



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**EVALUACIÓN DE UN SENSOR DE HIPOXIA EN EL CONTROL DE LA
PROLIFERACIÓN DEL NEUROEPITELIO DURANTE EL DESARROLLO POST
EMBRIONARIO DE *Drosophila melanogaster***

por

Mariel ROSAS AIDA

TESIS DE GRADO presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de Doctor en
Ciencias Veterinarias
Orientación: Higiene, Inspección, Control
y Tecnología de los Alimentos de Origen Animal

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2023**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada por:



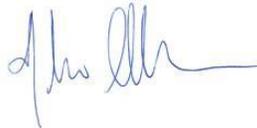
Presidente de mesa: _____
Dra. María José Ferreiro



Segundo miembro (Tutor): _____
Dr. Daniel Prieto



Tercer miembro (Co-tutor): _____
Dr. Alejandro Bielli



Cuarto miembro: _____
Dr. Aldo Calliari

Fecha: _____ 14 de junio de 2023 _____



Autora: _____
Mariel Rosas Aida

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia y amigos por tantos años de apoyo incondicional durante toda la carrera.

A mi tutor el Dr. Daniel Prieto por la gran dedicación y paciencia que tuvo tanto a lo largo del ensayo experimental como en todo el transcurso de la escritura de la tesis.

A todo el equipo de trabajo del Departamento de Biología del Neurodesarrollo del IIBCE que tan bien me recibieron en su grupo y compartimos tan lindos momentos juntos, Dr. Rafael Cantera, Dra. María José Ferreiro, Mag. Cristina Parada, Dr. Flavio Pazos y Lic. Constanza Silvera.

A mi co-tutor, Dr. Alejandro Bielli, por su tiempo para la revisión de la tesis.

A Facultad de Veterinaria y a todos sus docentes por haber sido parte de mi camino universitario.

TABLA DE CONTENIDO

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	5
1. RESUMEN	6
2. SUMMARY	7
3. INTRODUCCIÓN	8
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
4.1. Oxígeno e hipoxia	10
4.2. La mosca de la fruta <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio.....	11
4.3. Anatomía del sistema nervioso de <i>Drosophila</i>	13
4.4. Mecanismo de HIF/Sima	13
4.5. Traqueolación por Btl y su ligando Bnl y su relación con la hipoxia	14
4.6. Células madres del lóbulo óptico y la vía de señalización de Notch.....	17
4.7. Las guanilil ciclasas solubles y su relación con el GMPc.....	18
5. HIPÓTESIS	22
6. OBJETIVOS	22
6.1. Objetivo general.....	22
6.2. Objetivos específicos.....	22
7. MATERIALES Y MÉTODOS	23
7.1. Cepas de moscas.....	23
7.2. Procedimiento de disección, fijación e inmunofluorescencia <i>in situ</i>	23
7.3. Uso del sistema GAL4-UAS	24
7.4. Microscopía confocal y adquisición de imágenes.....	26
7.5. Análisis de imágenes	26
7.6. Análisis de datos.....	27
8. RESULTADOS	28
9. DISCUSIÓN	32
10. CONCLUSIÓN	36
11. BIBLIOGRAFÍA	37
12. ANEXOS	43

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismos de percepción de hipoxia.....	8
Figura 2. El ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	12
Figura 3. Modelo del patrón de ramificación terminal dependiente de Bnl.....	16
Figura 4. Esquema simplificado de la vía del GMP cíclico.....	19
Figura 5. Síntesis y degradación de la molécula de GMP cíclico.....	20
Figura 6. Moscas adultas de <i>Drosophila melanogaster</i>	23
Figura 7. Secuencia de avance hacia la disección de cerebros de de larvas L3 de <i>D. melanogaster</i>	24
Figura 8. Sistema GAL4-UAS para la expresión ectópica de genes de <i>D. melanogaster</i>	25
Figura 9. Anatomía del cerebro de larva de <i>D. melanogaster</i>	26
Figura 10. Lóbulo óptico (OL) del cerebro de <i>D. melanogaster</i>	27
Figura 11. Imágenes obtenidas en microscopio confocal con las distintas tinciones....	28
Figura 12. Cuantificación de células proliferantes en NE del OL de larvas L3 de <i>Drosophila</i>	29
Figura 13. Cuantificación de núcleos totales en el NE del OL de larvas L3 de <i>Drosophila</i>	30

TABLAS

	Página
Tabla 1. Células proliferantes del NE del OL de larvas L3 de <i>Drosophila</i>	30
Tabla 2. Núcleos totales en el NE del OL de larvas L3 de <i>Drosophila</i>	31

1. RESUMEN

La existencia de varias vías paralelas capaces de percibir la tensión de oxígeno en las células, y el hallazgo en el cerebro larvario de *Drosophila* de un compartimiento de células madre neurales que está en hipoxia sin exhibir una respuesta hipóxica canónica, sugiere que podría haber un mecanismo alternativo de percepción de oxígeno en estas células madre neurales. Esto podría permitir una regulación fina de la respuesta celular dirigiéndola hacia la proliferación en lugar de la diferenciación. La hipótesis principal de este estudio fue que los centros proliferantes del cerebro de *Drosophila* en desarrollo poseen mecanismos de percepción de oxígeno alternativos a los de la vía canónica Sima/HIF, que controlan la proliferación y diferenciación celular, y que no generan una respuesta hipóxica convencional. El objetivo general fue determinar si las guanilato ciclasas solubles atípicas (asGCs) controlan la proliferación y diferenciación celular del neuroepitelio (NE) de *Drosophila melanogaster*. Para ello, por una parte, se realizaron experimentos de pérdida de función de dos subunidades de asGC, la Gyc89Da y la Gyc89Db, e inmunofluorescencia *in situ*, que permitieron identificar las células proliferantes del NE. Por otra parte, se generaron moscas transgénicas que expresaran ectópicamente la subunidad de asGC Gyc89Db en el NE, y se cuantificaron sus células proliferantes y células totales del NE mediante inmunomarcación con anticuerpos específicos. En ambos grupos experimentales se compararon resultados con sus respectivos grupos controles. No encontramos diferencias estadísticamente significativas ni en el número de células proliferantes ni en el de células totales entre las moscas de los grupos experimentales comparadas con sus respectivos controles. En conclusión, proponemos que las subunidades de asGC Gyc89Da y Gyc89Db no regulan el nicho de la células madre neuroepiteliales durante el desarrollo del cerebro larvario de *Drosophila*.

2. SUMMARY

The existence of several parallel pathways capable of sensing oxygen tension in cells, and the finding that in the larval brain of *Drosophila*, a compartment of neural stem cells appears to be in hypoxia without exhibiting a canonical hypoxic response, suggests that there could be an alternative mechanism of oxygen sensing in these neural stem cells. This could allow for fine regulation of cellular response by directing it towards proliferation instead of differentiation. The main hypothesis of study was that proliferating centers in the developing brain have alternative oxygen-sensing mechanisms to the canonical Sima/HIF pathway that control cellular proliferation and differentiation without generating a conventional hypoxic response. The overall objective was to determine whether asGCs control the proliferation and differentiation of the neuroepithelium (NE) in the optic lobes (OLs) of the *Drosophila melanogaster* brain. To this end, loss-of-function experiments for two asGC subunits Gyc89Da and Gyc89Db were performed, and in situ immunofluorescence experiments were conducted to identify NE proliferating cells. Additionally, genetic crosses were developed to ectopically overexpress the asGC subunit Gyc89Db in the NE, and quantify proliferating and total NE cells in OLs through immunostaining. Both experimental groups were compared with their respective control groups. As a result, no significant differences were found in the number of proliferating cells or total nuclei in mitosis between the experimental and control groups of flies. In conclusion, it is proposed that the asGC Gyc89Da and Gyc89Db subunit does not regulate the neuroepithelial stem cell niche during the development of the *Drosophila* larval brain.

3. INTRODUCCIÓN

El desarrollo del sistema nervioso (SN) comprende una compleja cascada de procesos celulares en donde el balance entre proliferación y diferenciación celular es esencial. El control de estos procesos en los nichos de células madre es de gran interés, tanto para la ciencia básica como para la medicina regenerativa. Varios estudios han reportado que las células progenitoras del SN se desarrollan en condiciones de hipoxia en el cerebro embrionario y en el adulto (Baccino, 2016; Mohyeldin, Garzón-Muvdi y Quiñones-Hinojosa, 2010; Panchision, 2009). La hipoxia se define como el estado en el que el nivel de oxígeno (O_2) disminuye en relación con el nivel normal que se encuentra en la atmósfera (Simon y Keith, 2008), es decir, concentraciones de O_2 menores a 21%. La capacidad de detectar cambios en la concentración de O_2 en el medio ambiente es fundamental para la supervivencia de todos los animales. El O_2 ha representado una presión evolutiva tan importante que ha propiciado que las células expresen moléculas que pueden detectar cambios en sus niveles y transmitir una señal que conduce a la respuesta celular adecuada.

Existen varias vías de activación ante la hipoxia desarrollada en los organismos vivos (Figura 1). La vía convencional de respuesta a hipoxia en mamíferos es la de HIF (Simon y Keith, 2008). Otras vías que proveen también adaptaciones importantes a la hipoxia son las de mTOR, la de respuesta a proteínas desplegadas (UPR), y la vía dependiente del GMPc, donde participan las gualinato ciclasas solubles. Un estudio del genoma de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* ha identificado múltiples factores involucrados en la respuesta a la hipoxia independientes de HIF (Acevedo et al., 2010). Estudios bioquímicos, genéticos y conductuales han demostrado que aGCs funcionan como detectores de oxígeno en larvas de *Drosophila* (Morton, 2011).

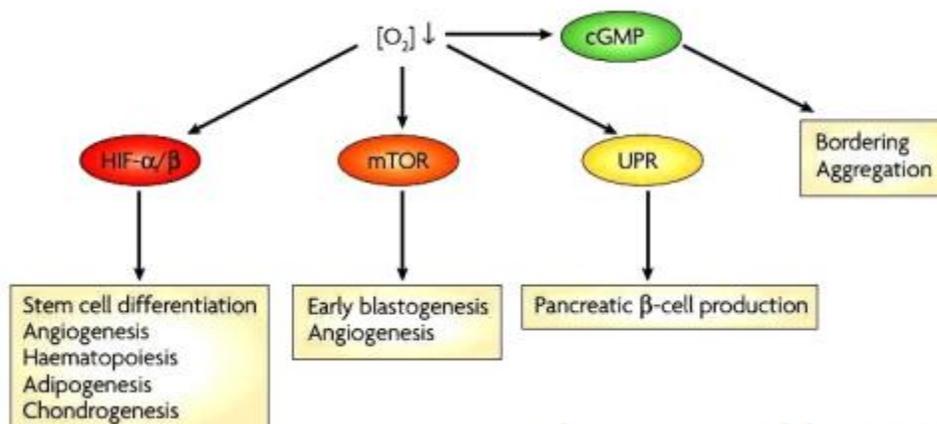


Figura 1. Mecanismos de percepción de hipoxia. Simon y Keith, 2008.

D. melanogaster, es un modelo genético muy utilizado para estudiar las adaptaciones fisiológicas, del desarrollo y celulares a la hipoxia. Es extremadamente tolerante a la falta de O_2 y puede sobrevivir en hipoxia durante largos períodos de tiempo. Por ejemplo, las moscas que son desafiadas con O_2 al 0,5% durante más de 6 horas no mueren, aunque entran en un estado de estupor en el que no se mueven ni responden a los estímulos (Romero et al., 2007). Posee un sistema conservado de respuesta a la hipoxia homólogo al HIF de los mamíferos, en el que Fatiga es una proil hidroxilasa dependiente de oxígeno, y las proteínas hélice-bucle-hélice básico Per/ARNT/Sim

(bHLH-PAS) Sima y Tango son las homólogas a HIF- α y HIF- β de los mamíferos (Acevedo, Centanin, Dekanty y Wappner, 2010; Lavista-Llanos et al., 2002; Romero, Dekanty y Wappner, 2007). La percepción de O₂ por el SN en desarrollo no se comprende completamente aún, pero se sabe que también influye en respuestas comportamentales en animales adultos. En *Drosophila*, se ha mostrado que las subunidades de asGCs funcionan como sensores moleculares de O₂ mediante unión al grupo hemo, y generan GMP cíclico (GMPc) y cambios en el comportamiento en respuesta a bajos niveles de O₂ (Vermehren, Langlais y Morton, 2006). De las tres asGC identificadas en *D. melanogaster*, Gyc89Da, Gyc89Db y Gyc88E, las dos últimas probablemente forman heterodímeros *in vivo* (Langlais, Stewart y Morton, 2004), y se ha mostrado que median respuestas comportamentales a la hipoxia asociadas a su expresión en el sistema nervioso periférico (Vermehren-Schmaedick, Ainsley, Johnson, Davies y Morton, 2010). La vía canónica de respuesta a la hipoxia dependiente de HIF/Sima está bien caracterizada (Simon y Keith, 2008), aunque resulta insuficiente para explicar algunos de los resultados de estudios previo del Departamento de Biología del Neurodesarrollo del IIBCE. En particular, encontraron que una gran zona proliferativa en el cerebro larvario de *D. melanogaster*, el lóbulo óptico (OL), parece no disparar una respuesta canónica a la hipoxia, aún siendo hipóxica en relación al resto del cerebro (Baccino-Calace, Prieto, Cantera y Egger, 2020). Una característica clave de la activación de la respuesta canónica a la hipoxia es la acumulación nuclear de Sima (Romero et al., 2007). Sin embargo, datos aún no publicados del laboratorio muestran que estas células del OL no presenta acumulación nuclear de Sima, no expresan los marcadores de hipoxia lactato deshidrogenasa-lacZ (Lavista-Llanos et al., 2002) y no atraen traqueolas (tubulos epiteliales que intervienen en el transporte de O₂), que representa un aspecto esencial de la respuesta canónica a hipoxia en otros tejidos (Centanin et al., 2008; Jarecki et al., 1999; Mortimer y Moberg, 2009). Así, en el lóbulo óptico no se activaría la respuesta tradicional controlada por la vía HIF/Sima y actuaría, en cambio, un mecanismo alternativo de percepción de oxígeno. En este sentido, algunas subunidades de asGC son capaces de responder a la disminución de la tensión de oxígeno (hipoxia) generando GMPc (Langlais et al., 2004; Morton, Langlais, Stewart y Vermehren, 2005; Morton y Vermehren, 2007). En este estudio proponemos que las asGC son el posible sensor de O₂ en las células madres del cerebro larval de *Drosophila*. El OL es la región cerebral de mayor proliferación celular. Es por esto que para constatar nuestra hipótesis, desarrollamos una estrategia experimental donde utilizamos moscas mutantes con pérdida de función de dos de las tres asGC, Gyc89Da y Gyc89Db, y moscas transgenicas con expresión ectópica específica de Gyc89Db en el NE del OL del cerebro de una larva L3, para determinar si estas tenían la capacidad de permitir la proliferación y diferenciación celular en esa región.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. Oxígeno e hipoxia

La Tierra es el único planeta del sistema solar que se conoce que posee O_2 suficiente para el desarrollo de la vida. No siempre fue así, ya que durante los primeros millones de años de la Tierra no había O_2 en su atmósfera. Se trataba de un lugar inhóspito, en el que pocos seres vivos podían resistir, no habiendo rastro de plantas y animales.

El O_2 apareció en la Tierra hace unos 2.400 millones de años (Marshall, 2015). Sin embargo, ya había vida antes de ese cambio conocido como la Gran Oxidación o la Revolución del Oxígeno. De hecho, fueron estas formas de vida primitivas las responsables de su formación.

Los ancestros de las cianobacterias, que en la actualidad habitan lagos y océanos, usaban la energía solar para transformarla en azúcares y dióxido de carbono, es decir, hacían la fotosíntesis. Lo interesante es que estas cianobacterias consideraban al O_2 un residuo, un material indeseado que liberaban a la atmósfera. Por tanto, se puede decir que a partir de la fotosíntesis de las cianobacterias se modificó nuestra atmósfera, permitiendo nuevas formas de vida (Marshall, 2015). El O_2 es el tercer elemento más abundante en el Universo (Emsley, 2001), después del hidrógeno y el helio. Además de formar parte del aire que respiramos, el O_2 también constituye el 65% del cuerpo de animales, sobre todo porque forma parte de las moléculas de agua.

Aunque la mayor parte de la atmósfera terrestre está formada por nitrógeno, el O_2 constituye el 21% de ésta. Por ende, a lo largo del texto cuando haga referencia a la normoxia será en estas condiciones de cantidad de O_2 ideales, y se definirá hipoxia a las concentraciones menores a 21%.

La normoxia fisiológica en realidad se encuentra en el rango de 2 a 9% de O_2 para la mayoría de las células embrionarias o adultas in vivo (14,4 a 64,8 mm de mercurio (Hg)) (Simon y Keith, 2008). Sin embargo, hay algunas excepciones a esta regla; por ejemplo, el timo, la médula renal y la médula ósea pueden existir con un 1% de O_2 (7,2 mm Hg) o menos debido a sus redes de vasos sanguíneos atípicas (Simon y Keith, 2008).

La hipoxia se define como el estado en el que el nivel de O_2 disminuye en relación con el nivel normal (Simon y Keith, 2008).

La hipoxia se asocia comúnmente a patologías como la isquemia e inflamación tisular, y es común en tumores sólidos. Sin embargo, los microambientes hipóxicos también ocurren tanto en el embrión en desarrollo como en el adulto y, a menudo, crean nichos específicos que regulan la diferenciación celular. Las células madre residen en estos nichos, que modulan sus actividades durante el desarrollo y el mantenimiento o la reparación de tejidos. La conexión entre la embriogénesis de los mamíferos y los niveles de oxígeno se apreció por primera vez en la década de 1970, cuando Morriss y New demostraron que el desarrollo exitoso del pliegue neural en embriones de ratones *ex utero* dependía de la creación de condiciones de cultivo con bajos niveles de O_2 (Simon y Keith, 2008).

