y explicar el total de los fenotipos mutantes observados en el ojo en este estudio. Como dice uno de los títulos de los artículos de la bibliografía, “timing is everything” (Brennan & Moses, 2000).

Sin embargo, al utilizar la tecnología FLP-FRT anclada al promotor de *eyeless*, no existe un control en la formación de los clones y estos se generan de forma aleatoria. Para corroborar estos resultados sería necesario realizar más repeticiones y obtener más omatidios en los que el R3 y R4 sean silvestres con mutantes en el resto, o generar clones en precursores de células fotorreceptoras específicas. Existen promotores de genes que se expresan diferencialmente en algunas células fotorreceptoras, pero esto requiere el aislamiento de estas regiones promotoras, la generación de construcciones que expresen a FLP bajo estos promotores, etc.

CONCLUSIONES

En este trabajo se obtuvo información valiosa sobre la función y efecto que tiene el gen *piragua* en el desarrollo del tejido ocular de *Drosophila melanogaster*. El efecto de mutaciones para este gen reduce la presencia del fotorreceptor R7 durante el desarrollo de los omatidios en el ojo compuesto de la mosca de la fruta. También encontramos nuevos fenotipos en las diferentes células y estructuras que conforman el ojo compuesto y el tejido visual, como son las cerdas oculares, las células de cono, la córnea y el frons. Las mutantes en *piragua* formaron agujeros en el centro del omatidio, malformaciones o pérdida en las cerdas oculares, defectos en los pezones de la córnea, cambio en la forma de los omatidios y una hendidura en el frons de la cabeza. Esto abre la puerta a que futuros trabajos puedan ser enfocados en otras estructuras y no únicamente a los fotorreceptores. El efecto mutante de *piragua* también se

puede ver potenciado por células silvestres generando un proceso de competencia celular, específicamente por parte de las células R3 y R4.

Al mismo tiempo, los resultados de este trabajo suman información sobre las diversas funciones que pueden llevar a cabo los factores de transcripción con dedos de zinc. Entender la forma en la que estas proteínas trabajan a nivel celular y en que procesos se pueden involucrar ayudarán a comprender la función de una de las familias de proteínas más abundantes en los animales.

PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

En el presente trabajo de tesis se encontró un efecto negativo del gen *piragua* mutado en el fotorreceptor R7 (y los fotorreceptores R1-6); sin embargo, no pudimos observar el primer fotorreceptor diferenciado (R8) por la profundidad a la que este se encuentra en cada uno de los omatidios. Realizar cortes de mayor profundidad podrán generar la información necesaria para afirmar o descartar un efecto potenciado en este fotorreceptor restante.

Aquí describimos un defecto en los pezones de la córnea que no se había encontrado antes. Las técnicas empleadas en este trabajo no nos permitieron un mayor acercamiento a estas estructuras al realizar microscopía de barrido. Para poder obtener más información del arreglo y posible función de los pezones de la córnea se deberían realizar observaciones de las moscas mutantes a *piragua* con Microscopía de Fuerza Atómica.

Una de las principales aportaciones del presente trabajo fue la determinación del efecto adverso que tienen las células mutadas sobre el resto de las vecinas en los cortes de los omatidios. Sin embargo, la forma en la que esto se logra sigue siendo una incógnita. Actualmente existe un gran arsenal de tecnologías que nos permiten marcar componentes clave de vías de señalización que pudieran estar siendo afectadas por la mutante del gen *prg*. Al ser un factor de transcripción, *prg* debería estar regulando la expresión de genes clave de su misma vía o vías de señalización alternas que puedan causar un efecto en células vecinas. Las vías de señalización descritas para muerte celular son

candidatos directos para continuar con estos estudios. Sugiero continuar este trabajo marcando proteínas clave de muerte celular con fluoróforos para ser observados al microscopio confocal y cuantificar la presencia o ausencia de estas proteínas en un fondo mutante a *piragua* en el ojo adulto de la mosca.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

