

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Identificación del rol de DILP8 y su receptor LGR3 en el sistema reproductor de *Drosophila melanogaster*

Tesis de grado presentada como requisito para obtener el título de Licenciada en Ciencias Biológicas



aputan aund.

Alumna: Dronseck Agustina

du

Directora: Volonté Yanel A.

AGRADECIMIENTOS

A mis papas, por absolutamente todo, por brindarme esta oportunidad, darme la libertad de decidir y confiar, por haberme hecho creer que todo lo puedo (aun cuando sé que algún día no será así), gracias por hacerme invencible y por estar siempre para mí, amándome.

A mis amigos de acá y de allá, a los de siempre y a los que encontré en el camino, no podría haber logrado esto sin su apoyo, sus risas y su forma inexplicable de creer en mí.

A mi hermana, por mostrarme esta nueva vida y aconsejarme, por hacerme crecer.

A mi mascota más amada, Pochoclo, aunque no puedas leer esto te extrañe cada día que estuvimos lejos.

A mi abuela Nidia, que fue la personificación de un "si yo te ayudo" cada vez que la necesite, incondicional como nadie.

Al amor de mi vida, de esta y de todas si es que existen, por vos, y por tu forma de quererme tanto, hoy soy una mejor persona.

A mi familia que comprendió siempre mis ausencias y me acompaño en los momentos más importantes.

A Moni, Javier y Maite, por la contención, la comida casera, las tardes de campo, la música, por considerarme familia, así sin más.

A Miguel y Griselda, por enseñarme y mostrarme como vivir la vida.

A Yane, por ser la mejor directora que pude haber elegido, por su capacidad de comprender, de ayudar y sobre todo de escuchar.

A Maite y Andrés, por mostrarme un mundo que desconocía en cada una de nuestras conversaciones.

A Nora, por todos y cada uno de los llamados en los que tuvo que contenerme y por ser quien siempre me impulso a darlo todo y descubrir que podía aún más de lo que yo misma creía.

A todos ellos, gracias infinitas por hacerme quien soy.

ÍNDICE

RESUMEN	. 2
INTRODUCCIÓN	. 3
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Técnicas generales	12
Mantenimiento de stocks	12
Preparación de alimento estándar para Drosophila melanogaster	12
Preparación de placas de puesta	13
Reconocimiento fenotípico del sexo	13
Protocolo de disección y tinción de ovarios de Drosophila melanogaster	14
Protocolo de inmunotinción de ovarios de Drosophila melanogaster	15
Obtención y procesamiento de imágenes	15
Balanceadores en Drosophila melanogaster	15
Genotipos	16
Sistema UAS-Gal4	19
Ensayo de ovulación	20
Ensayo de ovulación durante 10 días	21
Análisis del número de folículos en el ovario	21
Ensayo de viabilidad de huevo-larva	22
Resistencia al ayuno y deshidratación	23
Análisis de datos, diagramas y estadística	23
RESULTADOS	25
La falta de <i>dilp8</i> en hembras adultas de <i>D. melanogaster</i> provoca una disminución de la ovulaci	lón 25
Participación del receptor de DILP8, LGR3, en el proceso de ovulación	32
DILP8 no participa en el mantenimiento de viabilidad del ovocito fecundado en condiciones normal	les
de cultivo de D. melanogaster	34
Hembras apareadas mutantes para dilp8 presentan una mayor resistencia al ayuno y deshidrataci	ón
	35
DISCUSIÓN	37
BIBLIOGRAFÍA	43

RESUMEN

DILP8¹ (Drosophila Insulin-Like Peptide 8) es un péptido del tipo de las relaxinas, perteneciente a la familia de las insulinas. Actúa como la señal endócrina que coordina el crecimiento de las distintas partes del cuerpo con la maduración durante el desarrollo de la mosca; y además es necesario para la ejecución de un programa motor que modifica la forma del cuerpo y un programa morfogenético que endurece la cutícula y fija la nueva forma adquirida en la transición de larva a pupa. DILP8 actúa a través del receptor LGR3, expresado en un grupo de neuronas, diferentes para cada uno de los roles descriptos, del cerebro de *Drosophila melanogaster*. Además de ser expresados en tejidos imaginales en regeneración, *dilp8* y *Lgr3* son transcripcionalmente activos en otros tejidos y fases del ciclo de vida de *Drosophila*. En esta tesis de grado proponemos caracterizar nuevas funciones y mecanismos de acción de la vía DILP8-LGR3 en el adulto, evaluando su función en la reproducción, el control del metabolismo y la longevidad. Empleamos herramientas genéticas clásicas y de última generación (CRISPR/Cas9) para llevar a cabo estos objetivos y caracterizar la función de DILP8 en el ovario, la expresión de *Lgr3*, y aspectos asociados a la fisiología del sistema reproductor femenino en *Drosophila*.

Nuestros resultados revelan que la ausencia de *dilp8* se asocia con una disminución de la ovulación, sugiriendo un rol de DILP8 en este proceso. Al mismo tiempo, hallamos que en las hembras apareadas mutantes para *dilp8* existe una mayor resistencia al ayuno y deshidratación, involucrando a DILP8 en la regulación del metabolismo y la esperanza de vida. Esta información permite ampliar el conocimiento sobre la función de DILP8 y LGR3 en el contexto del organismo adulto.

¹ La abreviatura se indica según sus siglas en inglés.

INTRODUCCIÓN

Drosophila melanogaster, comúnmente conocido como "mosca de la fruta", es un díptero, perteneciente a la familia Drosophilidae, actualmente considerado como uno de los organismos modelo más poderosos en los estudios genéticos del desarrollo y el comportamiento de los animales (Bratu, McNeil, 2015). Características como el tamaño pequeño (cerca de 3 mm de longitud), un tiempo de generación corto (aproximadamente 10 días a 25°C), y la gran cantidad de descendencia que producen, en combinación con la sorprendente similitud entre la mosca y los mamíferos en términos de vías, mecanismos moleculares, anatomía y funcionamiento de los órganos hacen que *D. melanogaster* sea un organismo modelo excelente para explorar mecanismos relacionadas con el metabolismo, la fisiología y la neurología (Mishra, 2020), permitiendo experimentos genéticos rápidos, económicos y sencillos en comparación con otros modelos *in vivo*.

A lo anteriormente mencionado se suma el amplio conocimiento de la genética de este organismo que posee su genoma completamente secuenciado desde el año 2000, disponible en la base de datos de libre acceso "FlyBase", y la vasta gama de herramientas genéticas que han estado disponibles para *Drosophila* durante el siglo pasado convirtiéndose en el metazoo más manipulable genéticamente en la actualidad, siendo relativamente simple generar moscas transgénicas en las que se active o inhiba la expresión de genes individuales de interés, ya sea en todo el organismo o en tejidos definidos (Jennings, 2011).

Drosophila melanogaster presenta un ciclo de vida holometábolo, en el que el desarrollo transcurre a través de una serie sucesiva de estadios (embrión, larva, pupa y adulto) como se observa en la Figura 1. Las hembras depositan aproximadamente 60-80 huevos por día y la embriogénesis dura solo 24 hs. y luego comienza el desarrollo larval que se caracteriza por incluir tres estadios (L1, L2, L3) y dos mudas larvales, que implican fundamentalmente un aumento de tamaño y se suceden cada 24 hs., llegando a la larva L3 que busca un sitio para pupar durante 24 a 48 hs., siendo la pupa un estadio inmóvil intermedio entre larva e imago (adulto) (Fernández-Moreno et al., 2007).

Durante la pupariación (que ocurre a las 96 hs. luego de la eclosión) tiene lugar una metamorfosis completa de larva a adulto, con una reorganización total del cuerpo en donde la mayoría de los tejidos larvarios se degradan y los órganos adultos se desarrollan a partir de sacos de células indiferenciadas, los discos imaginales, ya presentes durante el estadio larval pero inactivos. Estos discos dan origen a las estructuras cuticulares del adulto como alas, patas, antenas, ojos, cabeza, tórax y genitales, específicamente en *Drosophila* hay 10 pares de discos imaginales que reconstruyen todo el cuerpo adulto, excepto el abdomen (la epidermis abdominal se forma a partir de histoblastos, un grupo de células imaginales especializadas), y un disco genital, que forma los órganos reproductores. Finalmente,

el adulto emerge entre 9 y 10 días después de la fecundación del óvulo (a 25°C). La eclosión marca el final de la pupa y el comienzo de la vida adulta (Fernández-Moreno et al., 2007).



Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Indicando el estadio de embrión, larva, pupa y adulto (tomada de Fernández-Moreno et al., 2007).

La transición de una etapa a otra está dirigida por la acción de una cascada hormonal, siendo la 20hidroxiecdisona (20HE) y la hormona juvenil (HJ) las dos hormonas más importantes en la regulación de la muda y la metamorfosis. Ambas son hormonas liposolubles que atraviesan la membrana, se unen con sus receptores intracelulares y van a activar o inhibir la transcripción de genes específicos. La 20HE regula programas genéticos relacionados al proceso de muda, mientras que la HJ es un factor de transcripción que inhibe la expresión de genes adultos, y produce un efecto morfoestático. Los insectos holometábolos poseen genes *larvales, pupales y adultos*, las combinaciones apropiadas de 20HE y HJ controlan la expresión de estos genes, que codifican diferentes proteínas que influyen sobre las funciones de las células diana (Hill et al., 2006).

Además de las principales hormonas implicadas en los eventos de transformación durante el ciclo de vida de estos organismos, la vía de señalización de la insulina/factor de crecimiento similar a la insulina (IIS²) es sumamente importante durante estos procesos, tratándose de una vía conservada evolutivamente a través de los metazoos, necesaria para el desarrollo, el metabolismo y el comportamiento. Dicha vía se encuentra regulada principalmente por la superfamilia de péptidos similares a la insulina (ILP¹) que se unen y controlan la actividad de su respectivo receptor (Biglou et al., 2021) esta superfamilia es diversa y se subdivide en insulinas, factores de crecimiento similares a la

² La abreviatura se indica según sus siglas en inglés.

insulina (IGF³) y relaxinas, sobre la base de la estructura primaria, el procesamiento y las preferencias de unión al receptor (Blundell, Humbel, 1980; Wilkinson, Bathgate, 2007).

Todos los ILP tienen seis cisteínas conservadas que forman tres enlaces disulfuro. Se sintetizan como un pre-propéptido que codifica un péptido señal N-terminal y un propéptido que consta de dos cadenas (B y A) separadas por un péptido C. Mientras que el péptido C de los IGF se retiene en la hormona madura, el de las insulinas y relaxinas se libera proteolíticamente, dejando las cadenas B y A unidas por dos enlaces disulfuro intermoleculares (Gontijo, Garelli, 2018). En concreto, el genoma de *Drosophila melanogaster* codifica ocho ILPs (Ilamados dILP, indicadas en la Figura 2), que son homólogos a la insulina de mamíferos, los IGF y las relaxinas, con diferente expresión espacio-temporal y funciones variables. En general, las respuestas fisiológicas claves de los dILPs incluyen la regulación del desarrollo embrionario y postembrionario, el impacto en la reproducción y la fertilidad, la regulación del comportamiento de búsqueda de alimento y el control del metabolismo, así como el almacenamiento de glucógeno, la gluconeogénesis y la longevidad (Biglou et al., 2021).



Figura 2. Alineamiento de las cadenas A y B de DILP8 con los siete ILPs previamente caracterizadas y miembros representativos de la familia de péptidos similares a insulina en humanos (tomada de Garelli et al., 2012).

Mientras que la vía de señalización de insulina/IGF (IIS) regula el crecimiento, el metabolismo y el envejecimiento (Blundell, Humbel, 1980; Wilkinson, Bathgate, 2007; Gronke et al., 2010), los miembros de la familia de las relaxinas de vertebrados tienen funciones antifibróticas, vasodilatadoras y estimulantes cardíacas, que afectan muchos procesos, que incluyen, entre otros, la reproducción femenina y masculina, como la menstruación, la motilidad de los espermatozoides y el embarazo (Bathgate et al., 2013). La primera relaxina fue descubierta como el factor que promueve el relajamiento de la sínfisis púbica durante el parto en mamíferos. Luego se demostró que es producida en el cuerpo lúteo y placenta, cumpliendo multiplicidad de funciones: promueve la remodelación y crecimiento del útero regulando los niveles de metaloproteasas de matriz (MMPs²) (Chow et al., 2012), evita las

³ La abreviatura se indica según sus siglas en inglés.

contracciones espontáneas del miometrio y tiene efectos sobre la adaptación cardiovascular durante el embarazo (Kong et al., 2010).

Las relaxinas pueden unirse a receptores acoplados a proteína G (GPCRs⁴) que pertenecen a dos grupos divergentes: uno es similar a la familia de receptores de péptidos pequeños tipo 1 y el otro grupo pertenece al tipo C de la familia de receptores con repeticiones ricas en leucina (LGR³). Los LGR tienen siete dominios transmembrana típicos de los GPCR y un gran dominio extracelular que contiene un número variable de repeticiones ricas en leucina (LRR³) requeridas para la unión del ligando (Gontijo, Garelli, 2018). En *D. melanogaster*, si bien siete de los ocho dILP conocidos se asume que actúan a través del receptor de insulina de *Drosophila* (dInR³), dILP-8, el más cercano a las proteínas similares a relaxina, puede unirse al receptor 3 acoplado a proteína G (LGR3), miembro de la familia de receptores de relaxina expresados en el sistema nervioso central (SNC) (Biglou et al., 2021). En vertebrados, los LGRs actúan como receptores de péptidos semejantes a insulina de la subfamilia de las relaxinas donde tienen un importante rol en la homeostasis y remodelación de tejidos, en el comportamiento y la reproducción (Bathgate et al., 2013).

En particular, el péptido similar a la insulina/relaxina, DILP8, se identificó primeramente como la señal endocrina que coordina el crecimiento de las distintas partes del cuerpo con la transición entre las fases del desarrollo en *Drosophila melanogaster* (Garelli et al., 2012; Colombani et al., 2015; Vallejo et al., 2015). DILP8 se produce y secreta desde los discos imaginales dañados actuando sobre centros neuroendócrinos que en respuesta retrasan el inicio de la metamorfosis, prolongando la fase larvaria y permitiendo la reparación de los tejidos (Garelli et al., 2012; Gontijo, Garelli, 2018). Esto provee un tiempo extra que permite el crecimiento y la regeneración de tejidos hasta que las partes dañadas son reparadas, mientras que los tejidos no dañados no crecen más allá de su tamaño normal, asegurándose la simetría del organismo adulto (Simpson et al., 1980).

Una revisión de los datos actuales respalda un modelo en el que DILP8 derivado de los discos imaginales actúa sobre cuatro neuronas positivas para Lgr3 del SNC para activar la señalización de AMP cíclico de una manera dependiente de LGR3 (Garelli et al., 2015). Esto provoca una reducción en la producción de la hormona ecdisona por parte de la glándula protorácica endocrina larvaria, lo que conduce a un retraso en el inicio de la metamorfosis y una ralentización de individuos proporcionados. Recientemente se describió que DILP8 también posee un rol decisivo para la ejecución del programa motor de pupariación (PMP), actuando a través de par de neuronas bilaterales del cerebro larval (diferentes a las anteriores) que también expresan Lgr3, y controlan la transición de larva a pupa (Heredia, Volonté, Pereirinha et

⁴ La abreviatura se indica según sus siglas en inglés.

al., 2021). Estos hallazgos indican que DILP8 es un factor homeostático fundamental requerido para ajustar el tiempo de desarrollo, coordinar el crecimiento de las partes del cuerpo y asegurar la producción de un fenotipo robusto (Gontijo, Garelli, 2018) y la viabilidad del organismo.