Cambios adaptativos a la hipoxia, por ejemplo en la expresión del gen que aumenta la supervivencia en condiciones de O_2 reducido, están mediadas a través de factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF) como HIF1. Por el contrario, cambios de

comportamiento a corto plazo requieren neuronas sensoriales para detectar cambios en niveles de O₂ y activar respuestas conductuales o fisiológicas específicas. Ejemplos de esto último incluyen la hiperventilación y el aumento del gasto cardíaco (revisado en Morton, 2011).

Para respuestas a la hipoxia tanto a largo como a corto plazo, se necesita un sensor molecular de O₂ que detecte cambios de O₂ y transduzca estos cambios en la respuesta celular apropiada: cambios en la transcripción para el primero y cambios en la actividad eléctrica en las neuronas sensoriales para este último. Para cambios transcripcionales a largo plazo, las concentraciones de O₂ son detectadas por una proil hidroxilasa cuya actividad es dependiente de O₂. En presencia de este esta enzima está activa, hidroxila HIF1 y lo marca para ubiquitinación y degradación, por lo tanto impidiendo su función como factor de transcripción. Durante la hipoxia, HIF1 ya no se hidroxila, no se degrada y puede activar la transcripción de una variable cantidad de genes que son importantes en la adaptación a la hipoxia (Morton, 2011). El desarrollo de sistemas de suministro de O₂ depende directamente de diferencias sutiles en el nivel de O₂ tisular y asegura que las células residentes mantengan una actividad metabólica adecuada. La regulación genética de estas respuestas se ha conservado durante la evolución de los animales. El O₂ tiene efectos en el desarrollo de múltiples sistemas en mamíferos. Por ejemplo, en la adipogénesis (a través de HIF), osteogénesis, el desarrollo del sistema respiratorio, morfogénesis cardiovascular (en mamíferos por HIF), y placentación en mamíferos (Simon y Keith, 2008). Dependiendo del contexto, y del sistema, se precisarán concentraciones mayores o menores para la diferenciación celular. En mamíferos, las células madre y las células progenitoras embrionarias frecuentemente ocupan nichos hipóxicos y los niveles bajos de O₂ regulan su diferenciación, e inhiben la diferenciación de otras. Las células madre de los tumores cerebrales también parecen estar asociadas con nichos vasculares. En resumen, parece que algunas células madre ocupan nichos hipóxicos, mientras que otras ocupan microambientes perivasculares relativamente bien oxigenados. Los cambios de tensión de O₂ probablemente influyan en la quiescencia, proliferación y diferenciación de células madre (Simon y Keith, 2008). La disponibilidad de O₂ regula la actividad de la proteína Notch; HIF-1 α media directamente sobre su actividad. La señalización de Notch se ha conservado evolutivamente para mantener el destino de las células madre o progenitoras en organismos multicelulares. Se profundiza en los siguientes puntos sobre esta vía.

4.2. La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio.

D. melanogaster pertenece al grupo de insectos holometábolos, es decir, los que sufren una metamorfosis completa en la transición de larva a pupa. La duración de todo el ciclo de vida es de unos 12 días a 25°C (Figura 2) (Romero et al., 2007).

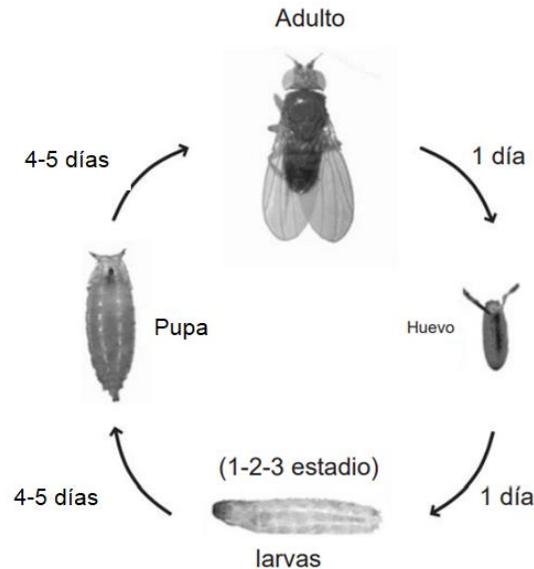


Figura 2: El ciclo de vida de *D. melanogaster*. La duración del ciclo de vida completo de *Drosophila* es de aproximadamente 12 días a 25°C. Las hembras adultas ponen huevos fertilizados; la embriogénesis ocurre allí y dura 24 horas. Los tres estadios larvarios (L1, L2 y L3) tardan de 4 a 5 días; la larva del tercer estadio (L3) da lugar a pupas que experimentan metamorfosis para convertirse en un adulto que alcanza la madurez sexual dentro de las 24 h. Imagen tomada y modificada de Romero et al., 2007.

En la naturaleza, las larvas de *Drosophila* viven principalmente en frutas en fermentación y se alimentan de la pulpa y de la levadura que suele crecer en ellas. Así, en su hábitat normal, compiten con los microorganismos por cantidades limitadas de O_2 , estando permanentemente expuestas a un microambiente hipóxico, anticipando una maquinaria celular bien desarrollada que responde a la falta de O_2 .

El sistema circulatorio de los insectos es abierto y está compuesto básicamente por un único vaso dorsal que desempeña el papel de un corazón primitivo. La sangre de los insectos (hemolinfa) no circula a través de las venas y las arterias, sino que llena toda la cavidad del cuerpo y lleva nutrientes a los órganos y tejidos de todo el cuerpo. El transporte y el suministro de O_2 y la liberación de dióxido de carbono, no depende de su sistema circulatorio. En cambio, los gases se envían directamente a los órganos y tejidos del organismo a través del sistema respiratorio traqueal. El aire ingresa al cuerpo del insecto a través de orificios llamados espiráculos, que están directamente conectados a una red compleja de tubos ramificados similares a epitelios, las tráqueas, que proporcionan O_2 a cada célula o tejido del organismo. El sistema respiratorio de *Drosophila* tiene características en común con el sistema circulatorio de los mamíferos, de modo que se produce una respuesta similar a la angiogénesis tras la exposición de las larvas de *Drosophila* a la hipoxia (Romero et al., 2007).

El desarrollo del SN comprende una compleja coreografía de procesos celulares, en donde el balance entre proliferación y diferenciación es esencial. El control de estos procesos en los nichos de células madre es de gran interés tanto para la ciencia básica, como para la medicina regenerativa. Varios estudios han reportado que las células progenitoras del SN se desarrollan en condiciones de hipoxia tanto en el cerebro embrionario como en el adulto (Baccino, et al. 2020; Panchision, 2009).

Además de la respuesta transcripcional a hipoxia mediada por las HIFs, otras vías proveen adaptaciones importantes. Estas vías incluyen la de TOR (Target Of Rapamycin), la de respuesta a proteínas desplegadas (UPR), y la vía de la guanilato ciclasa soluble atípica (asGC) (Morton, 2011; Simon y Keith, 2008).

La percepción de O₂ por el sistema nervioso en desarrollo no se comprende completamente aún, pero se sabe que estos sistemas también influyen en respuestas comportamentales en animales adultos. En *Drosophila*, se ha mostrado que las subunidades de la asGC atípica funcionan como sensores moleculares de oxígeno mediante unión a un grupo hemo, y generan GMPc y cambios en el comportamiento en respuesta a bajos niveles de O₂ (Vermehren et al., 2006). De las tres asGC identificadas en *D. melanogaster*, Gyc89Da, Gyc89Db y Gyc88E, las dos últimas probablemente forman heterodímeros *in vivo* (Langlais et al., 2004), y se ha mostrado que pueden mediar respuestas comportamentales a la hipoxia asociadas a su expresión en el sistema nervioso periférico (Vermehren-Schmaedick et al., 2010).

4.3. Anatomía del sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*

El sistema nervioso central *D. melanogaster* está formado por un gran número de neuronas y células gliales. Las neuronas individuales suelen considerarse las unidades de la función neural, actuando en forma de circuitos sinápticos locales (Hartenstein, Spindler, Pereanu y Fung, 2008). Las neuronas y las células gliales se diferencian durante la segunda mitad de la embriogénesis. El cerebro se forma en pocas horas, permitiendo que la larva eclosiona con un cerebro funcional. El cerebro larval tardío incorpora neuronas primarias producidas embrionariamente que forman una “corteza central” profunda, rodeada de neuronas secundarias.

En los siguientes días de desarrollo larval, éste sigue teniendo grandes poblaciones de células proliferantes.

La parte del cerebro larvario donde residen las neuronas diferenciadas se denomina cerebro central. A cada lado del mismo existe una gran región proliferativa llamada lóbulo óptico (OL). El OL se origina a partir de un neuroepitelio (NE), cuya gran actividad mitótica explica el rápido crecimiento del cerebro larvario (Hofbauer y Campos-Ortega, 1990). El NE prolifera por divisiones simétricas de las células neuroepiteliales hasta que se diferencian en neuroblastos (NB). Estos se dividen de manera asimétrica produciendo cada vez un NB y una célula madre ganglionar que se divide una sola vez simétricamente (Egger, Boone, Stevens, Brand y Doe, 2007; Egger, Gold, y Brand, 2008; Hofbauer y Campos-Ortega, 1990). Posteriormente, durante la metamorfosis, estas células comenzarán su diferenciación terminal (glial o neuronal) simultáneamente (Melnattur y Lee, 2011; Ngo, Andrade, Hartenstein, 2017). Durante la etapa de pupa, algunas de las neuronas primarias y secundarias sufren muerte celular apoptótica; la mayoría de las neuronas primarias se remodelan y se integran en circuitos adultos (Hartenstein et al., 2008). Resultados publicados de Baccino-Calace et al., 2020, sugieren fuertemente que el cerebro central de las larvas de *Drosophila*, se encuentra densamente traqueolado, y por lo tanto posee una mayor oxigenación de este compartimento en comparación con el OL escasamente traqueolado.

4.4. Mecanismo de HIF/Sima

La fisiología y el desarrollo animal están modulados por una amplia variedad de estímulos externos, como la temperatura, la luz, la disponibilidad de nutrientes y la tensión de O₂. La adaptación a las condiciones ambientales a menudo implica la regulación de estimulación o la represión de conjuntos específicos de genes que contribuyen a mantener la homeostasis de las células o de los organismos completos. Los animales suelen responder a la baja tensión de O₂ (hipoxia) mejorando el transporte del mismo desde las superficies respiratorias a los tejidos y cambiando el mecanismo oxidativo de producción de ATP al de la glucólisis anaerobia. En los mamíferos, la oxigenación se optimiza a través de diversas adaptaciones fisiológicas, incluido un aumento de la frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria, síntesis de más glóbulos rojos, vasodilatación y angiogénesis. La angiogénesis es un proceso de desarrollo generalizado que es común a muchas condiciones fisiológicas y patológicas, como la formación de la placenta, el crecimiento del endometrio, la cicatrización de heridas, la cardiopatía isquémica, el accidente cerebrovascular y el cáncer (Carmeliet, 2003; Folkman y Klagsbrun, 1987). Ésta abarca la formación de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes y se desencadena cuando las células hipóxicas secretan factores de crecimiento angiogénicos, principalmente el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que se une a sus receptores en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Ferrara, Gerber y LeCouter, 2003; Levy, Levy, Wegner y Goldberg, 1995; Shweiki, Itin, Soffer y Keshet, 1992). La inducción transcripcional de VEGF en células hipóxicas depende en gran medida de la acumulación de factores inducibles por hipoxia (HIF) (Carmeliet et al., 1998; Pugh y Ratcliffe, 2003), aunque los mecanismos no transcripcionales dependientes de la hipoxia, como el ARNm de VEGF, la estabilización y la inducción de la traducción también contribuyen a la respuesta angiogénica (Levy, Levy y Goldberg, 1996a, 1996b). Las proteínas HIF son heterodímeros de proteínas basic-helix-loop-helix-Per-Arnt-Sim (bHLHPAS) (Wang, Jiang, Rue y Semenza, 1995), en las que la subunidad β es constitutiva y la subunidad α está regulada por el oxígeno a través de varios mecanismos.

En *Drosophila*, la maquinaria celular que media la respuesta transcripcional a la hipoxia está muy conservada con el sistema HIF de los mamíferos (Gorr, Tomita, Wappner y Bunn, 2004; Lavista-Llanos et al., 2002; Nagao, Ebert, Ratcliffe y Pugh, 1996). El HIF de la mosca también es un heterodímero bHLH-PAS en el que la subunidad α está regulada por oxígeno y es una proteína llamada Similar (Sima) (Bacon et al., 1998; Nambu, Chen, Hu y Crews, 1996), mientras que la subunidad β constitutiva se denomina Tango (Ma y Haddad, 1999; Ohshiro y Saigo, 1997; Sonnenfeld et al., 1997). Sima es estable en hipoxia pero se degrada fácilmente en normoxia.

4.5. Traqueolación por Btl y su ligando Bnl y su relación con la hipoxia

Tal como señalé en 4.2, en los insectos, el sistema circulatorio es rudimentario y, con pocas excepciones conocidas (Burmester y Han Keln, 2007), no participa en el transporte de oxígeno. En cambio, el O₂ llega a los órganos y tejidos del cuerpo directamente a través del sistema traqueal, una red de tubos epiteliales ramificados, interconectados y que se estrechan progresivamente, conteniendo aire (Ghabrial, Luschnig, Metzstein y Krasnow, 2003). A mediados de la embriogénesis, el sistema

traqueal de *Drosophila* se desarrolla a partir del primordio ectodérmico, en un proceso que depende en gran medida de la migración celular guiada.

Al final de la embriogénesis, esta fase genéticamente especificada del desarrollo traqueal está completa y se ha establecido el patrón general de ramificación. En esta etapa, las células especializadas en todas las ramas traqueales, las células terminales, se diferencian y adquieren la capacidad de brotar proyecciones llamadas ramas terminales (Guillemin et al., 1996).

En estadios larvales, las ramas terminales son plásticas y tienen la capacidad de ramificarse e invadir áreas hipóxicas en los tejidos diana (Jarecki et al., 1999), en un proceso análogo a la angiogénesis de los mamíferos. Se ha propuesto que la respuesta de tipo angiogénico del sistema traqueal de *Drosophila* se desencadena por la expresión de Branchless (Bnl) inducible por hipoxia en células no traqueales, lo que promueve la formación de nuevas ramificaciones terminales (Jarecki et al., 1999). El patrón de expresión de Bnl en los tejidos diana predice la dirección de las células traqueales (Romero et al., 2007). Este patrón de expresión es muy dinámico durante la traqueogénesis; una vez que una célula principal de una rama dada ha alcanzado un grupo positivo para Bnl en el tejido objetivo, la expresión de Bnl se desactiva y el gen se activa de nuevo un poco más adelante en la trayectoria de la rama en crecimiento. Por lo tanto, a lo largo del proceso de desarrollo traqueal, la expresión de Bnl se activa y desactiva muchas veces a lo largo del camino de las células traqueales migratorias (Romero et al., 2007).

En suma, la respuesta dependiente de hipoxia de las ramas terminales traqueales está mediada por Bnl, que se induce en tejidos diana privados de O₂, y su receptor, Breathless (Btl), se expresa en células traqueales. Este comportamiento dependiente de la hipoxia del sistema traqueal de *Drosophila* es notablemente similar a la angiogénesis de los mamíferos (Metzger y Krasnow, 1999; Wappner y Ratcliffe, 2001), donde se induce el VEGF en células hipóxicas, promoviendo el crecimiento de nuevos capilares sanguíneos (traqueolas en los insectos) que proporcionan oxigenación adicional a los tejidos diana hipóxicos (Romero et al., 2007).

Se ha propuesto un modelo (Jarecki et al., 1999) en el cual cada célula que experimenta un déficit de O₂ puede sentir y responder con la expresión de Bnl (Figura 2. A y B). Bnl difunde hacia las células traqueales cercanas y estimula la formación y crecimiento de las ramas hacia la fuente de la señal. Este proceso es dinámico y se repite múltiples veces debido al cambio constante de oxigenación de las células. Una rama terminal puede sentir simultáneamente más de una señal de Bnl, por tanto, ante niveles bajos de Bnl se estimula un crecimiento guiado, mientras que ante niveles altos se promueve la traqueolización (Jarecki et al., 1999).

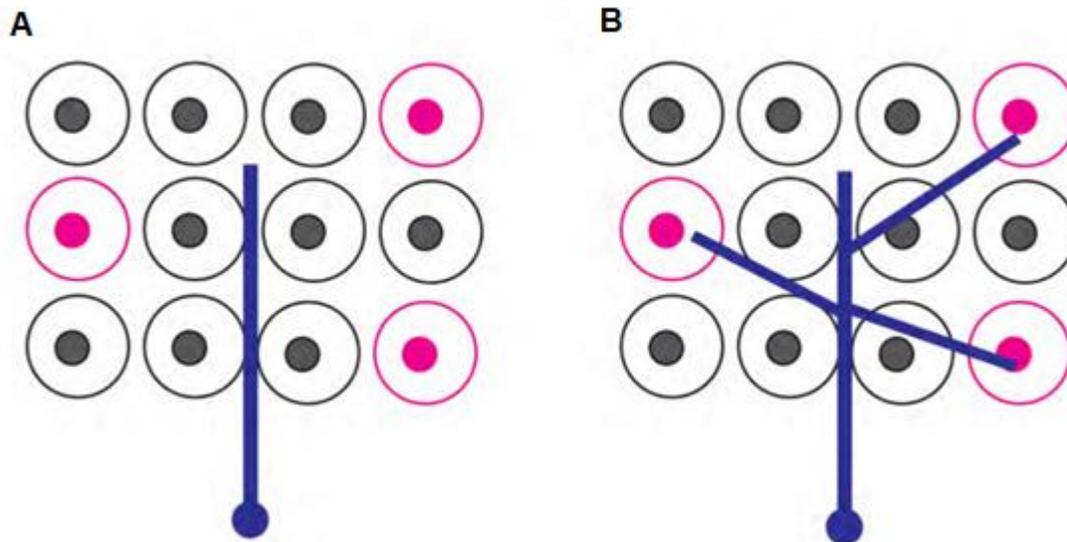


Figura 3. Modelo del patrón de ramificación terminal dependiente de Bnl. La traqueogénesis durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster* es regulada por niveles locales de O_2 y la interacción entre el receptor Breathless, expresado en las traqueolas y su ligando Branchless, secretado por células con falta de O_2 . A. Las células en magenta son células donde bajos niveles de O_2 inducen la expresión de Branchless. B. Respuesta del sistema traqueal ante la detección de señal celular por falta de O_2 , produciendo la extensión de ramas traqueolares (imagen tomada y adaptada de la tesis de maestría de González, 2022).

