



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas

Centro de Investigación en Dinámica Celular

**Participación del gen *escargot* en el desarrollo y
funcionamiento de los órganos quimiosensoriales en
Drosophila melanogaster.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Doctor en Ciencias

PRESENTA

Fernando Rosales Bravo

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Verónica Narváez Padilla

Cuernavaca, Morelos.

2019

Lista de Jurado

Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles.

Dr. Ramón González García-Conde.

Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia.

Dr. Enrique Salas Vidal.

Dra. Viviana del Carmen Valadez Graham.

Dra. Verónica Narváez Padilla.

Dra. Denhi Schnabel Peraza.

Lista de publicaciones relacionadas con la tesis:

The Esg Gene Is Involved in Nicotine Sensitivity in *Drosophila melanogaster*.

Esté artículo está próximo a someterse a revisión:

Escargot modulates peripodial membrane development and it is central for normal labial and antennal imaginal disc development.

RESUMEN

Drosophila melanogaster presenta múltiples órganos quimiosensoriales distribuidos en todo su cuerpo. Estos forman los órganos del olfato y gusto. Los órganos del gusto se localizan principalmente en la proboscis y además en las extremidades, alas y ovopositor (hembras), mientras que los órganos del olfato, sólo se localizan en la cabeza, específicamente en las antenas y palpos maxilares. Estos órganos se desarrollan a partir de discos imaginales que cohabitan con el tejido larval y durante la metamorfosis formarán las estructuras de la mosca adulta. Los discos son sacos de epitelios aplanados conformados por dos distintos epitelios: Epitelio Columnar (EC), que son células propias del disco imaginal y el Epitelio Peripodial (EP), son células aplanadas y alargadas que recubren la parte dorsal del disco. Existe una estrecha comunicación entre ambos epitelios, mediante las vías de señalización de Wingless, Hedhehog, Decapentaplegic y el gen selector *engrailed*.

Nosotros trabajamos con la línea *esg^{L4}*, la cual presenta una inserción del elemento transponible {PGaWB} en la región 5' del gen *escargot* (*esg*) causando su pérdida de función. Este gen pertenece a la familia Snail y codifica para un factor de transcripción de tipo de dedos de zinc. Encontramos que los órganos quimiosensoriales de la cabeza de la mosca se ven comprometidos cuando disminuyen los niveles de *esg*, presentando desde un daño parcial hasta la pérdida completa de los órganos olfativos y de la proboscis.

Estos fenotipos son ocasionados por las células que recubren la mandíbula de las larvas. Estas células migran e invaden parte del territorio de los discos imaginales de antena-ojo (antena y palpo maxilar) y del disco de labio (proboscis), reduciendo considerablemente su tamaño. La invasión de las células mandibulares hacia los discos imaginales altera el desarrollo del EP, ocasionando que se pierdan los compartimentos en las células del EC y que no se establezcan correctamente las vías de señalización de Engrailed, Hh, Wg y Dpp.

Por otro lado, encontramos que *esg* participa en el correcto funcionamiento de las neuronas receptoras gustativas de la proboscis. Mediante ensayos de GCaMP y de electrofisiología se encontró que en *esg^{L4}*, la respuesta de las neuronas que responden a sabores amargos presentan mayor respuesta a la nicotina comparada con las líneas controles.

SUMMARY

Drosophila melanogaster has multiple chemosensory organs distributed throughout its body. These form the organs of smell and taste. The organs of taste are located mainly in the proboscis but also in the legs, wings and ovipositor (females), while the organs of smell, are located only in the head, specifically in the antennae and maxillary palps. These organs develop from imaginal discs that cohabit with the larval tissue during metamorphosis will form the structures of the adult fly. Discs are sac-like or flattened epithelia formed by two different epithelia: Columnar Epithelium (CE), which are cells proper of the imaginal disc and the Peripodial Epithelium (PE), are flattened and elongated cells that cover the dorsal part of the disc. There is close communication between both epithelia, through the signaling pathways of Wingless, Hedgehog, Decapentaplegic and the selector gene *engrailed*.

We work with line *esg*^{L4}, which presents an insertion of the transposable element {PGaWB} in the 5' region of the *escargot* (*esg*) gene, causing its loss of function. This gene belongs to the Snail family and codes for a zinc finger type transcription factor. We found that the chemosensory organs of the fly's head are compromised when the *esg* levels decrease, presenting from partial damage to the complete loss of the olfactory organs and the proboscis. These phenotypes are caused by the cells coating the mandible of the larvae. These cells migrate and invade part of the territory of the imaginal antenna-eye discs (antenna and maxillary palp) and labial disc (proboscis), considerably reducing their size. The invasion of the mandibular cells towards the imaginal discs, generates alteration in the development of the PE, causing that the compartments in the CE cells are lost and the signaling pathways of Engrailed, Hh, Wg and Dpp are not correctly established.

On the other hand, we find that *esg* participates in the correct functioning of the taste receptor neurons of the proboscis. Through GCaMP and electrophysiology assays, it was found that in *esg*^{L4}, the response of the neurons that respond to bitter taste have a greater response to nicotine compared to the control lines.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero dar las gracias a mi directora de tesis, la Dra. Verónica Narváez, por haber aceptado ser mi tutora, por tus conocimientos que me has brindado y tu apoyo en cada momento que te necesité en todos estos años.

Al Dr. Enrique Reynaud por dejarme trabajar en tu laboratorio, por tu paciencia y todo lo que me has enseñado, pero sobre todo por la preocupación personal hacia mí.

A mis compañeros de laboratorio: Estefanía, Ángel, Iván, Luz. Al M. en B. René Hernández por su ayuda técnica. Gracias Carmen por preparar el alimento de nuestras moscas. Gracias Mariana por haberme brindado tu amistad y ponerle un toque único a los días en el laboratorio. En especial quiero agradecer al Dr. Ivan Sánchez por toda la ayuda científica y consejos de vida que me diste, esta tesis no hubiera tenido final sin tu ayuda.

A mis Padres que les debo todo y sin su ayuda no hubiera terminado el Doctorado.

A mi hijo Joshua, por ser el hijo que siempre soñé tener y ser mi motor de vida.

Agradezco el apoyo económico brindado por los siguientes programas: Proyecto DGAPA/UNAM PAPIIT-IN206517 y al proyecto CONACyT 255478.

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	3
Discos imaginales.	4
Compartimentos y vías de señalización	6
Disco imaginal de antena-ojo.	7
Disco imaginal de labio.....	9
Epitelio Columnar y el Epitelio Peripodial.....	11
Órganos quimiosensoriales de <i>Drosophila melanogaster</i>	15
Desarrollo de la sensila: Unidad básica sensorial.....	15
Sistema gustativo.	18
El factor de transcripción Escargot y los órganos quimiosensoriales.	20
ANTECEDENTES	23
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS PARTICULARES	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Mantenimiento de las moscas y líneas stocks.....	27
Sistema UAS-GAL4.	27
Cruzas y cuantificación de fenotipos.....	28
Ensayo de exposición a nicotina volatilizada.....	29
Ensayos de Electrofisiología.....	30
Ensayos de GCaMP.	31
Inmunofluorescencia.....	33
Larvas	33
Mosca adulta.	34
Western blot.	35
Tinción de TUNEL.....	36
RT-PCR cuantitativa	36
Extracción de RNA	36
Condiciones de qPCR	37
Aclaramiento de tejidos.....	37

RESULTADOS	38
La respuesta alterada a la nicotina <i>esg^{L4}</i> ocurre a través del receptor gustativo Gr33a.	38
El establecimiento de las neuronas gustativas en el labelo de la proboscis son dependientes de los niveles de <i>escargot</i> .	40
Las neuronas receptoras que responden a sabores amargos en <i>esg^{L4}</i> presentan mayor respuesta a la nicotina.	42
<i>esg</i> se expresa en un circuito neuronal implicado en locomoción y alimentación.	44
2.- Implicación del gen <i>esg</i> en el desarrollo de los discos imaginales de labio y antena-ojo	47
<i>esg</i> se expresa en todos los discos imaginales destinados a formar los apéndices de la mosca adulta.	47
La pérdida de función de <i>esg</i> ocasiona alteración en el desarrollo de los órganos quimiosensoriales de la cabeza de la mosca.	48
La pérdida de <i>esg</i> causa disminución en los niveles de E-cadherina en las larvas.	53
La pérdida de los discos imaginales de antena y de labio no ocurre por apoptosis.	57
Los niveles bajos de <i>esg</i> ocasionan pérdida de la morfología del epitelio peripodial y migración de las células perimandibulares.	59
La disminución de <i>esg</i> en el epitelio peripodial del disco de antena fenocopia los fenotipos observados en <i>esg^{L4}>esg-RNAi</i> .	62
La disminución en los niveles de <i>esg</i> ocasiona que se pierdan las fronteras entre los compartimentos posterior y anterior en el disco de antena.	65
La pérdida de los discos de labio involucra a la vía de señalización de Decapentaplegic.	67
DISCUSIÓN	69
Efecto en la disminución de los niveles de <i>esg</i> en el desarrollo de los órganos quimiosensoriales.	69
Defectos en la percepción de los estímulos en mutantes de <i>esg</i> .	73
CONCLUSIONES	75
BIBLIOGRAFÍA	76
ANEXO	87

ABREVIATURAS

<i>abdA</i>	<i>abdominal-A</i>
<i>AbdB</i>	<i>abdominal-B</i>
amos	Absent md neurons and Olfactory Sensilla
<i>ato</i>	<i>atonal</i>
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CtBP	C-terminal Binding Protein
<i>ci</i>	<i>cubitus interruptus</i>
CE	Columnar Epithelium
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
PE	Peripodial Epithelium
<i>dll</i>	<i>distalless</i>
<i>dpp</i>	<i>decapentaplegic</i>
<i>en</i>	<i>engrailed</i>
<i>esg</i>	<i>escargot</i>
esg-RNAi	RNA interference against <i>escargot</i>
GAL4	Transcription factor of yeast
GAL80	Repressor of GAL4
GCaMP	Green Calmodulin M13 Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
Gr	Gustatory receptor
Hh	Hedgehog

<i>lz</i>	<i>lozenge</i>
N	Notch
<i>sna</i>	<i>snail</i>
<i>Scr</i>	<i>Sex combs reduced</i>
<i>sal</i>	<i>spalt</i>
SOP	Sensory Organ Precursor
Or	Olfactory receptor
<i>Opa</i>	<i>odd-paired</i>
P{GaWB}	Genetically modified P element
P(EP)esg	Genetic construction that overexpresses <i>escargot</i>
<i>pb</i>	<i>proboscipedia</i>
UAS	Upstream Activation Sequence
TeTxLc	Tetanus Toxin Light chain
Pros	Prospero
<i>wor</i>	<i>worniu</i> Snail family member
<i>w¹¹¹⁸</i>	<i>white</i> control line.
<i>wg</i>	<i>Wingless</i>

INTRODUCCIÓN

Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

Drosophila melanogaster (*D. melanogaster*), conocida comúnmente como la mosca de la fruta, pertenece al grupo de los insectos holometábolos, cuya característica principal es que durante su crecimiento presentan un proceso de metamorfosis completa, esto quiere decir que a diferencia de insectos hemimetábolos, donde los organismos sólo crecen mediante cambios de mudas, en cambio en los insectos holometábolos hay una transición de larva a la formación de una pupa, donde el tejido larval se elimina y se reemplaza completamente por discos imaginales que formarán las estructuras de la mosca adulta (Shingleton, 2011).

El ciclo de vida de la mosca *D. melanogaster* se puede dividir en cuatro etapas: desarrollo embrionario, estadios larvales, metamorfosis y mosca adulta (Fig. 1). El tiempo que tardan las primeras tres etapas del ciclo, puede variar por diferentes factores, pero principalmente dependerá de la temperatura del ambiente. A 25°C el tiempo que tarda en desarrollarse una mosca adulta es alrededor de 12 días, pero el crecimiento se acelera si las moscas se crecen a 28°C (9-10 días) y por el contrario, es más lento si se crecen a 18°C (25-30 días).

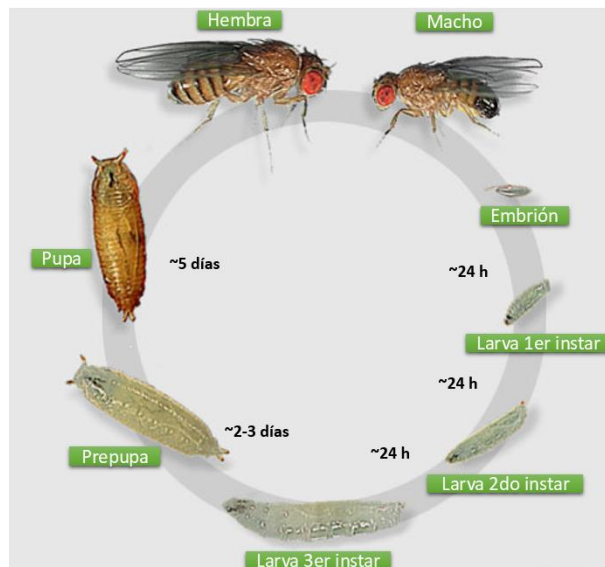


Figura 1. Ciclo de vida de la mosca *Drosophila melanogaster*. Esquema que representa los diferentes estadios de desarrollo de la mosca y se indica el tiempo que dura cada etapa cuando se crece a 25°C. Imagen tomada y modificada de FlyMove.

Discos imaginales.

Los discos imaginales son epitelios en forma de sacos aplanados que formarán toda la cutícula de la mosca adulta así como cada uno de los órganos sensoriales. Las células que se establecieron como discos imaginales en el desarrollo embrionario (Bate & Arias, 1991) crecen de manera exponencial en los estadios de larva y van adquiriendo una identidad definida a medida que la larva pasa por cada una de sus mudas o estadios larvales. La función de la larva de resguardar los discos imaginales se completa cuando inicia la metamorfosis, donde la mayoría de las células de la larva se reemplazan por cada disco imaginal que formará una estructura específica de la mosca adulta. El cuerpo de la mosca se puede dividir en tres partes, cabeza, tórax y abdomen, y cada región se formará a partir de discos imaginales, de los cuales existen nueve pares somáticos y uno sexual. La cabeza se forma a partir de los discos imaginales de antena-ojo-palpos maxilares, cípeo-labral y labio. El tórax se forma en su mayoría por el disco de ala y será complementado por los discos de humeral, extremidad (tres pares de discos para las seis extremidades) y del halterio (Fig. 2). El abdomen se desarrolla a partir de células imaginales llamadas histoblastos, que son células agrupadas en anillos (o racimos), localizadas en cada segmento de la larva. A diferencia de los discos imaginales, los histoblastos comienzan a crecer y a diferenciarse hasta el inicio de la metamorfosis (Madhavan & Madhavan, 1980; Mandaravally Madhavan & Schneiderman, 1977). Los órganos reproductores se desarrollan a partir de un solo disco imaginal, localizado en la parte posterior de la larva.

Durante la metamorfosis cada disco imaginal se fusiona con su par para formar el imago o mosca adulta (Fig. 2). En este proceso la hormona esteroidea ecdisona o 20 hidroxiecdisona producida por la glándula protorácica, juega un papel importante. Su liberación se da por pulsos al final de cada muda larval, pero los niveles son mayores en la transición de larva a pupa, ocasionando que los discos imaginales se elonguen y emerjan de su envoltura para posicionarse fuera de la epidermis de la larva (Gibson, Matthew C. and Schubiger, 2001).

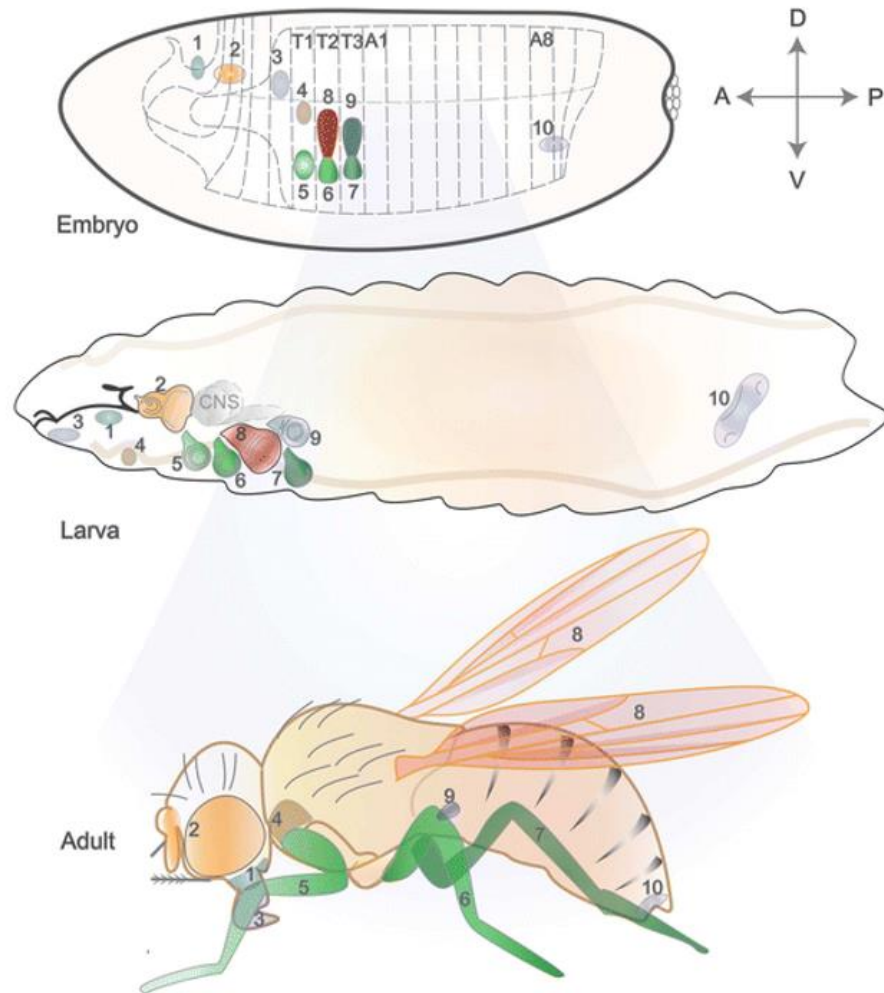


Figura 2. Establecimientos de los discos imaginales y su destino en la formación de las estructuras en la mosca adulta. Representación de la localización y crecimiento de los discos imaginales desde su establecimiento como primordios en el desarrollo embrionario y el aumento en su tamaño en estadio de larva. Cada disco imaginal dará lugar a una estructura específica en el imago o mosca adulta. En el embrión, T1, T2 y T3 indican los segmentos torácicos y A1-A8 los segmentos abdominales. Los números en la imagen representan a cada disco imaginal, con su respectiva estructura que formará en la mosca adulta. 1.- Clipeo-labral (Labro), 2.- Antena-ojo (Antena, palpo maxilar y ojo), 3.- Labio (Proboscis), 4.- Humeral (húmero), 5, 6 y 7.- Extremidad, 8.- Ala, 9.- Halterio y 10.- Sexual. Esquema tomado y modificado de (Beira & Paro, 2016).

Compartimentos y vías de señalización

Los discos imaginales se determinan durante el desarrollo embrionario mediante la invaginación de células del epitelio del embrión hacia el interior (Bate & Arias, 1991). Cada disco imaginal está delimitado topográficamente por un gen selector que define un compartimento en el disco (J. F. de Celis & García-Bellido, 2013; Lawrence, Struhl, & Street, 1996). Estos genes codifican factores de transcripción que se expresan en tiempo y espacio específicos, dando como resultado la delimitación del disco imaginal y su división en regiones con identidades distintas, sin que exista una mezcla entre células de los distintos compartimentos. La frontera entre los compartimentos induce la formación de centros organizadores que actúan liberando moléculas que funcionan como morfógenos. Todos los discos imaginales comparten un set de vías de señalización involucrados en los procesos morfológico, siendo los discos de ala y extremidad en donde se han descrito con mayor detalle (Fig. 3) (J. De Celis, National, & Celis, 2017; Fleming, Scottgale, Diederich, & Artavanis-Tsakonas, 1990). Estas vías son la de Notch (N), Ephidermal growth factor receptor (EGFR), c-Jun N-terminal kinase (JNK), Wingless (Wg), *decapentaplegic* (*dpp*) y Hedgehog (Hh) (Fig. 3).

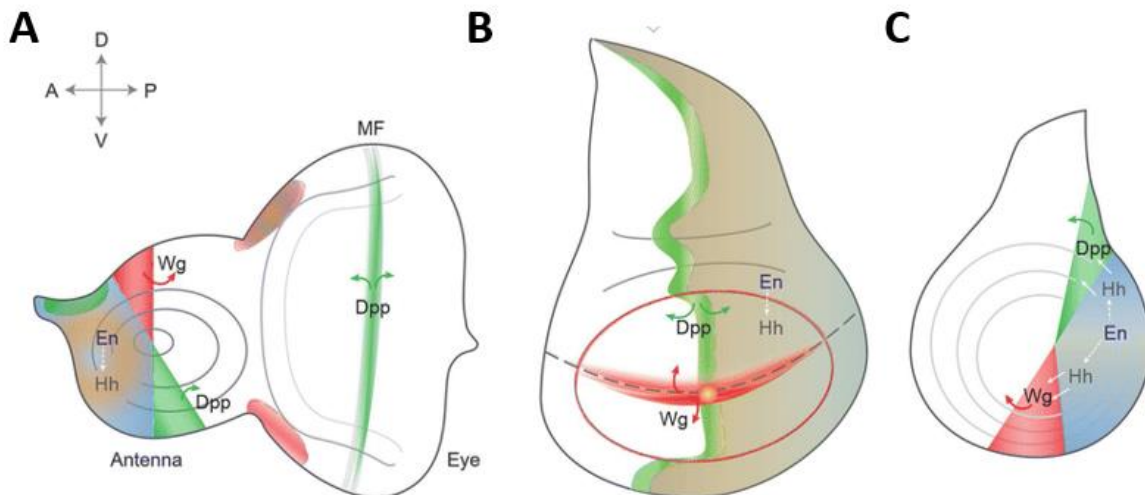


Figura 3. Establecimiento de los ejes antero-posterior y dorso-ventral en los discos imaginales. Todos los discos imaginales presentan señales moleculares en común: Engrailed (Azul), Hh (café), Wg (rojo) y Dpp (verde). El eje posterior es determinado por Engrailed y Hh, mientras que el anterior es determinado por *Cubitus interruptus*. El eje dorso-ventral es definido por Wg y Dpp en los discos imaginales de: A) Antena-ojo, B) ala y C) Extremidad. Imagen tomada y modificada de (J. F. de Celis & García-Bellido, 2013).

La expresión del gen selector *engrailed* en el compartimento posterior tiene su origen desde el ectodermo del embrión, donde determina la identidad posterior de cada segmento y derivan los primordios de los discos imaginales (Hama, Ali, & Kornberg, 1990; Morata & Lawrence, 1979a). La expresión de Engrailed en los discos imaginales define el eje antero-posterior, promueve la expresión de *hh* en las células del dominio posterior pero a su vez reprime la expresión de *cubitus interruptus (ci)*, un efector de la cascada de señalización de Hh, restringiendo la expresión de Ci hacia el dominio anterior. Hh es un morfógeno difusible de corto alcance que induce la expresión de *decapentaplegic*, un morfógeno difusible que se secreta a la matriz extracelular y que constituye un centro organizador donde difunde hacia los dominios antero-posterior controlando el patrón de formación del disco imaginal.

Disco imaginal de antena-ojo.

A diferencia de los demás discos imaginales que se desarrollan individualmente, el disco de antena-ojo aloja a tres discos en uno sólo; ojo, antena y palpo maxilar. Durante la metamorfosis los dos discos de antena-ojo se fusionan; las células recubren el cerebro formando la cutícula o cápsula de la cabeza desarrollando en su superficie múltiples quetas dispuestas simétricamente (Singh, Tare, Puli, & Kango-Singh, 2012); los ojos recubren los lóbulos ópticos mientras que las antenas se posicionan por encima de los lóbulos antenales, en tanto que los palpos maxilares se fusionan con los discos del labro y labio (Fig. 4A).

Las células que conforman este disco provienen de distintos segmentos del embrión (Haynie & Bryant, 1986). El disco de antena está conformado por cuatro dominios; A1, A2 y A3 y el dominio Ar. La región que rodea al dominio A1 formara la cutícula de la cabeza de la mosca. La disposición de cada dominio esta ordenado de modo que cuando se induce el eje próximo-distal, el dominio A1 (proximal) quedará unido a la cutícula de la cabeza de la mosca, el dominio A2 dará lugar al segundo segmento de la antena y el dominio A3 formara el segmento 3 de la antena. En la parte posterior-ventral se localiza el disco del palpo maxilar que dará lugar como su nombre lo indica a uno de los palpos maxilares (Fig. 4A y B).

El establecimiento de los ejes en el disco de antena-ojo ocurre contrario a como se establecen en los discos de ala y extremidad. A diferencia de estos discos donde primero se define el eje antero-posterior, en el disco de antena-ojo primero se establece el eje dorso-ventral en estadio de larva de 1er instar por la expresión de *lobe* en la parte ventral del disco y *pannier* en la región ventral. El establecimiento del eje antero-posterior ocurre hasta estadio de larva de 2do instar, donde la expresión de factores de transcripción comienzan a expresarse en dominios específicos, como es el caso de *homothorax* (*hth*) que su expresión se restringe al dominio de la antena, mientras que la expresión de *teashirt* (*tsh*), *sine oculis* (*so*) y el gen selector *eyeless* (*ey*), genes implicados en el desarrollo del ojo, su expresión se restringe al dominio del disco de ojo. En este estadio donde se detecta la expresión del gen selector *engrailed* en la parte posterior del disco (Gehring, 2002). La región del disco de antena donde convergen las señales de *wg* y *dpp*, inducen la vía de señalización de EGFR y la expresión de *dll*. La combinación de las señales de Dll y Hth en el 2do y 3er segmento de la antena inducen a *spalt* (*sal*), uno de los pocos genes que no se expresa en las extremidades pero sí en las antenas. En mutantes hipomorfos de *dll*, se reducen los niveles de *sal* y presentan una transformación de antena a extremidad (Dong, Chu, & Panganiban, 2000). *hth* y *dll* actúan como genes selectores y en conjunto otorgan la identidad de la antena. La expresión ectópica de alguno de estos dos genes genera la formación de este órgano (Fig. 4C) (Gorfinkiel, Morata, & Guerrero, 1997).

El disco de antena define dos órganos sensoriales en la mosca adulta, el olfativo y el auditivo. El factor de transcripción Cut, el cual presenta un homeodominio tiene diferentes funciones desde dar identidad al disco de antena hasta el establecimiento del órgano auditivo (Ruiz-Losada, Blom-Dahl, Córdoba, & Estella, 2018a), mientras que el órgano olfativo es definido por los genes pro-neuronales; *lozenge* y *amos* en el 3er dominio del disco de antena (Goulding, Lage, & Jarman, 2000; Lage, Prentice, Holohan, & Jarman, 2003). Estos genes están implicados en el establecimiento y desarrollo de las neuronas sensoriales olfativas.

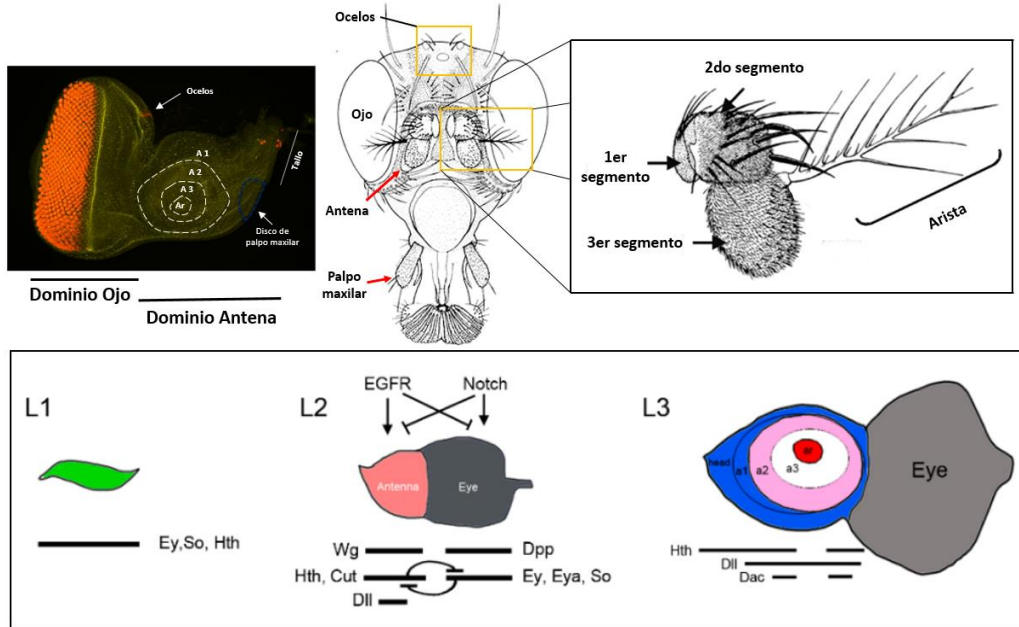


Figura 4. El disco imaginal de antena-ojo induce la formación de la mayor parte de la cabeza de la mosca. (A) El disco de antena-ojo presenta dos regiones: el dominio del ojo y el dominio de antena, dentro del dominio de la antena se localiza el disco de los palpos maxilares, además presenta la región del tallo que se une a la mandíbula de la larva. Además el dominio del disco de la antena se divide en 4 segmentos. (A y B) El dominio A1 desarrollará parte de la cutícula de la cabeza de la mosca y el primer segmento de la antena. El dominio A2 formará el segundo segmento de la antena, mientras que el dominio A3 conformará el 3er segmento de la antena. El dominio Ar dará lugar a la arista que es una prolongación del sistema auditivo. El esquema de la cabeza de la mosca fue modificada y tomada de Fybase.org. El resto de las imágenes se obtuvieron de (D'Ávila, Garcia, Loreto, & Valente, 2008; Ruiz-Losada, Blom-Dahl, Córdoba, & Estella, 2018b)

Disco imaginal de labio.

Los discos del labio son los más pequeños de todos los discos imaginales y se ubican a un costado de las mandíbulas de las larvas. Cada disco dará lugar a un labelo de la proboscis, que es uno de los órganos gustativos de la mosca adulta (Fig. 5A). Los discos del labio están conformados por dos capas de células de epitelios aplanados, la capa lateral (L) y la capa media (M). Como se menciona anteriormente, todos los discos imaginales que dan lugar a los apéndices de la mosca adulta presentan marcadores moleculares en común, como son: Hh, Wg, Dpp y En. Tanto las antenas como la proboscis son tejidos susceptibles a mutaciones homeóticas. La expresión de *proboscipedia* (*pb*) en los discos

imaginales del labio es lo que hace que la proboscis mantenga su identidad durante el desarrollo y que se formen las estructuras de la proboscis (Fig. 5B) (Abzhanov, Holtzman, & Kaufman, 2001). Se ha demostrado que la pérdida de función de *pb* ocasiona que la proboscis se transforme a segmentos distales de extremidad (Joulia, Bourbon, & Cribbs, 2005), mientras que la pérdida conjunta de *pb* y *Sex combs reduced (Scr)* ocasiona que la proboscis presente partes de una antena (Percival-Smith, Weber, Gilfoyle, & Wilson, 1997). La pérdida de *pb* en los discos de labio ocasiona un cambio de las estructuras de la proboscis a estructuras de antena o extremidad y se ve correlacionado con los niveles de *hth*, *extradenticle (exd)* y *dll* (Abzhanov et al., 2001). En una mosca silvestre estos marcadores se expresan poco en el disco de labio, mientras que en mutantes de *pb*, la expresión aumenta a niveles similares a los que se observan en los discos de las extremidades y antenas de una mosca silvestre; además, se observa expresión ectópica de *dachshund (dac)*, un gen que no se expresa normalmente en los discos de labio, pero sí en los discos de extremidad y antena (Fig. 4C) (Yasunaga, Saigo, & Kojima, 2006). El eje próximo-distal en el disco del labio se establece por la expresión de *pb* y *Scr* en la parte proximal, mientras que la parte distal está determinada por *dll*. La expresión ectópica de *pb* en las antenas suprime a *sal*, un marcador de antena y transforma a las antenas en palpos maxilares (Fig. 5C y D) (Boube, Seroude, & Cribbs, 1998; Cribbs, Benassayag, Randazzo, & Kaufman, 1995).

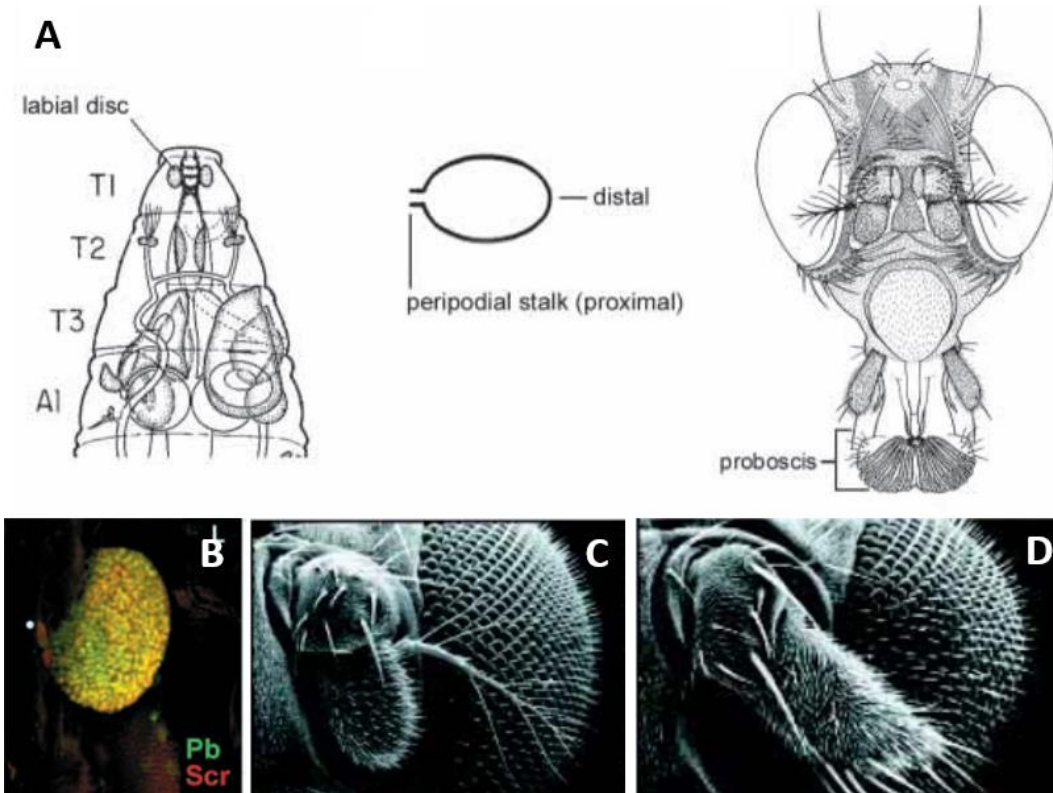


Figura 5. El disco de labio induce la formación de la proboscis en la mosca adulta. (A) Esquema de una larva de 3er instar donde se señala la ubicación del disco de labio unido a la mandíbula por células del epitelio columnar y peripodial (peripodial stalk). El disco del labio durante la metamorfosis formará la proboscis de la mosca adulta. (B) Patrón de expresión de marcadores de disco de labio, Proboscipedia y Sex Combs Reduced. (C) Imagen de una antena de una mosca adulta y (D) una mosca que se expresó ectópicamente a *pb* en los discos imaginales de antena, se muestra la transformación homeótica de una antena a un palpo maxilar. Imágenes modificadas y tomadas de Flybase.org y de (Abzhanov et al., 2001; Boube et al., 1998).

Epitelio Columnar y el Epitelio Peripodial.

Como se describió anteriormente los discos imaginales son sacos de células epiteliales aplanados conformados por dos tipos de células epiteliales: Epitelio Columnar (EC) y Epitelio Peripodial (EP). El EC está compuesto por células propias del disco y son: altas, compactas y dispuestas columnarmente (Fig. 6 B, D y F), las cuales formarán las estructuras de la mosca adulta durante la metamorfosis. Por otro lado, el EP está compuesto por células aplanadas dispuestas perpendicularmente al EC y forman una especie de red que recubre la parte dorsal del disco imaginal (Fig. 6B, C y E). El EP mantiene una estrecha comunicación con

el EC y juega un papel importante en el crecimiento y coordinación de estas células (Cho, Chern, Izaddoost, & Choi, 2000; McClure, 2005; Pallavi, 2005). Durante la metamorfosis el EP ayuda a la eversión de las células columnares, permitiendo que se desarrollen las estructuras de la mosca adulta fuera de la epidermis de la larva. Una vez que cumple con su propósito, la mayoría de las células del EP son inducidas a apoptosis al igual que el resto de las células larvales (Aldaz, Escudero, & Freeman, 2010; J. P. Kumar, 2017). Las superficies apicales del EC y EP se encuentran separadas por un lumen, el contacto entre ambos epitelios se da en los bordes por células epiteliales cuboidales (Fig. 6B). Estas células se localizan a lo largo del borde del disco imaginal y pueden provenir del EC y EP en los discos de ala y extremidad, pero en el disco de antena-ojo sólo provienen del EP (Atkins & Mardon, 2009; Kornberg, 2000; J. P. Kumar, 2017). Los discos imaginales presentan en su base células del tallo conformado por EC y EP, su función parece ser la de mantener el disco imaginal unido a la epidermis del embrión o de la larva; sin embargo se desconoce si lleva a cabo otras funciones (Kornberg, 2000).

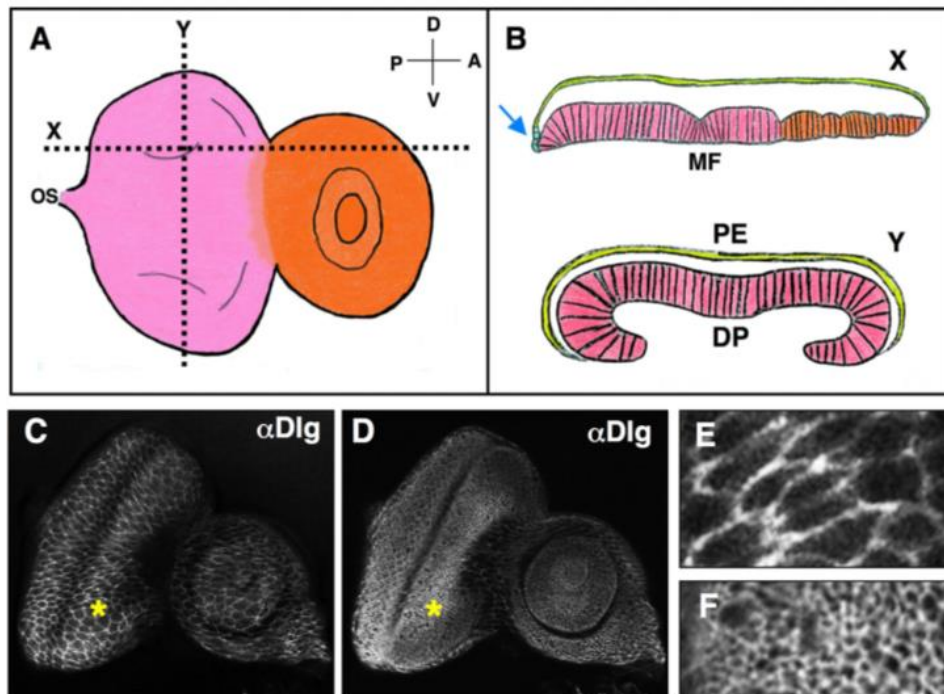


Figura 6. Representación de los epitelios Columnar y Peripodial en el disco imaginal de antena-ojo. (A) Esquema del disco de antena en naranja y el disco de ojo en color rosa. Las líneas punteadas representan cortes longitudinales en el eje

x y transversales en el eje y, (B) esquema que representa los cortes transversales y longitudinal en (A), y se muestra como están dispuestas las células del epitelio Peripodial y Columnar en el disco, la flecha azul muestra a las células cuboidales entre el EC y el EP. Disco imaginal de antena-ojo donde se muestra el (C) Epitelio Peripodial y (D) Epitelio Columnar. La estrella amarilla señala un acercamiento de (E) las células del EP, las células son alargadas y aplanada mientras que (F) las del EC son más pequeñas y dispuestas columnarmente. Imágenes tomadas de (Atkins & Mardon, 2009).

Se ha reportado que la eliminación de EP, ya sea mecánicamente o mediante herramientas genéticas, ocasiona alteraciones en la morfología de las extremidades y alas (Gibson & Schubiger, 2000). Al eliminarlo del disco de antena-ojo en larvas de 3er instar se afecta principalmente al ojo, ya que se suprime la progresión del surco morfogenético, afectando la división mitótica, causando una reducción en el número de fotorreceptores y afectando el ensamblado de las omatidias, lo que ocasiona una reducción en el tamaño del ojo de la mosca adulta (Gibson, Matthew C. and Schubiger, 2001; Gibson & Schubiger, 2000; J. P. Kumar, 2017).

Existe una comunicación constante entre el EP y el EC mediante extensiones de microtúbulos, semejantes a citonemas, especializados de las células del EP que atraviesan el lumen y conectan las superficies de ambos epitelios difundiendo a través de ellos las señales de las vías de Wg, Dpp y Hh (Gibson & Schubiger, 2000). Empleando el gen reportero *lacZ* bajo el control de elementos reguladores de los genes *wg*, *dpp* y *hh*, se encontró que se expresan en un inicio en el EP de los discos de antena-ojo en larvas de 1er y 2do instar (Atkins & Mardon, 2009; Cho et al., 2000). La señal de *hh* desde el EP del disco de ojo induce la señalización de Notch a través de sus ligandos Ser y Delta. La expresión de Notch se detecta en la frontera entre el eje dorso-ventral del ojo, antes de iniciarse la diferenciación (Cho et al., 2000). Estas señales conjuntas correlacionan con la transición del paso del 2do al 3er instar, con lo que se inicia el movimiento del surco morfogenético en el estadio de 3er instar. La inactivación de *hh* en larvas de 1er instar, ocasiona una disrupción en la distribución de Delta y Ser en el epitelio columnar (Cho et al., 2000; Gibson, Matthew C. and Schubiger, 2001). El gen *dpp* se expresa únicamente en el epitelio peripodial que se encuentra en el borde ventral del disco de antena-ojo desde donde antagoniza la señal de *wg* (Beira & Paro, 2016; Singh et al., 2012). Mutaciones en

dpp ocasionan defectos en la epidermis rostral de la cabeza de la mosca adulta, en la distribución de las macroquetas de la región vibrissae (Fig. 7C) (Stultz, Park, Mortin, Kennison, & Hursh, 2012), y los fenotipos más penetrantes presentan pérdida o duplicación de los palpos maxilares (Fig. 7D y E) (Stultz, Lee, Ramon, & Hursh, 2006). La regulación de *dpp* en el EP depende del gen pair rule *odd-paired* (*opa*), que durante el desarrollo embrionario define la segmentación del embrión, pero también han encontrado que se expresa en el EP del disco de antena de larvas de 3er instar. La pérdida de función de *opa* ocasiona defectos en estructuras ventrales de la cabeza similares a los observados en *dpp*. Además se confirmó mediante la expresión de reporteros *dpp-lacZ*, que la señal de *dpp* se pierde en la región dorsal del disco de antena y que la expresión ectópica de *opa* induce la expresión de *dpp* (H. Lee, Stultz, & Hursh, 2007).

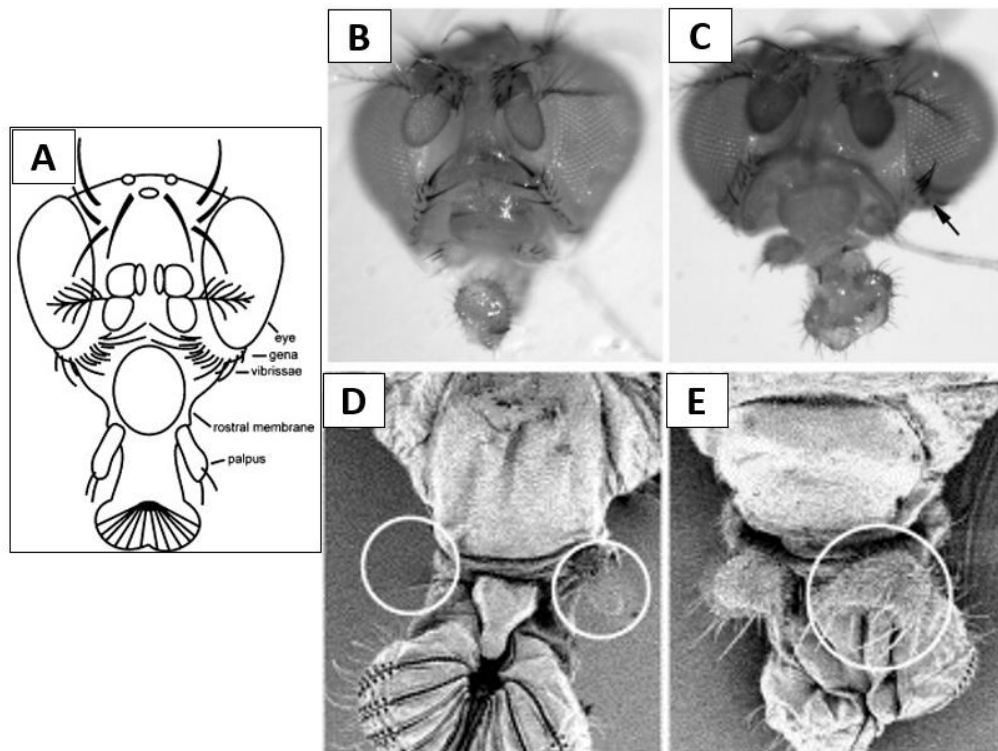


Figura 7. Fenotipos en la cabeza de la mosca ocasionados por la pérdida de función de *dpp*. (A) Esquema de la cabeza de una mosca donde se señalan las estructuras sensoriales. (B) Cabeza de una mosca silvestre y (C-D) los fenotipos que se generan en mutantes de *dpp*, como son: (C) aglomeración de macroquetas de la región llamada vibrissae, señaladas por la flecha, (D) pérdida de palpos maxilares (círculos en blanco) o (E) duplicación de este órgano olfativo (Circulo blanco). Imágenes tomadas de (Stultz et al., 2006, 2012).

Órganos quimiosensoriales de *Drosophila melanogaster*.

