



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Tesis de grado para la Licenciatura en Ciencias Biológicas

**“MODULACIÓN HORMONAL DEL COMPORTAMIENTO DURANTE LA
PUPARIACIÓN DE *Drosophila melanogaster*”**

Alumno: Esteban Silva

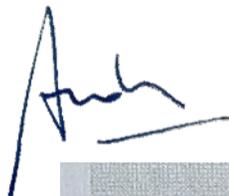
Director: Andrés Garelli

Codirectora: Yanel Volonté

Alumno
Esteban Silva

Handwritten signature of Esteban Silva in blue ink, featuring a stylized 'E' and 'S'.

Direcor
Andrés Garelli

Handwritten signature of Andrés Garelli in blue ink, consisting of a large 'A' followed by a horizontal line.

Codirectora
Yanel Andrea Volonté

Handwritten signature of Yanel Andrea Volonté in blue ink, with the name 'VOLONTÉ, YANEL A.' printed below it.

ÍNDICE

RESUMEN-----	3
INTRODUCCIÓN -----	4
OBJETIVOS-----	9
MATERIALES Y MÉTODOS-----	10
Genotipos y stocks -----	10
Seguimiento de pupariación -----	12
Relación de aspecto del pupario -----	15
Métodos gráficos -----	16
Análisis estadístico-----	16
RESULTADOS -----	17
Rol de la vía Dilp8/Lgr3 en el proceso de pupariación-----	17
Participación de las poblaciones neuronales 48H10 y 18A01 en la recepción de la señal Dilp8 -----	27
Efecto del aumento sostenido en los niveles de Dilp8 sobre el PMP -----	34
DISCUSIÓN-----	41
BIBLIOGRAFÍA -----	47

RESUMEN

El desarrollo de un organismo vivo involucra diversos procesos biológicos definidos por la actividad diferencial de un conjunto de redes moleculares, sensibles al estado fisiológico del organismo y las señales ambientales percibidas del entorno. Dentro de este enorme espectro de posibilidades, podemos pensar a una red molecular como un conjunto de genes y sus productos (por ejemplo, hormonas) que activan una red neuronal ejecutante de un comportamiento. Estos comportamientos pueden ser innatos y, por ende, estar programados en forma estereotipada por circuitos neuronales definidos genéticamente.

Un comportamiento innato denominado pupariación tiene preponderancia durante la transición de larvas a pupas en *Drosophila melanogaster*. Dicho programa está compuesto por varios subprogramas biológicos sincronizados críticos para la supervivencia del animal durante la metamorfosis.

El objetivo general de esta tesis fue caracterizar uno de los subprogramas asociados denominado “Programa Motor de Pupariación” (PMP). Consiste en un patrón de contracciones estereotipadas y repetitivas, iniciadas por un pico de la hormona esteroide Ecdisona, la cual induce la expresión del gen *dilp8* en la epidermis cuticular. *dilp8* es codificante de una hormona perteneciente a la familia de péptidos insulín-relaxinas (Dilp8), y se une a receptores neuronales asociados a proteína G en el sistema nervioso central (SNC) de la larva, denominados Lgr3. De esta forma, se sabe que la vía Dilp8/Lgr3 participa en la ejecución del PMP, el cual a su vez permite el remodelado corporal del cuerpo de las larvas en su transición a pupas antes que finalice el programa de esclerotización cuticular.

En esta tesis caracterizamos con mayor detalle la participación de Dilp8 en la ejecución del PMP observando como principal propiedad que la ausencia de Dilp8 o Lgr3 en animales mutantes impide la ejecución de un PMP completo, las contracciones musculares desarrolladas son deficientes y las pupas no sufren un acortamiento típico de su cuerpo, por ende, no existe un remodelado corporal durante la transición larva-pupa.

Además, identificamos las neuronas Lgr3+ que reciben la señal de Dilp8 para ejecutar el PMP. Lgr3 es necesario específicamente en un grupo de 6 neuronas (o un subgrupo de ellas) de la cuerda nerviosa ventral para percibir la señal Dilp8 y promover el remodelado corporal en la transición de larva a pupa.

Finalmente, proponemos que es necesario un aumento sostenido de Dilp8 durante la pupariación para que las diferentes etapas del PMP se ejecuten por completo y el remodelado corporal de larva a pupa se lleve a cabo. En conclusión, mediante la propagación de sinapsis nerviosas o la liberación de neuromoduladores, sugerimos que la vía Dilp8/Lgr3 es necesaria para activar y sostener la función de la red neuronal que efectúa el patrón rítmico y repetitivo de contracciones musculares durante la pupariación.

INTRODUCCIÓN

A diferencia de las máquinas, todos los organismos vivos conforman un sistema autoorganizado y autorregenerativo, es decir donde cada una de nuestras partes se producen, se mantienen y generalmente existen por medio de las otras partes que componen el sistema. Cada una de nuestras partes está en una relación de interdependencia colectiva, ya que cada una de ellas es necesaria para la generación y/o mantenimiento y/o operación de las otras. Es decir, el organismo mantiene su autonomía como un todo por estar constantemente autoproduciendo, organizando, regulando y reparando sus partes mediante diversos procesos biológicos¹.

Esta especie de relación e interdependencia colectiva ocurre porque las partes de un organismo pueden comunicarse a través de diversos tipos de moléculas. El resultado de esta comunicación estará afectado por el estado dinámico de diversas variables, entre ellas el momento del desarrollo del individuo o las señales fisiológicas presentes en el mismo. De acuerdo con esto, se encontrarán determinados niveles de concentración de las moléculas reguladoras que ocasionarán (o no) la ejecución de ciertos programas biológicos en regiones específicas del organismo².

Tras la identificación de numerosas moléculas como señales comunicantes y coordinadoras entre diferentes partes del cuerpo, se ha logrado describir redes regulatorias de genes (GRN), o de sus productos, tales como hormonas, factores de transcripción o ARN no codificantes^{2,3,4}. Estas redes proporcionan vínculos causales entre los diferentes tipos moleculares y explican directamente por qué los eventos de un programa dado del desarrollo ocurren o no. Por ejemplo, pueden evidenciar cómo un conjunto de células se especifica en un determinado destino, la emisión de señales químicas concretas al entorno, o la diferenciación celular en una dirección dada^{5,6}. En este sentido, se pueden realizar experimentos genético-moleculares detallados para proponer modelos de redes moleculares relativamente pequeñas, permitiéndonos comprender la funcionalidad de los genes, el cambio temporal de su actividad (la dinámica de la red) o la forma en que los genes (o sus productos) están conectados entre sí y desencadenan programas biológicos específicos (Figura 1)^{3,7,8}.

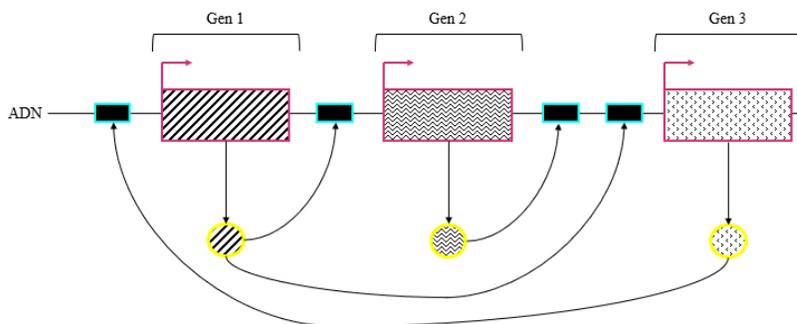


Figura 1. Representación simple e hipotética de una red regulatoria de genes (rectángulos magenta) codificantes de factores de transcripción (círculos amarillos). Estos activan la transcripción de genes al unirse a su respectiva secuencia promotora (rectángulos cian). Adaptado de Schlitt and Brazma (2007)⁹.

En este sentido, *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) se ha convertido en un organismo modelo muy importante, no solo por la facilidad experimental de trabajar con este, sino también por la gran cantidad de información genético-molecular que se ha ido acumulando en los últimos años. Esto ha permitido entender un amplio rango de programas biológicos complejos y que, eventualmente, pueden ser aplicados en organismos más arduos de estudiar¹⁰. Entre ellos, se pueden destacar diferentes eventos del desarrollo postembrionario como la diferenciación sexual, la muerte celular extensiva o el proceso de metamorfosis y las señales endócrinas asociadas¹¹.

En este último aspecto (Figura 2), *D. melanogaster* atraviesa 3 estadios larvarios (denominados L1, L2 y L3) donde básicamente la larva se alimenta y, en consecuencia, aumenta de tamaño^{12,13}. De hecho, prácticamente todo el crecimiento ocurre durante este estado con un notable aumento de 200 veces en la masa corporal¹². Luego, la transición a la forma adulta se da mediante un proceso de metamorfosis, durante el cual se forma el adulto sexualmente activo¹³. Es un proceso que involucra la muerte celular programada de gran parte de los tejidos larvarios^{14,15} y formación de tejidos adultos (por ejemplo, extremidades, alas y halterios)¹⁴ a partir de la diferenciación y desarrollo de un grupo de tejidos larvales internos (los discos imaginales)¹⁶, durante el estadio de pupa¹⁷. Luego, mediante un comportamiento de liberación, la mosca adulta rompe el opérculo del pupario y emerge del mismo por la acción de una serie de contracciones musculares complejas^{17,18}. Finalmente, la mosca libre inicia un comportamiento de expansión, incluyendo la toma de aire hacia el intestino y un patrón de contracciones musculares, permitiendo ajustar el cuerpo a su forma y tamaño definitivo^{17,18}.

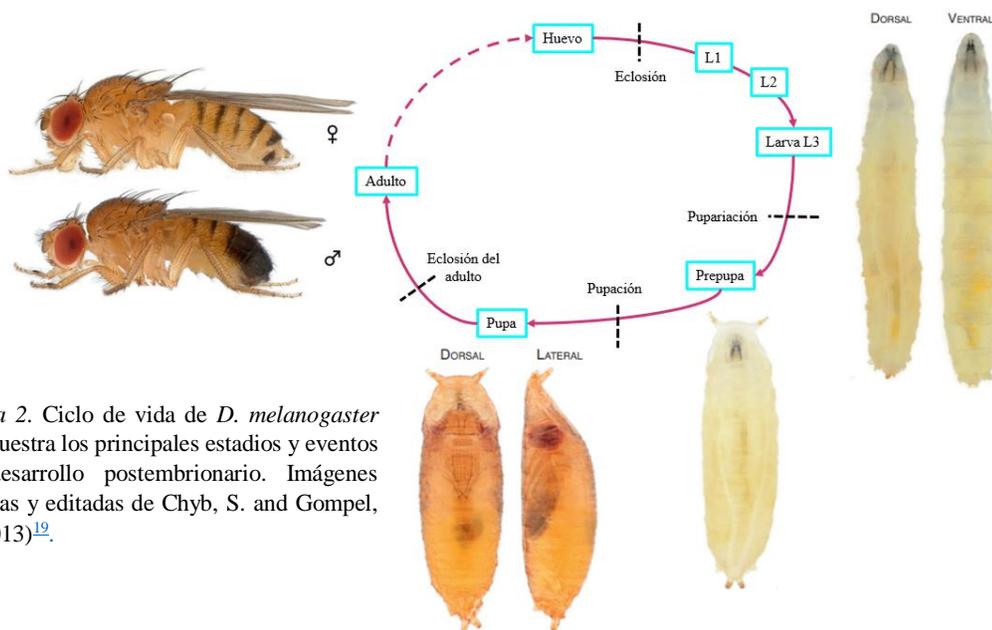


Figura 2. Ciclo de vida de *D. melanogaster* que muestra los principales estadios y eventos del desarrollo postembrionario. Imágenes tomadas y editadas de Chyb, S. and Gompel, N. (2013)¹⁹.

Con más detalle (Figura 3), finalizando el estadio L3, la larva (ahora denominada Wandering) inicia un comportamiento donde el animal se aleja del alimento y luego, permaneciendo sésil, comienza un proceso

de pupariación o formación del pupario^{16-18,20,27}. El pupario es prácticamente una cubierta protectora desarrollada por el desprendimiento, remodelado y endurecimiento (por esclerotización y melanización) de la cutícula del último estadio larval (L3)^{17,18,27}. De esta manera, el animal desde la formación del pupario hasta la pupación se denomina prepupa^{14,18}; una fase inmobilizada, contraída, con una cubierta esclerotizada y oscurecida, es decir con un aspecto muy diferente al de la larva “wandering”^{17,18}.

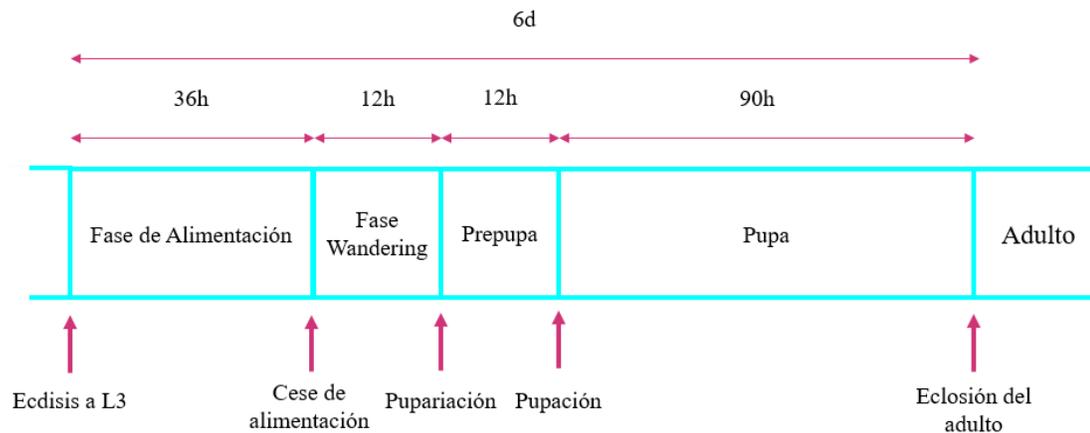


Figura 3. Principales eventos de desarrollo de *D. melanogaster* desde el estadio L3 hasta la eclosión del adulto. Las flechas gruesas verticales indican los eventos implicados en las transiciones entre cada intervalo. Las flechas finas horizontales indican el período aproximado de tiempo que dura cada intervalo y el tiempo total promedio a 25°C. Adaptado y editado de Denlinger et al., (1994).

Además, la formación del pupario está sincronizado con una serie de comportamientos innatos adicionales y esenciales para la supervivencia del animal, incluyendo la eversión de un par de espiráculos debida a la retracción de los segmentos anteriores^{14,17,27}, que permite el intercambio gaseoso entre la pupa y el medio externo, y la liberación de una sustancia pegajosa (“Glue”) producida en las glándulas salivales larvarias que permite la adhesión del pupario al sustrato^{15,21-24}.

Para que la pupariación se lleve a cabo, debe ocurrir la producción en forma de pulso de la hormona ecdisona (Figura 4), en este caso al final del estadio de Larva 3^{16,25}. Incluso, se ha identificado que la ecdisona se produce en forma de pulsos periódicos ejecutando el recambio del exoesqueleto (o ecdisis) y la transición hacia estadios posteriores del ciclo de vida de numerosos artrópodos^{15,16,23,26}. Por ello, es concluyente que la ecdisona es una hormona que no solo funciona como un disparador fisiológico promoviendo la ecdisis, sino que integra circuitos moleculares relacionados a los diferentes comportamientos innatos ya mencionados, entre ellos, la pupariación²⁹. Además, se ha encontrado que, asociado al pico de ecdisona, hay una producción de péptidos neurohormonales que inducen la contracción del pupario y activan los procesos de esclerotización y melanización²⁸. Más aún, en esta instancia se identificó que la ecdisona tiene como tejido diana la epidermis cuticular y allí estimula la expresión del gen *dilp8*²⁹. En definitiva, resulta sugerente pensar que el inicio y desarrollo de la pupariación es el resultado

de una red integrada de procesos genéticos y fisiológicos, donde una buena parte de sus componentes han sido descritos e interrelacionados, pero otros aún son desconocidos.