Se ha demostrado que las células terminales traqueales de larvas de *Drosophila* pueden inducir la expresión génica en hipoxia con alta sensibilidad, y que pueden responder al estímulo hipóxico mediante la regulación positiva del receptor Btl (Centanin et al., 2008). Esta respuesta transcripcional, que depende del sensor de O_2 Fatiga y del factor de transcripción Sima, contribuye a que se produzcan cambios morfológicos traqueales en larvas expuestas a hipoxia. También demostraron que las células traqueales desempeñan un papel activo en la detección de los niveles de O_2 y en la respuesta a la hipoxia. Estos autores propusieron que tras la exposición a la hipoxia, las células traqueales ejecutaban una respuesta celular autónoma que activa un "modo de búsqueda" que las sensibiliza a los niveles crecientes y disponibles del ligando. Asimismo, proponen que tendría el mismo funcionamiento en la angiogénesis de los mamíferos.

La plasticidad traqueal en respuesta a la hipoxia depende de Fatiga y Sima (Centanin et al., 2008). Estos autores, vieron cómo aumentaba la ramificación traqueal terminal en condiciones de hipoxia en el tercer estadio larval de *Drosophila*. Las células terminales traqueales son sensores de O_2 especializados capaces de responder a niveles bajos de O_2 con alta sensibilidad (Centanin et al., 2008). Respecto a la detección de O_2 y desarrollo traqueal, analizaron el papel de Sima de *Drosophila* y Fatiga (sensible al O_2) en la ramificación terminal traqueal. Se supone que durante las etapas embrionarias, el desarrollo traqueal depende de señales de desarrollo programadas y, más tarde, en las etapas larvales, la ramificación terminal traqueal es impulsada por la hipoxia local en los tejidos objetivo (Ghabrial et al., 2003).

El umbral sensorial para inducir la activación del gen impulsado por Sima en estas células se desplaza a una tensión de O_2 casi normóxica. Una interpretación alternativa

de estos datos es que las células terminales traqueales son igualmente sensibles pero más hipóxicas que otras células, lo que induce una transcripción dependiente de hipoxia con mayor sensibilidad.

Por lo tanto, aunque está claro que Bnl se induce en hipoxia y atrae la extensión de las ramas terminales (Jarecki et al., 1999), estos datos respaldan la noción de que Sima es necesaria, pero no suficiente, para la inducción de Bnl en hipoxia.

También en Centanin et al., 2008, se plantea que la inducción transcripcional de Btl dependiente de Sima en células terminales traqueales es un paso crítico de la respuesta de tipo angiogénico del sistema traqueal en larvas hipóxicas.

En resumen, propusieron que las células traqueales responden a la hipoxia de forma autónoma, promoviendo la acumulación de Sima, que induce la expresión del receptor Btl, aumentando así la sensibilidad de estas células al ligando Bnl. Al mismo tiempo, Bnl se induce en tejidos diana hipóxicos a través de un mecanismo que también implica la participación de Sima y sirve para señalar el crecimiento de ramas terminales hacia áreas privadas de O₂.

Los estudios funcionales en cultivos celulares y embriones en desarrollo confirmaron que Sima y Tango son absolutamente necesarios para inducir una respuesta transcripcional a la hipoxia.

La expresión de la proteína Tango es ubicua en todos los tejidos de la mosca de la fruta a lo largo del desarrollo. A diferencia de Tango, los niveles de Sima son demasiado bajos para ser detectables en embriones normóxicos mediante inmunofluorescencia. Solo ante la exposición a hipoxia severa se puede observar la proteína Sima en los núcleos de las células del sistema traqueal (Lavista-Llanos et al., 2002).

Esta alta sensibilidad a la hipoxia que muestran las células traqueales se mantiene durante todo el ciclo de vida de *Drosophila*. Sorprendentemente, el resto de los tejidos del organismo también son capaces de acumular proteína Sima e inducir reporteros sensibles a la hipoxia, aunque la inducción ocurre en condiciones hipóxicas más intensas (Lavista-Llanos et al., 2002). Por lo tanto, Sima se vuelve cada vez más nuclear a medida que la hipoxia se vuelve más severa y predominantemente citoplásmica en condiciones de abundante aporte de oxígeno (Romero et al., 2007).

Los mutantes homocigotos de pérdida de función de Sima de *Drosophila* son completamente viables en normoxia, pero no se desarrollan en condiciones de hipoxia leve (Centanin et al., 2008), lo que indica que Sima es necesaria para el desarrollo en hipoxia pero no en normoxia. Por el contrario, los alelos mutantes de Fatiga provocan letalidad en diferentes etapas del ciclo de vida en normoxia (ninguno de ellos puede alcanzar la etapa adulta), lo que implica que Fatiga es un requisito crítico para el desarrollo normal. Sorprendentemente, los mutantes dobles de Fatiga-Sima son viables y alcanzan la etapa adulta en normoxia, pero no en hipoxia (Centanin et al., 2008).

4.6. Células madres del OL y la vía de señalización de Notch

La transición de la división simétrica a la asimétrica debe ser estrictamente regulada, ya que la división simétrica excesiva puede conducir a sobrecrecimiento tumoral, mientras que la división asimétrica precoz resulta en diferenciación prematura y cerebros pequeños (Egger, Gold y Brand, 2010).

Las vías de transducción de señales son las que se encargan de llevar a cabo los distintos mecanismos entre las diferentes células que componen los organismos pluricelulares. Estas vías son activadas cuando un agente estimulante, también

conocido como ligando, se adhiere a los receptores que se encuentran en la membrana plasmática de la célula o en receptores intracelulares cuando el ligando penetra al citoplasma. La unión de estos complejos forma una cadena de eventos finamente regulados y acoplados que generan una respuesta en la célula estimulada, afectando tanto su metabolismo como la expresión de sus genes. El proceso de desarrollo de un organismo pluricelular después de la fertilización y la formación de las tres capas germinales del embrión está controlado por la vía de Notch (Bravo y Baizabal, 2005). Los genes de la vía de señalización de Notch son altamente expresados en células neuroepiteliales como las que dan origen al OL de *Drosophila*, lo que sugiere que esta vía es activa en células madre que se dividen simétricamente. Algunos autores demostraron que Notch es un regulador clave para mantener el equilibrio entre agrupaciones de células madre que se dividen simétricamente y asimétricamente. Otra conclusión de estos autores fue que la señalización de Notch es diferente regulando células neuroepiteliales simétricamente divididas y neuroblastos de división asimétrica (Egger et al., 2010). Situado entre el neuroepitelio y los neuroblastos se encuentra un grupo de células denominado zona de transición; que transitoriamente expresan el gen proneural lethal of scute (*l'sc*). Esa expresión funciona en el epitelio como una onda proneural, donde las células por delante de la ola se dividen simétricamente, y por detrás se dividen asimétricamente. El gen proneural *l'sc* induce el cambio de división simétrica a asimétrica, al menos en parte, por represión transitoria de Notch, permitiendo la transición de la célula neuroepitelial a neuroblastos (Egger et al., 2010). El desarrollo del OL de *Drosophila* es comparable al de la corteza cerebral de los vertebrados, lo que sugiere que las vías que regulan la transición de la división simétrica a asimétrica podrían conservarse desde las moscas hasta los mamíferos. Durante la neurogénesis en la corteza cerebral de los mamíferos, las células neuroepiteliales inicialmente se dividen simétricamente expandiendo el grupo de células madre. Más tarde en el desarrollo, se transforman en células gliales radiales divisorias asimétricamente, que expanden el grupo de células diferenciadas (Egger et al., 2010). Las células madres del OL, sensarían entonces los niveles de O_2 para regular la proliferación y la diferenciación celular en el cerebro de *Drosophila*.

4.7. Las guanilil ciclasas solubles, su relación con el GMPc y el posible rol en el cerebro de *Drosophila*.

Las guanilil ciclasas solubles (sGCs) son enzimas que actúan como receptor del óxido nítrico (NO) y catalizan la síntesis del mensajero intracelular guanosin monofosfato cíclico (cGMP). Son enzimas heterodiméricas, que contienen un grupo hemo que, a diferencia de la mayoría de las proteínas hemo, no pueden unirse al O_2 . Su vía de transducción de la señal implica un incremento en los niveles intracelulares de GMPc. De este modo, su activación mediante un estímulo externo provoca una cascada de reacciones enzimáticas interna que facilita la adaptación de la célula a su entorno, por mediación de segundos mensajeros (Figura 4).

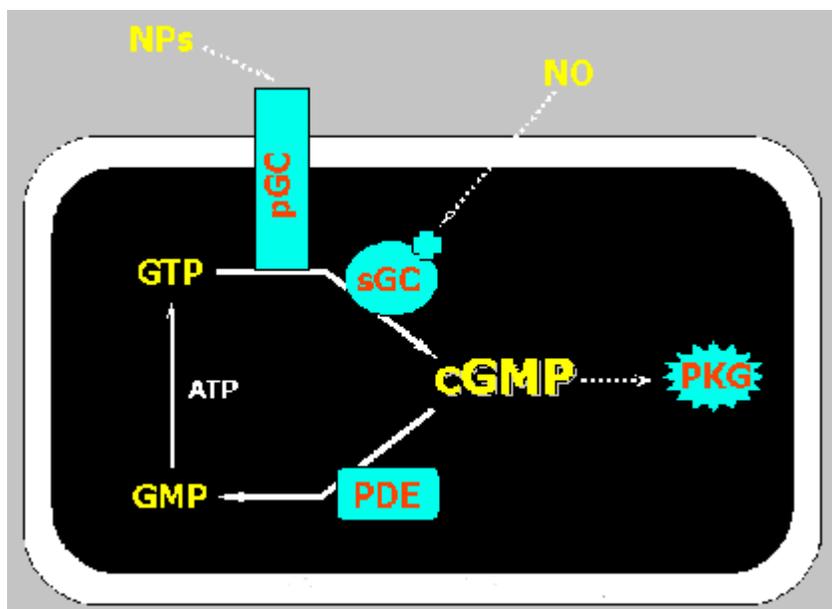


Figura 4. Esquema simplificado de la vía del GMP cíclico. El GMP cíclico (en el centro de la célula en el diagrama) es producido (sintetizado) a partir del GTP, un nucleótido trifosfato de guanina, bien por la guanilil (también guanilato ó guanil) ciclasa soluble (sGC) o por la guanilil ciclasa particulada (pGC). Otro grupo de enzimas, las fosfodiesterasas (PDEs), se encargan de su degradación. Una vez degradado a GMP (monofosfato de guanina no cíclico) se requiere ATP como fuente de energía metabólica para obtener de nuevo el compuesto inicial en la cadena: el GTP. Muchos de los efectos del GMP cíclico están mediados por la proteína quinasa G (PKG), enzima que tras su activación por el GMP cíclico fosforila distintas proteínas modificando su función. En el diagrama también se muestra la activación de las enzimas que sintetizan GMP cíclico: la sGC por el óxido nítrico (NO) y la pGC por los péptidos natriuréticos (NPs). Imagen tomada y adaptada de Agullo, 2007.

Aunque está distribuido por todo el organismo, el GMPc (guanósín 3',5'-fosfato cíclico) tiene un papel crucial en el cerebro, el sistema cardiovascular y en los órganos sensoriales (por ejemplo, en la detección de luz por las células de la retina). De hecho, las células han utilizado el GMPc desde tiempos ancestrales; esta molécula y la enzima que lo sintetiza (la guanilil ciclasa) se pueden encontrar en todos los animales, en plantas e incluso en bacterias.

Su síntesis y degradación se detallan en el esquema de la Figura 5.

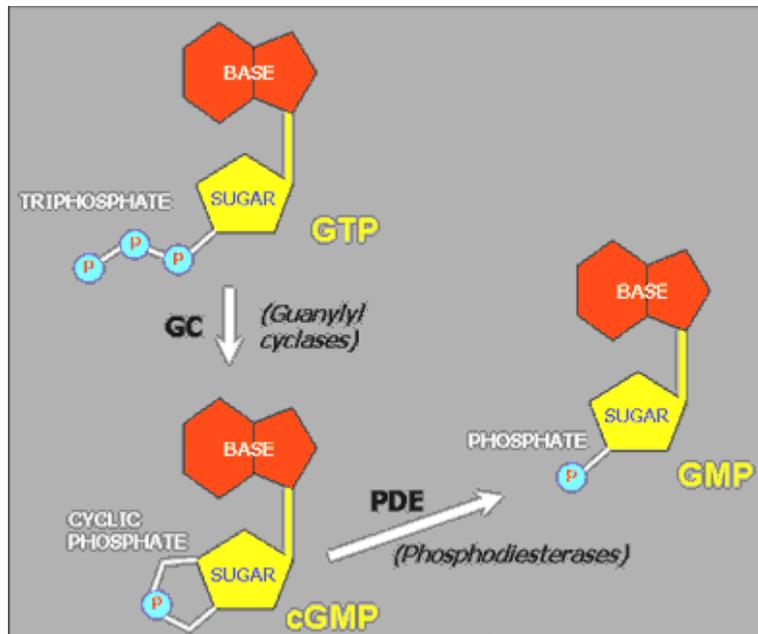


Figura 5: Síntesis y degradación de la molécula de GMP cíclico. El cGMP está compuesto de un azúcar, una base nitrogenada y un fosfato formando un enlace cíclico. La molécula se sintetiza a partir del GTP en una reacción catalizada por la enzima guanilil ciclasa (GC) y es degradada por las fosfodiesterasas. Imagen tomada y adaptada de Agullo, 2007.

El genoma de *Drosophila* contiene genes que codifican para NO sintasa y GCs convencionales, que son potentemente activados por NO. Además, tres GCs atípicos: Gyc88E, y dos genes adicionales ubicados adyacentes entre sí en 89D, llamados Gyc89Da y Gyc89Db (Morton, 2011).

Se ha demostrado tanto para *D. melanogaster* como para otros invertebrados como *Anopheles gambiae*, *Manduca sexta* y *Caenorhabditis elegans*, que mediante la unión a un grupo hemo, las subunidades de guanilato ciclasa soluble atípica (asGC) funcionan como un sensor molecular de O₂ por eso su denominación de atípica, ya que las guanilato ciclasas comunes sensan NO (Morton, 2004). La activación de la asGC produce un aumento de GMPc de hasta 50 veces más que en células incubadas en ausencia de O₂ frente a concentraciones atmosféricas normales (Morton y Vermehren, 2007).

Un primer estudio del patrón de expresión espacial de las asGC basado en hibridación *in situ*, indicó su expresión en el cerebro larvario (Langlais et al., 2004). Cuando se usó densitometría para reanalizar esos resultados, se reveló un patrón de enriquecimiento de mRNA en el lóbulo óptico con respecto al cerebro central (Prieto, datos no publicados). Este hallazgo sugirió que las asGC podrían actuar en la percepción del oxígeno dentro de las zonas proliferativas del cerebro de *D. melanogaster*.

En el OL no se activaría la respuesta tradicional controlada por la vía HIF/Sima y actuaría, en cambio, un mecanismo alternativo de percepción de O₂. Algunas subunidades de Guanilato Ciclasa soluble atípica (asGC) son capaces de responder a la disminución de la tensión de oxígeno (hipoxia) generando GMP cíclico (Langlais et al., 2004; Morton, et al., 2005; Morton y Vermehren, 2007). Las asGC podrían ser el sensor de O₂ en las células madres. El OL del cerebro de *Drosophila* es la región de mayor proliferación celular. Por esto, utilizamos moscas

mutantes con pérdida de función de dos subunidades de las asGC, Gyc89Da Gyc89Db, y moscas transgénicas con expresión ectópica específica de una de las subunidades de asGC, la Gyc89Db, para determinar si éstas tienen la capacidad de proliferación y diferenciación celular en esa región.

5. HIPÓTESIS

Las guanilato ciclasa soluble atípicas (asGC) constituyen uno de los mecanismos de percepción de O₂ en las células madre neurales de *Drosophila melanogaster*, alternativo a la vía de HIF/Sima.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

El objetivo general del estudio fue determinar si asGCs controlan la proliferación y diferenciación celular del neuroepitelio (NE) de *Drosophila melanogaster*.

6.2. Objetivos específicos

El primer objetivo específico fue cuantificar las células proliferantes del NE en un doble mutante de falta de función de Gyc89Da y Gyc89Db (Morton, Stewart, Langlais, Clemens-Grisham y Vermehren, 2008) y comparar los resultados con sus respectivos controles (*w*¹¹¹⁸).

El segundo objetivo específico fue construir moscas transgénicas que expresaran ectópicamente la subunidad de asGC Gyc89Db en el NE del OL (grupo experimental) a partir de cruzamientos genéticos de cepas GAL4^{c855a}xUAS-Gyc89Db), para cuantificar la cantidad de células totales en el NE y comparar los resultados con sus grupos parentales (GAL4^{c855a} y UAS-Gyc89Db).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta tesis de grado se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, a partir de un Contrato de Iniciación a la Investigación que por obtuve por un concurso de méritos en el Departamento de Biología del Neurodesarrollo, que se extendió de setiembre a diciembre del 2019.