BIBLIOGRAFÍA

- Abbehausen, C. (2019). Zinc finger domains as therapeutic targets for metal-based compounds-an update. In *Metallomics* (Vol. 11, Issue 1, pp. 15–28). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c8mt00262b>
- Ashburner, M. (1989). *Drosophila. A laboratory handbook*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19900599002>
- Baker, N. E. (2001). Cell proliferation, survival, and death in the *Drosophila* eye. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 12(6). <https://doi.org/10.1006/scdb.2001.0274>
- Bate, M; Arias, A. (1994). The development of *Drosophila melanogaster*. *Trends in Genetics*, 10(8). [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(90\)90017-z](https://doi.org/10.1016/0168-9525(90)90017-z)
- Beira, J. V., & Paro, R. (2016). The legacy of *Drosophila* imaginal discs. In *Chromosoma* (Vol. 125, Issue 4). <https://doi.org/10.1007/s00412-016-0595-4>
- Bier, E. (2005). *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/nrg1503>
- Brayer, K. J., Kulshreshtha, S., & Segal, D. J. (2008). The protein-binding potential of C2H2 zinc finger domains. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 51(1). <https://doi.org/10.1007/s12013-008-9007-6>
- Brennan, C. A., & Moses, K. (2000). Determination of *Drosophila* photoreceptors: Timing is everything. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 57, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/PL00000684>
- Brown, N. L., Paddock, S. W., Sattler, C. A., Cronmiller, C., Thomas, B. J., & Carroll, S. B. (1996). Daughterless is required for *Drosophila* photoreceptor cell determination, eye morphogenesis, and cell cycle progression. *Developmental Biology*, 179(1). <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0241>

- Brown, R. S. (2005). Zinc finger proteins: Getting a grip on RNA. In *Current Opinion in Structural Biology* (Vol. 15, Issue 1 SPEC. ISS., pp. 94–98). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.01.006>
- Cagan, R. L., & Ready, D. F. (1989). The emergence of order in the Drosophila pupal retina. *Developmental Biology*, 136(2). [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(89\)90261-3](https://doi.org/10.1016/0012-1606(89)90261-3)
- Casas-Tinto, S., Torres, M., & Moreno, E. (2011). The flower code and cancer development. *Clinical and Translational Oncology*, 13(1). <https://doi.org/10.1007/s12094-011-0610-4>
- Cassandri, M., Smirnov, A., Novelli, F., Pitolli, C., Agostini, M., Malewicz, M., Melino, G., & Raschellà, G. (2017). Zinc-finger proteins in health and disease. In *Cell Death Discovery* (Vol. 3, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.71>
- Chou, T. Bin, & Perrimon, N. (1996). The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in Drosophila melanogaster. *Genetics*, 144(4).
- Chou, T. B., & Perrimon, N. (1992). Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in drosophila. *Genetics*, 131(3).
- Chung, H. R., Schäfer, U., Jäckle, H., & Böhm, S. (2002). Genomic expansion and clustering of ZAD-containing C2H2 zinc-finger genes in Drosophila. In *EMBO Reports* (Vol. 3, Issue 12). <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf243>
- Crew, J. R., Batterham, P., & Pollock, J. A. (1997). Developing compound eye in lozenge mutants of Drosophila: Lozenge expression in the R7 equivalence group. *Development Genes and Evolution*, 206(8). <https://doi.org/10.1007/s004270050079>
- De La Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P., & Johnston, L. A. (2004). Drosophila myc regulates organ size by inducing cell competition. *Cell*, 117(1), 107–116. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00214-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00214-4)