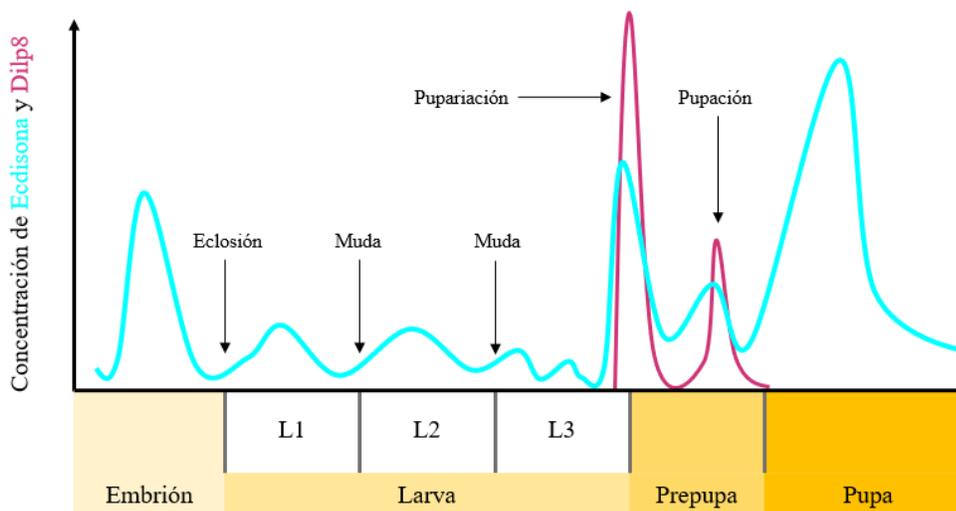


Figura 4. Concentración de Ecdisona en hemolinfa y niveles de expresión de dilp8 durante el desarrollo de Drosophila. Dilp8 y Ecdisona están coordinados durante la transición de L3-Prepupa y Prepupa-Pupa. Adaptado de Garelli et al. (2018).

dilp8 es un gen codificante de una secuencia peptídica de 150 aminoácidos que contiene un fragmento invariable de 6 cisteínas típico de la familia de péptidos insulín-relaxinas³⁰. El péptido Dilp8 (Drosophila insulín-like peptide 8) requiere de la función de un receptor neuronal en el cerebro de la larva llamado Lgr3³¹⁻³³, el cual está asociado a proteína G y activados producen un aumento en los niveles de AMPc³⁴.

La vía Dilp8/Lgr3 ha sido previamente identificada coordinando el crecimiento de los órganos con el inicio de la metamorfosis. Cuando los discos imaginales de moscas *D. melanogaster* resultan dañados física, genética o químicamente, rápidamente se detecta una significativa inducción en la transcripción del gen *dilp8* en los mismos discos dañados^{30,35}. De esta forma, Dilp8 expresada es una señal que alcanza y activa un grupo de neuronas específicas con receptores Lgr3^{31,36}. Estas a su vez emiten señales a células neuroendocrinas demorando la producción de la hormona protoracicotrópica (HPTT) y, por ende, de ecdisona^{30,35}. En consecuencia, se retarda el inicio de la metamorfosis dando un tiempo de desarrollo adicional que permite la regeneración tisular. En sintonía, animales dañados carentes de *dilp8* o *Lgr3* no atraviesan un período larvario extendido tras el daño tisular y, por ende, muestran una regeneración incompleta de los discos imaginales^{30,31,37}.

En conclusión, la vía Dilp8/Lgr3 toma preponderancia en diferentes etapas del ciclo de vida de *D. melanogaster*, demostrando que pueden existir numerosas funciones novedosas, aun por conocer³⁶. Heredia, F., Volonté, Y., Pereirinha, J. et al (2021) estudiaron las implicancias de la expresión de *dilp8* en la epidermis cuticular previo al evento de pupariación. Aquí, la proteína Dilp8 fue identificada como una señal

hormonal necesaria para que se desarrolle el “Programa Motor de Pupariación” (PMP). Este programa (Figuras 5 y 6) consiste en una serie compleja de contracciones estereotipadas que comprende 3 fases, preGSB, GSB y postGSB, denominadas en base al comportamiento más conspicuo, GSB (Glue Spreading Behavior).

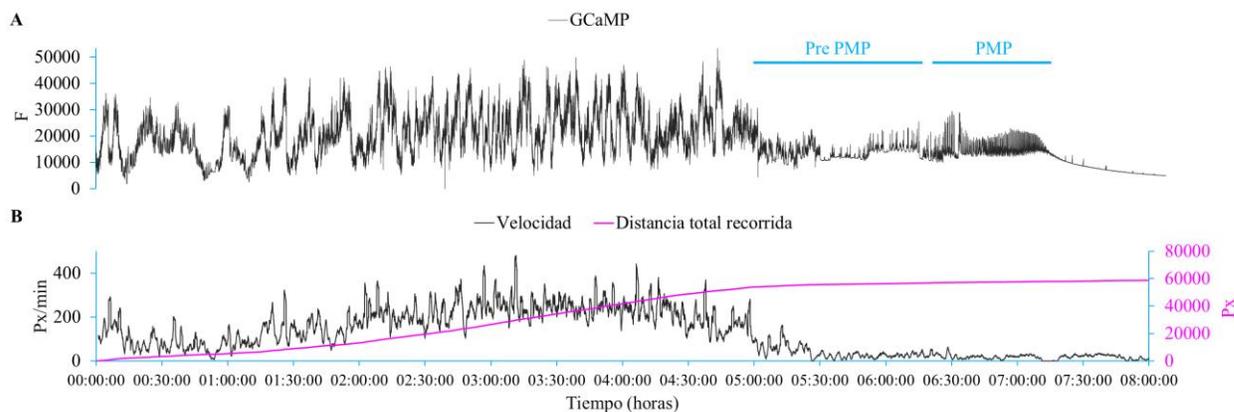


Figura 5. **A**) Patrón de fluctuaciones de Ca²⁺ en músculo (Ver en “Materiales y Métodos” *mhc>>GCaMP*) en una larva salvaje (*dilp8 +/-*). **B**) Velocidad (píxeles/minuto) y distancia total recorrida (píxeles) de la misma larva que **A**. La larva en estadio “wandering” deja de desplazarse (velocidad≈0 y distancia total recorrida≈d máximo), iniciando un comportamiento previo al PMP, denominado prePMP. Adaptado de Heredia, F., Volonté, Y., Pereirinha, J. *et al* (2021).

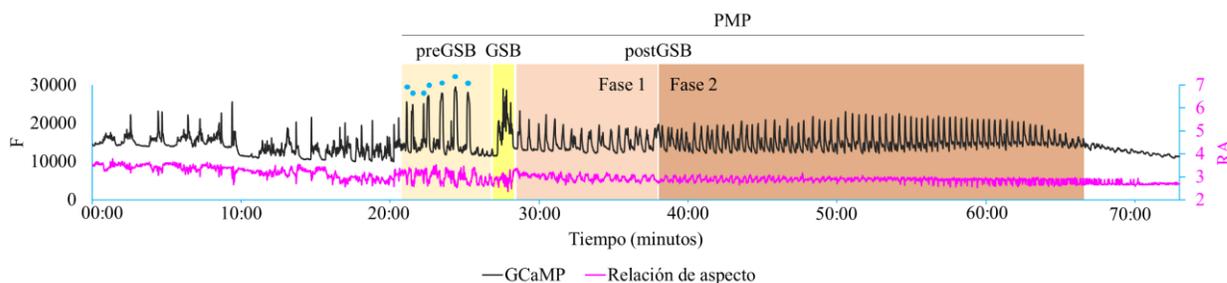


Figura 6. Patrón del Programa Motor de Pupariación (PMP) para larvas con genotipo *dilp8 +/-* mostrado como fluctuaciones en los niveles de Ca²⁺ intramuscular (*mhc>>GCaMP*). Se muestran las 3 fases: preGSB, GSB y postGSB. Las contracciones preGSB están indicadas con puntos color cian. En magenta se muestra la variación en la relación de aspecto del mismo animal (RA, ver “Materiales y Métodos”).

El PMP comienza en respuesta al aumento de la Ecdisona, pero queda bloqueado en la fase inicial y sólo puede avanzar más allá de este punto sólo si los centros neuronales involucrados reciben una señal hormonal desde la epidermis, Dilp8. Al igual que lo descrito en el proceso de regeneración de los discos, Dilp8 requiere unirse al receptor *Lgr3*, expresado en una población neuronal alojada en la cuerda nerviosa ventral del sistema nervioso central de la larva. Por ende, el desarrollo del PMP queda también detenido ante la ausencia de expresión de *Lgr3* en todo el organismo. Además, la población neuronal puede manipularse experimentalmente mediante las inserciones 18A01-Gal4 y 48H10-Gal4, las cuales se expresan en aproximadamente 200 neuronas del sistema nervioso central (Figura 7), pero cuya expresión conjunta

queda solapada sólo en 6 de ellas. A partir de esto, se identificó que el silenciamiento de *Lgr3* en este subgrupo de 6 neuronas tiene el mismo efecto que la falta de expresión de *Lgr3* en todo el organismo. También, se ha descrito que la presencia de la inserción 18A01-Gal4 afecta el desarrollo de la fase GSB en forma independiente al silenciamiento de *Lgr3*²⁹.

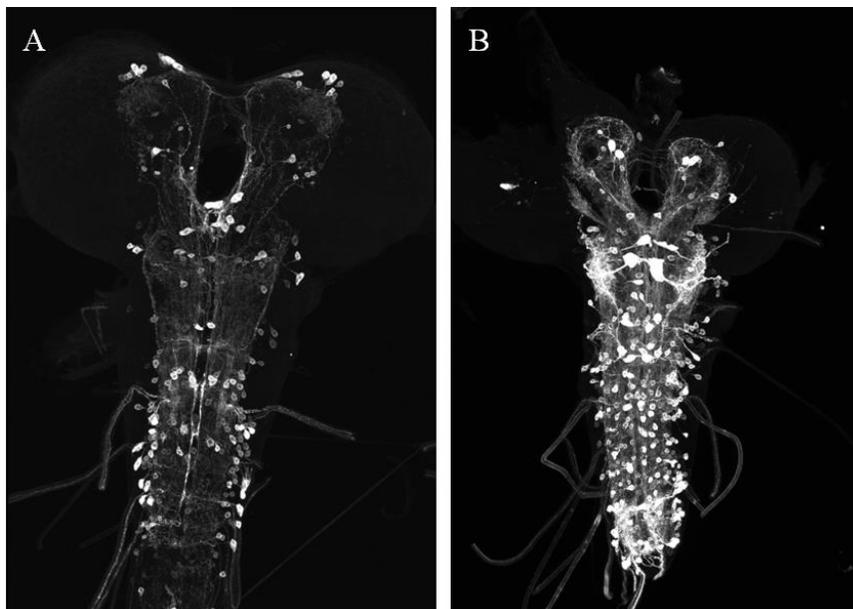


Figura 7. A) Patrón GFP de expresión de Gal4 para la población neuronal 18A01 del cerebro de una larva “wandering”. B) Mismo patrón de expresión para la población neuronal 48H10. Extraído de flweb.janelia.org.

La expresión de *dilp8* comienza poco antes del inicio del programa motor y aumenta sostenidamente durante su ejecución, alcanzando el máximo valor al final del postGSB, cuando el animal ya llegó al estadio de prepupa blanca. En los animales mutantes, el PMP queda detenido al comienzo de preGSB, lo que sugiere que ya en ese punto es imprescindible la acción de la hormona. Sin embargo, no se conoce aún si el aumento sostenido de Dilp8 tiene alguna relevancia fisiológica para la progresión del programa motor.

OBJETIVOS

En esta tesis, como objetivo general, planteamos caracterizar el efecto de Dilp8 sobre las neuronas *Lgr3*+ ejecutantes del PMP. Los objetivos específicos son:

- 1- Identificar y describir el rol de Dilp8 y *Lgr3* durante la transformación de larva en pupa.
- 2- Caracterizar el efecto de las inserciones 18A01-LexA y 48H10-Gal4 sobre el desarrollo del programa motor de pupariación.
- 3- Evaluar si el aumento sostenido de Dilp8 es necesario para la progresión de las distintas fases del programa motor de pupariación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Por efecto de la pandemia provocada por el virus SARS-CoV-2 y las consecuentes restricciones, parte de la tesina se desarrolló durante el período de cuarentena obligatoria. De este modo, los resultados obtenidos en la presente tesina se complementan con datos de investigaciones previamente realizadas en el Laboratorio de Fisiología y Genética del Desarrollo del Instituto de investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), CONICET.

Genotipos y stocks

Los stocks de todos los genotipos de *Drosophila melanogaster* mencionados en esta tesina fueron provistos por el Laboratorio previamente mencionado.

Se utilizaron animales transgénicos que expresan GCaMP en todas las células musculares (mhc>>GCaMP). Estos derivan de la combinación de los transgenes mhc-LexA con LexAop-GCaMP. La secuencia mhc es una región reguladora específica de músculo que dirige la expresión de LexA, un activador transcripcional. LexA reconoce la secuencia LexAop e induce la transcripción de GCaMP. Esta molécula, al unirse a Ca²⁺, emite una fluorescencia verde que es propia de la actividad muscular asociada a la liberación de Ca²⁺. Entonces, como se observa en la figura 5A, las variaciones en la intensidad de fluorescencia durante el PMP permiten identificar y estudiar con alta fidelidad los patrones de contracción muscular durante el proceso de pupariación.

Inicialmente, para la revisión de la funcionalidad de *dilp8* en el PMP se analizó dicho comportamiento en un genotipo experimental que no expresa Dilp8 (*dilp8*^{-/-}) y su control heterocigota *dilp8*^{+/-} y en otro genotipo experimental que no expresa *Lgr3* (*Lgr3*^{-/-}) y su control *Lgr3*^{+/-}.

Ciertos genotipos contenían el sistema Gal4/UAS para conducir la expresión de secuencias codificantes de ARNi para *Lgr3*. Específicamente, Gal4 es un factor de transcripción que reconoce y activa sitios promotores UAS asociados a secuencias codificantes de ARNi para *Lgr3*. El objetivo de esto es evaluar la funcionalidad del receptor de Dilp8 (*Lgr3*) en el PMP haciendo un silenciamiento de su gen codificante por ARNi. Para ello, se silenció *Lgr3* con las líneas 18A01-Gal4 y 48H10-Gal4 que expresan Gal4 en poblaciones neuronales que incluyen a las neuronas receptoras de Dilp8. De esta forma, se condujo un silenciamiento de *Lgr3* para dichos grupos neuronales.