Finalmente, el análisis de su patrón de expresión espacio-temporal sugiere que podría tener funciones novedosas en otras etapas de la historia de vida de la mosca. Por ejemplo, DILP8 se expresa en el ovario de las hembras adultas, específicamente en las células foliculares que acompañan al ovocito de estadio 14 (Tootle et al., 2011; Garelli et al., 2012; Brown et al., 2014; Liao, Nässel, 2020), donde podría estar actuando de manera similar a las relaxinas de vertebrados que controlan algunos aspectos de la biología reproductiva, lo que indicaría que la interacción entre LGR3 y DILP8 podría trascender la coordinación del crecimiento y que estas moléculas podrían actuar juntas varias veces en el ciclo de vida de *Drosophila* (Gontijo, Garelli, 2018).

En este contexto, es importante referir a la estructura general del sistema reproductor femenino en *Drosophila* (Fig. 3). La hembra adulta presenta un par de ovarios altamente inervados y rodeados de una vaina peritoneal muscular que se contrae rítmicamente. Cada ovario está formado por 16-20 unidades de desarrollo denominadas ovariolas, formadas por una estructura hueca que contiene una serie de cámaras ováricas en crecimiento rodeada de una vaina epitelial muscular (Jevitt et al., 2020). El sistema reproductor se continua en un par de oviductos laterales donde abre cada ovario; que forman un oviducto común conectado con el útero y luego con la genitalia femenina. A medida que los ovocitos maduros pasan del oviducto común al útero, son fertilizados allí por los espermatozoides almacenados en el receptáculo seminal y las espermatecas (Dansereau et al., 2005).



Figura 3. Representación del sistema reproductor femenino de D. melanogaster (tomada de Miller, 1950).

La ovogénesis, proceso de formación de un ovocito maduro en *D. melanogaster*, ocurre simultáneamente dentro de cada una de las ovariolas, dividiéndose en 14 estadios (Fig. 4) mediante Página | 7

criterios morfológicos establecidos por King, 1970 (el estadio 1 se refiere a una cámara ovárica recién formada y el estadio 14 a un ovocito maduro que está listo para ser fertilizado y ovipositado). Dentro de estos, se reconoce además el proceso previtelogénico (estadio 1 a 7), la vitelogénesis (estadio 8 a 10) durante la cual los nutrientes requeridos para el desarrollo embrionario son producidos por el cuerpo graso y las células foliculares y almacenados en el ovocito, constituyendo este proceso un punto de control importante de la ovogénesis que integra señales internas (hormonales) y externas (ambientales) para permitir una progresión eficiente del desarrollo del folículo (Spradling, 1993) y, finalmente, la coriogénesis y la ovulación (estadio 11 a 14) (Dansereau et al., 2005).



Figura 4. Esquema de una ovariola. El germario y el filamento terminal se ubican en la región anterior de la ovariola. El ovocito se indica en color gris (tomada de Ogienko et al., 2007).

A su vez, cada ovariola en un ovario maduro se divide en tres regiones, el filamento terminal, el germario y el vitelario. Dentro del germario, se forma el folículo previtelogénico (inicio de la ovogénesis) a partir de un grupo de células madre germinales (CMG) que se encuentra dentro de un nicho conformado por el filamento terminal y las células cap, siendo estas esenciales para el mantenimiento de la capacidad de autorrenovación y el control de la proliferación, constituyendo un microambiente anatómico que provee señales moleculares que mantienen a las CMG (Wieschaus, Szabad, 1979). Cada CMG se divide asimétricamente generando una nueva célula madre y un cistoblasto. Este último se divide cuatro veces por mitosis, con citocinesis incompleta, resultando en un ovocito conectado por puentes citoplasmáticos a 15 células nodrizas poliploides, de metabolismo muy activo, que sintetizan nutrientes y ARNm que son transportados al ovocito para utilizarse durante el desarrollo embrionario. Esta cámara ovárica se rodea de una capa de células foliculares (FC^5) de origen somático, que organizan el patrón anteroposterior del ovocito y producen las cubiertas que más tarde protegerán al huevo y al embrión. Las interacciones entre las células foliculares y el ovocito son fundamentales para el crecimiento y la supervivencia del folículo. Luego el folículo (conformado por el ovocito, las células nodrizas y las FC) se expulsa al vitelario, donde sufre la transición de la previtelogénesis a la vitelogénesis y, posteriormente, la transición a la coriogénesis y la ovulación (Swevers et al., 2005).

Los ovocitos de estadio 14 completamente maduros son almacenados hasta que son ovulados de a uno por vez, existiendo un proceso de selección que involucraría interacciones complejas a nivel local y comunicación entre ambos ovarios (Deady, Sun, 2015). Durante este proceso, las células foliculares se desprenden del ovocito y permanecen temporalmente en el cáliz del ovario como un "cuerpo lúteo", en

⁵ La abreviatura se indica según sus siglas en inglés.

forma semejante al cuerpo lúteo de los vertebrados (Deady et al., 2015). Después de la ovulación, se inicia la activación del ovocito (que pasa a transformase en un óvulo) cuando este se hidrata en el oviducto, siendo un proceso que ocurre independientemente de la fertilización (Heifetz et al., 2001). Esta transformación incluye el reinicio de la meiosis, la impermeabilización de la cubierta del ovocito y el inicio de la traducción, preparando al óvulo para la embriogénesis posterior, en caso de que ocurra la fertilización en el útero (Page, Orr-Weaver, 1997; Chen et al., 2000; Bloch Qazi et al., 2003).

La ovulación es estimulada por el apareamiento y, específicamente, por el esperma y algunas proteínas de las glándulas accesorias masculinas (Heifetz et al., 2001). Además, a través de un mecanismo de retroalimentación positiva, el aumento de la ovulación da como resultado la estimulación de la progresión oogénica de los folículos. El acoplamiento de ambos procesos asegura que se produzca una gran cantidad de ovocitos maduros y que se deposite una gran cantidad de huevos fertilizados (Spradling, 1993).

Adicionalmente, existe una compleja regulación hormonal y neuronal de la fisiología reproductiva en *Drosophila melanogaster*. Particularmente, durante la ovogénesis se encuentran implicadas las dos principales hormonas morfogenéticas de insectos, 20HE y HJ. La HJ funciona como una gonadotrofina que estimula la secreción de 20HE desde las células foliculares en el ovario, que a su vez estimula la síntesis de la proteína de la yema (yolk protein -YP⁶) en el cuerpo graso, así como la absorción de YP por parte del ovocito, siendo necesaria para la producción de huevos fértiles. Aun así, durante las últimas etapas de la ovogénesis, alternativamente, 20HE tiene un efecto negativo sobre el desarrollo del folículo. En hembras vírgenes, 20HE induce la apoptosis, provocando la desaparición de casi todos los folículos vitelogénicos, y este efecto se puede contrarrestar mediante la administración de HJ o péptido sexual (SP⁵) (Soller et al., 1999). Por lo tanto, un equilibrio correcto entre HJ y ecdisteroides parece ser esencial para la progresión del desarrollo del folículo vitelogénico en el ovario, demostrando una estricta regulación del desarrollo restringida a los folículos de la etapa 9, mientras que los folículos de etapas anteriores o posteriores (etapas 8 y 10, respectivamente) no se ven afectados (Swevers et al., 2005).

Durante la ovulación (liberación de un ovocito maduro desde el ovario) se requiere de la presencia de octopamina (OA) y su receptor (OAMB) en las células foliculares de los ovocitos de estadio 14 para iniciar la ruptura del folículo (Deady, Sun, 2015). Se desconoce la fuente de la OA requerida, pero es probable que sean las neuronas octopaminérgicas que inervan la base de los ovarios y poseen sus cuerpos neuronales en el sistema nervioso central, específicamente en la cuerda ventral (Rezával et al., 2014). Sin embargo, la OA no actúa sola para iniciar la ruptura del folículo; también se requiere la hormona 20HE, la cual a través del receptor EcR.B2 prepara los folículos maduros para que respondan a los

⁶ La abreviatura se indica según sus siglas en inglés.

estímulos ovulatorios neuronales, lo que proporciona información sobre el mecanismo de la señalización de esteroides en la ovulación de *Drosophila* (Knapp, Sun, 2017). Además, las neuronas octopaminérgicas que inervan el ovario y tracto reproductivo se hallan involucradas en la contracción muscular del ovario y la relajación del oviducto, siendo esto indispensable para la ovulación. También participa en coordinar la liberación de esperma desde los reservorios con el pasaje del ovulo en el útero para permitir la fertilización, coordinando así múltiples aspectos de la fisiología y el comportamiento post-apareamiento de la hembra. Finalmente, la señalización de OA se integra con otras señales neuronales y endocrinas del estado interno femenino para optimizar el rendimiento reproductivo. La expresión de diferentes receptores OA y la presencia de otras moléculas de señalización permiten que las respuestas específicas de la región produzcan diferentes resultados (White et al., 2021).

Por otra parte, se conoce que los ILPs son producidos y secretados en respuesta a condiciones nutricionales específicas y coordinan el crecimiento con la disponibilidad de nutrientes. Están involucrados en el control del crecimiento, la esperanza de vida, fecundidad y resistencia a estrés (Broughton et al., 2005; Grönke et al., 2010; Schiesari et al., 2016) con importantes semejanzas entre las insulinas descriptas en *Drosophila* y las de humano (Grönke, Partridge, 2010). Modificaciones en la dieta y manipulaciones genéticas directas o indirectas en la expresión de los distintos dILPs afectan las vías activadas por insulina mostrando un aumento de la esperanza de vida (Broughton et al., 2005). Sin embargo, el rol de cada dILP en la regulación de esta esperanza de vida es difícil de comprender debido a la compensación funcional de otros péptidos (Grönke et al., 2010; Post et al., 2018, 2019; Semaniuk et al., 2021).

Luego de realizar manipulaciones de la dieta, se observa en hembras, pero no en machos, que tanto la expresión de *dilp8* como *dilp2* y *dilp3* aumenta en dietas con baja concentración de carbohidratos y proteínas y que esto podría ser parte de un fenómeno llamado plasticidad específica de sexo. Este estudio se realizó en larvas en un momento específico del desarrollo, al inicio del estadio de larva wandering, posterior a L3, momento en el que *dilp8* muestra un pico de expresión (Gontijo, Garelli, 2018) lo que sugiere que podría tener un rol en la regulación del metabolismo en respuesta a alteraciones del estado nutricional durante el desarrollo, que luego se manifiestan en el adulto, como por ejemplo, en la esperanza de vida ante situaciones de estrés como son el ayuno y la deshidratación.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La ovogénesis de *Drosophila melanogaster* ha demostrado proporcionar un sistema genético manejable y versátil en el que estudiar muchos aspectos de la biología celular. Debido a su gran tamaño y facilidad de manipulación y cultivo, las células del ovario son un excelente sistema para el análisis microscópico. Aun así, la mayoría de los estudios de la función del ovario de *Drosophila* se han concentrado en los procesos que ocurren en los estadios tempranos e intermedios de ovogénesis. La renovación y proliferación de CMG, la vitelogénesis, la determinación de los ejes del ovocito y la deposición de membrana vitelina y corion, han sido intensamente estudiadas (Ogienko et al., 2007). Por el contrario, el estadio terminal del desarrollo de los ovocitos ha sido entendido como un estado quiescente durante el cual los ovocitos son almacenados hasta que la hembra encuentra condiciones ambientales adecuadas para la puesta de huevos.

El hallazgo de que una nueva hormona peptídica (DILP8) se expresa específicamente en células foliculares de los ovocitos completamente maduros y en el cuerpo residual (Jevitt et al., 2020; Liao, Nässel, 2020), con algunas similitudes destacables con la rama de relaxina de la familia de péptidos semejantes a insulina de vertebrados, sugiere que esta puede tener un inesperado rol activo en la fisiología del ovario pudiendo ser autónomo, sobre el mismo ovocito, o sobre el ovario u otros tejidos. Es así que proponemos explorar tres hipótesis diferentes no excluyentes: 1) DILP8 podría estar regulando el ritmo del proceso de ovogénesis, 2) el mantenimiento de la calidad del ovocito mientras está almacenado en el ovario 3) y/o regulando la ovulación. Además, al tratarse de un péptido de la familia de las insulinas también se evalúa un posible rol en el metabolismo y la longevidad.

Finalmente, se propone estudiar si el efecto es mediado por LGR3, el cual se expresa durante casi todo el ciclo de vida de *Drosophila*, mostrando un dimorfismo sexual en el adulto, observándose una mayor expresión de *Lgr3* en el cuerpo graso de las hembras en comparación con los machos, y también un alto nivel transcripcional en el útero (Van Hiel et al., 2015).

Como objetivo general de esta tesina nos propusimos dilucidar este nuevo rol de DILP8 en la fisiología del ovario a través de los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la ovulación, morfología ovárica y distribución de los distintos estadios de la ovogénesis; en hembras vírgenes y apareadas, control y mutantes para *dilp8* y *Lgr3*.
- Analizar la expresión de LGR3 en el tracto reproductor femenino.
- Evaluar la viabilidad de huevo a larva 1 en huevos control, heterocigotas y homocigotas para el alelo mutante de *dilp8*.
- Estudiar la resistencia al ayuno y a la deshidratación por parte de hembras vírgenes y apareadas, y machos, tanto control como mutantes para *dilp8*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Técnicas generales

El cultivo de *Drosophila melanogaster* se realizó mediante las técnicas de rutina utilizadas en el laboratorio de Fisiología y Genética del Desarrollo ubicado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB). En términos generales, se trata de un organismo de fácil mantenimiento para el cual generalmente existen pocas restricciones sobre su uso en el laboratorio, con cuestiones éticas y de seguridad mínimas; y diversas ventajas experimentales tal como se mencionó en la introducción de esta tesis.

Las moscas en uso experimental se mantuvieron rutinariamente a 25°C con ciclo 12:12 luz:oscuridad (a menos que se indique expresamente lo contrario) en viales de plástico cubiertos con un tapón de algodón hidrofóbico para evitar la condensación de humedad que podría interferir con el suministro adecuado de aire. Además, se tuvo en cuenta que el alimento dentro del vial resulte lo suficientemente sólido para que las moscas no se atasquen en él y en simultáneo que permita que las larvas se desplacen y alimenten. A 25°C, el tiempo de generación es de aproximadamente 10 días desde el óvulo fertilizado hasta el adulto en eclosión, mientras que el período de vida máximo varía de 60 a 80 días, dependiendo de las condiciones de cultivo (Fernández-Moreno et al., 2007).

De ser necesaria la manipulación individual de las moscas, esta se llevó a cabo bajo anestesia en forma segura, colocando a los individuos sobre almohadillas porosas conectadas a una fuente de dióxido de carbono (CO₂) y manipulándolas con pinza mientras se observan bajo microscopio estereoscópico. Este método de anestesia resulta más seguro y simple que la utilización del éter tradicional, además, se evita la sobreanestesia de las moscas.

Mantenimiento de stocks

Hasta la fecha, no ha sido posible encontrar una forma eficiente de congelar los gametos o embriones de *Drosophila*, por lo que es necesario mantener las poblaciones de moscas mediante cultivos vivos ("stocks"). Cada stock o línea se mantiene en viales por duplicado (con generaciones alternas separadas por 15 días aproximadamente) con ciclo de 12:12 luz: oscuridad a 18°C, esta temperatura ralentiza el ciclo de vida a aproximadamente 28 días respecto de los 10 días que tardan cuando son incubadas a 25°C.