- Di Gregorio, A., Bowling, S., & Rodriguez, T. A. (2016). Cell Competition and Its Role in the Regulation of Cell Fitness from Development to Cancer. In *Developmental Cell* (Vol. 38, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.08.012>
- Dickson, B. (1995). Nuclear factors in sevenless signalling. In *Trends in Genetics* (Vol. 11, Issue 3). [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)89011-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)89011-3)
- Dickson, B., Sprenger, F., Morrison, D., & Hafen, E. (1992). Raf functions downstream of Ras1 in the Sevenless signal transduction pathway. *Nature*, 360(6404), 600–603. <https://doi.org/10.1038/360600a0>
- Franke, W. W., Krien, S., & Brown, R. M. (1969). Simultaneous glutaraldehyde-osmium tetroxide fixation with postosmication. *Histochemie*, 19(2). <https://doi.org/10.1007/bf00281096>
- Freeman, M. (1997). Cell determination strategies in the Drosophila eye. In *Development* (Vol. 124, Issue 2).
- Garcia-Bellido, A., & Dapena, J. (1974). Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in Drosophila. *MGG Molecular & General Genetics*, 128(2), 117–130. <https://doi.org/10.1007/BF02654485>
- Garcia-Bellido, A., & Merriam, J. R. (1969). Cell lineage of the imaginal discs in Drosophila gynandromorphs. *Journal of Experimental Zoology*, 170(1), 61–75. <https://doi.org/10.1002/jez.1401700106>
- Golic, K. G., & Lindquist, S. (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the drosophila genome. *Cell*, 59(3). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90033-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90033-0)
- Gorb, S., & Gorb, E. (2018). *Functional surfaces in biology III: diversity of the physical phenomena*. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-319-74144-4.pdf>
- Greenspan, R. J. (1997). Fly pushing: The theory and practice of Drosophila

genetics. *Trends in Genetics*, 13(10). [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(97\)89749-1](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(97)89749-1)

Grishin, N. V. (2001). Treble clef finger - A functionally diverse zinc-binding structural motif. *Nucleic Acids Research*, 29(8). <https://doi.org/10.1093/nar/29.8.1703>

Hardiman, K. E., Brewster, R., Khan, S. M., Deo, M., & Bodmer, R. (2002). The bereft gene, a potential target of the neural selector gene cut, contributes to bristle morphogenesis. *Genetics*, 161(1). <https://doi.org/10.1093/genetics/161.1.231>

Jarman, A. P., Sun, Y., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (1995). Role of the proneural gene, atonal, in formation of Drosophila chordotonal organs and photoreceptors. *Development*, 121(7).

Jauch, R., Bourenkov, G. P., Chung, H. R., Urlaub, H., Reidt, U., Jäckle, H., & Wahl, M. C. (2003). The zinc finger-associated domain of the Drosophila transcription factor grauzone is a novel zinc-coordinating protein-protein interaction module. *Structure*, 11(11). <https://doi.org/10.1016/j.str.2003.09.015>

Jennings, B. H. (2011). Drosophila-a versatile model in biology & medicine. In *Materials Today* (Vol. 14, Issue 5). [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70113-4](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70113-4)

Kankel, D., biology, J. H.-D., & 1976, undefined. (n.d.). Fate mapping of nervous system and other internal tissues in genetic mosaics of Drosophila melanogaster. *Elsevier*. Retrieved March 25, 2021, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0012160676900415>

Kenyon, K. L., Ranade, S. S., Curtiss, J., Mlodzik, M., & Pignoni, F. (2003). Coordinating proliferation and tissue specification to promote regional identity in the Drosophila head. *Developmental Cell*, 5(3). [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00243-0](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00243-0)