18A01-Gal4 x UAS-*Lgr3*-IR → 18A01>*Lgr3*-IR

48H10-Gal4 x UAS-*Lgr3*-IR → 48H10>*Lgr3*-IR

El comportamiento de estos genotipos experimentales en el PMP se contrastó con el PMP de sus respectivos genotipos control que permiten evaluar el efecto de las inserciones de cada línea por separado:

UAS-*Lgr3*-IR x *w*¹¹¹⁸ → UAS-*Lgr3*-IR/+

18A01-Gal4 x w^{1118} —————▶ 18A01-Gal4/+

48H10-Gal4 x w^{1118} —————▶ 48H10-Gal4/+

Finalmente, conociendo que 48H10 y 18A01 son poblaciones neuronales que se intersectan representando un subgrupo de 6 neuronas de la cuerda nerviosa ventral, se estudió el PMP cuando solo ese subgrupo de neuronas expresa el ARNi para *Lgr3*. Consecuentemente, se silenció *Lgr3* exclusivamente en la intersección de ambas poblaciones. Para ello, en primer lugar, se generó una línea 18A01-LexA, similar a 18A01-Gal4 por representar la misma secuencia regulatoria (18A01), pero que dirige la expresión de LexA (no Gal4) y se encuentra inserta en el cromosoma II (18A01-Gal4 está inserta en el cromosoma III). Adicionalmente, se utilizó nuevamente la línea 48H10-Gal4. Entonces, se procedió a estudiar la intersección entre 48H10 y 18A01 (de aquí en adelante $18A01 \cap 48H10$) mediante la cruce de un genotipo a denominar FlpC (refiere a flipasa condicional ya que puede ser activada o no según el cruzamiento realizado) con las líneas mencionadas anteriormente (Figura 8). Con más detalle, siendo el genotipo de FlpC:

tub-(FRT.Gal80); UAS-*Lgr3*-IR; LexAop-FLP

- Gal80 es un inhibidor de Gal4. Como su secuencia codificante se sitúa bajo el promotor de tubulina, Gal80 se expresa en todas las células del organismo.
- FLP es una flipasa recombinasa que se expresa cuando LexAop es activado por el factor de transcripción LexA.
- FRT representa secuencias flanqueantes a Gal80 reconocidas y cortadas por FLP.

Entonces, se puede conducir un silenciamiento de *Lgr3* específico para el subgrupo de 6 neuronas mencionado mediante la siguiente cruce (Figura 8D):

FlpC x 18A01-LexA; 48H10-Gal4 —————▶ $18A01 \cap 48H10 > Lgr3$ -IR [Figura 8D]

Dicho genotipo experimental se contrastó con los genotipos controles obtenidos de los siguientes cruzamientos (Figura 8A, B y C respectivamente):

FlpC x w^{1118} —————▶ FlpC/+ [Figura 8A]

FlpC x 48H10-Gal4 —————▶ FlpC/48H10-Gal4 [Figura 8B]

FlpC x 18A01-LexA —————▶ FlpC/18A01-LexA [Figura 8C]

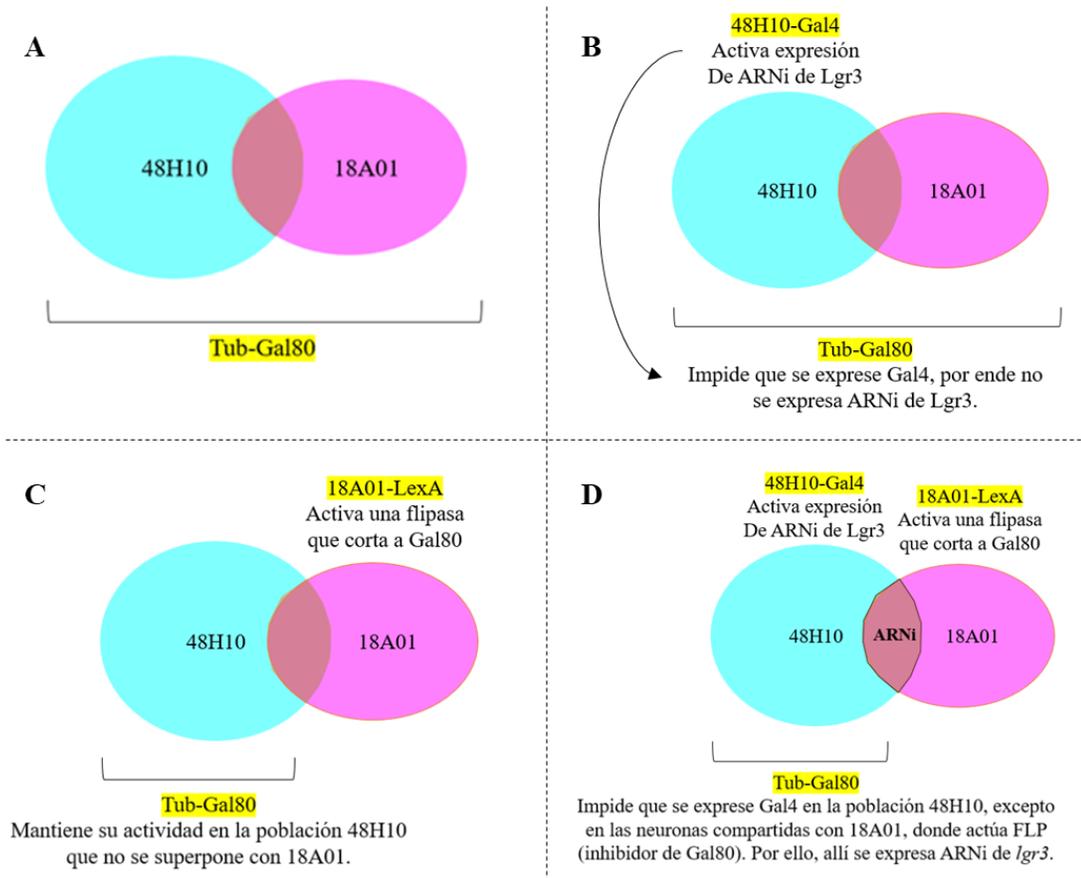


Figura 8. Variantes genotípicas para el estudio de la función neuronal de Lgr3 en el PMP. La población neuronal 48H10 (cian) se interseca en parte (Violeta) con la población neuronal 18A01 (magenta). **A)** Genotipo control ya que el receptor Lgr3 se expresa en ambas poblaciones neuronales. **B)** Genotipo control donde la actividad de Gal4 expresado en la población 48H10 es inhibida a nivel postraduccional por Gal80 (no hay expresión del ARNi de *Lgr3*). **C)** Genotipo control ya que, a pesar de que Gal80 fue escindido por la flipasa, no hay expresión de Gal4 en la población 18A01 por ausencia de 48H10-Gal4 y, por ende, no hay inducción de la expresión de ARNi para *Lgr3*. **D)** Genotipo experimental 18A01 \cap 48H10 > Lgr3-IR; ARNi de *Lgr3* solo se expresa en las neuronas compartidas por 48H10 y 18A01 y, por ende, puede estudiarse el rol de Lgr3 en este subgrupo neuronal durante el PMP.

Finalmente, para evaluar el efecto del aumento sostenido de Dilp8 durante el PMP, se procedió a trabajar con un genotipo mutante hipomorfo denominado *-/dilp8^{MI00727}*, donde la expresión de *dilp8* resulta disminuida aproximadamente un 30% con respecto al valor de expresión normal.

Los símbolos y nombres utilizados para la anotación de objetos genéticos (genotipos, cruzamientos, genes, etc.) de los stocks de *D. melanogaster* provienen de la nomenclatura propuesta por la organización FlyBase.

Seguimiento de pupariación

Se utilizó un dispositivo previamente diseñado para el seguimiento de la actividad larvaria y el proceso de pupariación²⁹. Consiste en un estructura diseñada con bloques de LEGO que sostiene una cámara

y captura imágenes de un soporte impreso en 3d, compuesto de 6 cuadrantes (matriz 3x2) iluminados con luz LED. En cada cuadrante se posicionó individualmente una larva en un estadio avanzado L3 para su seguimiento. Además, los cuadrantes estaban comunicados con un cuadrante de menor tamaño que contenía agar para evitar la desecación de la larva durante el proceso de filmación. Previo a la filmación, el soporte fue cubierto en ambas caras con 2 vidrios y fijados con clips de metal para luego posicionar de forma estable dicho soporte frente a la cámara. Entonces, por cada video se analizó 1 grupo de 6 animales. Como se mencionó anteriormente, todas las larvas monitoreadas eran animales *mhc>>GCaMP* transgénicos. Por ello se utilizó luz LED azul para iluminar el soporte y un filtro de luz verde sobre la lente de la cámara para bloquear la luz azul. De esta forma, se logró registrar la actividad muscular de las larvas detectando las emisiones de fluorescencia verde asociadas.

Los videos obtenidos fueron procesados utilizando un software en Python 3 (Figura 9), diseñado y aportado por el laboratorio para este estudio. Mediante dicho software se analizó y procesó datos en cada cuadro por segundo del video correspondiente sobre los 6 cuadrantes seleccionados. En principio, el algoritmo separa los canales R, G, B, utilizando consecuentemente solo el canal G (verde) para el análisis de GCaMP. A partir de dicho canal el programa segmenta a la larva ubicada en cada cuadrante, diferenciándolas del fondo, al seleccionar los pixeles cuyo rango de intensidad de fluorescencia se encuentren dentro de un rango especificado. Para mayor precisión, los contornos también pueden ser filtrados en función del área, largo y ancho (para el cual se utilizaron los valores típicos de una larva). Para ello, previamente se definieron ciertos parámetros del programa, por ejemplo: área máxima y mínima detectable, intensidad de fluorescencia máxima y mínima detectable, etc. Esto incluso permitió normalizar la variación dada por diferencias operativas, de iluminación sobre el soporte o cualquier otro aspecto técnico que pudiera variar entre videos e interferir sobre los resultados.

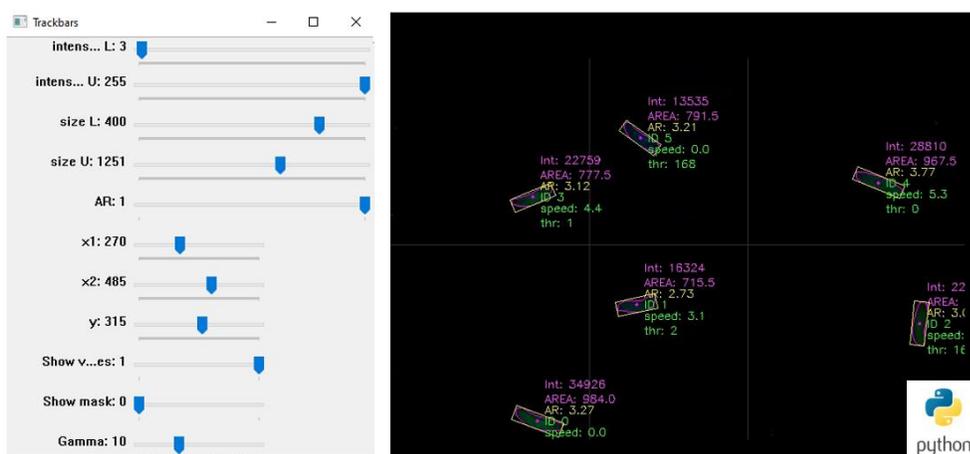


Figura 9. Captura de ejemplo del análisis de videos sobre el comportamiento de pupariación de larvas de *D. melanogaster* utilizando el software python.

Los datos obtenidos en cada cuadro por segundo mediante este análisis fueron: posición de la larva (ubicación de la larva sobre ejes X e Y), velocidad (medida en pixeles por segundo), intensidad de fluorescencia (o F; medida de la intensidad de verde emitida por la larva), área (medida en pixeles), relación de aspecto (o RA; cociente del largo y ancho en pixeles de la larva) y umbral o threshold (un contador que registra la cantidad de cuadros consecutivos cuya velocidad de desplazamiento de la larva es menor a 4,3 pixeles, por ende, sirve como estimador para identificar cuando la larva se detiene e inicia el proceso de pupariación). Además, el programa asigna automáticamente un número identificador a cada larva. Finalmente, el conjunto de datos obtenidos en cada video se recopiló automáticamente en un archivo .csv (archivo de valores separados por comas de Microsoft Excel).

Luego, se dividió cada archivo .csv en 6 archivos individuales (cada uno correspondiente a un cuadrante o área diferente, es decir a larvas individuales) ejecutando un programa adicional de Python 3.

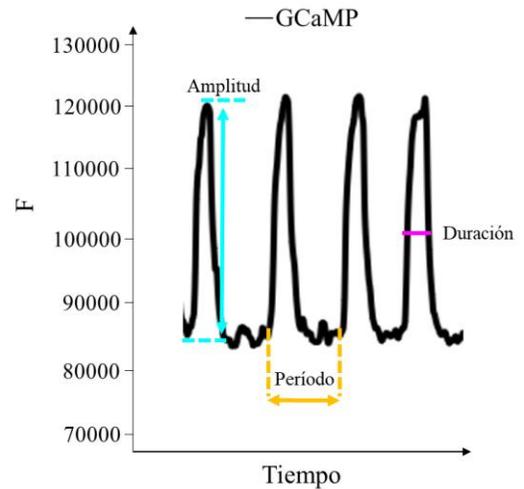
Mediante el uso de Macros en Excel, se procedió a reordenar los valores separados por comas en valores separados en columnas y, a partir de ellos, obtener nuevos datos:

- Distancia total recorrida: distancia acumulada en pixeles obteniendo la hipotenusa entre 2 puntos (la posición de la larva en cuadros sucesivos),
- Distancia al punto final: de igual forma al anterior, pero calculando la distancia entre la posición de la larva en un cuadro con respecto a la posición de esta en el último cuadro del video.
- Velocidad: medida de la distancia recorrida en los 60 segundos previos.

La iluminación con luz LED azul no resultó ser homogénea en la superficie del soporte de pupariación, provocando que la intensidad de fluorescencia basal registrada varíe dependiendo de la posición que ocupe la larva en el soporte. Por ello, no fue posible analizar un patrón de contracciones cuando la larva se encontraba en un estadio “wandering” ya que las variaciones de intensidad detectadas no correspondían solo a diferencias en el patrón de GCaMP sino a que la larva ocupaba posiciones en el soporte con intensidades de luz diferentes. De todas formas, cuando la larva se detenía y comenzaba una etapa de pre-PMP, los cambios en intensidad detectados reflejaban solo las fluctuaciones en el patrón de GCaMP. Dichas fluctuaciones se estudiaron calculando los siguientes parámetros (Figura 10):

- Duración de contracciones: tiempo en segundos durante el cual la intensidad de fluorescencia de GCaMP es superior al 50% de la diferencia entre los valores de intensidad mínima (F_0) y máxima ($F_{m\acute{a}x}$) de dicha contracción, siendo F_0 el valor mínimo de los 10 segundos precedentes.
- Amplitud (A): siendo $\Delta F = F_{m\acute{a}x} - F_0$, y $F_{m\acute{a}x}$ y F_0 el valor máximo y mínimo de intensidad de fluorescencia de un pico, definimos $A = \frac{(F_{m\acute{a}x} - F_0)}{F_0}$.
- Período: es el tiempo entre el inicio de 2 picos consecutivos de GCaMP.

Figura 10. Parámetros de contracciones (amplitud, duración y período) sobre un patrón de fluctuaciones GCaMP que representa 4 contracciones preGSB de una mosca *dilp8+/-*. Se representa la amplitud en color cian, período en color amarillo y duración en color magenta.



En los genotipos control, las diferentes etapas del PMP (pre-GSB, GSB y post-GSB) fueron consistentemente identificadas a partir de los patrones de GCaMP, como se muestra en la figura 6. Especialmente, los picos de GCaMP asociadas a las primeras contracciones preGSB son semejantes a aquellos producidos por movimientos peristálticos. Para distinguirlos y evitar cuantificar una onda peristáltica como una contracción preGSB, en cada video se verificó visualmente que los picos de contracción efectivamente correspondieran a contracciones preGSB. De igual forma se precisó la presencia/ausencia de contracciones pre-GSB para animales mutantes. Además, se definió la duración de la etapa preGSB como la diferencia de tiempo entre el inicio de la primera contracción generalizada del cuerpo y el final de la última contracción preGSB.