7.1. Cepas de moscas

Se utilizaron cepas de *Drosophila melanogaster* salvajes (Vallecas, *wild type* WT), mutantes (doble mutante en *Gyc89Da* y *Gyc89Db*: (w^{1118} ; ;Pbac {w1mC1/4RB}Gyc89Da^{e01821}, Mi{3xP3-EGFP.ET1}Gyc89Db^{MB03197}) y transgénicas (w^{1118} ; UAS-Gyc89Db y w^{1118} ; P{w[+mW.hs]=GawB}c855a), gentileza del Prof. David Morton (Oregon Health & Science University, USA), Figura 6.

Las moscas se encontraban en el Departamento de Biología del Neurodesarrollo del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Aquí se mantuvieron en tubos con alimento a base de harina de maíz, levadura y glucosa (ver receta en anexo), en incubadora en condiciones estándar, a 25°C, con un ciclo de 12h/12h luz/oscuridad y una humedad relativa de 60%.

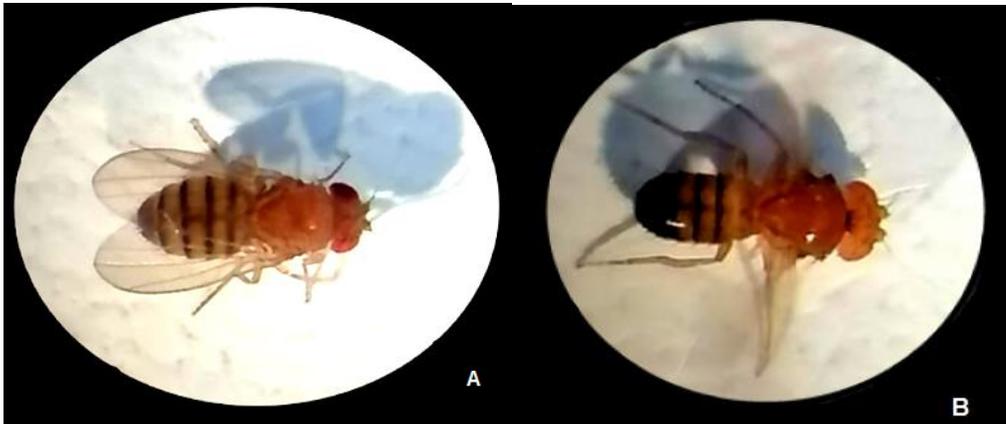


Figura 6. Moscas adultas de *Drosophila melanogaster*. A. Hembra. B. Macho. Imágenes obtenidas sobre la lupa binocular del laboratorio.

7.2. Procedimiento de disección, fijación e inmunofluorescencia *in situ*.

Para cumplir con el primer objetivo:

Primero se procedió a realizar la disección de cerebros de larvas de *D. melanogaster* de tercer estadio (L3) de doble mutantes de falta de función de *Gyc89Da* y *Gyc89Db* (grupo experimental) y grupo control elegido (w^{1118}). La misma se comenzó seleccionando las larvas L3 desde sus frascos (Figura 7.A), luego bajo microscopio óptico binocular (lupa) (Figura 7.B) y con pinzas de disección cuidadosamente se iba retirando los tejidos circundantes al tejido de interés (Figura 7.C). Posteriormente se fijaron los cerebros en paraformaldehído (PFA 4%) durante 10 minutos. Se lavaron 3 veces con PBS-Triton X-100 0,5% (PBS-T).

Posteriormente, se incubaron en anticuerpo primario de conejo anti- Histona H3 fosforilada (anti-PH3, 1:200, Cell Signaling Technologies #9713) como marcador de mitosis por 24hs. Luego se lavaron 3 veces con PBS-T, seguido de una incubación por

24hs en el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado a un fluoróforo (Alexa 488) para detectar y amplificar el primario. Una vez terminado el tiempo de inmunomarcación de anticuerpos, se procedió a teñir con Faloidina conjugada con Rodamina (Sigma-Aldrich) para detectar la actina filamentosa como marcador de la estructura celular y Verde de metilo (Sigma-Aldrich) para el ADN como marcador de núcleos totales (Prieto, Aparicio, Morande, Zolessi, 2014).

Luego se lavaron 3 veces con PBS-T, se colocaron sobre portaobjetos, con una gota de glicerol (80%) para clarificarlos y se sellaron con un cubreobjetos y pegamento. Esto se mantuvo por 24hs a -20°C , para luego llevarlos al microscopio confocal para ver los resultados de las inmunotinciones (Figura 11).



Figura 7: Secuencia de avance hacia la disección de cerebros de *D. melanogaster*. A. Cultivo de cepas en tubo con su alimento a base de harina de maíz, levadura y glucosa, en incubadora en condiciones de 25°C y 60% de humedad con 12h/12h luz-oscuridad, a partir de estos se seleccionaban las larvas de *D. melanogaster* en su tercer estadio (L3). B. Larva L3 observada en lupa binocular. C. Cerebro diseccionado de larva L3.

7.3. Uso del sistema GAL4-UAS.

Para cumplir con el segundo objetivo planteado:

Se implementó un cruzamiento genético de cepas transgénicas de *D. melanogaster* empleando el sistema GAL4-UAS (Brand y Perrimon, 1993), Figura 8, (w^{1118} GAL4^{c855a} × w^{1118} UAS-Gyc89Db), con el fin de dirigir la expresión ectópica de Gyc89Db al NE del OL del cerebro de las larvas L3 (grupo experimental w^{1118} GAL4^{c855a} w^{1118} UAS-Gyc89Db). Como grupo control se utilizaron los parentales w^{1118} GAL4^{c855a} y w^{1118} UAS-Gyc89Db. Como grupo externo se utilizaron moscas de genotipo salvaje (Vallecas, wild type WT). El sistema GAL4-UAS (Brand y Perrimon, 1993), Figura 8, permite el control de la expresión de un gen de interés en un grupo de células o en un tejido a elección de forma específica. Brevemente, consiste en la acción de dos módulos genéticos que inicialmente están separados en dos cepas de moscas diferentes. Al cruzar estas dos cepas ambos módulos se combinan y activan. Uno de los módulos contiene un promotor que dirige la expresión del gen de levadura GAL4 hacia un grupo celular o un tejido específico de la mosca. El otro módulo contiene una secuencia de unión para la proteína GAL4 llamada UAS (upstream activation sequence) unida corriente arriba a una secuencia codificante de interés (por ejemplo: la proteína fluorescente verde, GFP). De este modo, en la progenie se expresará la proteína GAL4 en un tejido específico determinado por el promotor usado (c855a en este caso para dirigir al NE del OL),

donde a su vez se activará la expresión del gen de interés a través de la unión al elemento UAS. Las posibilidades que ofrece el sistema son varias, desde la sobreexpresión de un gen, su expresión ectópica, e incluso el silenciamiento de su expresión utilizando ARN de interferencia. En este trabajo, se utilizó el sistema GAL4-UAS para dirigir la expresión ectópica de Gyc89Db en el NE del OL.

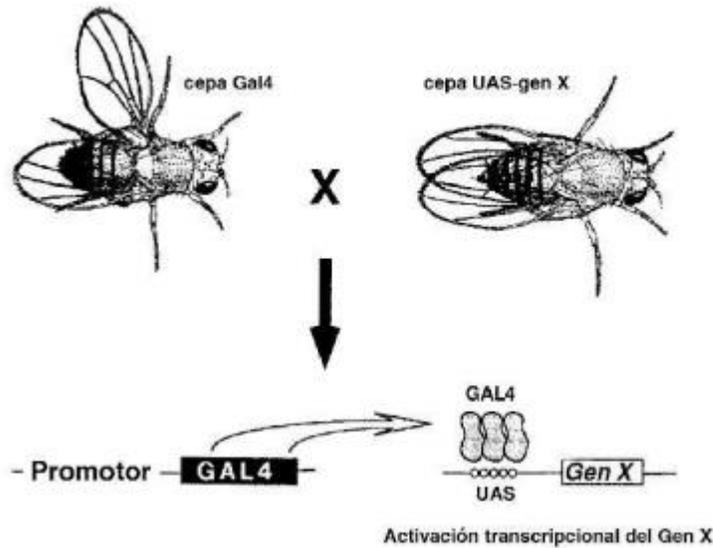


Figura 8: Sistema GAL4-UAS para la expresión ectópica de genes de *Drosophila melanogaster*. La activación de la secuencia UAS y la consecuente expresión del Gen X por la unión del GAL4 a su secuencia de reconocimiento UAS cuya expresión es a su vez controlado por un promotor de *Drosophila* específico de célula o tejido. Imagen obtenida de la tesis de grado de Baccino, 2013.

Se hizo la disección de los cerebros L3 tal como fue detallado anteriormente. Posteriormente se fijaron paraformaldehído (PFA 4%) durante 10 minutos. Se lavaron 3 veces con PBS-Triton 0,5% (PBS-T) y se incubaron en anticuerpo primario primario de conejo anti- Histona H3 fosforilada (anti-PH3, 1:200, Cell Signaling Technologies #9713) como marcador de mitosis por 24hs. Luego se lavaron 3 veces con PBS-T, seguido de una incubación por 24hs en el anticuerpo secundario e cabra anti-conejo conjugado a un fluoróforo (Alexa 488) para detectar y amplificar el primario. Una vez terminado el tiempo de inmunomarcación de anticuerpos, se procedió a teñir con Faloidina conjugada con Rodamina (Sigma-Aldrich) para detectar la actina filamentosa como marcador de la estructura celular y Verde de metilo (Sigma-Aldrich) para el ADN como marcador de núcleos totales (Prieto et al., 2014).

Luego se lavaron 3 veces con PBS-T, se colocaron sobre portaobjetos, con una gota de glicerol (80%) para clarificarlos y se sellaron con un cubreobjetos y pegamento. Esto se mantuvo por 24hs a -20°C, para luego llevarlos al microscopio confocal para ver los resultados de las inmunotinciones (Figura 11).

7.4. Microscopía confocal y adquisición de imágenes

Las imágenes de los cerebros de *Drosophila melanogaster* fueron tomadas con un microscopio láser confocal Zeiss LSM800 de la Plataforma de Microscopía Confocal en el IIBCE.

7.5. Análisis de imágenes

Todos los análisis cuantitativos se realizaron mediante programas informáticos libres y de código abierto. El procesamiento y análisis de imágenes lo realicé con Fiji-ImageJ, un paquete de procesamiento de imágenes de código abierto que agrupa ImageJ, un programa de procesamiento de imágenes científicas multidimensionales, y una serie de complementos para su análisis de imágenes (Schindelin et al., 2012).

Se segmentaron las imágenes (Figura 10), para delimitar una o varias regiones dentro de la imagen que abarquen únicamente a los objetos de interés (la región del NE en el OL, dado que como se detalló previamente es la región de mayor proliferación celular del cerebro de la mosca *D. melanogaster*). Como orientación se utilizó la Figura 9, excluyendo al resto de la imagen, a partir de las imágenes marcadas con Faloidina conjugada a Rodamina (estructura celular) utilizadas como guía para luego conseguir los volúmenes resultantes de dicha región que estén marcados con fosfato-histona H3 positiva PH3 y verde de metilo.

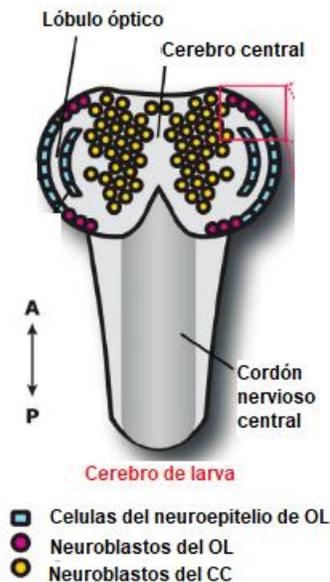


Figura 9: Anatomía del cerebro larval de *Drosophila melanogaster*. El sistema nervioso de las larvas de *Drosophila* está compuesto por el cordón nervioso ventral, el cerebro central y los lóbulos ópticos. Lóbulo óptico (OL). Cerebro central (CC). Imagen tomada y modificada del artículo Egger, Gold y Brand (2011).

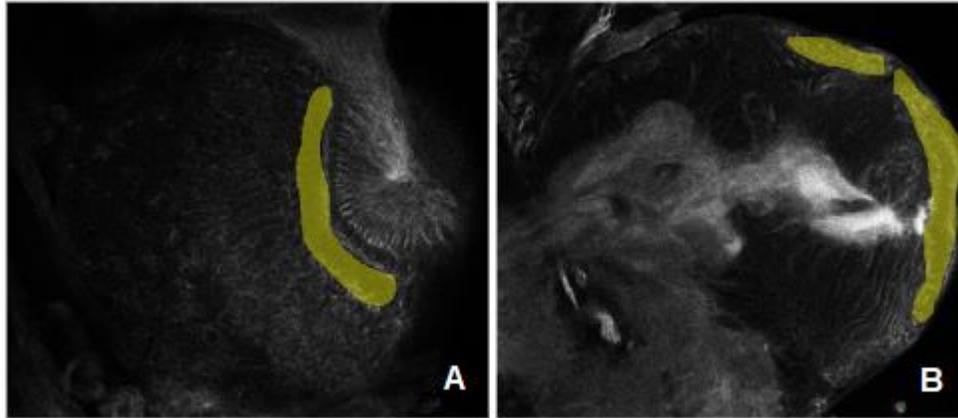


Figura 10: A y B. Lóbulo óptico del cerebro *Drosophila melanogaster*. Imágenes cargadas al programa Fiji-Imagen J donde seleccioné la zona del OL para que el programa cuantifique los objetos de interés para cada objetivo.

Para reproducibilidad del procedimiento, así como para su implementación en diversas aplicaciones, se elaboró un Manual de Segmentación (Rosas y Prieto, 2020) (ver en Anexo).

Con el mismo programa y a partir de estos volúmenes resultantes, ajustando según la imagen el umbral que abarcara más objetos, se cuantificaron las células proliferantes (imágenes del canal de la PH3) y de núcleos totales (imágenes del canal del Verde de metilo para el ADN). Esos datos se tabularon para cada experimento y sus grupos controles (ver Figuras y Tablas en Resultados).

7.6. Análisis de datos

Para el procesamiento de los datos obtenidos, así como la realización de gráficos y la aplicación de tests estadísticos, se utilizó el programa R/Rstudio.

Se realizó un test de normalidad Shapiro-Wilk (Shapiro y Martin, 1965). Los datos obtenidos en Fiji-ImageJ no tuvieron una distribución normal, por lo tanto se procedió a analizar a los mismos con un test no paramétrico, Mann-Whitney-Wilcoxon.

Se calcularon las medianas de los diferentes genotipos, acompañadas de su mínima y su máxima cantidad de núcleos totales y de células proliferantes cuantificadas en cada caso.

Se empleó un análisis de poder con pseudoréplicas (bootstrap) para determinar el tamaño óptimo de las muestras experimentales. Utilizando la distribución empírica de los datos como resultados piloto y extendieron a 1000 pseudoréplicas con un número creciente de muestras. Mediante interpolación se obtuvo el número de muestras necesario para un poder estadístico del 60%.

El script que se elaboró para el análisis de los datos se encuentra disponible en <https://github.com/IIBCE-BND/neuroepitelio/blob/master/graficos.R>.

8. RESULTADOS

Mediante la técnica de inmunomarcación se cuantificaron las células proliferantes y células totales del NE del OL de los doble mutante de falta de función de dos de las asGCs *Gyc89Da* y *Gyc89Db* y las larvas L3 de moscas transgénicas con expresión ectópica de *Gyc89Db* en el NE del OL, comparándolas con sus respectivos controles. En la Figura 11 se muestran las imágenes que se obtuvieron mediante el microscopio confocal con cada tinción utilizada.

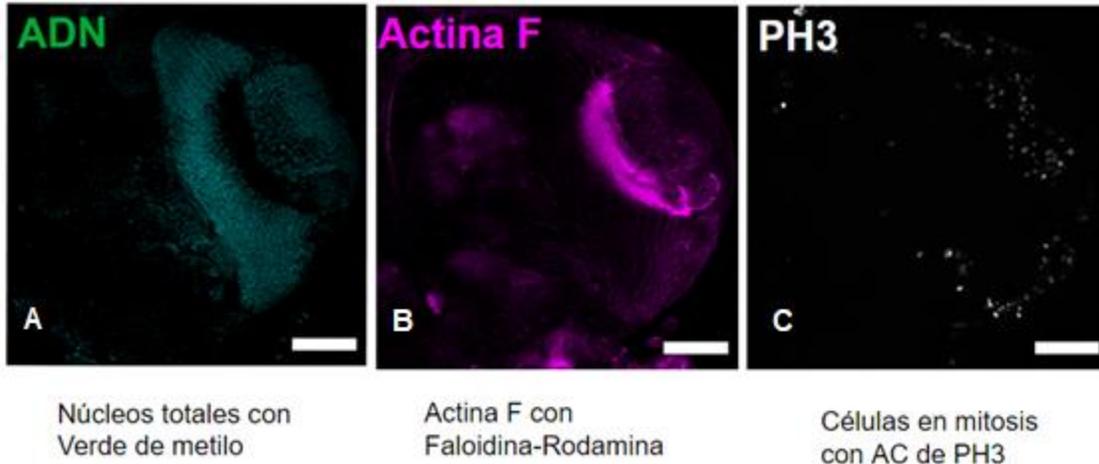


Figura 11: Imágenes obtenidas en microscopio confocal con las distintas tinciones. A. núcleos totales marcados con verde de metilo. B. actina filamentosa de cada célula proliferante marcada con faloidina-rodamina. C. células en mitosis marcadas con anticuerpos para PH3. Imágenes propias tomadas con el microscopio confocal en IIBCE. Barra de escala: 300 μ m.