Preparación de alimento estándar para Drosophila melanogaster

Para la obtención de 1 litro de alimento se comienza pesando 50 gr de harina, 33,3 gr de levadura, 66,7 gr de sacarosa y 16,5 gr de agar industrial. Se coloca 1 L de agua destilada en recipiente de vidrio y se agregan los ingredientes sólidos, revolviendo con varilla de vidrio. Para obtener un homogeneizado Página | 12

óptimo se realizan entre 5-7 ciclos de hervor en microondas. Se deja enfriar el alimento y previo a la solidificación, se agregan 8,7 ml de ácido propiónico y 8,7 ml de Nipagin 5%, estos últimos con el objetivo de conservar el alimento y evitar el desarrollo de bacterias y hongos. Finalmente, se vierten 10 ml de alimento en cada vial de cultivo y se deja solidificar sin cubrir con tapón de algodón para evitar la acumulación de humedad dentro de los mismos. Una vez que la comida se solidifica, se almacena a 4° C y puede ser utilizada para el cultivo de moscas.

Preparación de placas de puesta

Para la preparación de 500 ml se deben pesar 10 gr de agar alimentario y 12,5 gr de sacarosa. Se colocan 375 ml de agua destilada en recipiente de vidrio y se agregan los ingredientes sólidos, revolviendo con varilla de vidrio. Para obtener una correcta disolución del agar y un homogeneizado óptimo se realizan de 5 a 7 ciclos de hervor en microondas, luego se agregan 125 ml de jugo de fruta. Se deja enfriar la preparación y previo a la solidificación, se agregan 4,35 ml de Nipagin 5%. Finalmente, se vierte el contenido en 45 placas de Petri aproximadamente, una vez que el producto se solidifica y se enfría, se procede a su utilización o almacenamiento a 4°C.

Reconocimiento fenotípico del sexo

Durante la realización de los experimentos resulta indispensable reconocer fenotípicamente el sexo de cada individuo, basándose en características distintivas dadas por la presencia de dimorfismo sexual en la especie. La distinción entre machos y hembras se realizó teniendo en cuenta; el mayor tamaño de estas últimas, la observación del abdomen del macho, que posee tres segmentos fusionados en su extremo terminal, visiblemente melanizados (observándose como una pigmentación oscura) mientras que el abdomen de la hembra no tiene fusionados estos segmentos y su coloración es uniforme, además, la terminación del abdomen es ligeramente puntiaguda en contraste con la del macho, que es más redondeada. Por último, la placa genital de la hembra se caracteriza por tener un órgano ovipositor, mientras que la del macho está formada por múltiples piezas, generalmente de coloración oscura.

Estas características son, por lo general, suficientes para el sexado, aun así, en los momentos inmediatos a la eclosión los patrones de pigmentación pueden ser confusos, utilizándose como estructura auxiliar en la distinción la presencia de peines sexuales (carácter exclusivo del macho), conformados por una hilera de aproximadamente 10 cerdas cortas y gruesas, de color negro y con apariencia de peine que se localizan en la región basal del tarso del primer par de patas.

La selección de las hembras vírgenes de *D. melanogaster* se basa en el conocimiento de que estas no se aparean dentro de las primeras 8 a 12 horas después de emerger de la pupa. Por lo tanto, utilizando esta ventana de tiempo, se pueden recolectar vírgenes, que se separaran de los machos, manteniéndose aisladas en cultivo hasta que se necesiten. Además, para comprobar dicha condición, se examinan rasgos

Tesis Final de Grado | UNS

fenotípicos como la presencia de restos de meconio en el intestino (mancha oscura en la parte ventral del abdomen) de las moscas que tienen pocas horas de haber emergido junto a la observación de las alas aun replegadas sobre el dorso y una coloración tenue en comparación con la de la hembra adulta de mayor edad.

La importancia de seleccionar hembras vírgenes para la totalidad de los experimentos planteados reside en que de esta manera se controla la edad inicial de las hembras que se utilizan (siendo siempre menor a 1 día), y en el caso de que estas se apareen con machos de un genotipo en particular, permite tener certeza de la descendencia obtenida, dado que las hembras de *D. melanogaster* son poliándricas (capaces de aparearse con varios machos) y almacenan esperma durante un periodo prolongado, desde 5 días a 3 semanas luego del apareamiento, como una estrategia que permite el desacople temporal entre el apareamiento y la producción de progenie (permitiendo una mayor fertilidad y el uso eficiente de los gametos) así como la competencia espermática y el uso selectivo del esperma (White et al., 2021).

Los machos se pueden recolectar en cualquier momento, con la mejor eficiencia de apareamiento cuando tienen entre 3 y 10 días de edad. El número de moscas necesarias para iniciar un nuevo cultivo varía, principalmente según el genotipo y los requisitos específicos del experimento. Dependiendo del objetivo, en términos generales, se requieren de 4 a 8 vírgenes y un número menor de machos para cada uno de los viales.

Protocolo de disección y tinción de ovarios de Drosophila melanogaster

Se comienza seleccionando las hembras correspondientes y se las coloca en un pocillo individual con PBS 1X + Tritón 0.2%. Durante la disección se toma al ejemplar de *D. melanogaster* con un fórceps desde la parte anterior del abdomen mientras se ejerce una fuerza mínima sobre el extremo posterior del mismo con un segundo fórceps, para retirar los órganos del sistema digestivo y finalmente los ovarios, que deberán ser colocados en PBS 1X, lo que permite el lavado de las estructuras para asegurarse de que los ovarios estén limpios, libres de restos de otros órganos.

A continuación, se procede a la fijación de las estructuras, colocando los ovarios en un pocillo con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. Finalmente, se realiza la tinción nuclear con 4′, 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) durante 5 minutos y se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS + Tritón 0,2%. Se lleva a cabo el lavado final de las estructuras en glicerol 50%. Las estructuras se reservan en glicerol 50% para su posterior montaje. Para esto se colocan los ovarios en un portaobjetos debidamente rotulado, sobre una gota de glicerol 50% y se cubren con un cubreobjetos, apoyando el mismo en un ángulo de 45° hasta que entre en contacto con el glicerol, evitando así la formación de burbujas que puedan dificultar la posterior visualización. Se sella con esmalte de uñas y finalmente se procede a la observación de las muestras en microscopio de fluorescencia con objetivo de 10X.

La adición de los reactivos se realiza utilizando micropipetas (20-200 μ l) con tips amarillos. Los preparados deberán mantenerse en oscuridad ya que los tintes fluorescentes son sensibles a la luz.

NOTA: Se utilizó un fórceps para separar las ovariolas individuales, ejerciendo una leve fuerza desde el tercio anterior de la longitud del ovario hacia el exterior.

Protocolo de inmunotinción de ovarios de Drosophila melanogaster

La disección y fijación de las estructuras se realiza como se describió anteriormente, obteniéndose los ovarios de las hembras de *D. melanogaster*. Luego de la fijación y permeabilización del tejido, se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS + Tritón 0,2% y se incuba con anticuerpo primario (AC 1°) anti-GFP rabbit (1:100) durante toda la noche a 4°C, en agitación suave para maximizar el contacto antígeno-anticuerpo. Luego se realizan 3 lavados con PBS + Tritón 0,2 % y se incuba con el anticuerpo secundario (AC 2°) anti-rabbit (Alexa 488) (1:200) durante 2 horas a temperatura ambiente y los últimos 5 min se incuba con DAPI para la marcación nuclear.

Nuevamente, se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS + Tritón 0,2% y un lavado final de las estructuras en glicerol 50%. Se procede al montaje como se describió anteriormente. Finalmente se procede a la observación de las muestras en microscopio de fluorescencia con objetivo de 10X.

Obtención y procesamiento de imágenes

Las imágenes obtenidas en los diferentes ensayos fueron analizadas con el programa de procesamiento de imágenes de libre acceso ImageJ (Schneider et al., 2012), ajustándose exposición, brillo y contraste de manera idéntica para los conjuntos de imágenes comparadas.

Las imágenes correspondientes a hembras adultas y ovarios en vista externa se obtuvieron utilizando una cámara digital AmScope MU300 integrada al microscopio estereoscópico.

Los ovarios montados se visualizaron en un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse TE2000-S utilizando el filtro UV-2E/C para evidenciar los núcleos marcados con DAPI y el filtro B-2E/C para el caso de los ovarios con inmunotinción anti-GFP. Las imágenes se obtuvieron con una cámara de alta sensibilidad Nikon DS-Qi2 acoplada, con objetivo 10X.

Balanceadores en Drosophila melanogaster

Los cromosomas balanceadores permiten reconocer fácilmente el genotipo de la progenie como producto de un cruce especifico. Los balanceadores tienen tres características esenciales; 1) presentan al menos un "marcador" dominante, lo que significa una mutación que causa un fenotipo visible dominante, 2) tienen una mutación letal recesiva, por lo que las moscas deben ser heterocigotas para cada balanceador específico que portan y 3) tienen múltiples inversiones que evitan la producción de cruces viables entre el balanceador y su homólogo no balanceado durante la meiosis. Por lo tanto, las

moscas con cromosomas balanceadores dan lugar a una progenie que tiene el balanceador o el cromosoma homólogo del balanceador, es decir, no dan lugar a descendencia con cromosomas recombinantes entre el balanceador y su homólogo. Además, como resultado de las inversiones, los genes a lo largo de un cromosoma balanceador se colocan en un orden lineal diferente al de los genes a lo largo del cromosoma homólogo no balanceador del balanceador. En consecuencia, cuando ocurre un entrecruzamiento entre un balanceador y su contraparte no balanceadora, los cromosomas recombinantes resultantes, llamados cromátidas de intercambio, tienen el contenido genético incorrecto, lo que conduce a una progenie inviable (Markstein, 2018).

Los balanceadores se nombran generalmente con una letra para su cromosoma (F para el primero, que es la X; 5 para el segundo; y T para el tercero), con una M para múltiples inversiones, un número y una letra minúscula para identificar su lugar en una serie. El nombre a veces va seguido del símbolo genético de los principales marcadores que lleva ese balanceador. El balanceador utilizado en los genotipos descriptos a continuación es TM6B (nombre real: In(3LR)TM6B, Antp[Hu] e[1] Tb[1]) con los marcadores dominantes Humeral ($Antp^{Hu}$) (moscas que presentan cerdas adicionales (3-6) en el húmero, algunas de ellas más cortas de lo normal) y Tubby (Tb) (moscas con cuerpo más corto en comparación con las de tipo salvaje) siendo este último un buen marcador durante el estado de larva y pupa (Chyb, Gompel, 2013).

Genotipos

Para llevar a cabo los experimentos se emplearon moscas con un alelo hipomórfico de *dilp8* Mi{MIC}*dilp8*^{MI00727}. Dicho genotipo a su vez actúa como reportero transcripcional de *dilp8* para observar la proteína fluorescente verde (eGFP) en el sitio de activación transcripcional de *dilp8* (Fig. 5), pero aun así esta línea no permite estudiar su dinámica de almacenamiento y liberación, ya que la dinámica de la proteína GFP puede no coincidir con la de DILP8. Los controles para esta línea fueron w[1118] y su control de fondo genético *dilp8*[exp1] generado en el laboratorio mediante excisión perfecta del elemento Mi{MIC}.



Figura 5. Imagen TIRF de folículos ováricos de *D. melanogaster* pertenecientes a hembra virgen de 5 días de edad de la línea Mi{MIC}*dilp8*^{MII0727}. Se observan los núcleos en azul de las células marcados con DAPI y en blanco y verde la expresión de la proteína GFP que indica el sitio de activación transcripcional de *dilp8* en las células foliculares que rodean a los ovocitos de estadio 14.

También empleamos mutantes nulos para *dilp8* generados previamente por el laboratorio mediante reparación homóloga mediada por CRISPR/Cas9, utilizando un único ARN guía específico (ARNg) contra *dilp8* (dilp8gRNA1) para guiar la actividad de la endonucleasa Cas9 de la línea germinal (nos-Cas9.P) hasta el extremo 3' del locus *dilp8*, que codifica las cisteínas esenciales que son críticas para la actividad de DILP8. Se obtuvo el alelo salvaje *dilp8[ag52]* que se utilizó como control de fondo genético y los alelos mutantes nulos *dilp8[ag54]*/TM6B, *dilp8[ag51]*/TM6B, *dilp8[ag50]*/TM6B y *dilp8[ag55]*/TM6B, los cuales presentaban cambios que afectaban la capacidad de formar los puentes disulfuro intra- e intermoleculares característicos de los ILPs (como se puede observar en la Fig. 6). En este trabajo de tesis empleamos el alelo mutante *dilp8[ag54]*/TM6B y *dilp8[ag50]*/TM6B, este último porta una gran deleción que elimina toda la cadena A del péptido. Como alelo control de fondo genético empleamos *dilp8[ag52]*(Tabla 1).

Estos mutantes nulos confieren una ventaja experimental respecto al uso de ARNi (ARN de interferencia) o mutantes hipomorfos; ya que el ARNi existente no elimina completamente el ARNm de *dilp8* y los mutantes disponibles son hipomorfos fuertes, pero no nulos, con lo cual si el sistema fuera lo suficientemente sensible a bajos niveles de DILP8 podría verse enmascarado el fenotipo a estudiar.



Figura 6. Secuencia de las proteínas codificadas por cinco alelos mutantes de *dilp8* generados por reparación homologa mediada por CRISPR/Cas9. Los cuadros rojos indican los residuos de cisteínas conservados involucrados en la formación de los puentes disulfuros característicos de los péptidos semejantes a insulina.

Además, en el diseño experimental inicial también se consideró el empleo del mutante nulo para *Lgr3* Lgr3[ex1]/TM6B, y su respectivo control, Lgr3[exp2]/TM6B. Ambos fueron generados previamente en el laboratorio, removiendo un elemento MB Minos Lgr3MB06848 usando la transposasa MiET1, y obteniendo tres escisiones precisas que sirven como controles genéticos de fondo (utilizando en este caso Lgr3[exp2]), y un alelo de escisión imprecisa, Lgr3[ex1], que consiste en la eliminación de 3.8 kb

que elimina completamente el exón 8 y elimina parcialmente el exón 9. Lgr3[ex1] produce una transcripción con un codón de terminación prematura (PTC) que trunca la proteína LGR3 un aminoácido después de D326, codificando entonces para una proteína gravemente comprometida que es poco probable que se una al ligando o a la señal debido a un dominio de repetición rico en leucina que se une al ligando truncado y la ausencia de los siete dominios transmembrana (7TM) y el extremo carboxilo de acoplamiento de la proteína G (Garelli et al., 2015). Finalmente, empleamos la línea sfGFP::Lgr3, para estudiar el patrón de expresión de *Lgr3* en el ovario y órganos accesorios.

Los genotipos empleados se detallan en la Tabla 1, indicando la condición que representan y la abreviatura con la que se referirá a dicho genotipo de aquí en adelante.