Relación de aspecto del pupario

Se tomaron imágenes de las pupas bajo un microscopio conectado a una cámara (Amscope MU300) y analizadas mediante el software Amscope (Figura 11). Se determinó el largo (L) midiendo la distancia en píxeles desde la parte más anterior de la pupa hasta la parte anterior de la papila anal. El ancho (A) se determinó midiendo la sección más ancha de la pupa, ubicada aproximadamente en la parte distal del tercio anterior de la misma. En base a L y A , definimos la relación de aspecto (RA) para cada pupa de la siguiente manera: $RA = \frac{L}{A}$



Figura 11. Ejemplo de medición de la relación de aspecto de una pupa en base al largo y ancho de la misma obtenidos mediante el software Amscope.

Métodos gráficos

Se utilizaron diversos softwares para acompañar la exposición de los resultados. Los gráficos de puntos (o dot-plot) fueron diseñados tanto en el software R (versión 4.1.2) como en Python 3. Tanto los gráficos de barras como los patrones GCaMP (correspondientes a la intensidad de fluorescencia emitida por las larvas a lo largo del PMP) se realizaron en Microsoft Excel. Además, los gráficos fueron editados en PowerPoint para adaptar el formato de estos a la presentación escrita. Finalmente, para la exposición conjunta de imágenes de pupas se utilizó el editor Adobe Photoshop 2021.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue llevado a cabo utilizando como recursos el software SigmaPlot y el sitio oficial de “Social Science Statistics” (<https://www.socscistatistics.com/>). En todas las pruebas se utilizó un nivel de significancia (α) igual a 0,05.

Cuando los datos siguen una distribución normal (prueba Shapiro-Wilk) y los grupos a comparar contienen varianzas iguales (prueba Brown-Forsythe), se procedió a realizar una prueba t de Student para comparar 2 muestras no pareadas a una cola. De esta forma, diferentes variables (ejemplo: duración, período, amplitud, etc.) fueron comparadas entre genotipos experimentales y control, bajo el supuesto $H_0: \mu_1 = \mu_2$. H_0 es rechazada cuando la diferencia entre medias de 2 muestras es mayor a la esperada por azar ($p < 0,05$). Alternativamente, ante el rechazo de una distribución normal o igualdad de varianzas entre muestras, se procedió a realizar una prueba no paramétrica como Mann-Whitney y Welch’s respectivamente.

Se realizaron comparaciones entre múltiples condiciones (ejemplo: duración de primeras y últimas 2 contracciones preGSB para genotipos experimentales y control) mediante un ANOVA. En dicha prueba, hay una diferencia estadísticamente significativa cuando las diferencias en los valores medios entre muestras son lo suficientemente grandes permitiendo excluir a la variabilidad del muestreo aleatorio como explicación de las diferencias entre muestras. Cuando los datos de las muestras no seguían una distribución normal, se procedió con un análisis alternativo: análisis de la varianza por el método de Kruskal-Wallis. Cuando los tratamientos eran significativamente diferentes se procedió con el método de Holm-Sidak. Sólo cuando los resultados fueron estadísticamente significativos, pruebas post-hoc como el de Dunn’s y Conover se llevaron a cabo para conocer la significancia estadística de la comparación por pares de muestras.

Finalmente, los datos obtenidos de muestras binarias (presencia/ausencia de GSB y postGSB) se analizaron mediante una prueba binomial, ajustando como valores de entrada el tamaño de la muestra (n), el número de individuos que realizan o no GSB (k) y una probabilidad “p” conocida de que ocurran dichas fases (0.995).

RESULTADOS

Rol de la vía Dilp8/Lgr3 en el proceso de pupariación

El cambio de la forma de una larva en su transición a pupa ocurre en paralelo al proceso de endurecimiento de la cutícula al final del período larvario²⁹. Consecuentemente, el fin del proceso de esclerotización cuticular impone una restricción física al cambio de forma del pupario. Por ello, una vez transcurrida la transición de larva a pupa, se procedió a medir y comparar el tamaño de las pupas entre diferentes genotipos. En este caso, se identificó que los genotipos mutantes para *dilp8* y *Lgr3* desarrollan una pupa con una forma alterada en comparación con los genotipos control. Específicamente, en las moscas que no expresan *dilp8* o *Lgr3*, las pupas son más largas y angostas definiendo una RA significativamente mayor ($p \ll 0,01$ para *dilp8* y $p = 0,01$ para *Lgr3*) al de los genotipos control o salvajes (figura 12). Es decir, la falta de expresión de la hormona Dilp8 o su receptor Lgr3 sugieren que no hay un cambio en la forma o remodelado corporal durante la transición larva-pupa como el evidenciado en los animales salvajes.

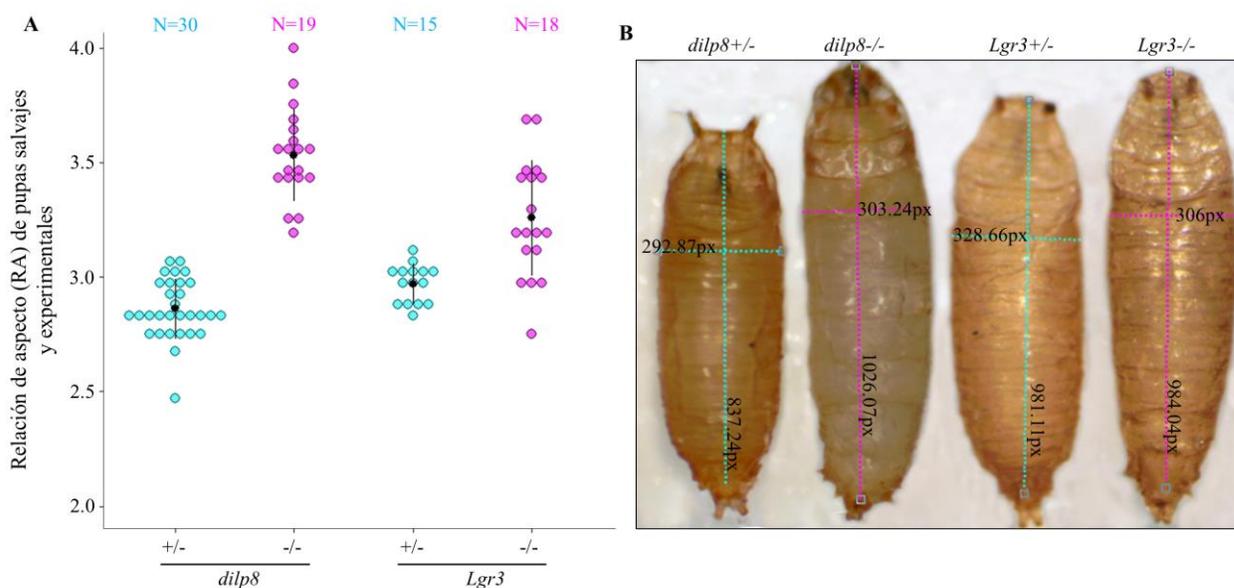


Figura 12. Relación de aspecto (RA) de pupas salvajes (*dilp8*+/- y *Lgr3*+/-) en color cian y pupas experimentales (*dilp8*-/- y *Lgr3*-/-) en color magenta. **A**) La RA de animales mutantes es significativamente mayor ($p \ll 0,01$ para *dilp8* y $p = 0,01$ para *Lgr3*) al de animales salvajes, es decir que tienen expresión de *dilp8* y *Lgr3*. Además, se muestra la media (círculo negro) y la desviación estándar (línea vertical negra) del conjunto de datos analizados. **B**) Imagen de pupas representativas de cada grupo de estudio.

Para conocer la relación entre la vía Dilp8/Lgr3 y la RA, se procedió a estudiar el comportamiento de las larvas durante el desarrollo del PMP, caracterizando e identificando diferencias comportamentales entre genotipos mutantes y salvajes.

En primer lugar, se observó que el 100% de los animales control presentan las 3 fases características del PMP: preGSB, GSB y postGSB (Figura 13A). En contraste con ello, los animales mutantes no desarrollan un PMP completo. En este caso, se identificaron animales experimentales que no desarrollan ninguna de las fases aparentes del PMP (Figura 13C) o, alternativamente, que presentan solo un número variable de contracciones preGSB (Figura 13B). Es decir, a diferencia de los genotipos control, en los genotipos *dilp8*^{-/-} y *Lgr3*^{-/-} pueden observarse o no contracciones preGSB, pero nunca se observa un comportamiento GSB y postGSB (Figura 14). Con mayor detalle, el 43,5% de los animales mutantes (n = 39), 33,3% de los animales *dilp8*^{-/-} (n = 18) y un 52,3% de los animales *Lgr3*^{-/-} (n = 21), no desarrollan ninguna de las fases mencionadas. El 56,4% restante de los individuos mutantes (66,6% en *dilp8*^{-/-} y 47,6% en *Lgr3*^{-/-}), no desarrolla un PMP más allá de las primeras contracciones preGSB.

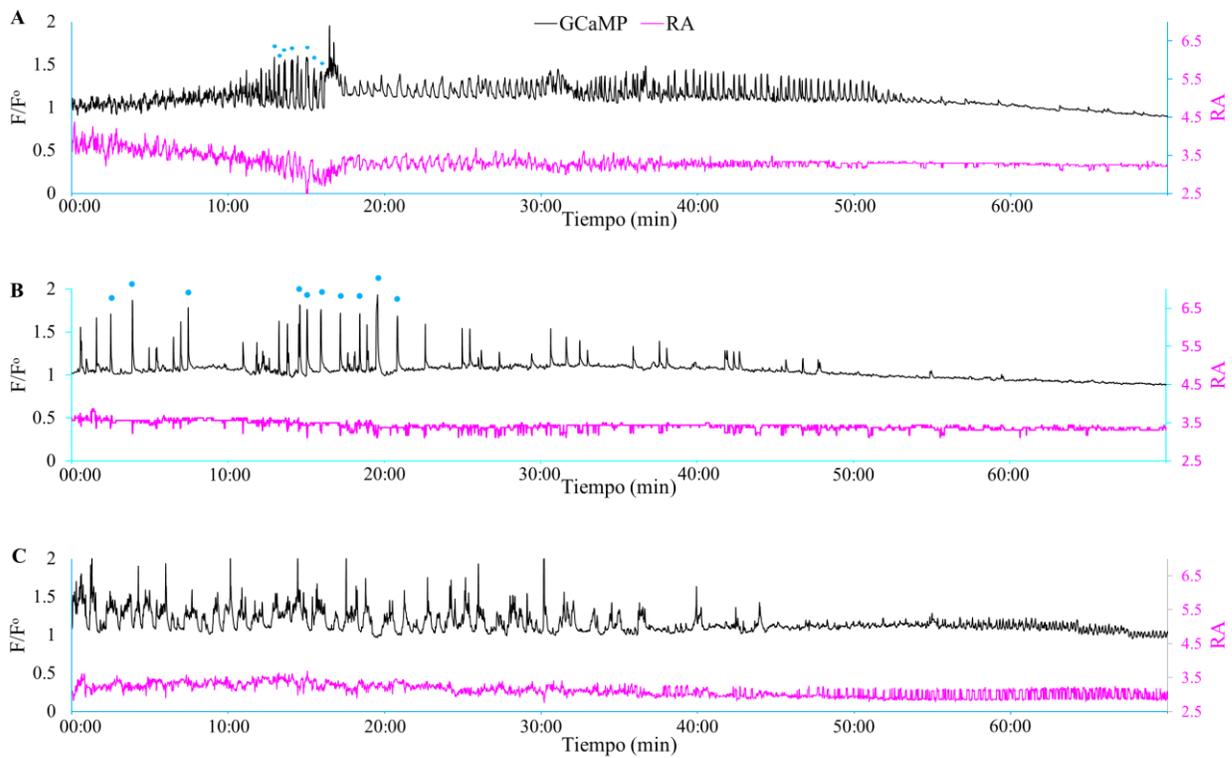


Figura 13. **A)** Patrón GCaMP de una larva *Lgr3*^{+/-}. Se observan las 3 fases del PMP: preGSB, GSB y postGSB. Es un PMP representativo de los genotipos *dilp8*^{+/-} (n = 14) y *Lgr3*^{+/-} (n = 16), los cuales en el 100% de los casos desarrollan un PMP completo. **B)** Patrón GCaMP de una larva *Lgr3*^{-/-}, sin fases GSB y postGSB. Un número variable de contracciones preGSB (indicadas con puntos color cian) se encuentran presentes en un 56,4% de los animales mutantes (n=39). Específicamente, un 66% de los animales mutantes *dilp8*^{-/-} (n = 18) y un 47,6% de los animales *Lgr3*^{-/-} (n = 21) tienen contracciones preGSB. **C)** Patrón GCaMP de un animal *Lgr3*^{-/-}, sin fases preGSB, GSB y postGSB. Dicho patrón se presenta en el 43,5% de los individuos mutantes estudiados (33,3% en *dilp8*^{-/-} y 52,3% en *Lgr3*^{-/-}). **A, B)** Los picos de GCaMP indicados con puntos color cian corresponden a contracciones generalizadas del cuerpo durante la fase preGSB. Los picos observados en **C)** se corresponden con ondas peristálticas y no constituyen una contracción preGSB.

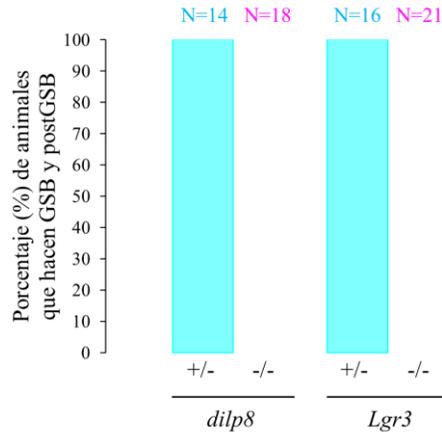


Figura 14. Porcentaje de animales que desarrollan GSB y postGSB. Los genotipos control (*dilp8*+/- y *Lgr3*+/-) desarrollan un comportamiento GSB y postGSB en el 100% de los casos ($p > 0,05$). En los animales mutantes (*dilp8*-/- y *Lgr3*-/-) nunca se observaron las fases GSB y postGSB ($p << 0,01$).

A continuación, se procedió a caracterizar las fases GSB y postGSB de los animales salvajes. Como se mencionó previamente, a diferencia de los genotipos mutantes, *dilp8*+/- y *Lgr3*+/- realizan en todos los casos la fase GSB. Esta fase inicia inmediatamente posterior a la última contracción preGSB, específicamente 0,3 a 5 minutos de finalizar la última contracción preGSB (Figura 15). La fase GSB consiste en un comportamiento motor complejo que dura en la mayoría de los casos entre 45 y 100 segundos, y está implicado en la secreción de una sustancia pegajosa desde las glándulas salivales permitiendo la adherencia del pupario al sustrato (Figura 16).

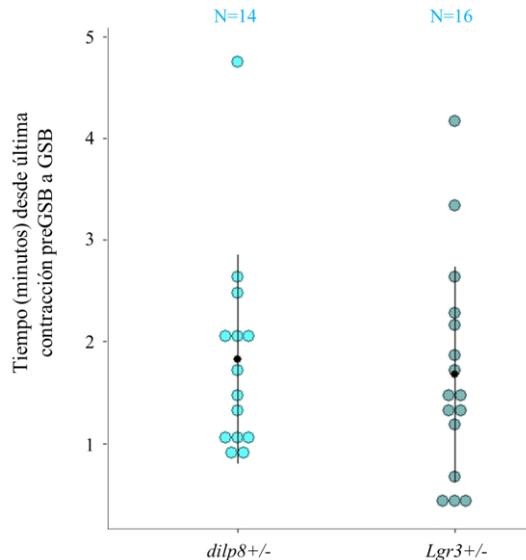


Figura 15. Tiempo (minutos) que transcurre entre la última contracción preGSB y el inicio del comportamiento GSB para los animales salvajes *dilp8*+/- (cian claro) y *Lgr3*+/- (cian oscuro), donde cada círculo representa un individuo. No hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,75$) en el tiempo que transcurre desde la última contracción preGSB al inicio de la fase GSB entre animales *dilp8*+/- y *Lgr3*+/- . Media y desviación estándar son mostradas con un círculo negro y líneas verticales negras respectivamente.