El conjunto de imágenes obtenidas se utilizó para cargar en el programa de Fiji-Imagen J, y realizar la segmentación de las zonas del OL de las larvas L3 de *Drosophila melanogaster*, según lo que me interesaba cuantificar en cada caso (Figura 10).

A pesar de que inicialmente se planteó como primer objetivo específico cuantificar células proliferantes en el doble mutante en *Gyc89Da* y *Gyc89Db*, y como segundo objetivo específico cuantificar núcleos totales en el cruce transgénico (w^{1118} GAL4^{c855a} \times w^{1118} UAS-*Gyc89Db*), al momento de la práctica se hallaron los resultados de ambos objetivos en cada grupo experimental y sus respectivos controles.

En la Figura 12 se muestran los resultados de la cuantificación comparativa de las células proliferantes encontradas en el NE del OL de los grupos experimentales: doble mutante con falta de función de *Gyc89Da* y *Gyc89Db*, y transgénicos con expresión ectópica de *Gyc89Db* (w^{1118} GAL4^{c855a} \times w^{1118} UAS-*Gyc89Db*), con sus respectivos grupos controles: w^{1118} y los parentales del cruzamiento w^{1118} GAL4^{c855a} y w^{1118} UAS-*Gyc89Db*.

En los grupos experimentales hubo una mediana de (63,50 \pm 24,58) células proliferantes en el NE del doble mutante en *Gyc89Da* y *Gyc89Db*, una mediana de (71,50 \pm 26,50) células proliferantes en el NE en el cruzamiento (GAL4^{c855a} \times UAS-*Gyc89Db*); frente a una mediana de (55 \pm 28,33) células proliferantes en el NE del grupo control w^{1118} , una mediana de (64 \pm 25,39) células proliferantes en el NE del grupo control UAS-*Gyc89Db*, y una mediana de (47,25 \pm 14,52) células proliferantes en el NE del grupo control GAL4^{c855a} (Tabla 1 y Figura 12).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas con los parámetros de corte que se seleccionaron (las diferencias entre los datos no son mayores al 5%), entre

la cantidad de células proliferantes del NE de los grupos experimentales y sus controles (Figura 12).

Se introdujo una comparación con moscas del genotipo wild type Vallecas, cepa que no se utilizó ni para la preparación de los mutantes ni de los transgénicos. La inclusión de este grupo se hizo con fines comparativos, para tener una referencia de un genotipo silvestre.

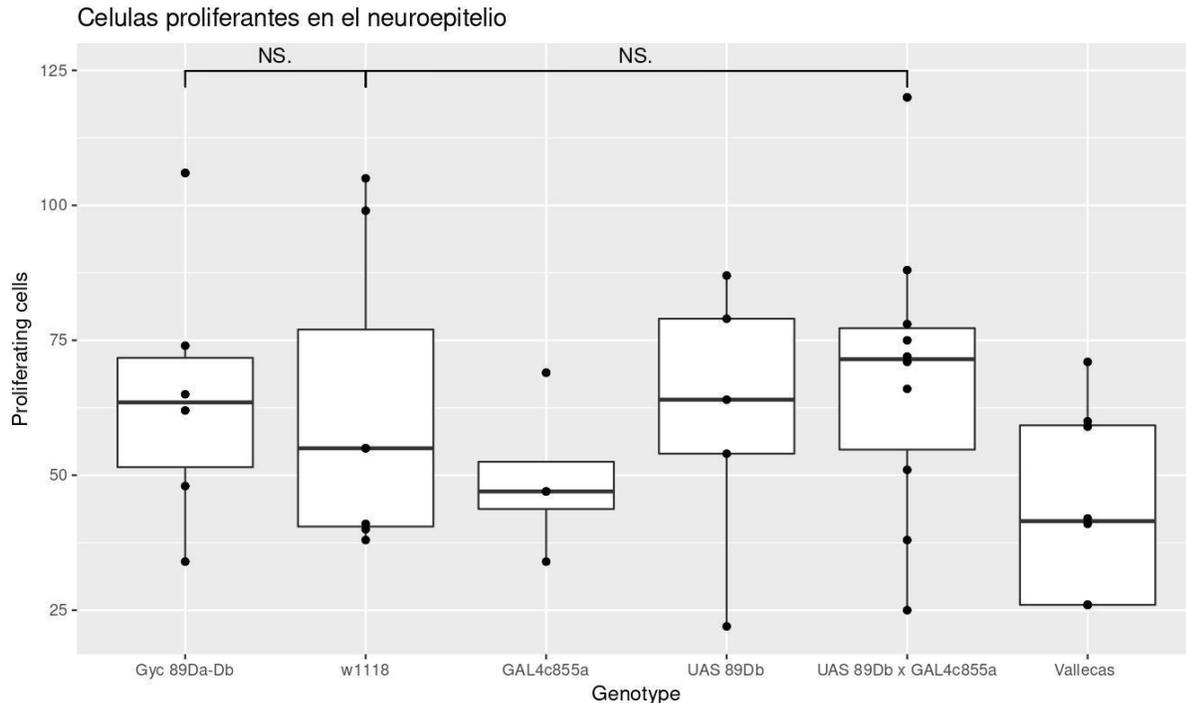


Figura 12: cuantificación estadística de las células proliferantes encontradas en el NE del OL de larvas L3 de *Drosophila*.

En la Figura 13 se muestra la comparación entre la cuantificación de los células totales encontrados en el NE del OL de los grupos experimentales y sus respectivos controles. Se encontró una mediana de $156,5 \pm 49,87$ células totales en el doble mutante con falta de función en *Gyc89Da/Db*, y $118 \pm 73,83$ células totales en el cruzamiento $w^{1118} GAL4^{c855a} \times w^{1118} UAS-Gyc89D$; frente a las siguientes medianas de los grupos control: $160 \pm 57,87$ células totales en el grupo control de w^{1118} , $255 \pm 94,42$ células totales $w^{1118} UAS-Gyc89Db$ y $206 \pm 63,29$ células totales en $w^{1118} GAL4^{c855a}$ (Tabla 2 y Figura 13).

Del mismo modo, en estos resultados tampoco parecen haber diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales y sus respectivos controles, el cruzamiento con uno de sus parentales, $w^{1118} UAS-Gyc89Db$, sí se encontró una diferencia mayor a 0.05.

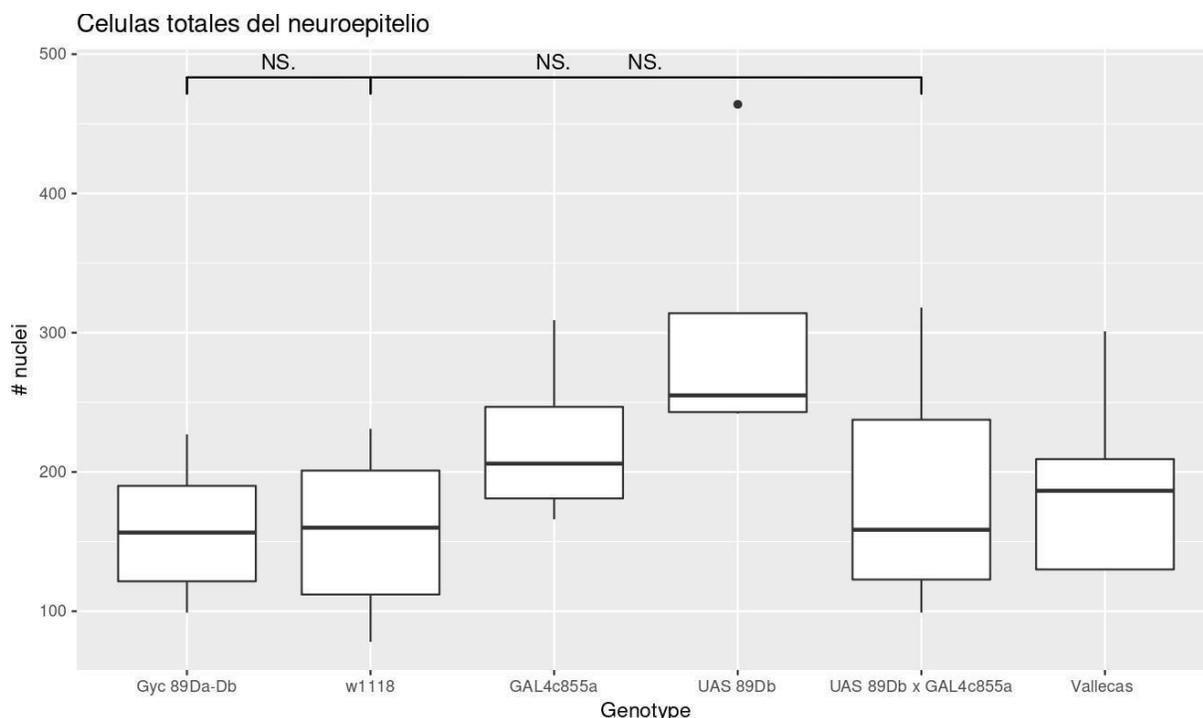


Figura 13: comparación estadística de la cuantificación de células totales del NE del OL de cerebros de larvas L3 de *Drosophila*.

En las Tablas 1 y 2 se muestra el cálculo que se realizó con el mismo programa informático de la mediana con la cantidad mínima y máxima correspondientes de cada grupo.

Experimento	Cantidad mínima	Mediana	Cantidad máxima
w¹¹¹⁸	38	55 ± 28,33	105
Gyc89Da/Db	34	63,5 ± 24,58	106
Vallecas	41	59 ± 12,86	71
w¹¹¹⁸ UAS-Gyc89Db	22	64 ± 25,39	87
w¹¹¹⁸ GAL4^{c855a}	34	47,25 ± 14,52	69
w¹¹¹⁸ GAL4^{c855a} x w¹¹¹⁸ UAS-Gyc89Db	25	71,50 ± 26,50	120

Tabla 1: Células proliferantes del NE del OL de larvas L3 de *Drosophila*.

Experimento	Cantidad mínima	Mediana	Cantidad máxima
w¹¹¹⁸	78	160 ± 57,87	231
Gyc89Da/Db	99	156,5 ± 49,87	227
Vallecas	185	195 ± 50,92	301
w¹¹¹⁸ UAS-Gyc89Db	242	255 ± 94,42	464
w¹¹¹⁸ GAL4^{c855a}	166	206 ± 63,29	309
w¹¹¹⁸ GAL4^{c855a}x w¹¹¹⁸ UAS-Gyc89Db	99	118 ± 73,83	170

Tabla 2: Células totales del NE del OL de larvas L3 de *Drosophila*.

Los resultados obtenidos sugieren que no se detectaron diferencias significativas en el número de células proliferantes ni en núcleos totales entre los grupos experimentales. Para determinar cuál sería el diseño experimental óptimo que nos permita tener certeza de que no existen tales diferencias utilizamos nuestros datos como experimento piloto en una aproximación de tipo bootstrap, y determinamos que se necesitarían 90 cerebros de cada grupo para dar por confirmados los resultados encontrados.

9. DISCUSIÓN

La respuesta tradicional a la hipoxia incluye acumulación nuclear de HIF/Sima, sobreexpresión de lactato deshidrogenasa y crecimiento de traqueolas (Lavista-Llanos et al., 2002; Centanin et al., 2008).

Resultados previos del grupo de trabajo del Departamento de Biología del Neurodesarrollo del IIBCE demostraron que durante el desarrollo larval en el OL no están presentes estas características típicas de la respuesta tradicional a la hipoxia asociadas a la vía HIF/Sima. Solo unas pocas células acumulan Sima en su núcleo, no existe expresión preponderante de lactato deshidrogenasa ni se detecta aumento de la traqueolación (Baccino-Calace et al., 2020). Esto sugiere la existencia de una vía alternativa en el cerebro en desarrollo.

Dado que no hay respuesta típica a la hipoxia en un tejido hipóxico como lo es la zona proliferativa del OL (Baccino-Calace et al., 2020), y que las asGCs serían posibles sensores alternativos que no aún se han explorado en profundidad, nos planteamos estudiarlas en un nicho de células madre hipóxicas (el NE del OL en larvas L3 de *D. melanogaster*). Suponiendo que la hipoxia regulara de alguna manera el nicho de células madre, uno de los posibles parámetros que podría afectar es el número de células o su estado proliferativo (los acontecimientos que se podrían alterar serían: la proliferación, la diferenciación o la muerte celular). En este caso, estudiar el número de células totales nos daría una idea sobre estos tres eventos (si hubiera más células será por más proliferación o menos diferenciación, si hubiera menos células será por más diferenciación o por muerte celular). La medida de proliferación nos permite diseccionar un poco más el proceso.

Para cumplir con el primer objetivo específico se cuantificaron las células proliferantes del NE en el doble mutante con falta de función de Gyc89Da y Gyc89Db, y en el grupo control w^{1118} , como resultado en las regiones de corte que se seleccionaron no se observaron diferencias significativas en la cantidad de células proliferantes (y células totales) comparando el grupo control y el grupo experimental utilizados (Figura 12 y Tabla 1).

La elección de utilizar moscas con pérdida de función de dos de las tres subunidades de asGCs que tiene *Drosophila*, viene en primer lugar porque era con los ejemplares que teníamos disponibles en el laboratorio gracias al obsequio de Morton. Y en segundo lugar, también basados en artículos de Morton es que estas subunidades funcionan como heterodímeros, entonces al eliminar dos de las tres que presenta, ya se está eliminando la mayor parte de su función.

Como la pérdida de función no pareció mostrar diferencias se decidió en el grupo de investigación preguntarse qué pasaba al expresar ectópicamente la Gyc89Db. Es por ésta razón que apareció el planteo del segundo objetivo específico.

Para cumplir con el segundo objetivo específico se desarrollaron moscas, a partir de cruce de cepas w^{1118} GAL4^{c855ax} w^{1118} UAS-Gyc89Db, que expresaran ectópicamente la subunidad asGC Gyc89Db en el NE del OL, del mismo modo que lo anterior, se cuantificaron la cantidad de células totales (y células proliferantes) en este grupo experimental y en sus parenterales utilizados como grupo control. En estos resultados tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales y sus controles en las regiones de corte que fueron seleccionadas, pero sí se encontraron

diferencias significativas con el parental $w^{1118}UAS-Gyc89Db$ ($p \geq 0.05$) (Figura 13 y Tabla 2). Esta diferencia podría explicarse por la utilización de moscas con base genética en w^{1118} . Este gen *white* está localizado en el cromosoma X, en este trabajo no se sexaron las larvas, entonces los resultados podrían haber sido diferentes si se hubiera tenido esto presente, quizás cambiarán los hallazgos.

La elección de utilizar moscas transgénicas con expresión ectópica de una de las tres subunidades de las asGCs, la *Gyc89Db*, fue en primer lugar por el tiempo, generar una mosca con la expresión ectópica de dos o tres subunidades llevaría más tiempo del que teníamos disponible para trabajar en este ensayo experimental. También tiene otra justificación que es que al no saber cuáles de las tres estaría actuando, y conocer su comportamiento como dímeros o heterodímeros, alcanzaba con expresar uno por demás para que la función se vea aumentada.

En mi conocimiento y en la literatura consultada este es el primer trabajo que cuantifica dichos valores. Por este motivo, hemos elaborado un manuscrito que adjunto en Anexo, el cual se intentará publicar a la brevedad en una revista científica.

Para el desarrollo del cerebro es necesario un equilibrio entre proliferación y diferenciación celular. La proliferación se da a partir de células madres, y éstas se encuentran en un nicho hipóxico (Baccino, 2016; Panchision, 2009). Las variaciones en la tensión de oxígeno pueden alterar dicho equilibrio.

Lo que se pudo determinar indirectamente con estos resultados fue que a pesar utilizar moscas de *Drosophila* con falta de función de dos de las subunidades de asGCs y moscas transgénicas con expresión ectópica de una de las subunidades de asGCs, las cuales fueron consideradas en la hipótesis como un posible sensor de oxígeno en las células madres del OL, igualmente hubo proliferación, por tanto, debería que haber otro mecanismo que le permita a estas células lograr su capacidad de proliferación y diferenciación. O quizás estos resultados se expliquen porque éstas subunidades no tengan importancia en el momento del desarrollo de la larva L3 que fue el que se utilizó para realizar esta investigación.

La presente tesis se encuentra dentro de un grupo de investigaciones que formaron parte del posdoctorado de mi tutor Dr. Daniel Prieto donde también se logró llegar a determinaciones interesantes acerca de estos resultados: la pérdida de función de *Gyc89Da/Gyc89Db* no produce una diferencia de tamaño del cerebro o su lóbulo óptico, el número de neuroblastos no se afecta tampoco con esta pérdida de función de las asGC, aunque sí produce un incremento de tamaño en el cerebro central en *Drosophila* (Prieto et al., 2022).

Se utilizó el sistema GAL4-UAS para expresar ectópicamente *Gyc89Da* y *Gyc89Db*, en la población de células madres, bajo el control de drivers específicos de tipos celulares: *c855a* para células neuroepiteliales. Se comprobó que la expresión ectópica de estas proteínas hizo el OL más grande en volumen, también aumentó el número de neuroblastos, células proliferantes totales y neuroblastos proliferantes (Prieto et al., 2022). Resultados distintos a los encontrados en mi ensayo experimental, pero explicados tal vez por la expresión ectópica de dos subunidades

Las tensiones más bajas de oxígeno influyen positivamente en la biología de las células madre (Panchision, 2009).

Las asGCs son sensibles al oxígeno y se han relacionado con regulación del volumen del OL y del número de neuroblastos (Prieto et al., 2022). Según los resultados de esta tesis la pérdida contextual de la función y los experimentos dirigidos de ganancia de función no revelaron ningún efecto observable en el número de células neuroepiteliales o proliferación en el tercer estadio larvario (L3).

A pesar de no expresarse normalmente en células del NE en L3, la expresión ectópica de Gyc89Db en el NE aumenta el volumen del OL y el número de neuroblastos, se sugiere que estos fenómenos ocurren antes de L3 sin alteración persistente del NE. Asimismo, una mutación nula de Gyc88E también aumenta el volumen de OL sin alterar el número de neuroblastos (Prieto et al., 2022, manuscrito inédito).