Tabla 1. Detalle de genotipo empleados durante la tesis de grado	. Se indica la condición correspondiente y la abrevi	latura.
--	--	---------

Genotipo	Condición	Abreviatura
w[1118];;Mi{MIC}ilp8MI00727-19	Mutante hipomorfo dilp8	<i>dilp</i> 8 ^{MI00727}
;;dilp8[exp1]	Control de fondo genético	dilp8 ^{exp1}
w[1118];;	Control genérico salvaje	w ¹¹¹⁸
;;dilp8[ag54]/TM6B	Mutante nulo <i>dilp8</i>	$dilp8^{ag54}$
;;dilp8[ag50]/TM6B	Mutante nulo <i>dilp8</i>	$dilp8^{ m ag50}$
;;dilp8[ag52]	Control de fondo genético	dilp8 ^{ag52}
;;Lgr3[ex1]/TM6B	Mutante nulo <i>Lgr3</i>	Lgr3 ^{ex1}
;;Lgr3[exp2]/TM6B.	;;Lgr3[exp2]/TM6B. Control de fondo genético	
w;;sfGFP::Lgr3 F17/TM6B	Marcador de expresión de la proteína endógena LGR3 mediante GFP	Lgr3 ^{ag5}
P{y[+t7.7] w[+mC]=GMR47A04- GAL4}attP2	{y[+t7.7] w[+mC]=GMR47A04- GAL4}attP2Permite expressión de GAL4 bajo el control de secuencias dentro o cercanas a Oamb	
;UAS-RFP/CyO;MKRS/TM6	Permite la expresión de RFP al combinarse con una línea GAL4	

Sistema UAS-Gal4

Una de las herramientas genéticas más versátiles y ampliamente utilizadas disponibles en *D. melanogaster* es el sistema UAS-Gal4, este sistema permite expresar *in vivo* un gen, de manera dirigida y especifica a cualquier célula y en cualquier momento del desarrollo de la mosca. El sistema consiste en una línea "driver", que expresa un transgén que codifica Gal4 bajo el control de elementos promotores o potenciadores específicos de tejido, y una línea "UAS" que responde a Gal4 y contiene un gen de interés rio abajo de cinco o más sitios UAS en tándem. Por lo tanto, el promotor bajo cuyo control se localiza GAL4 determina el sitio y momento de expresión, y la secuencia UAS controla la expresión de un gen blanco (Caygill, Brand, 2016).

Un simple cruce genético de estas dos líneas produce una progenie con el patrón de expresión específico de tejido deseado del gen de interés. La naturaleza modular de este sistema, con cada transgén transportado en una línea separada, tiene muchas ventajas. El requisito específico de la proteína Gal4 para la activación de UAS significa que los transgenes de UAS que codifican productos génicos tóxicos o letales se pueden mantener de forma estable en una población de moscas sin efectos perjudiciales. Además, una única línea impulsora Gal4 puede acoplarse con miles de líneas UAS diferentes, y viceversa, para lograr una gran variedad de patrones de expresión génica espacio-temporal (Caygill, Brand, 2016).

Este sistema se utilizó para generar las líneas UAS-RFP/CyO; $P{y[+t7.7] w[+mC]=GMR47A04-GAL4}attP2$ dilp 8^{ag52} /TM6B y UAS-RFP/CyO; $P{y[+t7.7] w[+mC]=GMR47A04-GAL4}attP2$ dilp 8^{ag54} /TM6B a partir de recombinar la línea $P{y[+t7.7] w[+mC]=GMR47A04-GAL4}attP2$ con ;;dilp8[ag52]/TM6B (alelo salvaje); y en paralelo con ;;dilp8[ag54]/TM6B (alelo mutante), una vez obtenido el recombinante lo cruzamos con ;UAS-RFP/CyO;MKRS/TM6B (Tabla 1). De esta manera, la F1 con el sistema UAS-GAL4 nos permitirá evidenciar específicamente a las células foliculares presentes en los folículos completamente maduros de estadio 14, mediante la expresión de la proteína fluorescente roja (RFP), tanto en moscas control que portan el alelo control, *dilp* 8^{ag52} como en moscas mutantes que portan el mutante *dilp* 8^{ag54} .

Estas líneas quedarán disponibles en el laboratorio para futuros experimentos en los que se plantee emplear folículos maduros de estadio 14, permitiendo la expresión de GAL4 bajo el control de secuencias dentro o cercanas a *Oamb* (receptor de octopamina en "mushroom bodies"), como se observa en la Figura 7.



Figura 7. Imagen TIRF de folículos ováricos de *D. melanogaster* **pertenecientes a hembra de 5 días de edad de la línea 47A04-GAL4 dilp8** (+/+) **> UAS-RFP.** Se observan los núcleos en azul de las células marcados con DAPI y en rojo la expresión de la proteína RFP que permite evidenciar específicamente a las células foliculares presentes en los folículos completamente maduros de estadio 14.

Ensayo de ovulación

Para analizar si DILP8 y su receptor LGR3 están involucrados en el control de la ovulación, se diseñó un protocolo que permite contabilizar el número de huevos que depositan las hembras cada 24 hs. Se comenzó ampliando el genotipo de cada línea de interés, el mutante hipomorfo de *dilp8* (indicado de ahora en adelante como *dilp8*^{MI00727}) y sus respectivos controles, un control genérico (w^{1118}) y uno de fondo genético (*dilp8*^{exp1}), el mutante nulo de *dilp8* (*dilp8*^{ag50}) con su respectivo control de fondo genético (*dilp8*^{ag52}) y, por último, el mutante nulo *Lgr3* (*Lgr3*^{ex1}) y su control (*Lgr3*^{exp2}).

Se seleccionaron hembras vírgenes de 3-4 días de edad para generar las distintas condiciones ensayadas, cada vial representa una réplica biológica del experimento. En el caso de las vírgenes, se colocaron 5 hembras vírgenes por cada vial y para el caso de las apareadas, se colocaron 5 hembras vírgenes en presencia de 3 machos de genotipo control (w^{1118} , $dilp8^{exp1}$, $dilp8^{ag52}$, $Lgr3^{exp2}$, según corresponda) en cada caso. Pasados 4 días, se realizó la puesta de huevos en condiciones estandarizadas, colocando a esas mismas hembras (vírgenes y apareadas) en placas de puesta que se renovaron cada 24 hs. Finalmente, se llevó a cabo el conteo de los huevos depositados en estas placas analizando dos periodos sucesivos de 24 hs. para luego expresar el resultado como el número de huevos puestos por cada hembra cada 48 horas.

Es importante mencionar que el experimento se diseña de esta manera teniendo en cuenta un posible fenómeno de aclimatación, ya que experimentalmente se observa que existe una diferencia entre el número de huevos puestos por las hembras entre el primer y el segundo periodo de 24 hs., por lo tanto, para equilibrar esta diferencia debida posiblemente al proceso de aclimatación al nuevo ambiente en el que se encuentran los individuos, se expresan los resultados de la forma anteriormente mencionada.

Se debe aclarar que, en el caso de las hembras vírgenes, los viales donde se las coloco durante los primeros 4 días se mantuvieron durante una semana adicional evaluando la aparición de larvas, lo que llevaría a descartar dicho ensayo si se detectara la presencia de huevos fertilizados.

La representación gráfica de los datos obtenidos para este experimento incluye el número de replicas biológicas que se analizó en cada caso indicado entre paréntesis y a su vez, en la leyenda, se informa el número total de hembras de *D. melanogaster* para cada condición.

Ensayo de ovulación durante 10 días

El ensayo se diseñó de igual manera que el ensayo de ovulación, extendiendo únicamente el periodo durante el cual se realizó el cambio de las placas de puesta y el conteo del número de huevos presentes en las mismas cada 24 hs y durante 10 días, expresándose los resultados en términos de números de huevos ovulados/hembra/día.

Análisis del número de folículos en el ovario

Luego del ensayo de ovulación de 48 horas, esas mismas hembras fueron utilizadas para llevar a cabo la disección y tinción con DAPI de los ovarios y el análisis de estos luego de la fijación bajo el microscopio de fluorescencia. En este ensayo se contabilizó el número de ovariolas por ovario y el número total de folículos por ovario, distinguiendo a su vez los folículos maduros de estadio 14, folículos de estadio 14 temprano, y estadios inmaduros, considerando en conjunto a los folículos previtelogénicos (estadio 1-7), vitelogénicos (8-10) y de estadio 11-13.



Figura 8. Identificación de los 14 estadios foliculares durante la ovogénesis de *D. melanogaster* (modificada de Jia, Xu, Xie, et al., 2016).

La distinción de los distintos estadios de la ovogénesis se realizó siguiendo los criterios morfológicos establecidos por King, 1970, identificando cada estadio mediante la observación bajo microscopio de

fluorescencia y la tinción nuclear con la sonda DAPI, de manera similar a la Fig. 8. En el primer caso, la identificación de los ovocitos de estadio 14 se realizó en base a la disposición de los núcleos marcados con DAPI de las células foliculares que acompañan al ovocito, experimentalmente se observó que estos núcleos adoptan una disposición lineal marcada solo cuando se encuentran completamente maduros (Fig. 9A). Por el contrario, se contabilizaron como ovocitos de estadio 14 temprano a aquellos que por su morfología se hallaban en estadio avanzado definido por la ausencia de células nodrizas o presencia de un remanente de los núcleos de estas células, pero que aún no presentaban la disposición lineal característica de los núcleos de las células foliculares. Como folículos inmaduros se consideró a todos aquellos que aun presentaban claramente células nodrizas acompañando al ovocito (Fig. 9B).

La representación gráfica de los datos obtenidos para este experimento incluye el número de ovarios que se analizó indicado entre paréntesis y a su vez se informa el número total de hembras de *D*. *melanogaster* para cada condición.



Figura 9. Fotomicrografías de fluorescencia de folículos ováricos pertenecientes a hembras de *D. melanogaster.* Se observan los núcleos en azul de las células marcados con DAPI. En A se indican con flechas rellenas los folículos de estadio 14. En B se indican con flechas vacías los folículos de estadio 14 temprano y con punta de flecha los estadios considerados inmaduros, a modo representativo.

Ensayo de viabilidad de huevo-larva

Como forma de evaluar si DILP8 efectivamente es requerido para mantener la viabilidad de los ovocitos en el ovario, se comenzó analizando la viabilidad de huevo a larva (L1) en condiciones estándar. Nuevamente, al igual que para el ensayo de ovulación, se comenzó ampliando el genotipo de cada línea de interés, considerando el ensayo para el mutante nulo de *dilp8* (*dilp8*^{ag50}) y su respectivo control de fondo genético (*dilp8*^{ag52}).

Posteriormente, se diseñaron los cruces que se detallan en la Tabla 2. para evaluar si la presencia del alelo mutante, en homo- o en heterocigosis afecta la viabilidad de la descendencia. Para generar cada cruce se seleccionaron 5 hembras vírgenes de 3-4 días de edad y 3 machos del genotipo que corresponda.

Tabla 2. Detalle de cruces entre hembras y machos de D. melanogaste	r homocigotas para el genotipo mutante y control.
Se indica en la última columna el genotipo resultante de la descendencia	(F1) luego del apareamiento para cada cruce.

Genotipo macho (F0)	Genotipo hembra (F0)	Genotipo descendencia (F1)
$dilp8^{ag52}(+/+)$	$dilp8^{ag52}$ (+/+)	<i>dilp8</i> +/+
<i>dilp8^{ag50}</i> (-/-)	$dilp8^{ag52} (+/+)$	dilp8 -/+
$dilp8^{ag52}$ (+/+)	$dilp \delta^{ag50}$ (-/-)	dilp8 +/-
dilp8 ^{ag50} (-/-)	<i>dilp8^{ag50}</i> (-/-)	dilp8 -/-

Pasados 4 días, se realizó la puesta de huevos en condiciones estandarizadas, colocando a esas mismas hembras apareadas en placas de puesta que se renovaron cada 24 horas durante 2 días consecutivos. Para cada placa se realizó el conteo del número de huevos presentes, y al día siguiente, se contabilizo el número de larvas, indicando la viabilidad de los ovocitos como el porcentaje de huevos del cual emergen larvas.

Resistencia al ayuno y deshidratación

Se ha descripto previamente que la falta de otros ILPs en los adultos de *D. melanogaster* hace que estos presenten una mayor resistencia al ayuno que los controles, es por esto que se diseña este ensayo de resistencia al ayuno y deshidratación a fin de elucidar si este comportamiento se replica ante la ausencia de DILP8.

Se da inicio al ensayo ampliando el genotipo de cada línea de interés, considerando particularmente para este experimento al mutante nulo de dilp8 ($dilp8^{ag54}$) y su respectivo control de fondo genético ($dilp8^{ag52}$). Se estudian 3 condiciones: hembras vírgenes, apareadas y machos, que permanecen 5 días en viales con condiciones estándar. Al cumplirse el quinto día, se coloca a los animales en viales vacíos (en ausencia de agua y alimento) en un número no mayor a 20 individuos por vial.

Finalmente, una vez que los individuos son sometidos a condiciones de ayuno y deshidratación, se evalúa la supervivencia cada 2 horas, contando los individuos que se observan muertos a través del vial hasta que la totalidad de ellos fenezca, realizando un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier.

Análisis de datos, diagramas y estadística

En todos los experimentos informados en esta tesis de grado, no se excluyó ningún dato. Todos los datos, incluidos los valores atípicos, están representados en las figuras y se utilizaron en los análisis estadísticos. No se hizo cegamiento y no se usó ningún método en particular para atribuir individuos a

grupos experimentales. Se utilizó la versión 8.0.1 de GraphPad Prism para el procesamiento estadístico de los datos y la generación de gráficos y diagramas.

En el análisis estadístico el alfa se estableció en 0.05 para todas las pruebas, indicándose **ns** (no significativo, p>0.05), * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001), **** (p<0.001), según sea el caso.

Los datos cuantitativos se sometieron a la prueba de Shapiro-Wilk y a la prueba Brown-Forsythe para verificar normalidad y homocedasticidad, respectivamente. En aquel conjunto de datos donde fue necesario, se llevó a cabo la normalización de los mismos. Luego, la comparación entre las diferentes condiciones se realizó mediante ANOVA simple (seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey) o prueba t de Student para muestras independientes, según corresponda. Alternativamente, se realizó una prueba de suma de rangos de Mann-Whitney para aquel conjunto de datos que no haya podido ser normalizado. Únicamente se utilizó la prueba t de Student pareada para la comparación de los datos del número de huevos puestos/hembra en el seguimiento a 10 días. Para la comparación de la distribución de folículos en el ovario se lleva a cabo una prueba de homogeneidad de Chi-Cuadrado. Por último, el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier se sometió a las pruebas Mantel-Cox (log-rank) y Gehan-Breslow-Wilcoxon.

Los datos se representaron mediante diagrama de cajas y bigotes (box-whisker), siendo especialmente útiles para comparar entre grupos de datos en el mismo gráfico. En estos diagramas se resume la información que contienen los datos utilizando como medidas de localización a los cuartiles (Q) y los valores máximo y mínimo. El diagrama consiste en un rectángulo (caja) limitado en su parte superior e inferior por el tercer (3Q) y primer cuartil (1Q), que dejan tres cuartos (75%) de los valores de la variable por debajo y un cuarto (25%) de los valores por debajo, respectivamente. La línea dentro de la caja indica el valor de la mediana o segundo cuartil (Q2), mientras que el símbolo "+" dentro de la caja representa la media muestral. Finalmente, los brazos de Tukey indican los limites superior e inferior, fijados en ± 1.5 veces el rango intercuartil, por encima y por debajo de Q3 y Q1 respectivamente, esta representación permite graficar a los datos que sobrepasan estos límites como puntos individuales, evitando exagerar el rango de la variable y resaltando a los posibles datos anómalos o "outliers". Dicha visualización proporciona una visión general de la simetría de la distribución de los mismos; si la mediana no está en el centro del rectángulo, la distribución no es simétrica.