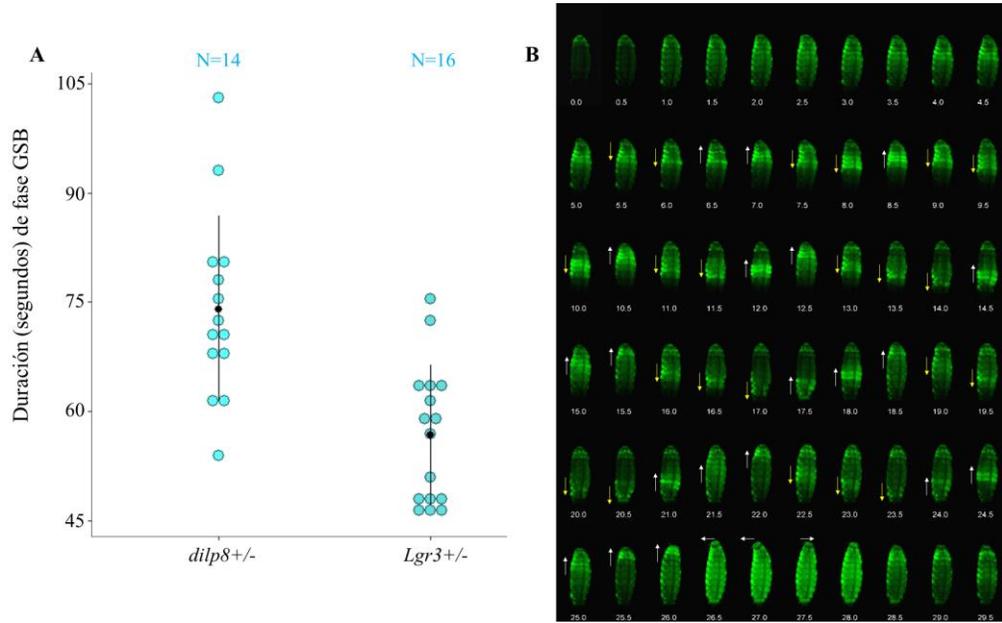


Figura 16. A) Duración (segundos) de la fase GSB de los animales salvajes *dilp8+/-* (cian claro) y *Lgr3+/-* (cian oscuro), donde cada círculo representa un individuo. Media y desviación estándar son mostradas con un círculo negro y líneas verticales negras respectivamente. **B)** Fotos secuenciales de la fase GSB otorgadas por el Laboratorio de Fisiología y Genética del Desarrollo (INIBIBB). La expresión de GCaMP en células musculares permite registrar su actividad debido a la emisión de fluorescencia verde provocada cuando GCaMP se une a Ca²⁺. Con flechas se indican la dirección de las contracciones registradas y los movimientos lateralizados de la región cefálica.

Posterior al GSB continúa la etapa postGSB, la cual puede dividirse en 2 fases a partir de una contracción postGSB típicamente de mayor duración a las restantes contracciones (figura 17). Adicionalmente, las contracciones de la fase 1 son de mayor duración ($p \ll 0,01$) y período ($p \ll 0,01$) que las contracciones de la fase 2, las cuales son más frecuentes y de menor duración (figura 18A y 18B). En consecuencia, si bien se define a la fase postGSB como un evento singular en el PMP, durante cada fase de la etapa postGSB transcurre un comportamiento motor significativamente diferente. De esta forma, podría ser relevante continuar con la diferenciación de ambas fases y potencialmente identificar su rol preponderante en el desarrollo del PMP.

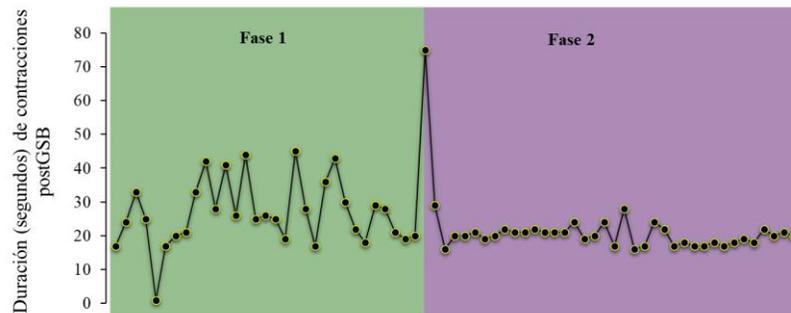


Figura 17. Duración en segundos de las contracciones (círculos negros y amarillos) de la fase postGSB. Las contracciones son secuenciales y están unidas por una línea negra equidistante en el sentido horizontal. Una contracción típicamente de mayor duración a las restantes permite separar las 2 fases (fase 1 en verde y fase 2 en violeta) de la etapa postGSB.

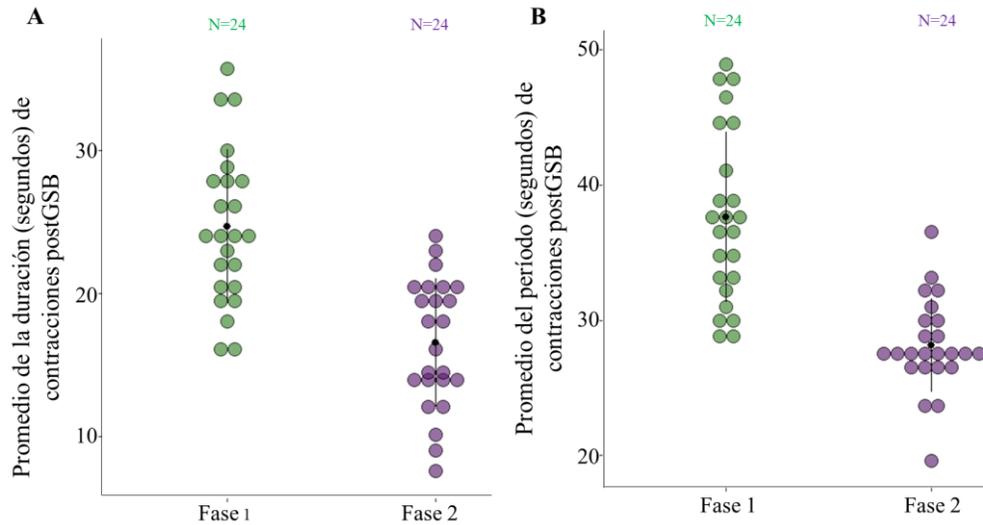


Figura 18. A) Cada círculo es el promedio de la duración (segundos) de las contracciones que ocurren en un individuo durante la fase 1 (verde) y fase 2 (violeta) de la etapa postGSB. El promedio de la duración de las contracciones postGSB es significativamente mayor ($p \ll 0,01$) en la fase 1. **B)** Cada círculo es el promedio del período (segundos transcurridos entre el inicio de una contracción y la siguiente) de contracciones que transcurre en un individuo durante la fase 1 (verde) y fase 2 (violeta) de la etapa postGSB. El promedio del período de contracciones es significativamente mayor ($p \ll 0,01$) en la fase 1. **A y B)** Media y desviación estándar son mostradas con un círculo negro y líneas verticales negras respectivamente.

Luego de analizar las fases GSB y postGSB del PMP de animales salvajes, se procedió a caracterizar la primera fase del PMP, denominada preGSB. Como se describió previamente, la fase preGSB siempre está presente en animales salvajes, pero también puede desarrollarse en animales experimentales, es decir en ausencia de expresión de *dilp8* o *Lgr3*. Esto hace posible, además de su caracterización, comparar la fase preGSB entre genotipos control y experimentales.

Inicialmente, se detectó que en los individuos control las contracciones preGSB tienen mayoritariamente una duración de 5 a 20 segundos. Adicionalmente, la duración de las primeras contracciones preGSB suele ser considerablemente menor a la duración de las últimas contracciones de un mismo animal, marcando un patrón aproximadamente ascendente en la duración de las contracciones a medida que progresa la fase mencionada. Realizando comparaciones entre genotipos control y experimentales, se observa que los animales mutantes tienen contracciones preGSB de menor duración (rara vez superan los 10 segundos). Incluso, el patrón ascendente de duración de las contracciones preGSB descrito en animales salvajes no es visiblemente notorio en animales mutantes para *dilp8* o *Lgr3* (Figura 19).

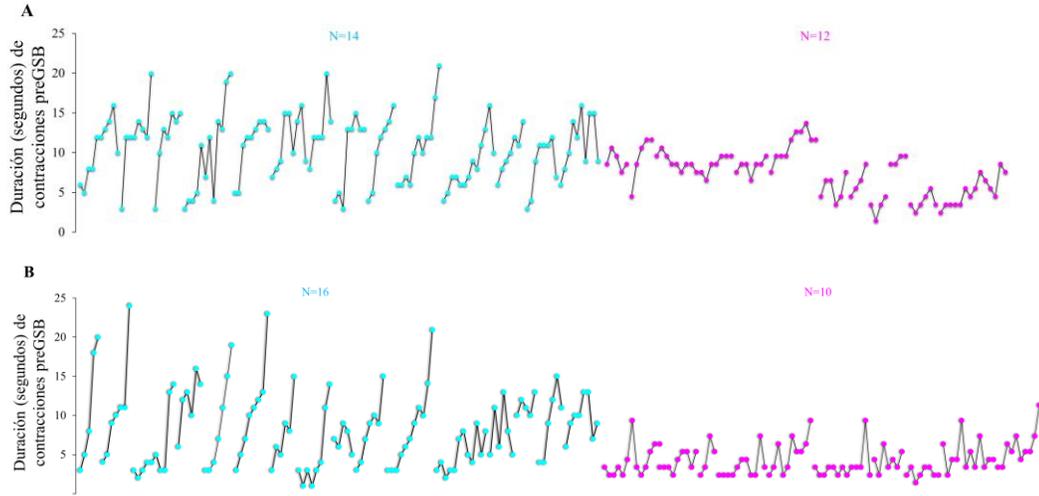


Figura 19. A, B) Duración de contracciones preGSB (círculos de color). Aquellas contracciones que forman parte de la fase preGSB de una misma larva, y por ende son consecutivas, están unidas por una línea negra (-). En Cian se indican contracciones preGSB de animales salvajes (en **A** *dilp8*+/- y en **B** *Lgr3*+/-). En magenta, contracciones preGSB de animales experimentales (en **A** *dilp8*-/- y en **B** *Lgr3*-/-). La duración de las contracciones preGSB es mayor en animales control que en mutantes y se visualiza fácilmente un patrón ascendente en la duración de las contracciones a medida que transcurre la fase preGSB de una larva.

Asimismo, en la mayoría de los casos, el período de contracciones preGSB en los animales salvajes varía entre 10 a 100 segundos. En contraposición, en los animales experimentales el período de contracciones es notoriamente mayor, por ejemplo, superando frecuentemente 100 segundos de tiempo transcurrido entre el inicio de contracciones preGSB consecutivas (Figura 20).

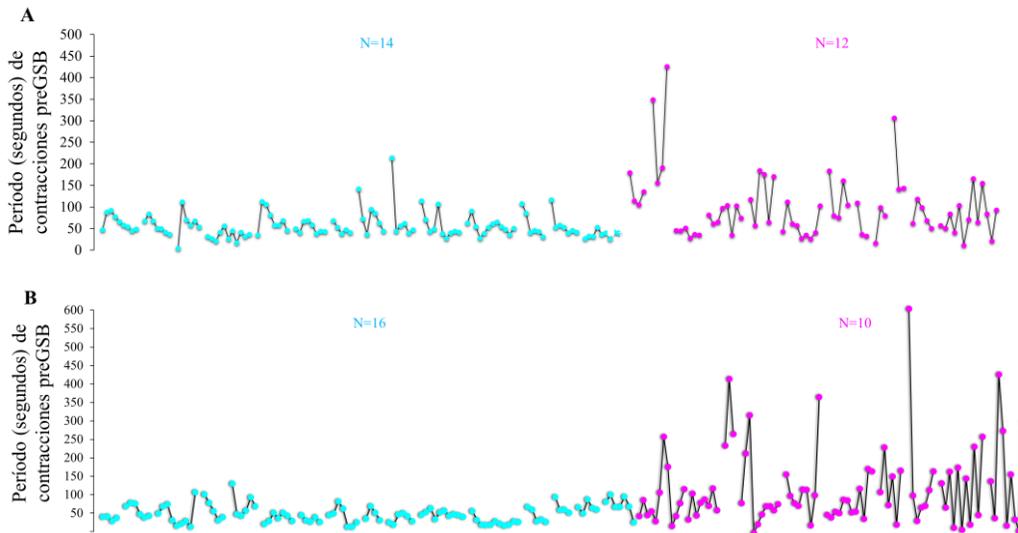
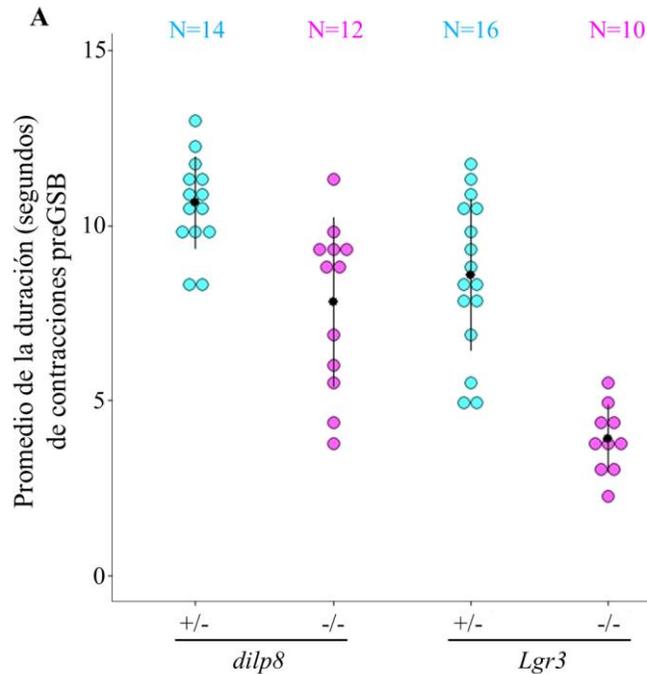


Figura 20. A, B) Período de contracciones preGSB (círculos de color). Aquellas contracciones que forman parte de la fase preGSB de una misma larva, y por ende son consecutivas, están unidas por una línea negra (-). En Cian se indican contracciones preGSB de animales salvajes (en **A** *dilp8*+/- y en **B** *Lgr3*+/-). En magenta, contracciones preGSB de animales experimentales (en **A** *dilp8*-/- y en **B** *Lgr3*-/-). El período de contracciones preGSB es visualmente mayor en animales experimentales que en salvajes.

Una tercera propiedad de contracción analizada fue la amplitud. Debido a que durante la filmación de los vídeos la iluminación no fue precisamente homogénea en la superficie del soporte de pupariación, posiblemente haya variaciones en la fluorescencia detectada que son propias de este fenómeno y no absolutamente por diferencias en las intensidades de contracción muscular. Entonces, las diferencias registradas en los valores de amplitud entre genotipos control y experimental pueden no ser consecuencia de la presencia/ausencia de expresión de *dilp8* o *Lgr3*. En este caso, y para las restantes variables analizadas (período y duración), se promediaron los valores de cada animal para poder comparar estadísticamente la amplitud, período y duración promedio de las contracciones preGSB entre animales salvajes y animales que no expresan *dilp8* y *Lgr3*.