Durante la metamorfosis los discos de antena-ojo y de labio, se extienden para fusionarse y recubrir el cerebro para conformar la cápsula y órganos sensoriales de la cabeza de la mosca. A medida que se fusionan los discos también se lleva a cabo la formación de sensilas, que son las unidades básicas sensoriales de la mosca. Las sensilas son un conjunto de células provenientes de una misma célula (la precursora del órgano sensorial, o SOP) y en general cada sensila está conformada por una o más neuronas sensoriales y varias células de soporte (glía) (Roegiers & Jan, 2004; Wu, Egger, & Brand, 2008). Las sensilas pueden ser mecanorreceptoras, fotoreceptoras y quimiorreceptoras, dependiendo del tipo de estímulo al que respondan sus neuronas. Estas células transforman la información del ambiente en señales eléctricas que junto con centros de procesamiento superiores de información en el cerebro le brindarán a la mosca una representación de su entorno (Herrero, 2012; Hussain et al., 2016; Oswald, Lin, & Waddell, 2015).

Desarrollo de la sensila: Unidad básica sensorial.

El que sólo una célula dentro de un clúster proneuronal se convierta en neurona se lleva a cabo por un mecanismo conocido como inhibición lateral, donde la célula destinada a adquirir un destino neuronal o SOP (Sensory Organ Precursor), inhibe a sus vecinas para mantenerse como células epiteliales (Dewey, Taylor, & Johnston, 2016). Así, la primera célula SOP que exprese a Delta, el ligando de Notch, activará la vía de Notch en sus vecinas, lo que ocasionará que se repriman los genes proneurales en estas células y así mantengan un estado epitelial (Fig. 8A).

La formación de las sensilas requiere de una serie de divisiones para generar tanto a las neuronas sensoriales como a las células de soporte. La primera división de la célula SOP (PI) ocurre a nivel del epitelio, en el eje antero-posterior. Esta división es simétrica y genera dos células hijas PIIa y PIIb. La célula PIIa se divide una vez más en el eje antero-posterior para generar las células del eje (que forma la queta) y la del cuenco (que es donde se ancla la queta), mientras que la célula PIIb se divide perpendicular al eje antero-posterior, para formar una célula glía y una célula PIIIB, que finalmente se dividirá para formar una célula de la vaina (que recubre a

la neurona) y una neurona (Fig. 8B y C) (Dewey et al., 2016; Roegiers & Jan, 2004; Roegiers, Younger-shepherd, Jan, & Jan, 2001). Las divisiones celulares anteriores son asimétricas, ya que generan dos células hijas de distinto tamaño con destino celular diferente. Esto sucede gracias a que, antes de la división, en la SOP se forman complejos de proteínas adaptadoras en el polo anterior y posterior. Estos complejos están formados por diferentes proteínas de modo que cuando ocurre la mitosis las células hijas heredan distintos marcadores que les otorgarán destinos distintos (Cabernard & Doe, 2009; Fuerstenberg, Broadus, & Doe, 1998; Li, Yang, Wasser, Cai, & Chia, 1997). La expresión de *Inscuteable* en las células PIIb induce la rotación del uso mitótico 90° para generar la orientación ápico-basal, de modo que las siguientes divisiones asimétricas ocurran perpendicular con respecto al epitelio (Fig. 8B) (Roegiers et al., 2001).

Otro factor determinante en el desarrollo de las sensilas es Notch, un factor que participa en la determinación del destino de las células en la sensila. Su expresión se localiza en las células PIIa mientras que es reprimido en las células PIIb por Numb, una proteína determinante de destino neuronal (Dewey et al., 2016). La sobreexpresión de Notch genera una transformación de células PIIb a PIIa, lo que ocasiona un aumento en el número de quetas, pero sin la formación de neuronas sensoriales. Por el contrario, la disminución en los niveles de Notch genera un aumento en el número de neuronas sensoriales pero sin la formación de quetas (Pear, 2010; Roegiers & Jan, 2004; Schweisguth, 2015).

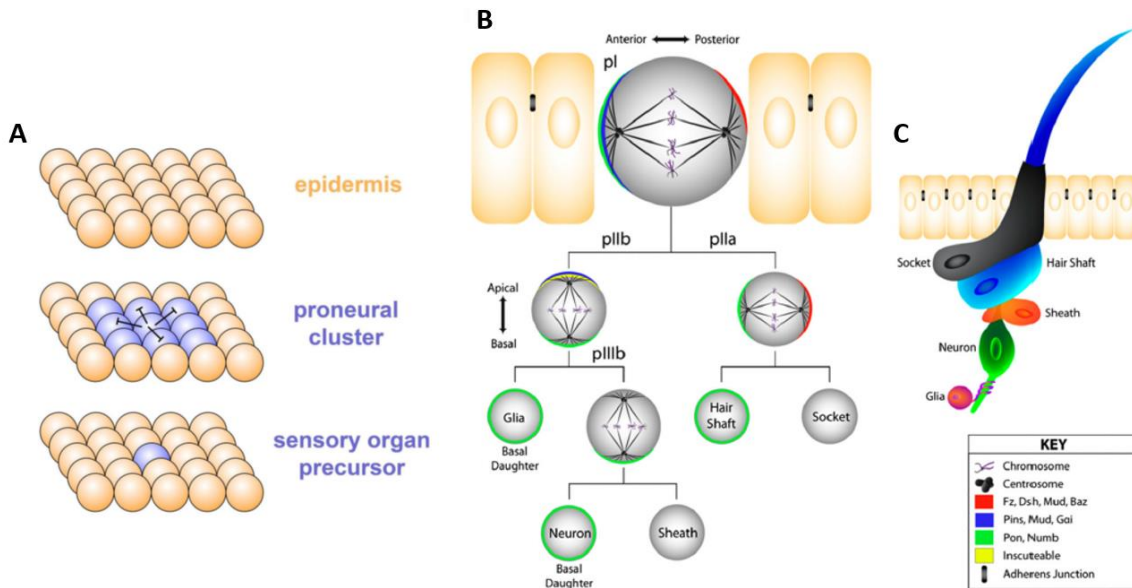


Figura 8. Establecimiento y desarrollo de las sensilas. (A) Esquema que representa el proceso de inhibición lateral, el cluster de células marcadas en azul, representan células con el potencial de formar células SOP, pero mediante la inhibición lateral, sólo una célula expresará genes proneuronales. (B) La división asimétrica de las SOP ocurre en un inicio en el eje antero-posterior a nivel del epitelio, posteriormente dependiendo de la identidad que hayan adquirido las células hijas, se dividirán en el plano antero-posterior como ocurre con las células pIIa, mientras que en las células pIIb su división ocurre en el eje ápico-basal. La formación de las quetas depende de las células pIIa, mientras que las divisiones de la célula pIIb formarán las neuronas. (C) Una vez que terminan las divisiones celulares, la sensila estará conformada por: una queta, dos células de soporte (socket y shaft), una célula de la vaina (sheath) y una o varias neuronas sensoriales. Imágenes tomadas de (Dewey et al., 2016; Singhania & Grueber, 2014)

El conocimiento de la división asimétrica de las SOP, se generó a partir de estudios realizados en precursores de órganos sensoriales mecanorreceptores localizados en la parte dorsal del tórax durante la metamorfosis. Cada espacio que hay entre una SOP y otra, permite dar seguimiento *in vivo* de cada una de las fases que van ocurriendo en la división asimétrica (Zitserman & Roegiers, 2011). En cambio, se sabe poco de las divisiones asimétricas que dan lugar a las sensilas quimiosensoriales. Las sensilas gustativas y olfativas son estructuralmente similares a las sensilas sensoriales del tórax, con la diferencia que la queta presenta múltiples poros por donde atraviesan las moléculas sápidas y odoríficas, en tanto que las sensilas quimiosensoriales presentan más de una neurona. Se ha

identificado que las células PIIIb se dividen una vez más para dar lugar no sólo a una neurona, sino a la formación de dos a cinco neuronas con características específicas (Jiang, Boll, & Noll, 2015).

Sistema gustativo.

El sistema del gusto en *D. melanogaster* está formado por sensilas gustativas que se encuentran repartidas en distintos lugares del cuerpo de la mosca, como son las extremidades, las alas, el ovopositor (hembras) y la proboscis; además de la presencia de algunas sensilas gustativas internas localizadas en la superficie del esófago. Cada sensila gustativa está dotada de neuronas capaces de detectar un abanico de sabores y feromonas, que trabajan conjuntamente para brindar información sobre la fuente de alimento y en el caso de las hembras, para saber donde depositar sus huevos. Las sensilas en las extremidades de los machos les permiten identificar feromonas de hembras o hidrocarburos depositados por otros machos en el abdomen de la hembra posterior a la cópula, para determinar si la hembra se encuentra receptiva o si previamente ha copulado (Fig. 9A) (Gendre et al., 2004; Isono & Morita, 2010).

La proboscis es el órgano donde se localiza el principal sentido del gusto en la mosca, debido a la presencia de un mayor número de neuronas receptoras gustativas que son capaces de responder a una gran gama de sabores. La distribución de las sensilas en la proboscis presentan un patrón estereotípico y se clasifican en tres categorías de acuerdo a su tamaño: largas (L), intermedias (I) y cortas (S). Cada sensila presenta un número determinado de neuronas. Las sensilas intermedias contienen sólo dos neuronas receptoras gustativas, en cambio las sensilas largas y cortas presentan cuatro (Thorne et al., 2004). Las neuronas que se localizan en las sensilas largas responden principalmente a sustancias atrayentes, como son los sabores dulces y a concentraciones bajas de sal, así como a agua. Las sensilas intermedias responden a sabores dulces y sustancias repelentes como sabores amargos y soluciones con altas concentraciones de sal. Las neuronas de las sensilas cortas son estimuladas principalmente por sabores

amargos y concentraciones bajas y altas de sal (Fig. 9B) (Delventhal & Carlson, 2016; Isono & Morita, 2010).

Cada neurona tiene receptores específicos para responder a un solo sabor, ya sea salado, dulce, amargo o al agua. En el genoma de *Drosophila* se han identificado 60 genes que codifican para 68 receptores del gusto vía “splicing” alternativo. De acuerdo a su secuencia se piensa que son receptores transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas (Mitchell et al., 1999). Se ha identificado que los receptores Gr5a, el clúster Gr64a-f y el Gr43a responden a sabores dulces. Los receptores gustativos no sólo se expresan en las neuronas de las sensilas gustativas, ya que también se han localizado en el cerebro en donde pueden participar para detectar concentraciones de azúcar en la hemolinfa y para inducir la señal de saciedad en la mosca. El número de receptores que se localizan en las neuronas que responden a sabores dulces es menor comparado con el número de receptores que presentan las neuronas que responden a sustancias amargas, lo que hace pensar que se debe a un mecanismo de defensa, ya que las sustancias amargas están relacionadas con sustancias tóxicas y se necesita de un gran repertorio de receptores para identificar cualquier molécula que condicione la vida de la mosca. Se identificó a los receptores Gr66a y Gr93a como receptores que responden a sabores amargos específicos. La pérdida de función de alguno de estos receptores ocasiona que las neuronas no detecten la cafeína (Moon et al., 2006), pero la expresión ectópica de ambos receptores no es suficiente para formar un receptor funcional para detectarla, lo que indica que los receptores podrían formar trímeros para detectar los sabores. También se identificó al receptor Gr33a, el cual se expresa en todas las neuronas que responden a sabores amargos y es necesario para que las neuronas respondan a sustancias amargas como: cafeína, denatonio, lobelina, papaverina, estricnina, quinina y berberina (Weiss et al., 2011). Se cree que el receptor Gr33a funciona como un co-receptor de las neuronas que responden a estímulos amargos, ya que los fenotipos generados por pérdida de función de los receptores Gr93a, Gr66a y Gr32a, son idénticos cuando se pierde el receptor Gr33a (Apostolopoulou et al., 2014; Moon., 2009). Por otro lado, se ha

identificado que mutantes de pérdida de función para el receptor Gr32a causa que los machos cortejen a otros machos o a hembras que previamente han copulado.

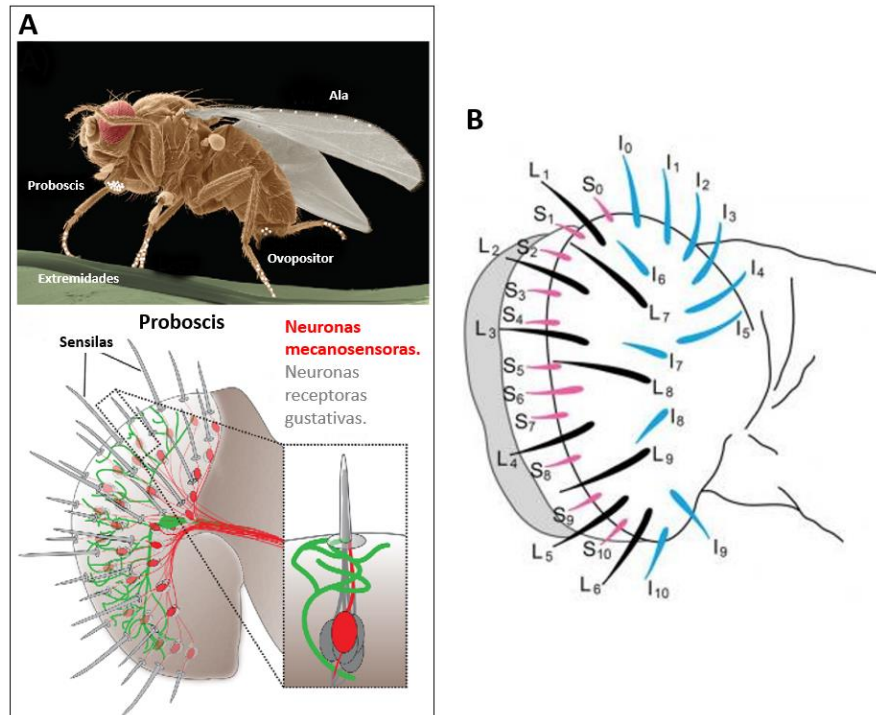


Figura 9.- El sistema del gusto en *D. melanogaster* y la distribución de las sensilas en el labelo de la proboscis. (A) El sistema del gusto de la mosca adulta está distribuido en varias partes su cuerpo; en la proboscis, extremidades, ala y ovopositor (hembras). El principal órgano del gusto se localiza en el labelo de la proboscis. Esta región contiene múltiples sensilas y cada una contiene entre 2 y 4 neuronas receptoras gustativas. (B) Las sensilas en el labelo de la proboscis se han clasificado de acuerdo a su tamaño. S= small (rosas), I= intermediate (azules) y L= Large (negras). Normalmente las sensilas L, contienen neuronas con receptores gustativos que responden a sustancias atrayentes como la sacarosa, maltosa y a bajas concentraciones de sal. En cambio las neuronas s, presentan neuronas con receptores que presentan afinidad hacia sustancias repelentes como la cafeína, berberina o lobelina. En cambio, las sensilas I presentan neuronas gustativas receptoras de ambos tipos, responden tanto a sustancias atrayentes como a sustancias repelentes. Imágenes tomadas y modificadas de (Sánchez-Alcañiz and Benton. 2017)

El factor de transcripción Escargot y los órganos quimiosensoriales.

El gen *escargot* (*esg*) codifica para un factor de transcripción de tipo dedos de zinc. Se identificó por primera vez en 1992, en una línea que presentaba la inserción de un elemento P que estaba causando la disrupción de un gen similar a *snail*. A *esg* se le ha llamado de diferentes maneras: Fusion-1, wizard, double glazed, pero de

acuerdo a su secuencia de aminoácidos altamente conservada a los dedos de zinc en Snail (76% de homología), se determinó que pertenece a la familia Snail y se le dio el nombre de *escargot* (Whiteley et al., 1992). Se conocen tres miembros de esta familia: *snail*, *escargot* y *worniu*, siendo *snail*, el primer miembro de la familia que se identificó y se caracterizó. La pérdida de función de *snail* ocasiona daño en la invaginación de las células ventrales durante la gastrulación, dando un fenotipo al embrión con apariencia de caracol (Nusslein-Volhard et al., 1984; Leptin, 1991). La familia Snail se encuentra ampliamente conservada desde nemátodos hasta mamíferos. Los tres genes que conforman a la familia Snail presentan dominios funcionales altamente conservados. En la región C-terminal presentan un sitio de unión al co-represor CtBP (por sus siglas en inglés C-terminal Binding Protein) y en la región N-terminal presentan de cuatro a seis dedos de zinc. La secuencia consenso que reconocen CAGGTG (Fuse, Hirose, & Hayashi, 1994), también es reconocida por las proteínas Helix-Loop-Helix (bHLH), por lo que compiten por los mismos sitios de unión durante el desarrollo.

La expresión de *esg* en el desarrollo embrionario es bastante dinámica. Al principio, en el ciclo celular seis, el mensajero se detecta en células del ectodermo y alrededor del ciclo 11 en adelante la expresión de *esg* se va alternando en regiones de la superficie dorsal, surco cefálico, blastodermo, neuroectodermo, línea media ventral y precursores de los discos imaginales (Whiteley et al., 1992). La pérdida de función de *esg* es letal y a pesar que se expresa desde estadios tempranos del desarrollo no se observan defectos en la embriogénesis. Pero en estadios posteriores se pueden reconocer fenotipos asociados a la pérdida de función de este gen en células imaginales. Los histoblastos son células imaginales que dan lugar a la cutícula de la mosca adulta y en estadios de larva se encuentran en arresto mitótico hasta el inicio de la metamorfosis. La endorreplicación es un proceso donde el material genético se duplica sin haber división celular y es un mecanismo finamente controlado por *cdk1*. Se ha reportado que en mutantes hipomórficas de *esg*, los histoblastos presentan endorreplicación debido a la falta de expresión de *cdk1*, por lo que se consideró que *esg* es importante para mantener la diploidía de los histoblastos. Las moscas hipomorfas que llegan a adulto presentan daño en la

cutícula del abdomen, tanto en las tergitas como en las esternitas (Hayashi et al., 1993; Fuse et al., 1994).

Como se mencionó anteriormente, durante el desarrollo de las sensilas mecanosensoriales las células precursoras pueden adoptar dos destinos celulares, ser células de soporte o ser una neurona, y esta decisión es dependiente de los niveles de Notch. Se ha reportado la participación de *esg* en este sistema de encendido y apagado del desarrollo de las sensilas. La pérdida de función simultánea de *esg* y *scratch*, otro miembro de la súper familia SNAi1, favorece la expresión de marcadores no neuronales, lo que genera la formación de células de soporte y quetas extras. En cambio, la sobre-expresión de *esg* o de *scratch* reprime la formación de quetas localizadas en el tórax, por la inhibición de manera indirecta de la vía de señalización de Notch en células precursoras neuronales, favoreciendo la expresión de genes involucrados en el destino neuronal como Prospero y Elav (Fig. 10) (Ramat et al., 2016).

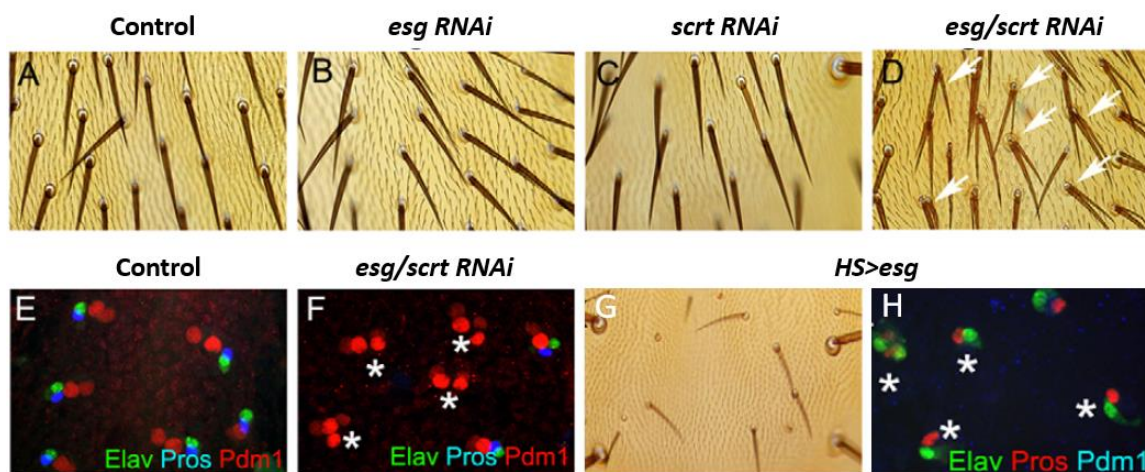


Figura 10. Participación de *esg* y *scrt* en el desarrollo de las sensilas del tórax.

(A) Imagen de la parte dorsal del tórax donde se muestra un grupo de sensilas mecanosensoriales. (B) La disminución en los niveles de *esg* o *scrt* mediante RNAi no causan ningún fenotipo, pero la expresión conjunta de ambos RNAi ocasiona un aumento en el número de sensilas (D). Esto se ve reflejado en los marcadores neuronales Elav y Prospero (Pros) y del precursor de quetas y células de soporte Pdm1. Las células precursoras de sensilas están ordenadas en clusters, (E) en el control, cada cluster contiene una célula precursora neuronal marcada con Elav, una célula marcada con Prospero y dos células marcadas con Pdm1. (F) Cuando se disminuyen los niveles de *esg* y *scrt*, la mayoría de los clusters solo presentan

expresión de Pdm1. (G) La sobreexpresión de *esg* genera pérdida de quetas en el tórax y (H) del precursor Pdm1.

ANTECEDENTES

En un principio nuestro estudio estaba enfocado en encontrar circuitos neuronales que respondieran a la nicotina. Esto llevó a generar un banco de líneas de moscas mediante movilizaciones al azar de un elemento P llamado P{GaWB}. Con cada línea generada se realizaron ensayos de comportamiento de respuesta a nicotina volatilizada. Estos ensayos consistieron en exponer a grupos de 10 moscas por ensayo al vapor de la nicotina durante 15 segundos, posteriormente se midió su recuperación, a través de su capacidad innata de escalamiento vertical o también llamada geotaxis negativa. Las líneas control *Oregon* y *w¹¹¹⁸* presentaron un tiempo medio de recuperación de 25 y 30 minutos respectivamente. Del screening se identificaron dos mutantes a partir de las cuales se establecieron las líneas: L70 y *esg^{L4}*. Ambas líneas presentaron un tiempo significativamente mayor en su recuperación que las líneas controles, lo que definimos como sensibilidad a la nicotina (Fig. 11A).

La inserción del elemento P{GaWB} en *esg^{L4}*, se localizó en el brazo izquierdo del cromosoma 2, en el extremo 5' UTR del gen *esg*, a 41 pares de bases del inicio de la transcripción de este gen. Esta mutación es homóciga letal, así que las moscas que se emplearon para los experimentos, todas fueron heterócigotas para esta mutación. Para demostrar que la sensibilidad a la nicotina en la línea *esg^{L4}* se debía a una alteración en los niveles de *esg*, se empleó el alelo *esg^{35ce-3}*, el cual lleva una mutación puntual en su dominio de unión al DNA (Fuse et al., 1994). Las moscas *esg^{35ce-3}* tras ser expuesta a nicotina volatilizada, presentaron un tiempo medio de recuperación de 50 minutos, idéntico a la línea *esg^{L4}*, además la cruce heteroalélica entre *esg^{L4}* y *esg^{35ce-3}* es letal, lo que indica que las mutaciones de ambas líneas son pérdida de función del gen *esg*.

P{GaWB} contiene un gen reportero que codifica al factor de transcripción de levadura GAL4 y su expresión depende de los elementos reguladores bajo los cuales se encuentre. Dado que en la línea *esg^{L4}* el elemento P{GawB} interrumpió al gen *esg*, se verificó si GAL4 estaba regulado por los mismos enhancers

endógenos que regulan a *esg*, esto mediante el sistema bipartito UAS/GAL4. Se dirigió la línea UAS-GFP hacia un fondo genético de *esg^{L4}* y se encontró expresión de GFP en los histoblastos, y en los discos imaginales de extremidad y ala, tejidos en donde se encontró mediante hibridación *in situ* que se expresa *esg* (Hayashi, Hirose, Metcalfe, & Shirras, 1993). Este dato fue importante, porque nos indicó que *esg^{L4}*, es un driver de *esg* y nos daba la certeza que se podía dirigir cualquier gen de interés a los tejidos donde se expresa *esg* empleando el sistema bipartito UAS/GAL4. Con la intención de caracterizar el papel de *escargot* en la respuesta a la nicotina empleamos un RNA interferente contra *esg* (*esg-RNAi*) para bajar más los niveles de *esg* en *esg^{L4}* y tratar de definir así su papel en la respuesta a la nicotina. Nos llamó la atención que el fenotipo de sensibilidad a la nicotina se perdiera en *esg^{L4}>esg-RNAi* (28514) y que las moscas presentaran un comportamiento similar a la línea control (Fig. 11A). Revisando con mayor detalle la morfología de las moscas encontramos que no presentaban proboscis (Fig. 11C) mientras que la línea *esg^{L4}* presentaron una morfología idéntica a la línea silvestre (Fig. 11B). La reversión en el fenotipo de hipersensibilidad a la nicotina observado en *esg^{L4}* se lo adjudicamos a la pérdida de la proboscis, por ser el único órgano aparente que faltaba en la mosca. De este modo, nos enfocamos en estudiar la función de *esg* en el desarrollo de la proboscis y el posible vínculo de las neuronas gustativas de la proboscis con la respuesta alterada a la nicotina.

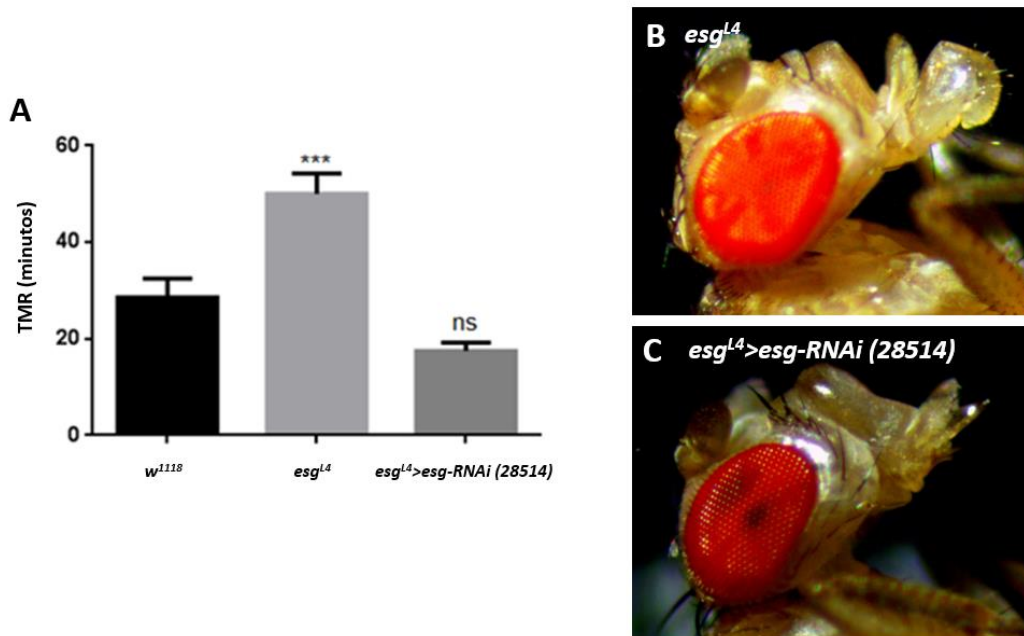


Figura 11. Las moscas con genotipo *esg^{L4}>esg-RNAi (28514)* no presentan proboscis y no son sensibles a la nicotina. (A) Como se muestra en la gráfica las moscas *esg^{L4}* presentan un tiempo mayor de recuperación tras la exposición a la nicotina volatilizada. La sensibilidad a la nicotina no se intensifica en *esg^{L4}>esgRNAi (28514)* aun cuando los niveles de *esg* son menores que en *esg^{L4}*, por el contrario, las moscas presentan un fenotipo de recuperación parecido al control *w¹¹¹⁸*. Este fenotipo se podría deber porque las moscas *esg^{L4}>esgRNAi (28514)* no presentan proboscis (C), mientras que las moscas *esg^{L4}* presentan una morfología idéntica a la línea silvestre (B). TMR es el tiempo medio de recuperación, es el tiempo que le tomaba al 50% de la población de las moscas recuperarse después de la exposición a la nicotina volatilizada.

HIPÓTESIS

La pérdida de función del gene *escargot* causa una alteración en el desarrollo de los discos imaginales de antena y labio, ocasionando que se atrofie la formación del órgano del gusto y olfato, así como la respuesta de estas neuronas quimiosensoriales a diferentes estímulos químicos.

OBJETIVO GENERAL

Identificar la función del gen *escargot* en el desarrollo de los órganos quimiosensoriales de la cabeza de la mosca, así como su implicación en la respuesta correcta de las neuronas quimiosensoriales.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el patrón de expresión de *esg* mediante el sistema bipartito UAS/GAL4, en discos imaginales de antena y labio, así como en mosca adulta.
- Determinar el papel de *esg* en el desarrollo de los órganos quimiosensoriales.
- Analizar la respuesta de las neuronas gustativas y olfativas a diferentes estímulos en mutantes de *esg*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mantenimiento de las moscas y líneas stocks.

Las moscas y cruzas fueron crecidas en un medio estándar preparado a partir de sacarosa, agar, maíz, levadura y ácido propiónico a temperatura ambiente, salvo algunas ocasiones que se requirió emplear temperaturas de 18°C o 28°C que se indican en cada caso.

Se emplearon dos líneas de referencia, *Oregon-R* o *w¹¹¹⁸*, ambas obtenidas de Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC). La línea transgénica *esg^{L4}* (*w¹¹¹⁸*; *P{GaWB.esg}^{L4}*) fue generada en nuestro laboratorio por la movilización del elemento *P{GaWB}* (Sanchez-Díaz et al., 2015). El alelo empleado de *esg* ha sido *esg^{35ce-3}* (Fuse et al., 1994). Las líneas UAS que se usaron fueron: *UAS-GFP*, *UAS-mCD8::GFP*, *UAS-esg-RNAi* (34063, 28514, v9794, v9793), *P{EP}esg*, *UAS-GCaMP5*, *UAS-TeTxLc*. Las líneas GAL4 que se emplearon para dirigir la expresión génica fueron: *Gr66a-GAL4*, *Pnr-GAL4*, *C311-GAL4*. Todas las líneas se obtuvieron de Bloomington Drosophila Stock Center a excepción de los *esg-RNAi* v9793 y v9794, que se obtuvieron de Vienna Drosophila Resource Center.

Sistema UAS-GAL4.

Para dirigir la expresión de los genes estudiados se empleó el sistema UAS/GAL4, que permite dirigir de manera tejido específico un gen de interés en un tiempo y espacio definido. Brand y Perrimon diseñaron este sistema basados en el mecanismo de control de expresión de los genes que se expresan para el metabolismo de la galactosa con secuencias UAS (Upstream Activation Sequence), que son reconocidas por el factor de transcripción GAL4, y que están involucrados en transportar y metabolizar la galactosa en levadura (Brand & Perrimon, 1993). En el caso de las líneas transgénicas, la expresión de GAL4 está bajo el control de un promotor mínimo y su expresión depende de los elementos reguladores vecinos. Para la expresión de cada gen se requiere de una línea transgénica que expresa tejido específico a GAL4, llamado driver y por otro lado se necesita de otra línea transgénica que presenta una secuencia clonada de un gen de interés río abajo de

las secuencias UAS. La progenie que presente ambas construcciones expresará el gen de interés en un tiempo y patrón definido (Fig. 12).

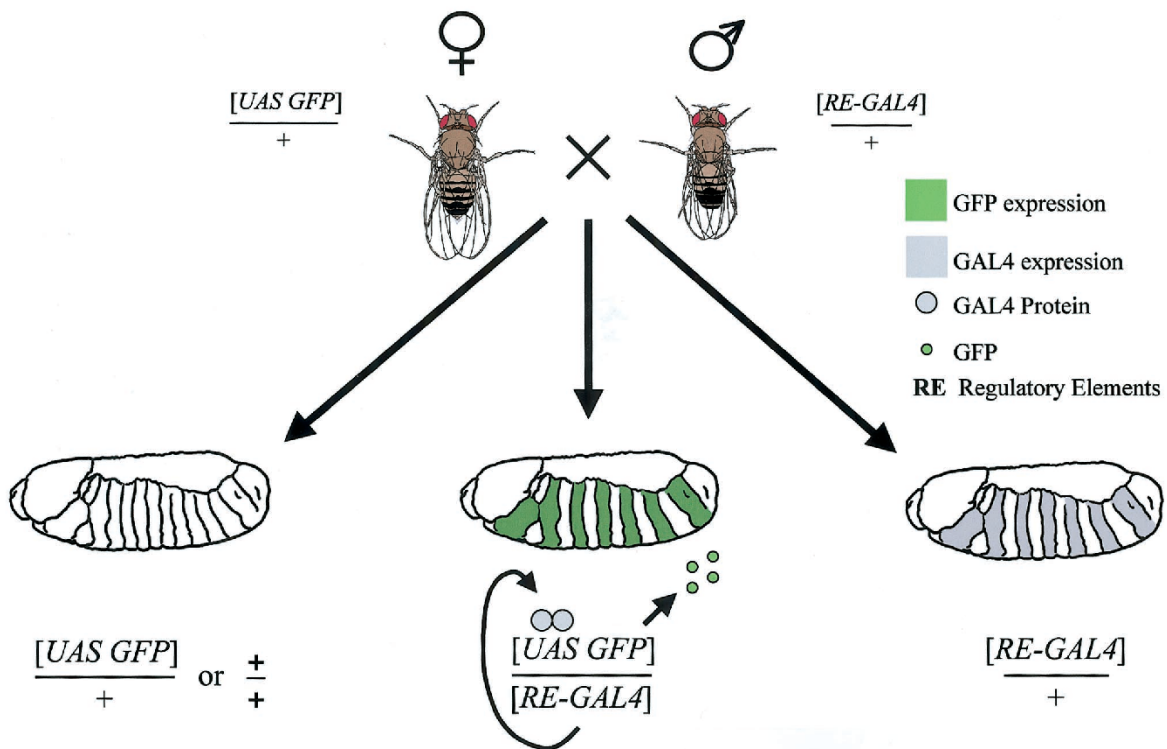


Figura 12. Sistema UAS/GAL4. Esquema donde se muestran las líneas portadoras del elemento GAL4 y la línea transgénica UAS-GFP. La descendencia resultante que presente ambas construcciones expresará en un patrón espacio-temporal el factor de transcripción GAL4, quien reconocerá y se unirá a las secuencias UAS, induciendo la expresión de la GFP. Figura tomada de (Duffy, 2002).

Cruzas y cuantificación de fenotipos.

Las cruzas se realizaron a dos temperaturas: Temperatura Ambiente (23-26°C) y a 28°C. La expresión de GAL4 en los drivers es mayor a una temperatura de 28°C y disminuye a menor temperatura. La expresión de los *esg-RNAi* a 28°C fueron semi-letales o letales pero viables a temperatura ambiente (de aquí en adelante se va a definir como T/A), a excepción del *esg-RNAi* (34063), por lo que se decidió analizar los fenotipos de los individuos a T/A y a 28°C. Para mantener la mutación del elemento P{GaWB} insertado en el gen *esg* en *esg^{L4}* y evitar que se perdiera en subsecuentes generaciones, se estableció con el cromosoma balanceador CyO. Los cromosomas balanceadores son cromosomas con secuencias invertidas que

impiden la recombinación homóloga durante la meiosis. Usualmente llevan un marcador dominante y son mutaciones letales recesivas. En el caso del cromosoma balanceador *CyO* lleva el marcador *Cy*, que le otorga un fenotipo de alas curvas a las moscas que portan esta mutación.

Para la determinación de la viabilidad y cuantificación de los fenotipos se realizó la cruce de *esg^{L4}* con el *esg-RNAi (v9794)*. La progenie que se obtuvo se cuantificó y se analizaron los fenotipos obtenidos a T/A y a 28°C. La progenie que se obtuvo con genotipo *+ / CyO; esg-RNAi (v9794) / +* se empleó como referencia para comparar los individuos obtenidos de *esg^{L4} / +; + / esg-RNAi (v9794)*.

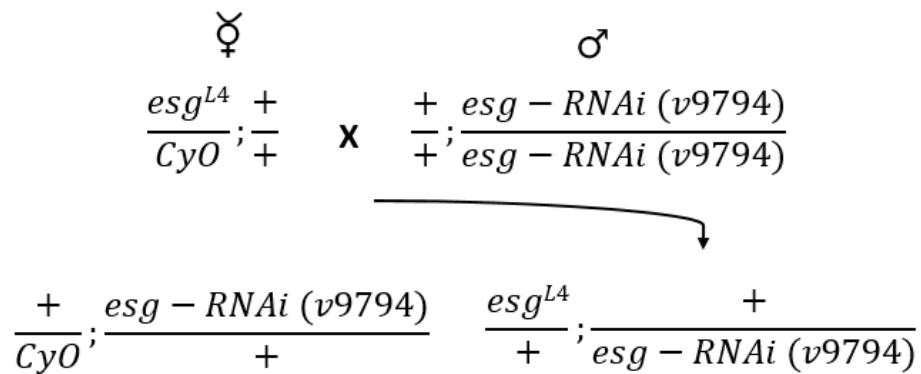


Figura 13.- Cruza genética entre *esg^{L4}* y el *esg-RNAi*. Se realizaron cruza únicas entre una hembra *esg^{L4}* y un macho *esg-RNAi*, la descendencia que se obtuvo se cuantificó. La descendencia obtenida con genotipo *esg^{L4} / +; + / esg-RNAi (v9794)* se comparó con la descendencia con genotipo *+ / CyO; esg-RNAi (v9794) / +* que se empleó como control.

Ensayo de exposición a nicotina volatilizada.

Para este ensayo se diseñó un sistema para volatilizar la nicotina usando una fuente de poder construida en el laboratorio y calibrada a 6 V. La corriente fue suficiente para calentar una resistencia (>250°C) y volatilizaron 2 µL de nicotina (32ng) (Sigma #N3876-25mL). Para los ensayos se colectaron moscas adultas de 1 a 4 días post-eclosión, de cada línea se hicieron grupos de 10 moscas macho y se colocaron en viales con comida fresca 24 horas antes de realizar los ensayos. Durante el ensayo cada grupo estuvo expuesto al vapor de la nicotina por 15 segundos y al terminó de este tiempo las moscas se colocaron en viales limpios. Tras la exposición a la nicotina volatilizada, las moscas permanecieron inmóviles en el fondo del vial y se

fueron recuperando paulatinamente. Se delimitó una distancia de 2.5 cm a partir del fondo del vial para considerar como recuperadas a las moscas que treparon y atravesaron esta distancia. Lo que se midió y cuantificó fue el tiempo que les llevó a cada mosca recuperarse a través de estimular su reflejo innato de geotaxis negativa o escalamiento vertical, mediante el golpeo de la parte inferior del vial. Cada 5 minutos durante una hora se golpeó la parte inferior del vial para identificar y cuantificar las moscas que se recuperaron y fueron capaces de trepar por las paredes del vial de las que fueron incapaces. Las moscas que se recuperaron de la intoxicación se retiraron del vial y se contabilizaron. Se compararon los tiempos medios de recuperación (TMR) el cual se definió como el tiempo que les llevó recuperarse al 50% de las moscas de cada grupo.

Ensayos de Electrofisiología.

Para los registros de electrofisiología se empleó un amplificador de señales diseñado especialmente para amplificar los potenciales de acción neuronal (amplificador diferencial AM systems. Carlsbor WA). Se usaron dos micromanipuladores con soporte magnético de tres ejes (Marzhauser Wetzlar, modelo: MM33) y un micromanipulador de microconducción hidráulica (Burleigh serie PCS-5000). Para la manipulación de las moscas y los electrodos se empleó un microscopio Zeiss Axiovert 25. Todo el equipo se montó sobre una mesa anti-vibración para evitar cualquier registro inespecífico, además se resguardo los instrumentos con una caja de Faraday hecha de un esqueleto de metal recubierto por una malla metálica. El amplificador se conectó a un convertidor analógico-digital (National Instruments 9803) para conectarlo a una computadora y medir los registros empleando un software de uso libre de adquisición de datos llamado "dbWave".

Se realizaron registros electrofisiológicos empleando la técnica "Tip Recording" la cual se basa en emplear un electrodo hecho a base de microcapilares de vidrio (World Precision Instruments, Inc. 1.5mm). Este capilar de registro contiene una solución sávida mezclada con un electrolito que permite el flujo de electrones hasta el alambre de plata que se localiza en el interior del electrodo y que está conectado

a un amplificador. Además se empleó un electrodo de referencia llenado con solución salina, el cual se introduce en la mosca desde la parte posterior dorsal del tórax hacia la parte anterior del cuerpo de la mosca en un ángulo de 25° con respecto al eje de la mosca de modo que se atravesó el musculo del tórax y parte del esófago hasta que quedó posicionado dentro de la proboscis. Se tomaron registros de sensilas únicas y se estudiaron su respuesta a distintas soluciones sápidas. Esta técnica se ha empleado anteriormente para el estudio de la respuesta de las sensilas gustativas de la proboscis.

Se contó el número de potenciales de acción o espigas que tuvo cada sensila en un periodo de tiempo de 500 ms. Las soluciones sápidas que se emplearon para evaluar la respuesta de las sensilas fueron: Sacarosa 100mM (Baker #4072-01) y nicotina 100mM (SIGMA #N3876-25). Para descartar la respuesta de las neuronas gustativas que responden a agua, se empleó Citrato de tricolina (30mM, Sigma, # T0252-100G) para abatir esta señal y evitar falsos positivos.

Ensayos de GCaMP.

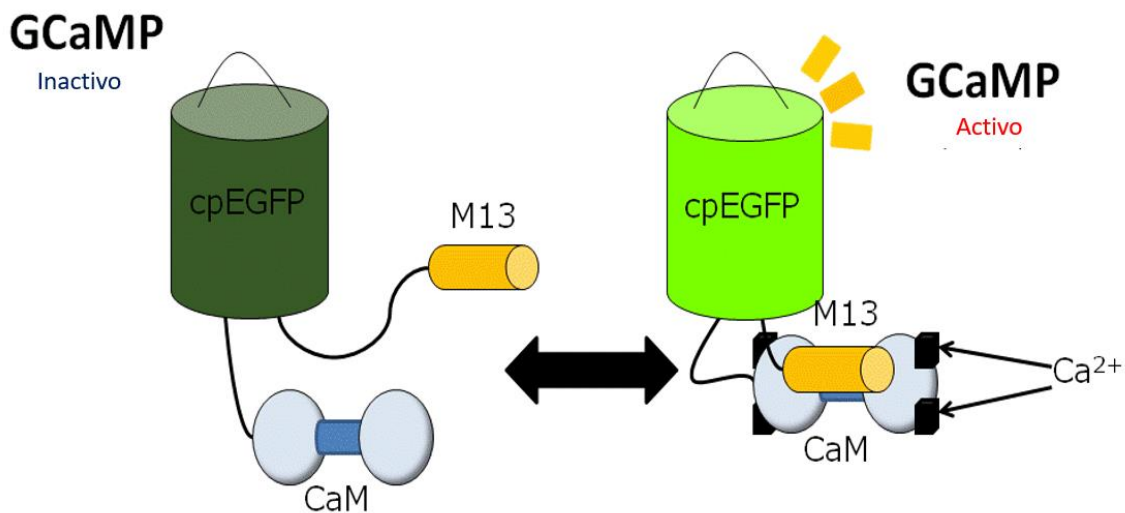


Figura 14. Construcción genética de GCaMP. Esquema que representa cada dominio que constituye a GCaMP. La proteína GFP está unido a la Calmodulina y al péptido M13. Previo al estímulo la GFP presenta una fluorescencia basal que aumenta cuando se despolariza la neurona, debido a un cambio conformacional de GCaMP en forma de anillo, que sufre la estructura por la unión de la calmodulina al péptido M13, favorecido por la captación de Ca²⁺.

La construcción genética GCaMP es un sistema que está diseñado para censar los niveles de calcio (Ca^{2+}) dentro de la neurona en un tejido *ex-vivo*. Esta construcción está conformada por tres dominios: Calmodulina (CaM), la proteína verde fluorescente (cpGFP) y el péptido M13 de unión a Ca^{2+} /CaM (M13pep) (Akerboom et al., 2012). Previo al estímulo de las neuronas GCaMP presenta una fluorescencia basal que se incrementa si se genera un potencial de acción. La entrada de Ca^{2+} y su unión al péptido M13 generado por el potencial de acción, ocasiona un cambio conformacional de la construcción de GCaMP, generando un aumento en la fluorescencia emitida por la GFP.

La adquisición de las imágenes se realizó en el Microscopio Confocal Spinning Disc (Zeiss Observer Z.1 Invertido). La cámara usada para la adquisición de las imágenes fue EMCCD Andor Ixon 512x512 pixeles. Se tomó un cuadro cada 400 milisegundos y en total se tomaron 100 cuadros para cada video. Cada sustancia sávida que se evaluó se colocó en el cuadro 20 (a los 8 segundos) y se tomó registro hasta el cuadro 100 (40 segundos). Los filtros del espejo dicróico para la excitación de la construcción GCaMP fue de 485nm y la luz de la fluorescencia reflejada de las muestras del pico de emisión de GCaMP fue de 530nm.

Las imágenes fueron analizadas y procesadas en imageJ. Se definió un área que contemplará la mayoría de las neuronas. Esta misma área se tomó como referencia para restar el fondo de fluorescencia a cada imagen. Una vez restado el fondo, se procedió a calcular el ΔF de cada cuadro. Este ΔF está determinado por la diferencia obtenida de la fluorescencia de cada cuadro menos la fluorescencia del cuadro 1:

$$\Delta F = F_n - F_0$$

F_n = Fluorescencia de cada cuadro (1, 2, 3...100)

F_0 = Fluorescencia del cuadro 1.

Cada punto en el tiempo que se obtuvo fue graficado y comparado entre los genotipos analizados. Los resultados y gráficas fueron realizados en Excel.