Las ramas terminales traqueales de *Drosophila* son plásticas y tienen la capacidad de hacer brotar proyecciones hacia áreas hipóxicas (Jarecki et al., 1999), en un proceso análogo a la angiogénesis de los mamíferos. En la larva en desarrollo de *Drosophila*, el cerebro central está mucho más traqueolado que el OL (Misra et al., 2017), y por tanto, el OL se encuentra más hipóxico en comparación con el cerebro central.

Baccino-Calace et al., 2020 usando un nuevo biosensor de hipoxia, encontraron que hacia el final de la vida larvaria la asimetría en la densidad de las traqueolas observada se correlaciona con la asimetría en los niveles de hipoxia, con el lóbulo óptico menos oxigenado que el cerebro central. Por tanto, existe una estrecha correlación topográfica entre una traqueolación densa del cerebro central y una traqueolación escasa en los lóbulos ópticos, donde no hay sinapsis, sino células progenitoras y progenie neuronal inmadura.

Las traqueolas y las células indiferenciadas se separan espacialmente dentro del cerebro larvario. Los autores Baccino-Calace et al., 2020 observaron a partir de microscopía láser confocal y microscopía electrónica de transmisión que el cerebro central contiene la mayoría de las traqueolas y sinapsis, pero el OL tiene muy pocas traqueolas y sinapsis.

Además, el lóbulo óptico de la larva está enriquecido en células progenitoras proliferativas y células inmaduras, mientras que la mayoría de las neuronas diferenciadas se encuentran en el cerebro central. A partir de datos de microscopía electrónica de transmisión Baccino-Calace et al., 2020 observaron las neuronas diferenciadas del cerebro central con una relación núcleo/citoplasma baja y células indiferenciadas en el lóbulo óptico, con mucho menos citoplasma. Las neuronas diferenciadas son más grandes y contienen un citoplasma más bien diferenciado, enriquecido en orgánulos como mitocondrias, cisternas del retículo endoplásmico rugoso, cisternas de Golgi y otros organelos. Las neuronas inmaduras en el lóbulo óptico están menos diferenciadas que las neuronas del cerebro central y muestran un anillo delgado de citoplasma alrededor del núcleo.

En una etapa tardía del desarrollo larvario, 96 h después de la eclosión de las larvas, el lóbulo óptico escasamente traqueolado parecía estar hipóxico en relación con el cerebro central densamente traqueolado (Misra et al., 2017).

Para investigar si esta condición era específica para esa etapa particular de la vida de las larvas o prevalece durante un intervalo de desarrollo más largo y, por lo tanto, tiene una relevancia potencial para el desarrollo del cerebro, Baccino-Calace, et al., 2020 ampliaron su análisis a siete puntos de tiempo que abarcan el desarrollo de las larvas en intervalos de 12 h, de 24 a 96 horas. Aquí encontraron que la segregación de

traqueolas existe a las 24 h y persiste a lo largo de la vida larval. De este modo, confirmaron que el lóbulo óptico crece de tamaño durante este tiempo.

Observaron también que las traqueolas crecieron considerablemente en longitud total durante este tiempo, y que la proporción de tejido del lóbulo óptico desprovisto de traqueolas pareció aumentar con la edad. La longitud de la traqueola crece a medida que aumenta el volumen del lóbulo óptico durante el desarrollo larvario.

Tanto el lóbulo óptico como sus traqueolas crecen continuamente a lo largo de la vida larvaria. Utilizando un sensor de hipoxia basado en HIF-1 α /Sima (Misra et al., 2017), sus resultados sugieren fuertemente que la traqueolación densa del cerebro central da como resultado una mayor oxigenación de este compartimento en comparación con el lóbulo óptico escasamente traqueolado.

Las células terminales traqueales pueden detectar la hipoxia a través del sensor de oxígeno, Fatiga, lo que resulta en la acumulación de la subunidad Sima de HIF-a en estas células. La acumulación de Sima provoca la inducción de Btl, y los niveles aumentados del receptor Btl sensibilizan las células a los niveles disponibles del ligando Branchless, lo que da como resultado el crecimiento de la rama terminal. En tejidos no traqueales, como el ectodermo, la ausencia de ramas (Bnl) se induce coordinadamente en la hipoxia; Sima es necesario, pero no suficiente, para la inducción de bnl (Centanin et al., 2008). Las células traqueales responden a la hipoxia de forma autónoma, promoviendo la acumulación de Sima, que induce la expresión del receptor Btl, aumentando así la sensibilidad de estas células al ligando Bnl. Al mismo tiempo, Bnl se induce en tejidos diana hipóxicos a través de un mecanismo que también implica la participación de Sima y sirve para señalar el crecimiento de ramas terminales hacia áreas privadas de O₂ (Centanin et al., 2008).

10. CONCLUSIÓN

No se encontraron diferencias significativas en la cuantificación de células del NE del OL en L3 de moscas *D. melanogaster* entre los grupos experimentales, moscas con pérdida de función de las asGCs y moscas con sobre expresión de asGCs Gyc89Db, y sus respectivos grupos controles.

Las subunidades de asGC Gyc89Da y Gyc89Db no regulan el nicho de las células madres neuroepiteliales durante el desarrollo del cerebro de las larvas L3 de *Drosophila*.

Esto da paso a nuevas incógnitas y perspectivas, ya que la progenie de esas células del NE sí aumenta en cantidad, sugiriendo que el cambio se da en el mecanismo de la diferenciación de éstas y no en su proliferación.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, J. M., Centanin, L., Dekanty, A., y Wappner, P. (2010). Oxygen sensing in *Drosophila*: Multiple isoforms of the prolyl hydroxylase Fatiga have different capacity to regulate HIF α Sima. *PLoS ONE*, 5(8), e12390.
- Agullo, L. (2007). *La vía del óxido nítrico/GMP cíclico*. Recuperado de <https://cgmp.lagullo.com/es-path.html>
- Apitz, H., y Salecker, I. (2015). A region-specific neurogenesis mode requires migratory progenitors in the *Drosophila* visual system. *Nature Neuroscience*, 18, 46-55.
- Baccino, M. (2013). *Cambios rítmicos en las mitocondrias de la terminal neuromuscular de Drosophila melanogaster* (Tesis de grado). Facultad de Ciencias, UDELAR, Montevideo.
- Baccino, M. (2016). *The role of oxygen supply in the regulation of neural stem cell proliferation in the brain of Drosophila* (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias, UDELAR, Montevideo.
- Baccino-Calace, M., Prieto, D., Cantera, R., y Egger, B. (2020). Compartment and cell type-specific hypoxia responses in the developing *Drosophila* brain. *Biology Open*, 9(8), bio053629.
- Bacon, N.C., Wappner, P., O'Rourke, J.F., Bartlett, S.M., Shilo, B., Pugh, C.W. y Ratcliffe, P.J. (1998). Regulation of the *Drosophila* bHLH-PAS protein Sima by hypoxia: functional evidence for homology with mammalian HIF-1. *Biochem. Biophysical Research Communications*, 249, 811-816.
- Brand, AH y Perrimon, N (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2):401-15.
- Bravo, A., y Baizabal Aguirre, V.M. (2005). La vía de señalización Notch y el desarrollo embrionario animal. *REB*, 24(3/4), 87-96.
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, 9, 653-660.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J. M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Keshet, E. (1998). Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 394, 485-490.
- Centanin, L., Dekanty, A., Romero, N., Irisarri, M., Gorr, T. A. y Wappner, P. (2008). Cell Autonomy of HIF Effects in *Drosophila*: Tracheal Cells Sense Hypoxia and Induce Terminal Branch Sprouting. *Developmental Cell*, 14, 547-558.

- Dunwoodie, S.L. (2009). The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Developmental Cell*, 17(6), 755-773.
- Egger, B., Boone, J.Q., Stevens, N.R., Brand, A.H., y Doe, C.Q. (2007). Regulation of spindle orientation and neural stem cell fate in the *Drosophila* optic lobe. *Neural Development*, 2. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-2-1>
- Egger, B., Gold, K.S., y Brand, A.H. (2010). Notch regulates the switch from symmetric to asymmetric neural stem cell division in the *Drosophila* optic lobe. *Development*, 137, 2981-2987.
- Egger, B., Gold, K.S., y Brand, A.H. (2011). Regulating the balance between symmetric and asymmetric stem cell division in the developing brain. *Landes Bioscience*, 5(3), 1-5.
- Emsley, John (2001). Oxygen. *Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements*. Oxford, Reino Unido: Oxford University Press. p. 297. ISBN 0-19-850340-7.
- Ferrara, N., Gerber, H.P., y LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9, 669-676.
- Folkman, J., y Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science*, 235, 442-447
- Ghabrial, A., Luschnig, S., Metzstein, M.M., y Krasnow, M.A. (2003). Branching morphogenesis of the *Drosophila* tracheal system. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19, 623-647.
- González, A. (2022). *Rol de la guanilato ciclasa soluble atípica (asGC) en la percepción del oxígeno durante el desarrollo del cerebro larvario de Drosophila melanogaster. caracterización de un biosensor de GMPc* (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias, PEDECIBA, UDELAR, Montevideo.
- Gorr, T.A., Tomita, T., Wappner, P., y Bunn, H.F. (2004). Regulation of *Drosophila* hypoxia-inducible factor (HIF) activity in SL2 cells: identification of a hypoxia-induced variant isoform of the HIFa homolog gene similar. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 36048-36058.
- Guillemin, K., Groppe, J., Ducker, K., Treisman, R., Hafen, E., Affolter, M., y Krasnow, M.A. (1996). The pruned gene encodes the *Drosophila* serum response factor and regulates cytoplasmic outgrowth during terminal branching of the tracheal system. *Development*, 122, 1353-1362.
- Hartenstein, V., Spindler, S., Pereanu, W., y Fung, S. (2008). The Development of the *Drosophila* Larval Brain. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 628, 1-31.

- Hofbauer, A., y Campos-Ortega, J.A. (1990). Proliferation pattern and early differentiation of the optic lobes in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 198(5), 264-274.
- Jarecki, J., Johnson, E., y Krasnow, M. A. (1999). Oxygen Regulation of Airway Branching in *Drosophila* Is Mediated by Branchless FGF. *Cell*, 99(2), 211-220.
- Langlais, K. K., Stewart, J. A., y Morton, D. B. (2004). Preliminary characterization of two atypical soluble guanylyl cyclases in the central and peripheral nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 207, 2323-2338.
- Lavista-Llanos, S., Centanin, L., Irisarri, M., Russo, D. M., Gleadle, J. M., Bocca, S. N., Wappner, P. (2002). Control of the Hypoxic Response in *Drosophila melanogaster* by the Basic Helix-Loop-Helix PAS Protein Similar. *Molecular and Cellular Biology*, 22, 6842-6853.
- Levy, A.P., Levy, N.S., Wegner, S., y Goldberg, M.A. (1995). Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 270(22), 13333-13340.
- Levy, A.P., Levy, N.S., y Goldberg, M.A. (1996a). Hypoxia-inducible protein binding to vascular endothelial growth factor mRNA and its modulation by the von Hippel-Lindau protein. *Journal of Biological Chemistry*, 271(41), 25492-25497.
- Levy, A.P., Levy, N.S., y Goldberg, M.A. (1996b). Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 271(5), 2746-2753.
- Ma, E., y Haddad, G. (1999). A *Drosophila* CDK5-like molecule and its possible role in response to O₂ deprivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 61(2), 459-463.
- Marshall, M. (2015). Cómo se creó el aire que respiramos. BBC.
- Melnattur, K.V., y Lee, C.H. (2011). Visual circuit assembly in *Drosophila*. *Developmental Neurobiology*, 71, 1286-1296.
- Metzger, R.J., y Krasnow, M.A. (1999). Genetic control of branching morphogenesis. *Science*, 284(5420), 1635-1639.
- Misra, T., Baccino-Calace, M., Meyenhofer, F., Rodriguez-Crespo, D., Akarsu, H., Armenta-Calderón, R., y Luschnig, S. (2017). A genetically encoded biosensor for visualizing hypoxia responses in vivo. *Biology Open*, 6(2), 296-304.

- Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., y Quiñones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell*, 7(2), 150-161.
- Mortimer, N. T., y Moberg, K. H. (2009). Regulation of *Drosophila* embryonic tracheogenesis by dVHL and hypoxia. *Developmental Biology*, 329(2), 294-305.
- Morton, D.B., (2004). Invertebrates Yield a Plethora of Atypical Guanylyl Cyclases. *Molecular Neurobiology*, 29(2), 97-116.
- Morton, D. B. (2011). Behavioral responses to hypoxia and hyperoxia in *Drosophila* larvae molecular and neuronal sensors. *Fly (Austin)*, 5(2), 119-125.
- Morton, D. B., Langlais, K. K., Stewart, J. A., y Vermehren, A. (2005). Comparison of the properties of the five soluble guanylyl cyclase subunits in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Science*, 5, 12.
- Morton, D. B., Stewart, J. A., Langlais, K. K., Clemens-Grisham, R. A., y Vermehren, A. (2008). Synaptic transmission in neurons that express the *Drosophila* atypical soluble guanylyl cyclases, Gyc-89Da and Gyc-89Db, is necessary for the successful completion of larval and adult ecdysis. *Journal of Experimental Biology*, 211, 1645-1656.
- Morton, D. B., y Vermehren, A. (2007). Soluble guanylyl cyclases in invertebrates: Targets for NO and O₂. *Advances in Experimental Biology*, 1, 65-82.
- Nagao, M., Ebert, B.L., Ratcliffe, P.J., y Pugh, C.W. (1996). *Drosophila melanogaster* SL2 cells contain a hypoxically inducible DNA binding complex which recognises mammalian HIF-binding sites. *FEBS Letters*, 387(2-3), 161-166.
- Nambu, J.R., Chen, W., Hu, S., y Crews, S.T. (1996). The *Drosophila melanogaster* similar bHLH-PAS gene encodes a protein related to human hypoxia-inducible factor 1a and *Drosophila* single-minded. *Gene*, 172(2), 249-254.
- Ngo, K.T., Andrade, I., y Hartenstein, V. (2017). Spatio-temporal pattern of neuronal differentiation in the *Drosophila* visual system: A user's guide to the dynamic morphology of the developing optic lobe. *Developmental Biology*, 428(1), 1-24.
- Ohshiro, T., y Saigo, K. (1997). Transcriptional regulation of breathless FGF receptor gene by binding of TRACHEALESS/dARNT heterodimers to three central midline elements in *Drosophila* developing trachea. *Development*, 124(20), 3975-3986.
- Panchision, D. M. (2009). The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 220(3), 562-568.

- Prieto, D., Aparicio, G., Morande, P. E. y Zolessi, F. R. (2014). A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green. *Histochemistry and Cell Biology*, 142(3), 335-345.
- Prieto, D., Egger, B., y Cantera, R. (2022). *Atypical soluble guanylyl cyclase subunit Gyc89Db augments optic lobe volume by increasing neuroblast number and cell proliferation in the Drosophila larval brain*. Manuscrito en preparación.
- Pugh, C.W., y Ratcliffe, P.J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature Medicine*, 9(6), 677-684.
- Romero, N. M., Dekanty, A., y Wappner, P. (2007). Cellular and Developmental Adaptations to Hypoxia: A *Drosophila* Perspective. *Methods in Enzymology*, 435, 123-144.
- Rosas, M., y Prieto, D. (2020). *Manual de segmentación en Image J*. Recuperado de https://github.com/IIBCE-BND/neuroepitelio/blob/master/Manual_de_segmentacion.pdf
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676-682.
- Shapiro, S. S., y Martin, B. W. (1965). An analysis of variance test for normality. *Biometrika*, 52, 591-611.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., y Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359(6398), 843-845.
- Simon, M. C., y Keith, B. (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 285-296.
- Sonnenfeld, M., Ward, M., Nystrom, G., Mosher, J., Stahl, S., y Crews, S. (1997). The *Drosophila* tango gene encodes a bHLH-PAS protein that is orthologous to mammalian Arnt and controls CNS midline and tracheal development. *Development*, 124(22), 4571-4582.
- Vermehren, A., Langlais, K.K., y Morton, D.B. (2006). Oxygen-sensitive guanylyl cyclases in insects and their potential roles in oxygen detection and in feeding behaviors. *Journal of Insect Physiology*, 52(4), 340-348.

- Vermehren-Schmaedick, A., Ainsley, J. A., Johnson, W. A., Davies, S. A., y Morton, D. B. (2010). Behavioral responses to hypoxia in drosophila larvae are mediated by atypical soluble guanylyl cyclases. *Genetics*, 186(1), 183-196.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., y Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(12), 5510-5514.
- Wappner, P., y Ratciffer, P. (2011). Development of branched structure and the cellular response to hypoxia: An evolutionary perspective. En G. Haddad y T. Xu (Ed.), *Genetic models in cardiorespiratory biology*, (Vol. 156, pp. 91-138). Boca Ratón: Marcel Denkker.