Los restantes datos experimentales se presentan como medias \pm el error estándar de la media (SEM) en el caso del número de huevos puestos/hembra en el seguimiento a 10 días, mientras que se presentan como gráficos de barras o columnas para la distribución de folículos de diferentes estadios en el ovario y para el ensayo de viabilidad.

RESULTADOS

Identificación del rol de DILP8 en el ovario

La falta de dilp8 en hembras adultas de D. melanogaster provoca una disminución de la ovulación

El hallazgo de DILP8 en el ovario, específicamente en las células foliculares de los ovocitos de estadio 14 y en el cuerpo residual que estas generan (conocido como cuerpo lúteo), permite plantear la hipótesis de que este péptido perteneciente a la familia de la insulina podría tener una función conservada, actuando como una relaxina, participando en el desprendimiento de las células foliculares y/o relajando el oviducto para facilitar el pasaje del ovocito hacia el útero, permitiendo la correcta ovulación.

Hipotetizando un posible rol de DILP8 durante la ovulación, comenzamos analizando el número de huevos puestos por cada hembra en un periodo de 48 horas, en hembras control y mutantes para *dilp8*, vírgenes y apareadas con machos control. Primeramente, evaluamos este proceso en hembras mutantes hipomorfas para *dilp8* que presentan niveles reducidos de expresión de *dilp8*. Los datos obtenidos muestran una disminución altamente significativa en la ovulación por parte de las hembras vírgenes mutantes hipomorfas, en comparación con ambos controles (*dilp8*^{+/+} y w^{1118}), dado que el promedio de huevos depositados disminuye de 32 y 60 (para cada control respectivamente) a 1 huevo por hembra en el mutante *dilp8*^{-/-} (Fig. 10a).

Para el caso de las hembras apareadas, los resultados son diferentes (Figura 10a). En primer lugar, no se observan diferencias en el número de huevos depositados entre las hembras mutantes hipomorfas y su control de fondo genético ($dilp8^{+/+}$), mientras que la diferencia resulta significativa cuando se compara con el control genérico salvaje (w^{1118}), con una disminución de aproximadamente 1.4 veces en la ovulación. Sin embargo, dado que existen diferencias significativas entre el control genérico y el control de fondo genético (Fig. 10a), es pertinente destacar la importancia de utilizar los controles adecuados, en este caso, la interpretación de los resultados se modifica ampliamente según se considere al control salvaje w^{1118} o al control de fondo genético $dilp8^{+/+}$ para comparar con el mutante hipomorfo $dilp8^{-/-}$, indicando que el fondo genético está influyendo en el fenotipo observado, pudiendo llevar a una conclusión errónea.

Además del análisis del número de huevos puestos, llevamos a cabo la observación en vista externa (lateral y ventral) de la hembra adulta de *D. melanogaster* en las diferentes condiciones estudiadas, poniendo principal atención al aspecto del abdomen, que suele encontrarse hinchado por el aumento de volumen cuando las hembras presentan ovocitos retenidos en sus ovarios, dado que las estructuras reproductivas se hallan en esta región corporal. Esta observación directa sirve de complemento para evaluar si la disminución de la tasa de ovulación observada en las hembras vírgenes mutantes se asocia con una menor producción de huevos, esperando observar en este caso un abdomen de menor volumen, Página l 25

o si existe un efecto de retención asociado a dificultades durante la ovulación que se correspondería con un abdomen hinchado que puede ser reconocible externamente.

Los resultados de esta observación muestran que existe un mayor volumen abdominal en el caso de las hembras *dilp8^{-/-}* tanto vírgenes (Fig. 10 j, k) como apareadas (Fig. 10 l, m), en comparación con la observación de las hembras control (Fig. 10 b-i), lo que podría estar indicando que la producción de huevos no se interrumpe y que, por lo tanto, los ovocitos están siendo retenidos en el ovario de la hembra.





Figura 10. Disminución de la ovulación en hembras vírgenes mutantes hipomorfas para *dilp8.* a. Diagrama de cajas y bigotes indicando número de huevos ovulados/hembra/48 horas para hembras vírgenes y apareadas de *D. melanogaster*, control w^{1118} y *dilp8*^{exp1}(+/+), y mutantes *dilp8*^{M100727}(-/-). Se indica entre paréntesis el número de replicas biológicas (n) para cada condición, el número de hembras totales analizadas fue (98), (60), (86), (90), (31) y (100) respectivamente. El resultado de la prueba ANOVA seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey se expresa con **** (p<0.001), *** (p<0.01) o ns (p>0.05) según el caso. La media se halla representada por el signo "+" en el diagrama. Los valores "outliers" se identifican con círculos en el diagrama. b-m. Imágenes representativas en vista lateral y ventral de hembras adultas de *D. melanogaster* (-/-)

Dada la mínima expresión de dilp8 que puede presentarse en el mutante hipomorfo y que podría estar enmascarando un posible fenotipo en hembras apareadas, decidimos evaluar la ovulación en mutantes nulos para dilp8, que carecen completamente de la hormona y en los que, por lo tanto, sería razonable observar un efecto mayor en relación a dicha ausencia. Al igual que observamos para las hembras vírgenes mutantes hipomorfas, las hembras vírgenes mutantes nulas ($dilp8^{-/-}$) también muestran una diferencia altamente significativa en la puesta de huevos, siendo hasta 4 veces menor en comparación con su control de fondo genético $dilp8^{-/-}$. Al analizar el número de huevos puestos por hembras apareadas $dilp8^{-/-}$ observamos una disminución significativa en el número de huevos ovulados, siendo la magnitud de este efecto menor al observado para las hembras vírgenes, disminuyendo aproximadamente 1.2 veces (Fig. 11a).

Tesis Final de Grado | UNS

Dronseck Agustina

Al igual que para las hembras *dilp8*^{MI00727}(-/-), también realizamos la observación en vista externa del aspecto del abdomen. En esta comparación visual no se identifican diferencias en cuanto al volumen abdominal entre las hembras vírgenes mutantes y control (Fig. 11 b, c, f, g), aunque se puede destacar el abdomen abultado de las hembras apareadas mutantes en comparación con las hembras control (Fig. 11 d, e, h, i) pudiendo reflejar nuevamente el efecto de retención anteriormente mencionado.



Figura 11. Disminución de la ovulación en hembras mutantes nulas vírgenes y apareadas para *dilp8.* a. Diagrama de cajas y bigotes indicando número de huevos ovulados/hembra/48 horas para hembras vírgenes y apareadas de *D. melanogaster* de cada genotipo. Se indica entre paréntesis el número de replicas biológicas para cada condición, el número de hembras totales analizadas fue (116), (94), (111) y (63) respectivamente. El resultado de la prueba t de Student se expresa con **** (p<0.0001), * (p<0.05) según el caso. La media se halla representada por el signo "+" en el diagrama. Los valores "outliers" se identifican con círculos. b-i. Imágenes representativas en vista lateral y ventral de hembras adultas de *D. melanogaster* de cada genotipo, vírgenes y apareadas, control *dilp*^{8ag52} (+/+) y *mutantes dilp*^{8ag50} (-/-).

Luego de analizar el comportamiento diferencial que se da para el caso de las hembras apareadas mutantes $dilp 8^{MI00727}(-/-)$ (que no presentan diferencias significativas en la ovulación en comparación con su control) respecto de las hembras apareadas $dilp 8^{ag50}$ (-/-), que si muestran una disminución significativa, decidimos avanzar en la identificación del rol de DILP8 en el sistema reproductor femenino utilizando únicamente al mutante nulo de $dilp 8^{ag50}$ (-/-), ya que nos confiere una ventaja experimental respecto a uso del mutante hipomorfo, dado que si el sistema fuera sensible a bajos niveles de DILP8 podría estar enmascarando el fenotipo a analizar.

En este contexto, planteamos analizar si las diferencias en la ovulación durante las primeras 48 hs. se mantenían a lo largo del tiempo, considerando un periodo de 10 días durante el cual se registró el número de huevos depositados por cada hembra cada 24 hs. Finalmente, la diferencia entre las hembras vírgenes control $(dilp8^{+/+})$ y mutantes $(dilp8^{-/-})$ se mantiene a lo largo del tiempo, con valores de entre 20-35 huevos por hembra para el control, y de 1-10 huevos para el mutante (Fig. 12A), mientras que para las hembras apareadas la diferencia en el número de huevos ovulados no resulta significativa para el periodo estudiado (Fig. 12B). En conclusión, la diferencia observada durante las primeras 48 hs. se mantiene en

el tiempo para las hembras vírgenes, siendo las hembras mutantes ($dilp8^{-t-}$) las que depositan menor cantidad de huevos que su control ($dilp8^{+/+}$), mientras que para las hembras apareadas esta diferencia resulta significativa para el ensayo de ovulación durante 48 hs. pero no así para el ensayo a 10 días, para el que no se hallan diferencias en cuanto a lo ovulación en hembras mutantes y control. Aun así, es relevante mencionar que los resultados obtenidos del ensayo de ovulación a 48 hs. se sustentan en un mayor número de replicas biológicas en comparación con este último ensayo a 10 días.



Figura 12. La disminución en la ovulación se mantiene a lo largo del tiempo para hembras vírgenes mutantes para *dilp8*. A. número de huevos ovulados/hembra/día durante 10 días para hembras vírgenes control (*dilp8*^{ag52}) (+/+) y mutantes (*dilp8*^{ag50}) (-/-). B. número de huevos ovulados/hembra/día durante 10 días para hembras apareadas control (*dilp8*^{ag52}) (+/+) y mutantes (*dilp8*^{ag50}) (-/-). El número de replicas fue (4) para cada condición, representando cada punto del grafico la media ± SEM. El resultado de la prueba t de Student pareada se expresa a la derecha del gráfico, siendo **** (p<0.0001) en (A) y ns (p>0.05) en (B).

Posteriormente, procedimos a evaluar la organización de los folículos dentro de los ovarios de las hembras en las diferentes condiciones. Hipotetizamos que la disminución en el número de huevos depositados por hembras carentes de *dilp8* podría deberse a que DILP8 está actuando a diferentes niveles que no pueden diferenciarse únicamente con la información recopilada hasta el momento, es decir, la ausencia de DILP8 en los mutantes nulos podría estar afectando el proceso de ovogénesis en sí mismo (formación de un ovocito maduro) o la ovulación (liberación de un ovocito maduro desde el ovario).

Primeramente, contabilizamos el número de ovariolas por ovario para las hembras mutantes $dilp8^{-L}$ y control $dilp8^{+/+}$, tanto vírgenes como apareadas (Fig. 13a). Este valor es considerablemente fijo según los recursos bibliográficos consultados, variando solo de entre 16-20 ovariolas, en coincidencia con esto, no hallamos diferencias significativas al comparar dentro de cada grupo. Notablemente, y en contraposición con la bibliografía, se observan diferencias altamente significativas al comparar a las hembras control según sean vírgenes o apareadas y lo mismo ocurrió para las hembras mutantes (Fig. 13a), sugiriendo que el apareamiento mismo lleva a una disminución en el número de ovariolas por ovario.

Luego de demostrarse una disminución significativa en el número de huevos depositados por hembras mutantes para *dilp8*, asociada a un abdomen hinchado, decidimos evaluar el número de folículos maduros en sus ovarios con el objetivo de dilucidar si el menor número de huevos depositados se corresponde con un mayor número de folículos maduros retenidos en el interior de estas hembras. Efectivamente encontramos que el número de folículos maduros (ovocitos de estadio 14, completamente desarrollados) resulta significativamente mayor en los ovarios provenientes de hembras mutantes vírgenes en comparación con los ovarios de hembras vírgenes control (Fig. 13B). Estos resultados permiten plantear un rol de DILP8 durante la ovulación actuando como un facilitador de este proceso, ya que en aquellas hembras donde no hay expresión de *dilp8*, se observa una acumulación de folículos maduros que han logrado avanzar en su desarrollo, es decir, la ovogénesis no se ve afectada, pero no pueden ser ovulados normalmente, quedando retenidos en los ovarios de la hembra.

Sin embargo, esta diferencia en el número de ovocitos de estadio 14 no resulta significativa para las hembras apareadas (control *dilp8*^{+/+} y mutantes *dilp8*^{-/-}) (Fig. 13b), dado que en ambos casos se alcanza un promedio de 2 ovocitos de estadio 14 por ovario, estos resultados son concordantes con las fotomicrografías de fluorescencia de los ovarios individuales (Fig. 13 h, j) en las que se advierten numerosos estadios tempranos en desarrollo dentro de cada ovariola, con mayor intensidad de fluorescencia debido a las presencia de numerosos núcleos asociados a las células nodrizas aun presentes, y una escasa presencia de formas maduras.

Además, los resultados del ensayo tanto para las hembras vírgenes como apareadas se acompañan con fotografías representativas de los ovarios en vista externa luego de la disección (Fig. 13 c, e, g, i) para corroborar que estos fueron obtenidos de cada hembra en forma adecuada y manteniendo su estructura normal, siendo indispensable para la correcta obtención de los datos y su interpretación posterior.

Dronseck Agustina



Figura 13. Las hembras vírgenes mutantes para *dilp8* muestran un aumento del número de folículos maduros en sus ovarios. Diagrama de cajas y bigotes indicando número ovariolas (a) y número de ovocitos maduros (estadio 14) (b) por ovario para hembras vírgenes y apareadas de *D. melanogaster* de genotipo control $(dilp8^{ag52})$ (+/+) y mutante $(dilp8^{ag50})$ (-/-). Para ambos diagramas se indica entre paréntesis el número de ovarios analizados para cada condición. (a) La prueba de suma de rangos de Mann-Whitney resulta ns (p<0.05) para la comparación entre hembras vírgenes así como el resultado de la prueba t de Student para hembras apareadas. El resultado de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey resulta * (p<0.05), ** (p<0.01), respectivamente. (b) El resultado de la prueba t de Student es **** (p<0.0001), ns (p>0.05), respectivamente. La media se halla representada por el signo "+" en el diagrama. Los valores "outliers" se identifican con círculos. c-j. Imágenes representativas de ovarios de hembras adultas de *D. melanogaster* en vista externa y bajo microscopio de fluorescencia, respectivamente. En vista externa, se observa la estructura del par de ovarios correspondientes a cada ejemplar luego de la disección. En las fotomicrografías de fluorescencia se observan los ovarios montados individualmente con sonda DAPI para el marcaje de los núcleos bajo filtro UV-2E/C.

Al evaluar la presencia de folículos inmaduros en los ovarios pertenecientes a hembras control y mutantes encontramos que, para el caso de las hembras vírgenes, el número de formas inmaduras es semejante entre $dilp8^{+/+}$ y $dilp8^{-/-}$ (Fig. 14A) mientras que se encuentra un mayor número de ovocitos de estadio 14 temprano (siendo aquellos ovocitos que aún no presentan la disposición lineal característica de los núcleos de las células foliculares) en las hembras vírgenes control $dilp8^{+/+}$. Esta información permite una interpretación más acertada de las fotomicrografías de las Figuras 13 d y f, en las que las diferencias no se observan a nivel de folículos inmaduros, presentando una estructura ovárica similar, sino que se dan particularmente por la presencia mayoritaria de ovocitos de estadio 14 maduros en los ovarios de hembras mutantes $dilp8^{+/+}$ y diferencia de lo que ocurre con las hembras vírgenes, la tendencia se modifica para las apareadas, hallándose un aumento significativo en el número de folículos inmaduros presentes en el ovario y un mayor número de ovocitos de estadio 14 tempranos en las hembras mutantes $dilp8^{+/+}$ (Fig. 14B).