Para dirigir a GCaMP hacia las neuronas receptoras gustativas que responden a sabores amargos, se empleó el driver *Gr66a-GAL4*. Este driver se expresa en todas las neuronas que responden a sustancias amargas en la mosca. Para los ensayos se emplearon moscas de entre 3-5 días post-eclosión y se anestesiaron en hielo y no en CO₂ para evitar cualquier estímulo previo en las neuronas gustativas. Para el montaje de las muestras biológicas se realizó de la siguiente manera: se retiró las cabezas de las moscas mediante un corte con una navaja de afeitar entre la cabeza y el tórax. La cabeza se colocó sobre un diurex doble cara que previamente se adhirió sobre un cubreobjetos y se presionó la cabeza con otro diurex para generar que la proboscis quedara extendida. Además la cabeza fue inmovilizada con agarosa de bajo punto de fusión al 2% (30-35°C) (LONZA #50110) dejando descubiertos únicamente los labelos de cada proboscis. Las soluciones que se emplearon para evaluar la respuesta de las neuronas receptoras gustativas fueron: Sacarosa 10 mM (J. T. Baker #4072-01), Nicotina 100mM (SIGMA #N3876-25), Cafeína 100mM (Sigma-aldrich #C0750-100) y Lobelina 100mM (Sigma-aldrich #141879-1G), todos los reactivos se diluyeron en agua destilada con el inhibidor de los receptores de H₂O, citrato de tricolina (30mM) (SIGMA #546634).

Inmunofluorescencia.

Larvas

Para llevar a cabo tinciones de inmunofluorescencias en discos imaginales, se disecaron larvas de 3er instar empleando pinzas de disección. Los discos imaginales se disecaron en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.6 mM, Na₂HPO₄ 10.2mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4) y se fijaron en paraformaldehído 4% disuelto en PBS durante 30 minutos. Las muestras se permeabilizaron con tres lavados con PBST (PBS, Triton X100 0.2%) de 30 minutos cada uno. A continuación se bloquearon las muestras con solución de bloqueo (PBST + suero de chivo 5%) durante 30 minutos. Para la inmunofluorescencia donde se detectó a E-cadherina y la GFP, se usó la siguiente solución de bloqueo; PBST+BSA (0.1%), NaCl (250mM). Se bloqueó durante 30 minutos y al finalizar este tiempo las muestras se incubaron con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo toda la noche a 4°C (~12 horas).

Los anticuerpos primarios que se emplearon fueron: mouse anti-GFP (DSHB 1:50), Rabbit anti-GFP (Abcam 1:100), Rat anti-Elav (DSHB 1:50), Mouse anti-Bruchpilot (DSCB 1:50), Mouse anti-Futsch (DSHB 1:50), Rat anti-E-cadherina (1:50), Mouse anti-Arm (1:50), Mouse anti-En (1:25), Rat anti-Ci (1:25), Mouse anti-Wn (1:50). Se retiró el anticuerpo primario con 3 lavados con PBST de 30 minutos cada uno y posteriormente se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario en solución de bloqueo durante 17 hrs. Los anticuerpos secundarios que se utilizaron fueron: Cy2 anti-mouse (Jackson, ImmunoResearch 1:300), Cy3 anti-mouse (Jackson, ImmunoResearch 1:300), Cy2 anti-rata (Jackson, ImmunoResearch 1:300), Cy3 anti-rata (Jackson, ImmunoResearch 1:300) y Cy5 anti-mouse (Jackson, ImmunoResearch 1:300). Al término de este tiempo, se retiró el anticuerpo secundario con tres lavados con PBST de 30 minutos cada uno. Las muestras se montaron en Citifluor (TED PELLA, INC) para su posterior observación. Las muestras se observaron mediante microscopía confocal láser con un microscopio Confocal Olympus MPhot Invertido con objetivos de aumento 10x y 20x. Las imágenes fueron procesadas y analizadas mediante el programa ImageJ (Fiji) y GIMP 2.8. El manejo de intensidad de Fluorescencia de las imágenes de microscopia confocal se utilizó la herramienta Window/level del programa ImageJ.

Mosca adulta.

Cerebros

Se retiraron las cabezas del tórax de las moscas y se sumergieron por 5 segundos en etanol al 96% para retirar los componentes hidrofóbicos y se colocaron en PBS. Los cerebros se disecaron en PBS y se fijaron en PFA al 4% durante 45 minutos. Posteriormente se realizaron los pasos ya descritos anteriormente.

Proboscis

Se fijaron las moscas completas en formaldehído 3.7% en PBST durante 45 minutos. Posteriormente se permeabilizaron con PBST con 3 lavados de 30 minutos. Antes de bloquear, se retiraron las cabezas del tórax y se cortaron longitudinalmente con navajas para rasurar (Dorco), procurando que el filo de la navaja quedara justo entre ambos labelos de la proboscis. Los siguientes pasos se realizaron como se describió anteriormente.

Western blot.

Se extrajo proteína total de muestras de larvas de 3er instar y se lisaron en buffer de homogenizado (sacarosa 250 mM, Tris 50mM pH 7.4, KCl 25mM, MgCl₂ 5mM, EDTA 5mM), 1mM Feniltiourea (impide la melanización de la hemolinfa), 2mM de CaCl₂ para mantener la integridad de la proteína E-cadherina, además PMSF y complete como inhibidores de proteasas.

Se cuantifico la proteína empleando el método de Bradford, la curva estándar se realizó con concentraciones seriadas de BSA, las concentraciones empleadas fueron: 0, 2, 4, 8, 16 y 32 µg.

En cada gel se cargaron 100 µg de proteína en un gel de 7.5% SDS-poliacrilamida (PAGE) y se sometieron a electroforesis a 80 Volts, hasta que las muestras salen del gel compactador y posteriormente se aumentó el voltaje a 100 Volts. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa 0.2microm (# 1620112 BIO RAD) durante 70 minutos a 120 Volts.

Las membranas se bloquearon en solución de bloqueo (PBS, Tween 20 0.1%, Leche 10% (Carnation Nestle)) toda la noche a 4°C (~12 h). Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti-E cadherina (monoclonal de rata, DCAD2, Developmental Studies Hybridoma Bank) en una dilución de 1:1000 en solución de bloqueo (PBS, Tween 20 0.1%, Leche 5%) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se retiró el anticuerpo con 3 lavados de PBST y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario HRP-Anti Rat (Life Technologies) en una dilución 1:4000 durante dos horas a temperatura ambiente. Se retiró el anticuerpo con tres lavados de PBST (PBS, Tween 20 0.1%) de 15 minutos cada uno y dos lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Se reveló con el kit SuperSignal™ West Femto (Thermo Scientific, # 34095). Para el control de cargado de proteína se empleó el anticuerpo anti-actina (Developmental Studies Hybridoma Bank) en una dilución 1:1000 y el anticuerpo secundario HRP-anti-mouse (invitrogen), se añadió en una concentración de 1:3000. La señal fue detectada con películas film radiográfica Kodak. Las imágenes fueron procesadas y cuantificadas con el programa ImageJ.

Tinción de TUNEL.

Se evaluó el índice de células en apoptosis en discos imaginales de labio y antena-ojo de larvas de 3er instar crecidas a 28°C. Los discos imaginales se disecaron en PBS a 4°C y se fijaron en paraformaldehído 4% durante 1 hora a 4°C. Se retiró el paraformaldehído con tres lavados rápidos de PBST y 4 lavados de 15 minutos cada uno a 4°C. Las muestras se dejaron bloqueando en solución de bloqueo (PBS, 0.3% TritonX-100, suero de chivo 5%) por ~12 hrs a 4°C. Posteriormente las muestras se colocaron en Citrato de Sodio 100mM con TritonX-100 0.005% por 30 minutos a 65°C. Se retiró el Citrato de Sodio con 3 lavados rápidos de PBST y se incubaron las muestras con TUNEL-Dilution buffer (Roche #11966006001) por 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiró la solución y se agregó Labeling solution (in situ cell death detection TMR Red kit, Roche # 12156792910) por 30 minutos a 37°C. Al terminar este tiempo se agregó 3 µL de Enzyme solution (Roche #11966006001) y se incubó a 37°C durante 2 horas. Al finalizar se realizaron 3 lavados rápidos con PBST y se tiñeron los núcleos con Hoescht disuelto en PBST en una relación 1:1000 por 3 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el Hoestch con 3 lavados rápidos y 4 lavados de 15 minutos cada uno con PBST a 4°C. Las muestras se montaron en Citifluor.

RT-PCR cuantitativa

Para determinar los niveles de expresión de *esg*, se extrajo RNAm de discos imaginales de antena-ojo de larvas de 3er instar, crecidas a 28°C. Se compararon los niveles de expresión del RNAm del gen *esg* de las muestras interferidas con respecto a la muestra silvestre.

Extracción de RNA

Se extrajo RNA total de discos imaginales de antena-ojo, estos fueron disecados en PBS a 4°C e inmediatamente colocados en 100µL de TRIzol a 4°C. Se colectaron cinco discos imaginales de antena-ojo, un disco por larva de cada genotipo. Los discos se homogenizaron mecánicamente en un volumen total de 200 µL de TRIzol. Para el qRT-PCR se siguieron las especificaciones del kit de Qiagen. Para todas las reacciones de partió de 70ng de RNA total.

Condiciones de qPCR

Las reacciones de tiempo real se realizaron con 6.25ng de cDNA. La TM empleada fue de 58°C.

Reactivo	Secuencia
Forward	5'-TGCAGATCGCTCGAATCTGC-3'
Reverse	5'-AGCAACTGGTGCAGGAGTAC-3'
TaqMan	5'-/56FAM/TTCTTGATGTCCGAGTGGGTCTGC/36-TAMSp/-31

El análisis de cuantificación se realizó mediante el doble delta Ct. Este ensayo se hizo por triplicado y se realizó un análisis estadístico de ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiple de Dunnett, con un valor de significancia de $P \leq 0.05$.

Aclaramiento de tejidos.

Para el aclaramiento de tejidos se retiró los hidrocarburos que recubren la cutícula de las moscas adultas sumergiendo las moscas en EtOH al 96% durante 5 segundos. Se retiraron las cabezas y se colocaron en solución de aclarado (NaOH al 10% + PBS) durante 30 minutos a 80°C. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS por 20 minutos cada uno (Boll, 2002). Las antenas fueron montadas en Citifluor y las imágenes se tomaron en microscopio Zeiss Axiovert 200 en campo claro.

RESULTADOS

La respuesta alterada a la nicotina *esg^{L4}* ocurre a través del receptor gustativo *Gr33a*.

De acuerdo a los datos obtenidos anteriormente se encontró un vínculo entre la respuesta alterada a la nicotina con el desarrollo de la proboscis. Los labelos de la proboscis contienen múltiples neuronas gustativas que responden a una gran gama de moléculas sápidas. Se evaluó si el fenotipo de sensibilidad a la nicotina que se observó en la mutante *esg^{L4}* ocurre a través de las neuronas gustativas de la proboscis. Para esto, se emplearon mutantes de pérdida de función de receptores de neuronas que responden a sabores amargos y dulces, y se expusieron a nicotina volatilizada (ver materiales y métodos). La nicotina es un alcaloide considerada como una molécula amarga y se desconoce si los receptores gustativos en insectos presentan una afinidad por esta sustancia. Así que, si el fenotipo de sensibilidad a la nicotina se genera en las neuronas gustativas, se esperaría que fuera a través de neuronas que respondan a sabores amargos.

Las líneas mutantes de los receptores gustativos que se emplearon fueron las líneas; *Gr64f*, que presenta una deficiencia en la respuesta a: glucosa, maltosa, trehalosa y sacarosa, mientras que la línea *Gr64e* no responde a: glucosa y trehalosa (Freeman, Wisotsky, & Dahanukar, 2014). También se empleó una línea mutante del receptor *Gr8a* que responde a sabores amargos pero no a L-canavanina, un aminoácido con estructura química semejante al aminoácido arginina que las plantas emplean como mecanismo de defensa (Y. Lee et al., 2012). Las líneas mutantes de receptores que se expresan en neuronas receptoras amargas que se emplearon son: *Gr32b*, *Gr93d*, *Gr93a³* y *Gr33a¹*. De estas líneas únicamente *Gr93a³* y *Gr33a¹* se ha reportado que presentan una respuesta alterada a sustancias amargas, *Gr93a* no responde a la cafeína (Y. Lee, Jun, & Montell, 2009), mientras que *Gr33a¹* no responde a: berberina, estricnina, lobelina, papaverina, quinina, denatonio y cafeína (Moon et al., 2009). Cada línea se expuso a nicotina volatilizada (32 ng) y se midió su TMR. Se comparó la respuesta de las líneas mutantes con la línea *w¹¹¹⁸* y ninguna presentó una diferencia significativa (Fig. 15A). La idea de estos ensayos fue que la falta de un receptor ocasionará que

las moscas fueran resistentes a la nicotina al no haber una señal de entrada por las neuronas gustativas. Para verificar que la sensibilidad a la nicotina inicia por las neuronas gustativas que responden a sabores amargos, se empleó la mutante *Gr33a¹* en un fondo de *esg^{L4}* (*esg^{L4}/Gr33a¹*) y se comparó la respuesta con la línea *esg^{L4}/+;Gr64f/+*.

El comportamiento de las moscas *L4/+;Gr64f/+* fue idéntico a *esg^{L4}* (Fig. 15B), las moscas mantuvieron una respuesta de sensibilidad a la nicotina. Por el contrario, en *esg^{L4}/Gr33a¹* el fenotipo de sensibilidad observado en *esg^{L4}* se revierte, las moscas presentaron un comportamiento similar a la línea control *w¹¹¹⁸* (Fig. 15B). Los resultados obtenidos sugieren que la sensibilidad en *esg^{L4}* se inicia a través de neuronas receptoras gustativas amargas e involucra al receptor Gr33a.

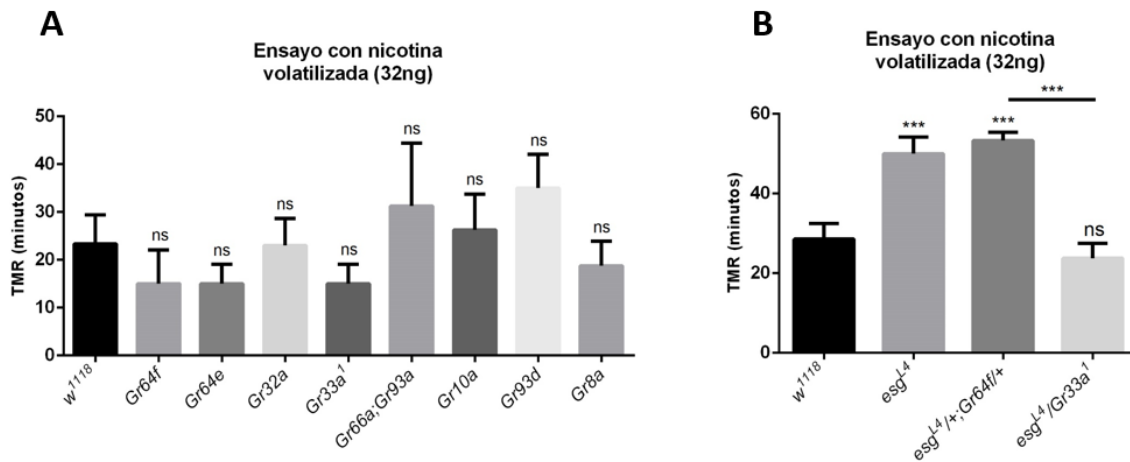


Figura 15. El fenotipo de sensibilidad a la nicotina en *esg^{L4}* se revierte por la pérdida de una copia del receptor Gr33a. (A) De las diferentes líneas mutantes de receptores gustativos que se emplearon, ninguna presentó diferencias significativas en el TMR con respecto a *w¹¹¹⁸*. Por cada línea se realizaron al menos 4 repeticiones con una $n \geq 40$ moscas. $P = 0.0006$. Los datos fueron analizados usando ANOVA de una vía, las diferencias fueron obtenidas con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. (B) La sensibilidad a la nicotina descrita en *esg^{L4}* no se afectó por la falta de una copia del receptor Gr64f (*esg^{L4}/+;Gr64f/+*) y presentó una diferencia significativa comparada con *w¹¹¹⁸*, en cambio, las moscas *esg^{L4}* dejan de ser sensibles cuando les falta una copia del receptor Gr33a (*esg^{L4}/Gr33a¹*) y no presentan diferencia significativa con respecto a *w¹¹¹⁸*, pero sí presentó una diferencia significativa comparado con *esg^{L4}/+;Gr64f/+*. Para cada línea se realizaron al menos 4 repeticiones con una $n \geq 40$ moscas. Los datos fueron analizados usando una ANOVA de una vía, las diferencias fueron obtenidas con la prueba de comparaciones múltiple de Tukey. ****= $P \leq 0.0001$.

El establecimiento de las neuronas gustativas en el labelo de la proboscis son dependientes de los niveles de *escargot*.

La formación de las neuronas gustativas inicia en las primeras horas que comienza la metamorfosis e involucra diferentes vías de señalación en el desarrollo de las sensilas. Por un lado, la expresión de Notch induce la formación de las quetas y reprime la formación de neuronas sensoriales, mientras que Prospero (Pros), Numb y Elav participan en el desarrollo de neuronas sensoriales y reprimen la formación de las quetas (Ramat et al., 2016).

Los datos obtenidos previamente, indican que las neuronas gustativas ocasionan la sensibilidad a la nicotina, pero ¿qué ocasiona particularmente este fenotipo?: ¿un incremento en el número de neuronas gustativas que responden a sabores amargos o las neuronas gustativas en L4 están facultadas para responder a la nicotina mientras que en el control no lo hacen? Para responder estas preguntas buscamos si *esg* juega un papel en el desarrollo de las SOP. En el 2016 se reportó que *esg* regula de manera indirecta la vía de señalización de N, esto se descubrió cuando sobre-expresaron a *esg* en las SOP del tórax, lo que generó que se reprimiera la formación de quetas mecanosensoriales, mientras que se favoreció la formación de precursores neuronales como Prospero y Elav (Ramat et al., 2016). Al mismo tiempo, encontramos un fenotipo similar de pérdida de quetas, no sólo en el tórax sino también en las quetas de la proboscis al sobreexpresar a *esg*. La sobreexpresión de *esg* se realizó de manera controlada porque resulta letal si se realiza durante el desarrollo embrionario. Para esto se empleó un sistema de expresión génica que permite controlar la expresión de un gen de interés en un tiempo específico mediante cambios de temperatura. Este sistema es una variante de la herramienta genética UAS/GAL4 que se complementa con GAL80 para conformar un sistema tripartito UAS/GAL4/GAL80. Se generó la línea *Act5c-GAL4;Tub-GAL80>P(EP)esg* y se sobreexpresó a *esg* en todas las células que conformaron al organismo únicamente en las primeras 24 horas de inicio de la metamorfosis. De las moscas que eclosionaron, presentaron una reducción en el número de quetas de los labelos entre un 10 y 60% aproximadamente (n=5) (Fig. 16C). El desarrollo de las neuronas gustativas también se ve afectado, los cuerpos

de las neuronas se acumularon en la base del labelo y las dendritas no llegan a su blanco (Fig. 16C) y pierden su distribución en forma de abanico como se observó en la línea control (Fig. 16A). También la disminución en los niveles de *esg* generó defectos en el desarrollo de las sensilas. En *esg^{L4}>esg-RNAi* (*v9794*), como se describirá más adelante, las moscas mostraron defectos en el desarrollo de la proboscis, pero en moscas donde hubo un desarrollo de este órgano, se observaron defectos en el establecimiento de las neuronas gustativas y alteración en la distribución de quetas en los labelos (Fig. 16B). Este fenotipo se podría deber porque no se desarrollaron correctamente los labelos de la proboscis.

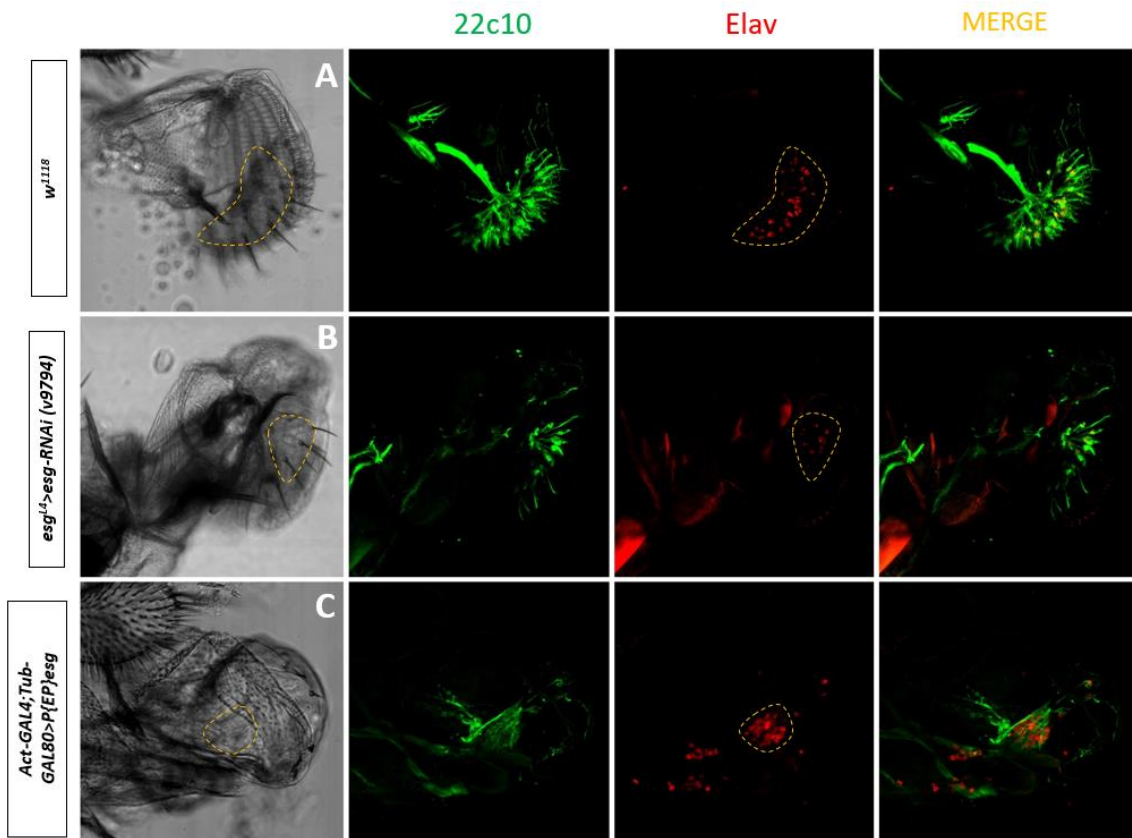


Figura 16. Distribución de las neuronas gustativas en uno de los labelos de la proboscis en mutantes de *esg*. (A) Labelo de una mosca *w¹¹¹⁸*, donde se observan las quetas que la recubren. La distribución de los somas (Elav) y dendritas (22c10) de las neuronas gustativas dentro de los labelos se asemeja a un abanico. (B) La distribución de las quetas y de las neuronas gustativas se alteró en *esg^{L4}>esg-RNAi* (*v9794*) al igual que cuando se sobreexpresó *esg*. (C) La sobreexpresión de *esg* en cada célula de la mosca generó pérdida de quetas en el labelo y acumulación de

los somas de las neuronas en la base del labelo (Elav) y las dendritas (22c10) no llegaron a localizarse dentro de las quetas.

Las neuronas receptoras que responden a sabores amargos en *esg^{L4}* presentan mayor respuesta a la nicotina.

Ya que no identificamos que hubiera un mayor número de neuronas gustativas receptoras amargas en los labelos de *esg^{L4}*, quisimos evaluar, si estas neuronas responden a la nicotina. Para responder esta pregunta decidimos emplear dos sistemas mutuamente complementarios. Por una parte empleamos el indicador de calcio GCaMP para evaluar la respuesta de las neuronas gustativas en tiempo real ex-vivo (Fig. 17A, C y D) y por ensayo electrofisiología de tipo “tip recording”, para evaluar de manera independiente la respuesta de las sensilas.

El indicador de calcio GCaMP se dirigió a todas las neuronas gustativas que responden a sabores amargos y para esto se empleó el driver Gr66a-GAL4 (Fig. 17 C y D) (Thakur et al., 2017). Se generó la línea *Gr66a-GAL4>UAS-GCaMP5* y se empleó como control para comparar la respuesta de las neuronas gustativas a la nicotina en un fondo mutante de *esg*. Se estableció la línea experimental *esg^{L4}/Gr66a-GAL4>UAS-GCaMP5* y se realizaron los ensayos como se describió anteriormente (ver Materiales y métodos). Previo al estímulo, las neuronas gustativas presentaron una fluorescencia basal (Fig. 17A y C), que en el caso de la línea control no presentó una respuesta o cambio en la fluorescencia de GFP después de haber estimulado de manera independiente con sacarosa y nicotina (Fig. 17 E y F). En cambio, en *esg^{L4}/Gr66a-GAL4>UAS-GCaMP5* las neuronas gustativas respondieron en su mayoría a la nicotina (Fig. 17D y F). Se corroboró que el sistema funcionaba y que no respondían a cualquier estímulo, mediante la estimulación con sacarosa previo al estímulo con nicotina (Fig. 17E). Se confirmó que la respuesta de las neuronas gustativas a la nicotina se debe a los niveles de *esg*, empleando el alelo *esg^{35ce-3}*. Se generó la línea *esg^{35ce-3}/Gr66a-GAL4;UAS-GCaMP5/+* y se encontró también que las neuronas gustativas respondieron a la nicotina al igual que en *esg^{L4}* (Fig. 17F).

Estos datos se complementaron con ensayos de electrofisiología en 8 diferentes sensilas de la proboscis. Se encontró que las sensilas intermedias y pequeñas

responden a la nicotina en la línea control w^{1118} (Fig. 17H), pero resaltó que en esg^{L4} se generó un mayor número de potenciales de acción comparado con el control w^{1118} (Fig. 17H). Estos resultados no fueron tan contundentes como los ensayos con GCaMP, pero en ambos ensayos la respuesta de las neuronas gustativas a la nicotina es mayor en un fondo mutante de esg .

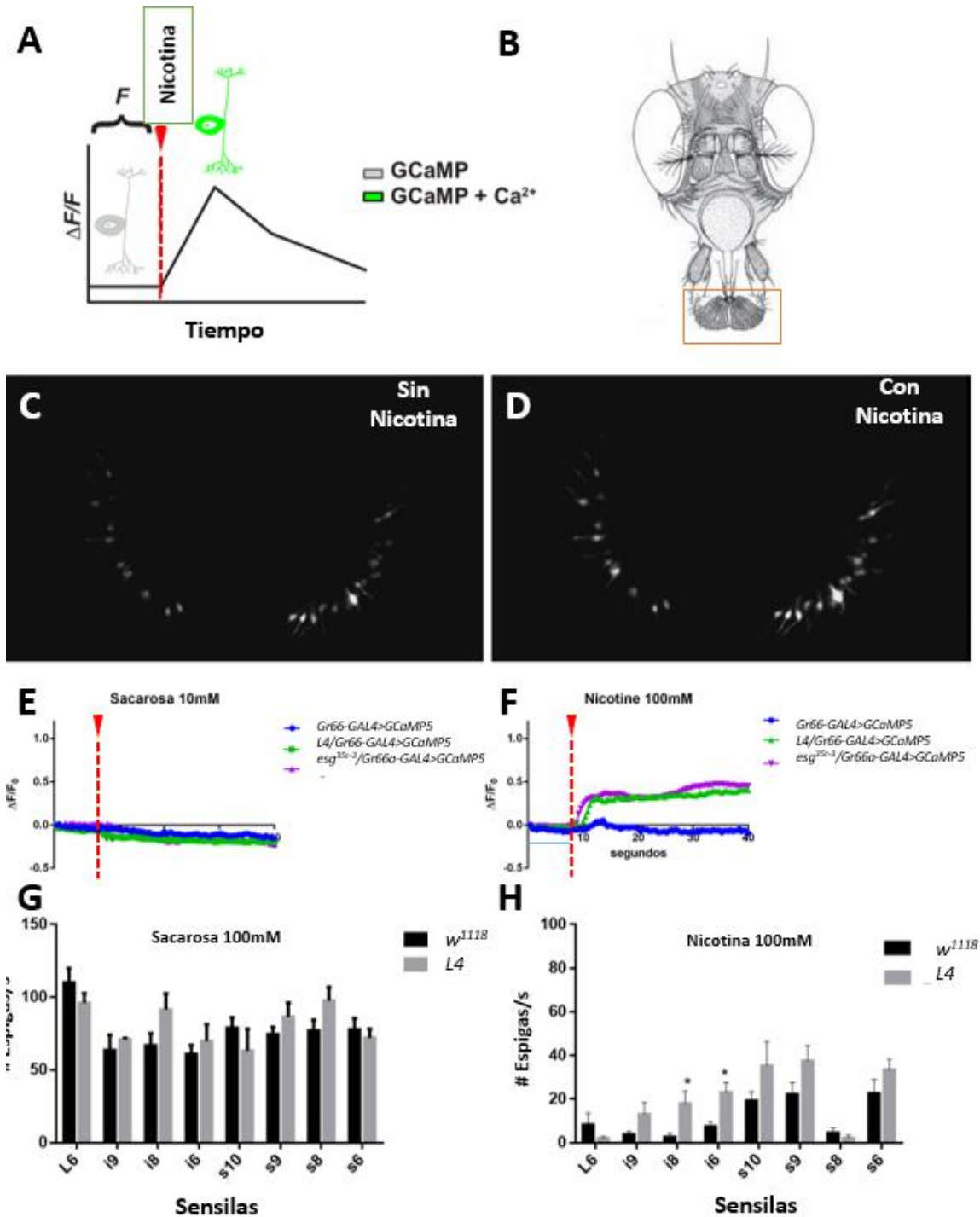


Figura 17. Respuesta de las neuronas gustativas de la proboscis a la nicotina en mutantes de *esg*. (A) Esquema que representa la respuesta de las neuronas en el tiempo, antes del estímulo representado por F y después del estímulo cuando el Ca^{2+} es censado por GCaMP, lo que genera un cambio en la fluorescencia ΔF . (B) Esquema de la cabeza de una mosca donde el recuadro muestra la región de la proboscis estudiada en los ensayos de GCaMP. (C y D) Distribución de las neuronas receptoras amargas del labelo cuando se montan para los ensayos de GCaMP. Se observa fluorescencia basal previo al estímulo pero se incrementa cuando se estimuló con nicotina en *esg^{L4}/Gr66a-GAL4>GCaMP5*. (E) Ninguna de las neuronas gustativas de la línea control *Gr66a-GAL4>GCaMP5* respondió a sacarosa y tampoco a la nicotina (F). (F) En cambio, las neuronas gustativas las líneas experimentales *esg^{L4}/Gr66a-GAL4>GCaMP5* y *esg^{35c3}/Gr66a-GAL4>GCaMP5* respondieron a la nicotina mientras que no lo hicieron a la sacarosa (E). La línea punteada roja indica el momento en que se colocó el estímulo. (G) Ensayos de electrofisiología, las gráficas muestran el número de potenciales de acción generados por sacarosa y (H) nicotina. (F) Las sensilas de la línea *esg^{L4}* responden igual a las sensilas de *w¹¹¹⁸* con la estimulación de sacarosa pero difieren su respuesta cuando se estimulan con nicotina. Las imágenes del ensayo de electrofisiología fueron tomadas de la tesis de Maestría de Miguel Urioso. La imagen del panel (A) fue tomada y modificada de (Shankar, Calvert, & Yew, 2016).

***esg* se expresa en un circuito neuronal implicado en locomoción y alimentación.**

A pesar que las neuronas receptoras gustativas de *esg^{L4}* presentan una mayor respuesta a la nicotina que las de la línea *w¹¹¹⁸*, consideramos que esta diferencia no sería suficiente para ocasionar el fenotipo de sensibilidad a la nicotina (Fig. 15B). Se decidió explorar el patrón de expresión de *esg* de manera indirecta en el cerebro de la mosca adulta con la finalidad de identificar un circuito que pudiera estar implicado en la respuesta en la nicotina, para esto se empleó a *esg^{L4}* como driver para dirigir la GFP. Se identificó en cerebros de mosca adulta un cluster de neuronas que se ubican en el centro mecánico y sensorial de las antenas (AMMC antennal mechanosensory and motor center) a un costado de los lóbulos antenales y dirigen sus axones o dendritas a los cuerpo fungiformes, que es la región del cerebro donde se llevan a cabo procesos complejos de memoria y aprendizaje (Fig. 18A). También se encontró un circuito en el ganglio torácico abdominal en los neurómeros protorácico y metatorácico, que proyectan sus axones hacia la zona subesofágica del cerebro (Fig. 17 B). Interesantemente, cuando se bajan los niveles de *esg*

aumenta el número de neuronas que expresan GFP (Fig. 18C). En la zona del ganglio subesofágico se observó señal en somas que podrían ser interneuronas y que no se observaban en *esg^{L4}* (Fig. 18B), también aumento el número de neuronas localizadas entre los neurómeros protorácicos, mesotarácicos, metatorácicos (Fig. 18C).

Una vez que trazamos un circuito neuronal en *esg^{L4}*, se buscó si ya había sido tipificado o se asemejaba a uno ya descrito. En el 2013 el grupo de Kristin Scott (Mann, Gordon, & Scott, 2013) reportó un circuito neuronal casi idéntico al que encontramos en *esg^{L4}*, y describieron interneuronas que se localizan en el ganglio protorácico que coordinan la extensión y retracción de la proboscis (Fig. 18B) (Mann et al., 2013). Al silenciar estas neuronas mediante un inhibidor de la bomba de potasio kir2.1, las moscas mantenían extendida la proboscis sin que existiera un estímulo de por medio y presentaban menor movimiento. Para averiguar si el circuito en *esg^{L4}* ocasiona el mismo fenotipo de extensión de la proboscis prolongada, se dirigió la cadena ligera de la toxina de tétanos con la construcción UAS-TeTxLc (por sus siglas en inglés Tetanus Toxin Light chain) bajo el control de *esg^{L4}*. Se generó la línea *esg^{L4};Tub-GAL80>UAS-TeTxLc*, y se crecieron las moscas a 18°C para mantener reprimido a GAL4 por GAL80. Al eclosionar, se colocaron las moscas a 28°C para inactivar a GAL80 y dirigir la expresión de la TeTxLc por *esg^{L4}*. El 80% de las moscas presentaron el fenotipo de proboscis extendida (Fig. 18D). Posteriormente se evaluó la respuesta de estas moscas a la nicotina para determinar si el circuito descrito en *esg^{L4}* podría estar implicado en la sensibilidad a la nicotina. Tanto las moscas *esg^{L4};Tub-GAL80>UAS-TeTxLc* que se crecieron a 18°C (control) como las que se expresó la TeTxLc hasta mosca adulta, fueron sensibles a la nicotina volatilizada (Fig. 18E), lo que indica que el circuito encontrado en *esg^{L4}* no participa en la sensibilidad a la nicotina.

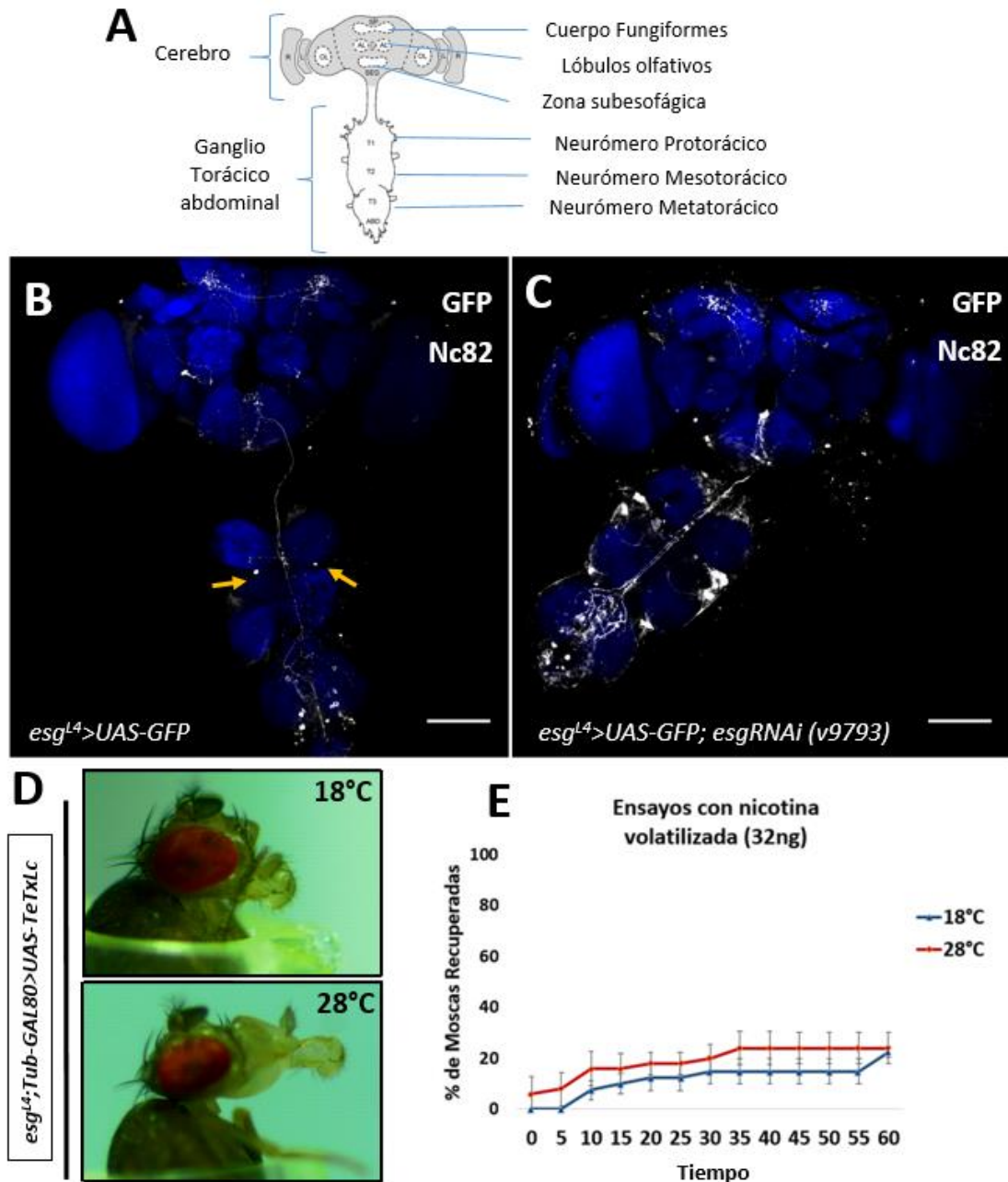


Figura 18. El circuito de *esg^{L4}* está involucrado en la extensión de la proboscis.

(A) Esquema de un cerebro de mosca adulta donde se describe cada parte del cerebro. (B) Expresión de GFP bajo el control de *esg^{L4}* en un cerebro de mosca adulta. Se encontró señal de GFP en neuronas del cerebro y en el ganglio torácico abdominal. Nc82 es un anticuerpo que marca el neuropilo y permite definir las estructuras del cerebro. Las flechas amarillas indican interneuronas implicadas en el fenotipo de extensión de la proboscis. (C) La señal en las neuronas observadas en *esg^{L4}*, se amplifica cuando disminuyen los niveles de *esg*, tanto en el ganglio subesofágico del cerebro como en los neurómeros protorácico, mesotorácico y metatorácico. (D) La expresión de la TeTxLc bajo el control de *esg^{L4}* genera

extensión prologada de la proboscis. Sólo se genera este fenotipo si se crecen las moscas a 18°C y después de que eclosiona se expresa la TeTxLc pasando las moscas a 28°C. (E) Apagar el circuito de *esg^{L4}* con la TeTxLc no interfiere en la sensibilidad a la nicotina. Barra de escala: 50 µm.

2.- Implicación del gen *esg* en el desarrollo de los discos imaginales de labio y antena-ojo

***esg* se expresa en todos los discos imaginales destinados a formar los apéndices de la mosca adulta.**

En 1993 el grupo de Hayashi (Hayashi et al., 1993) describió por primera vez el patrón de expresión de *esg*. Mediante hibridación *in situ* describieron la expresión de *esg* en los primordios imaginales en embrión así como en los discos imaginales de ala, antena-ojo, extremidad, histoblastos y sistema nervioso central de larvas de 3er instar (Fig. 19) (Hayashi et al., 1993). El patrón de expresión de *esg*, se ha complementado mediante herramientas genéticas como son: sistemas de reporteros de expresión como *UAS/GAL4* y trampas de enhancers con reporteros tipo lacZ, donde además se encontró que la expresión de *esg* se localiza en el intestino medio, traqueoblastos, SOP, neuroepitelio. Con la intención de asegurarnos que la línea *esg^{L4}* es un driver de *esg*, se dirigió la construcción genética *UAS-GFP::mCD8* bajo el control de *esg^{L4}* (*esg^{L4}>UAS-GFP::mCD8*). La expresión del gen reportero se localizó en todos los discos imaginales (Fig. 19), histoblastos, traqueoblastos, intestino medio, neuroepitelio, sistema nervioso central. La señal se localizó en los mismos tejidos reportados, además de que se encontró señal en otros tejidos como proboscis, cuerpos fungiformes, ganglio torácico abdominal y cefaloesqueleto (mandíbulas de larva). Además como se reportó por nuestro grupo se localizó señal en los discos de labio (Sanchez-Díaz et al., 2015). Sin importar el sistema que se haya empleado para describir el patrón de expresión de *esg*, se encontró que la expresión de nuestro driver *esg^{L4}* coincide en cada tejido donde se ha reportado que se expresa *esg*. En el presente trabajo presentamos un acercamiento para tratar de entender su función en los discos imaginales de labio y de antena.

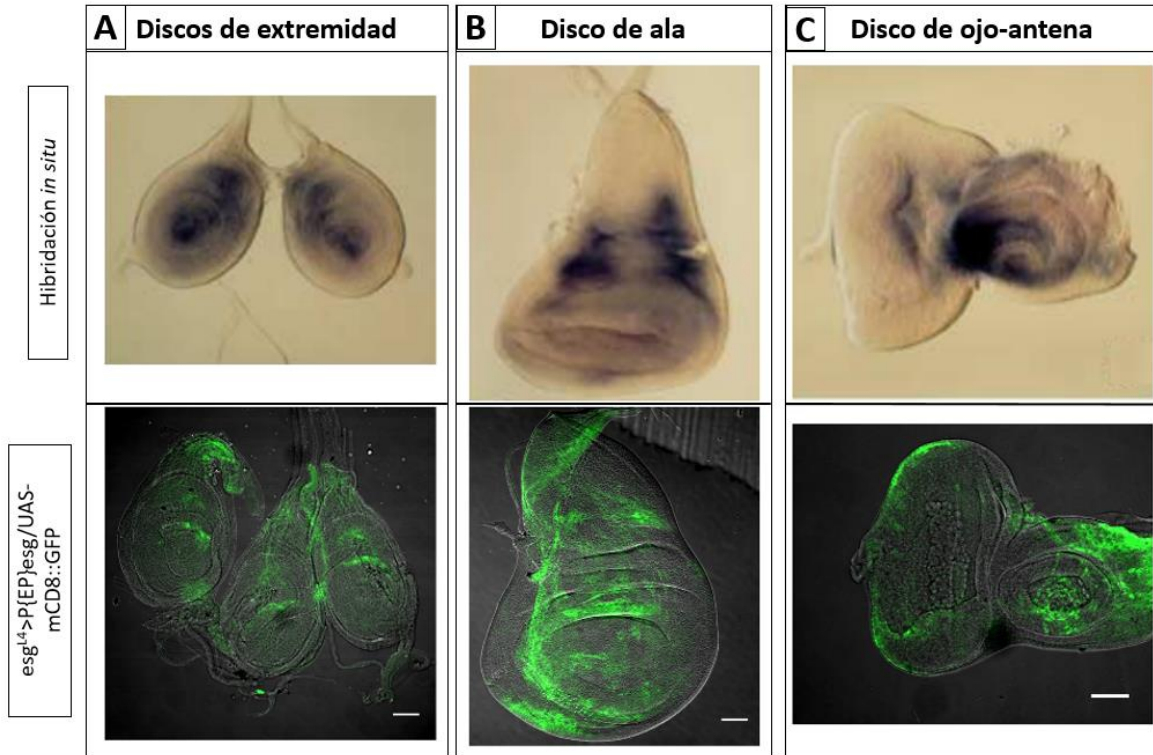


Figura 19. Comparación del patrón de expresión de *esg* por hibridación *in situ* y GFP dirigido por el driver *esg^{L4}*. (A) El Patrón de expresión de *esg* en discos de extremidad es muy parecido en ambas figura, cambia un poco en los discos imaginales (B) de ala y (C) ojo-antena, en ambos casos se observa señal en la región posterior del disco, mientras que en las hibridaciones *in situ*, (B) en el disco de ala no se ve señal en la parte posterior y (C) en el disco de antena la señal es muy tenue. La comparación se realizó con la línea $esg^{L4} > P\{EP\}esg; UAS-mCD8::GFP$, porque presenta un rescate en los niveles de *esg*. Barra de escala: 50 μ m. Las imágenes de las hibridaciones *in situ* fueron modificadas y tomadas de (Hayashi et al., 1993)

La pérdida de función de *esg* ocasiona alteración en el desarrollo de los órganos quimiosensoriales de la cabeza de la mosca.

La anatomía de la cabeza de la mosca está delimitada por regiones morfológicamente distintas, empezando por la cápsula o cutícula que recubre el cerebro y donde están dispuestas lateralmente simétricas macro y micro quetas además de alojar cuatro órganos sensoriales: la vista (ojos), olfato (antenas y palpos maxilares), oído (antenas) y gusto (proboscis). Las antenas se dividen en tres segmentos: el primero segmento está unido a la cápsula, mientras que en el segundo segmento se localiza el sentido del oído y se prolonga hasta la arista. El

tercer segmento es el de mayor tamaño y se ubica el principal sentido del olfato. Los palpos maxilares son apéndices situados encima de la proboscis, también presentan neuronas receptoras olfativas pero en menor número que en las antenas (Fig. 20B). Por otro lado, la proboscis contiene el principal sentido del gusto de la mosca, su contracción y extensión está sistemáticamente vinculada en función de las necesidades alimenticias y apareamiento de la mosca que es distinta entre machos y hembras. La anatomía de este órgano se puede dividir en dos segmentos: el primero es la base unida a la cabeza y hace la función de extender o contraer la proboscis y en el segundo se localizan dos labelos y cada uno presenta neuronas receptoras gustativas (Fig. 20B).

La línea *esg^{L4}* presenta la inserción del elemento P{GawB} a 41 pb de inicio del gen *escargot* en la región 2L:15333905 (Fig. 20A) (Sanchez-Díaz et al., 2015). Se comprobó que esta inserción es una pérdida de función para el gen *esg* que al presentarse de manera homociga es letal, pero es viable y no presenta ningún fenotipo en la mosca adulta cuando se encuentra heterocigota (Fig. 20C). Anteriormente se encontró que la disminución en los niveles de *esg* por debajo de la media dosis génica (ver antecedentes), generaba que las moscas adultas eclosionaran sin proboscis o con un desarrollo alterado en los labelos. Para caracterizar mejor el origen del fenotipo de la pérdida de la proboscis por la disminución en los niveles de *esg*, se emplearon varias construcciones genéticas *UAS-RNAi* contra *esg* (*esg-RNAi*) y se dirigieron tejido específico con el driver *esg^{L4}* (*esg^{L4}>esg-RNAi*).