Se detectó que la duración promedio de las contracciones preGSB es significativamente menor en los animales carentes de *dilp8* y *Lgr3* en comparación con sus respectivos genotipos controles ($p \ll 0,01$) (Figura 21A). Adicionalmente, con la finalidad de poder evaluar el patrón creciente de duración de las contracciones preGSB, se calculó para cada animal el promedio de las primeras y últimas 2 contracciones preGSB. En los genotipos control, se observa que las primeras contracciones preGSB son las de menor duración y la misma aumenta hasta alcanzar su valor máximo en las últimas 2 contracciones. Es decir, la diferencia en la duración entre las primeras y últimas 2 contracciones preGSB son mayores a las esperadas por azar ($p \ll 0,01$ tanto en *dilp8*^{+/-} como en *Lgr3*^{+/-}). Este patrón no es representativo del comportamiento preGSB en los genotipos experimentales, donde no hay diferencias significativas ($p = 0,24$ en *dilp8*^{-/-} y $p = 0,15$ en *Lgr3*^{-/-}) entre la duración de las primeras y últimas 2 contracciones (Figura 21B).



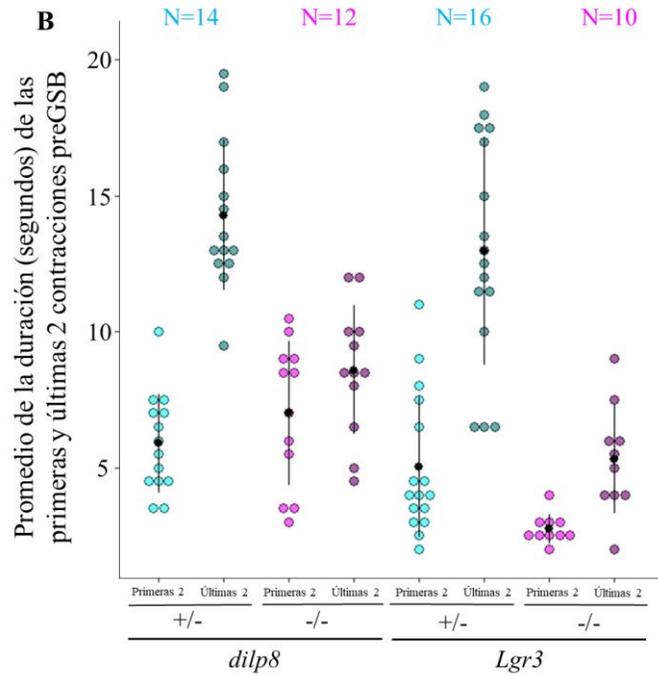


Figura 21. Para cada subfigura, el color cian representa los genotipos control y el color magenta los genotipos experimentales. **A)** Promedio de la duración de contracciones preGSB, donde cada círculo representa el promedio de la duración de todas las contracciones preGSB de un individuo. Típicamente la duración de las contracciones es significativamente menor ($p \ll 0,01$ para *dilp8* y *Lgr3*) en moscas mutantes. **B)** Promedio de la duración de las primeras (cian/magenta claro) y últimas (cian/magenta oscuro) 2 contracciones de una larva. En moscas WT la duración de las últimas 2 contracciones es significativamente mayor ($p \ll 0,01$ en *dilp8*^{+/-} y *Lgr3*^{+/-}) a las primeras 2 contracciones. No se evidencian diferencias significativas en genotipos mutantes ($p = 0,24$ en *dilp8*^{-/-} y $p = 0,15$ en *Lgr3*^{-/-}). **A** y **B)** Media y desviación estándar son mostradas con un círculo negro y líneas verticales negras respectivamente.

Adicionalmente, el período de contracciones preGSB resulta en promedio significativamente mayor ($p \ll 0,01$ tanto para *dilp8* como para *Lgr3*) en genotipos mutantes, carentes de *dilp8* o *Lgr3* (Figura 22A), resultando en un patrón alterado de contracciones poco frecuentes en el tiempo.

También, se procedió a registrar la duración de la fase preGSB en los diferentes grupos analizados. Se considera la duración preGSB como la diferencia de tiempo entre el inicio de la primera y última contracción preGSB. Se observa que la fase preGSB puede ser en promedio significativamente de mayor duración ($p \ll 0,01$) en animales *Lgr3*^{-/-} con respecto a individuos salvajes *Lgr3*^{+/-}. Sin embargo, no se observan diferencias significativas ($p = 0,08$) en la duración de la fase preGSB entre animales *dilp8*^{+/-} y *dilp8*^{-/-} (Figura 22B).

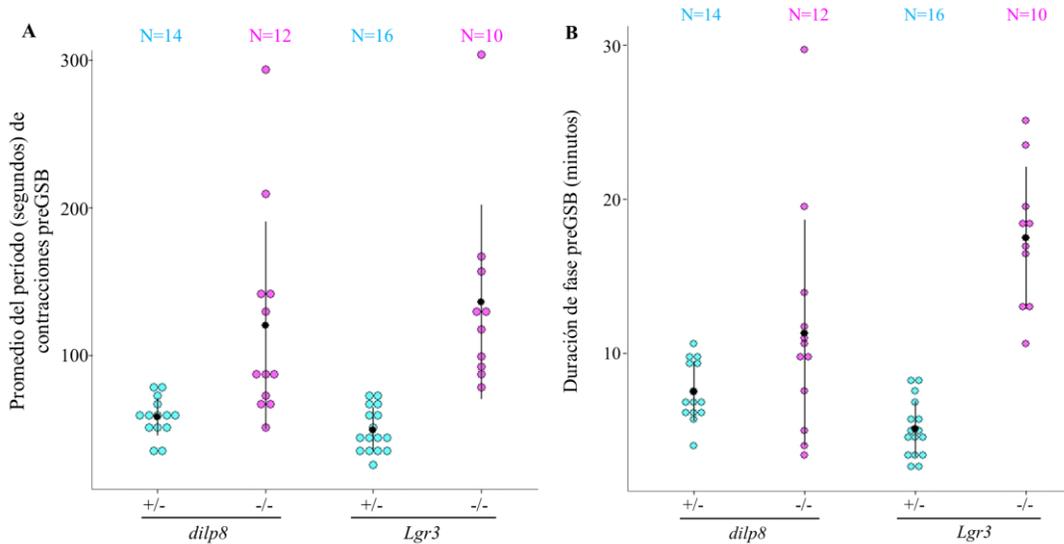


Figura 22. Para cada subfigura, el color cian representa los genotipos control y el color magenta los genotipos experimentales. **A)** Promedio del período de contracciones preGSB, donde cada círculo representa el promedio del período de todas las contracciones preGSB de un individuo. El período de contracciones es significativamente mayor ($p \ll 0,01$) en moscas que no expresan *dilp8* y *Lgr3* en comparación con los genotipos control. **B)** Duración total de la fase preGSB, donde cada círculo representa la duración de la fase preGSB de una larva. La duración de la fase preGSB es significativamente mayor ($p \ll 0,01$) en genotipos *Lgr3*^{-/-} con respecto a su control (*Lgr3*^{+/-}), mientras que no se observan diferencias significativas ($p = 0,08$) en la duración de la fase entre los genotipos *dilp8*^{+/-} y *dilp8*^{-/-}. En **A** y **B** se muestra la media (círculo negro) y la desviación estándar (línea vertical negra) del conjunto de datos analizados.

Además, se registró el número de contracciones preGSB desarrolladas en cada grupo de estudio. El número de contracciones es significativamente menor ($p = 0,03$) en ausencia de Dilp8 en comparación con animales *dilp8*^{+/-}. Contrariamente, en ausencia de Lgr3 el número de contracciones preGSB es mayor ($p \ll 0,01$) en comparación con el genotipo control *Lgr3*^{+/-} (Figura 23).

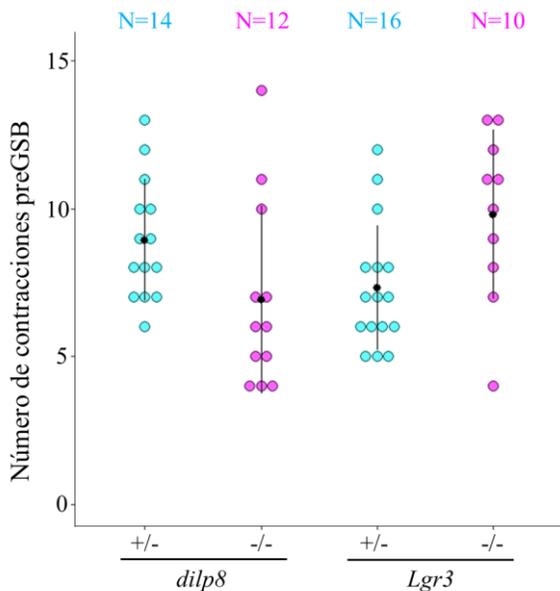


Figura 23. El color cian representa los genotipos control y el color magenta los genotipos experimentales. Cada punto representa el número de contracciones preGSB de un individuo. El número de contracciones preGSB es mayor ($p = 0,03$) en animales *dilp8*^{+/-} con respecto al mutante *dilp8*^{-/-}, mientras que es menor ($p \ll 0,01$) en animales *Lgr3*^{+/-} con respecto al mutante *Lgr3*^{-/-}. Además, se muestra la media (círculo negro) y la desviación estándar (línea vertical negra) del conjunto de datos analizados.

En relación a la amplitud, se encontró que en promedio la amplitud de las contracciones preGSB es mayor ($p = 0,01$) en genotipos que expresan *Lgr3* en comparación con grupo experimental *Lgr3*^{-/-}, pero no se observan diferencias significativas ($p = 0,123$) en la amplitud de contracciones entre genotipos control y experimental para *dilp8* (Figura 24). En este último caso, y como se mencionó previamente, las diferencias de amplitud registradas pueden estar subestimadas por una iluminación heterógena sobre el soporte de filmación de las larvas.

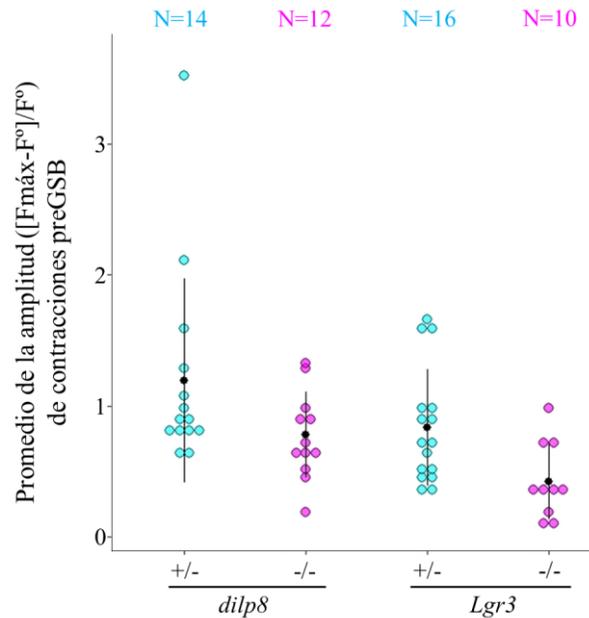


Figura 24. El color cian representa los genotipos control y el color magenta los genotipos experimentales. Se observa el promedio de la amplitud de contracciones preGSB, donde cada círculo representa el promedio de la amplitud de todas las contracciones preGSB de un individuo. La amplitud es significativamente mayor ($p = 0,01$) en larvas que expresan *Lgr3* en comparación con su genotipo control. No se observan diferencias significativas ($p = 0,123$) entre individuos salvajes y mutantes para *dilp8*. También, se muestra la media (círculo negro) y la desviación estándar (línea vertical negra) del conjunto de datos analizados.

En conclusión, la ausencia de *Dilp8* o *Lgr3* genera un patrón preGSB defectuoso, con contracciones a menudo más débiles y significativamente más cortas y dispersas. Este comportamiento defectuoso de los animales mutantes, adicionado a la falta de fases GSB y postGSB, explica la ausencia de un cambio significativo en la forma corporal en la transición larva-pupa. De esta forma, y como consecuencia de la esclerotización cuticular, pupas carentes de expresión de *dilp8* o *Lgr3* tienen una RA significativamente mayor al de animales salvajes.

Participación de las poblaciones neuronales 48H10 y 18A01 en la recepción de la señal hormonal Dilp8

Lgr3 es requerido en dos poblaciones celulares del sistema nervioso central para la coordinación del crecimiento con las transiciones del desarrollo³¹ y para la ejecución del programa de pupariación²⁹. Previamente, se registró que la población neuronal marcada por 19B09-Gal4, al recibir la señal de Dilp8, actúa coordinando el crecimiento larvario con el estado de desarrollo de los discos imaginales³¹. Pero cuando se realizó un silenciamiento de *Lgr3* por ARNi, no se observó alteración alguna en la forma del pupario con respecto al fenotipo salvaje. De esta forma, se deduce que 19B09 no es la población neuronal receptora de la señal de Dilp8 durante la ejecución del PMP. Alternativamente, 18A01 y 48H10 fueron planteadas como 2 poblaciones neuronales cuya expresión de *Lgr3* es necesaria para que ocurra el PMP²⁹.

Por ello, se procedió a describir el PMP de distintas líneas de moscas con silenciamiento selectivo de *Lgr3* en diferentes poblaciones neuronales. Inicialmente, se realizó la medición de la RA de animales control (*UAS-Lgr3-IR/+* y *18A01-Gal4/+*) y su respectivo genotipo experimental (*18A01>Lgr3IR*) donde el ARNi expresado disminuye la expresión de *Lgr3* en la subpoblación neuronal 18A01. Al igual que en los genotipos carentes de *dilp8* o *Lgr3* vistos anteriormente, la RA es significativamente mayor ($p < 0,01$) en animales con silenciamiento de *Lgr3* en la población 18A01 en comparación con los grupos control (Figura 25).

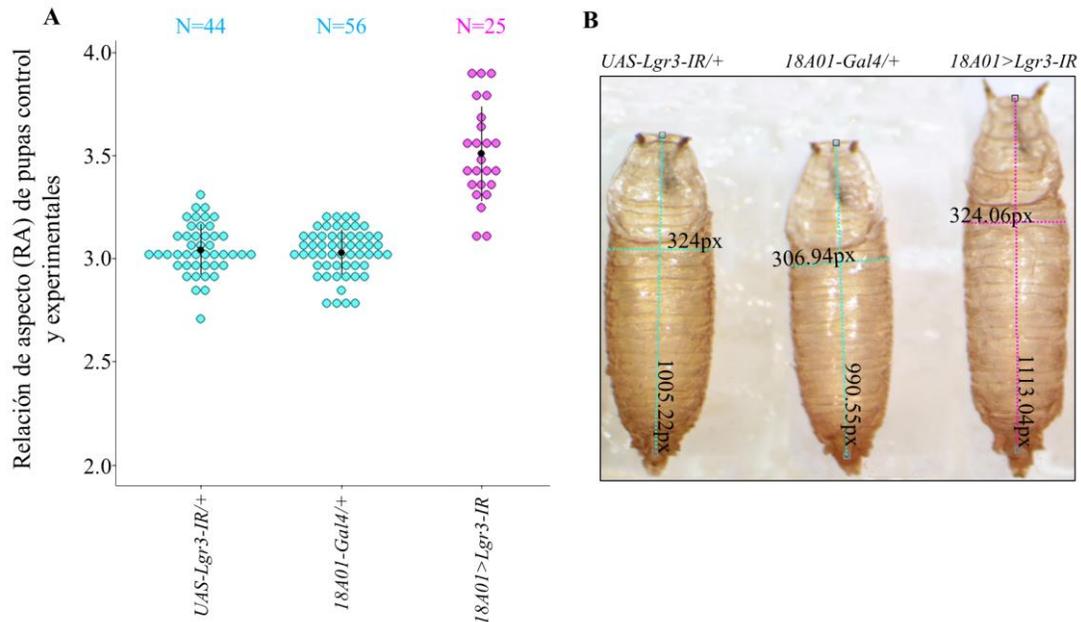


Figura 25. Relación de aspecto (RA) de pupas del grupo control (*UAS-Lgr3-IR/+* y *18A01-Gal4/+*) en color cian y experimental (*18A01>Lgr3-IR*) en color magenta. **A)** La RA de animales con *Lgr3* silenciado es significativamente mayor ($p < 0,01$) al de animales control, es decir la expresión de *Lgr3* es necesaria en la subpoblación neuronal 18A01 para que se ejecute un cambio de la forma corporal durante la transición larva-pupa. Además, se muestra la media (círculo negro) y la desviación estándar (línea vertical negra) del conjunto de datos analizados. **B)** Imagen de pupas representativas de cada grupo de estudio.