12. ANEXO

Materiales utilizados

- Tubos de plástico de 64 por 25 mm, con comida para moscas y tapones de algodón
- Portaobjetos de vidrio de 26x76mm
- Cubreobjetos de vidrio 22x22 mm
- Sellador (esmalte)
- Pincetas de acero inoxidable número 4 y 5
- Tubos eppendorf de 1.5 ml

Equipamiento

- Lupa binocular WESO SM-300 para disección de cerebros
- Vortex para lavado y tinción de cerebros?
- Heladera
- Microscopio láser confocal Zeiss LSM800
- Computadora con los programas ImageJ y R studio instalados
- Incubadora, configurada a 25°C, en períodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad

Soluciones

- Buffer Fosfato salino (PBS)
- Trietilamina para anestesia de moscas
- Glicerol 80%
- Comida de moscas:
 - Para preparar un litro se utilizaron:
 - 1 L de agua
 - 80 g de Agar
 - 50 g de levadura
 - 90 g de harina de maíz
 - 100 g de glucosa
 - 3 mL de ácido propiónico
 - 7 mL de Nipagina (preparada en solución, 10 g de nipagina en 70 mL de alcohol 95% y 30 mL de agua destilada)

- Procedimiento:
 - Se colocaron 750 mL de agua fría en una olla y se agregó la levadura. Se cocinó a fuego fuerte, revolviendo hasta alcanzar el primer hervor.
 - Por otro lado, se agregó el harina de maíz a 250 mL de agua y la mezcla se agregó a la olla una vez ésta había hervido, y se continuó revolviendo hasta que se alcanzaba el hervor nuevamente.
 - Se bajó el fuego y se agregó la glucosa, siempre revolviendo.
 - Se apagó el fuego y se esperó a que la temperatura de la preparación fuese de 60°C. Se agregó el ácido propiónico con la nipagina (mezcla de agentes antibióticos y antifúngicos). Por último, se dosifican los tubos.

Cómo extraer una región de interés en un canal mediante segmentación en otro canal guía*

Mariel Rosas
Daniel Prieto

Depto. de Biología del Neurodesarrollo, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

Este documento provee un método para obtener datos de un canal, segmentando una estructura anatómica en otro, a partir de datos multidimensionales de microscopía confocal. Para ello realizamos una segmentación semiautomática con TrakEM2.

Keywords: confocal, microscopía, TrakEM2, segmentación

Introducción

A menudo debemos extraer información de una estructura que podemos reconocer anatómicamente con un marcador, pero el dato que queremos extraer se encuentra en otro canal, donde no podemos delimitar estructuras (Fig. 1). El problema es sencillo cuando se trabaja con un único plano, pero cuando se trabaja con múltiples planos y canales el procesamiento manual se vuelve inviable. Dentro de la aplicación de FIJI (Schindelin et al. 2012) dado que en la sección de TrakEM2 (Cardona et al. 2012) para trabajar con imágenes de varios canales hay seguir una serie de pasos para poder separar una región interés pero seleccionando un área de otra imagen, se hizo este material de apoyo para poder realizarlo. En este caso utilizamos un grupo de imágenes apiladas (diferentes planos en el eje z) tomadas en un microscopio laser confocal. Los preparados fueron marcados con Faloidina conjugada a un fluorocromo para segmentar una región determinada de interés, y luego recuperar la misma región en un segundo (aunque pueden ser mas) canal. El segundo canal, en nuestro caso, esta marcado con anticuerpos anti-histona H3 fosforilada, corresponde a células proliferantes.

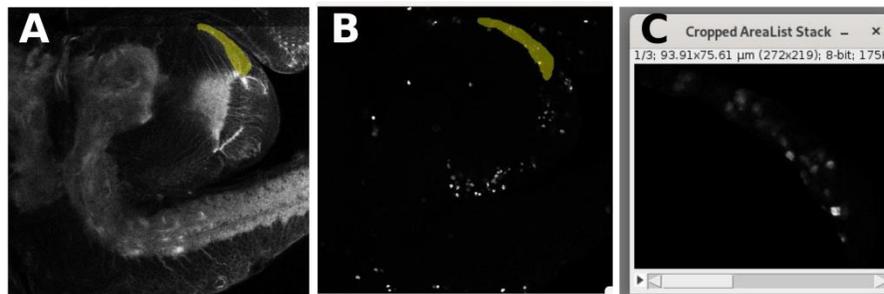


Figure 1: A. Canal utilizado para segmentar. B. Canal de interés. C. volumen segmentado resultante en el canal de interés.

*Replication files are available on the author's Github account (<http://github.com/danielprieto>). **Current version:**2.1; **Correspondence:** marielrosasaidaa@gmail.com, dprieto@fcien.edu.uy. This document has been written in Rmarkdown using the template designed by Steven Miller available at <https://github.com/svmiller/svm-r-markdown-templates>

Método

Si tenemos archivos con stacks multicanal, conviene separar los canales y guardarlos por separado. Sugerimos utilizar el formato OME-TIFF, y una nomenclatura conveniente.

1. Para elegir las (2) pilas de imágenes a segmentar: **File>Open>archivo en OME-TIFF**.
2. Para entrar a TrakEM2: **File>New>TrakEM2**, aquí aparecerá un cuadro para elegir donde guardar el archivo.
3. Ya dentro de dicha sección se hará CLICK DER sobre la imagen negra: **>Import >Stack**, se elegirá el canal que se quiera usar como guía de selección en el cuadro emergente (Fig.2) presionando: **Ok > Ok> Yes**.

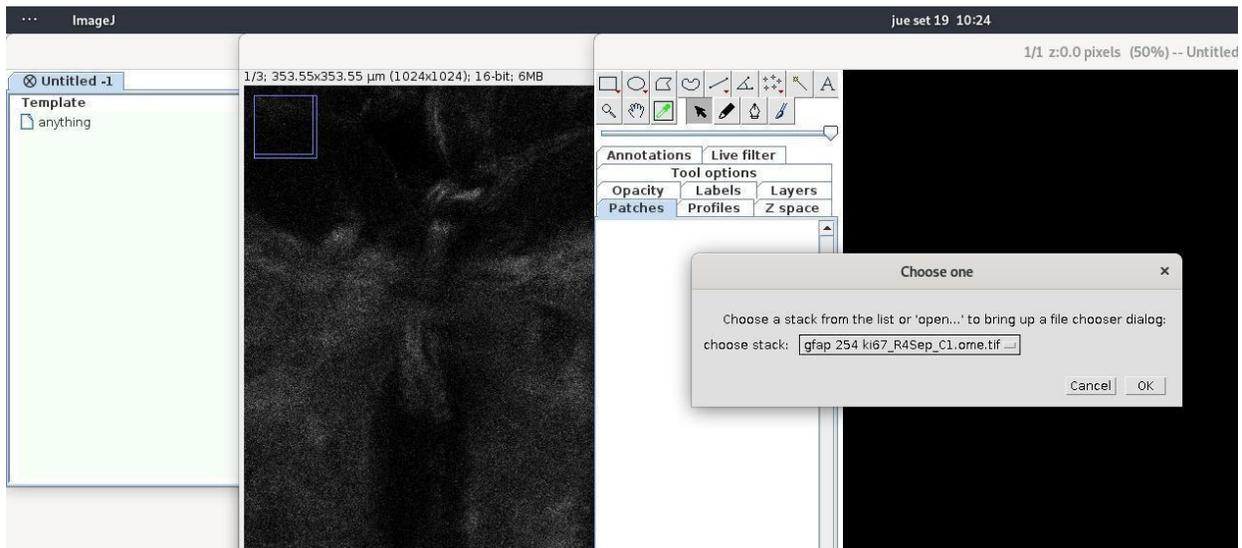


Figure 2: Cuadro emergente para seleccionar el canal de guía.

4. Seleccionar en Anything **CLICK DER >Add new chid> Area_list**, y sobre la ventana de Project Objects **CLICK DER >New anything> New area_list** (Fig.3).

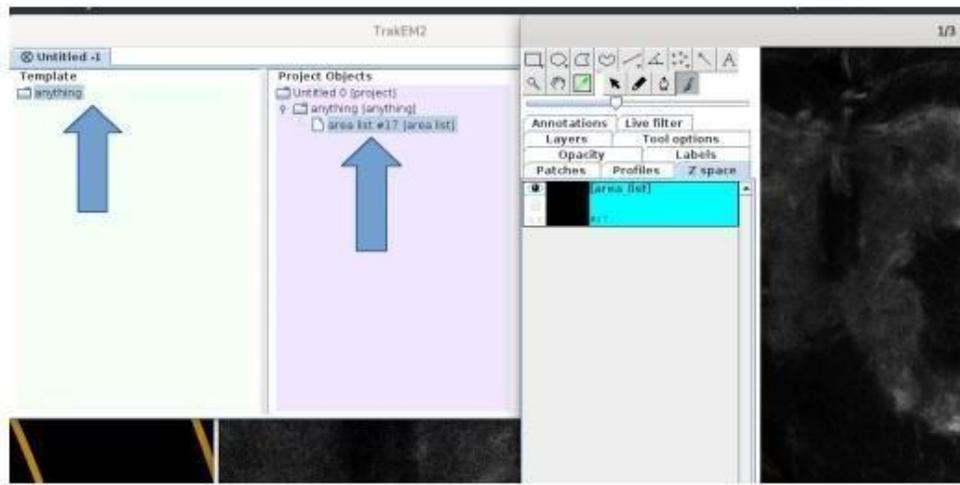


Figure 3: Las flechas celestes muestran el cuadro emergente de TrakEM, con las ventana de Anything (izq) y la de Project Objects (der).

5. Se volverá a la pantalla inicial y se importará el canal (o canales) de interés, con **CLICK DER >Import >Stack**, siempre en el Patches. Aparecerá un cuadro emergente (Fig.4) para elegir dicho canal, presionar: **OK> OK> YES**. En Patches tiene que quedar en la posición 1 en todas las capas la imagen que se usará como guía.

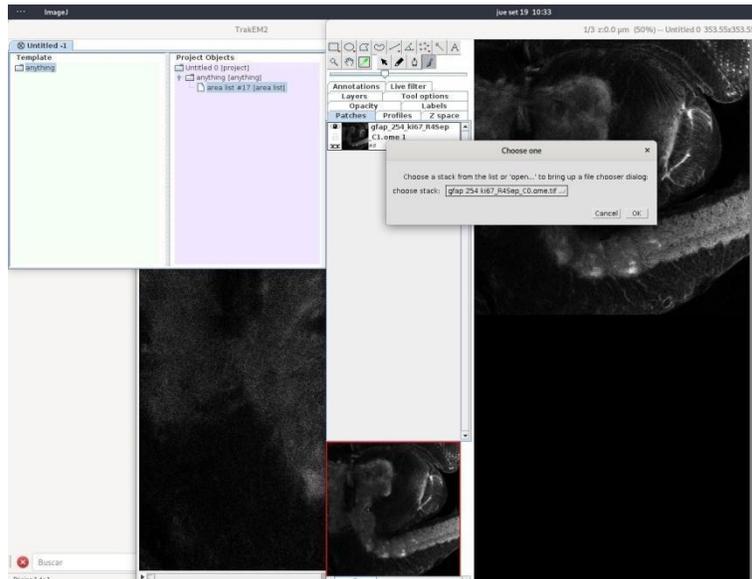


Figure 4: Se debe estar posicionado en Patches y en el primer canal de la imagen de guía.

6. Para alinear la imagen nueva con la imagen anterior, nos posicionamos en Patches **CLICK DER>Properties** y en el cuadro emergente (Fig.5) se posicionará la imagen en **>x=0 , y=0**.

Nos posicionamos sobre ésta y con **CLICK DER Move > Move to top**, se recorrerá todas las capas.

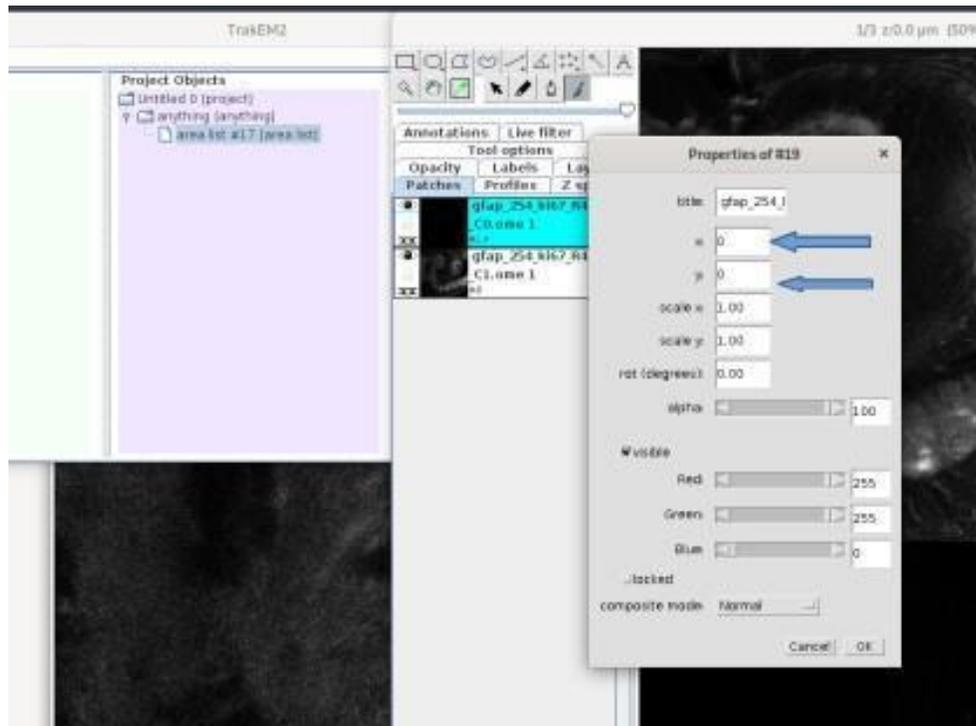


Figure 5: Las flechas azules muestran valores de x e y.

7. Se procederá a hacer la segmentación del área que se quiera utilizar como guía para hacer la interpolación en algunas de las capas. Siempre se tendrá que estar posicionado con el area_list seleccionada, y con el pincel del panel de herramientas superior activado, con **MAYUS+CLICK IZQ** se rellenará el área seleccionada, con **ALT+CLICK IZQ** se borrará la selección (Fig.6).
8. Con **CLICK DER** sobre la pantalla se seleccionará **Area >Interpolate all gaps**.
9. Para recortar el área segmentada en base a la selección guía y extraerla de forma individual: posicionados en Patches se **desencadenará** todas las capas la imagen que se utilizó como guía, y en Z space se **desencadenará** el area_list (Fig. 7).

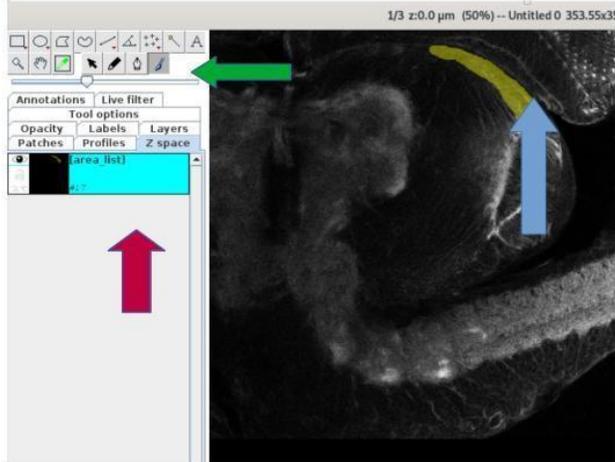


Figure 6: La flecha verde muestra el pixel que se deberá tener seleccionado para comenzar la segmentación, la flecha celeste muestra el área de segmentación en la imagen guía y la flecha roja muestra que se debe estar con el area list seleccionada.

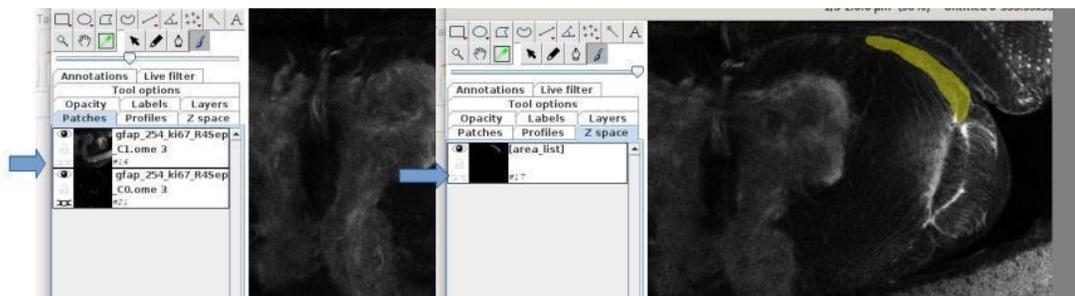


Figure 7: Ambas flechas celestes muestran el lugar donde se deberán desecandernar las capas de la imagen, en dentro de Patches, y dentro de Z space

10. Volviendo a Patches se eliminará las imágenes de la guía de segmentación: posicionados sobre ella CLICK DER >delete (en todas capas), desapareciendo como muestra la Fig. 8 el canal utilizado como guía, y apareciendo el canal de interés con el área segmentada en color amarillo.

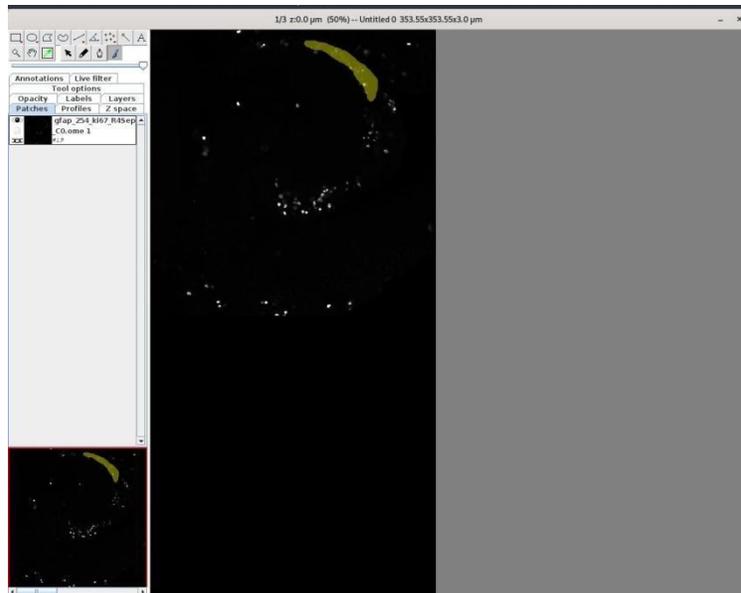


Figure 8: Canal de interés con area segmentada.