Con cada uno de los *esg-RNAi* empleados se observó el fenotipo característico de daño en la cutícula del abdomen asociado a la pérdida de *esg* (Hayashi et al., 1993; Fuse et al., 1994). Aunado a este fenotipo, se encontró otro particularmente característico en la proboscis, las moscas presentaban daño parcial o pérdida total de este órgano dependiendo del *esg-RNAi* utilizado (Fig. 20 D-G). Otro fenotipo que se encontró fue que las antenas y palpos maxilares se reducían o se perdían completamente (Fig. 20G y 20C) y también se encontró duplicación de las antenas y palpos maxilares (Fig. 20B y 20D), pero en ningún caso hubo duplicación de la proboscis.

El *esg^{L4}>esg-RNAi (28514)* fue con el que se observó menor penetrancia, sólo un 57% de las moscas que eclosionaron presentaron pérdida de la proboscis (Fig. 20D). En cambio, en *esg^{L4}>esg-RNAi (v9794)* se observó una gama de fenotipos que se describirán más adelante con mayor detalle (Fig. 21). Los *esg-RNAi (v9793)* y *esg-RNAi (34063)*, son los que dan fenotipos más fuertes en los órganos quimiosensoriales de la cabeza de la mosca. El *esg^{L4}>esg-RNAi (v9793)* es semiletal, 10% de las moscas eclosionaron y presentaron fenotipos semejantes a los observados con el *esg^{L4}-RNAi (v9794)*, pero con la excepción de que ninguna mosca desarrolló proboscis (Fig. 20F), mientras que *esg^{L4}>esg-RNAi (34063)* es letal; solo algunas moscas se desarrollan hasta faratos o metamorfosis tardía y presentaron los mismos fenotipos observados en *esg^{L4}>esg-RNAi(v9793)*, pérdida de proboscis y de antenas (Fig. 20G). En todos los casos, los fenotipos fueron muy localizados en los órganos quimiosensoriales de la cabeza de la mosca sin afectar el resto de los apéndices, lo que indica que *esg* juega un papel en el desarrollo de estos órganos.

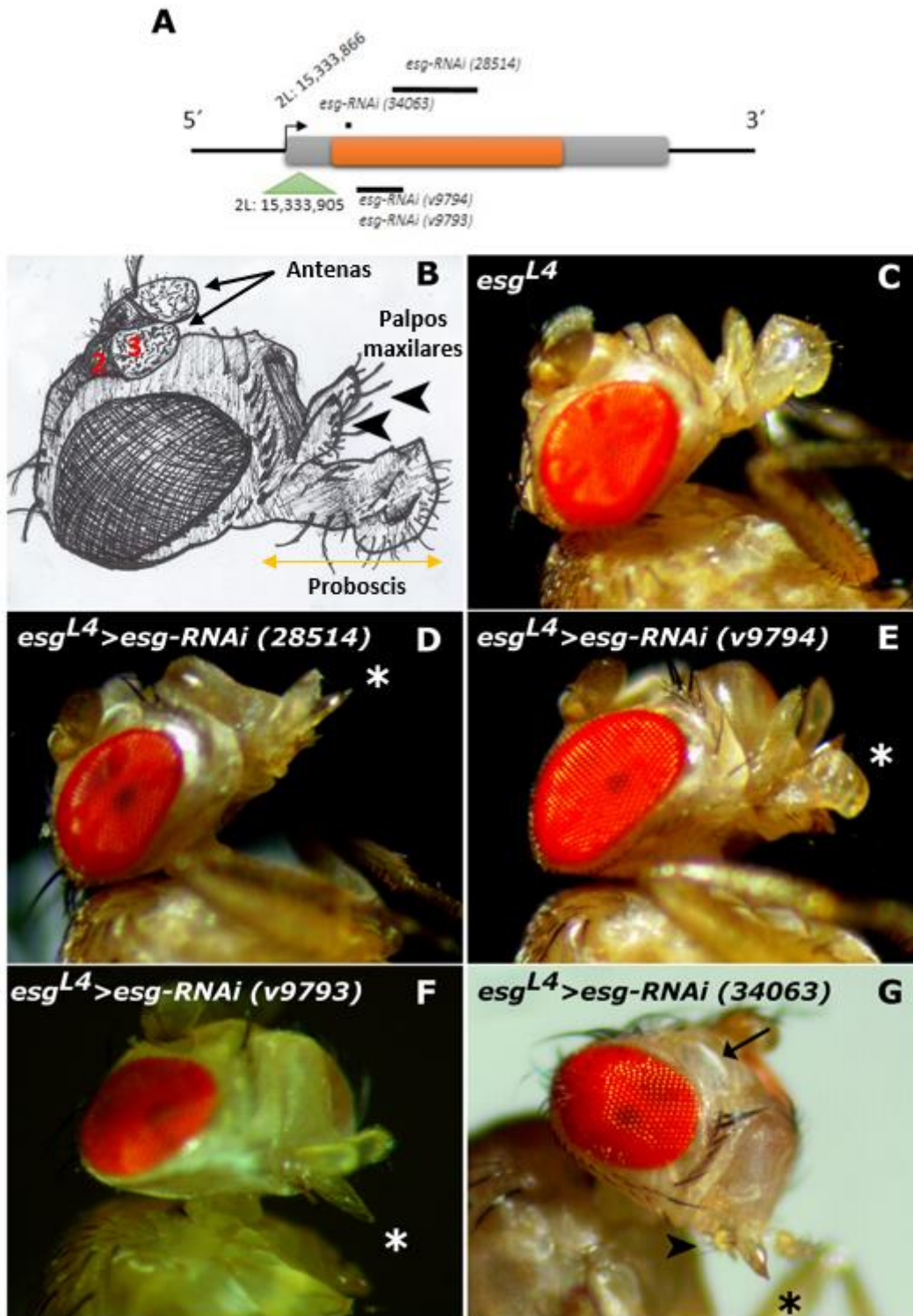


Figura 20. Fenotipos de pérdida de la proboscis asociados a la disminución en los niveles de *esg*. (A) Esquema donde se representa la inserción del elemento P{GaWB} en el extremo 5' del gen *esg*. Además se muestra la región que reconoce cada uno de los *esg-RNAi* a *esg*. (B) Esquema de la cabeza de una mosca donde se señalan las antenas, palpos maxilares y la proboscis, los números en rojo señalan:

(2) segundo segmento y (3) tercer segmento. (C) Cabeza de mosca adulta del alelo *esg^{L4}*, esta línea no presentó ningún fenotipo aparente en la mosca adulta. (D-G) Serie alélica de los fenotipos ocasionados por la disminución en los niveles de *esg* por los *esg-RNAi* dirigidos por el driver *esg^{L4}*. En todos los casos la proboscis se pierde o se desarrolló parcialmente uno de los dos labelos (E). Los asteriscos señalan el lugar donde se localizaría la proboscis, las flechas señalan la ausencia de las antenas y las cabezas de las flechas la reducción de los palpos maxilares.

Como se mencionó anteriormente en *esg^{L4}>esg-RNAi (v9794)* se observan todos los fenotipos observados con los *esg-RNAi* de mayor penetrancia, con la diferencia que con este *esg-RNAi* los individuos llegaron a mosca adulta (Fig. 21A-D). Empleando esta línea se obtuvo un cotejo de la sobrevivencia y de las proporciones fenotípicas que se generan por la disminución en los niveles de *esg*. A T/A 50% de los individuos eclosionaron, de este porcentaje el 72% de las moscas presentaron un fenotipo en el gusto, desde un daño parcial en uno de los dos labelos hasta la pérdida completa de la proboscis (Fig. 21A). Un 10% presentó un desarrollo parcial o incompleto de las antenas (Fig. 21C) y palpos maxilares (Fig. 21D), pero también hubieron casos de fenotipos donde las moscas presentaron duplicación en el 3er segmento de la antena (Fig. 21B). Un 18% presentaron fenotipos en ambos órganos: pérdida o daño en la proboscis y disminución en los palpos maxilares. Cuando se crecieron las moscas a 28°C el porcentaje de sobrevivencia disminuyó drásticamente a un 6%, en el cual, 75% de las moscas no desarrollaron proboscis y 25% no presentaron proboscis ni las antenas.

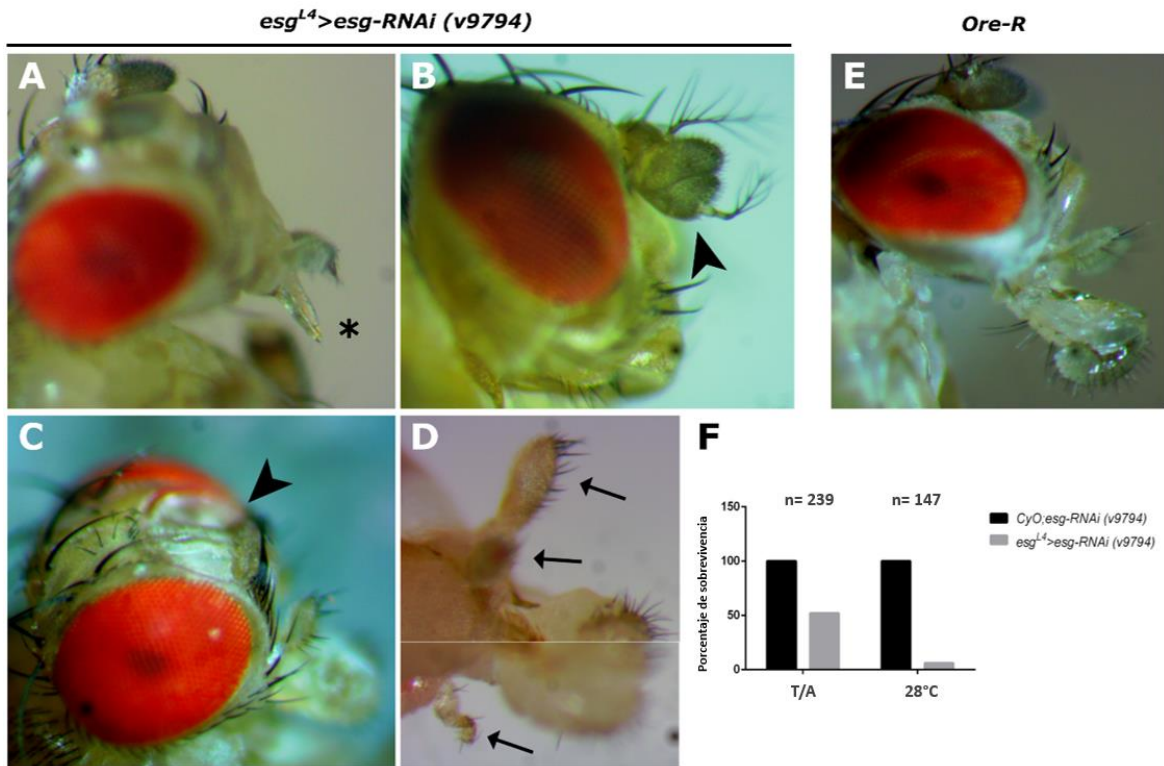


Figura 21. Fenotipos en los órganos quimiosensoriales generados por el *esg-RNAi (v9794)*. (A-D) La expresión del *esg-RNAi (v9794)* bajo el control de *esg^{L4}* (*esg^{L4}>esg-RNAi (v9794)*) genera defectos en el desarrollo de los órganos quimiosensoriales de la cabeza y se trunca la formación de: (A) la proboscis, (C) antenas y (E) palpos maxilares o la duplicación de las antenas (B) o palpos maxilares (las flechas indican cada palpo maxilar). (E) Cabeza de una mosca silvestre *Ore-R*. (F) Porcentaje de viabilidad en *esg^{L4}>esgRNAi (v9794)* crecidas a temperatura ambiente (T/A) y 28°C.

La pérdida de *esg* causa disminución en los niveles de E-cadherina en las larvas.

Las uniones adherentes entre células son fundamentales para el desarrollo y diferenciación de cualquier tejido y éstas dependen de las cadherinas. *Drosophila* presenta principalmente dos tipos de cadherinas; N-cadherina y E-cadherina. N-cadherina se expresa sustancialmente en el sistema nervioso central y E-cadherina en el resto de las células. La E-cadherina está codificada por el gen *shotgun* y su expresión está regulada por miembros de la familia Snail. Durante la gastrulación Snail regula negativamente a E-cadherina (Hiroki Oda, Tsukita, & Takeichi, 1998),

mientras que durante el desarrollo del sistema traqueal, Esg la regula positivamente (Tanaka-Matakatsu, Uemura, Oda, Takeichi, & Hayashi, 1996).

Se analizó si la pérdida de los órganos quimiosensoriales ocurre debido a la pérdida de las uniones adherentes por bajos niveles de E-cadherina. Se ha descrito un tipo de apoptosis ocasionada por la falta de E-cadherina en mamíferos que se llama anoikis, en la cual, las células al perder su adherencia con las células vecinas son excluidas del tejido y se inducen a apoptosis (Fouquet et al., 2004; S. Kumar et al., 2011). Con estos datos nos planteamos si Esg también regula positivamente a E-cadherina en los discos de antena y de labio, y si es a través de esta vía que se pierden los órganos quimiosensoriales.

Se analizó el patrón de expresión de E-cadherina en los discos imaginales de antena-ojo y labio de larvas de 3er instar usando un anticuerpo α -E-cadherina que reconoce el dominio extracelular (Uemura et al., 1996). En la línea control w^{1118} , la expresión de E-cadherina se define muy bien en los discos del labio, que se localizan a un costado de las mandíbulas (Fig. 22D), además se observó un entramado de las uniones adherentes en las células localizadas alrededor de esta estructura. En el disco de antena, la señal se observa en todo el disco, define principalmente en forma de anillos el límite entre cada segmento del disco (Fig. 22A, n= 4), cada segmento dará lugar a una estructura anatómica de la antena en la mosca adulta. En esg^{L4} se observó un desarrollo completo de los discos imaginales de antena (Fig. 22B, n=6, 100%) y de labio (Fig. 22E, n= 10, 100%), de manera similar al de la línea control w^{1118} . En cambio en $esg^{L4}>esg-RNAi$ (34063) los discos de labio no se desarrollan (Fig. 22G, n=4, 100%), mientras que los discos de antena se redujeron en tamaño y la señal de E-cadherina que divide cada segmento disminuye considerablemente (Fig. 22C, n=8, 100%).

Empleando el mismo anticuerpo con el que se realizó la inmunofluorescencia se midió la proteína E-cadherina por Western blot (Jia et al., 2014). Se corroboró que los niveles de la proteína E-cadherina están disminuidos dosis dependiente de Esg en esg^{L4} y $esg^{L4}>esg-RNAi$ (34063) (Fig. 22J y K), mientras que empleando una línea para rescatar los niveles de esg , $esg^{L4}>P\{EP\}esg$ (Fig. 22K), aumentan los niveles de la proteína E-cadherina.

Con el fin de determinar si restaurando los niveles de E-cadherina en *esg^{L4}>esgRNAi*, se podía lograr un rescate en el desarrollo de los discos se empleó a *esg^{L4}>esgRNAi (28514)*, que es el RNAi de menor penetrancia y da fenotipos de reducción del disco de labio (Fig. 22F) y pérdida de la proboscis (Fig. 20D). Se expresó de manera ubicua a E-cadherina empleando la construcción genética UBI-p63E-shg.GFP, la cual se ha reportado que expresa a DE-cadherina fusionada a GFP (DE-cadherina-GFP) de manera ubicua y rescata la viabilidad en organismos con pérdida de función para *shg* (H Oda & Tsukita, 2001). Se generó la línea *esg^{L4};UBI-p63E-shg.GFP>esgRNAi (28514)* y se analizaron los fenotipos en la mosca adulta. A pesar que se localizó expresión DE-cadherina-GFP en el disco de labio, no se logró rescatar el tamaño del disco (Fig. 22H) y el fenotipo de pérdida de la proboscis en las mosca adulta. Del total de las moscas que eclosionaron con genotipo *esg^{L4};UBI-shg-GFP>esgRNAi (28514)* el 64% no presentaron proboscis, porcentaje similar al que se observó en las moscas que no expresaron ubicuamente a la E-cadherina-GFP en *esg^{L4}>esgRNAi (28514)* (Fig. 22I). Por lo tanto, a pesar de que hay una disminución en los niveles de E-cadherina en las uniones adherentes en *esg^{L4}>esgRNAi*, no es el mecanismo por el cual se están perdiendo los discos imaginales, lo que indica que hay otra vía por la cual los órganos quimiosensoriales no se desarrollan.

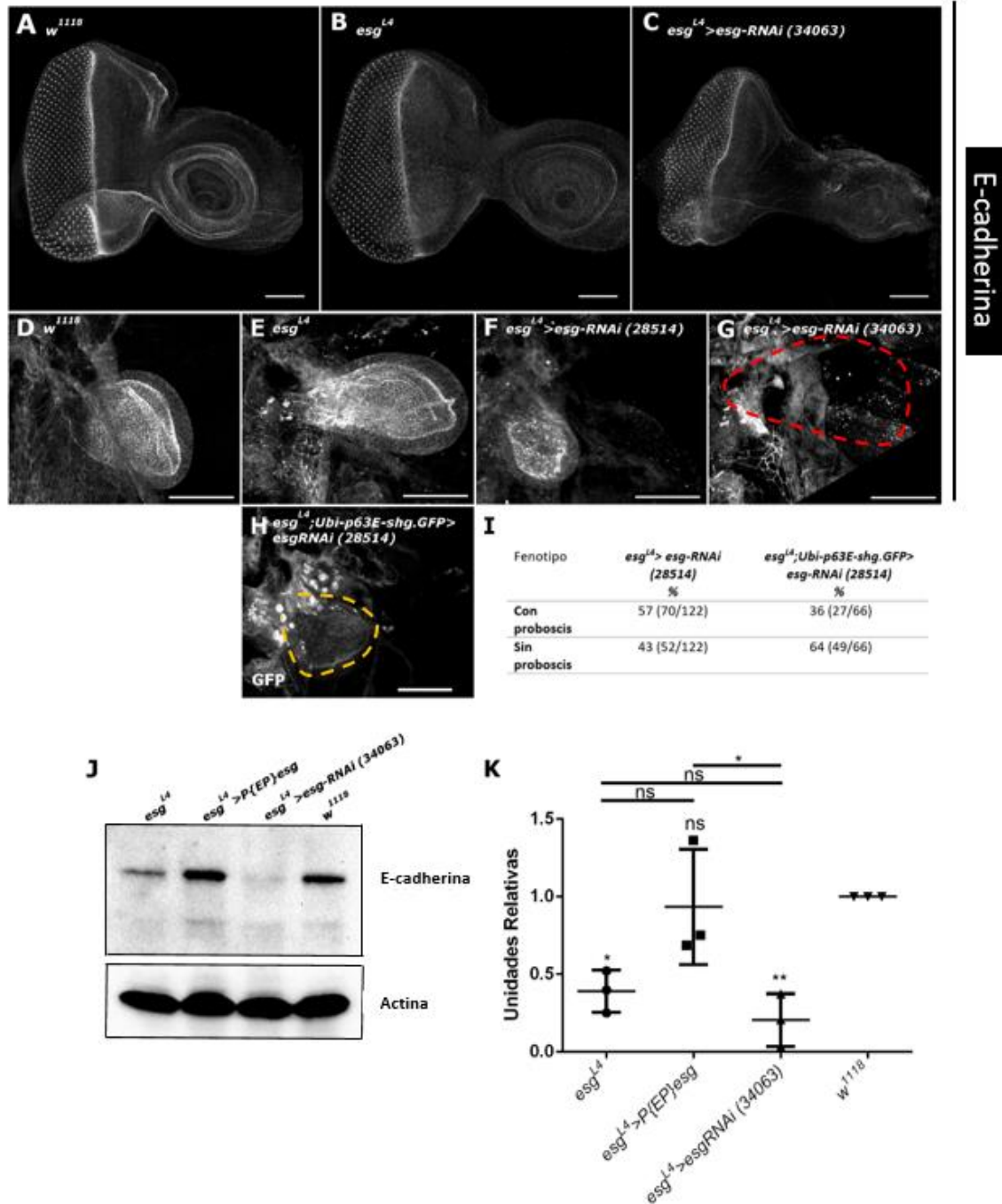


Figura 22. Disminución de los niveles de E-cadherina en *esg^{L4}>esg-RNAi*. (A) Expresión de E-cadherina en el disco de antena-ojo, la señal se observa más intensa en las omatidias del disco de ojo y en las divisiones entre cada segmento del disco de antena. (B) La señal de E-cadherina disminuye en *esg^{L4}*, pero aun así, se forma correctamente la antena. (C) En *esg^{L4}>esgRNAi (34063)* el disco de antena presenta defectos y la señal de E-cadherina disminuye en las divisiones de cada segmento. La expresión de E-cadherina es similar en el disco de labio de la línea control (D) *w¹¹¹⁸* y (E) *esg^{L4}*. En el caso de la línea *esg^{L4}>esgRNAi (28514)* el disco se redujo y en *esg^{L4}>esgRNAi (34063)* el disco no se desarrolló. (H) Señal de

la proteína de E-cadherina fusionada a GFP en el disco de labio y en la mandíbula. La expresión ubicua de E-cadherina en *esg^{L4};UBI-shg-GFP>esgRNAi (28514)* no rescata la disminución en el tamaño del disco de labio y en la pérdida de la proboscis (I). (J-K) Los niveles de E-cadherina disminuyen a medida que bajan los niveles de *esg*. Barra de escala: 50 μ m.

La pérdida de los discos imaginales de antena y de labio no ocurre por apoptosis.

Como se mostró anteriormente la pérdida de los órganos quimiosensoriales de la cabeza de la mosca se debe a que no se desarrollan correctamente los discos imaginales de antena y labio durante los estadios de larva. Este fenotipo se podría deber a varias causas, una posibilidad es que la disminución en los niveles de *esg* está incrementando la muerte celular por lo cual los discos no están adquiriendo el tamaño correcto. Para comprobar si un aumento en la apoptosis contribuía al fenotipo de disminución del tamaño de los discos, se realizaron tinciones de TUNEL en discos imaginales de labio y antena-ojo. Para este ensayo se empleó el *esg-RNAi (v9794)*, porque los discos imaginales de antena y de labio están aún presentes en estadio de larvas de 3er instar. Se cuantificó el número de células que dieron positivo a la tinción en el disco de labio y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la línea control *w¹¹¹⁸* y las líneas experimentales *esg^{L4}* y *esg^{L4}>esg-RNAi (v9794)* (Fig. 23A). Por otro lado, los discos de antena-ojo de *esg^{L4}* y *esg^{L4}>esg-RNAi (v9794)* presentaron diferencias estadísticamente significativa para la tinción de TUNEL con respecto al control *w¹¹¹⁸*, pero entre *esg^{L4}* y *esg^{L4}>esg-RNAi (v9794)* no hubo diferencia significativa (Fig. 23B). Se descartó que la pérdida de las antenas se debiera a apoptosis ya que la presencia de las células que dan positivo para la tinción de TUNEL no se observaron localizadas en el disco de antena si no homogéneamente en todo el disco de antena-ojo, tanto en *esg^{L4}* como en *esg^{L4}>esg-RNAi (v9794)* (Fig. 23C).

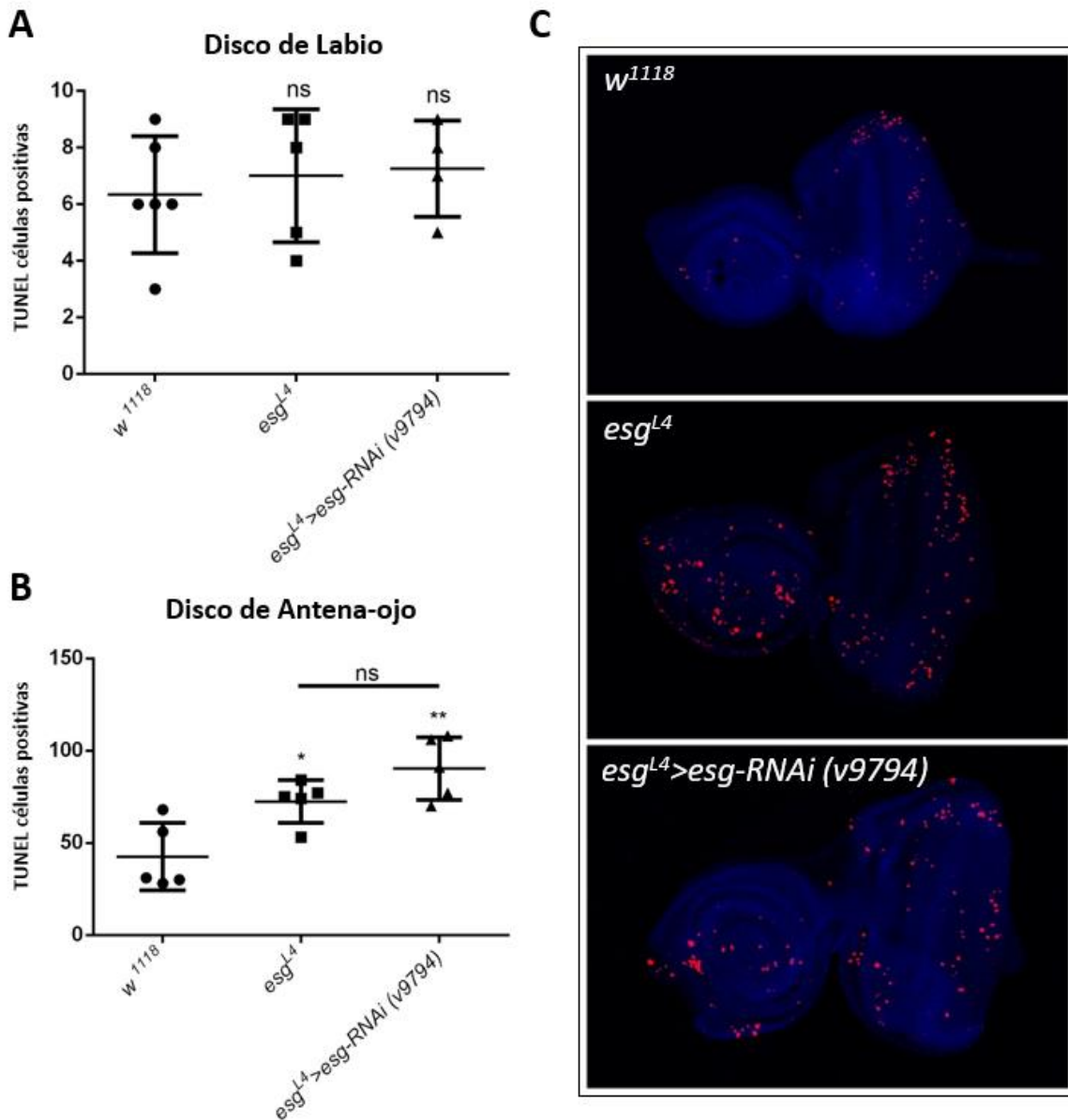


Figura 23. Tinción de TUNEL en disco de antena-ojo y de labio. (A) Comparación de las células que dieron positivo para la tinción de TUNEL en discos de labio de larvas de 3er instar con genotipos *w¹¹¹⁸*, *esg^{L4}* y *esg^{L4}>esg (v9794)*. (B) El número de células que son positivas para la tinción de TUNEL es mayor cuando disminuyen los niveles de *esg* como en *esg^{L4}* y *esg^{L4}>esg (v9794)*. La distribución de las células que dan positivo a la tinción se localizaron homogéneamente en todo el disco de antena-ojo y no solo en la región del disco de antena. Se cuantificaron las células positivas del TUNEL de 4-6 discos imaginales de diferentes larvas para cada genotipo. Los datos fueron analizados usando una ANOVA de una vía, las diferencias fueron obtenidas con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, para el disco de labio ($P=0.7702$) y para el disco de antena ($P=0.0016$). (C) Las células que dieron positivo para la tinción de TUNEL se localizaron homogéneamente en todo el disco de antena-ojo.

Los niveles bajos de *esg* ocasionan pérdida de la morfología del epitelio peripodial y migración de las células perimandibulares.

Para analizar las causas de los defectos en el desarrollo en los discos del labio y de antena por la disminución en los niveles de *esg*, se estudió el patrón de expresión de *esg* de manera indirecta mediante la expresión de GFP bajo el control de *esg^{L4}* (*esg^{L4}>UAS-mCD8::GFP*). La expresión de *esg* se localizó desde el desarrollo embrionario en la parte anterior del embrión (E 17) donde se localizan los discos imaginales y en los histoblastos (Fig. 24A). En estadios posteriores la expresión se mantiene en los discos imaginales, en el caso del disco de labio la señal de *esg* se localizó en la base del disco (Fig. 24C) mientras que en el disco de antena la señal se localizó principalmente en la región del tallo y en la parte dorsal del disco (Fig. 24G). Este dato sólo confirmó lo que ya se había reportado sobre el patrón de expresión de *esg* (Hayashi et al., 1993), pero lo que nosotros encontramos es que la expresión se localizó en el epitelio peripodial (Fig. 24I) y en células que recubren las mandíbulas, las cuales las hemos llamado células perimandibulares. Estas células están en contacto con las células del epitelio columnar y peripodial del tallo de los discos de antena y de labio y mantiene anclados los discos a la mandíbula. Rescatando los niveles de *esg* en la línea *esg^{L4}>P{EP}esg;UAS-mCD8-GFP*, la señal de *esg* se localizó homogéneamente en el epitelio peripodial del disco de antena pero también en el epitelio columnar en los segmentos que darán lugar al 2do y 3er segmento de la antena de la mosca adulta (Fig. 24I, n=8, 100%). Con la disminución en los niveles de *esg* en *esg^{L4}>esg-RNAi/UAS-mCD8-GFP*, se observó un aumento en el dominio de expresión de *esg* comparado con *esg^{L4}>P{EP}esg;UAS-mCD8-GFP*, desde el desarrollo embrionario hasta larva de 3er instar (Fig. 24B, E, H y J). En este estadio, los discos de antena se reducen en tamaño, las células del tallo del disco desaparecen y el disco es invadido por células perimandibulares ocasionando un contacto de los segmentos del disco de antena con la mandíbula (Fig. 24H, n=5, 100%), aunado a este fenotipo y como se verá más adelante, el compartimento posterior delimitado por *Engrailed* se observó desorganizado (Fig. 24J).

Para correlacionar los fenotipos obtenidos con los niveles de expresión de *esg*, se realizó un análisis cuantitativo de los niveles de expresión de *esg* mediante PCR cuantitativo. Se obtuvo RNA de larvas con genotipos: Oregon, *esg^{L4}*, *esg^{L4}>P{EP}esg*, *esg^{L4}>esg-RNAi (34063)*, *esg^{L4}>esg-RNAi (v9794)* y se compararon los niveles de expresión de *esg* con respecto al control del genotipo silvestre. Como se esperaba, los niveles de expresión de *esg* se encuentran disminuidos en *esg^{L4}*, casi un 50% con respecto al control (Fig. 24K), de igual manera como se observó con los niveles de la proteína en el desarrollo embrionario (Sanchez-Díaz et al., 2015). En el rescate *esg^{L4}>P{EP}esg*, los niveles de *esg* se igualan con los niveles que presenta el control, mientras que con los *esg-RNAi* la disminución es gradual acorde a los fenotipos obtenidos con la genética. En *esg^{L4}>esg-RNAi (v9794)* la disminución de *esg* es mínimo con respecto a *esg^{L4}*, mientras que en *esg^{L4}>esgRNAi (34063)* los niveles de *esg* disminuyen hasta casi un 25% con respecto al control (Fig. 24K). Este dato reforzó los resultados obtenidos con las cruza genéticas, donde la línea *esg^{L4}>esgRNAi (34063)* es letal, mientras que en *esg^{L4}>esg-RNAi (v9794)* las moscas son viables. Comparando los niveles de *esg* entre *esg^{L4}>esg-RNAi (v9794)* con *esg^{L4}*, se pudo observar que la disminución en los niveles de expresión de *esg* por debajo de la media dosis génica, es la diferencia de que haya un desarrollo correcto de las antenas, palpos maxilares y la proboscis.

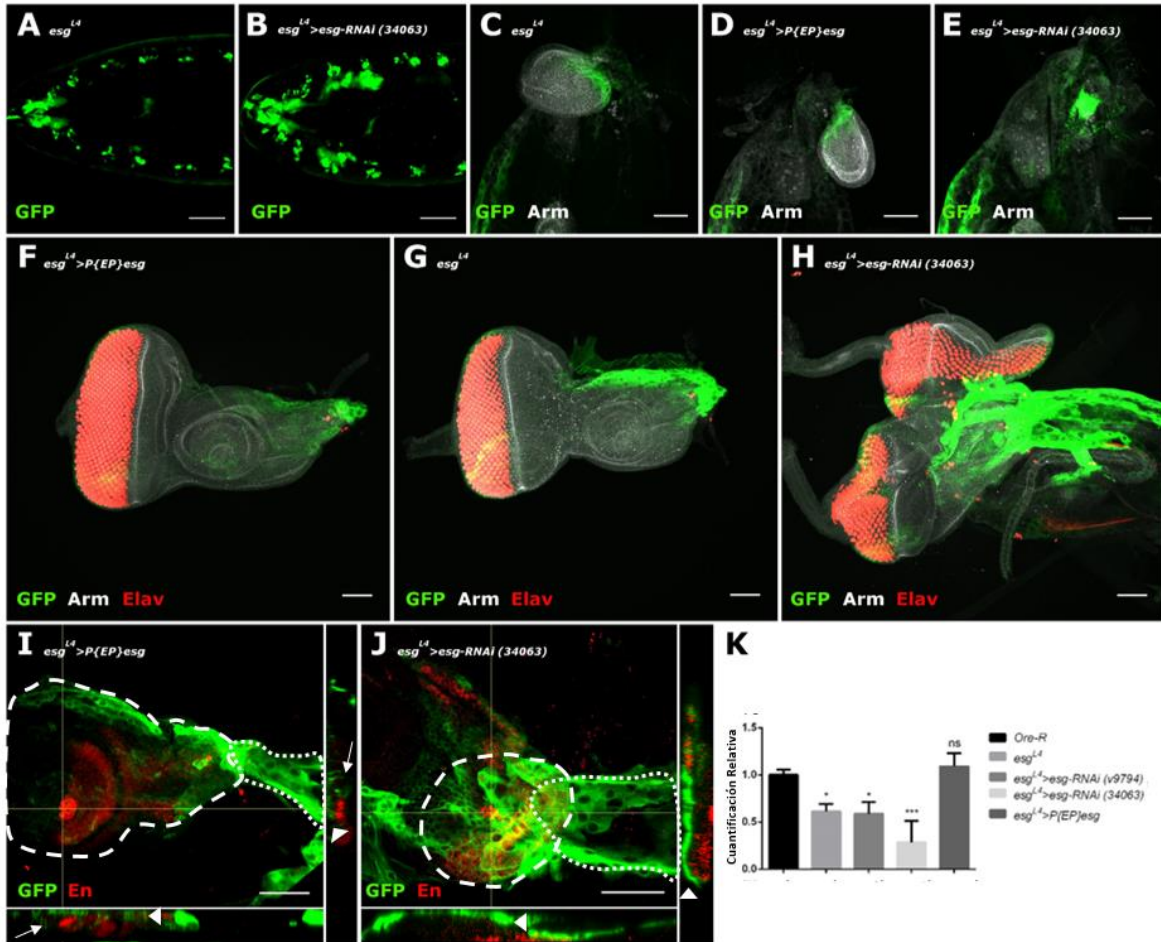


Figura 24. Patrón de expresión del driver de *esg^{L4}* en el epitelio peripodial de los discos imaginales de antena y labio. (A-J) Expresión de GFP bajo el control del driver *esg^{L4}*. (A) La señal de GFP dirigido por *esg^{L4}* se localizó en embriones de estadio 17 en la parte anterior, histoblastos y en el epitelio peripodial del disco del (C) labio y (G) antena, principalmente en la parte dorsal del disco. La inmuno anti-Armadillo (Arm) se realizó para contrastar los discos y la inmuno anti-Elav se realizó para marcar las neuronas fotorreceptoras localizadas en el disco de ojo. (B) La señal de GFP se expande y aumenta su dominio de expresión en la parte anterior del embrión e histoblastos, cuando disminuyen los niveles de *esg* en *esg^{L4}>esg-RNAi/UAS-mCD8::GFP*. Este fenotipo se repite en el disco imaginal de antena (H y J), mientras que en el caso los discos de labio no se desarrollan, en su lugar se acumulan células perimandibulares (E). (F e I) Rescatando los niveles de *esg* en *esg^{L4}>P{EP}esg; UAS-mCD8::GFP*, la expresión de GFP se re-localiza en el epitelio peripodial del disco de antena, también hay expresión en el epitelio columnar en el 2do y 3er segmento del disco de antena y (D) en el disco del labio la señal es semejante a *esg^{L4}*. (J) La disminución en los niveles de *esg* ocasiona que se pierda la región del tallo del disco de antena ocasionando que el disco de antena este en contacto con la mandíbula y las células perimandibulares invadan parte del disco. En las secciones vertical y horizontal se puede apreciar que la expresión de GFP solo se localiza en el epitelio peripodial, mientras que en el rescate se puede

apreciar la señal de GFP tanto en el epitelio peripodial como en el epitelio columnar (I) . Las cabezas de las flechas señalan el epitelio peripodial y las flechas señala el epitelio columnar. La línea punteada delimita la mandíbula mientras que la línea discontinua delimita el disco de antena.

(K) Gráfica que representa los niveles de expresión del RNAm de *esg* mediante qPCR de discos imaginales de antena-ojo. Los datos fueron analizados usando ANOVA de una vía, las diferencias fueron obtenidas con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett ($P=0.0002$).

La disminución de *esg* en el epitelio peripodial del disco de antena fenocopia los fenotipos observados en *esg^{L4}>esg-RNAi*.

Con los datos obtenidos se ha mostrado que la disminución en los niveles de *esg* generó alteración principalmente en el desarrollo de los discos de antena y de labio, coincidiendo en que ambos discos se encuentran unidos a la mandíbula. Con el fin de determinar que los fenotipos observados en los discos de antena y de labio se debe a la disminución de los niveles de *esg* en el epitelio peripodial lo que podría estar alterando alguna vía de señalización específica del desarrollo y no por la invasión de células perimandíbulares hacia los dominios de los discos imaginales, se expresaron los *esg-RNAi* bajo el control del driver *c311-GAL4*. Se ha reportado que este driver se expresa específicamente en el epitelio peripodial de los discos imaginales de ala y antena-ojo (Billes et al., 2018; Gibson & Schubiger, 2000). Se realizaron secciones transversales y longitudinales en el disco de antena para verificar la expresión de GFP bajo el control del driver *c-311-GAL4* en el epitelio peripodial (Fig. 25A) y su expresión no presenta ningún fenotipo en la mosca adulta (Fig. 25B), además se encontró expresión del driver en el disco de labio. Una vez que se confirmó la expresión del driver en el epitelio peripodial, se dirigieron los *esg-RNAi* (*34063*) y *esg-RNAi* (*v9793*) con el driver *c-311-GAL4* con la intención de fenocopiar los fenotipos observados en *esg^{L4}>esg-RNAi*. Ambos *esg-RNAi* fueron letales. En estas líneas el desarrollo culminó a inicios de la pupación formándose únicamente la cáscara de la pupa pero sin la formación del imago. Analizando los discos de antena, se encontró una morfología semejante a la observada en *esg^{L4}>esg-RNAi*, la región del tallo no se desarrolla, el disco de antena esta reducido un 20% y se desorganiza el eje antero-posterior lo que se evidencia al ver a Ci, que marca el compartimiento anterior, y a Engrailed, que define el compartimiento

posterior (Fig. 25C). La expresión del driver debe ser muy fuerte porque incluso empleando el *esg-RNAi* (v9794), resultó semiletal, pero hubo individuos que llegaron a mosca adulta de los cuales 24% de las moscas no presentaron una de las dos antenas (Fig.25D). En relación con la proboscis, ninguna presentó daño o pérdida de este órgano, lo que sugiere que la pérdida de la proboscis involucra otra vía a través de la cual *esg* está involucrado en su desarrollo. No se puede concluir que *esg* controla el desarrollo del disco de antena desde el epitelio peripodial, debido a que el driver *c311-GAL4* también se encontró que se expresa en las células perimandibulares, aunque no ocurre una invasión tan drástica de estas células hacia el disco como se describió en *esg^{L4}>esg-RNAi* (Fig. 24H), si se observó una acumulación en la frontera entre el disco y la mandíbula (Fig. 25C).

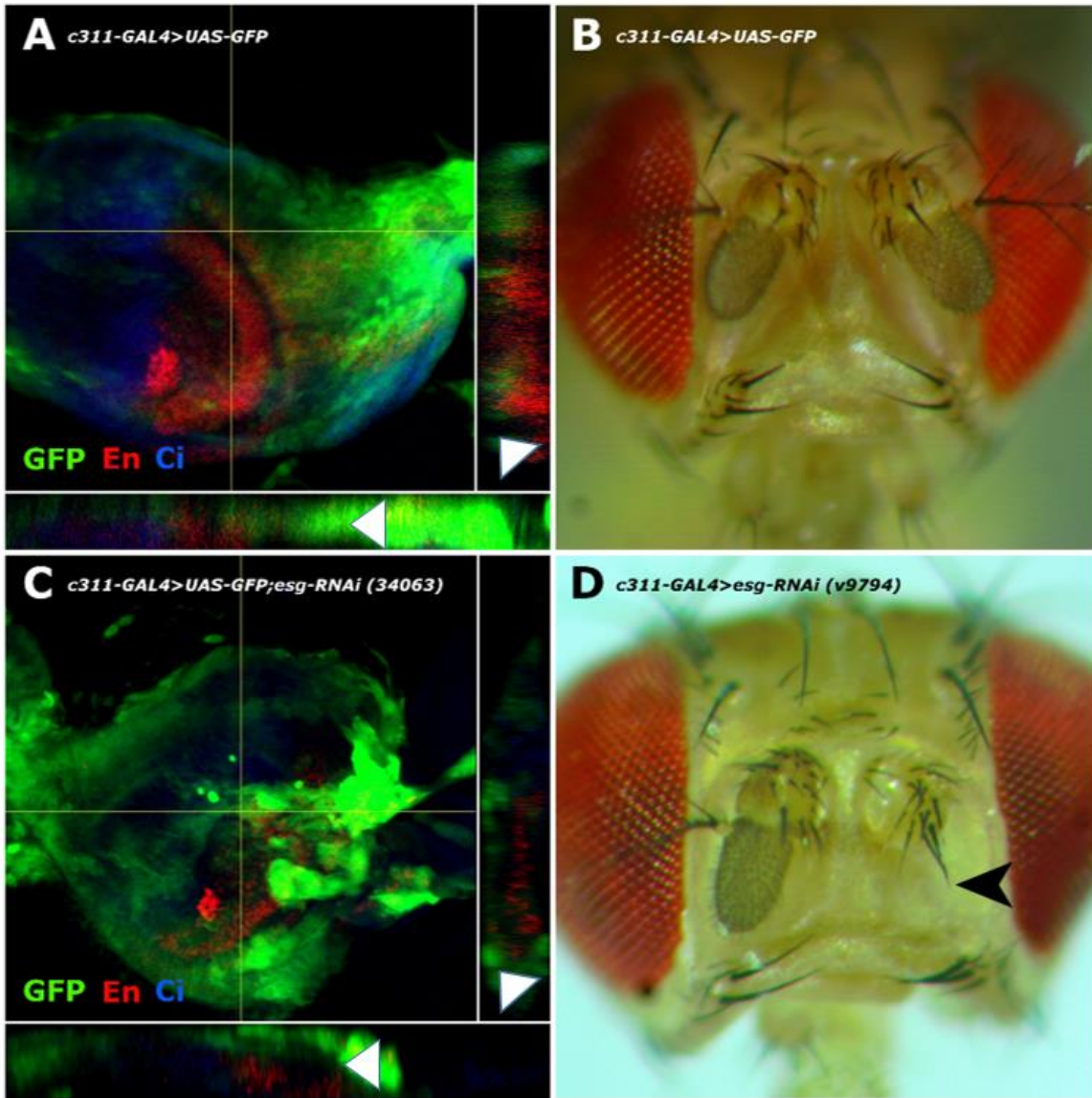


Figura 25. La disminución en los niveles de *esg* en el epitelio peripodial ocasiona alteración en el desarrollo del disco de antena. (A) EL driver *c311-GAL4* se expresa en el epitelio peripodial del disco de antena. (C) La disminución de *esg* en el epitelio peripodial por la expresión de *esg-RNAi* (34063) con el driver *c311-GAL4* ocasiona alteración en el desarrollo del disco de antena y en los compartimentos anterior y posterior. (D) Dirigiendo el *esg-RNAi* (v9794) con el driver *c311-GAL4*, genera que las moscas adultas no desarrollen una de las dos antenas, comparado con el control que no presenta ningún fenotipo aparente (B). Los recuadros en la parte inferior y al costado derecho son secciones longitudinal y transversal respectivamente del disco de antena. Las cabezas de las flechas muestran la expresión de GFP en el epitelio peripodial.

La disminución en los niveles de *esg* ocasiona que se pierdan las fronteras entre los compartimentos posterior y anterior en el disco de antena.

Engrailed es un factor de transcripción con un dominio homeótico que determina los compartimentos posteriores de los discos imaginales (Morata & Lawrence, 1979b). Induce la expresión de *hedgehog* (*hh*) que a su vez induce a *decapentaplegic* (*dpp*) en la parte ventral del disco de antena y a *wingless* (*wg*, el ortólogo de Wnt en vertebrados) en la parte dorsal. Wg, Hh y Dpp inducen el crecimiento del disco de antena y ayudan a definir las identidades de las antenas y palpos maxilares (Lebreton, Faucher, Cribbs, & Benassayag, 2008; Royet & Finkelstein, 1996; Won et al., 2015).