De hecho, al observar el patrón GCaMP del genotipo control *UAS-Lgr3-IR/+*, se registra un PMP completo: con fases preGSB, GSB y postGSB (Figura 26A). Llamativamente, el patrón GCaMP del genotipo *18A01-Gal4/+* realiza un PMP único, generalmente sin fase GSB pero con fases preGSB y postGSB adyacentes (Figura 26B). Esto puede estar provocado por un efecto secundario propio de la construcción genética de animales control *18A01*, interfiriendo de forma directa o indirecta sobre el desarrollo de la etapa GSB. Aún así, reconociendo los resultados en la RA para este genotipo y detectando que la RA en animales *18A01-Gal4/+* es similar ($p = 0.29$) a la RA de animales *UAS-Lgr3-IR/+*, se puede deducir que la fase GSB no tiene un efecto significativo sobre el cambio en la RA durante la transición larva a pupa. Luego, al observar el patrón GCaMP de *18A01>Lgr3-IR*, el desarrollo de un PMP incompleto (sin GSB y postGSB como en animales *dilp8-/-* y *Lgr3-/-*) es ocasionado estrictamente por el silenciamiento de *Lgr3* en la población *18A01* (Figura 26C). En definitiva, la expresión de *Lgr3* en la población *18A01* es necesaria para el desarrollo de un PMP completo y, por ende, para un cambio en la forma de larva a pupa. Consecuentemente, el patrón GCaMP resultante de este silenciamiento es equivalente al obtenido cuando se eliminó en forma generalizada la expresión de *dilp8* o *Lgr3* (*dilp8-/-* y *Lgr3-/-*).

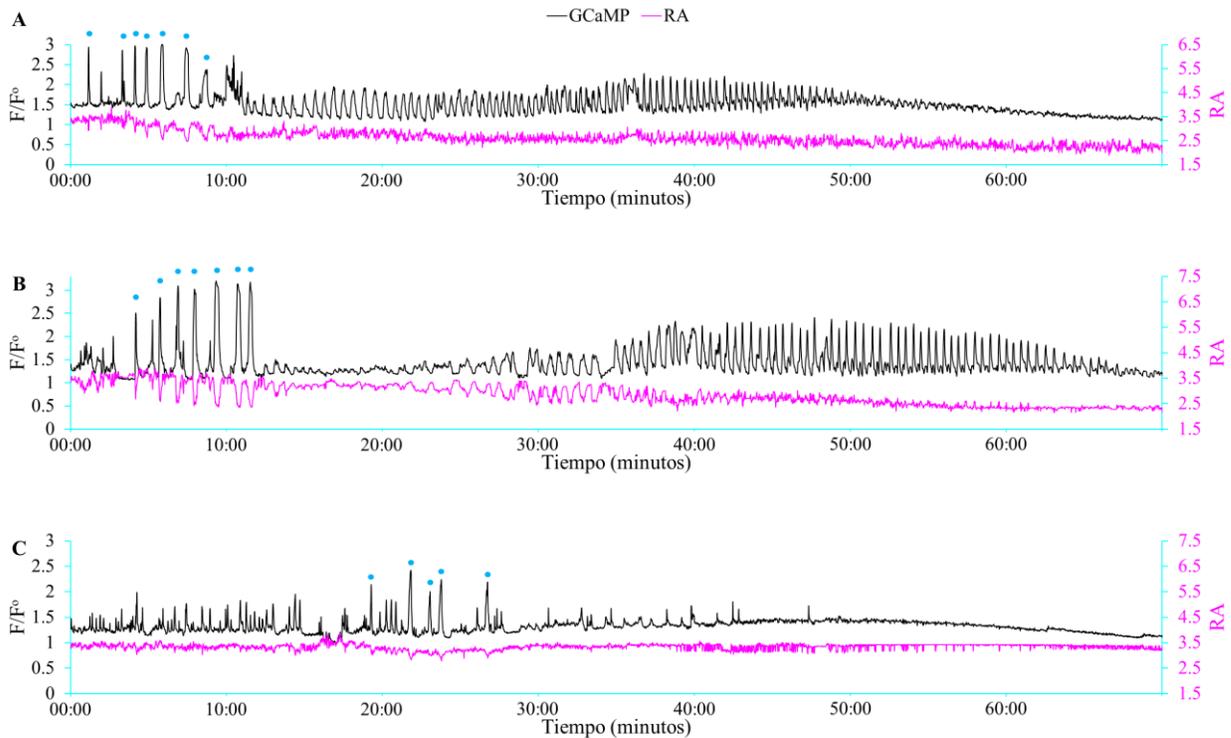


Figura 26. **A)** Patrón GCaMP de una larva *UAS-Lgr3-IR/+*. Se observan las 3 fases del PMP: preGSB, GSB y postGSB. Es un PMP equivalente al observado en los genotipos salvajes, *dilp8+/-* y *Lgr3+/-*. **B)** Patrón GCaMP de una mosca *18A01-Gal4/+*. En general, entre fases preGSB y postGSB se destaca la ausencia de actividad motora, es decir, se detecta la ausencia de una fase GSB en el 83,33% de los casos ($n = 6$). **C)** Patrón GCaMP de una larva *18A01>Lgr3-IR*. Es un PMP sin fases GSB y postGSB, equivalente al observado en los genotipos *dilp8-/-* y *Lgr3-/-*. En el ejemplo, se observan contracciones preGSB pero pueden estar ausentes. En **A**, **B** y **C** los picos de GCaMP indicados con puntos color cian corresponden a contracciones generalizadas del cuerpo durante la fase preGSB.

Posteriormente, se procedió a analizar la RA y los patrones GCaMP en el genotipo control *48H10-Gal4/+* y el genotipo experimental *48H10>Lgr3-IR*. De esta forma, se puede conocer el efecto del silenciamiento de *Lgr3* en la población neuronal 48H10. El genotipo *UAS-Lgr3IR/+* previamente analizado funciona como un grupo control adicional para este análisis. La ausencia de expresión de *Lgr3* determina que la RA de las pupas sea significativamente mayor ($p \ll 0,01$) con respecto a los genotipos control (Figura 27).

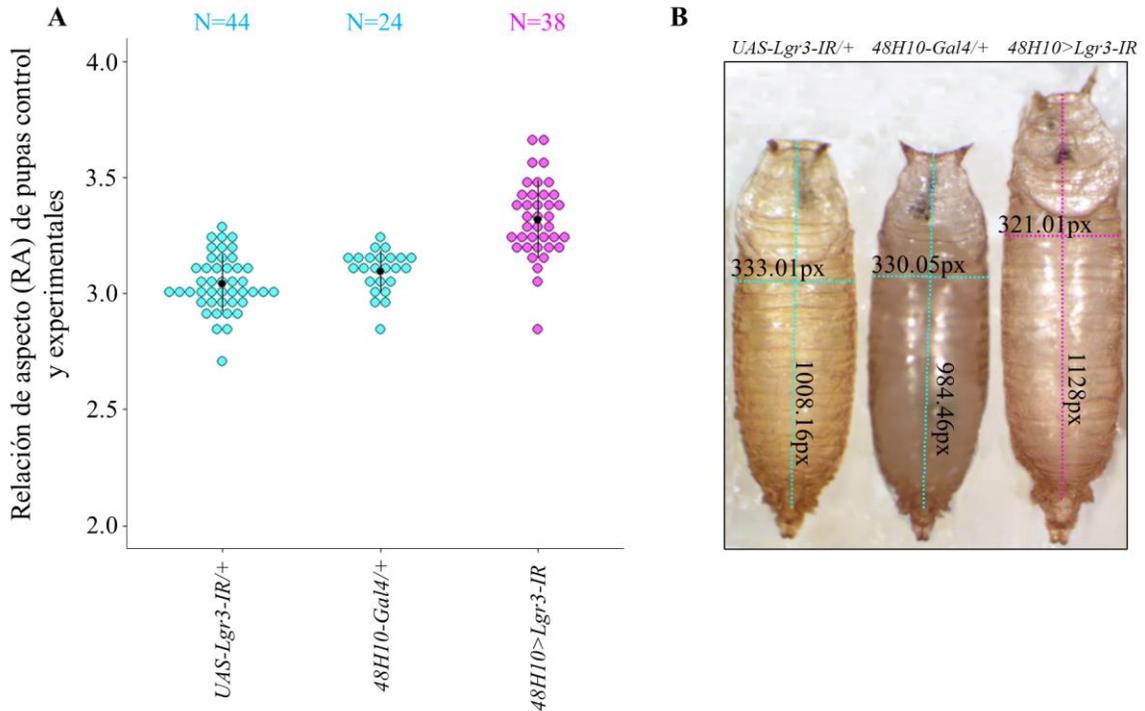


Figura 27. Relación de aspecto (RA) de pupas control (*UAS-Lgr3-IR/+* y *48H10-Gal4/+*) en color cian y experimental (*48H10>Lgr3-IR*) en color magenta. **A**) La RA de animales con *Lgr3* silenciado es significativamente mayor ($p \ll 0,01$) al de animales control, es decir la expresión de *Lgr3* es necesaria en la subpoblación neuronal 48H10 para que se ejecute un cambio de la forma corporal durante la transición larva-pupa. Además, se muestra la media (círculo negro) y la desviación estándar (línea vertical negra) del conjunto de datos analizados. **B**) Imagen de pupas representativas de cada grupo de estudio.

Acorde a lo esperado, se observó un PMP completo con todas sus fases para el genotipo control *48H10-Gal4/+* (Figura 28A). Tras el silenciamiento de *Lgr3* mediante ARNi en el grupo neuronal 48H10 (*48H10>Lgr3-IR*), se identificó un patrón GCaMP representativo de un PMP incompleto, sin fases GSB y postGSB, equivalente al observado en los genotipos mutantes, *dilp8-/-* y *Lgr3-/-* (Figura 28B).

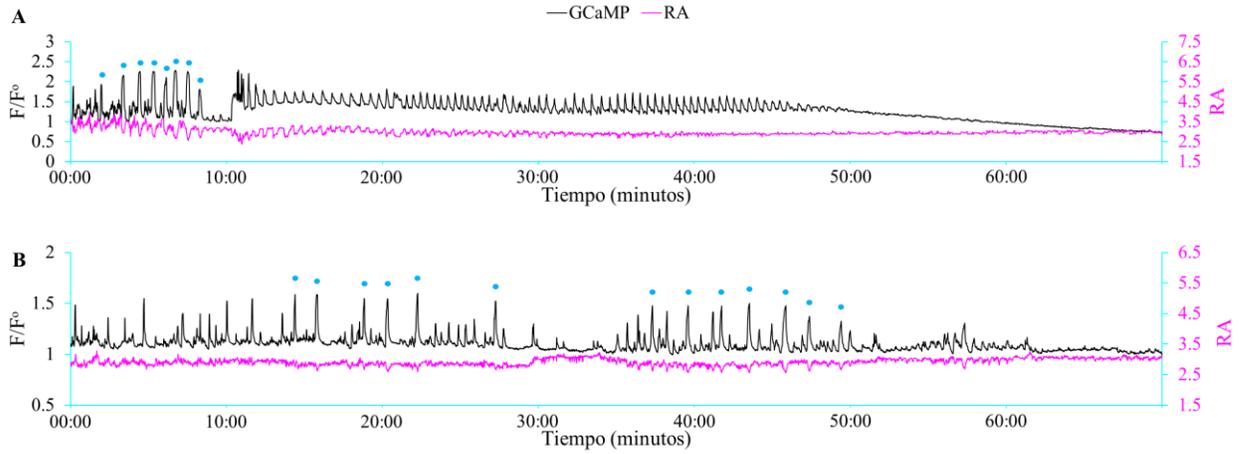


Figura 28. **A)** Patrón GCaMP de una mosca *48H10-Gal4/+*. Se observan las 3 fases del PMP: preGSB, GSB y postGSB. Es un PMP equivalente al observado en los genotipos salvajes, *dilp8+/-* y *Lgr3+/-*. **B)** Patrón GCaMP de una mosca *48H10>Lgr3-IR*. Se observa un PMP incompleto, sin fases GSB y postGSB. Las contracciones preGSB pueden estar presentes (como en el ejemplo) o nó. En **A**, y **B** los picos de GCaMP indicados con puntos color cian corresponden a contracciones generalizadas del cuerpo durante la fase preGSB.

En conclusión, el PMP se desarrolla por completo en las condiciones control, excepto cuando se trabajó con el grupo control *18A01-Gal4/+*. En esta condición, los animales hacen preGSB y postGSB, pero generalmente no desarrollan la fase GSB. Además, la ausencia de GSB no afecta la morfología de las pupas, ya que la RA es similar a los restantes grupos control. Al igual que para moscas *dilp8-/-* y *Lgr3-/-*, las pupas resultan ser más largas y angostas (alta RA) cuando la expresión de *Lgr3* es silenciada por ARNi en cualquiera de las poblaciones neuronales (*48H10* o *18A01*), relacionándose con la falta en el 100% de los casos de un comportamiento GSB y postGSB (Figura 29).

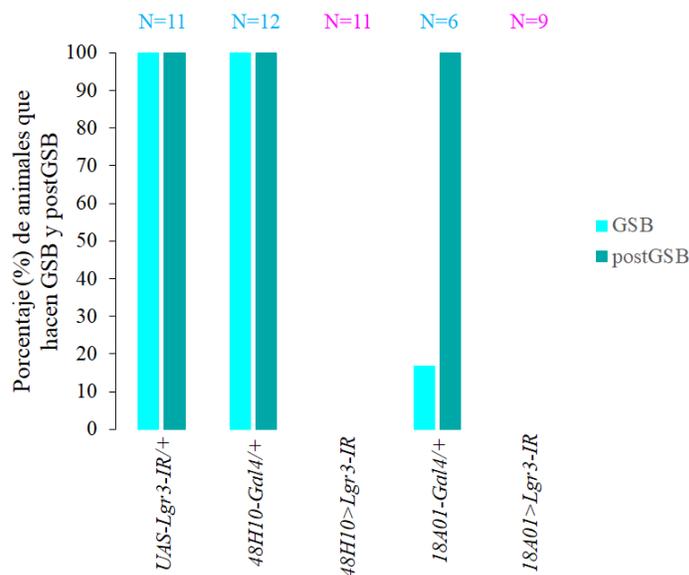


Figura 29. Porcentaje (%) de animales que hacen GSB y postGSB en genotipos control (cian) y experimentales (magenta). Como la totalidad de los individuos que realizan GSB y/o postGSB se encuentran dentro del grupo control, la fase GSB está representada en color cian y la fase postGSB en cian oscuro. Los grupos control desarrollan ambas fases, GSB y postGSB ($p > 0,05$) excepto individuos *18A01-Gal4/+* que comunmente no desarrollan la fase GSB ($p \ll 0,01$). Los grupos experimentales *48H10>Lgr3-IR* y *18A01>Lgr3-IR* no desarrollan ninguna de las fases mencionadas ($p \ll 0,01$).