- Kasinathan, B., Colmenares, S. U., McConnell, H., Young, J. M., Karpen, G. H., & Malik, H. S. (2020). Innovation of heterochromatin functions drives rapid evolution of essential *zad-znf* genes in *Drosophila*. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.63368>
- Krishna, S. S. (2003). Structural classification of zinc fingers: SURVEY AND SUMMARY. *Nucleic Acids Research*, 31(2). <https://doi.org/10.1093/nar/gkg161>
- Kryuchkov, Michail, Katanaev, V. L., Enin, G. A., Sergeev, A., Timchenko, A. A., & Serdyuk, I. N. (2011). Analysis of micro- and Nano-Structures of the corneal surface of *Drosophila* and its mutants by atomic force microscopy and optical diffraction. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022237>
- Kryuchkov, Mikhail, Bilousov, O., Lehmann, J., Fiebig, M., & Katanaev, V. L. (2020). Reverse and forward engineering of *Drosophila* corneal nanocoatings. *Nature*, 585, 383. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2707-9>
- Malartre, M. (2016). Regulatory mechanisms of EGFR signalling during *Drosophila* eye development. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 73, Issue 9). <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2153-x>
- Merino, M. M., Rhiner, C., Lopez-Gay, J. M., Buechel, D., Hauert, B., & Moreno, E. (2015). Elimination of unfit cells maintains tissue health and prolongs lifespan. *Cell*, 160(3), 461–476. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.017>
- Miller, J., McLachlan, A. D., & Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *The EMBO Journal*, 4(6). <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1985.tb03825.x>
- Mlodzik, M., Baker, N. E., & Rubin, G. M. (1990). Isolation and expression of *scabrous*, a gene regulating neurogenesis in *Drosophila*. *Genes and Development*, 4(11). <https://doi.org/10.1101/gad.4.11.1848>
- Morata, G., & Ripoll, P. (1975). Minutes: Mutants of *Drosophila* autonomously

affecting cell division rate. *Developmental Biology*, 42(2), 211–221.
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90330-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90330-9)

Moreno, E., & Basler, K. (2004). dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell*, 117(1). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00262-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00262-4)

Moreno, E., Basler, K., & Morata, G. (2002). Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development. *Nature*, 416(6882). <https://doi.org/10.1038/416755a>

Nazario-Yepiz, N. O., & Riesgo-Escovar, J. R. (2017). *piragua* encodes a zinc finger protein required for development in *Drosophila*. *Mechanisms of Development*, 144. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2016.12.003>

Nazario-Yepiz, N. O. (2018) Caracterización del ge *piragua* (*prg*) en *Drosophila melanogaster*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Newsome, T. P., Åsling, B., & Dickson, B. J. (2000). Analysis of *Drosophila* photoreceptor axon guidance in eye-specific mosaics. *Development*, 127(4).

Nöthiger, R. (2002). Ernst Hadorn, a pioneer of developmental genetics. *The International Journal of Developmental Biology*, 46(1). <https://doi.org/10.1387/ijdb.11902684>

Nüsslein-volhard, C., & Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *drosophila*. *Nature*, 287(5785), 795–801. <https://doi.org/10.1038/287795a0>

Oliver, E. R., Saunders, T. L., Tarlé, S. A., & Glaser, T. (2004). Ribosomal protein L24 defect in belly spot and tail (Bst), a mouse Minute. *Development*, 131(16). <https://doi.org/10.1242/dev.01268>

Paschon, D. E., Lussier, S., Wangzor, T., Xia, D. F., Li, P. W., Hinkley, S. J., Scarlott, N. A., Lam, S. C., Waite, A. J., Truong, L. N., Gandhi, N., Kadam, B. N., Patil, D. P., Shivak, D. A., Lee, G. K., Holmes, M. C., Zhang, L., Miller, J. C., & Rebar, E. J. (2019). Diversifying the structure of zinc finger

nucleases for high-precision genome editing. *Nature Communications*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08867-x>

Peverali, F. A., Isaksson, A., Papavassiliou, A. G., Plastina, P., Staszewski, L. M., Mlodzik, M., & Bohmann, D. (1996). Phosphorylation of Drosophila Jun by the MAP kinase Rolled regulates photoreceptor differentiation. *EMBO Journal*, 15(15). <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00768.x>