Figura 14. Las hembras apareadas mutantes para *dilp8* muestran un mayor número de folículos inmaduros y de estadio 14 temprano. Diagramas de cajas y bigotes indicando número de folículos inmaduros (A) y número de ovocitos de estadio 14 temprano (B) por ovario para hembras vírgenes y apareadas de *D. melanogaster* de genotipo control (*dilp8*^{ag52}) (+/+) y mutante (*dilp8*^{ag50})(-/-). Se indica entre paréntesis el número de ovarios analizados para cada condición. El resultado de la prueba t de Student se expresa con ns (p>0.05), * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001), **** (p<0.001) según el caso. La media se halla representada por el signo "+" en el diagrama. Los valores "outliers" se identifican con círculos.

Con el objetivo de complementar este resultado, estudiamos la distribución de los diferentes estadios foliculares hallados en los ovarios de las hembras. En ambas comparaciones, tanto entre vírgenes como apareadas la distribución de los diferentes estadios no es homogénea, es decir, existen diferencias significativas entre las hembras control y mutantes. Del análisis de las hembras vírgenes se evidencia que el porcentaje de formas inmaduras es similar en ambos genotipos ($dilp8^{+/+}$ y $dilp8^{-/-}$), mientras que las diferencias están dadas principalmente por la distribución de las formas avanzadas, con una mayor representación de ovocitos de estadio 14 tardío presentes en los ovarios pertenecientes a hembras dilp8-¹⁻, en conjunto con una menor cantidad de ovocitos de estadio 14 temprano (Fig. 15A), esta diferencia podría indicar una alteración en el ritmo de ovulación de hembras mutantes vírgenes, ya que en las hembras vírgenes control, la ovulación parece ocurrir a un ritmo normal y por lo tanto, no hay una presencia marcada de ovocitos de estadio 14 completamente maduros (y preparados para ser ovulados) en el ovario, y si se encuentran folículos en desarrollo avanzado pero aún no completamente maduros, como evidencia de un proceso activo de ovogénesis y ovulación. En contraposición, cuando las hembras se aparean, la tendencia se invierte para el caso de los ovocitos de estadio 14 temprano, que representan una mayor proporción en las hembras apareadas mutantes $dilp8^{-t}$ en comparación con el control $dilp8^{+t+}$ (Fig. 15B).

Los resultados expuestos hasta el momento indican que el apareamiento en sí mismo es capaz de producir cambios a nivel fisiológico que modifican el efecto que genera la ausencia de *dilp*8 en las

hembras mutantes *dilp*8^{-/-}, en la mayoría de los casos, disminuyendo la magnitud de dicho efecto, respecto a lo observado en hembras vírgenes.



Figura 15. Las hembras vírgenes mutantes acumulan ovocitos de estadio 14, mientras que las mutantes apareadas acumulan principalmente estadios inmaduros. Gráficos de distribución de folículos en cada ovario para hembras vírgenes (A) y apareadas (B) de *D. melanogaster* de genotipo control $(dilp8^{ag52})$ (+/+) y mutante $(dilp8^{ag50})$ (-/-). Se distingue entre ovocitos de estadio 14, ovocitos de estadio 14 temprano y folículos inmaduros en todos los casos, expresando la distribución en porcentaje. El resultado de la prueba de homogeneidad de Chi-Cuadrado se expresa con *** (p<0.001) o **** (p<0.0001) según el caso.

Participación del receptor de DILP8, LGR3, en el proceso de ovulación

Considerando que el rol ejercido por DILP8 durante las etapas previas del desarrollo, como la coordinación del crecimiento de las distintas partes del cuerpo (Garelli et al., 2015) y la ejecución del PMP (Heredia, Volonté, Pereirinha, et al., 2021) es mediado y dependiente de la presencia de LGR3 como su receptor, evaluamos la participación de este receptor en el proceso de ovulación.

Primeramente, se lleva a cabo un ensayo de ovulación empleando hembras mutantes nulas para *Lgr3* (*Lgr3*-^{*l*-}) y su control (*Lgr3*+^{*l*+}), a fin de evaluar si la ausencia del receptor LGR3 imita el efecto provocado por la ausencia de DILP8. Sin embargo, los resultados de este ensayo no son concluyentes Página | 32

dada la escasa viabilidad del mutante en homocigosis y la dificultad para obtener un número de replicas biológicas significativo que permita el análisis estadístico, aun así, la tendencia observada para las hembras vírgenes se mantiene (Fig. 16).



Figura 16. Diagrama de cajas y bigotes indicando número de huevos ovulados/hembra/48 horas para hembras vírgenes y apareadas de *D. melanogaster* de cada genotipo, $Lgr3^{exp1}$ (+/+) y $Lgr3^{exp2}$,(-/-). Se indica entre paréntesis el número de replicas biológicas para cada condición, el número de hembras totales analizadas fue (31), (3), (30) y (3) respectivamente. El resultado de la prueba t de Student se expresa con * (p<0.05). La media se halla representada por el signo "+" en el diagrama.

En paralelo analizamos el patrón de expresión de *Lgr3* en el sistema reproductor femenino de *D. melanogaster*, como una forma de identificar los tejidos o estructuras sobre los cuales podría estar actuando DILP8, si es liberado desde las células foliculares de los ovocitos maduros (estadio 14) o del cuerpo lúteo luego de la ovulación. Para este ensayo se disecciona el sistema reproductor de hembras de la línea *Lgr3*^{ag5}, que expresa el receptor LGR3 fusionado a una GFP, permitiendo identificar la expresión de la proteína endógena de *Lgr3*. Procedemos a su observación luego de la inmunotinción con anticuerpos 1° (anti-GFP) y 2° para amplificar la señal de la GFP. No hallamos expresión de LGR3 en las regiones específicas del ovario estudiadas, ni en las estructuras que forman parte del tracto reproductivo o que acompañan el mismo, como se observa en las Fig. 17A y 17B, en donde no hay evidencia de expresión en el oviducto común como tampoco en las espermatecas. Aun así, estos resultados preliminares no descartan la hipótesis de que DILP8 actúa a través de su receptor LGR3 en el sistema reproductor, sino que las técnicas deberían perfeccionarse y repetirse nuevamente en futuros estudios, evaluando otras estructuras del tracto reproductor como así también cerebro ya que no descartamos que DILP8 sea liberado y se una LGR3 a nivel del sistema nervioso central.



Figura 17. Análisis de la expresión de LGR3 en el sistema reproductor de hembras *Lgr3*^{ag5} de *D. melanogaster*. A. Fotomicrografía de fase y de fluorescencia. Se indica con una flecha la estructura del sistema reproductor que se está analizando (oviducto común), marcándose los núcleos con DAPI y la expresión de LGR3 con sfGFP. B. Fotomicrografía de fase y de fluorescencia. Se indica con dos flechas la estructura del sistema reproductor que se está analizando (espermatecas), marcándose los núcleos con DAPI y la expresión de LGR3 con sfGFP.

DILP8 no participa en el mantenimiento de viabilidad del ovocito fecundado en condiciones normales de cultivo de *D. melanogaster*.

Se conoce que, en forma semejante a los ovocitos de mamíferos que se mantienen viables por largos períodos de tiempo en el ovario, las hembras de *Drosophila* son capaces de retener los ovocitos maduros hasta el momento en que encuentren condiciones ambientales y nutricionales propicias para el desarrollo del embrión. En condiciones de laboratorio los ovocitos maduros pueden ser retenidos hasta veinte días en el ovario sin pérdida significativa de la viabilidad (Wyman, 1979). Por lo tanto, hipotetizamos que la expresión de *dilp8* en el ovario también podría estar vinculada al mantenimiento de la viabilidad de los ovocitos maduros, dado que este péptido se expresa justamente durante el período de tiempo en que estos son almacenados en el ovario esperando la ovulación.

En este contexto, para evaluar si DILP8 es requerido para mantener la viabilidad de los ovocitos en el ovario, se analizó la viabilidad de huevo a larva (L1), representada como el porcentaje de huevos del cual emergen larvas. Al analizar los resultados obtenidos no hallamos diferencias significativas en la viabilidad para la totalidad de condiciones analizadas (Fig. 18), es decir, independientemente de si el alelo mutante se presente en homo- o en heterocigosis, la viabilidad no se ve afectada respecto a un ovocito salvaje, siendo del 80-90% en todos los casos. Estos resultados indicarían que la presencia de DILP8 no es requerida durante el proceso de embriogénesis y el desarrollo del primer estadio larval (L1).



Figura 18. DILP8 no participa en el mantenimiento de la viabilidad de huevo a L1. Gráfico de columnas indicando el porcentaje de viabilidad de huevo a larva. Se evalúa la viabilidad de la progenie resultante (F1) de los diferentes cruces, indicando en el cuadro inferior el genotipo en cada caso para el alelo *dilp8*. El número de replicas fue (2) para cada condición. El resultado de las comparaciones múltiples mediante prueba de Tukey fue ns (p>0.05) en todos los casos.

<u>Hembras apareadas mutantes para *dilp8* presentan una mayor resistencia al ayuno y</u> <u>deshidratación</u>

En función de evaluar un posible rol metabólico se llevó a cabo el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier estudiando las curvas de supervivencia de 3 condiciones: hembras vírgenes, apareadas y machos apareados, cada una de ellas considerando genotipo control $(dilp8^{+/+})$ y mutante $(dilp8^{-/-})$ en condiciones de ayuno y deshidratación. No se hallaron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de hembras vírgenes control y mutantes (Fig. 19A), mientras que las diferencias resultaron altamente significativas para las hembras apareadas (Fig. 19B), demostrando una mayor resistencia al ayuno y la deshidratación para las hembras apareadas mutantes para *dilp8*. Por último, en el caso de los machos apareados, los resultados de ambas pruebas estadísticas analizadas no son coincidentes, aun así, interpretamos que no existen diferencias entre las curvas dado que estás son altamente similares en comportamiento y estructura y la mediana de supervivencia es igual para el control y el mutante (Fig. 19C).



Figura 19. Hembras apareadas mutantes para *dilp8* **presentan una mayor resistencia al ayuno y deshidratación.** Curva de supervivencia por Kaplan-Meier para hembras vírgenes (A), apareadas (B) y machos apareados (C), genotipo control $dilp8^{ag52}$ (+/+) y mutante $dilp8^{ag54}$ (-/-). Los datos se representan en porcentaje, indicando con barras el error estándar (ES). Se indican entre paréntesis primero el número de replicas biológicas seguido del número total de animales en cada caso. Las curvas se analizaron mediante las pruebas Mantel-Cox (log-rank) y Gehan-Breslow-Wilcoxon, siendo el resultado para ambas ns (p<0.05) en (A), *** (p<0.001) en (B) y, siendo diferencialmente * (p<0.05) para Mantel-Cox y ns (p>0.05) para Gehan-Breslow-Wilcoxon en (C).

DISCUSIÓN

En *Drosophila melanogaster*, tanto las hembras vírgenes como las apareadas son capaces de ovular tal como muestran los resultados obtenidos. La ovulación implica liberar un ovocito maduro desde el ovario al oviducto lateral y el éxito de este proceso depende de una serie de eventos que deben ocurrir prácticamente en simultaneo. En primer lugar debe darse la ruptura folicular en un único ovocito, que involucra el desprendimiento de las células foliculares somáticas que acompañan al mismo, además, este ovocito como tal debe ser capaz de ingresar al oviducto, lo que requiere cambios a nivel de la musculatura ovárica y de los músculos del oviducto, implicando una coordinación compleja de eventos entre diferentes estructuras presentes en el sistema reproductivo femenino (White et al., 2021).

Nuestros resultados muestran que la ausencia de *dilp8* no suprime por completo la ovulación, por lo que es interesante plantear un rol de DILP8 como facilitador del proceso de ovulación, participando en paralelo en los diferentes eventos. Se conoce que la octopamina (OA), monoamina biogénica reguladora central de la fisiología y el comportamiento de los invertebrados en variedad de contextos biológicos, se produce y libera en neuronas octopaminérgicas que inervan el tracto reproductivo femenino ejerciendo sus efectos mediante la unión a sus receptores en las células diana que pueden ubicarse localmente o en lejanía (White et al., 2021). En particular, la OA modula la actividad de la musculatura ovárica durante el proceso de ovulación, aumentando la amplitud y la frecuencia de las contracciones musculares, facilitando la liberación del ovocito desde el ovario (Meiselman et al., 2018), sin embargo, el receptor de OA y las vías de señalización que median este efecto siguen siendo desconocidas actualmente. La expresión de *dilp*8 en las células foliculares de ovocitos maduros podría actuar como una señal que indique la presencia de ovocitos en condiciones de ser ovulados y que, por lo tanto, participe en el inicio de la modulación de OA sobre la musculatura ovárica para facilitar dicho proceso. Si bien es necesario un mayor número de replicas experimentales, la ausencia de LGR3 en el mutante nulo (Lgr3-/-) nos estaría mostrando una disminución en la ovulación de hembras vírgenes, semejante a lo observado en el mutante de *dilp8* por lo que a pesar de no haber encontrado expresión de este receptor en la región del oviducto estudiada no podemos descartar que DILP8 esté actuando a través de LGR3, ya sea en las terminales presinápticas del tracto reproductivo para aumentar la producción sináptica de OA, en tejido no neuronal en el tracto reproductivo, o centralmente en el sistema nervioso, para lo que ya existen evidencias de este mecanismo durante el desarrollo (Garelli et al., 2015; Heredia, Volonté, Pereirinha et al., 2021).

Como se menciona anteriormente, la ovulación también requiere de modificaciones musculares a nivel del oviducto. Se ha descripto que la inhibición de la contracción del musculo del oviducto es mediada por el aumento de AMPc en las células musculares. Este aumento, a su vez, se ha relacionado con la presencia de OA actuando a través del receptor β-adrenérgico (Octβ₂R) que se acopla a AMPc, aunque Página | 37

se desconoce actualmente la vía de señalización por debajo del AMPc que culmina con la relajación del musculo del oviducto, permitiendo el pasaje del ovocito (White et al., 2021).

El papel de OA en la modulación de la musculatura del oviducto parece ser conservado, ya que actúa como un inhibidor de la contracción del oviducto en muchos insectos (Orchard, Lange, 1987; Hana, Lange, 2017; Chowanski, Spochacz, Szymczak, Rosinski, 2017; Cook, Wagner, 1992; Bamji, Orchard, 1995). Sin embargo, en el grillo Gryllus bimaculatus, la aplicación de OA al oviducto aumenta la frecuencia y la amplitud de las contracciones espontáneas (Tamashiro, Yoshino, 2014), lo que sugiere que en algunas especies otras moléculas pueden inhibir la contracción del oviducto, como podría ser en el caso de D. melanogaster, siendo DILP8 liberado desde las células foliculares somáticas o desde el cuerpo lúteo quien participe en la relajación del oviducto. Esto tendría concordancia con un posible rol conservado dado que se trata de un péptido de la familia de las relaxinas, las cuales son producidas por el cuerpo lúteo y la placenta de mamíferos durante el embarazo, promoviendo el relajamiento de la sínfisis púbica durante el parto, entre otras múltiples funciones (Chow et al., 2012). DILP8 podría estar ejerciendo esta función actuando a través de su receptor LGR3, dado que es un receptor acoplado a proteína G que incrementa los niveles intracelulares de AMPc cuando se activa. De confirmarse que DILP8 actúa a través de LGR3 sería interesante identificar la vía de señalización activada por DILP8, pudiendo utilizarse moscas transgénicas que posean un elemento de respuesta a AMPc clonado rio arriba de una RFP (CRE-RFP) (Garelli et al., 2015) para observar el patrón de expresión de RFP en las moscas mutantes nulas para dilp8 y Lgr3 en comparación con sus controles, evaluando las diferencias y coincidencias en dicha expresión.