Se decidió examinar la expresión de Engrailed y Ci en el disco de antena en las mutantes de *esg*, con la intención de averiguar si había alteraciones a alguna de estas vías. La expresión de Engrailed en *esg^{L4}* se localizó en la parte posterior del disco de antena que colinda con la mandíbula. La señal abarca la mitad del disco y se intensifica en el anillo central del disco de antena (Fig. 26A). En estos experimentos no se analizó a los discos de la línea *esg^{L4}>esgRNAi* (34063) porque el disco imaginal de antena es un 40% más chico comparado con el disco de *esg^{L4}* y no presentan una morfología adecuada para su análisis, por lo que se analizaron los discos de antena de las líneas *esg^{L4}>esgRNAi* (v9794) y *esg^{L4}>esgRNAi* (v9793). Observando los compartimentos de las mutantes de *esg*, resalta que el dominio de expresión de Engrailed no se localiza en la parte posterior del disco y la frontera que divide los compartimentos posterior y anterior definido por Ci se pierde (Fig. 26B, C y K), lo que no sucede en los discos de ala (Fig. 26D y G). Esto tampoco sucede en los discos de labio y halterio (datos no mostrados). A pesar que en algunas ocasiones el disco de antena de la línea *esg^{L4}>esgRNAi* (v9793) presentó una morfología igual al wt (Fig. 26I), los compartimentos posterior y anterior estaban desorganizados (Fig. 18C, n= 15,100%). Se corroboró que la alteración en el establecimiento de los dominios anterior y posterior se debe a una disminución en los niveles de expresión de *esg*, rescatando los niveles de *esg* en *esg^{L4}>esgRNAi* (v9793) mediante la línea *esg^{L4};P(EP)esg>esgRNAiv9793*. Los discos de antena

presentaron un rescate en el restablecimientos de los compartimentos de Engrailed y Ci en un 65% de los discos analizados (n= 22) (Fig. 26D).

Aunado a los fenotipos ya descritos, cuando se disminuyen los niveles de *esg* también se encontraron fenotipos de duplicación del 3er segmento de la antena. Analizando la expresión de Engrailed en el disco de antena en la línea control w^{1118} , su dominio de expresión se localizó en la parte posterior del disco (Fig. 26I) mientras que en $esg^{L4}>esg-RNAi$ (v9794) 42% de los discos analizados, el dominio de expresión de Engrailed se duplicó (Fig. 26K, n=12). Este fenotipo de duplicación se reflejó en la mosca adulta donde sólo se observó duplicación de la arista y el 3er segmento de las antenas (Fig. 26L) mientras que en el control no se observa este fenotipo (Fig.26J).

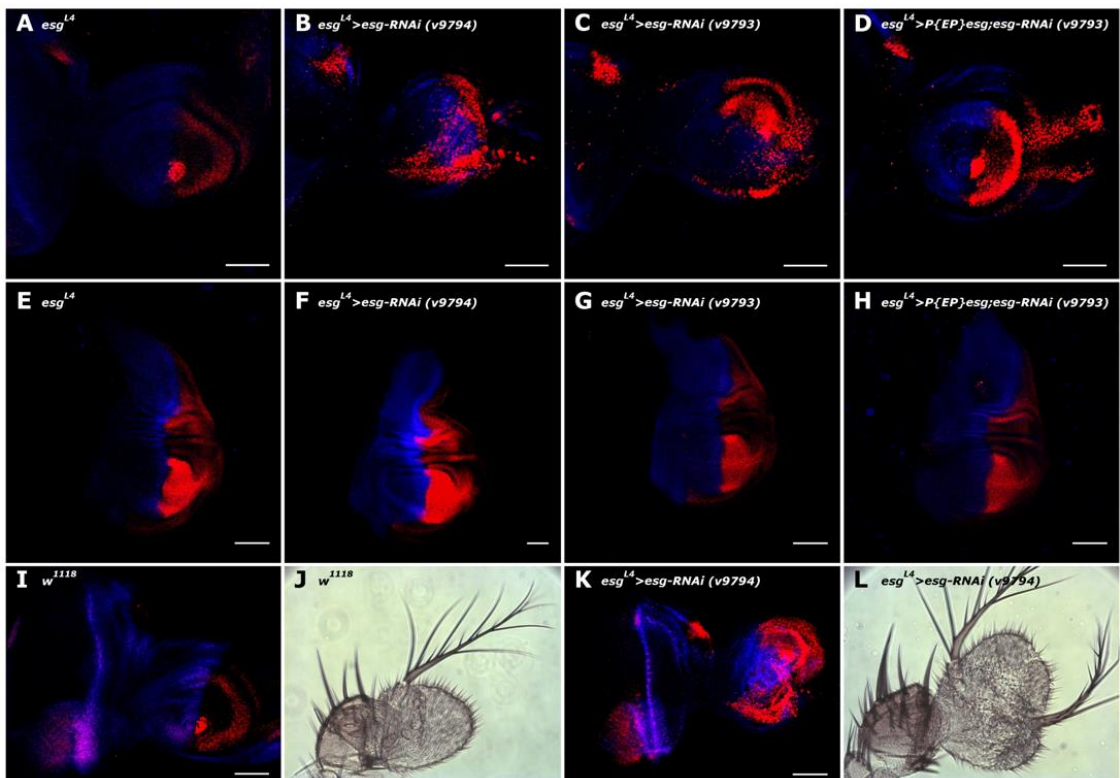


Figura 26. Los compartimentos del disco de antena se pierden cuando disminuye *esg*. Patrón de expresión de En y Ci en la región posterior y anterior respectivamente en el disco de (A e I) antena y (E) ala. (B, C y K) La división entre los compartimentos anterior y posterior se pierde por la disminución en los niveles de *esg* en el disco de antena pero se mantiene en el disco de ala (F y G). (D) Los

compartimentos del disco de antena se restablecen cuando se rescatan los niveles de *esg*. Los defectos en el desarrollo ocurren solo en el disco de antena, en el disco de ojo no se observa ninguna alteración (K). (L) La duplicación de la antena solo ocurre en el tercer segmento. (Barra de escala: 50 μ m).

La pérdida de los discos de labio involucra a la vía de señalización de Decapentaplegic.

En la mayoría de los discos imaginales una vez que se establece el dominio de Engrailed, se van expresando secuencialmente diferentes vías de señalización como son Hh, Wn, Decapentaplegic (Dpp), etc. Dpp es un morfógeno que se expresa en todos los discos imaginales donde juega un papel importante en el crecimiento y diferenciación celular. Trabajos anteriores han señalado el papel de *dpp* en el desarrollo de la cápsula de la cabeza: mutantes para *dpp* presentan agrupamiento de macroquetas en la región de la vibrassae de la parte frontal de la cabeza, así como pérdida o duplicación de los palpos maxilares (H. Lee et al., 2007; Park, Stultz, & Hursh, 2015; Stultz et al., 2006), fenotipos semejantes a los que se observan cuando se disminuyen los niveles de *esg*.

Para saber si *esg* interactúa con la vía de señalización de Dpp durante el desarrollo de los órganos quimiosensoriales, se dirigió un RNAi contra *dpp* usando a *esg^{L4}* como driver, con la intención de fenocopiar los fenotipos descritos anteriormente en *esg^{L4}>esg-RNAi*. La expresión del *dpp-RNAi* dirigido por *esg^{L4}* fue viable, los individuos llegan a mosca adulta pero ninguna mosca presentó fenotipo de daño en las antenas ni alteración en la distribución de las macroquetas de la parte frontal de la cabeza. Sin embargo, presentaron daño o pérdida de la proboscis en el 99% de las moscas (Fig. 27F), un fenotipo idéntico al observado en las moscas *esg^{L4}>esg-RNAi (v9794)* (Fig. 27E). Se analizaron los discos imaginales de labio en *esg^{L4}>dpp-RNAi* y se encontró que se reducen un 40% con respecto al disco de labio de *esg^{L4}* (Fig. 27A y C), mientras que los demás discos como el de ala y antena no presentan ningún fenotipo (Fig. 27H e I), lo que correlaciona con lo observado en la mosca adulta que sólo pierden la proboscis. Se examinó si *dpp* se expresa en el disco de labio en este estadio y si co-localizaba con la señal de *esg* (Fig. 27G) pero las señales no coincidieron. Estos resultados confirman, como ya se había mencionado antes, que la pérdida de los discos imaginales de antena y de labio

ocurre por vías distintas y a pesar que las señales de *dpp* y *esg* no coinciden en el disco de labio de larvas 3er instar, podría estar ocurriendo la interacción de ambas vías en estadios más tempranos.

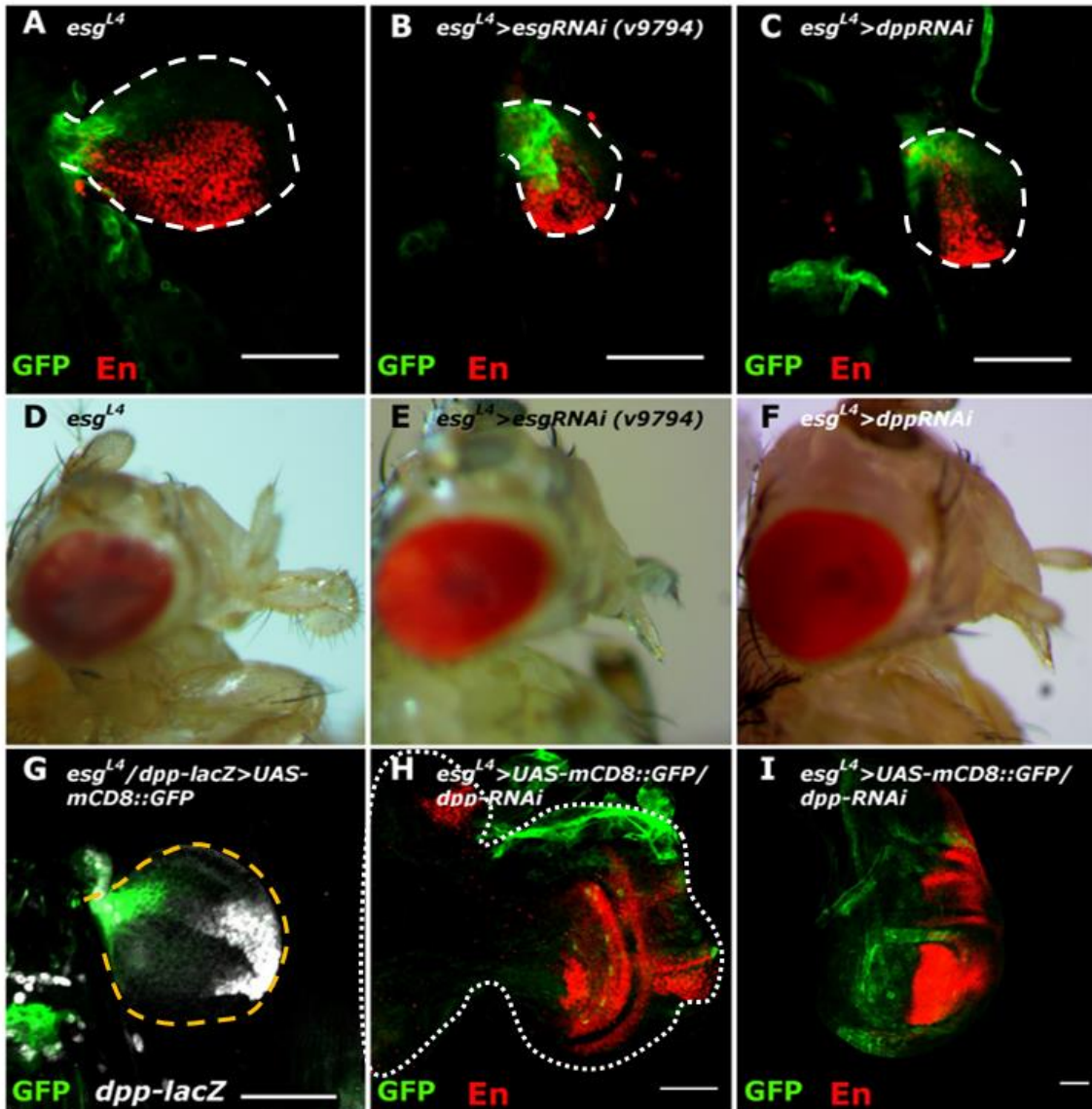


Figura 27. La vía de *dpp* está involucrada en el desarrollo de la proboscis. (A) Disco de labio donde se observa la expresión de Engrailed en la parte posterior del disco. (B) En *esg^{L4}>esgRNAi (v9794)* el disco de labio está reducido y hay una migración de las células perimandibulares hacia éste disco, en cambio cuando se disminuyen los niveles de *dpp* solo se reduce el tamaño del disco del labio sin haber migración de las células perimandibulares. (E y F) En ambos casos los fenotipos en la mosca adulta es la pérdida de la proboscis, éste fenotipo no se observa en el driver *esg^{L4}* (D). (G) Comparación de las señales de expresión del driver *esg^{L4}* con la expresión de *dpp* en el disco de labio. (H e I) Disco de antena y ala

respectivamente, donde se observa que la expresión del *dpp-RNAi* bajo el control de *esg^{L4}* solo afecta el desarrollo del disco de labio (C). Barra de escala: 50 μ m.

DISCUSIÓN

Efecto en la disminución de los niveles de *esg* en el desarrollo de los órganos quimiosensoriales.

La disminución en los niveles de *esg* ocasiona una gama de fenotipos en los órganos quimiosensoriales de la cabeza, desde la reducción hasta la pérdida completa de la proboscis y de las antenas, recapitula algunos fenotipos asociados a la pérdida de varias vías de señalización implicadas en el desarrollo de los discos imaginales que dan lugar a estos órganos, como son; *dpp*, *odd*, *amos*, JNK, Hh y el gen de polaridad segmental *engrailed*. De acuerdo a los datos obtenidos, el hecho de que varias vías de señalización se vean involucradas, es la consecuencia de varios eventos que ocurren secuencialmente a finales del desarrollo embrionario y continúan en estadios de larva y que al final afectan los órganos quimiosensoriales en la mosca adulta. Estos fenotipos se desencadenan posiblemente por la migración de células del epitelio mandibular hacia los territorios de los discos de antena y labio, impidiendo que se desarrollen correctamente.

Se confirmó que *esg^{L4}* es un driver de *esg* y adicional a los discos imaginales donde se reporta la expresión de *esg* (Hayashi et al., 1993), encontramos expresión en el disco de labio. Además la expresión de *esg* en discos imaginales de larva de 3er instar se encontró principalmente en el epitelio peripodial y en células que recubren la mandíbula a las que llamamos células perimandibulares, las cuales no han sido reportadas (Fig. 16 y 17).

Encontramos varios fenotipos asociados a la disminución en los niveles de *esg*, mediante la expresión de varios *esg-RNAi* dirigidos por *esg^{L4}*. La expresión de estos *esg-RNAi* se indujo a temperatura ambiente (23-26°C) y a 28°C, debido a que la expresión de los *esg-RNAi* a 28°C son semi-letales o letales. Se crecieron las cruces a T/A con la intención de obtener una mayor tasa de eclosión y poder observar los fenotipos que podrían permanecer ocultos a 28°C. El fenotipo más evidente que presentaron las moscas fue la pérdida de la proboscis; aunque también se detectaron fenotipos con mayor penetrancia, en donde, se trunca el desarrollo de las antenas y palpos maxilares (Fig. 20 y 21).

La mayoría de los fenotipos reportados de daño en la cápsula de la cabeza o pérdida de los palpos maxilares involucran un decremento en *decapentaplegic (dpp)*. La falta de expresión de Dpp en el epitelio peripodial, conlleva a apoptosis en la región del disco de antena que pertenece al dominio que dará lugar a los palpos maxilares (Park et al., 2015). Mediante tinciones de TUNEL encontramos que en líneas *L4>esgRNAi* los discos imaginales de antena-ojo y labio presentan mayor número de células positivas para esta tinción que la línea control. La distribución de las células fue homogénea en todo el disco, la señal no se encuentra únicamente localizada en el disco de antena sino en todo el disco de antena-ojo (Fig. 23C). Una explicación a este fenotipo podría ser que las células son más sensibles a entrar en apoptosis debido a los bajos niveles de *esg*, acorde con la posibilidad de que *Esg* tenga funciones similares a Snail II de mamíferos, para el que se ha reportado la capacidad de inducir sobrevivencia, (Barrallo-Gimeno, 2005). Sin embargo, la pérdida de los discos imaginales no parece ser consecuencia por apoptosis debido a que no hubo localización de las células que dieron positivo a la tinción de TUNEL sólo en el disco de antena y en el disco de labio no hubo diferencia significativa con respecto al control (Fig. 23A y B). Pero se encontró que la pérdida de la proboscis se debe a la disminución en los niveles de *dpp*. Esta propuesta es el resultado de inducir un *dpp-RNAi* bajo el control de *esg^{L4}*. El fenotipo que presentan las moscas es que no desarrollan proboscis, un fenotipo idéntico al encontrado en *esg^{L4}>esg-RNAi* (Fig. 27F). Que las antenas ni los palpos maxilares se vean afectados, quizá se deba por los tiempos en que se estarían expresando *esg* y *dpp* en el disco de antena. Se ha reportado que *dpp* se expresa en el disco de antena hasta larva de 2do instar, mientras que *esg* se expresa desde que se establecen los primordios de los discos imaginales en el estadio de desarrollo embrionario. En ensayos donde se controló la expresión del *esg-RNAi* dirigido por *esg^{L4}*, se encontró que los fenotipos de pérdida de la proboscis, antenas y palpos maxilares se originan durante la transición de embrión a larva de 1er instar. La expresión del *esg-RNAi* en estadios posteriores no se genera fenotipos. Por lo que la expresión del *dpp-RNAi* ya no tendría ningún efecto en el desarrollo del disco de antena por lo que la pérdida de las antenas debe de ocurrir por otra vía que no involucra a *dpp*.

Cuando se comparó la expresión de *esg* en la línea del rescate *esg^{L4}>P(EP)esg; UAS-mCD8::GFP* con *esg^{L4}>esgRNAi/UAS-mCD8::GFP*, llamó la atención que, a medida que disminuyen los niveles de *esg*, aumenta la señal de GFP, desde células de la parte anterior del embrión y histoblastos hasta en los discos de antena y labio, así como las células perimandibulares (Fig. 24). El aumento en la expresión de GFP no se observó en el resto de los discos imaginales. Pensamos que las células mandibulares son las que ocasionan los fenotipos descritos de pérdida o duplicación de las antenas. Encontramos que estas células invaden los dominios de los discos de la antena por lo que estarían alterando la homeostasis de las células imaginales tanto de las células columnares como de las peripodiales (Fig. 24H y J).

El proceso de transición de epitelio mesénquima, es frecuente durante el desarrollo embrionario para la formación correcta del mesodermo y para la delaminación de la cresta neural o para reparación de heridas (Campbell, 2018; Nakaya & Sheng, 2008); sin embargo, es un evento poco común en estadio de larvario. La familia Snail está ampliamente involucrada en la pérdida de la interacción cohesiva durante la transición epitelio mesénquima. Durante la gastrulación en *Drosophila melanogaster*, Snail reprime a E-cadherina, una proteína importante en las uniones adherentes y en mamíferos, Snail I y Snail II (homólogo de Escargot) regulan negativamente a E-cadherina durante procesos de migración celular (Gonzalez & Medici, 2014); además, Snail I regula positivamente las metaloproteasas implicadas en degradar la matriz extracelular. Pensamos que un evento similar está ocurriendo para generar el fenotipo observado; cuando disminuyen los niveles de *esg*, las células de la mandíbula estarían entrando en un proceso de transición parcial de epitelio a mesénquima. De tal manera que la pérdida de las uniones adherentes en *esg^{L4}>esg-RNAi* no ocurre por la regulación transcripcional negativa que ejercería Snail I, o en este caso Esg sobre E-cadherina como ocurre en mamíferos, si no más bien por la disminución misma de Esg (Fig. 22). El hecho de que no se obtuvo el rescate del fenotipo cuando se expresó ubicuamente a E-cadherina en un fondo mutante de *esg*, se podría deber a otros elementos implicados en la migración celular, como por ejemplo las metaloproteasas que participan en la degradación de la matriz extracelular y a E-cadherina.

Con resultados obtenidos mediante ensayos de electroretinogramas, encontramos que algunas moscas *esg^{L4}>esg-RNAi (v9793)* presentan deficiencia en la respuesta al estímulo con luz, lo que indica que las moscas son ciegas. Analizando los axones de las neuronas fotorreceptoras de los discos de ojo en larvas de 3er instar se encontró que los axones no llegan a su blanco en la región de la lámina y médula del cerebro (n= 40, 30%, datos no mostrados). Fenotipos similares se presentan en mutantes afectadas en la producción de Distroglicano y Distrofina. Estas proteínas están implicadas en el complejo de unión del citoesqueleto de actina con la matriz extracelular. Mutantes para estas proteínas en mamíferos ocasionan distrofia muscular y daño en el cerebro; en tanto que en *Drosophila*, aparte de estos fenotipos, se encontró que en cerebros de larvas de 3er instar los axones de las neuronas fotorreceptoras tampoco llegan a su blanco en la lámina y médula (Shcherbata et al., 2007; Zhu et al., 2008). Esto último es un fenotipo similar al observado en las mutantes de *esg*. La proteína Distroglicano es blanco de metaloproteasas, lo que indica que posiblemente en las mutantes de *esg* estas proteínas podrían estar desreguladas.

Por otro lado, a finales del estadio de larva de 3er instar la señal de *esg* la encontramos principalmente en células del epitelio peripodial (Fig. 24), que se asemeja a una red estirada que recubre únicamente la parte dorsal del disco imaginal. En mutantes de *esg* el epitelio peripodial que recubre únicamente la superficie de la antena se encuentra perturbado, mientras que en la parte del ojo, el epitelio peripodial presenta una morfología igual a la línea silvestre. Analizando los compartimentos mediante la expresión de *Engrailed* en la parte posterior y *Ci* en el dominio anterior del disco de antena, encontramos que, la mutante *esg* muestran pérdida de los compartimentos característicos de los discos imaginales. El dominio de *Engrailed* se desplaza hacia la parte anterior del disco, mientras que la expresión de *Ci* se deslocaliza hacia regiones de células posteriores (Fig. 26). En el caso del disco de labio, la señal de *Engrailed* se mantiene, pero es proporcional al tamaño del disco (Fig. 27A-C). Comparando las señales de *Engrailed* y *Ci* en los demás discos, los únicos que presentan afectación en los compartimentos son los discos de antena y labio, mientras que los compartimentos de los discos de ala, halterio y

extremidad no se ven alterados (Fig. 26). Estas observaciones sugieren que dado que la distribución en los compartimentos se encuentra alterada en la mutante de *esg*, las vías de señalización subsecuentes también están alteradas, indicando la influencia de *esg* hacia otras vías de señalización y que podrían estar implicadas en el fenotipo de sensibilidad a la nicotina (Fig. 15B).

Algunas vías de señalización involucradas en un mecanismo durante el desarrollo embrionario se conservan en etapas subsecuentes en el desarrollo de la mosca, como ocurre con la vía de señalización JNK. Esta vía participa en el cerrado dorsal del embrión y posteriormente en el cerrado del tórax a lo largo de la línea media dorsal durante la metamorfosis (Agnès, Suzanne, & Noselli, 1999; Harden, 2002; Martin-Blanco, 1997; Nosehi, Nosehi, Agnkst, & Agnkst, 1999). Esta vía participa en la adhesión celular, apoptosis, morfogénesis, etc. y se activa por el ligando Factor de Necrosis Tumoral (TNF).

Jnk está codificado por el gen *basket*, cuyos blancos son los factores de transcripción Jun y Fos. Esta vía se autorregula negativamente por la actividad de Puckered (*Puc*), además se emplea para monitorear la actividad de la vía de señalización de JNK. Mutantes de *bsk* muestran defectos en el cerrado dorsal en el desarrollo embrionario y en el cerrado del tórax durante la metamorfosis. Mutantes en los componentes de la vía Jnk, presentan daños en la cápsula de la cabeza de la mosca y pérdida de los palpos maxilares. Es posible entonces que los fenotipos observados en *esg-L4>esg-RNAi* relacionados al daño en la cutícula y en los palpos maxilares se deba a una interacción con la vía JNK con *Esg*, ya que presentan fenotipos similares; además observamos defectos en el cerrado dorsal del tórax, cuando *esg* se sobreexpresa en la línea *Pnr-GAL4>P(EP)esg* (Dato no mostrado).

Defectos en la percepción de los estímulos en mutantes de *esg*.

En ensayos de comportamiento realizados previamente, describimos que las moscas de la línea *esg^{L4}* presentan sensibilidad a la nicotina. En un principio este fenotipo se lo adjudicamos sólo a las neuronas gustativas de la proboscis, debido a la falta de este órgano gustativo en las moscas de la línea *esg^{L4}>esg-RNAi* (28514) no presentan un comportamiento de sensibilidad a este alcaloide. Resultados

recientes nos muestran un panorama más amplio sobre el papel que juega *esg* en el establecimiento del sistema nervioso central y periférico, debido a las repercusiones que se generan cuando disminuyen los niveles de expresión de esta proteína. La respuesta de sensibilidad a la nicotina observada en *esg^{L4}* podría implicar no sólo las neuronas gustativas de la proboscis, sino también a neuronas olfativas e interneuronas implicadas en la mosca en locomoción y alimentación, las cuales estarían generando el comportamiento de sensibilidad.

El fenotipo de sensibilidad descrito en *esg^{L4}*, se revertió cuando se afecta una copia del receptor Gr33a en la línea *L4/Gr33a¹*, lo que indicó que la sensibilidad inicia a través de estas neuronas gustativas. La comparación de la respuesta a la nicotina de moscas silvestres *w¹¹¹⁸* con *Gr33a¹* no presentan una diferencia significativa, lo que indica que el receptor Gr33a no hace diferencia en la respuesta a la nicotina en las moscas controles (Fig. 15). Una posible explicación a esta observación es que la línea *esg^{L4}* el receptor Gr33a estaría conformando un dímero funcional con una afinidad a la molécula de la nicotina, posiblemente porque la falta de Esg cause la expresión ectópica o inhibición de algún receptor gustativo. Está hipótesis es consistente con los datos que muestran que tan solo basta que una neurona gustativa exprese ectópicamente, sobreexprese o deje de expresar un receptor gustativo para que responda a una nueva sustancia. Así mismo, la idea también se apoya en el hecho de que *esg* juega un papel en el desarrollo de las sensilas sensoriales del notum a través de la regulación negativa de la vía Notch y como también lo demostramos, también impacta el desarrollo de las sensilas de la proboscis (Fig. 16).

Para comprobar que las neuronas gustativas responden diferente a la nicotina, adaptamos y modificamos un sistema basado en un indicador de calcio llamado GCaMP. Este sistema permite evaluar la respuesta de las neuronas *in vivo* con diferentes estímulos. Mediante estos ensayos, demostramos que las neuronas gustativas de la proboscis en *esg^{L4}* (*esg^{L4}/Gr66a-GAL4>GCaMP5*) responden a la nicotina, mientras que la línea control *Gr66a-GAL4>GCaMP5* no lo hace (Fig. 17). El circuito neuronal encontrado en *esg^{L4}* abarca neuronas localizadas en el ganglio torácico abdominal y en el cerebro. Cuando se indujo la expresión de la TeTxLc en

este circuito, las moscas fueron incapaces de retraer la proboscis y la mantuvieron constantemente extendida (Fig. 18). En el 2013 el grupo de la Dra. Kristin Scott (Mann et al., 2013) reportaron un circuito similar al que observamos en *esg^{L4}*, pero no mapearon en que región del genoma se localizaba su driver. Describen que cuando se apaga el circuito, las moscas caminan menos y presentan el reflejo de extensión de la proboscis afectado. Este fenotipo se debe a un grupo de interneuronas que se localizan en el ganglio torácico abdominal (Fig. 18), y está implicado en el andar de las moscas y extensión de la proboscis. Este fenotipo nos hace pensar que tras la exposición a nicotina volatilizada las moscas *esg^{L4}* son incapaces de trepar por el vial debido a la inhibición de este circuito, que ocasiona alteración en la locomoción de la mosca, lo que dificulta a las moscas trepar por el vial.

CONCLUSIONES

1. La disminución en los niveles de *esg* ocasiona daño en los órganos quimiosensoriales de cabeza de la mosca.
2. La pérdida o duplicación de los órganos olfativos se debe a la invasión de las células mandibulares hacia los dominios del disco de antena.
3. La variedad en los fenotipos observados en las antenas, palpos maxilares y proboscis se debe, al menos, a una alteración en la expresión de *Engrailed* y de la vía de señalización de *Hedgehog*.
4. La pérdida de la proboscis involucra la vía de señalización de *Dpp*.
5. Las neuronas receptoras gustativas de la línea L4 responden diferente a la nicotina.
6. El circuito observado en L4 está involucrado en el sistema locomotor de las extremidades y en la alimentación.

BIBLIOGRAFÍA

- Abzhanov, a, Holtzman, S., & Kaufman, T. C. (2001). The *Drosophila* proboscis is specified by two Hox genes, proboscipedia and Sex combs reduced, via repression of leg and antennal appendage genes. *Development (Cambridge, England)*, 128(14), 2803–2814. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(96\)00649-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(96)00649-1)
- Agnès, F., Suzanne, M., & Noselli, S. (1999). The *Drosophila* JNK pathway controls the morphogenesis of imaginal discs during metamorphosis. *Development (Cambridge, England)*, 126(23), 5453–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10556069>
- Akerboom, J., Chen, T. W., Wardill, T. J., Tian, L., Marvin, J. S., Mutlu, S., ... Looger, L. L. (2012). Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *Journal of Neuroscience*, 32(40), 13819–13840. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2601-12.2012>
- Aldaz, S., Escudero, L. M., & Freeman, M. (2010). Live imaging of *Drosophila* imaginal disc development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14217–14222. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008623107>
- Apostolopoulou, A. a, Mazija, L., Wüst, A., & Thum, A. S. (2014). The neuronal and molecular basis of quinine-dependent bitter taste signaling in *Drosophila* larvae. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 6. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00006>
- Atkins, M., & Mardon, G. (2009). Signaling in the third dimension: The peripodial epithelium in eye disc development. *Developmental Dynamics*, 238(9), 2139–2148. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22034>
- Barrallo-Gimeno, A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*, 132(14), 3151–3161. <https://doi.org/10.1242/dev.01907>
- Bate, M., & Arias, a M. (1991). The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 112(3), 755–761.
- Beira, J. V., & Paro, R. (2016). The legacy of *Drosophila* imaginal discs.

- Chromosoma*, 125(4), 573–592. <https://doi.org/10.1007/s00412-016-0595-4>
- Billes, V., Kovács, T., Manzóger, A., Lőrincz, P., Szincskák, S., Regős, Á., ... Vellai, T. (2018). Developmentally regulated autophagy is required for eye formation in *Drosophila*. *Autophagy*, 14(9), 1499–1519. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1454569>
- Boll, W. (2002). The *Drosophila* Pox neuro gene: control of male courtship behavior and fertility as revealed by a complete dissection of all enhancers. *Development*, 129(24), 5667–5681. <https://doi.org/10.1242/dev.00157>
- Boube, M., Seroude, L., & Cribbs, D. L. (1998). Homeotic proboscipedia call identity functions respond to cell signaling pathways along the proximo-distal axis. *International Journal of Developmental Biology*, 42(3), 431–436.
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, 118(2), 401–15. <https://doi.org/10.1101/lm.1331809>
- Cabernard, C., & Doe, C. Q. (2009). Apical/basal spindle orientation is required for neuroblast homeostasis and neuronal differentiation in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 17(1), 134–41. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.009>
- Campbell, K. (2018). Contribution of epithelial-mesenchymal transitions to organogenesis and cancer metastasis. *Current Opinion in Cell Biology*, 55, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.06.008>
- Celis, J. De, National, S., & Celis, J. De. (2017). Imaginal discs encyclopedia, (November 2013).
- Cho, K. O., Chern, J., Izaddoost, S., & Choi, K. W. (2000). Novel signaling from the peripodial membrane is essential for eye disc patterning in *Drosophila*. *Cell*, 103(2), 331–342. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00124-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00124-0)
- Cribbs, D. L., Benassayag, C., Randazzo, F. M., & Kaufman, T. C. (1995). developmental identity : evidence from low-level expression of the *Drosophila* homeotic gene proboscipedia under Hsp70 control. *EMBO Journal*, 14(4), 767–778.
- D'Ávila, M. F., Garcia, R. N., Loreto, E. L. S., & Valente, V. L. D. S. (2008).

- Analysis of phenotypes altered by temperature stress and hipermutability in *Drosophila willistoni*. *Iheringia - Serie Zoologia*, 98(3), 345–354.
<https://doi.org/10.1590/S0073-47212008000300009>
- de Celis, J. F., & García-Bellido, A. (2013). *Imaginal Disks. Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (Vol. 4). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00769-5>
- Delventhal, R., & Carlson, J. R. (2016). Bitter taste receptors confer diverse functions to neurons. *ELife*, 5(FEBRUARY2016), 1–23.
<https://doi.org/10.7554/eLife.11181>
- Dewey, E. B., Taylor, D. T., & Johnston, C. A. (2016). Cell Fate Decision Making through Oriented Cell Division, 3(4), 1–28.
<https://doi.org/10.3390/jdb3040129>.Cell
- Dong, P. D., Chu, J., & Panganiban, G. (2000). Coexpression of the homeobox genes *Distal-less* and *homothorax* determines *Drosophila* antennal identity. *Development (Cambridge, England)*, 127(2), 209–216.
<https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1434>
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*, 34(1–2), 1–15. <https://doi.org/10.1002/gene.10150>
- Fleming, R. J., Scottgale, T. N., Diederich, R. J., & Artavanis-Tsakonas, S. (1990). The gene *Serrate* encodes a putative EGF-like transmembrane protein essential for proper ectodermal development in *Drosophila melanogaster*. *Genes and Development*, 4(12 A), 2188–2201.
<https://doi.org/10.1101/gad.4.12a.2188>
- Fouquet, S., Lugo-Martínez, V. H., Faussat, A. M., Renaud, F., Cardot, P., Chambaz, J., ... Thenet, S. (2004). Early loss of E-cadherin from cell-cell contacts is involved in the onset of anoikis in enterocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 43061–43069. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405095200>
- Freeman, E. G., Wisotsky, Z., & Dahanukar, A. (2014). Detection of sweet tastants by a conserved group of insect gustatory receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(4), 1598–603. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311724111>

- Fuerstenberg, S. A. L., Broadus, J., & Doe, C. Q. (1998). Asymmetry and cell fate in the *Drosophila* embryonic CNS, *383*, 379–383.
- Fuse, N., Hirose, S., & Hayashi, S. (1994). Diploidy of *Drosophila* imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by *escargot*. *Genes & Development*, *8*(19), 2270–2281. <https://doi.org/10.1101/gad.8.19.2270>
- Gendre, N., Lüer, K., Friche, S., Grillenzoni, N., Ramaekers, A., Technau, G. M., & Stocker, R. F. (2004). Integration of complex larval chemosensory organs into the adult nervous system of *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, *131*(1), 83–92. <https://doi.org/10.1242/dev.00879>
- Gibson, Matthew C. and Schubiger, G. (2001). More Than Meets the Eye. *New York Times Book Review*, 31.
- Gibson, M. C., & Schubiger, G. (2000). Peripodial cells regulate proliferation and patterning of *Drosophila* imaginal discs. *Cell*, *103*(2), 343–350. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00125-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00125-2)
- Gonzalez, D. M., & Medici, D. (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science Signaling*, *7*(344), re8. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005189>
- Gorfinkiel, N., Morata, G., & Guerrero, I. (1997). The homeobox gene *Distal-less* induces ventral appendage development in *Drosophila*. *Genes and Development*, *11*(17), 2259–2271. <https://doi.org/10.1101/gad.11.17.2259>
- Goulding, S. E., Lage, P. zur, & Jarman, A. P. (2000). *amos*, a proneural gene for *Drosophila* olfactory sense organs that is regulated by *lozenge*. *Neuron*, *25*(1), 69–78. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80872-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80872-7)
- Hama, C., Ali, Z., & Kornberg, T. B. (1990). Region-specific recombination and expression are directed by portions of the *Drosophila* engrailed promoter. *Genes and Development*, *4*(7), 1079–1093. <https://doi.org/10.1101/gad.4.7.1079>
- Harden, N. (2002). Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: Lessons from dorsal closure in *Drosophila*. *Differentiation*, *70*(4–5), 181–203. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2002.700408.x>
- Hayashi, S., Hirose, S., Metcalfe, T., & Shirras, A. D. (1993). Control of imaginal

- cell development by the escargot gene of *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 118(1), 105–115. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90004-2](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90004-2)
- Haynie, J. L., & Bryant, P. J. (1986). Development of the eye- antenna imaginal disc and morphogenesis of the adult head in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Zoology*, 237(3), 293–308. <https://doi.org/10.1002/jez.1402370302>
- Herrero, P. (2012). Fruit fly behavior in response to chemosensory signals. *Peptides*, 38(2), 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.019>
- Hussain, A., Zhang, M., Üçpınar, H. K., Svensson, T., Quillery, E., Gompel, N., ... Grunwald Kadow, I. C. (2016). Ionotropic Chemosensory Receptors Mediate the Taste and Smell of Polyamines. *PLoS Biology*, 14(5), 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002454>
- Isono, K., & Morita, H. (2010). Molecular and cellular designs of insect taste receptor system. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 4(June), 20. <https://doi.org/10.3389/fncel.2010.00020>
- Jia, Q., Liu, Y., Liu, H., & Li, S. (2014). Mmp1 and Mmp2 cooperatively induce *Drosophila* fat body cell dissociation with distinct roles. *Scientific Reports*, 4, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep07535>
- Jiang, Y., Boll, W., & Noll, M. (2015). Pox neuro control of cell lineages that give rise to larval poly-innervated external sensory organs in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 397(2), 162–174. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.10.013>
- Joulia, L., Bourbon, H. M., & Cribbs, D. L. (2005). Homeotic proboscipedia function modulates hedgehog-mediated organizer activity to pattern adult *Drosophila* mouthparts. *Developmental Biology*, 278(2), 495–510. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.003>
- Kornberg, T. B. (2000). Signaling Reaches to New Dimensions in. *October*, 103, 189–192.
- Kumar, J. P. (2017). The fly eye: Through the looking glass. *Developmental Dynamics*, 247(1), 111–123. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24585>

- Kumar, S., Park, S. H., Cieply, B., Schupp, J., Killiam, E., Zhang, F., ... Frisch, S. M. (2011). A Pathway for the Control of Anoikis Sensitivity by E-Cadherin and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Molecular and Cellular Biology*, 31(19), 4036–4051. <https://doi.org/10.1128/MCB.01342-10>
- Lage, P. I. zur, Prentice, D. R. A., Holohan, E. E., & Jarman, A. P. (2003). The *Drosophila* proneural gene *amos* promotes olfactory sensillum formation and suppresses bristle formation. *Development*, 130(19), 4683–4693. <https://doi.org/10.1242/dev.00680>
- Lawrence, P. A., Struhl, G., & Street, W. (1996). and Pattern : Lessons from *Drosophila*? *Cell*, 85, 951–961.
- Lebreton, G., Faucher, C., Cribbs, D. L., & Benassayag, C. (2008). Timing of Wingless signalling distinguishes maxillary and antennal identities in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 135(13), 2301–2309. <https://doi.org/10.1242/dev.017053>
- Lee, H., Stultz, B. G., & Hursh, D. A. (2007). The *Zic* family member, *odd-paired*, regulates the *Drosophila* BMP, *decapentaplegic*, during adult head development. *Development*, 134(7), 1301–1310. <https://doi.org/10.1242/dev.02807>
- Lee, Y., Jun, S., & Montell, C. (2009). Multiple gustatory receptors required for the caffeine response in *Drosophila*, 106(11), 4495–4500.
- Lee, Y., Kang, M. J., Shim, J., Cheong, C. U., Moon, S. J., & Montell, C. (2012). Gustatory Receptors Required for Avoiding the Insecticide L -Canavanine, 32(4), 1429–1435. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4630-11.2012>
- Li, P., Yang, X., Wasser, M., Cai, Y., & Chia, W. (1997). *Inscuteable* and *Staufen* Mediate Asymmetric Localization and Segregation of *prospero* RNA during *Drosophila* Neuroblast Cell Divisions, 90, 437–447.
- Madhavan, M. M., & Madhavan, K. (1980). Morphogenesis of the epidermis of adult abdomen of *Drosophila*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 60, 1–31.
- Mandaravally Madhavan, M., & Schneiderman, H. A. (1977). Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal discs and histoblast nests during the

- larval development of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*, 183(4), 269–305. <https://doi.org/10.1007/BF00848459>
- Mann, K., Gordon, M., & Scott, K. (2013). A pair of interneurons influences the choice between feeding and locomotion in *Drosophila*. *Neuron*, 79(4), 754–765. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.018>
- Martin-Blanco, E. (1997). Regulation of cell differentiation by the *Drosophila* Jun kinase cascade. *Current Opinion in Genetics and Development*, 7(5), 666–671. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(97\)80015-9](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(97)80015-9)
- McClure, K. D. (2005). Developmental analysis and squamous morphogenesis of the peripodial epithelium in *Drosophila* imaginal discs. *Development*, 132(22), 5033–5042. <https://doi.org/10.1242/dev.02092>
- Mechanisms of asymmetric cell division during animal. (n.d.).
- Moon, S. J., Köttgen, M., Jiao, Y., Xu, H., & Montell, C. (2006). A taste receptor required for the caffeine response in vivo. *Current Biology: CB*, 16(18), 1812–7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.024>
- Moon, S. J., Lee, Y., Jiao, Y., & Montell, C. (2009). A *Drosophila* Gustatory Receptor Essential for Aversive Taste and Inhibiting Male-to-Male Courtship. *Current Biology*, 19(19), 1623–1627. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.07.061>
- Morata, G., & Lawrence, P. A. (1979a). Development of the eye-antenna imaginal disc of *Drosophila*. *Developmental Biology*. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(79\)90033-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(79)90033-2)
- Morata, G., & Lawrence, P. a. (1979b). Imaginal Disc of *Drosophila*. *Developmental Biology*, 371, 355–371.
- Nakaya, Y., & Sheng, G. (2008). Epithelial to mesenchymal transition during gastrulation: An embryological view. *Development Growth and Differentiation*, 50(9), 755–766. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01070.x>
- Nosehi, S., Nosehi, S., Agnkst, F., & Agnkst, F. (1999). Roles of the JNK signaling pathway in *Drosophila* Stbphane NoseHi*? and Fraquois Agnkst. *Current Opinion in Genetics and Development*, 466–472.
- Oda, H., & Tsukita, S. (2001). Real-time imaging of cell-cell adherens junctions reveals that *Drosophila* mesoderm invagination begins with two phases of

- apical constriction of cells. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 3), 493–501.
<https://doi.org/10.1093/carcin/23.7.1139>
- Oda, H., Tsukita, S., & Takeichi, M. (1998). Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation. *Developmental Biology*, 203(2), 435–450.
<https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9047>
- Owald, D., Lin, S., & Waddell, S. (2015). Light, heat, action: neural control of fruit fly behaviour. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1677), 20140211. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0211>
- Pallavi, S. K. (2005). Signaling interactions between squamous and columnar epithelia of the *Drosophila* wing disc. *Journal of Cell Science*, 118(15), 3363–3370. <https://doi.org/10.1242/jcs.02464>
- Park, S. Y., Stultz, B. G., & Hursh, D. A. (2015). Dual Role of jun N-Terminal kinase activity in bone morphogenetic protein-mediated *drosophila* ventral head development. *Genetics*, 201(4), 1411–1426.
<https://doi.org/10.1534/genetics.115.178376>
- Pear, W. S. (2010). New roles for Notch in tuberous sclerosis, 120(1).
<https://doi.org/10.1172/JCI41897.84>
- Percival-Smith, A., Weber, J., Gilfoyle, E., & Wilson, P. (1997). Genetic characterization of the role of the two HOX proteins, Proboscipedia and Sex Combs Reduced, in determination of adult antennal, tarsal, maxillary palp and proboscis identities in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 124(24), 5049–5062.
- Ramat, A., Audibert, A., Louvet-Vallée, S., Simon, F., Fichelson, P., & Gho, M. (2016). Escargot and Scratch regulate neural commitment by antagonizing Notch activity in *Drosophila* sensory organs. *Development*, 143(16), 3024–3034. <https://doi.org/10.1242/dev.134387>
- Roegiers, F., & Jan, Y. N. (2004). Asymmetric cell division. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(2), 195–205. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.02.010>
- Roegiers, F., Younger-shepherd, S., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2001). Two types of asymmetric divisions in the *Drosophila* sensory organ precursor cell lineage,

3(January).