11. Posicionados en Z space con CLICK DER >**Plugins** >**Area_list crop** > **Create** > **Valou=0** (Fig.9) el programa recortará la imagen segmentada.

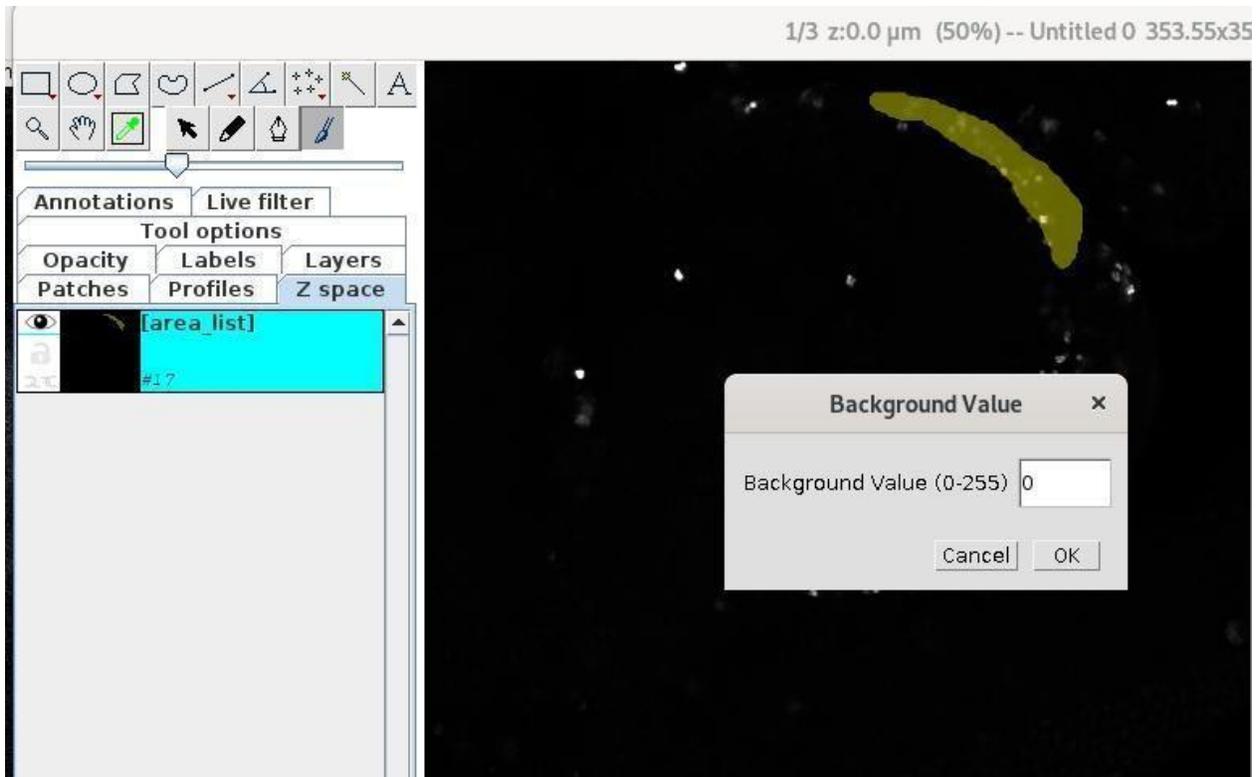


Figure 9: Cuadro emergente para indicar el color del fondo del volumen resultante, en este caso se prefiere color negro, por tanto el valor=0.

12. Aparecerán dos cuadros emergentes, uno con el volumen segmentado en el canal que nos in- teresa trabajar, y el otro como cuadro de diálogo con información de dicho volumen (Fig.10).



Figure 10: Cropped AreaList Stack es el volumen segmentado y Log es el cuadro de dialogo con información de dicho volumen o stack.

Luego, sobre esta nueva pila de imágenes puede realizarse el analisis que nos resulte más conveniente.

Referencias

- Cardona, Albert, Stephan Saalfeld, Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Stephan Preibisch, Mark Longair, Pavel Tomancak, Volker Hartenstein, and Rodney J Douglas. 2012. "TrakEM2 software for neural circuit reconstruction." *PloS One* 7 (6): e38011. doi:[10.1371/journal.pone.0038011](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038011).
- Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, et al. 2012. "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis." *Nature Methods* 9 (7): 676–82. doi:[10.1038/nmeth.2019](https://doi.org/10.1038/nmeth.2019).

Atypical soluble guanylyl cyclase subunit Gyc89Db does not regulate the neuroepithelial stem cell niche during *Drosophila* larval brain development.

Mariel Rosas¹, Boris Egger², Daniel Prieto^{1,3,4}, Rafael Cantera¹

¹ Departamento de Biología del Neurodesarrollo, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

² Department of Biology, University of Fribourg, Fribourg, Switzerland.

³ Advanced Bioimaging Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

⁴Current address: Departamento de Neurofisiología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

Abstract

*The neuroepithelium of the larval optic lobe of *Drosophila* is a hypoxic stem cell niche that does not show a typical hypoxic response. Oxygen-sensing atypical soluble guanylyl cyclases have been linked to optic lobe volume and neuroblast number regulation. Here we report that contextual loss-of-function and targeted gain-of-function experiments revealed no observable effect in either neuroepithelial cell number or proliferation in a late larval stage. Despite ectopic expression of Gyc89Db in neuroepithelium increases optic lobe volume and the number of neuroblasts, our present work suggests that these phenomena occur earlier in brain development without persistent alteration of the neuroepithelium.*

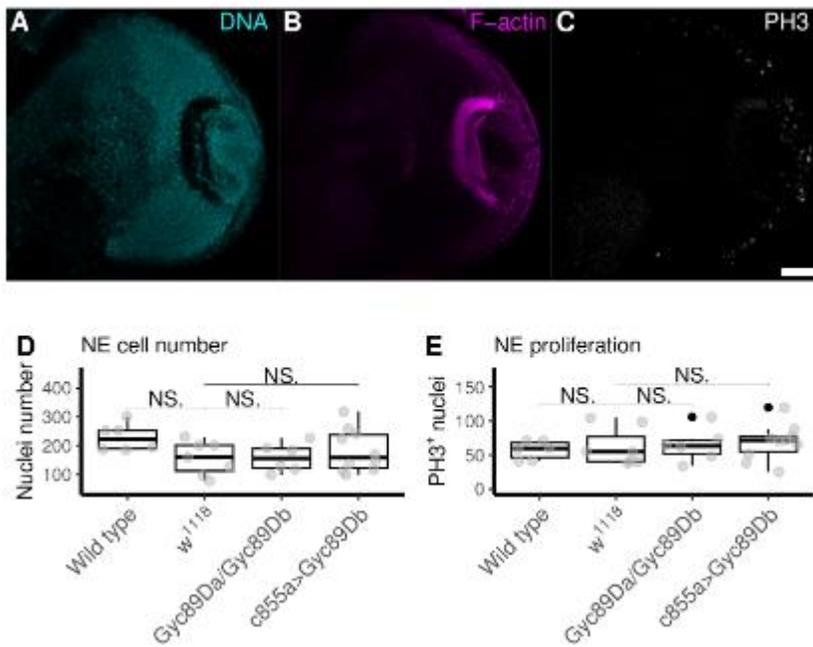


Figure 1. Larval brain staining for assessment of neuroepithelial cell number and proliferation (A) Total nuclei were stained with methyl green. (B) Staining of filamentous-actin with phalloidin was performed to reveal neuroanatomical details used for segmentation. (C) Anti-phosphorylated histone H3 staining was performed to determine the number of proliferating cells (gray). (D) Neuroepithelial cell number assessed by semi-automated segmentation with TrakEM in phalloidin and methyl green (MG) stained brains. The numbers of neuroepithelial cells quantified in double mutant larvae (*Gyc89Da/Gyc89Db*; median±SD: 156.50 ± 49.87) or in larvae ectopically expressing *Gyc89Db* in neuroepithelium (*c855a>Gyc89Db*; median±SD: 158.50 ± 73.83) did not differ from the numbers found in the two control genotypes (*w¹¹¹⁸*; median±SD: 160.00 ± 57.87 and wild-type; median±SD: 223.5 ± 46.94). (E) Proliferating neuroepithelial cells were counted as the positive-stained nuclei for anti-PH3 (MG/PH3⁺) within the segmented neuroepithelial volume. The number of proliferating cells was not different in *Gyc89Da/Gyc89Db* double mutant larvae (median±SD: 63.50 ± 24.58) or expressing *Gyc89Db* ectopically in neuroepithelium (*c855a>Gyc89Db*) (median±SD: 71.50 ± 26.50) compared to *w¹¹¹⁸* (median±SD: 55.00 ± 28.33) or wild-type (median±SD: 59.50 ± 13.31). N=6; Mann Whitney U-test. Scale bar: 30 μm, single confocal Airy-1 sections are shown.

Description

The major stem cell niche of the larval optic lobe (OL) is the hypoxic neuroepithelium (NE; Hofbauer and Campos-Ortega, 1990). The NE comprises hundreds of cells arising through symmetric proliferative division that differentiate progressively into self-renewing neuroblasts, which proliferate asymmetrically and generate ganglion mother cells, which in turn generate glia and neurons (Egger et al. 2007; Yasugi et al. 2008). As the NE is hypoxic relative to the rest of the brain (Baccino-Calace et al. 2020) but does not exhibit a typical hypoxic response (Prieto et al. 2022a), we wondered whether NE cells would be able to sense hypoxia through some alternative way. Three oxygen-sensing atypical guanylyl cyclases (asGCs) activated by hypoxia have been described in *Drosophila*, *Gyc88E*, *Gyc89Da* and *Gyc89Db* named after their chromosomal locations (Vermehren-Schmaedick et al. 2010; Morton 2011).

Both *Gyc89Da* and *Gyc89Db* have been shown to be inactive on their own in cell-free extracts, but their activity was enhanced when co-expressed with *Gyc88E* (Morton and Vermehren 2007). Additionally, it is accepted that the *Drosophila* asGCs exist mostly as heterodimers with some functional redundancy of the heterodimers compared to the homodimer, but the fact that *in vivo* *Gyc89Da* and *Gyc89Db* are frequently co-expressed with *Gyc88E* (Morton et al. 2005) support the idea that heterodimers might be the functionally relevant conformation.

We previously reported that despite not being normally expressed in third instar (L3) NE cells (Prieto et al., 2022b), ectopic expression of *Gyc89Db* into the NE increases OL volume and the number of neuroblasts (Prieto et al. 2022a) and that a null mutation of *Gyc88E* also increases OL volume without altering the number of neuroblasts (Prieto et al., 2022b).

Aiming to find out whether this effect of *Gyc89Db* in OL volume was due to an alteration of proliferation we examined the effect of asGC subunit loss- and targeted gain-of-function in NE cell number and their proliferation in L3 larval brains using confocal microscopy. Neither the contextual double loss-of-function in *Gyc89Da* and *Gyc89Db* in a zygotic mutant (*Gyc89Da/Gyc89Db*) nor the ectopic expression of *Gyc89Db* into neuroepithelial cells appeared to disrupt proliferation in this stem cell niche in a way observable in L3 larva. We used methyl green (MG) to stain total nuclei (Fig. 1A), F-actin staining to anatomically segment the NE (Fig. 1B) and assessed proliferation with anti-PH3 (Fig. 1C) as the double stained MG-PH3⁺ nuclei.

We did not find statistically significant differences neuroepithelial cell number between *Gyc89Da/Gyc89Db* double mutant larvae and *w¹¹¹⁸* controls. Interestingly, we were not able to observe any difference in NE cell number in brains of larvae ectopically expressing *Gyc89Db* in neuroepithelial cells (*c855a>Gyc89Db*) or wild-type (Fig. 1D). Moreover, the number of proliferating NE cells was not different in *Gyc89Da/Gyc89Db* double mutant larvae than in *w¹¹¹⁸*. Neither we found differences in brains of *c855a>Gyc89Db* or wild-type larvae (Fig. 1E).

Considering our previous finding that ectopic expression of *Gyc89Db* in NE increases OL volume and the number of neuroblasts, the negative results reported here indicate that these phenomena occur largely without alteration of NE proliferation at least to an extent observable by L3.

Methods

Fly strains

Flies were raised on cornmeal medium at 25°C 12:12 h light:darkness cycles as previously described (Ferreiro et al. 2018). Wild-type (Vallecas) and *w¹¹¹⁸* were used as control strains, *GAL4^{cs55a}* BDSC stock #6990 (Bloomington *Drosophila* Stock Centre, Bloomington, Indiana, USA) was used to drive expression of *UAS-Gyc89Db* in the OL. This stock, as well as the double mutant *Gyc89Da/Gyc89Db* (Vermehren-Schmaedick et al. 2010) were kind gifts from David Morton (Oregon Health & Science University, Oregon, USA).

Immunostaining and image acquisition

Brains were dissected from wandering third instar larval (L3), fixed and immunostained as previously described (Baccino-Calace et al. 2020). Primary antibodies to phosphorylated H3 histone (anti-PH3, 1:200, Cell Signaling Technologies #9713) were used as mitotic marker. DNA was stained with methyl green (Sigma-Aldrich) as previously described (Prieto et al. 2015). F-actin was stained with rhodamine-conjugated phalloidin (Sigma-Aldrich) as previously described (Prieto et al. 2017). Fluorescent conjugated secondary antibodies Alexa488, Cy3 and Cy5 were used (Thermo-Fisher). Images were acquired with a Zeiss LSM800 Airyscan confocal microscope and processed with FIJI (Schindelin et al. 2012). Semi-automated OL segmentation (Rosas and Prieto 2020) was performed with TrakEM (Cardona et al. 2012). Analyses and illustrations were made using R version 4.2.1 on Rstudio version 2022.07.01.

Reagents

Strains: Strains obtained from the BDSC or kindly provided by colleagues as stated above.

Gyc88E (*y*[1] *w*[*]; *Mi*{*y*+*mDint2*}=MIC)*Gyc88E*[MI09619]/TM3, *Sb*[1] *Ser*[1])
Gyc89DaGyc89Db (*w*¹¹¹⁸; PBac{*w*1*mC*^¼RB}*Gyc89Da*⁶⁰¹⁸²¹, *Mi*{3*xP3*-EGFP.ET1}*Gyc89Db*^{MB03197})

Funding

The work was supported with grants awarded to DP (Fondo Vaz Ferreira FVF-2019-055 from Dirección Nacional de Innovación, Ciencia y Tecnología) and RC (FCE_1_2019_1_156160 from Agencia Nacional de Investigación e Innovación, ANII). Stocks obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center (NIH P40OD018537) were used in this study. DP had a postdoctoral position

funded by Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura. ANII supports DP and RC through Sistema Nacional de Investigadores.

References

- Baccino-Calace M, Prieto D, Cantera R, Egger B. 2020. Compartment and cell-type specific hypoxia responses in the developing *Drosophila* brain. *Biology Open*. 9(8):bio053629. doi:10.1242/bio.053629.
- Cardona A, Saalfeld S, Schindelin J, Arganda-Carreras I, Preibisch S, Longair M, Tomancak P, Hartenstein V, Douglas RJ. 2012. TrakEM2 software for neural circuit reconstruction. *PLoS one*. 7(6):e38011–e38011. doi:10.1371/journal.pone.0038011.
- Egger B, Boone JQ, Stevens NR, Brand AH, Doe CQ. 2007. Regulation of spindle orientation and neural stem cell fate in the *Drosophila* optic lobe. *Neural Development*. 2(January):1–1. doi:10.1186/1749-8104-2-1.
- Ferreiro MJ, Pérez C, Marchesano M, Ruiz S, Caputi A, Aguilera P, Barrio R, Cantera R. 2018. *Drosophila melanogaster* White Mutant w1118 Undergo Retinal Degeneration. *Front Neurosci*. 11:732. doi:10.3389/fnins.2017.00732.
- Morton DB. 2011. Behavioral responses to hypoxia and hyperoxia in *Drosophila* larvae molecular and neuronal sensors. *Fly*. 5(2):119–125. doi:10.4161/fly.5.2.14284.
- Morton DB, Langlais KK, Steward JA, Vermehren A. 2005. Comparison of the properties of the five soluble guanylyl cyclase subunits in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Science*. 5:12–12. doi:10.1673/031.005.1201.
- Morton DB, Vermehren A. 2007. Soluble guanylyl cyclases in invertebrates: Targets for NO and O₂. *Advances in Experimental Biology*. 1(07):65–82. doi:10.1016/S1872-2423(07)01003-4.
- Prieto D, Aparicio G, Machado M, Zolessi FR. 2015. Application of the DNA-specific stain methyl green in the fluorescent labeling of embryos. *Journal of visualized experiments : JoVE*.(99):e52769–e52769. doi:10.3791/52769. Prieto D, Aparicio G, Sotelo-Silveira JR. 2017. Cell migration analysis: A low-cost laboratory experiment for cell and developmental biology courses using keratocytes from fish scales. *Biochemistry and molecular biology education : a*

bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. 45(6):475–482. doi:10.1002/bmb.21071.

Rosas M, Prieto D. 2020. How to extract a Region of Interest [ROI] in one channel through segmentation in a[nother] guide channel. doi:10.5281/ZENODO.4048323. [accessed 2022 Nov 25]. <https://zenodo.org/record/4048323>.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 9(7):676–82. doi:10.1038/nmeth.2019.

Vermehren-Schmaedick A, Ainsley JA, Johnson WA, Davies SA, Morton DB. 2010. Behavioral responses to hypoxia in drosophila larvae are mediated by atypical soluble guanylyl cyclases. *Genetics*. 186(1):183–196. doi:10.1534/genetics.110.118166.

Yasugi T, Umetsu D, Murakami S, Sato M, Tabata T. 2008. Drosophila optic lobe neuroblasts triggered by a wave of proneural gene expression that is negatively regulated by JAK/STAT. *Development (Cambridge, England)*. 135(8):1471–1480. doi:10.1242/dev.019117.