Esta hipótesis también permitiría explicar las diferencias observadas entre las hembras mutantes según sean vírgenes o apareadas, ya que en *D. melanogaster* los oviductos femeninos de las hembras vírgenes tienen mayor tono muscular y adoptan una conformación de bucle que puede impedir el paso del ovocito. Este tono muscular disminuye y el bucle se endereza después del apareamiento y la puesta de huevos (Rubinstein, Wolfner, 2013), por lo que podría pensarse que la ovulación esta dificultada desde un principio para las hembras vírgenes en comparación con las apareadas, pero además, en las hembras vírgenes carentes de *dilp8*, la magnitud del efecto es aún más marcada, y si bien, existe un efecto sobre la ovulación en las hembras mutantes apareadas este no se evidencia con claridad por los cambios fisiológicos que provoca el apareamiento.

Por último, resta analizar el proceso de ruptura folicular en el contexto de la ovulación. Estudios previos han descripto que la ruptura folicular (durante el estadio 14) requiere de la unión de la OA a su receptor α-adrenérgico (OAMB) en las células foliculares somáticas, lo que provoca un aumento en los niveles de Ca²⁺ intracelular que activa a la metaloproteasa de matriz 2 (Mmp2) iniciando la ruptura del folículo (Deady, Sun, 2015). Además, para este proceso también se necesita la hormona esteroide 20HE y la unión de esta al complejo heterodimérico formado por EcR (receptor de ecdisona) y Usp Página | 38 (ultraespiráculo), dos receptores nucleares que se expresan en las células somáticas, para estimular la transcripción de un factor aún desconocido que otorga al folículo maduro la capacidad de responder a los estímulos ovulatorios neuronales, es decir, a la señal de OA (Knapp, Sun, 2017). Sería interesante postular a DILP8 como este factor anteriormente mencionado, el cual podría estar actuando en el contexto de la ovulación en forma autocrina, sobre las mismas células foliculares de los ovocitos de estadio 14 en las que se observa su expresión génica. Esto último es probable dado que recientemente los enfoques genéticos y genómicos han revelados miles de genes que responden a la ecdisona, reflejando la diversa gama de funciones biológicas inducidas por la hormona junto con el escaso conocimiento sobre la regulación molecular y caracterización funcional de los genes que responden a la misma (McDonald, 2019).

Dentro de la fisiología reproductiva de *D. melanogaster* es pertinente mencionar a la ovogénesis, como un proceso que demanda grandes cantidades de nutrientes y energía, y se encuentra estrictamente regulada. Aun así, el hecho de que las hembras mutantes *dilp8* producen huevos viables, tal como se muestra en este trabajo de tesis, y que DILP8 se expresa exclusivamente en las células foliculares en el estadio 14, cuando la ovogénesis ya ha concluido, indican que DILP8 no es necesario durante el mismo, aunque su participación en un bucle regulatorio de retroalimentación no debe ser descartada. Conociendo que la entrada y progresión en la fase vitelogénica de la ovogénesis está regulada por insulina y ecdisona, dos hormonas que en otros contextos son reguladas por DILP8 (Garelli et al., 2012), es posible plantear que DILP8 producido en los ovocitos maduros podría inhibir la entrada en vitelogénesis, participando en un mecanismo de regulación negativa, donde actúe como la señal que indica que se ha alcanzado un número suficiente de huevos maduros, con el fin de que los recursos energéticos sean destinados a procesos diferentes a la ovogénesis, relacionados con la supervivencia o mantenimiento del organismo y su homeostasis corporal, asociado al concepto de "trade-offs" o trueques fisiológicos.

Por otra parte, el apareamiento es otro evento importante que debe considerarse, ya que modifica profundamente la fisiología y el comportamiento de la hembra en *D. melanogaster*. Los sistemas de señalización de la hembra interactúan y son modificados por las moléculas masculinas transferidas durante el apareamiento para provocar un subconjunto de cambios posteriores que se conocen como respuesta post-apareamiento y que involucran cambios en la producción y puesta de huevos, receptividad, locomoción, alimentación y tasa de ovulación (White et al., 2021). Durante esta interacción, las hembras reciben esperma y un coctel de proteínas del líquido seminal secretadas por las glándulas accesorias masculinas y las vesículas seminales, en particular, la proteína seminal ovulina modula la señalización de OA en el tracto reproductivo femenino promoviendo la ovulación en las primeras 24 horas post-apareamiento al aumentar la actividad de estas neuronas octopaminérgicas, siendo su contribución necesaria y suficiente para relajar la musculatura del oviducto, y demostrando

un vínculo entre una proteína seminal y una vía neuromoduladora endógena en la hembra que regula la fisiología reproductiva (Rubinstein, Wolfner, 2013).

Sin embargo, la falta de ovulina no suprime por completo la ovulación, indicando que otras vías adicionales deben contribuir al aumento de la ovulación. Por ejemplo, en *Drosophila* y otros insectos, se sabe que otros factores de señalización (p. ej., glutamato, proctolina e ILP7 de las hembras) son importantes en la ovulación y la puesta de huevos. Estos resultados implican que otros estímulos que aumentan la ovulación podrían funcionar a través de mecanismos independientes, quizás distintos de la señalización neuronal de OA (Rubinstein, Wolfner, 2013). En este contexto puede pensarse que la función de DILP8 en el ovario es similar a la que ejerce la ovulina luego del apareamiento, y esto lleva a que en el caso de las hembras carentes de *dilp8*, que se aparean con machos capaces de transferir la proteína ovulina durante la copula, no se observen dificultades de tal magnitud durante el proceso de ovulación dado que el fenotipo está siendo enmascarado por la presencia de ovulina y su actividad redundante con la de DILP8. A esta hipótesis se suma el hecho de que se ha propuesto que la acción principal de la ovulina es estimular la liberación de los ovocitos maduros que se acumularon en las hembras antes del apareamiento (Rubinstein, Wolfner, 2013), pudiendo ser el factor que libera el bloqueo dado por la ausencia de *dilp8* en las hembras luego del apareamiento.

Considerando que el patrón de expresión de DILP8 se observa únicamente en las células foliculares en el estadio 14, planteamos un posible rol de DILP8 asociado al mantenimiento de la viabilidad de los ovocitos maduros, sin embargo, la viabilidad de estos ovocitos resultó independiente de la ausencia de *dilp8* en los diferentes progenitores, permitiendo inferir que la presencia de este péptido similar a insulina no es necesaria para el proceso de embriogénesis, es decir, el embrión desarrolla normalmente y alcanza el estado de larva L1 aun en ausencia de la hormona.

Aun así, dada la expresión de DILP8 únicamente en el ovocito maduro, restaría estudiar si su presencia allí puede estar asociada con el mantenimiento de la viabilidad de los ovocitos en caso de que estos sean retenidos en el ovario durante un periodo de tiempo prolongado, pudiendo plantearse un ensayo de retención en donde mediante condiciones ambientales desfavorables o manipulación neuronal se induzca a las hembras a frenar la oviposición, para luego evaluar la viabilidad de estos ovocitos en tetenidos. La importancia de esta función podría asociarse a que el tiempo de retención de ovocitos en las hembras de *D. melanogaster* suele modificarse con las estaciones, así como a lo largo de gradientes latitudinales. Los genotipos de retención prolongada de huevos se asocian con una mayor viabilidad de la pupa, una vida más larga incluso después de la inseminación y una mayor fecundidad a bajas temperaturas invernales que los genotipos de retención corta. Una posible explicación es que un fenotipo de retención prolongada de huevos minimiza la pérdida innecesaria de potencial reproductivo, ya que tanto las hembras vírgenes como las apareadas de retención prolongada retienen los huevos por más tiempo a baja temperatura que las hembras de retención corta. Esto es evidencia de que una retención Página | 40

más prolongada tiene un valor adaptativo para la supervivencia durante el invierno, ya que la capacidad de reiniciar la población una vez que llega la primavera dependería principalmente de las hembras que fueron fertilizadas en otoño (Akhund-Zade et al., 2017).

Además del rol de DILP8 en la fisiología reproductiva, evaluamos la biología de DILP8 asociada al metabolismo y la longevidad, dado que al igual que ocurre con la falta de otros dILPs (Grönke et al., 2010), las hembras mutantes nulas para *dilp8* apareadas, tienen mayor resistencia al ayuno y la deshidratación que las controles. La capacidad de los organismos para responder adecuadamente a los cambios en su entorno es clave para la supervivencia y el éxito reproductivo. Una variable ambiental esencial para todos los organismos es el suministro de alimentos y los procesos energéticamente exigentes, como el crecimiento, el metabolismo y la reproducción, se combinan con la nutrición mediante vías de detección de nutrientes, como la señalización de insulina/IGF (IIS) y las vías TOR (Target Of Rapamycin) (Edgar, 2006). Recientemente se ha descubierto que la actividad reducida de ambas vías puede retrasar el envejecimiento y aumentar la resistencia al estrés y la vida útil en *Saccharomyces cerevisiae, Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster* y ratones (Broughton, Partridge, 2009).

En el caso de *D. melanogaster*, la extensión de la esperanza de vida asociada a la disminución de la actividad de la vía IIS se produce a pesar de la duplicación de los niveles de glucosa en la hemolinfa, un fenómeno interesante cuando se ve a la luz de los efectos patológicos de la diabetes en los mamíferos (Broughton et al., 2005). A su vez, en el género *Drosophila* se ha demostrado que los DILP pueden actuar de manera redundante, hallándose sinergia y compensación de expresión entre distintos DILP. En particular, DILP6 en el cuerpo graso compensa la pérdida de DILPs en células neurosecretoras medianas del cerebro, lo que demuestra que los DILP son parte de un sistema de retroalimentación complejo entre el sistema nervioso central y los tejidos periféricos como el cuerpo graso, que controla el desarrollo, el metabolismo y la reproducción (Grönke et al., 2010). De este modo, la mosca puede utilizar la presencia de copias de DILP redundantes para restar importancia a las variaciones estocásticas en la expresión o secreción de DILP en respuesta a condiciones externas variables (Kafri, Springer, Pilpel, 2009), pudiendo pensarse a DILP8 como parte de este complejo sistema de señalización, permitiendo explicar la ausencia de diferencias en cuanto a la resistencia al ayuno y deshidratación para los machos y las hembras vírgenes mutantes para *dilp8* con respecto a sus controles.

En paralelo, y considerando que la vía IIS también juega un importante rol en el crecimiento de los ovocitos, su desarrollo y maduración (Das, Arur, 2018), recientemente se demostró que existe una comunicación entre el cuerpo graso y el ovario de *Drosophila* que implica la señalización desde los adipocitos, en respuesta a los distintos DILP producidos en el cerebro, hacia el ovario, controlando el número de células madre germinales (CMG) y el proceso de vitelogénesis (Armstrong, Drummond-Barbosa, 2018; LaFever, Drummond-Barbosa, 2005; Matsuoka et al., 2017). Dado que *Lgr3* tiene una Página | 41

Tesis Final de Grado | UNS

elevada expresión en el cuerpo graso de hembras adultas (Van Hiel et al., 2015) sería interesante considerar una vía inversa (ovario-cuerpo graso-cerebro) que involucre a DILP8 y LGR3, como parte de un mecanismo de regulación del proceso de ovogénesis, implicando una señalización nutricional de los ovarios a las células neurosecretoras del cerebro para garantizar la asignación de nutrientes.

Finalmente, los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis de grado aportan información relevante para la comprensión de procesos básicos de la biología que exceden el marco de investigación en *Drosophila*. En este contexto se puede mencionar el grado de conservación evolutiva en el proceso de ovogénesis entre especies distantes en términos evolutivos. Por ejemplo, la gametogénesis en la mayoría de las especies se caracteriza por la formación de cistos, es decir, grupos de células que se originan a partir de una única CMG, los cuales presentan canales anulares y mitosis sincrónicas en todas las especies estudiadas (Ogienko et al., 2007). El hecho de que la formación de cistos se encuentre tan extendida sugiere una gran importancia funcional (Pepling, de Cuevas, Spradling, 1999). En los machos, las interacciones intercelulares dentro del cisto aseguran el desarrollo sincrónico de los espermatocitos y permiten una distribución libre de productos génicos entre todos los espermatocitos, que difieren en el conjunto de cromosomas haploides (Braun, Behringer, Peschon, et al., 1989). En las hembras, el cisto permite que una célula se especialice en un ovocito y reciba componentes esenciales para el desarrollo desde las células restantes (Ogienko et al., 2007).

Otra característica compartida por varias especies es la formación de un folículo como compartimento especializado para el crecimiento y desarrollo de las células de la línea germinal. Un folículo consta de una (s) célula (s) de línea germinal y células foliculares (FC) somáticas. Se conoce ampliamente que la producción de huevos maduros se altera en ausencia de las FC, lo que sugiere su papel esencial en la ovogénesis. A medida que se forma el folículo, las células meióticas de la línea germinal, que son ovocitos potenciales, se detienen en la profase meiótica I durante un período de varios días a muchos años, según la especie, mientras que el propio folículo en su conjunto asegura el rápido crecimiento del ovocito y facilita la acumulación de nutrientes esenciales para el futuro desarrollo del embrión (Ogienko et al., 2007).

Además de los procesos a nivel reproductivo, también se debe tener en cuenta la conservación evolutiva de los componentes moleculares de la vía de señalización de la insulina/factor de crecimiento similar a la insulina (IIS) (Biglou et al., 2021), lo que en conjunto postula a *Drosophila melanogaster* como un organismo modelo crítico para el estudio de la función exacta de los dILPs en el ovario y su rol en el metabolismo, conociendo que los resultados obtenidos pueden extrapolarse a otros organismos.

BIBLIOGRAFÍA

- Akhund-Zade, J., Bergland, A. O., Crowe, S. O., Unckless, R. L. (2017). The Genetic Basis of Natural Variation in *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) Virgin Egg Retention. *Journal of insect science* (*Online*), 17(1), 5. <u>https://doi.org/10.1093/jisesa/iew094</u>
- Armstrong, A. R., Drummond-Barbosa, D. (2018). Insulin signaling acts in adult adipocytes via GSK-3 β and independently of FOXO to control *Drosophila* female germline stem cell numbers. *Dev. Biol.* 440, 31–39. doi:10.1016/j.ydbio.2018.04.028.
- Bamji, S.X., Orchard, I. (1995). Pharmacological profile of octopamine and 5HT receptors on the lateral oviducts of the cockroach, *Periplaneta americana*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 28(1), 49–62. doi:10.1002/arch.940280105
- Bathgate, R. A. D., Halls, M. L., van der Westhuizen, E. T., Callander, G. E., Kocan, M., Summers, R. J. (2013). Relaxin family peptides and their receptors. *Physiol. Rev.* 93, 405–80. doi:10.1152/physrev.00001.2012.
- Biglou, S. G., Bendena, W. G., Chin-Sang, I. (2021). An overview of the insulin signaling pathway in model organisms *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Peptides*, 145, 170640. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170640
- Bloch Qazi, M.C., Heifetz, Y., Wolfner, M.F. (2003). The developments between gametogenesis and fertilization: ovulation and female sperm storage in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, Vol. 256 (2), 195-211. <u>https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00125-2</u>.
- Blundell, T.L., Humbel, R.E. (1980). Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature* 287, 781-787.
- Bratu, D. P., McNeil G. P. (eds.), Drosophila Oogenesis: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, vol. 1328, DOI 10.1007/978-1-4939-2851-4_1, © Springer Science+Business Media New York 2015.
- Braun, R.E., Behringer, R.R., Peschon, J.J., et al. (1989). Genetically Haploid Spermatids Are Phenotypically Diploid, *Nature*, vol. 337, no. 6205, pp. 373–376.
- Broughton, S. J., Piper, M. D. W., Ikeya, T., Bass, T. M., Jacobson, J., Driege, Y., et al. (2005). Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulinlike ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3105–10. doi:10.1073/pnas.0405775102.
- Broughton, S., Partridge, L. (2009). Insulin/IGF-like signalling, the central nervous system and aging. *Biochem* J 418: 1–12.