- Royet, J., & Finkelstein, R. (1996). hedgehog, wingless and orthodenticle specify adult head development in *Drosophila*. *Development*, 122(6), 1849–1858. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(96\)00555-2](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(96)00555-2)
- Ruiz-Losada, M., Blom-Dahl, D., Córdoba, S., & Estella, C. (2018a). Specification and Patterning of *Drosophila* Appendages. *Journal of Developmental Biology*, 6(3), 17. <https://doi.org/10.3390/jdb6030017>
- Ruiz-Losada, M., Blom-Dahl, D., Córdoba, S., & Estella, C. (2018b). Specification and Patterning of *Drosophila* Appendages. *Journal of Developmental Biology*, 6(3), 17. <https://doi.org/10.3390/jdb6030017>
- Sanchez-Díaz, I., Rosales-Bravo, F., Reyes-Taboada, J. L., Covarrubias, A. a, Narvaez-Padilla, V., & Reynaud, E. (2015). The Esg Gene Is Involved in Nicotine Sensitivity in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*, 10(7), e0133956. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133956>
- Schweisguth, F. (2015). Asymmetric cell division in the *Drosophila* bristle lineage: from the polarization of sensory organ precursor cells to Notch-mediated binary fate decision. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 4(3), 299–309. <https://doi.org/10.1002/wdev.175>
- Shankar, S., Calvert, M. E. K., & Yew, J. Y. (2016). Measuring Physiological Responses of *Drosophila*; Sensory Neurons to Lipid Pheromones Using Live Calcium Imaging. *Journal of Visualized Experiments*, (110), 1–7. <https://doi.org/10.3791/53392>
- Shcherbata, H. R., Yatsenko, A. S., Patterson, L., Sood, V. D., Nudel, U., Yaffe, D., ... Ruohola-Baker, H. (2007). Dissecting muscle and neuronal disorders in a *Drosophila* model of muscular dystrophy. *EMBO Journal*, 26(2), 481–493. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601503>
- Shingleton, A. W. (2011). The regulation of organ size in *Drosophila*. *Organogenesis*, 6(2), 76–87. <https://doi.org/10.4161/org.6.2.10375>
- Singh, A., Tare, M., Puli, O. R., & Kango-Singh, M. (2012). A glimpse into dorso-ventral patterning of the *Drosophila* eye. *Developmental Dynamics*, 241(1), 69–84. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22764>

- Singhania, A., & Grueber, W. B. (2014). Development of the embryonic and larval peripheral nervous system of *Drosophila*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 3(3), 193–210. <https://doi.org/10.1002/wdev.135>
- Stultz, B. G., Lee, H., Ramon, K., & Hursh, D. A. (2006). Decapentaplegic head capsule mutations disrupt novel peripodial expression controlling the morphogenesis of the *Drosophila* ventral head. *Developmental Biology*, 296(2), 329–339. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.034>
- Stultz, B. G., Park, S. Y., Mortin, M. A., Kennison, J. A., & Hursh, D. A. (2012). Hox proteins coordinate peripodial decapentaplegic expression to direct adult head morphogenesis in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 369(2), 362–376. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.07.012>
- Tanaka-Matakatsu, M., Uemura, T., Oda, H., Takeichi, M., & Hayashi, S. (1996). Cadherin-mediated cell adhesion and cell motility in *Drosophila* trachea regulated by the transcription factor Escargot. *Development*, 122(12), 3697–3705.
- Thakur, D., Kim, Y., Poudel, S., Montell, C., & Lee, Y. (2017). Calcium Taste Avoidance in *Drosophila*. *Neuron*, 97(1), 67–74.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.11.038>
- Uemura, T., Oda, H., Kraut, R., Hayashi, S., Kataoka, Y., & Takeichi, M. (1996). Zygotic *Drosophila* E-cadherin expression is required for processes of dynamic epithelial cell rearrangement in the *Drosophila* embryo. *Genes and Development*, 10(6), 659–671. <https://doi.org/10.1101/gad.10.6.659>
- Whiteley, M., Noguchi, P. D., Sensabaugh, S. M., Odenwald, W. F., & Kassis, J. A. (1992). The *Drosophila* gene escargot encodes a zinc finger motif found in snail-related genes. *Mechanisms of Development*, 36(3), 117–127. [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(92\)90063-P](https://doi.org/10.1016/0925-4773(92)90063-P)
- Won, J. H., Tsogtbartarr, O., Son, W., Singh, A., Choi, K. W., & Cho, K. O. (2015). Cell Type-Specific responses to Wingless, Hedgehog and Decapentaplegic are essential for patterning early eye-antenna disc in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 10(4), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121999>
- Wu, P.-S., Egger, B., & Brand, A. H. (2008). Asymmetric stem cell division: lessons

- from *Drosophila*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(3), 283–93.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.01.007>
- Yasunaga, K., Saigo, K., & Kojima, T. (2006). Fate map of the distal portion of *Drosophila* proboscis as inferred from the expression and mutations of basic patterning genes. *Mechanisms of Development*, 123(12), 893–906.
<https://doi.org/10.1016/j.mod.2006.08.008>
- Zhu, C. C., Boone, J. Q., Jensen, P. A., Hanna, S., Podemski, L., Locke, J., ... O'Connor, M. B. (2008). *Drosophila* Activin- and the Activin-like product Dawdle function redundantly to regulate proliferation in the larval brain. *Development*, 135(3), 513–521. <https://doi.org/10.1242/dev.010876>
- Zitserman, D., & Roegiers, F. (2011). Live-cell Imaging of Sensory Organ Precursor Cells in Intact *Drosophila* Pupae. *Journal of Visualized Experiments*, (51), 1–4. <https://doi.org/10.3791/2706>

ANEXO

RESEARCH ARTICLE

The *Esg* Gene Is Involved in Nicotine Sensitivity in *Drosophila melanogaster*

Iván Sanchez-Díaz¹*, Fernando Rosales-Bravo²*, José Luis Reyes-Taboada³, Alejandra A Covarrubias³, Verónica Narvaez-Padilla², Enrique Reynaud¹*

1 Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad, 2001, Apartado Postal, 510–3, Cuernavaca 62210, México, **2** Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62209, México, **3** Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad, 2001, Apartado Postal, 510–3, Cuernavaca 62210, Mexico

* These authors contributed equally to this work.

* enrique@ibt.unam.mx



OPEN ACCESS

Citation: Sanchez-Díaz I, Rosales-Bravo F, Reyes-Taboada JL, Covarrubias AA, Narvaez-Padilla V, Reynaud E (2015) The *Esg* Gene Is Involved in Nicotine Sensitivity in *Drosophila melanogaster*. PLoS ONE 10(7): e0133956. doi:10.1371/journal.pone.0133956

Editor: Gregg Roman, University of Houston, UNITED STATES

Received: December 19, 2014

Accepted: July 3, 2015

Published: July 29, 2015

Copyright: © 2015 Sanchez-Díaz et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Mexico), (<http://www.conacyt.mx/>), (grant no. 131685 to ER), scholarship no. 481914 to Fernando Rosales, and scholarship no. 255052 to Iván Sánchez. Universidad Nacional Autónoma de México; Dirección General de asuntos del Personal Académico. Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (<http://dgapa.unam.mx/html/papiit/papit.html>), grant no. IN203611

Abstract

In humans, there is a strong correlation between sensitivity to substances of abuse and addiction risk. This differential tolerance to drugs has a strong genetic component. The identification of human genetic factors that alter drug tolerance has been a difficult task. For this reason and taking advantage of the fact that *Drosophila* responds similarly to humans to many drugs, and that genetically it has a high degree of homology (sharing at least 70% of genes known to be involved in human genetic diseases), we looked for genes in *Drosophila* that altered their nicotine sensitivity. We developed an instantaneous nicotine vaporization technique that exposed flies in a reproducible way. The amount of nicotine sufficient to “knock out” half of control flies for 30 minutes was determined and this parameter was defined as Half Recovery Time (HRT). Two fly lines, *L4* and *L70*, whose HRT was significantly longer than control’s were identified. The *L4* insertion is a loss of function allele of the transcriptional factor *escargot* (*esg*), whereas *L70* insertion causes miss-expression of the microRNA cluster *miR-310-311-312-313* (*miR-310^c*). In this work, we demonstrate that *esg* loss of function induces nicotine sensitivity possibly by altering development of sensory organs and neurons in the medial section of the thoracoabdominal ganglion. The ectopic expression of the *miR-310^c* also induces nicotine sensitivity by lowering *Esg* levels thus disrupting sensory organs and possibly to the modulation of other *miR-310^c* targets.

Introduction

Nicotine addiction is a serious public health problem. Several studies in humans have provided evidence that there is a strong genetic component underlying nicotine and other substances addiction.

Assessing the genetic contribution to addiction in humans is, to say the least, complicated. It is very difficult to separate the environmental contribution from the genetic effects; therefore,

and IN204214. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

the use of animal models to study the genetic basis of addiction is invaluable. *Drosophila melanogaster* and humans respond to pharmacological treatments in very similar ways. Flies become hyperactive after the exposure to cocaine, fall unconscious after ingesting a sufficient dose of benzodiazepines and have a very similar intoxication with alcohol as humans do, thus they have consistently been used to study the genetic basis of drug differential sensitivity and addiction [1,2]. Considering that, in humans, hypersensitivity to drugs correlates with an increased addiction risk [3,4], we established a protocol for the reproducible exposure of flies to nicotine and characterized the normal response of wild type (wt) flies to this exposure. Using this approach, we identified two P-element insertion lines (*L4* and *L70*) that confer hypersensitivity to nicotine. *L4* insertion causes a loss-of-function mutation of the *escargot* (*esg*) gene, whereas *L70* insertion leads to the miss-expression of the *miR-310^c*. The *miR-310^c* codes for four microRNAs: miR-310, miR-311, miR-312 and miR-313 that share an identical seed sequence. Furthermore, we show that ectopic expression of the *miR-310^c* enhances *esg* phenotypes in the same way as the knock down of *Esg* by an RNAi, suggesting that these miRNAs downregulate *esg* expression. We also demonstrate that other *esg* loss-of-function alleles have a similar nicotine hypersensitive phenotype. It is important to note that this is the first time a behavioral phenotype is associated with the *miR-310^c*.

Results

L4 and *L70* *P{GawB}* insertions confer an abnormal sensitivity to nicotine

Based on McClung and Hirsh [5], we isolated mutants that have a differential response to nicotine compared to control lines, *white¹¹¹⁸* (*w¹¹¹⁸*) and *Oregon-R* (*Ore-R*) flies. When flies are exposed to nicotine, they lose their negative geotaxis reflex for a period of time that is proportional to the amount of vaporized nicotine. In order to determine the standard amount of nicotine to be used, we treated *w¹¹¹⁸* flies with different quantities of nicotine diluted in water to identify the sufficient amount of volatilized nicotine that allows half of the exposed flies to recover in 30 min. This parameter is defined as the Half Recovery Time (HRT). In our conditions *w¹¹¹⁸* has a HRT of 30 min when exposed to 32 ng of nicotine. All further experiments were performed using this amount of nicotine. Line *w¹¹¹⁸* was used as control and reference line, because it is the genetic background of the *P{GawB}* insertion collection and of all the other lines used in this work, *Oregon-R* was also used as an independent wt line and behaved identically to *w¹¹¹⁸* thus strongly suggesting that this is the wt sensitivity to nicotine (Fig 1A). A collection of 200 lines with random *P{GawB}* insertions in their genome was screened, and from this process we isolated two lines, *L4* and *L70*, which are hypersensitive to nicotine exposure. None of the other insertion lines tested showed any statistically significant differential sensitivity to nicotine when compared to the control lines. Heterozygous individuals of both lines, *L4/+* and *L70/+*, have an augmented HRT of 71 and 52 min, respectively, compared to *w¹¹¹⁸* (30 min). Homozygous *L70* is even more sensitive having a HRT of 145 min, suggesting a robust dosage effect (Fig 1B), while homozygous *L4* is lethal. The mock exposure of *L4* and *L70* to volatilized water (the nicotine vehicle) had no effect on their climbing capacity when compared with controls, demonstrating that the longer HRT is due to higher nicotine sensitivity and not to motility impairment (S1 Fig).

The insertion sites of *P{GawB}* in these mutants were identified using inverse PCR (*L70*) and plasmid rescue (*L4*) and confirmed by PCR amplification and sequencing of the insertion site. *L4* insertion site is 39 nucleotides downstream of the transcription initiation site of the *escargot* gene (*esg*) (Fig 1C). *L70* is homozygous viable and fertile and its insertion site is 10 nucleotides upstream of the transcription initiation site of the *miR-310^c* (Fig 1D). To demonstrate that the *P{GawB}* insertion causes hypersensitivity in *L70*, five independent precise

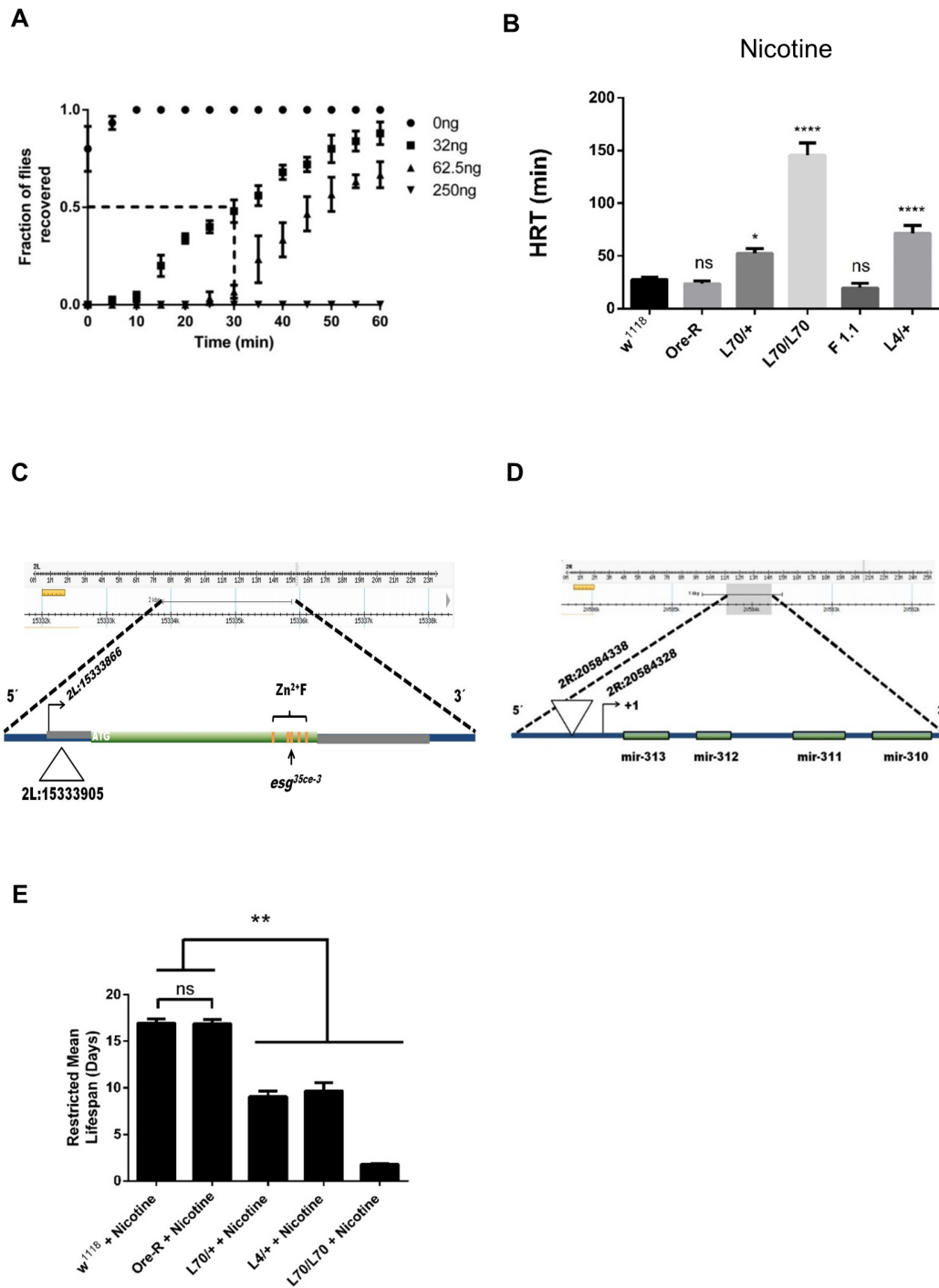


Fig 1. Genetic background determines *Drosophila* response to nicotine. (A) Dose response of *w¹¹¹⁸* flies to different concentrations of nicotine. The time needed for half of the flies to recover from a given concentration of nicotine exposure is defined as Half Recovery Time (HRT), note that mock exposure of flies (0 ng, closed circles) allows flies to recover nearly immediately. (B) HRTs are shown for different fly genotypes: *w¹¹¹⁸* and *Ore-R* are controls, *L70* has an insertion located at the 5' of the *miR-310^c*, *F1.1* is a revertant line, where the P-element insertion of *L70* line has been precisely excised. *L4* line has an insertion in *esg*. *L70* and *L4* showed nicotine hypersensitivity. (C) Schematic representation of the *L4* P{GawB} insertion. The triangle represents the insertion site according to fly-base standard genome coordinates (release version 6). Zinc fingers are denoted by orange bands, the site of the *esg^{35ce-3}* mutation is shown by an arrow. (D) Schematic representation of the *L70* P{GawB} insertion. The inverted triangle represents the insertion site according to fly-base standard genome coordinates (release version 6). The arrow shows the *miR-310^c* cistron transcription initiation site. (E) *L70* and *L4* insertion lines are sensitive to chronic nicotine exposure. Restricted mean lifespan of mutant genotypes are significantly reduced compared to *w¹¹¹⁸* when maintained in standard cornmeal food, supplemented with 0.5 mg/ml nicotine. All experiments were repeated at least 3 times with an $n \geq 100$ flies. * = $P \leq 0.01$, ** = $P \leq 0.001$, **** = $P < 0.001$, ns = not significant.

doi:10.1371/journal.pone.0133956.g001

excision lines were isolated by mobilizing the *P{GawB}* element. All these reverted lines showed normal sensitivity to nicotine (Fig 1B and S2 Fig).

In order to measure if the exposure route would have an effect on the sensitivity, and if the phenotype is different depending on an acute or chronic exposure, we exposed the flies to food containing 0.5 mg/ml of nicotine and measured their mean restricted lifespan. As shown in Fig 1E, *L70/+* and *L4/+* are significantly more sensitive to nicotine-containing food than control flies (*w¹¹¹⁸* 16.98 ± 0.41 days, *Ore-R* 16.87 ± 0.45 days, *L70/+* 9.07 ± 0.61 days, *L4/+* 9.68 ± 0.86 days, *L70/L70* 1.77 ± 0.09 days). Therefore, these lines are hypersensitive to nicotine regardless of the way they are exposed to it (volatilized or ingested).

L4 is an *escargot* loss-of-function mutation and causes nicotine hypersensitivity

To evaluate how the P-element insertion was affecting Esg levels in the *L4/+* line, we performed western blot analysis using embryos because *esg* expression levels are reported to be highest at this developmental stage [6]. We found that in embryos, *L4* has approximately half of Esg protein compared to the control line *w¹¹¹⁸* (Fig 2A and 2B). We attempted to perform western blots of adult extracts but Esg could not be detected in these conditions. This result is consistent with reports showing a very low *esg* expression at this stage [7,8]. Additionally, we found that in approximately 8% of the population, *L4* flies have the characteristic cuticle defects reported in other *esg* loss of function alleles, such as loss of bristles in the tergites and sternites, and loss of pigmentation in the dorsal abdomen [7]. These data strongly suggest that *L4* leads to a loss of function of *esg*.

In order to verify if the loss of function of *esg* is causing hypersensitivity to nicotine, we tested another *esg* mutant allele (*esg^{35Ce-3}*), that produces an inactive transcription factor due to a point mutation in the third Esg zinc-finger domain [8]. This allele also has a homozygous lethal phenotype and the sensitivity of heterozygous individuals to nicotine is almost identical to *L4* heterozygous individuals (Fig 2C). In addition, the transheterozygous genotype *L4/esg^{35Ce-3}* is lethal, therefore confirming that *L4* is an *esg* loss of function allele. *L4* is an enhancer trap insertion as it carries *GAL4* in the *P{GawB}* element, driving the expression of any gene under the control of UAS sequences in the endogenous *esg* expression pattern. The EP insertion *P{EP}esg^{EU143}* can be used to express *esg* under the control of any *GAL4* driver. Recovering the *esg* expression levels in the *L4/P{EP}esg^{EU143}* (*L4 > P{EP}esg^{EU143}*) genotype led to normal sensitivity to nicotine (Fig 2C).

These results clearly indicate that a reduction of one half of the *esg* gene dosage is sufficient to reproduce the nicotine hyper-sensitive phenotype.

The *L70* insertion causes the *mirR-310-311-312-313* cluster (*miR-310^c*) to be miss-expressed

To evaluate how the P-element insertion was affecting the expression levels of the *miR-310^c* in *L70* line, we performed northern blot analyses using embryos, larvae, pupae and adult flies. We found no difference between *L70* and *w¹¹¹⁸* embryos. However, the *miR-310^c* was expressed both in *L70* adults and pupae whereas no expression, or extremely low expression, was detected in the control line, *w¹¹¹⁸*, at these stages (Fig 3A and 3B and S3 Fig). It has been reported that the *miR-310^c* is strongly expressed during early embryo development (0–12 hrs), with its expression decreasing in 12 to 24 hrs embryos and being extremely low in larvae, pupae and adults [9]. These data indicate that the *L70* insertion caused somehow a deregulation of the *miR-310^c* expression, provoking its ectopic expression at late developmental stages. As the insertion site of *P{GawB}* element was close to the transcription initiation site (10 bp), we

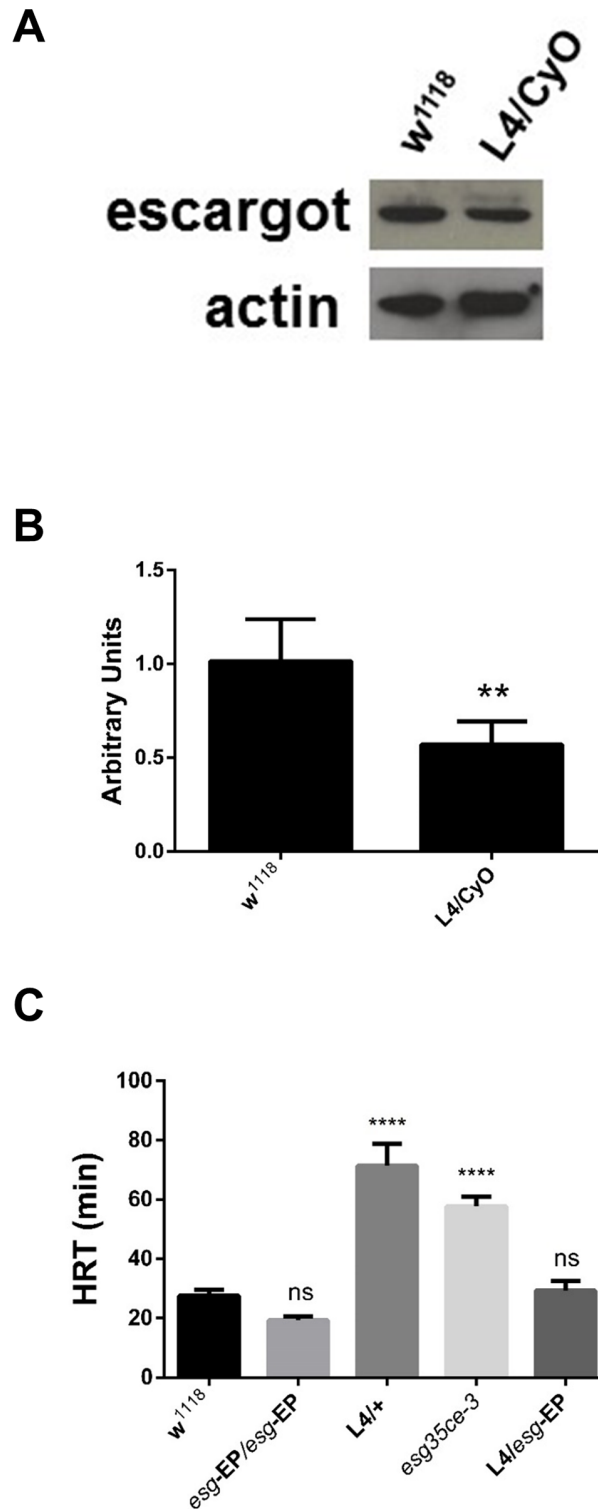


Fig 2. *L4* P-element insertion causes Esg loss of function. (A) Western blot of *L4* embryos showing a reduced expression of the Esg protein compared to *w¹¹¹⁸*. (B) Quantitative densitometry of western blots. *n* = 3 (C) Half recuperation time (HRT) of the different *esg* alleles used. EP = *P{EP}esg^{EU143}*, *esg^{35ce-3}* (loss of function allele) ** = $P \leq 0.001$, **** = $P < 0.0001$.

doi:10.1371/journal.pone.0133956.g002

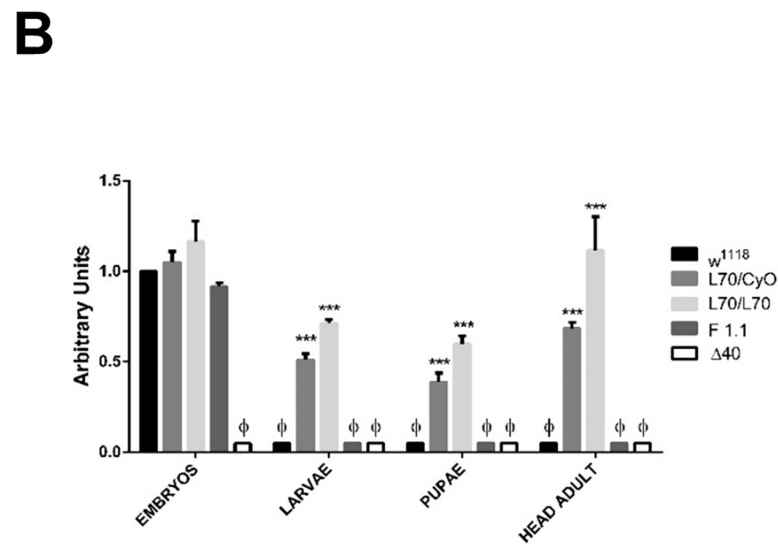
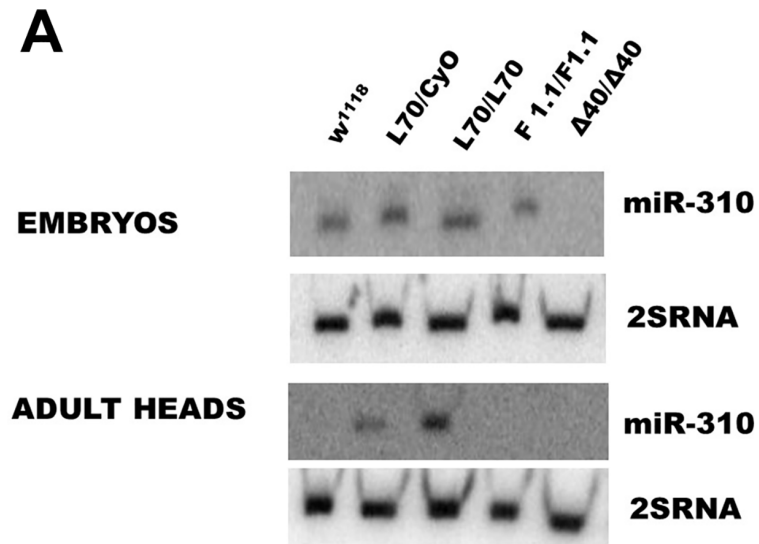


Fig 3. *L70* P-element insertion causes ectopic expression of the *miR-310^c* in adult flies. (A) Northern blots of fly embryos and adult heads show that there is no adult expression of the *miR-310* transcript in adult tissues in *w¹¹¹⁸* and revertant line *F1.1* while there is expression of the *miR-310* transcript in *L70*. $\Delta 40$ strain has a deletion of the complete *miR-310^c* and is used as a negative control. Similar results were found with the other miRs transcripts (S2 Fig). (B) Densitometric analysis of (A). Φ = not detectable, *** = $P \leq 0.0001$.

doi:10.1371/journal.pone.0133956.g003

presumed that the transcription initiation of this gene could be affected; however, by 5'RACE, we corroborated that the *miR-310^c* transcription initiation site in *L70* adults is identical to the transcription initiation site of wt embryos (S4 Fig).

Nicotine sensitivity of *L4* and *L70* is not due to a general lack of fitness

To evaluate the possibility that *L4* and *L70* nicotine hypersensitivity is due a general lack of fitness, we performed tests with different environmental factors that may uncover some other

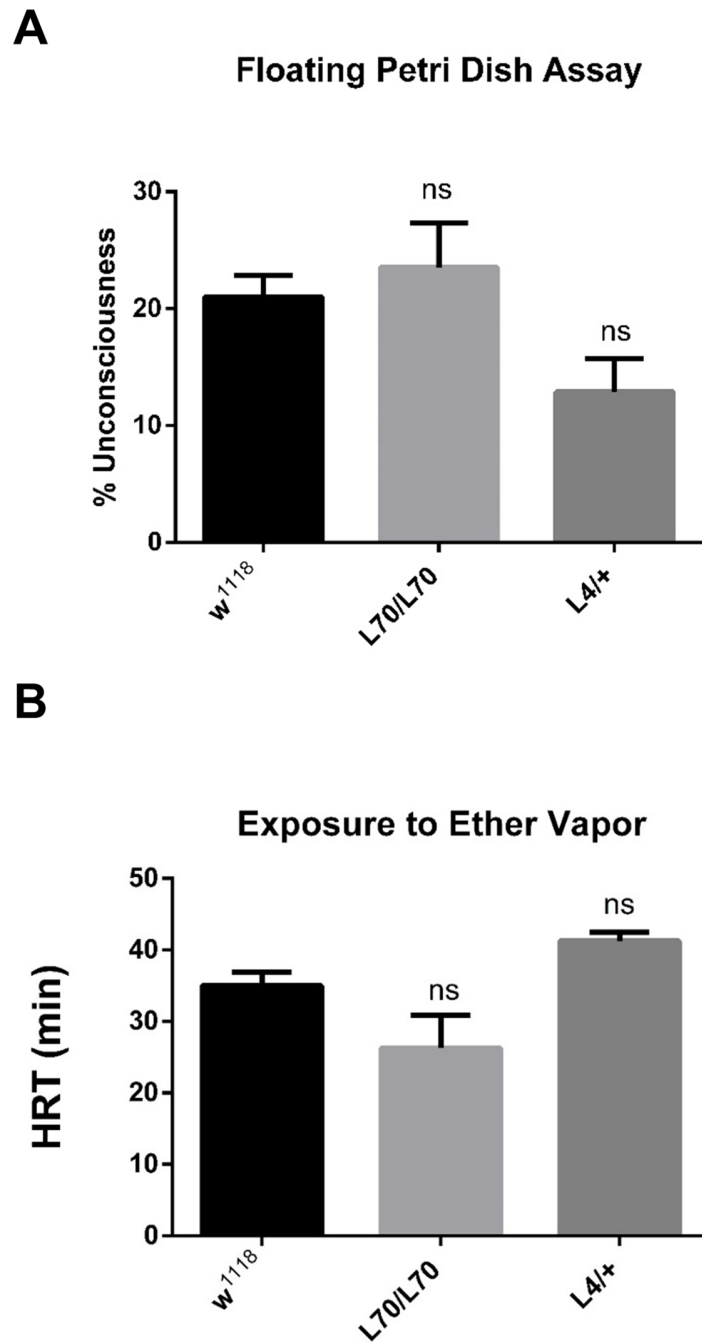


Fig 4. *L70* and *L4* mutant lines are not hypersensitive to heat or ether. (A) Percentage of unconscious flies exposed to 45°C in the floating plate assay: *L70* and *L4* are as resistant to heat as *w¹¹¹⁸*. (B) HRT of *L4* and *L70* flies exposed to ether. No significant (ns) difference was detected in either condition.

doi:10.1371/journal.pone.0133956.g004

type of fitness defects. Heat resistance and ether sensibility can be used as proxy of general fitness. Heat resistance can be evaluated using the floating Petri dish assay (see [Materials and methods](#)). Our data showed that *L4* and *L70* contend normally with heat ([Fig 4A](#)). The ether sensibility of *L4* and *L70* was also normal ([Fig 4B](#)). These data together with the fact that *L4*

and *L70* flies have the same climbing abilities than the controls (S1 Fig) suggest that these mutant lines do not have a general lack of fitness.

Expressing small interference RNAs against *esg* or expressing the *miR-310^c* under the control of *L4* enhances the mutant *esg* cuticle phenotype and nicotine sensitivity

Analysis of the *esg* transcript using TargetScanFly 6.2 [10] showed that it contains one complementary target site for the seven nucleotide “seed” sequence shared by the four microRNAs in the *miR-310^c*. The target sequence is located in the 3' end of *esg*'s open reading frame, from nucleotides 1113 to 1119 (Fig 5A). Interestingly, in the *Drosophila* *esg* homolog family members: *snail*, *worniu* and *scratch* this seed sequence is absent. We tested *snail^{l8}*, a loss of function mutant, and it did not present any abnormal nicotine sensitivity thus suggesting that *esg* has a direct involvement in nicotine sensitivity and that the expression of the *miR-310^c* down-regulates *esg*. Although animal canonical regulation by microRNAs involves targeting of the transcript 3' UTR, there are well-documented cases showing that microRNA regulation is also achieved by targeting the coding region, especially in *Drosophila* [11,12]. Noteworthy, it has been shown that the *miR-310^c* regulates Khc-73 via a target sequence located in its ORF [13].

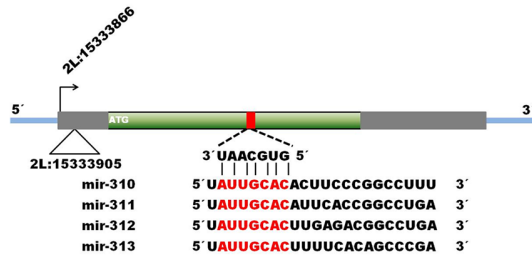
MicroRNA target regulation is usually demonstrated using artificial constructs that have the microRNA target sequence fused to luciferase and measuring *in vitro* the reduction in luciferase activity. We are fortunate to have an *in vivo* and biologically relevant phenotypic reporter that is the classic loss of function *esg* phenotype. As mentioned above, loss of function of *esg* in the ectoderm during development causes characteristic cuticle defects whose extent is proportional to the amount of *esg* loss of function [7]. In order to demonstrate that cuticle defects can be used as a reporter of *esg* loss of function, we used RNA interference to down-regulate *esg* using the *nullo* promoter that is a low level constitutive driver which is expressed in all somatic tissues [14]. In this genotype (*nullo*>*UAS-iRNA-esg*) the cuticle phenotype is induced in 89% of the flies with 100% viability. Furthermore, when *L4* is used to drive the *UAS-iRNA-esg* construct (*L4*>*UAS-iRNA-esg*), the cuticle phenotype penetrance is enhanced from 8%, in *L4* by itself, to 100%. In this genotype, the *esg* phenotype is so severe that flies are unable to eclose and have to be dissected from the pupal case to evaluate cuticle damage (Fig 5B).

When the *miR-310^c* is expressed from the *UAS-DsRed53-mir-310-313* line [13] using *L4* as a driver we found that the cuticle phenotype penetrance increased to 100%, although it was less severe than the one induced by the *UAS-iRNA-esg*, as they have 14% of viability. The eclosed flies behaved normally but were as sensitive to nicotine as the *L4/L70* flies (Fig 5C). These data suggest that *miR-310^c* is lowering Esg levels in a similar manner as the *esg* iRNA. This is also supported by the fact that individually expressed miR-311 has an enhanced cuticle phenotype with a penetrance of 23% with 100% viability (Fig 5B). The expression of the non-related microRNA *miR-14* driven by *L4* had no effect on nicotine HRT or cuticle phenotype (Fig 5B).

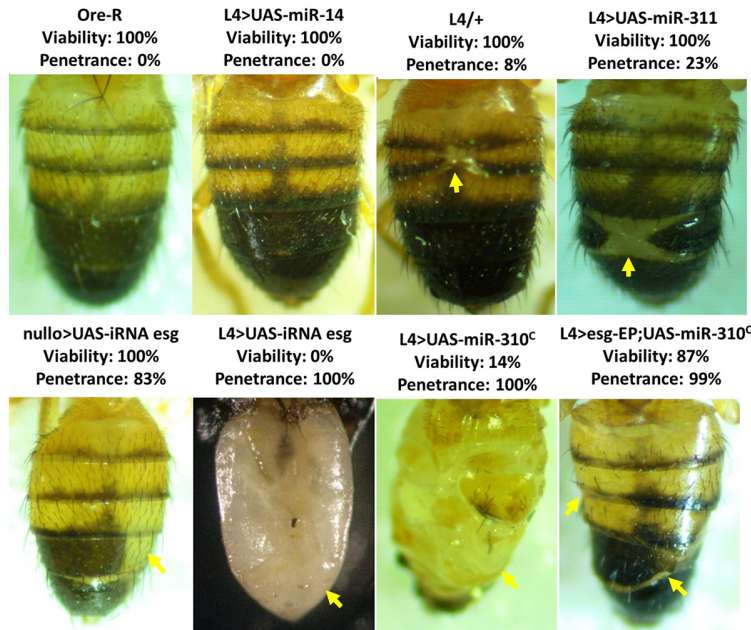
To confirm that the cuticle phenotype induced by the expression of the *miR-310^c* is specifically caused by a reduction of *esg* function, this phenotype was reverted by augmenting the *esg* gene dosage using the following genotype: *L4*>*esg-EP*; *UAS-miR-310^c*. In these flies, cuticle defects were partially rescued and viability increased from 14% to 87% (Fig 5B). Nicotine sensitivity was rescued as the HRT of this line decreased from 123 minutes, shown by the *L4*>*UAS-miR-310^c*, to 54 minutes in *L4*>*esg-EP*; *UAS-miR-310^c* (Fig 5C).

To further demonstrate that the *miR-310^c* overexpression reduces the amount of Esg, we performed a western blot analysis of embryos having the following genotype: *Act5c-GAL4*; *tub-GAL80^{ts}*>*miR-310^c*. Embryos were used because in adult flies Esg levels are extremely low. The expression of this cluster during embryo development reduces *esg* protein to undetectable

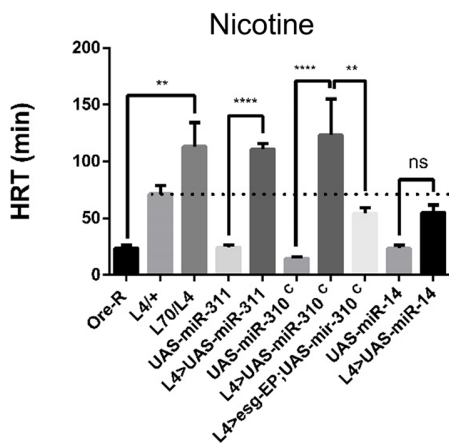
A



B



C



D

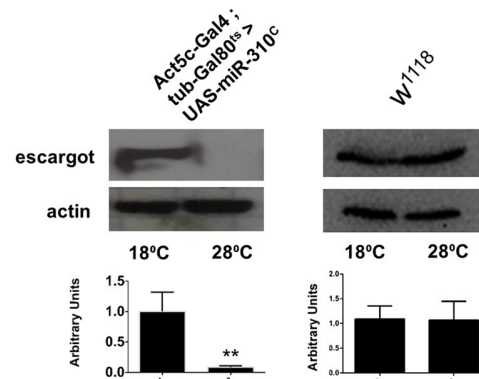


Fig 5. Genetic interaction of the *miR-310^c* with *esg*. (A) Schematic representation of *esg* gene. The red rectangle represents the target sequences in *esg*'s ORF of miR-310, miR-311, miR-312 and miR-313. An alignment of the four mRNAs encoded in the *miR-310^c* is also shown, red characters show the seed sequence. (B) Phenotype penetrance of the *L4* flies expressing small RNAs: *Ore-R* = wt abdomen, *L4*> UAS-miR-14 = miR-14 driven by *L4* (note that there is no apparent phenotype) *L4*/+ = basal *L4*, *L4*>UAS-miR-311 = miR311 driven by *L4*, *nullo*>UAS-iRNA *esg* = short interference RNA against *esg* driven by *nullo*, *L4*>UAS-iRNA *esg* = short interference RNA against *esg* driven by *L4*, *L4*>UAS-*miR-310^c* = *miR-310^c* driven by *L4*, *L4*>*esg-EP*;UAS-*miR-310^c* = *miR-310^c* and *esg* from the EP driven by *L4*. Phenotype of the small interference RNA against *esg* is similar to the miR-311 and *miR-310^c* phenotype (cuticle phenotype is indicated with yellow arrows). Note that the presence of the *esg-EP* suppresses the effect of the *miR-310^c* expression (*L4*>*esg-EP*;UAS-*miR-*

310^c). (C) HRTs become significantly longer when *L70* and *L40* genetically interact (*L70/L4*). This interaction can be phenocopied by the *L4* induced expression of the *miR-310^c* (*L4*> UAS-*miR-310^c*) or miR-311 alone, suggesting that the *miR-310^c* down-regulates *esg* expression. Dashed line indicates the basal sensitivity of *L4/+*. $n \geq 100$, * = $P \leq 0.01$, ** = $P \leq 0.001$, **** = $P < 0.0001$, ns = not significant. (D) Western blots show that Esg protein levels can be conditionally ablated when the *miR-310^c* is expressed. The *miR-310^c* can only be expressed at 28°C in the Act5c-GAL4;Tub-Gal80^{ts}>UAS-*miR-310^c* genotype, in these conditions *esg* becomes undetectable, while in the control (*w¹¹¹⁸*) remains unaffected, lower panels correspond to the densitometric analysis of the western blots, ** = $P \leq 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0133956.g005

levels thus explaining the lethality observed when the *miR-310^c* is expressed early in development with a strong promoter (Fig 5D). Overall, these experiments clearly demonstrate that the *miR-310^c* is downregulating *esg*.

The phenotype of the ectopic expression of the *miR-310^c* can be phenocopied by a constitutive GAL4 driver but only when it is expressed late in development

To demonstrate that the ectopic expression of the *miR-310^c* is enough to enhance the nicotine-sensitivity, we used the transgenic UAS-DsRed53-*mir-310-313* line driven by a battery of GAL4 drivers of different strengths and directed to different target organs; however, no driver was able to direct the expression of the *miR-310^c* in such a way that it phenocopies *L70* (S1 Table). A possible explanation for this result could be that the *miR-310^c* expression was not directed to the correct tissues, time and/or levels of expression. We attempted to drive the expression of the *miR-310^c* by strong constitutive GAL4 drivers such as the actin promoter but we only confirmed that constitutive strong expression of the microRNAs is lethal as previously reported (S1 Table) [15]. To overcome this issue, we decided to use the GAL4/GAL80^{ts} system in order to control the time at which the *miR-310^c* was expressed. For this, we induced the *miR-310^c* expression by incubating flies at 28°C, the permissive temperature, at different times during development using the Act5c-GAL4;tub-Gal80^{ts} driver. Under these conditions, flies were viable (60%) only when the expression of the *miR-310^c* was induced after sixteen days of development at 18°C when they are just at the end of pupation or after eclosion. Flies expressing *miR-310^c* became as sensitive to nicotine as the *L70* line after 72 hrs of induction (Fig 6A). Also, these flies are more sensitive to nicotine-containing food thus fully phenocopying *L70* (Fig 6B).

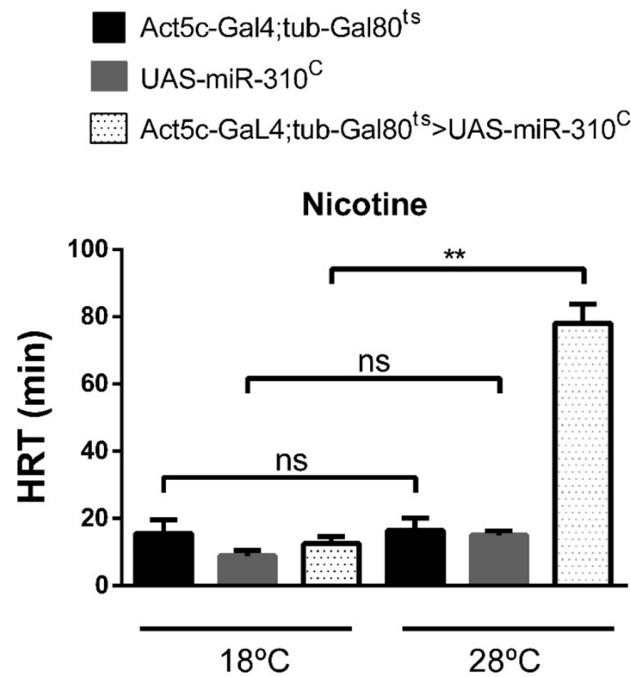
The gene *esg* is expressed in labial imaginal discs

Trying to understand the cellular basis of these phenotypes, we characterized the *L4* expression pattern by crossing it with UAS-GFP and found that it has the same expression pattern as the one reported for *esg*: embryonic ectoderm and histoblasts; larval leg and wing imaginal discs, brain, spiracles and tracheae; adult intestinal stem cells, malpighian tubules, testis and salivary glands [7,16–19]. Our data shows that *esg* is also expressed in the third instar larval mushroom bodies and the medial section of the thoracoabdominal ganglion, where motor neurons that innervate wings and legs are located. (Fig 7A–7C). Importantly, we found that *esg* is expressed in the proximal region of the third instar larvae labial imaginal discs (Fig 7D–7F) and in the labial palp of the late pupae (Fig 7G–7I) where the taste organs are developing. The lack of *esg* may be altering the normal differentiation of these organs causing hypersensitivity to nicotine.