Pletcher, R. C., Hardman, S. L., Intagliata, S. F., Lawson, R. L., Page, A., & Tennessen, J. M. (2019). A genetic screen using the drosophila melanogaster TRiP RNAi collection to identify metabolic enzymes required for eye development. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 9(7). <https://doi.org/10.1534/g3.119.400193>

Razin, S. V., Borunova, V. V., Maksimenko, O. G., & Kantidze, O. L. (2012). Cys2his2 zinc finger protein family: Classification, functions, and major members. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 77, Issue 3). <https://doi.org/10.1134/S0006297912030017>

Rhiner, C., & Moreno, E. (2009). Super competition as a possible mechanism to pioneer precancerous fields. *Carcinogenesis*, 30(5), 723–728. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp003>

Rhiner, Christa, López-Gay, J. M., Soldini, D., Casas-Tinto, S., Martín, F. A., Lombardía, L., & Moreno, E. (2010). Flower forms an extracellular code that reveals the fitness of a cell to its neighbors in Drosophila. *Developmental Cell*, 18(6), 985–998. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.010>

Rubin, G. M. (1991). Signal transduction and the fate of the R7 photoreceptor in Drosophila. In *Trends in Genetics* (Vol. 7, Issues 11–12). [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(91\)90258-R](https://doi.org/10.1016/0168-9525(91)90258-R)

Rutledge, B. J., Zhang, K., Bier, E., Jan, Y. N., & Perrimon, N. (1992). The Drosophila spitz gene encodes a putative EGF-like growth factor involved in dorsal-ventral axis formation and neurogenesis. *Genes and Development*, 6(8). <https://doi.org/10.1101/gad.6.8.1503>

- Shi, Y., & Noll, M. (2009). Determination of cell fates in the R7 equivalence group of the *Drosophila* eye by the concerted regulation of D-Pax2 and TTK88. *Developmental Biology*, 331(1). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.04.026>
- Theodosiou, N. A., & Xu, T. (1998). Use of FLP/FRT system to study *Drosophila* development. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 14(4). <https://doi.org/10.1006/meth.1998.0591>
- Tio, M., & Moses, K. (1997). The *Drosophila* TGF α homolog Spitz acts in photoreceptor recruitment in the developing retina. *Development*, 124(2).
- Tomlinson, A., & Ready, D. F. (1987). Cell fate in the *Drosophila* ommatidium. *Developmental Biology*, 123(1), 264–275. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(87\)90448-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(87)90448-9)
- Tomlinson, A., & Struhl, G. (2001). Delta/Notch and Boss/Sevenless signals act combinatorially to specify the *Drosophila* R7 photoreceptor. *Molecular Cell*, 7(3). [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00196-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00196-4)
- Tsai, Y. C., Grimm, S., Chao, J. L., Wang, S. C., Hofmeyer, K., Shen, J., Eichinger, F., Michalopoulou, T., Yao, C. K., Chang, C. H., Lin, S. H., Sun, Y. H., & Pflugfelder, G. O. (2015). Optomotor-blind negatively regulates *Drosophila* eye development by blocking jak/STAT signaling. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120236>
- Wangler, M. F., Yamamoto, S., & Bellen, H. J. (2015). Fruit flies in biomedical research. *Genetics*, 199(3). <https://doi.org/10.1534/genetics.114.171785>
- Wolff, T., & Ready, D. F. (1991). The beginning of pattern formation in the *Drosophila* compound eye: The morphogenetic furrow and the second mitotic wave. *Development*, 113(3). <https://doi.org/10.1242/dev.113.3.841>
- Zhu, J., Palliyil, S., Ran, C., & Kumar, J. P. (2017). *Drosophila* Pax6 promotes development of the entire eye-antennal disc, thereby ensuring proper adult head formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(23).

<https://doi.org/10.1073/pnas.1610614114>

Dirección General de Bibliotecas UAQ