- Brown, J. R., Boley, N., Eisman, R. (2014). Diversity and dynamics of the *Drosophila* transcriptome. *Nature* 512, 393–399. https://doi.org/10.1038/nature12962
- Caygill, E. E., Brand, A. H. (2016). The GAL4 System: A Versatile System for the Manipulation and Analysis of Gene Expression. En: Christian Dahmann (ed.), *Drosophila: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1478, DOI 10.1007/978-1-4939-6371-3_2, © Springer Science+Business Media NY, pp. 33-53.
- Chen, B., Harms, E., Chu, T., Henrion, G., Strickland, S. (2000). Completion of meiosis in *Drosophila* oocytes requires transcriptional control by Grauzone, a new zinc finger protein. *Development* 127, 1243–1251.
- Chow, B. S. M., Chew, E. G. Y., Zhao, C., Bathgate, R. A. D., Hewitson, T. D., Samuel, C. S. (2012). Relaxin signals through a RXFP1-pERK-nNOS-NO-cGMP-dependent pathway to up-regulate matrix metalloproteinases: the additional involvement of iNOS. *PLoS One* 7, e42714. doi:10.1371/journal.pone.0042714.
- Chowanski, S., Spochacz, M., Szymczak, M., & Rosinski, G. (2017). Effect of biogenic amines on the contractile activity of visceral muscles in the beetle *Tenebrio molitor*. *Bulletin of Insectology*, 70(2), 209–220.
- Chyb, S., Gompel, N. (2013). The Atlas of *Drosophila* Morphology: Wild-type and Classical Mutants. First edition. *Academic Press, London and Waltham (MA)*, 224 pp. ISBN 978-0-12-384688-4.
- Colombani, J., Andersen, D. S., Boulan, L., Boone, E., Romero, N., Virolle, V., Texada, M., Léopold, P. (2015). *Drosophila* Lgr3 Couples Organ Growth with Maturation and Ensures Developmental Stability. *Current biology : CB*, 25(20), 2723–2729. https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.020
- Colombani, J., Andersen, D. S., Leopold, P. (2012). Secreted Peptide Dilp8 Coordinates *Drosophila* Tissue Growth with Developmental Timing. *Science*. 336, 582–585. doi:10.1126/science.1216689.
- Cook, B.J., Wagner, R.M. (1992). Some pharmacological properties of the oviduct muscularis of the stable fly *Stomoxys calcitrans*. Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology, 102(2), 273–280. doi:10.1016/0742- 8413(92)90111-j
- Dansereau, D. A., McKearin, D., Lasko, P. (2005). Oogenesis. En Gilbert, L., Gill, S., and Iatrou, K. (eds.). Vol. 1, *Reproduction and Development*. Elsevier, NY, p. 39-85.
- Das, D., Arur, S. (2018). HHS Public Access. 84, 444-459. doi:10.1002/mrd.22806.Conserved.
- Deady, L. D., Sun, J. (2015). A Follicle Rupture Assay Reveals an Essential Role for Follicular Adrenergic Signaling in *Drosophila* Ovulation. *PLoS genetics*, *11*(10), e1005604. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005604

- Deady, L.D., Shen, W., Mosure, S.A., Spradling, A.C., Sun, J. (2015) Matrix Metalloproteinase 2 Is Required for Ovulation and Corpus Luteum Formation in *Drosophila*. *PLOS Genetics* 11(2): e1004989. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004989
- Edgar, B.A. (2006). How flies get their size: genetics meets physiology. Nat Rev Genet 7: 907-916
- Fernández-Moreno, M. A., Farr, C. L., Kaguni, L. S., Garesse, R. (2007). Drosophila melanogaster as a model system to study mitochondrial biology. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 372, 33– 49. <u>https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3_3</u>
- Garelli, A., Gontijo, A. M., Miguela, V., Caparros, E., Dominguez, M. (2012). Imaginal discs secrete insulinlike peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Science* 336, 579–82. doi:10.1126/science.1216735.
- Garelli, A., Heredia, F., Casimiro, A. P., Macedo, A., Nunes, C., Garcez, M., et al. (2015). Dilp8 requires the neuronal relaxin receptor Lgr3 to couple growth to developmental timing. *Nat. Commun.* 6, 8732. doi:10.1038/ncomms9732.
- Gontijo, A. M., Garelli, A. (2018). The biology and evolution of the Dilp8-Lgr3 pathway: A relaxin-like pathway coupling tissue growth and developmental timing control. *Mechanisms of development*, *154*, 44–50. <u>https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.04.005</u>
- Grönke, S., Clarke, D.F., Broughton, S., Andrews, T.D., Partridge, L. (2010). Molecular evolution and functional characterization of *Drosophila* insulin-like peptides. *PLoS Genet.* 6, e1000857.
- Grönke, S., Partridge, L. (2010). The Functions of Insulin-like Peptides in Insects. 105–124. doi:10.1007/978-3-642-04302-4_9.
- Hana, S., Lange, A.B. (2017). Octopamine and tyramine regulate the activity of reproductive visceral muscles in the adult female blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. The Journal of Experimental Biology, 220(Pt 10), 1830–1836. doi:10.1242/jeb.156307
- Heifetz, Y., Yu, J., Wolfner, M. F. (2001). Ovulation triggers activation of *Drosophila* oocytes. *Dev. Biol.* 234, 416–24. doi:10.1006/dbio.2001.0246.
- Heredia, F., Volonté, Y., Pereirinha, J., et al. (2021). The steroid-hormone ecdysone coordinates parallel pupariation neuromotor and morphogenetic subprograms via epidermis-to-neuron Dilp8-Lgr3 signal induction. *Nat Commun* 12, 3328. <u>https://doi.org/10.1038/s41467-021-23218-5</u>
- Hill, R.W., Wyse, G.A., Anderson, M. (2006). Capítulo 14: Fisiología endocrina y neuroendocrina (pp. 458-496). En: Hill, R.W., Wyse, G.A., Anderson, M. (Eds.). *Fisiología Animal*. Médica Panamericana SA, Buenos Aires.

- Jennings, B. H. (2011). *Drosophila* a versatile model in biology & medicine. *Materials Today*, *14*(5), 190–195. https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70113-4
- Jevitt, A., Chatterjee, D., Xie, G., Wang, X. F., Otwell, T., Huang, Y.C., et al. (2020). A single-cell atlas of adult *Drosophila* ovary identifies transcriptional programs and somatic cell lineage regulating oogenesis. *PLoS Biol 18(4)*: e3000538. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000538
- Jia, D., Xu, Q., Xie, Q. *et al.* (2016). Automatic stage identification of *Drosophila* egg chamber based on DAPI images. *Sci Rep* 6, 18850. https://doi.org/10.1038/srep18850
- Kafri, R., Springer, M., Pilpel, Y. (2009). Genetic redundancy: new tricks for old genes. Cell 136: 389–392.
- King, R.C. (1970). Ovarian Development in Drosophila melanogaster. Academic Press, New York.
- Knapp, E., Sun, J. (2017). Steroid signaling in mature follicles is important for *Drosophila* ovulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(4), 699–704. https://doi.org/10.1073/pnas.1614383114
- Kong, R. C. K., Shilling, P. J., Lobb, D. K., Gooley, P. R., Bathgate, R. A. D. (2010). Membrane receptors: Structure and function of the relaxin family peptide receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 320, 1–15. doi:10.1016/j.mce.2010.02.003
- LaFever, L., Drummond-Barbosa, D. (2005). Direct control of germline stem cell division and cyst growth by neural insulin in *Drosophila*. *Science* 309, 1071–3. doi:10.1126/science.1111410.
- Liao, S., Nässel, D. R. (2020). *Drosophila* Insulin-Like Peptide 8 (DILP8) in Ovarian Follicle Cells Regulates Ovulation and Metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, *11*. doi:10.3389/fendo.2020.00461
- Markstein, M. (2018). *Drosophila* Workers Unite! A Laboratory Manual for Working with *Drosophila*. *University of Mass/Amherst*. ISBN 1945764066, 9781945764066.
- Matsuoka, S., Armstrong, A. R., Sampson, L. L., Laws, K. M., Drummond-Barbosa, D. (2017). Adipocyte Metabolic Pathways Regulated by Diet Control the Female Germline Stem Cell Lineage in *Drosophila melanogaster. Genetics* 206, 953–971. doi:10.1534/genetics.117.201921.
- McDonald, S. I., Beachum, A. N., Hinnant, T. D., Blake, A. J., Bynum, T., Hickman, E. P., Barnes, J., Churchill, K. L., Roberts, T. S., Zangwill, D. E., Ables, E. T. (2019). Novel cis-regulatory regions in ecdysone responsive genes are sufficient to promote gene expression in *Drosophila* ovarian cells. *Gene* expression patterns : GEP, 34, 119074. <u>https://doi.org/10.1016/j.gep.2019.119074</u>
- Meiselman, M.R., Kingan, T.G., Adams, M.E. (2018). Stress-induced reproductive arrest in *Drosophila* occurs through ETH deficiency-mediated suppression of oogenesis and ovulation. *BMC Biol* 16, 18. <u>https://doi.org/10.1186/s12915-018-0484-9</u>

- Miller, A. (1950). The Internal Anatomy and Histology of the Imago of *Drosophila melanogaster*, in *Biology of Drosophila*, New York: Wiley, pp. 420–534.
- Mishra, M. (ed.) (2020). Fundamental Approaches to Screen Abnormalities in Drosophila, Springer Protocols Handbooks, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9756-5_1, © Springer Science+Business Media, LLC, Springer Nature 2020
- Ogienko, A.A., Fedorova, S.A., Baricheva, E.M. (2007). Basic aspects of ovarian development in *Drosophila* melanogaster . Russ J Genet 43, 1120–1134. <u>https://doi.org/10.1134/S1022795407100055</u>
- Orchard, I., Lange, A.B. (1987). Cockroach oviducts: The presence and release of octopamine and proctolin. Journal of Insect Physiology, 33(4), 265–268. doi:10.1016/0022-1910(87)90047-3
- Page, A.W., Orr-Weaver, T.L. (1997). Activation of the meiotic divisions in *Drosophila* oocytes. *Devel. Biol.* 183, 195–207.
- Pepling, M.E., de Cuevas, M., Spradling, A.C. (1999). Germline Cysts: A Conserved Phase of Germ Cell Development, *Trends Cell Biol.*, vol. 9, no. 7, pp. 257–262.
- Post, S., Liao, S., Yamamoto, R., Veenstra, J. A., Nässel, D. R., Tatar, M. (2019). Drosophila insulin-like peptide dilp1 increases lifespan and glucagon-like Akh expression epistatic to dilp2. *Aging cell*, 18(1), e12863. https://doi.org/10.1111/acel.12863
- Rezával, C., Nojima, T., Neville, M. C., Lin, A. C., Goodwin, S. F. (2014). Sexually dimorphic octopaminergic neurons modulate female postmating behaviors in Drosophila. *Current biology : CB*, 24(7), 725–730. <u>https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.051</u>
- Rubinstein, C. D., Wolfner, M. F. (2013). Drosophila seminal protein ovulin mediates ovulation through female octopamine neuronal signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(43), 17420–17425. https://doi.org/10.1073/pnas.1220018110
- Schiesari, L., Andreatta, G., Kyriacou, C. P., O'Connor, M. B., Costa, R. (2016). The Insulin-Like Proteins dILPs-2/5 Determine Diapause Inducibility in *Drosophila*. *PLoS One* 11, e0163680. doi:10.1371/journal.pone.0163680.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". *Nature Methods 9*, 671-675.
- Semaniuk, U., Piskovatska, V., Strilbytska, O., Strutynska, T., Burdyliuk, N., Vaiserman, A., et al. (2021). Drosophila insulin-like peptides: from expression to functions – a review. *Entomol. Exp. Appl.* 169, 195–208. doi:10.1111/eea.12981.

- Simpson, P., Berreur, P., Berreur-Bonnenfant, J. (1980). The initiation of pupariation in *Drosophila*: dependence on growth of the imaginal discs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 57, 155–65. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7430927.
- Soller, M., Bownes, M., Kubli, E., (1999). Control of oocyte maturation in sexually mature *Drosophila* females. *Devel. Biol.* 208, 337–351.
- Spradling, A.C. (1993). Developmental genetics of oogenesis. In: Bate, M., Martinez Arias, A. (Eds.), *The Development of Drosophila melanogaster*, vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 1–70.
- Swevers, L., Raikhel, A. S., Sappington T. W., Shirk, P., Iatrou, K. (2005). Vitellogenesis and postvitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. En: L. I. Gilbert, S. Gill, and K. Iatrou (eds.), . Vol. 1, *Reproduction and Development*. Elsevier, NY, pp. 87-155. doi: <u>10.1016/B0-44-451924-6/00093-4</u>.
- Tamashiro, H., Yoshino, M. (2014). Signaling pathway underlying the octopaminergic modulation of myogenic contraction in the cricket lateral oviduct. *Journal of insect physiology*, 71, 30–36. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.09.010
- Tootle, T. L., Williams, D., Hubb, A., Frederick, R., Spradling, A. (2011). *Drosophila* Eggshell Production: Identification of New Genes and Coordination by Pxt. *PLoS One* 6, e19943. doi:10.1371/journal.pone.0019943
- Vallejo, D. M., Juarez-Carreño, S., Bolivar, J., Morante, J., Dominguez, M. (2015). A brain circuit that synchronizes growth and maturation revealed through Dilp8 binding to Lgr3. *Science (New York, N.Y.)*, 350(6262), aac6767. https://doi.org/10.1126/science.aac6767
- Van Hiel, M. B., Vandersmissen, H. P., Proost, P., and Vanden Broeck, J. (2015). Cloning, constitutive activity and expression profiling of two receptors related to relaxin receptors in *Drosophila melanogaster*. *Peptides* 68, 83–90. doi:10.1016/j.peptides.2014.07.014.
- White, M. A., Chen, S. D., Wolfner, M. F. (2021) She's got nerve: roles of octopamine in insect female reproduction, *Journal of Neurogenetics*, 35:3, 132-153. <u>10.1080/01677063.2020.1868457</u>
- Wieschaus, E., Szabad, J. (1979). The development and function of the female germ line in *Drosophila melanogaster*: a cell lineage study. *Developmental biology*, 68(1), 29–46. <u>https://doi.org/10.1016/0012-1606(79)90241-0</u>
- Wilkinson, T.N., Bathgate, R.A. (2007). The evolution of the relaxin peptide family and their receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 612, 1-13.
- Wyman, R. (1979). The temporal stability of the *Drosophila* oocyte. *Journal of embryology and experimental morphology*, *50*, 137–144.