Transcriptome analysis shows that *esg* loss of function affects genes involved in chemical perception and cuticle development

We sequenced the transcriptome of *L4* and *L70* heads and compared each of the mutant lines with both control lines (*w¹¹¹⁸* and *Ore-R*). To identify the biological processes altered in our mutants, we used the resources of the Gene Ontology Consortium [20,21] to do an enrichment

A



B

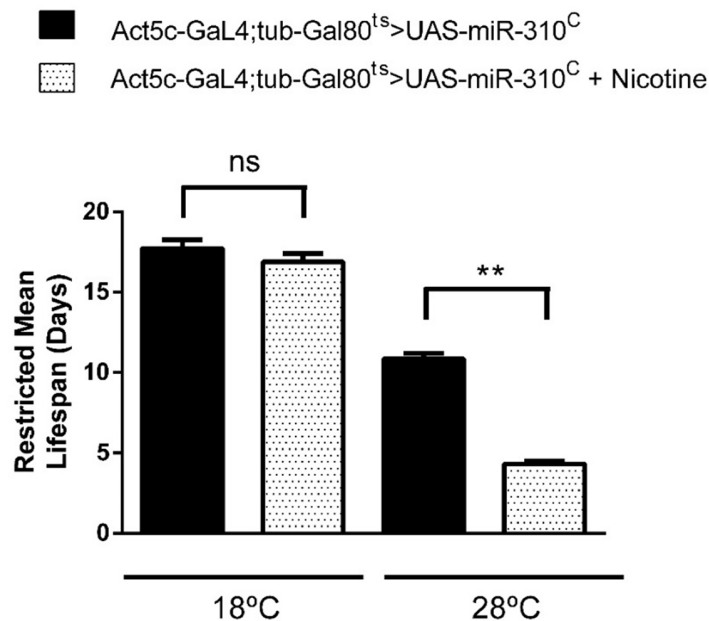


Fig 6. Temporally controlled expression of the *miR-310^C* in adult flies phenocopies *L70* mutant line. (A) The HRT of the line Act5c-GAL4;Tub-Gal80^{ts}>UAS-*miR-310^C* is significantly longer only when it is at the GAL80 permissive temperature (28°C). Embryos were reared at 18°C for sixteen days, just before eclosion pupae were transferred to 28°C and maintained at this temperature for 3 days before assaying, controls were kept at 18°C, n ≥ 100. (B) Survival of the line Act5c-GAL4;Tub-Gal80^{ts}>UAS-*miR-310^C* is significantly reduced. Restricted mean life of Act5c-GAL4;Tub-Gal80^{ts}>UAS-*miR-310^C* genotype is significantly reduced

when maintained in standard cornmeal food supplemented with 0.5 mg/ml nicotine at the GAL80 permissive temperature $n \geq 100$ flies, $n = 3$ in all experiments, $** = P \leq 0.001$, ns = not significant.

doi:10.1371/journal.pone.0133956.g006

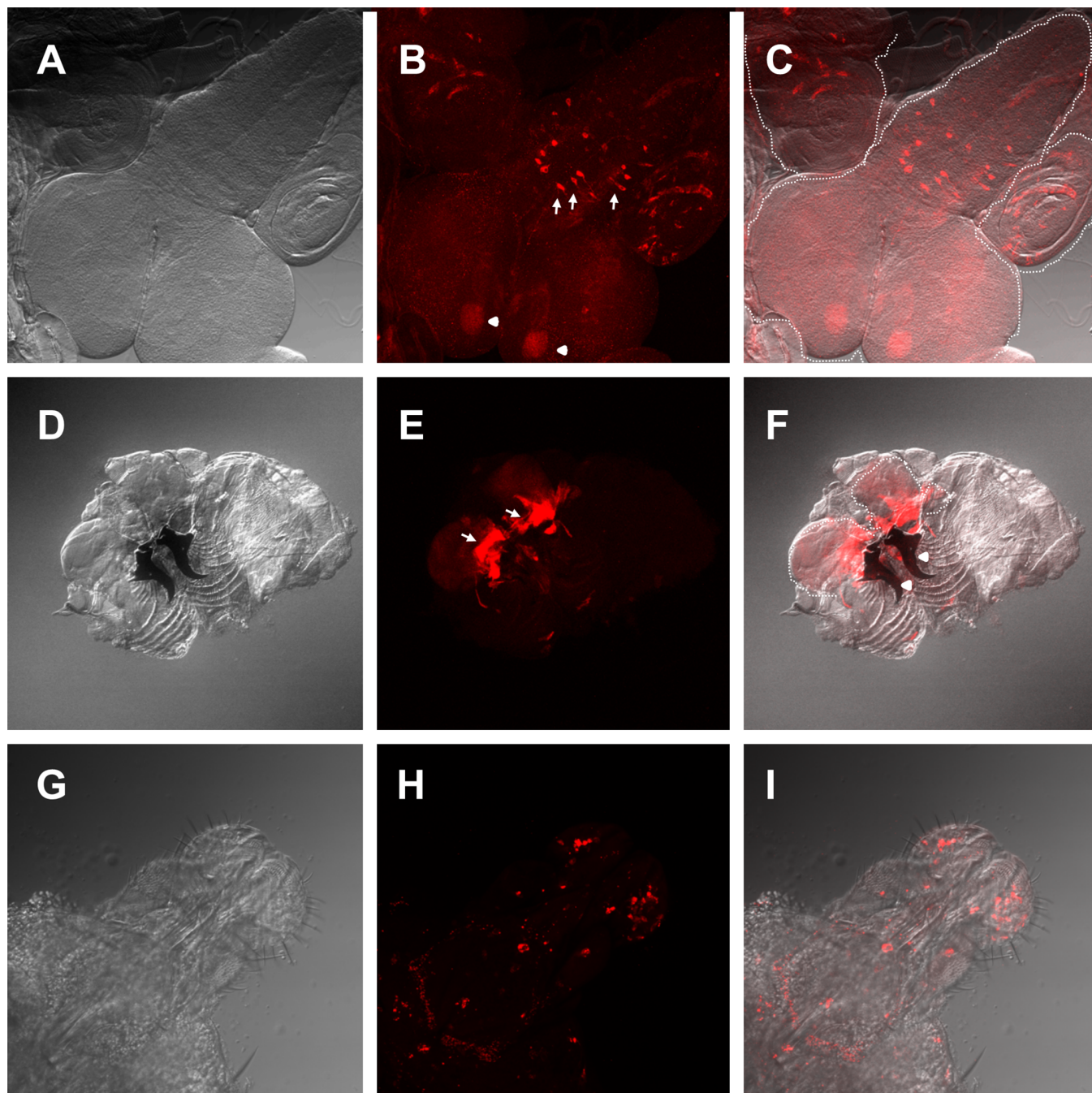


Fig 7. Expression pattern of the *esg* L4 enhancer trap. (A-C) L4>UAS-GFP third instar larval central nervous system (CNS) and adjacent imaginal discs (A) Differential interference contrast (DIC) microscopy image. (B) Confocal maximal projection of an immunohistochemistry against GFP. Arrows show the medial section of the thoracoabdominal ganglion *esg* expressing neurons and arrowheads show mushroom bodies. (C) Overlay of DIC and confocal images. (D-F) L4>UAS-GFP third instar larval inverted maxillary region that includes labial imaginal discs. (D) DIC microscopy image. (E) Confocal maximal projection of GFP fluorescence. Arrows show the expression domain in the proximal labial discs. Arrowheads show mandibles. (F) Overlay of (D) and (E). (G-I) L4>UAS-Stringer late pupal proboscis. (G) DIC microscopy image. (H) Confocal maximal projection of stringer fluorescence. (I) Overlay of (H) and (I). White dash-lines show the border of the CNS and labial imaginal discs, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0133956.g007

of biological process analysis, using the database of genes whose ontology is supported by experimental data. For this analysis, we only considered genes that were consistently up or downregulated in the mutant lines when compared with both control lines. We used as cutoff a “double control log₂ ratio” (see [Materials and methods](#)) of 1 or greater, that is equivalent to a minimum of a 2 fold increase when compared to the controls’ levels of expression; or -1 or lower, that is equivalent to a minimum reduction of half of the controls’ levels of expression. Computed genes with no mutant phenotype, molecular feature or determined function (CGs followed by an integer) were not included. Using these criteria, we found that in *L4*, 507 genes were upregulated and 233 were downregulated. The biological processes in which the affected genes in *L4* participate are related to male gamete generation, cuticle development and detection of chemical stimulus: odorant, pheromones, taste and chemical receptors ([S2 Table](#)). For *L70*, 164 genes were upregulated while 233 were downregulated. The affected genes in *L70* are involved in the following biological processes: detection of chemical stimulus involved in sensory perception (specifically smell), neurological system process, detection of pheromones, sexual reproduction and nervous system development ([S3 Table](#)). These data are in agreement with our observed phenotypes and also with previous literature as both *esg* and the *miR-310^c* had been reported to be required for male gametogenesis and neural development [[22,23](#)].

Discussion

In this work, we identified two mutant lines that are statistically significant more sensitive to nicotine when compared to control flies. One of them is *L4*, a loss of function allele that reduces the levels of the transcription factor Esg by half, as demonstrated by western blot analysis. The hypersensitivity of this P-element insertion mutant is clearly reproduced by *esg^{35Ce-3}*, a loss-of-function mutant that expresses a function-less full length Esg protein with one of its zinc fingers inactivated by a missense point mutation. This loss of function is further confirmed by the fact that the *L4/esg^{35Ce-3}* genotype is lethal, demonstrating that they belong to the same complementation group. In addition, the induced expression of *esg* by *L4* using an EP insertion in the *esg* gene completely rescues the normal nicotine phenotype; thus, confirming that the loss of half the dosage of *esg* is enough to confer hypersensitivity to nicotine.

L4 shows the classical *esg* cuticle phenotype previously reported for other *esg* alleles. The *esg* knock-down obtained by RNAi severely enhances cuticle phenotype, in the same way as the miss-expression of the *miR-310^c* does, either by its own promoter or by using the null driver, consequently demonstrating that this cluster is down-regulating the *esg* gene. The *esg* down-regulation was also shown in embryos, where the *miR-310^c* over expression completely abates Esg production.

We found *esg* expression in the proximal labial imaginal disc, the precursor of the proboscis, where the main gustatory organs reside. In order to explain the nicotine hypersensitivity we propose that the loss of *esg* function in the labial discs during development is promoting premature differentiation of these sensory organ precursors affecting their cellular fate and causing ectopic expression of chemical receptors. Esg, and the two other members of the family, *Worniu* and *Snail*, participate in neuroblast development and differentiation by mediating asymmetric cell divisions that has been shown to be involved in the correct development of sensory bristles and other taste specialized sensilla [[24,25](#)]. Esg affects aspects of the differentiation process in intestinal stem cells and male germ cells by maintaining stemness and repressing differentiation [[26](#)]. This Esg function might be conserved during gustatory organ development and differentiation and the development of neurons of the medial section of the thoracoabdominal ganglion. This hypothesis is supported by the fact that other *Snail* family members have a similar role in the nervous system [[27,28](#)], and by our sequencing data that showed that many

genes involved in sensory and chemical perception are affected when there is *esg* loss of function. The change in cell fate hypothesis that we propose is further supported by the fact that *esg* is involved in olfactory neuron fate determination as the over-expression of *Esg* together with *Nerfin* induces the appearance of CO₂ sensitive neurons that do not exist in the wild type [29]. The fact that *esg* is expressed in the labial discs, proboscis and labella and that, in our transcriptome analysis, the expression of several bitter taste and odorant receptors were affected is consistent with an aberrant chemical sensilla differentiation caused by the lowered expression of *esg*, either through its downregulation via miRs or by mutation. The lack of *esg* could also be affecting other sections of the nervous system such as the medial section of the thoracoabdominal ganglion, where many of the motor neurons that control limb movement are located, thus contributing to the loss of negative geotaxis reflex of *esg* mutants when exposed to nicotine.

The other nicotine hypersensitive line, *L70*, showed ectopic expression of the *miR-310^c* during pupation and in adult flies when it is not normally expressed. This altered *miR-310^c* expression is sufficient to induce nicotine hypersensitivity, as demonstrated by ectopically expressing the *miR-310^c* late in pupal development under the control of a strong constitutive promoter. The hypersensitivity shown by *L70* can be explained if the ectopic expression of these microRNAs downregulates *esg*, thus phenocopying *esg* loss of function. The stronger phenotype observed in homozygous *L70* compared to *L4* can be explained by the fact that the miRs in this cluster have additional target genes that affect neural physiology. The known targets of the *miR-310^c* are β -catenin, dTCF [22] and *Khc-73* [13]. *Khc-73* is important for the modulation of synaptic strength, so its downregulation could be altering the intensity of the response to nicotine; β catenin and TCF could be involved in neuron determination and synapse physiology via the Wg/Wnt pathway.

It is worth to mention that our work does not exclude metabolic pathways involved in detoxification, a line of inquiry that must be pursued in the future. We need to further investigate the precise levels of *Esg* during metamorphosis in these lines and to analyze in greater detail both the architecture and physiology of the adult nervous system in these lines.

In conclusion, we show that *esg* is important for the development of organs involved in chemical perception and that the ectopic expression of the *miR-310^c* modulates *esg* expression.

Materials and Methods

Volatilized nicotine sensitivity test

Groups of 10 male flies 0–3 days post-eclosion were put into an empty vial (VWR vial O.D. x H = 25 x 95 mm), where they were exposed for 15 seconds to volatilized nicotine (N3976 SIGMA-ALDRICH). Nicotine solution was volatilized by placing 2 μ l on a 3.0 mm Nichrome filament (NI30PF World Precision Instruments, Inc.), which was introduced into the vial and heated to 250°C to achieve instantaneous volatilization. To titrate the amount of nicotine to be used 0 to 1000 ng of nicotine were tested. The flies were then transferred into a clean vial labeled with a perimetral line 2.5 cm from the bottom. The negative geotaxis reflex was measured every 5 minutes. Flies that crossed the line in a time no longer than 10 seconds after being tapped to the bottom were considered recovered and removed from the vial. The observation time was performed until 100% of the flies recovered. Half Recovery Time (HRT) was defined as the time at which 50% of the flies recovered their geotaxis reflex. The amount of 32 ng of nicotine in 2 μ l caused an HRT of approximately 30 minutes for the line *w¹¹¹⁸*; therefore, we used this amount in the rest of the tests. For statistical analysis of the data one-way ANOVA was used and a $P \leq 0.01$ was considered significant. All graphs and statistical analyses were done in GraphPad Prism 6.01.

Chronic exposure to nicotine

Newly eclosed male flies were placed in standard corn meal agar food (control) or with nicotine (experimental) at a concentration of 0.5 mg/ml in groups of 20–30 flies. Flies were changed every 24 hours to a new vial and the number of dead flies was registered until there were no more flies alive. Assays were performed at 18°C, 25°C and 28°C. For survival analysis, we used the Kaplan-Meier estimator using the OASIS: online application for the survival analysis of life-span assays performed in aging research (<http://sbi.postech.ac.kr/oasis/>) [30].

Floating Petri dish assay

The avoidance of noxious heat assay or hot water floating Petri dish assay was performed by introducing 30 adult male flies in a 14 cm plastic Petri dish sealed with vinyl electric tape. Petri dishes were floated in a 45°C water bath for 30 min. in darkness. Fit flies migrate to the roof of the petri dish and avoid becoming unconscious because of the heat shock, flies found unconscious were considered unfit [31]. For statistical analysis of the data one-way ANOVA was used and $P \leq 0.01$ was considered significant. Graphs and statistical analyses were done in GraphPad Prism 6.01.

Exposure to ether vapors

Groups of ten flies were placed for one minute in an empty standard *Drosophila* vial covered with a cotton plug that had 1 ml of ether. Flies were transferred to a fresh vial and the HRT was determined. The experiment was repeated at least ten times. For statistical analysis of the data one-way ANOVA was used and $P \leq 0.01$ was considered significant. Graphs and statistical analyses were done in GraphPad Prism 6.01.

Mapping of L70 and L4 mutations

L70 mutant line was mapped using inverse PCR [32]. PstI and XbaI enzymes were used (NEB, Inc.) to digest genomic DNA. DNA was ligated with T4 ligase and fragments were amplified with the following oligonucleotides: F5 ' GCACGTTTGCTTGTGAGAGGAAAGG3' and R5 ' CGGTAAGCTAGCTTCGGCTATCG3 '. The products obtained were sequenced and subsequently mapped to the *Drosophila* genome using BLAST analysis in <http://flybase.org/blast/>. The insertion site was mapped to 2R:20584338. L4 mutant line was mapped by plasmid rescue technique [32,33]. PstI enzyme (NEB, Inc.) was used to digest genomic DNA and obtain pBluescript fused to adjacent genomic DNA. Three clones were obtained and sequenced using the T7 primer 5' TAATACGACTCACTATAGGG3'. Sequences obtained were identical and subsequently mapped to the *Drosophila* genome using BLAST analysis in <http://flybase.org/blast/>. The insertion mapped to site 2L: 15333905. Insertion sites were confirmed by PCR and the resulting products were sequenced. The oligonucleotides used were: 5' CACAACCTTTCCTCTCAACAA3' and 5' CTGACGTTGATCAGTTCCTCG3' for the 5' end of the *P{GawB}* insertion and oligos 5' TAGCCGAGTGCCGCGATTG3' and 5' CTGACGTTGATCAGTTCCTCG3' for the 3' end.

Northern-blot

Total RNA was prepared using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to manufacturer's directions. Total RNA (10–20 µg) was separated in a 15% polyacrylamide/7 M urea/0.5X TBE gel and transferred to Hybond-N⁺ membrane (Amersham, Piscataway, NJ). Hybridizations were carried out at 42°C with the Ultra-Hyb Oligo solution (Ambion, Austin, TX) using as probes DNA oligonucleotides labeled with P³²-γATP (PerkinElmer) at their 5' end using T4 polynucleotide kinase (Fermentas). Oligonucleotides used: miR-310-

5' AAAGGCCGGGAAGTGTGCAATA3', miR-311-5' tcaggccgggtgaatgtgcaata3', miR-312-5' tcaggccgtctcaagtgcaata3', miR-313-5' tcgggctgtgaaaa gtgcaata3' and as a loading control 2SRNA-5' TACAACCCTCAACCATATGTAGTCC AAGCA. Two washes using 2x SSC/0.1% SDS were carried for 30 min at 42°C. Autoradiographs were analyzed using a Typhoon PhosphorImager (Amersham). All membranes were exposed for 24 hours and control hybridizations were exposed for 5 minutes.

5' RACE

Total RNA was extracted from 3 day adult heads as above. 5' RACE was performed using the FirstChoice RLM-RACE Kit according to manufacturer's instructions including a third round of nested PCR. Primers used:

First PCR: Del1Fwd 5' -GATTCGTTTTAAAGTAATCAGG-3' and 5' RACE Outer Primer 5' -GCTGATGGCGATGAATGAACACTG-3'.

Second nested PCR: Del2Fwd 5' -GCTAATTGTTAGTATAAGGCA-3' and 5' RACE Inner Primer 5' -CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG-3'.

Third nested PCR: miR-313 5' -TCGGGCTGTGAAAAGTGCAATA-3' and 5' RACE Inner Primer 5' -CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG-3'.

PCR product was purified using Amicon Ultra-0.5 MILLIPORE columns and directly sequenced using primer miR-313.

Western-blot

Total proteins from fly embryos aged 0–14 hrs were extracted in lysis buffer (250 mM sucrose, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂ and 1% SDS) containing protease inhibitors. Protein extracts (50–100 µg) were subjected to 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride membranes (MILLIPORE) for 2 hrs at 200 mA on a Mighty Small Transphor (Amersham Pharmacia Biotech). Blots were blocked overnight with 5% nonfat dry milk in PBS 1X containing 0.1% Tween-20. Custom made anti-Escargot antibodies (rabbit polyclonal, EZBiolab) were added at a dilution of 1:1000 for two hours and developed using the SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific). After developing, blots were stripped by incubation at 55°C in a buffer containing: 62 mM TRIS-HCL pH = 6.8, 2% SDS and 0.1 M β-Mercaptoethanol. After stripping blots were assayed with anti-Actin antibody (Developmental Hybridoma Bank) using a dilution 1:3500 and developed as above. All blots were detected using Kodak radiographic film. Quantitation was performed using ImageJ [34] using the gel quantitation utility.

Transcriptome analysis

Total RNA from fly male heads was extracted using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to manufacturer's directions. RNA was stabilized using RNA stable tubes from Bio-matrix and processed according to manufacturer's instructions. Fifty µg of total RNA per line were sent for deep sequencing to the Beijing Genome Institute (BGI Americas corporation). BGI provided the following services: 1. Data filtering that includes removing adaptors contamination and low-quality reads from raw reads. 2. Assessment of sequencing (Alignment Statistics, randomness assessment of sequencing, distribution of reads on the reference genome). 3. Gene expression and annotation (Gene coverage and coverage depth). 4. Gene expression difference analysis (this tables are available as provided by BGI in S4–S7 Tables) which were obtained with the NOIseq differential expression method [35]. Sample (L4 or L70) and control lines (*w¹¹¹⁸* and *Ore-R*) were sequenced as independent duplicates. FPKMs for each duplicate were averaged and the mean log₂ ratio was calculated using the following formula: (mean

sample FPKM)/(mean control FPKM). Since we were using two different control strains, in order to avoid possible genetic background effects we specifically selected genes that were consistently up or down regulated in the sample when compared to both control lines. We obtained a “double control log₂ ratio” by averaging the mean log₂ ratios from both comparisons of each sample with both controls. Only genes that had a “double control log₂ratio” bigger than 1 or smaller than -1 were selected for the gene ontology analysis. The genes that satisfied these requirements were analyzed with the tools from the Gene Ontology Consortium [20,21] to do an enrichment of biological process analysis, using the database of genes whose ontology is supported by experimental data. Raw data available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/288398>. Accession numbers: SRR2080216, SRR2080214, SRR2080213, SRR2080215, SRR2080211, SRR2080210, SRR2080212.

Immunohistochemistry

Tissue was dissected in PBS and fixed in PBS 4% formaldehyde. Tissue was then permeabilized with 0.2% TritonX-100 and blocked for 30 min with 5% goat preimmune serum at room temperature. The primary antibody (mouse anti-GFP, 1:10, developmental studies hybridoma bank) was added, incubated overnight at 4°C and washed 3 times in PBS 0.2% TritonX-100 at room temperature. The secondary antibody (Cy3conjugated, 1:300, goat anti-mouse, Rockland Immunochemicals, Inc., Gilbertsville, PA) was added and incubated for 90 min and washed 3 times in PBS 0.2% TritonX-100 at room temperature. Samples were mounted in Citifluor (Ted Pella Inc).

Confocal Imaging

Images were collected at the “Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA)” in an inverted Confocal multiphotonic Olympus FV1000, using optimal confocal pinhole. Images were analyzed and reconstructed using the open source ImageJ program [34].

Stocks and crosses

Flies were raised on standard yeast medium at 18°C, 25°C and 28°C. *Oregon-R* and *w¹¹¹⁸* strains were obtained from the Drosophila stock center in Bloomington, Indiana. *L4* (*w¹¹¹⁸; P{GawB-GAL4. esg}^{L4}*) and *L70* (*w¹¹¹⁸; P{GawB-GAL4. miR310/313}^{L70}*), transgenic lines were obtained in our laboratory by mobilization of P-element P{GawB}. The P-element in *L70* was mobilized by crossing to the Δ2–3 transposase source. Revertant lines (F 1.1, F 1.2, F 2, F 5 and F 7.2) were recovered by screening for loss of the white marker, the insertion region was sequenced and revertant lines were tested for nicotine sensitivity. UAS-iRNA *esg* (Bloomington Stock # 34063), *snail¹⁸* (Bloomington Stock # 2311), Δ40 line (deletion of cluster *miR-310*), UAS-DsRed-53-miR-310-313 were kindly provided by Pejmun Haghghi Lab (McGill University), individual UAS-LUC-miR-311, UAS-LUC-miR-14 and all other lines used in this work are available at the Bloomington Drosophila Stock Center (NIH P40OD018537).

Supporting Information

S1 Fig. Response of flies to vaporized water. All mutant genotypes recovered immediately after exposure to vaporized water (nicotine 0 ng). (TIF)

S2 Fig. The precise excision of the P{GawB} revert *L70*'s hypersensitivity. P{GawB} was mobilized using the transposase source Δ2–3. Five independent lines: *F1.1*, *F1.2*, *F2*, *F5*, *F7.2* (data for *F1.1* is in Fig 1) were recovered, all of them having a precise excision that was

confirmed by DNA sequence. HRT from all revertant lines did not show significant differences from the control lines. ns = not significant.

(TIF)

S3 Fig. *L70* P-element insertion causes ectopic expression of the *miR-310^c*. (A) Northern blot and their quantitative analysis using RNA from embryos. (B) Northern blot and their quantitative analysis using RNA from adult male thorax. (C) Northern blot and their quantitative analysis using RNA from adult male abdomen. Probes used are indicated at the right of each hybridization result. There is practically no adult expression of the *miR-310*, *miR-311* and *miR-312* transcripts from wt, $\Delta 40$ and *F1.1* revertant line in adult tissues tested, while there is high expression of the transcripts in *L70* mutant line. *miR-313* was not detectable. *** = $P < < 0.001$, Φ = non detectable.

(TIF)

S4 Fig. The transcription initiation sites of *miR-310^c* in *w¹¹¹⁸* and *L70* are identical. First-Choice RLM-RACE Kit was used to determine the transcription initiation site of the *miR-310c*. A) Arrow shows third nested PCR product of *w¹¹¹⁸* and sequence histogram. 1) MWM 2) Primers *miR-313/Inner5'* RACE, *w¹¹¹⁸* cDNA. 3) Primers *miR-313/Inner5'* RACE, no cDNA B) Arrow shows third nested PCR product of *L70* and sequence histogram. 1) MWM 2) Primers *miR-313/Inner5'* RACE, *L70* cDNA. 3) Primers *miR-313/Inner5'* RACE, no cDNA C) Sequence alignment of *w¹¹¹⁸* and *L70* PCR products.

(TIF)

S5 Fig. Antibody Synthesis Report.

(PDF)

S1 Table. Drivers used for the expression of the *miR-310^c*.

(DOCX)

S2 Table. Gene ontology enrichment for *L4*.

(DOCX)

S3 Table. Gene ontology enrichment for *L70*.

(DOCX)

S4 Table. *w¹¹¹⁸* vs *L4* gene differential expression.

(XLS)

S5 Table. *Ore-R* vs *L4* gene differential expression.

(XLS)

S6 Table. *w¹¹¹⁸* vs *L70* gene differential expression.

(XLS)

S7 Table. *Ore-R* vs *L70* gene differential expression.

(XLS)

Acknowledgments

We thank René Hernández Vargas for technical support, Santiago Becerra for oligonucleotide synthesis, Jorge Arturo Yanez Ponce de Leon for DNA sequencing, Andrés Saralegui Amaro and Jaime Arturo Pimentel Cabrera from the Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LNMA) support in confocal imaging.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ISD FRB JRT AAC VNP ER. Performed the experiments: ISD FRB VNP ER. Analyzed the data: ISD FRB JRT AAC VNP ER. Contributed reagents/materials/analysis tools: ISD FRB JRT ACR VNP ER. Wrote the paper: ISD FRB JRT AAC VNP ER.

References

1. Heberlein U, Tsai LT-Y, Kapfhammer D, Lasek AW. *Drosophila*, a genetic model system to study cocaine-related behaviors: a review with focus on LIM-only proteins. *Neuropharmacology*. 2009; 56 Suppl 1: 97–106. doi: [10.1016/j.neuropharm.2008.07.023](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.023) PMID: [18694769](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18694769/)
2. Devineni AV, Heberlein U. Preferential ethanol consumption in *Drosophila* models features of addiction. *Curr Biol*. 2009; 19: 2126–32. doi: [10.1016/j.cub.2009.10.070](https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.10.070) PMID: [20005106](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20005106/)
3. Velázquez-Marrero C, Seale GE, Treistman SN, Martin GE. BK Channel $\beta 4$ Subunit Influences Sensitivity and Tolerance to Alcohol by Altering its Response to Kinases. *J Biol Chem*. 2014;289(42):29261–72.
4. Morel C, Fattore L, Pons S, Hay YA, Marti F, Lambomez B, et al. Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism in dopamine neurons. *Mol Psychiatry*. Nature Publishing Group; 2013; 19: 930–936.
5. McClung C, Hirsh J. Stereotypic behavioral responses to free-base cocaine and the development of behavioral sensitization in *Drosophila*. *Curr Biol*. 1998; 8: 109–12. PMID: [9427649](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9427649/)
6. Marygold SJ, Leyland PC, Seal RL, Goodman JL, Thurmond J, Strelets VB, et al. FlyBase: improvements to the bibliography. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41: D751–7. doi: [10.1093/nar/gks1024](https://doi.org/10.1093/nar/gks1024) PMID: [23125371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23125371/)
7. Hayashi S, Hirose S, Metcalfe T, Shirras A. Control of imaginal cell development by the escargot gene of *Drosophila*. *Development*. 1993; 118: 105–115. PMID: [8375329](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8375329/)
8. Fuse N, Hirose S, Hayashi S. Diploidy of *Drosophila* imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by escargot. *Genes Dev*. 1994; 8: 2270–2281. PMID: [7958894](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7958894/)
9. Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, et al. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell*. 2003; 5: 337–50. PMID: [12919683](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12919683/)
10. Ruby JG, Stark A, Johnston WK, Kellis M, Bartel DP, Lai EC. Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome Res*. 2007; 17: 1850–64. PMID: [17989254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17989254/)
11. Mandke P, Wyatt N, Fraser J, Bates B, Berberich SJ, Markey MP. MicroRNA-34a modulates MDM4 expression via a target site in the open reading frame. *PLoS One*. 2012; 7: e42034. doi: [10.1371/journal.pone.0042034](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042034) PMID: [22870278](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22870278/)
12. Schnall-Levin M, Zhao Y, Perrimon N, Berger B. Conserved microRNA targeting in *Drosophila* is as widespread in coding regions as in 3'UTRs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 15751–6. doi: [10.1073/pnas.1006172107](https://doi.org/10.1073/pnas.1006172107) PMID: [20729470](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20729470/)
13. Tsurudome K, Tsang K, Liao EH, Ball R, Penney J, Yang J-S, et al. The *Drosophila* miR-310 cluster negatively regulates synaptic strength at the neuromuscular junction. *Neuron*. 2010; 68: 879–93. doi: [10.1016/j.neuron.2010.11.016](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.016) PMID: [21145002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21145002/)
14. Kunwar PS, Starz-Gaiano M, Bainton RJ, Heberlein U, Lehmann R. Tre1, a G protein-coupled receptor, directs transepithelial migration of *Drosophila* germ cells. *PLoS Biol*. Public Library of Science; 2003; 1: E80.
15. Tang T, Kumar S, Shen Y, Lu J, Wu M-L, Shi S, et al. Adverse interactions between micro-RNAs and target genes from different species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 12935–40. doi: [10.1073/pnas.1007591107](https://doi.org/10.1073/pnas.1007591107) PMID: [20615957](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20615957/)
16. Tanaka-Matakatsu M, Uemura T, Oda H, Takeichi M, Hayashi S. Cadherin-mediated cell adhesion and cell motility in *Drosophila* trachea regulated by the transcription factor Escargot. *Development*. 1996; 122: 3697–705. PMID: [9012491](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9012491/)
17. Samakovlis C, Manning G, Steneberg P, Hacohen N, Cantera R, Krasnow MA. Genetic control of epithelial tube fusion during *Drosophila* tracheal development. *Development*. 1996; 122: 3531–6. PMID: [8951068](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8951068/)
18. Whiteley M, Noguchi PD, Sensabaugh SM, Odenwald WF, Kassis JA. The *Drosophila* gene escargot encodes a zinc finger motif found in snail-related genes. *Mech Dev*. 1992; 36: 117–27. PMID: [1571289](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1571289/)

19. Biteau B, Karpac J, Supoyo S, Degennaro M, Lehmann R, Jasper H. Lifespan extension by preserving proliferative homeostasis in *Drosophila*. Kim SK, editor. *PLoS Genet*. Public Library of Science; 2010; 6: e1001159. doi: [10.1371/journal.pgen.1001159](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001159) PMID: [20976250](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20976250/)
20. The Gene Ontology Consortium. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res*. 2014; 43: D1049–1056. doi: [10.1093/nar/gku1179](https://doi.org/10.1093/nar/gku1179) PMID: [25428369](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25428369/)
21. Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat Protoc*. 2013; 8: 1551–66. doi: [10.1038/nprot.2013.092](https://doi.org/10.1038/nprot.2013.092) PMID: [23868073](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23868073/)
22. Pancratov R, Peng F, Smibert P, Yang S, Olson ER, Guha-Gilford C, et al. The miR-310/13 cluster antagonizes β -catenin function in the regulation of germ and somatic cell differentiation in the *Drosophila* testis. *Development*. 2013; 140: 2904–16. doi: [10.1242/dev.092817](https://doi.org/10.1242/dev.092817) PMID: [23821034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23821034/)
23. Streit A, Bernasconi L, Sergeev P, Cruz A, Steinmann-Zwicky M. mgm 1, the earliest sex-specific germline marker in *Drosophila*, reflects expression of the gene *esg* in male stem cells. *Int J Dev Biol*. 2002; 46: 159–66. PMID: [11902678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11902678/)
24. Cai Y, Chia W, Yang X. A family of snail-related zinc finger proteins regulates two distinct and parallel mechanisms that mediate *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *EMBO J*. 2001; 20: 1704–14. PMID: [11285234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11285234/)
25. Le Borgne R, Bellaïche Y, Schweisguth F. *Drosophila* E-Cadherin Regulates the Orientation of Asymmetric Cell Division in the Sensory Organ Lineage. *Curr Biol*. Elsevier; 2002; 12: 95–104.
26. Korzelius J, Naumann SK, Loza-Coll MA, Chan JS, Dutta D, Oberheim J, et al. Escargot maintains stemness and suppresses differentiation in *Drosophila* intestinal stem cells. *EMBO J*. 2014; 289(42):29261–72.
27. Lai S-L, Miller MR, Robinson KJ, Doe CQ. The Snail family member *Wormiu* is continuously required in neuroblasts to prevent *Elav*-induced premature differentiation. *Dev Cell*. 2012; 23: 849–57. doi: [10.1016/j.devcel.2012.09.007](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.09.007) PMID: [23079601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23079601/)
28. Voog J, D'Alterio C, Jones DL. Multipotent somatic stem cells contribute to the stem cell niche in the *Drosophila* testis. *Nature*. 2008; 454: 1132–6. doi: [10.1038/nature07173](https://doi.org/10.1038/nature07173) PMID: [18641633](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18641633/)
29. Hartl M, Loschek LF, Stephan D, Siju KP, Knappmeyer C, Kadow ICG. A new Prospero and microRNA-279 pathway restricts CO2 receptor neuron formation. *J Neurosci*. 2011; 31: 15660–73. doi: [10.1523/JNEUROSCI.2592-11.2011](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2592-11.2011) PMID: [22049409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22049409/)
30. Yang J-S, Nam H-J, Seo M, Han SK, Choi Y, Nam HG, et al. OASIS: online application for the survival analysis of lifespan assays performed in aging research. *PLoS One*. Public Library of Science; 2011; 6: e23525.
31. Neely GG, Hess A, Costigan M, Keene AC, Goulas S, Langeslag M, et al. A genome-wide *Drosophila* screen for heat nociception identifies $\alpha 2\delta 3$ as an evolutionarily conserved pain gene. *Cell*. 2010; 143: 628–38. doi: [10.1016/j.cell.2010.09.047](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.047) PMID: [21074052](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21074052/)
32. Huang AM, Rehm EJ, Rubin GM. Recovery of DNA sequences flanking P-element insertions in *Drosophila*: inverse PCR and plasmid rescue. *Cold Spring Harb Protoc*. 2009; 2009: pdb.prot5199.
33. Hersberger M, Kirby K, Phillips JP, Würzler FE, Koller T, Widmer RM. A plasmid rescue to investigate mutagenesis in transgenic *D. melanogaster*. *Mutat Res Mutagen Relat Subj*. 1996; 361: 165–172.
34. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012; 9: 671–675. PMID: [22930834](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22930834/)
35. Tarazona S, García F, Ferrer A, Dopazo J, Conesa A. NOISeq: a RNA-seq differential expression method robust for sequencing depth biases. *EMBnet.journal*. 2012; 17: 18.

Escargot modulates peripodial membrane development and it is central for normal labial and antennal imaginal disc development.

Fernando Rosales-Bravo¹, Iván Sanchez-Díaz², Verónica Narvaez-Padilla¹, Enrique Reynaud².

1.- Centro de Investigación en Dinámica Celular. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

2.-Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Abstract

In insects, imaginal discs become adult structures. Their development is an excellent model to study morphogenesis. Imaginal discs are formed by two epithelial layers, the lower disc proper columnar epithelium and the upper peripodial squamous epithelium (also known as peripodial membrane). During morphogenesis and metamorphosis there is a complex crosstalk between these two epithelia that defines the final size and form of the adult organs. In this work we found that in *Drosophila melanogaster*, the dosage of the transcriptional factor Escargot (Esg) regulates the extension of the peripodial epithelium in labial and antennal discs. A reduction in Esg expands the peripodial domain at the expense of the disc proper distorting the anteroposterior compartments, making their boundaries ambiguous, causing loss or malformations of the proboscis, and loss, malformations or duplications of antennae and maxillary palps.

Introduction

Adult *Drosophila* structures are derived from clusters of imaginal cells that are specified and determined in the embryo. There are two type of imaginal cells, the imaginal discs and the histoblasts. Histoblasts are nests of larval abdominal cells that are precursors of the fly abdomen, and do not proliferate until metamorphosis. The imaginal discs arise from imaginal cells that invaginate from the embryonic epithelium and become two layered epithelial sacks during larval development. The pattern of these structures is molecularly defined early in development. Imaginal discs proliferate extensively during larval development (Sprey, T.E., Oldenhave, 1974; Haynie and Bryant, 1986). During metamorphosis, imaginal discs evert and differentiate to form the adult appendages and head and thorax epidermis. Imaginal discs are formed by two epithelial layers: the lower disc proper (DP), a columnar epithelium that develops into the principal adult structures, and the upper peripodial squamous epithelium (also known as peripodial membrane) that gives rise mostly to the integumentary cuticle of the adult body wall, being specially important where adjacent discs will suture (Agnès, Suzanne and Noselli, 1999). It has been shown, at least in wing discs, that the PE is a third developmental field that has different genetic requirement and it is defined during early development and that the PE field is different from the wing's and notum's (Baena-Lopez, 2003). In addition, short narrow cells at the border between the DP and the peripodial epithelium (PE) are called cuboidal margin cells. The role of the PE has been studied mainly in leg, wing and eye imaginal discs, however, its role in the development of the antenna and proboscis is little known. In the discs where it has been studied, the PE is needed for disc eversion and to control cell proliferation by sending signals to the DP (Milner, Bleasby and Pyott, 1983; Milner, Bleasby and Kelly, 1984). The PE is also important for the establishment and maintenance of disc developmental compartments (Gibson and Schubiger, 2000). It has also been shown that the PE secretes exoskeleton cuticle (Milner, Bleasby and Pyott, 1983; Mikołajczyk *et al.*, 1995). During development, the PE communicates with the DP affecting its morphogenesis through direct contact between apposed cells or by transluminal extensions (Cho *et al.*, 2000; Gibson and Schubiger, 2000; Gibson, Lehman and Schubiger, 2002; Pallavi and Shashidhara, 2003; Lim and Choi, 2004). The PE has molecularly defined, lineage restricted compartments and it contributes with cells to the DP. In some imaginal discs, such as the wing and leg, cuboidal cells are derived from both the DP and the PE, while in the eye they are derived only from the PE. This difference in cell lineage contribution makes each disc and its development different, thus stressing the fundamental

developmental principle that underlying cellular and molecular processes are commonly used but tissue specific peculiarities define the final morphology or identity of each structure. The cuboidal cells of the eye disc signal the margin cells of the DP determining dorso-ventral axis specification controlling proliferation, growth, and initiation of differentiation (Bras-Pereira, Bessa and Casares, 2006). Cuboidal marginal cells are also an important source of signals regulating the planar polarity of the eye disc, and mediate omatidial rotation at the dorso/ventral axis through the Wg signaling pathway (Lim and Choi, 2004). Several head structures are directly derived from the eye-antennal lateral PE: the second antennal segment, the vibrissae, the maxillary palps, the fons, and the gena (the part of the head to which the jaws are attached) (Bessa and Casares, 2005; Stultz *et al.*, 2006; Lee, Stultz and Hursh, 2007). During early larval development, the major signaling molecules controlling development of the eye-antennal disc are Hedgehog (Hh), Decapentaplegic (Dpp), and Wingless (Wg) which are expressed in the PE but not in the DP (Cho *et al.*, 2000). In third instar larvae, the expression of these proteins changes and becomes restricted to the DP. The mechanisms that establish the dynamic and asymmetric patterns of these signaling molecules are yet to be described but it is known that the asymmetric expression of Hh, Wg, and Dpp in the PE during the second instar refines Delta (DI) and Serrate (Ser) expression patterns establishing the disc's D/V boundary (Cho *et al.*, 2000). Alterations in Dpp regulation affect the development of ventral head structures as it was revealed by the identification of the *Dpp^{s-hc}* allele which has a mutation in its 5' eye-antennal enhancer (Stultz *et al.*, 2006). This evidence clearly shows that the interactions between the PE and the DP are critical for the correct patterning and development of the adult structures that emerge during metamorphosis.

The gene *escargot* (*esg*) codes for a transcription factor of the *snail* family. It has five Zn²⁺-finger DNA-binding domains that binds to its consensus sequence 5'-A/GCAGGTG-3' and two P-DLS-R/K motifs that recruit the dCtBP co-repressor, therefore it can activate or repress gene expression depending on the cellular context (Ashraf *et al.*, 1999; Ashraf and Ip, 2001; Cai, Chia and Yang, 2001). It is expressed in all imaginal discs and histoblasts where it has been shown that it is needed for maintaining diploidy and stemness. *Esg* loss of function in histoblasts promotes premature cell differentiation affecting cuticle development (Hayashi *et al.*, 1993; Fuse, Hirose and Hayashi, 1994). *Esg* positively regulates *DE*-cadherin expression mediating cell adhesion, motility, survival and differentiation (Tanaka-Matakatsu, Tadashi Uemura, *et al.*, 1996). Depending on their nature, *esg* alleles have a variety of phenotypes that include deletions of tergites and sternites, held out wings, twisted legs, reduced eyes, and null mutants are homozygous lethal.

We have previously reported and characterized a P{GaWB} insertion line (*esg^{L4}*) that knocks-out *esg* expression. As expected, *esg^{L4}* is homozygous lethal while the heterozygous mutant has half of the normal gene dosage. Its GAL4 expression pattern is consistent with previous literature. This driver expresses GAL4 in the embryonic ectoderm and histoblasts; larval leg, wing and eye-antennal imaginal discs, brain, spiracles and tracheae; adult intestinal stem cells, malpighian tubules, testis and salivary glands. Importantly, we found that *esg* is also expressed in the labial imaginal disc (Sanchez-Díaz *et al.*, 2015).

In the present work we found that lowering the dosage of *Esg* using RNAi against *esg* (*esg*-RNAi) driven either by *esg^{L4}* or by a PE-specific driver, causes abnormalities mainly in the adult antennae maxillary palps and proboscis. These abnormalities are dose dependent; their range of phenotypes goes from the complete loss of the proboscis and antenna to structure duplications. We demonstrate that *esg* is expressed in the PE of the antennal disc, and its expression domain also includes the epithelium of the base of the labial disc which is likely to be part of the precursors of the gena. Correct *esg* expression is necessary for the normal development of the antennal and labial discs. When *Esg* dosage is reduced, the PE expands over the DP altering the expression domains of *cubitus interruptus* (*ci*) and *engrailed* (*en*) and lowers *DE*-cadherin, inducing an alteration of the developmental compartments and structure malformations.

Results

***esg* loss of function induces defective development of antennae and proboscis.**

Since head structures are derived from the eye-antennal and the labial discs, and there is strong *esg* expression in these discs, we decided to investigate the role *esg* in their development. The homozygous *esg^{L4}* line is lethal while the heterozygous expresses half the normal *esg* dosage being viable and fertile with no defects in external head structures (**Fig. 1C**). We used different *UAS-esg-RNAi* construct lines driven by *esg^{L4}* to generate even lower *esg* gene dosages. **Fig. 1A** shows the genomic insertion of *esg^{L4}* and the targets for the different RNAis used. The different RNAi lines used induced partial or total loss the antennae, maxillary palps and proboscis (**Table 1**). The *esg^{L4}>esg-RNAi(28514)* genotype (**Fig. 1D**) had the lowest penetrance having only partial proboscis defects without any damage to the antennae. The *esg^{L4}>esg-RNAi(v9794)* genotype (**Fig. 1E**) showed defects in proboscis development that included the loss of one or two labella, completely deformed proboscis and in some cases there was total loss of the proboscis. Some individuals of this genotype presented antennal-segment and maxillary palp duplications. *esg^{L4}>esg-RNAi(v9793)* (**Fig. 1F**) produced viable and fertile individuals with total loss of the proboscis in all of them. Finally, *esg^{L4}>esg-RNAi(34063)* (**Fig. 1G**) has a lethal phenotype and only a few individuals develop to pupal stages and these could only be analyzed by dissection from the pupal case. Although *esg* is expressed in all imaginal discs, we found that the most affected structures were the head chemosensory organs: the antennae and the maxillary palps that are olfactory and the proboscis which is gustatory.

To further characterize the effect of *esg* loss of function we calculated the frequency of different phenotypes found in the *esg^{L4}>esg-RNAi(v9794)* organisms. We used this genotype because it has the whole range of abnormalities that appeared with all the other RNAi lines while being fertile and viable. **Fig. 2** shows examples of the deformities observed: proboscis loss (**2A**), antenna duplication (**2B**), antennae loss (**2C**), maxillary palp duplication and reduction (**2D**). The viability was severely reduced when incubated at 28°C degrees when compared with development at room temperature (**2F**). As there was a wide range of phenotypes, we classified them by the affected organ according to their function (gustatory, olfactory or both). At room temperature, we found that 72% of individuals had defects on the proboscis (gustatory); 10% had defects on the antennae and/or maxillary palps (olfactory); and 18% had defects on both, proboscis and maxillary palps and/or antennae. In this genotype there were no individuals that had normal organs. At 28°C, there were only 8 individuals that survived to adulthood, 6 of them had gustatory defects and 2 with both gustatory and olfactory defects (**Table 2**).

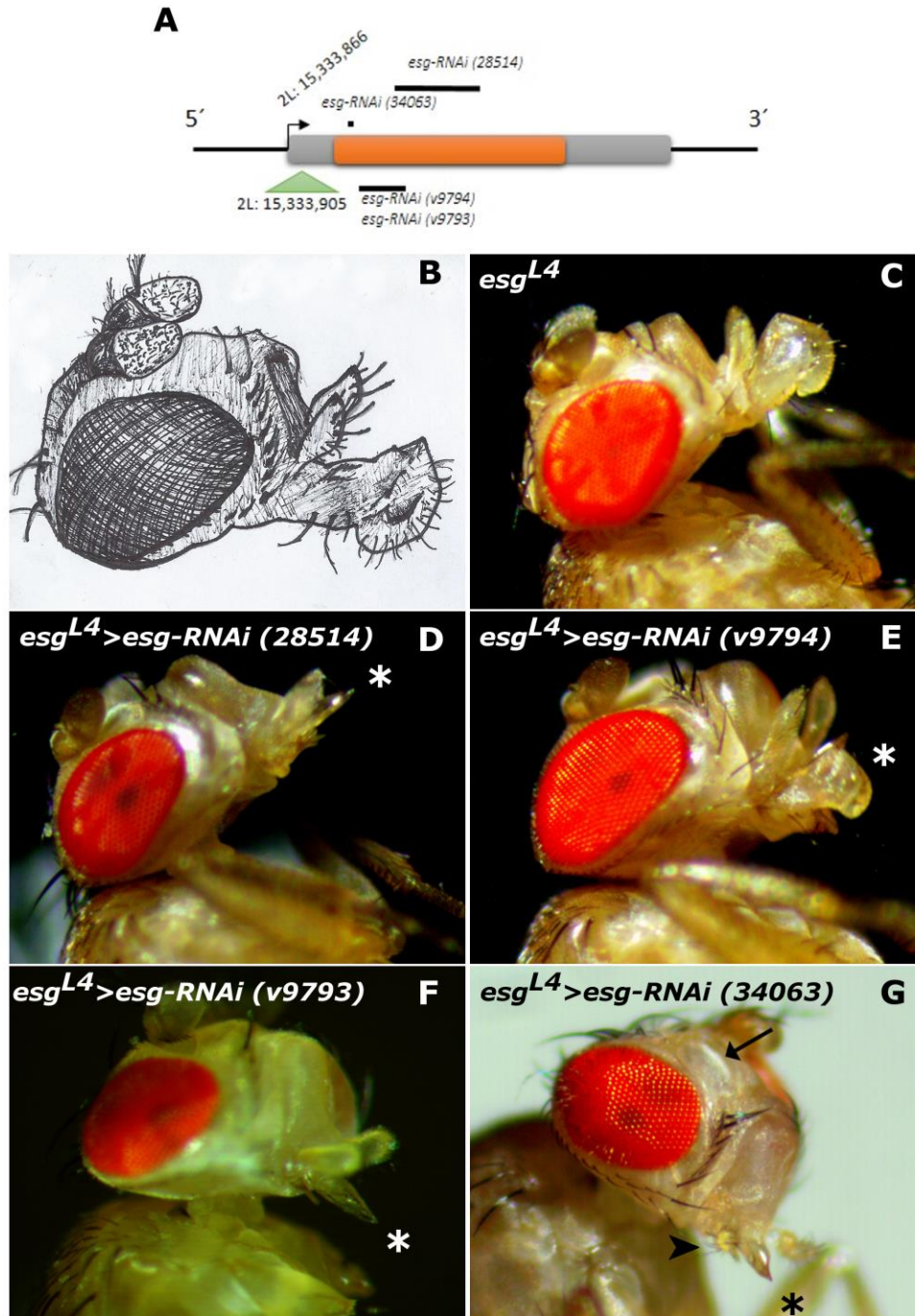


Fig. 1. Phenotypes of the developmental defects in head structures induced by different RNAis targeting *esg*. **A)** Schematic representation of *esg* genomic region showing the insertion site of the P{GaWB} element (*esg*^{L4}) and the location of the targets of the RNAis used. **B)** Schematic representation of the wt *Drosophila* head structures affected by the RNAis. **C-G)** Allelic series showing proboscis damage caused by the different anti *esg* RNAis driven by *esg*^{L4}. **C)** *esg*^{L4} (control) shows fully developed proboscis and antennae. **D)** *esg*^{L4}>*esg-RNAi*(28514) presents partial proboscis damage but no antennal defects. **E)** *esg*^{L4}>*esg-RNAi*(v9794) all individuals present partial proboscis and antennal damage; in this example a single labellum is affected. **F)**

esg^{L4}>esg-RNAi(v9793) all individuals present complete loss of the proboscis from its base, only the labrum persists. **G)** *esg^{L4}>esg-RNAi(34063)* has a lethal phenotype and only a few individuals develop to pupal stages that could be analyzed by dissection; this genotype presents loss of antennae and complete loss of the proboscis from its base, only the labrum persists. Asterisks mark proboscis damage. Arrowhead points to defective maxillary palps.

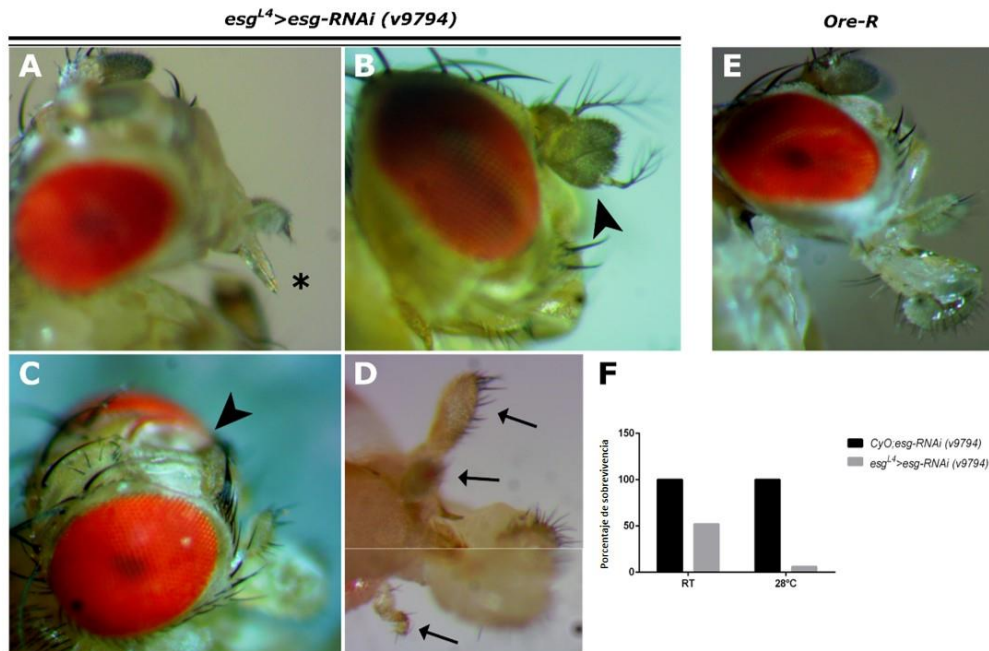


Fig. 2.-Range of chemosensory organs defects in flies expressing *esg-RNAi*. (A-D) Different individuals showing the diversity of phenotypes found in *esg^{L4}>esg-RNAi(v9794)*. **A)** Proboscis loss. **B)** Antennae duplication. **C)** Antennae loss. **D)** Shows an extreme phenotypes where one individual has a duplication of the maxillary palp on one side and reduction of the maxillary palp on the other side (arrows), the panel is divided because it was impossible to focus both sides simultaneously. **E)** Normal chemosensory organs of a wt fly (*Ore-R*). **F)** Viability as a function of temperature. Phenotype incidence (table) in organs classified by their function (gustatory, olfactory or both) at two different temperatures.

Defects induced by *esg* RNAi on head chemosensory organs are not caused by an increase in cell death

Mutations in *dpp* cause similar defects in the maxillary palps to the ones observed in this work. Loss of *dpp* in the PE induces apoptosis in the DP (Stultz *et al.*, 2006). In order to find out if the defects we observed in the *esg* hypomorphic mutant lines were caused by increased cell death during development, we performed TUNEL assay on third instar larvae eye-antenna and labial imaginal discs (**Fig. 3**). In labial discs of wt and *esg^{L4}* and *esg^{L4}>esg-RNAi(v9794)* lines there was no significant differences in the number of TUNEL positive cells. On the eye-antenna disc, there were more dying cells in the *esg^{L4}* and *esg^{L4}>esg-RNAi(v9794)* in comparison with the control line, however there was no significant difference between *esg^{L4}* and *esg^{L4}>esg-RNAi(v9794)*. As the latter always shows some type of head structure defects and *esg^{L4}* never presents this type of malformations, we concluded that it is not likely that cell death accounts for the phenotypes observed.

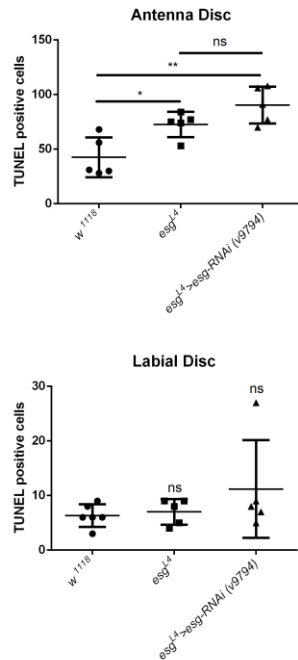


Fig. 3: Cell death is not the cause of head structures defects. A and B) Number of TUNEL positive cells in labial and antennal discs.

***esg* is expressed in the peripodial epithelium of the eye-antennal discs and in the base of the labial disc**

Given the fact that structures disappear when *esg*-RNAs are expressed, we decided to characterize the expression pattern of *esg^{L4}* and evaluate if this pattern was altered. The *mCD8::GFP* expression domain expands whenever any *esg*-RNAi is expressed. As an example of this phenotype the *esg^{L4}>esg-RNAi(v34063)/UAS-mCD8::GFP* line was used (**Fig. 4**). We found that when the UAS-RNAi is expressed together with UAS-*mCD8::GFP* using *esg^{L4}* the number of cells expressing GFP in the embryo augments (**Fig. 4 A and B**). When *esg^{L4}* labial imaginal discs express *mCD8::GFP* the base of the disc and the perimandibular region are labeled. When the *Esg* levels are rescued using *esg^{L4}>P{EP}*esg** the labial disc appears to be slightly larger and the region that expresses GFP becomes relatively smaller. Conversely, in *esg^{L4}>esg-RNAi(v34063)/UAS-mCD8::GFP* where the *Esg* levels are lower than in *esg^{L4}>UAS-mCD8::GFP* the disc is unrecognizable and in its place a large cluster of GFP positive cells is found. (**Fig. 4 C,D,E**).

In the eye-antenna disc loss of *esg* function causes that cells on the periphery of the disc expand towards its central region. Conversely, the over expression of *esg* reduces the expression domain of GFP positive cells (**Fig. 4 F-H**). The morphology of the GFP positive big-squamous cells strongly suggest that *esg* expression is mainly restricted to the PE the third instar eye-antenna disc and not in the DP (**Fig. 4 I,J**). Quantitative PCR of eye-antenna discs showed that reduced *esg* expression levels correlate with the expression of the RNAi and are restored to normal levels over expressing line (*esg^{L4}>P{EP}*esg**) (**Fig. 4 K**)

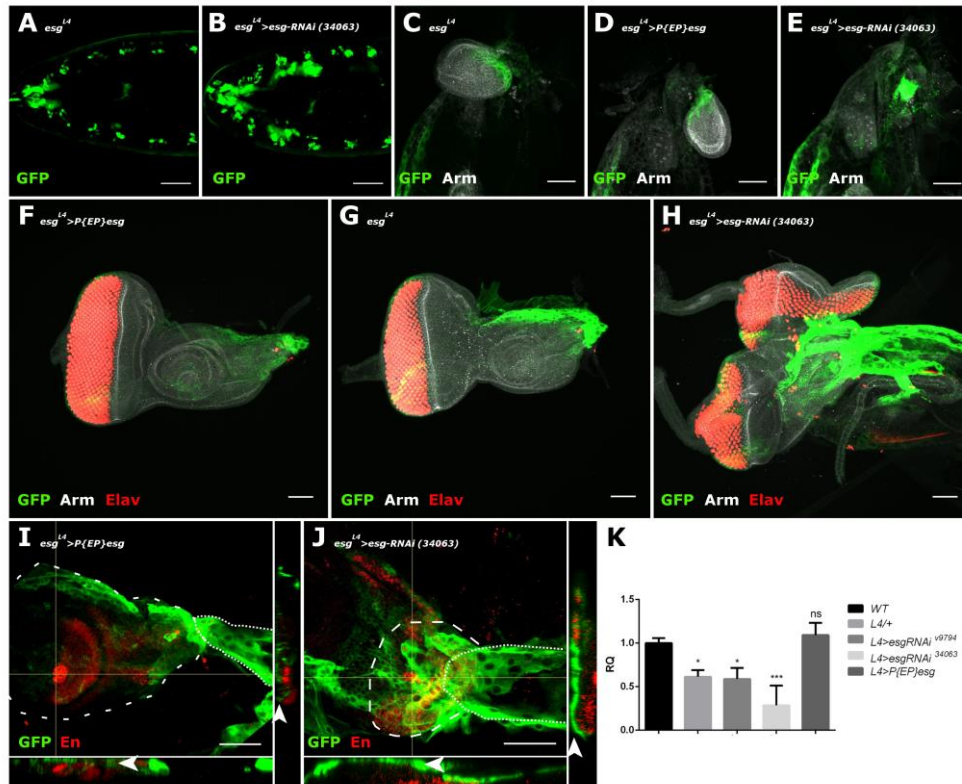


Fig. 4.- Expansion of the peripodial epithelium in *esg* loss of function. GFP expression driven by *esg* in lines with different level of *esg* expression. **A and B**) Embryonic *esg^{L4}* expression pattern without (**A**) and with RNAi (**B**). **C-E**) Mandibular region of the genotypes labeled. The area covered by the GFP positive cells increases with decreasing levels of *esg* expression. **C**) In the *esg^{L4}>P{EP}esg/UAS-mCD8::GFP* line, GFP positive cells of the base of the labial disc (arrows) and the perimandibular cells (arrowhead). **D**) In *esg^{L4}/UAS-mCD8::GFP* an increase in the area covered by GFP positive perimandibular cells can be observed. **E**) In *esg^{L4}>esg-RNAi(v34063)/UAS-mCD8::GFP* perimandibular cells are bigger and cover a greater area, the labial disc is completely lost and in its place a large cluster of GFP positive cells is found. **F-H**) Eye-antenna discs of the genotypes labeled. **F**) In the *esg^{L4}>P{EP}esg/UAS-mCD8::GFP* line rescued dosage of *esg* expression restricts GFP to the base of the disc and the peripodial membrane **G**) Half dosage of *esg* (*esg^{L4}/UAS-mCD8::GFP*) causes an expansion of the area where GFP is expressed. **H**) Approximately 25% Further reduction of *esg* dosage (*esg^{L4}>esg-RNAi(v34063)/UAS-mCD8::GFP*) extends the GFP expression domain covering and invading the antennal disc. **I-J**) Higher magnification of the peripodial membrane of the corresponding genotypes. **I**) Rescued *esg* organisms (*esg^{L4}>P{EP}esg/UAS-mCD8::GFP*) show GFP expression that is restricted to the peripodial epithelium of the antennal disc. **J**) GFP positive cells of an antenna disc with very low *esg* dosage (*esg^{L4}>esg-RNAi(v34063)/UAS-mCD8::GFP*), the antennal disc stalk is lost, the perimandibular cells invade the posterior part of the antennal disc. **K**) Quantitative PCR of *esg* expression levels in third instar larvae eye-antenna discs. Cellular markers in this confocal image have the following channels: green = GFP, grayscale = β -catenin and red = pan neural marker Elav.

Escargot is critical for peripodial epithelium development

In order to demonstrate that the phenotype observed is caused by *esg* loss of functions in the PE, we used a PE specific driver (*c311-GAL4*) to knockdown *esg* expression. The *c311-GAL4* driver directed the expression of GFP specifically to eye-antenna PE (**Fig. 5A**). These organisms are

normal (**Fig. 5B**). Knocking down *esg* expression with this driver induced a similar phenotype to the one observed when RNAis were driven by *esg^{L4}*. Expression of *esg-RNAi(v34063)* had a pupal lethal phenotype. Third instar larval imaginal discs from these animals had an expansion of the PE very similar to the one observed when this RNAi is driven by *esg^{L4}* (**Fig. 5C**). When the relatively mild *UAS-esg-RNAi(v9794)* was used, malformations in head structures such as antennal loss were observed (**Fig. 5D**). These results strongly suggest that *esg* is expressed in the PE of the antenna disc, and that it restricts the expansion of the PE over the DP.

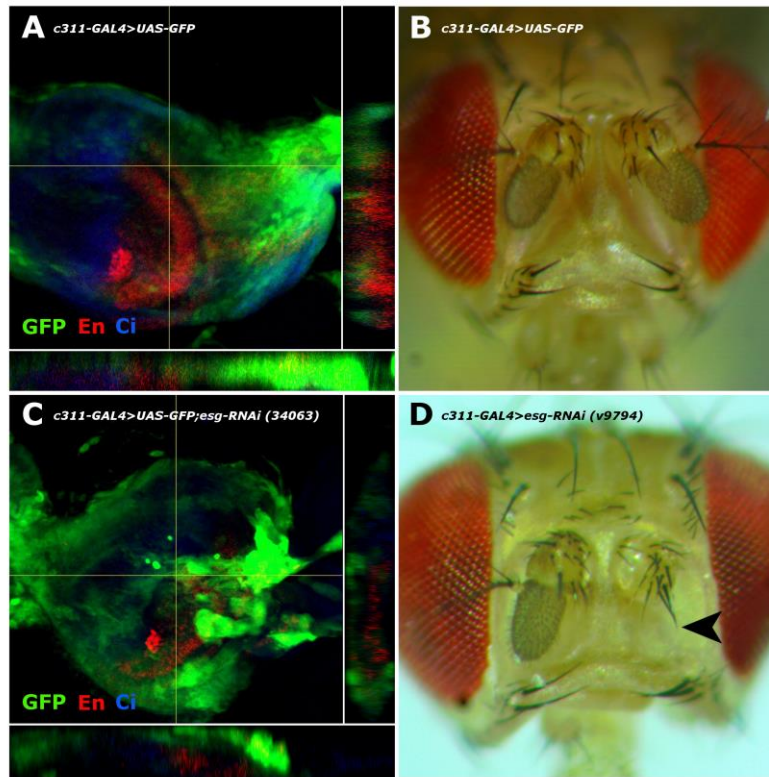


Fig. 5.- Specific *esg* knockdown in the peripodial epithelium produces head structures defects and expansion of the peripodial epithelium. A) Expression of GFP driven by *c311-GAL4*, GFP is only expressed in the PE as can be observed in transversal section insert. **B)** *c311-GAL4>GFP* has a wt adult phenotype. **C)** The PE expands over the DP when the *esg-RNAi(v34063)* is driven by *c311*, this genotype dies at pupal stages. **D)** Adult phenotype observed when the *UAS-esg-RNAi(v9794)* is driven by *c311-GAL4*, loss of the distal part of one of the antennae (arrowhead).

***esg* loss of function causes a reduction in *DE*-cadherin in labial and antennal imaginal discs**

It has been shown that during tracheal system development, *esg* is a positive regulator of *DE*-cadherin (Tanaka-Matakatsu, Tadashi Uemura, *et al.*, 1996). To determine if *Esg* is also a positive regulator of *DE*-cadherin in the imaginal discs, *DE*-cadherin expression pattern was observed in third instar labial and eye-antennal imaginal discs in normal and mutant *esg* genotypes. In controls, *DE*-cadherin signal can be observed in the periphery of each segment that will be part of the antenna and is also very prominent in the eye morphogenetic furrow and the developing ommatidia (**Fig. 6A**). In the control labial discs, *DE*-cadherin has a uniform expression all over the disc (**Fig. 6D**). RNAi expression clearly causes an alteration in disc morphology of the eye-antenna discs. They have lower *DE*-cadherin expression levels and its pattern becomes de-localized. In

some of the extreme examples the discs are very deformed or missing, and the morphogenetic furrow becomes discontinuous (**Fig. B** and **C**). In the labial imaginal discs, *DE*-cadherin expression is drastically reduced. In *esg^{L4}>esg-RNAi(v28514)* the labial discs are deformed and very little *DE*-cadherin can be detected. In *esg^{L4}>esg-RNAi(v34063)* *DE*-cadherin expression disappears and discs are missing thus explaining the high lethality observed when these larvae get to pupate (**Fig. 6 E-G**). These data demonstrate that *esg* is a positive regulator of *DE*-cadherin not only in tracheal cells but also in chemo-sensory organs. It is interesting to note that *DE*-cadherin signal disappears from the tight junctions of the periphery of the perimandibular cells that cover the mandible. Western blot analysis and its quantitation shows that *DE*-cadherin is strongly reduced when *esg*-RNAs are expressed, conversely *DE*-cadherin levels are rescued when the P{EP}*esg* is expressed (**Fig. H**).

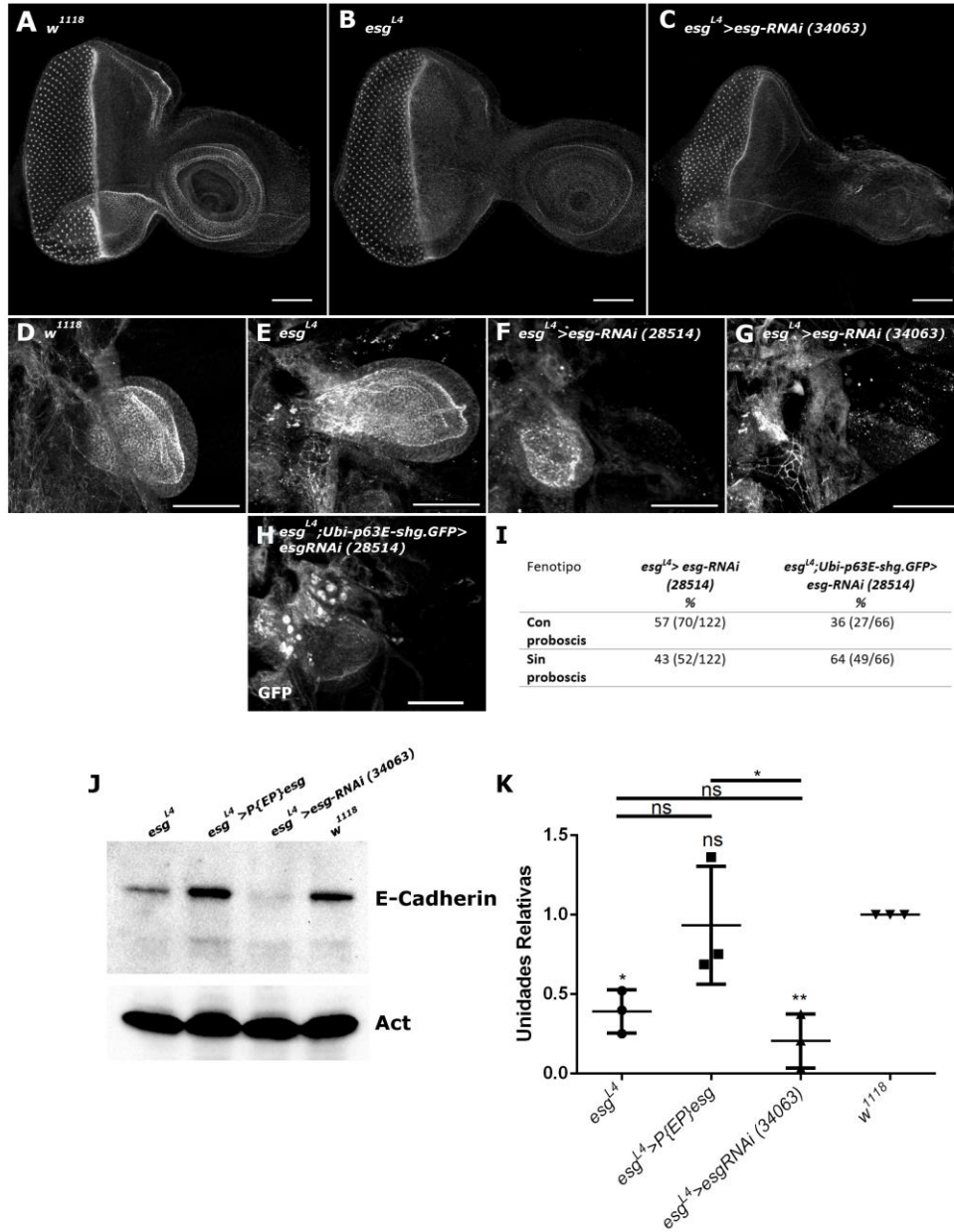


Fig. 6. Esg positively regulates DE-Cadherin. (A-C) *DE*-cadherin expression in eye-antenna imaginal disc. **A)** Control (w^{1118}) *DE*-cadherin is clearly expressed in the periphery of the precursors of the antennal segments. **B)** *esg^{L4}* show a slight decrease in the expression of *DE*-cadherin of the precursors of the antennal segments. **C)** *esg^{L4}>esg-RNAi(34063)*, in this genotype *DE*-cadherin expression is severely reduced and the eye-antenna imaginal disc is deformed. **D-G)** *DE*-cadherin expression in the labial imaginal disc of the corresponding genotypes. **D)** Control (w^{1118}), the labial disc are easily identified by the of *DE*-cadherin (Arrows), the periphery of the perimandibular cells are clearly delimited (arrowheads). **E)** In *esg^{L4}*, the labial disc can also be easily identified by *DE*-cadherin expression (arrows), the perimandibular cells are still clearly delimited (arrowheads) **F)** The size of the labial disc is greatly reduced when the RNAi *esg-(281514)* is expressed; *DE*-cadherin of the perimandibular cells is lost. **G)** When *esg-RNAi(34063)* is expressed, labial imaginal disc are completely loss, *DE*-cadherin labeling is generally reduced. **H)** Western-blot of the corresponding genotypes. Note that *De*-cadherin expression is lower in *esg^{L4}* and practically disappears when the RNAi is expressed.

Developmental compartments become disorganized when there is *esg* loss of function.

Low dosage *esg* only induced PE expansion in the eye-antenna and labial discs. There was no observable expansion in the leg and wing discs and in our hands we did not observed malformations in these organs. Since the PE is an important source of morphogenetic signals and the PE expansion correlates with developmental defects in head structures, we decided to observe if there was a change in the expression domains of genes that mark DP developmental compartments. As an anterior compartment marker we used an antibody against *Cubitus interruptus* (Ci) and for the posterior compartment we used an antibody against Engrailed(**Fig. 7**). In the heterozygous *esg^{L4}* background there no external defects are observed and the antero-posterior compartments of the antennal disc are well defined; this can also be observed in the wing disc. When the *esg-RNAi*s are expressed, the antero-posterior compartments of the wing and eye discs remain well defined whereas in the antennal disc the antero-posterior domains become disorganized. The disorganization of these compartments was variable and this is consistent with the phenotypical diversity that we observed in adult individuals of these genotypes. In some extreme cases we found duplicated *en* domains that may explain the apparition of duplicated antenna in adults. Importantly when *esg* gene dosage is restored in a *esg^{L4}>P{EP}esg* background the *esg-RNAi* effect is reversed.

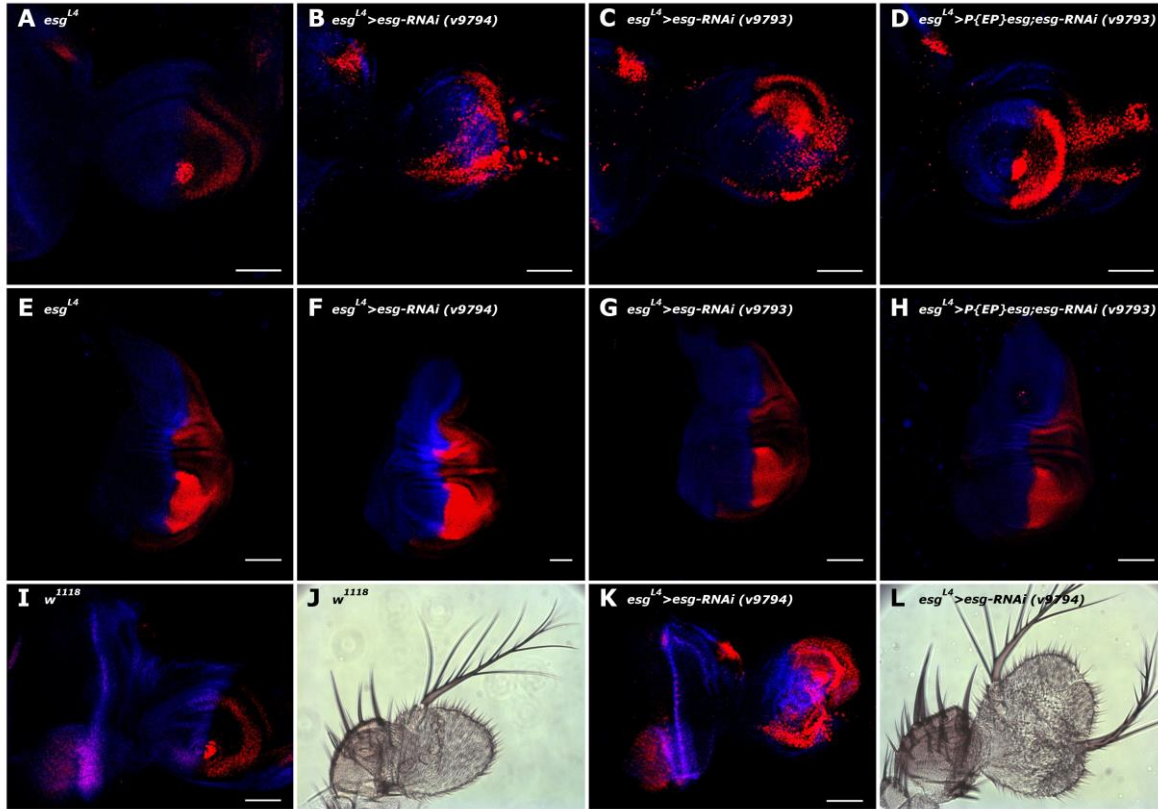


Fig. 7.- Antero-posterior (AP) domains are distorted when *esg* is knocked down. Immunolocalization of posterior domain marker, Engrailed (red) and anterior domain marker, Cubitus interruptus (blue) in third instar larvae antenna discs (upper panels) and wing discs (middle panels) of the corresponding genotypes. Half *esg* dosage (*esg^{L4}*) does not have an apparent adult phenotype and the AP domains are well defined in both antenna and wing discs. When the *esg-RNAis* are used (v9794 and v9793) adult head structures are consistently affected and the AP domains become disorganized only in the antenna discs. Restoring *esg* dosage with a *P{EP}esg* while expressing the RNAis rescues the AP compartmentalization. In the wing discs there is no effect regardless of the genotype. Some individuals presented duplication of the En domain, which could explain the apparition of duplicated antennae in adults (lower panels).

Decapentaplegic knock down in the peripodial epithelium phenocopies *esg* loss of function.

To our knowledge, the only gene whose mutations produce duplications or loss of the maxillary palps is Decapentaplegic (*dpp*). *dpp* is critical for imaginal disc compartmentalization, it is expressed in the PE of the eye-antennal disc and *dpp* de-regulation generates defects of adult head structures (Stultz *et al.*, 2006). When we drive the expression of the *dpp-RNAi* using the *esg^{L4}* driver we only observe defects in the labelum but not in the antenna. These results suggest that even though misexpression of *dpp* and *esg* have similar phenotypes there is no early integration of these different developmental pathways in the antenna, however our data suggest that they eventually converge late in development. Lowering of *dpp* in the same tissues where *esg* is expressed causes the loss of the proboscis thus implicating for the first time *esg* and *dpp* in proboscis development and that there is probably a crosstalk between these two pathways.

It is clear that imaginal discs are compartmentalized in an anteroposterior fashion and that each of these compartments have a characteristic genetic barcoding that defines its final structure.

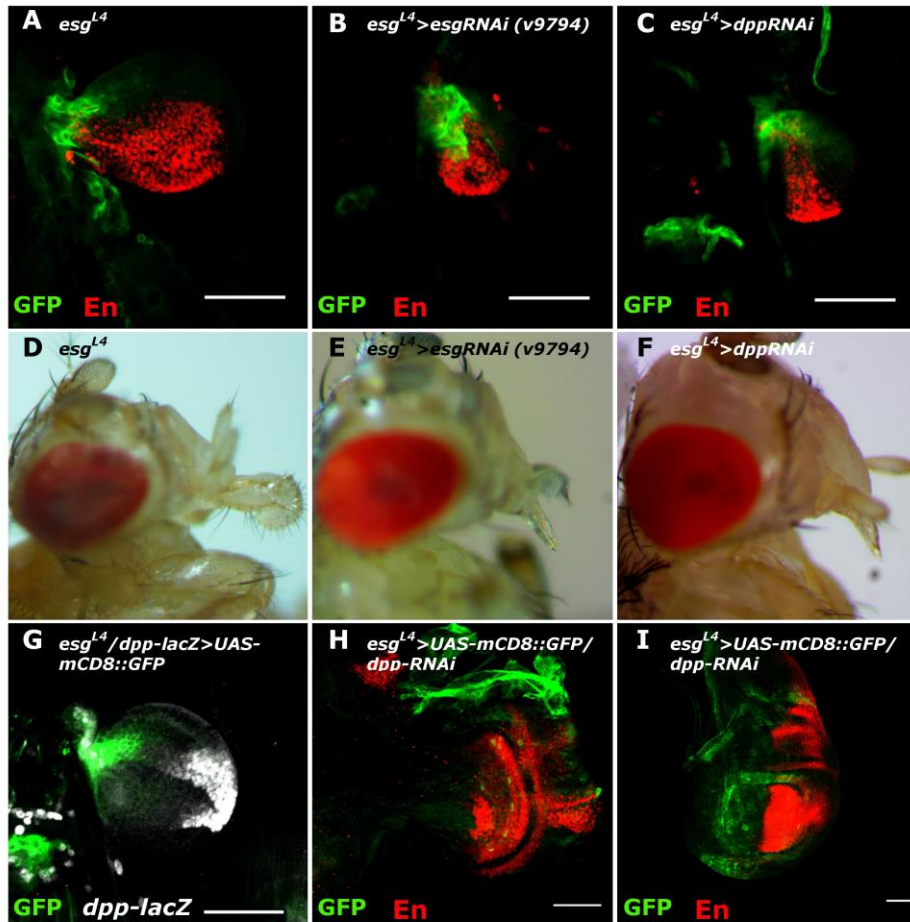


Fig. 8.- Downregulation of *dpp* in the *esg* domain induces proboscis loss.

A, C and E) immunofluorescence against GFP (green) expression driven by *esg^{L4}* and endogenous Engrailed (red) of third instar labial imaginal discs of the corresponding genotypes. **B,D and F)** Adult phenotypes of the same genotypes. **A)** GFP expression driven by *esg^{L4}* in the perimandibular cells and PE of the labial disc. There no obvious phenotype in any head structure **(B).** **C)** RNAi against *esg* expression using this driver causes the expansion of the perimandibular cells and the PE over the DP of the labial disc. Los of proboscis can be observed **(D).** **E)** The same expansion of the perimandibular cells and the PE can be observed when *dpp* is downregulated. Similar loss of the proboscis can be observed, however antennae and maxillary palps are normal **(F).** **G)** β -Galactosidase (grayscale) and GFP (green) expression in the *esg^{L4}>UAS-GFP; dpp-LacZ*. Both *dpp* and *esg* are expressed in the labial discs, their domains overlap but are not identical. **H)** Antenna and wing discs where the RNAi against *dpp* is driven by *esg^{L4}*. Neither disc presents alterations in their Engrailed domain thus explaining the lack phenotypes in antennae and maxillary palps.

Discussion

The transcriptional factor *esg* is involved in many important developmental processes that affect a wide variety of tissues. Cell differentiation and destiny is profoundly influenced by *esg* levels. Different *esg* levels alter tissue development and have a variety of phenotypes. We have previously shown that half genetic dosage of *esg* causes nicotine sensitivity but has no external phenotypes. Further lowering of *esg* dosage has increasing penetrant phenotypes that can be observed in adult structures while null mutants are lethal. In this work we found that *esg* function is important in antennal and labial disc development. The developmental defects in the antennae and proboscis become more penetrant as *esg* dosage becomes smaller; the phenotype range goes from reduced or malformed to missing or duplicated structures. We also demonstrated that these malformations are caused by an expansion of the PE at the expense of the DP. Lowering *esg* dosages expands the PE and alters morphogenetic signaling and compartmentalization. The role of *esg* in these phenotypes is confirmed by the fact that they can be suppressed by counter acting the effect of RNAis by recovering expression of this transcription factor with a *P{EP}esg*. It also known that *DE-cadherin* is an *Esg* target and that this cell adhesion protein becomes down regulated in labial and antennal discs in genotypes with low *Esg* levels. The loss of cell adhesion can induce cell death (anoikis) however, our results does not support this possible explanation for the phenotypes found. It is more likely that lack of *DE-cadherin* is altering cell to cell signaling thus determination and differentiation of the DP as the antennal PE expands and invades the antennal DP and the perimandibular tissue invades the labial disc. Previous works have shown that lower levels of *DE-cadherin* have phenotypes with variable expressivity that include: abnormalities in proliferation and morphogenetic movements, loss of epithelial structures and loss of cell polarity (Wang *et al.*, 2004). It is well documented that loss of cell adhesivity promotes invasivity and cell proliferation and that repression of E-cadherin reduces cell adhesion and promotes tissue invasivity (Conacci-Sorrell *et al.*, 2003). It has also been reported that *esg* regulates cell motility, probably by actin-based motility, independently of its function to regulate cell adhesion (Tanaka-Matakatsu, T Uemura, *et al.*, 1996). The crosstalk between the early PE and the DP determines the developmental compartments in the second and third instar larvae. Our work shows that the expansion of the PE disrupts correct signaling between these two epithelia causing a distortion of the normal morphogenetic fields as it can be observed by the loss of the imaginal anterior compartment marker *Ci* in the antennae.

To our knowledge there are no reported mutants that have a complete proboscis loss other than *esg*. The only other gene whose mutations affect the maxillary palps in a similar way as *esg* does is *dpp*. Interestingly, lowering *dpp* in the *esg^{L4}* expression domains causes no effect on the antennae or maxillary palps. The failure to phenocopy *dpp* mutations that affect the maxillary palps when *esg^{L4}* drives the expression of the *dpp* RNAi, implies that in these tissues *esg* is probably not expressed in the same domains as *dpp*. Importantly, reduction of *dpp* by *esg^{L4}* caused total loss of the proboscis suggesting for the first time an important interaction of *esg* and *dpp* that is specific for the labial disc.

The most affected structures by *esg* reduction were the antennae, maxillary palp, and proboscis which are the main *Drosophila* chemosensory organs. We have previously shown that *esg^{L4}* was affected in chemosensory perception; together with the stronger phenotypes found in this work, this suggest that *esg* function is critical for chemosensory organ determination and development.

Materials and methods

Stocks and crosses

Flies were raised on standard yeast medium at 25°C or 28°C. *Oregon-R* and *w¹¹¹⁸* strains were obtained from the *Drosophila* stock center in Bloomington, Indiana. *L4* (*w¹¹¹⁸*; *P{GawB-GAL4. esg^{L4}*) was obtained in our laboratory by mobilization of P-element *P{GawB}*. UAS-iRNA *esg*

(Bloomington Stock # 34063), all other lines used in this work are available at the Bloomington Drosophila Stock Center (NIH P40OD018537).

Immunohistochemistry

Tissue was dissected in PBS and fixed in PBS 4% formaldehyde and permeabilized with 0.2% TritonX-100 and blocked for 30 min with 5% goat pre-immune serum at room temperature. The primary antibodies were added in permeabilization buffer (see antibodies and concentrations below), incubated overnight at 4°C and washed 3 times in PBS 0.2% TritonX-100 at room temperature. The secondary antibodies were added, incubated for 90 min, and washed 3 times in PBS 0.2% TritonX-100 at room temperature. Antibodies used: Samples were mounted in Citifluor (Ted Pella Inc).

Confocal Imaging

Images were collected at the “Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA)” in an inverted Confocal multiphotonic Olympus FV1000, using optimal confocal pinhole. Images were analyzed and reconstructed using the open source ImageJ program (Schneider, Rasband and Eliceiri, 2012).

TUNEL cell death detection

Cell death was labeled using the In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche). Imaginal discs were dissected in PBS, fixed in PBS 4% paraformaldehyde for 1hr at 4°C, washed three time in PBST (PBS supplemented with 0.1% Triton X-100). Discs were blocked in PBST with 5% pre-immune goat serum for 12 hours at 4°C and transferred to permeabilization solution (0.1% Sodium citrate, 0.1% Triton X-100) at room temperature then followed the manufacturer's instructions. Labeled were imaged using confocal microscopy. Signal was quantified using imageJ's analyze particle tool.

Quantitative PCR

qPCR reactions were performed using the universal TaqMan® PCR master mix (Applied Biosystems) according to manufacturer instructions. However, the reactions were scaled down to a volume of 14 µl. The TaqMan® probe was used at a final concentration of 25 nM, and 1 µl of a 1:20 dilution of the cDNA reaction was used for the detection. The TaqMan probe for *esg* used 5'-/56FAM/TTCTTGATGTCCGAGTGGGTCTGC/36-TAMSp/-31 that flanked by the primers 5'-TGCAGATCGCTCGAATCTGC-3' and 5'-AGCAACTGGTGCAGGAGTAC-3'. The following PCR conditions were used: 95 °C for 5 min, 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 59 °C for 1 min. Poner temperaturas correctas.

Western blots

References

- Agnès, F., Suzanne, M. and Noselli, S. (1999) 'The Drosophila JNK pathway controls the morphogenesis of imaginal discs during metamorphosis.', *Development (Cambridge, England)*, 126(23), pp. 5453–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10556069>.
- Ashraf, S. I. *et al.* (1999) 'The mesoderm determinant snail collaborates with related zinc-finger proteins to control Drosophila neurogenesis.', *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 18(22), pp. 6426–38. doi: 10.1093/emboj/18.22.6426.
- Ashraf, S. I. and Ip, Y. T. (2001) 'The Snail protein family regulates neuroblast expression of *inscuteable* and *string*, genes involved in asymmetry and cell division in Drosophila.', *Development (Cambridge, England)*, 128(23), pp. 4757–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731456> (Accessed: 13 August 2019).
- Baena-Lopez, L. A. (2003) 'Wg and Egr signalling antagonise the development of the peripodial epithelium in Drosophila wing discs', *Development*, 130(26), pp. 6497–6506. doi: 10.1242/dev.00884.
- Bessa, J. and Casares, F. (2005) 'Restricted *teashirt* expression confers eye-specific responsiveness to Dpp and Wg signals during eye specification in Drosophila.', *Development (Cambridge, England)*. The Company of Biologists Ltd, 132(22), pp. 5011–20. doi: 10.1242/dev.02082.
- Bras-Pereira, C., Bessa, J. and Casares, F. (2006) 'Odd-skipped genes specify the signaling center that triggers retinogenesis in Drosophila', *Development*, 133(21), pp. 4145–4149. doi: 10.1242/dev.02593.
- Cai, Y., Chia, W. and Yang, X. (2001) 'A family of Snail-related zinc finger proteins regulates two distinct and parallel mechanisms that mediate Drosophila neuroblast asymmetric divisions', *The EMBO Journal*. European Molecular Biology Organization, 20(7), p. 1704. doi: 10.1093/EMBOJ/20.7.1704.
- Cho, K. O. *et al.* (2000) 'Novel signaling from the peripodial membrane is essential for eye disc patterning in Drosophila.', *Cell*. Elsevier, 103(2), pp. 331–42. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00124-0.
- Conacci-Sorrell, M. *et al.* (2003) 'Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: The roles of β -catenin signaling, Slug, and MAPK', *Journal of Cell Biology*, 163(4), pp. 847–857. doi: 10.1083/jcb.200308162.
- Fuse, N., Hirose, S. and Hayashi, S. (1994) 'Diploidy of Drosophila imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by *escargot*.', *Genes & Development*, 8(19), pp. 2270–2281. doi: 10.1101/gad.8.19.2270.
- Gibson, M. C., Lehman, D. A. and Schubiger, G. (2002) 'Luminal Transmission of Decapentaplegic in', *Developmental cell*, 3(3), pp. 451–460. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12361606> (Accessed: 30 July 2019).
- Gibson, M. C. and Schubiger, G. (2000) 'Peripodial cells regulate proliferation and patterning of Drosophila imaginal discs', *Cell*, 103(2), pp. 343–350. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00125-2.
- Hayashi, S. *et al.* (1993) 'Control of imaginal cell development by the *escargot* gene of Drosophila.', *Development (Cambridge, England)*, 118(1), pp. 105–115. doi: 10.1016/0168-9525(93)90004-2.
- Haynie, J. L. and Bryant, P. J. (1986) 'Development of the eye-antenna imaginal disc and morphogenesis of the adult head in Drosophila melanogaster', *Journal of Experimental Zoology*. John Wiley & Sons, Ltd, 237(3), pp. 293–308. doi: 10.1002/jez.1402370302.
- Lee, H., Stultz, B. G. and Hursh, D. A. (2007) 'The Zic family member, *odd-paired*, regulates the Drosophila BMP, *decapentaplegic*, during adult head development', *Development*, 134(7), pp. 1301–1310. doi: 10.1242/dev.02807.

- Lim, J. and Choi, K.-W. (2004) 'Drosophila eye disc margin is a center for organizing long-range planar polarity', *genesis*, 39(1), pp. 26–37. doi: 10.1002/gene.20022.
- Mikołajczyk, P. *et al.* (1995) 'Chitin synthesis in Spodoptera frugiperda wing imaginal discs. III: Role of the peripodial membrane', *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 28(2), pp. 173–187. doi: 10.1002/arch.940280207.
- Milner, M. J., Bleasby, A. J. and Kelly, S. L. (1984) 'The role of the peripodial membrane of leg and wing imaginal discs of *Drosophila melanogaster* during evagination and differentiation in vitro', *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*. Springer-Verlag, 193(3), pp. 180–186. doi: 10.1007/BF00848893.
- Milner, M. J., Bleasby, A. J. and Pyott, A. (1983) 'The role of the peripodial membrane in the morphogenesis of the eye-antennal disc of *Drosophila melanogaster*', *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*. Springer-Verlag, 192(3–4), pp. 164–170. doi: 10.1007/BF00848686.
- Pallavi, S. K. and Shashidhara, L. S. (2003) 'Egfr/Ras pathway mediates interactions between peripodial and disc proper cells in *Drosophila* wing discs', *Development*, 130(20), pp. 4931–4941. doi: 10.1242/dev.00719.
- Sanchez-Díaz, I. *et al.* (2015) 'The Esg Gene Is Involved in Nicotine Sensitivity in *Drosophila melanogaster*', *PLOS ONE*. Edited by G. Roman. Public Library of Science, 10(7), p. e0133956. doi: 10.1371/journal.pone.0133956.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W. (2012) 'NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis', *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 9(7), pp. 671–675. doi: 10.1038/nmeth.2089.
- Sprey, T.E., Oldenhave, M. (1974) 'A detailed organ map of the wing disk of *Calliphora erythrocephala*.' *Netherlands Journal of Zoology*, 24(3), pp. 291–310.
- Stultz, B. G. *et al.* (2006) 'Decapentaplegic head capsule mutations disrupt novel peripodial expression controlling the morphogenesis of the *Drosophila* ventral head', *Developmental Biology*. Academic Press, 296(2), pp. 329–339. doi: 10.1016/J.YDBIO.2006.05.034.
- Tanaka-Matakatsu, M., Uemura, Tadashi, *et al.* (1996) 'Cadherin-mediated cell adhesion and cell motility in *Drosophila* trachea regulated by the transcription factor Escargot.', *Development*, 122(12), pp. 3697–3705.
- Tanaka-Matakatsu, M., Uemura, T, *et al.* (1996) 'Cadherin-mediated cell adhesion and cell motility in *Drosophila* trachea regulated by the transcription factor Escargot.', *Development (Cambridge, England)*, 122(12), pp. 3697–705.
- Wang, F. *et al.* (2004) 'The role of DE-cadherin during cellularization, germ layer formation and early neurogenesis in the *Drosophila* embryo', *Developmental Biology*. Academic Press, 270(2), pp. 350–363. doi: 10.1016/J.YDBIO.2004.03.002.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Coordinación de Programas Educativos

Posgrado en Ciencias



DR. VICTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada "Participación del gen *escargot* en el desarrollo y funcionamiento de los órganos quimiosensoriales en *Drosophila melanogaster*" que presenta el alumno **Fernando Rosales Bravo (5620120701)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles IBT-UNAM		
Dr. Ramón Gonzalez García-Conde CIDC-UAEM		
Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia FM-UAEM		
Dr. Enrique Salas Vidal IBT-UNAM		
Dra. Viviana del Carmen Valadez Graham IBT-UNAM		
Dra. Verónica Narváez Padilla CIDC-UAEM		
Dra. Denhi Schnabel Peraza IBT-UNAM		