Entonces, el PMP podría desencadenarse a partir de una ruta de señalización compleja que implique la recepción de Dilp8 en algunas o todas las neuronas comprendidas en las poblaciones 48H10 y 18A01. En este caso, la falta de expresión de *Lgr3* en cualquiera de las poblaciones afectaría el desarrollo de un PMP completo, concordante con lo observado hasta el momento.

Para poder identificar y caracterizar el número mínimo de neuronas *Lgr3*+ involucradas en el programa motor de pupariación, se procedió a trabajar con un nuevo genotipo experimental (definido para mayor simplicidad $18A01 \cap 48H10 > Lgr3-IR$) donde la expresión de *Lgr3* queda interferida sólo en la intersección de ambas poblaciones, el subgrupo de 6 neuronas compartidas por 48H10 y 18A01 (los detalles experimentales y cruzamientos para la obtención de este y restantes genotipos se describen en la sección “Materiales y Métodos”). Precisamente, para garantizar que los resultados obtenidos sean explicados sólo por la ausencia de *Lgr3* en la subpoblación neuronal, se procedió a contrastar los resultados con 3 genotipos control: *FlpC*+, para corroborar que la construcción *FlpC* no interfiera en la expresión generalizada de *Lgr3*; *FlpC*/*48H10-Gal4*, permite asegurar que *Gal80* (de expresión generalizada) actúa correctamente como inhibidor de *Gal4*; *FlpC*/*18A01-LexA*, para evaluar que la actividad de la Flipasa Recombinasa es específica sobre la población neuronal 18A01.

Inicialmente, se midió la RA de las pupas al finalizar el PMP y luego el patrón GCaMP representativo durante el evento de pupariación de los genotipos mencionados. La falta de expresión de *Lgr3* en el subgrupo de 6 neuronas determinó el desarrollo de pupas con una RA significativamente mayor ($p \ll 0,01$) al de los genotipos control (figura 30).

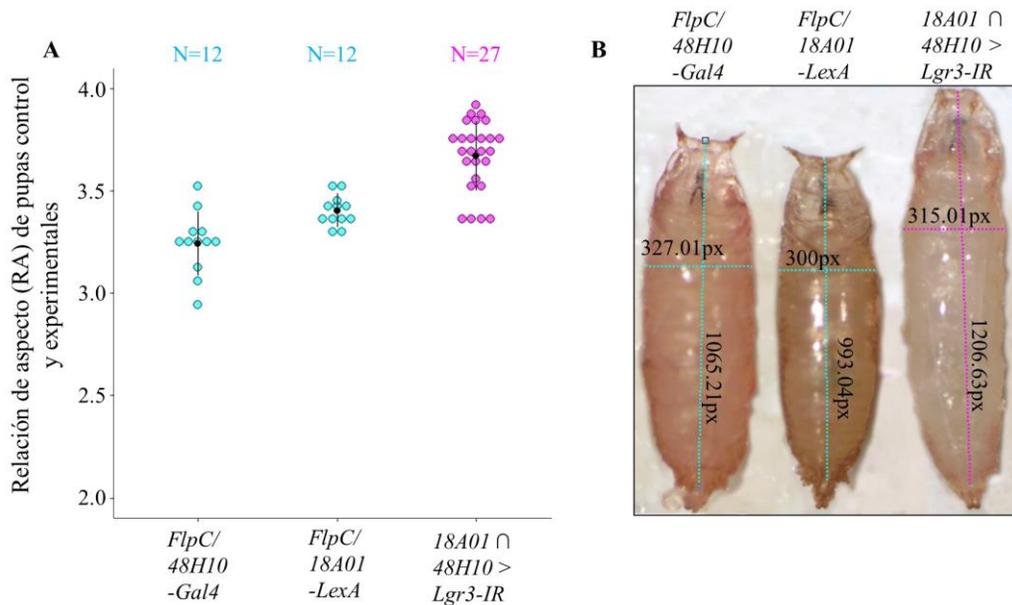


Figura 30. Relación de aspecto (RA) de pupas control (*FlpC*/*48H10-Gal4* y *FlpC*/*18A01-LexA*) en color cian y experimental ($18A01 \cap 48H10 > Lgr3-IR$) en color magenta. La RA de animales con *Lgr3* silenciado es significativamente mayor ($p \ll 0,01$) al de animales control, es decir la expresión de *Lgr3* es necesaria en el grupo de 6 neuronas (o un subgrupo de ellas) para que se ejecute un cambio de la forma corporal durante la transición larva-pupa. Además, se muestra la media (círculo negro) y la desviación estándar (línea vertical negra) del conjunto de datos analizados.

FlpC/+ y *FlpC/48H10-Gal4* desarrollan un PMP completo equivalente al descrito para los genotipos control *dilp8+/-*, *Lgr3+/-*, *UAS-Lgr3-IR/+* y *48H10-Gal4/+* (figura 31A y B respectivamente). *FlpC/18A01-LexA* tiene un patrón GCaMP equivalente al genotipo *18A01-Gal4/+*, sin fase GSB, pero con fases preGSB y postGSB adyacentes (Figura 31C). Esto tendría la misma interpretación descrita anteriormente, donde la construcción genética de moscas 18A01 interfiere por sí sola en el desarrollo de la fase GSB. Cuando se expresa el ARNi de *Lgr3* en la intersección de las poblaciones neuronales 18A01 y 48H10 ($18A01 \cap 48H10 > Lgr3-IR$), observando el patrón GCaMP característico (Figura 31D), se detecta un PMP incompleto, sin fases GSB y postGSB.

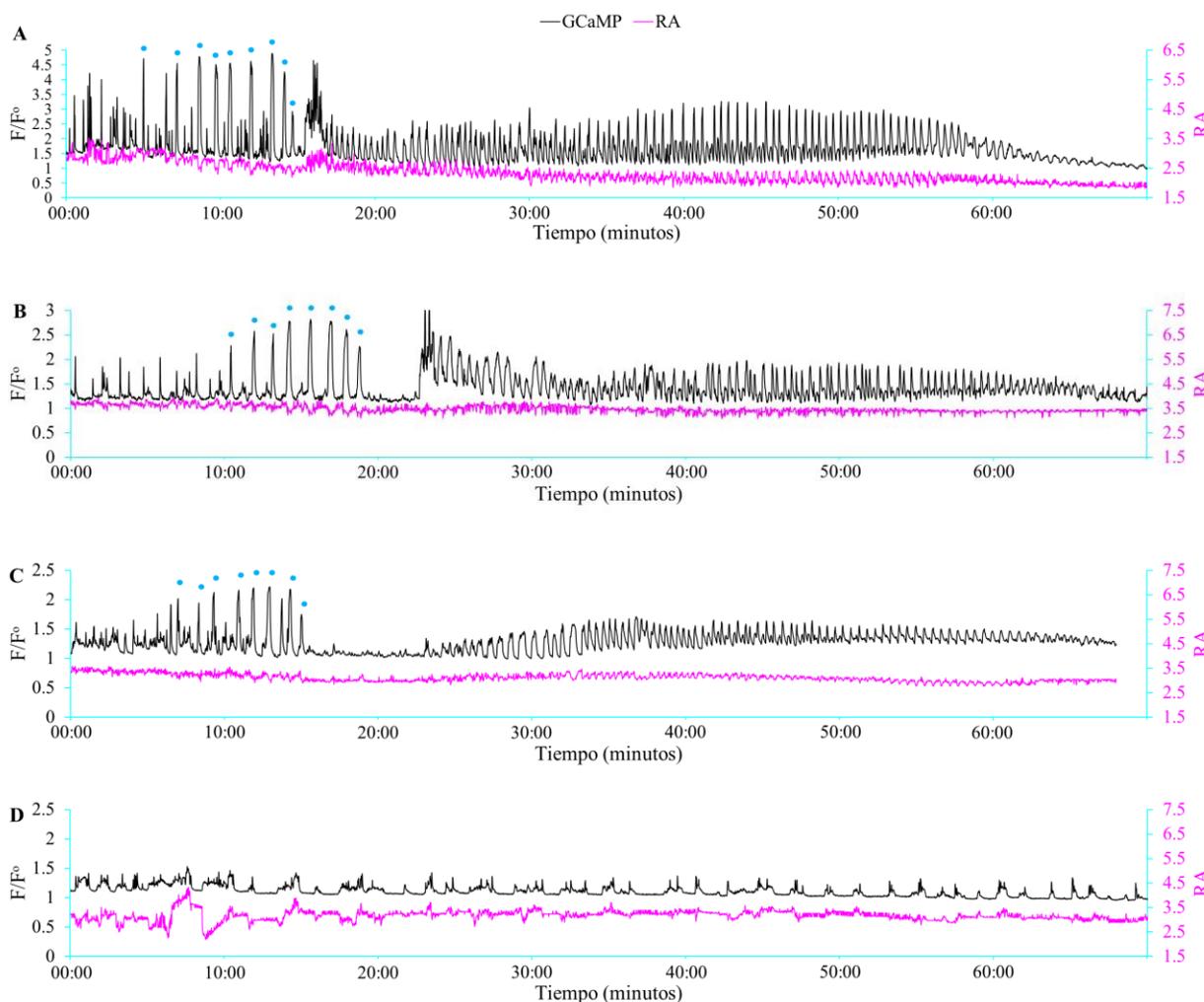


Figura 31. **A)** Patrón GCaMP de una mosca *FlpC/+*. Se observan las 3 fases del PMP: preGSB, GSB y postGSB. Es un PMP equivalente al observado en los genotipos salvajes *dilp8+/-* y *Lgr3+/-*. **B)** Patrón GCaMP de una larva *FlpC/48H10-Gal4*. Se observan las 3 fases del PMP: preGSB, GSB y postGSB. De igual interpretación al patrón A. **C)** Patrón GCaMP de una mosca *FlpC/18A01-LexA*. Al igual que en animales *18A01-Gal4/+*, la fase GSB está ausente en el 100% de los casos ($n = 10$) pero siempre hay desarrollo de las fases adyacentes, preGSB y postGSB. **D)** Patrón GCaMP de una mosca $18A01 \cap 48H10 > Lgr3-IR$. Se observa un PMP incompleto, sin fases GSB y postGSB. No se presentan contracciones preGSB. En **A**, **B** y **C** los picos de GCaMP indicados con puntos color cian corresponden a contracciones generalizadas del cuerpo durante la fase preGSB.

En conclusión, ninguno de los individuos con genotipo $18A01 \cap 48H10 > Lgr3-IR$ analizados ($n = 17$) desarrolla fase GSB y postGSB. Aún más, en ninguno de ellos se pudo identificar contracciones preGSB quedando un registro totalmente incompleto del PMP. En cambio, en los respectivos genotipos control se pudo registrar en el 100% de los casos las fases preGSB y postGSB. La fase GSB también fue identificada en el 100% de los grupos control, excepto para el genotipo $FlpC/18A01-LexA$ (Figura 32).

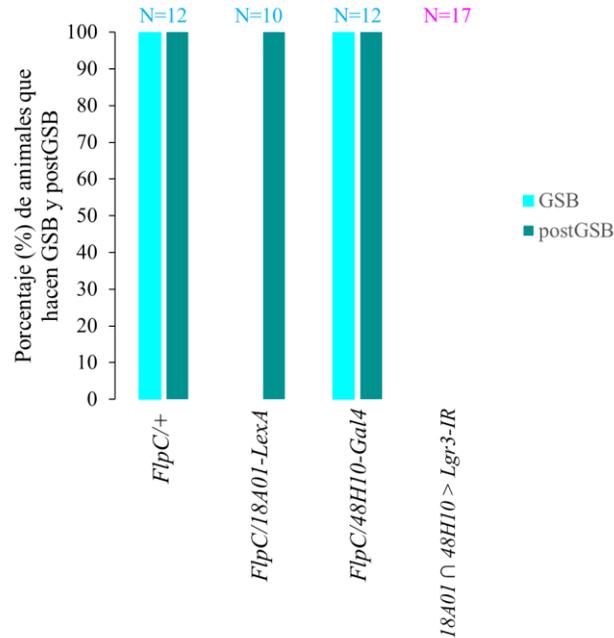


Figura 32. Porcentaje (%) de animales que hacen GSB y postGSB en genotipos control (cian) y experimentales (magenta). Como la totalidad de los individuos que realizan GSB y/o postGSB se encuentran dentro del grupo control, la fase GSB está representada en color cian y la fase postGSB en cian oscuro. Los grupos control desarrollan las fases GSB y postGSB ($p > 0,05$) excepto individuos $FlpC/18A01-LexA$ que no realizan GSB ($p \ll 0,01$). El grupo experimental ($18A01 \cap 48H10 > Lgr3-IR$) no desarrolla las fases GSB y postGSB ($p \ll 0,01$).

En función de los resultados obtenidos, se sugiere que el grupo de 6 neuronas, o un subgrupo de ellas son las que específicamente requieren $Lgr3$ para desencadenar el PMP por completo. Cuando dichas neuronas carecen de expresión de $Lgr3$, no se recibe la señal hormonal de $Dilp8$ y, en consecuencia, desarrollan un PMP incompleto. De esta forma, se evidencia que la falta de este comportamiento motor en la transición larva-pupa determina la formación de pupas más largas y angostas. También se explica el desarrollo incompleto del PMP observado previamente en los genotipos $18A01 > Lgr3-IR$ y $48H10 > Lgr3-IR$: al realizar un silenciamiento de $Lgr3$ por ARNi en cualquiera de las 2 poblaciones neuronales, siempre incluye un silenciamiento de $Lgr3$ en el subgrupo de 6 neuronas. Aún más, trabajando con los genotipos control y experimental que permiten analizar la intersección de ambas poblaciones neuronales, se observa lo esperado: cuando se reduce la expresión de $Lgr3$ en el subgrupo de 6 neuronas ($18A01 \cap 48H10 > Lgr3-IR$), no hay desarrollo de un PMP completo. De hecho (al igual que para $dilp8^{-/-}$, $Lgr3^{-/-}$, $18A01 > Lgr3-IR$ y $48H10 > Lgr3-IR$) en ningún caso se supera la fase preGSB.

Efecto del aumento sostenido en los niveles de Dilp8 sobre el PMP

Se ha descrito que durante el proceso de pupariación hay un aumento sostenido de Dilp8²⁹. El nivel de expresión de *dilp8* medido por PCR cuantitativa se incrementa sostenidamente entre el final del estadio de larva L3 hasta el de prepupa y vuelve a valores basales 60 minutos después de la pupariación. Cinco minutos después del GSB, el nivel de ARNm de *dilp8* es aproximadamente 100 veces mayor que en larva wandering y alcanza un pico máximo al finalizar el PMP²⁹. La relevancia fisiológica de este aumento sostenido no es conocida. Nos propusimos analizar si es necesario para la progresión de las diferentes fases del PMP. Para ello, se analizó el PMP de animales heterocigotas para el alelo hipomorfo *dilp8*^{M100727}. Este alelo conjugado con una alelo de expresión nula, representan el 30% del valor normal de expresión de *dilp8*.

A valores normales de expresión de *dilp8*, todas las fases del PMP son desarrolladas (Figura 33A). En los animales con genotipo *-dilp8*^{M100727} también se identificó un patrón con todas las etapas de un PMP: preGSB, GSB y postGSB (Figura 33B). En consecuencia, a niveles de expresión de *dilp8* inferiores al normal, las etapas del PMP han sido al menos iniciadas, definiendo una progresión del comportamiento motor más bien similar a la de los genotipos control y totalmente diferente a los genotipos experimentales (sin expresión de *dilp8* o *Lgr3*, donde solo podían visualizarse en algunos casos contracciones preGSB).

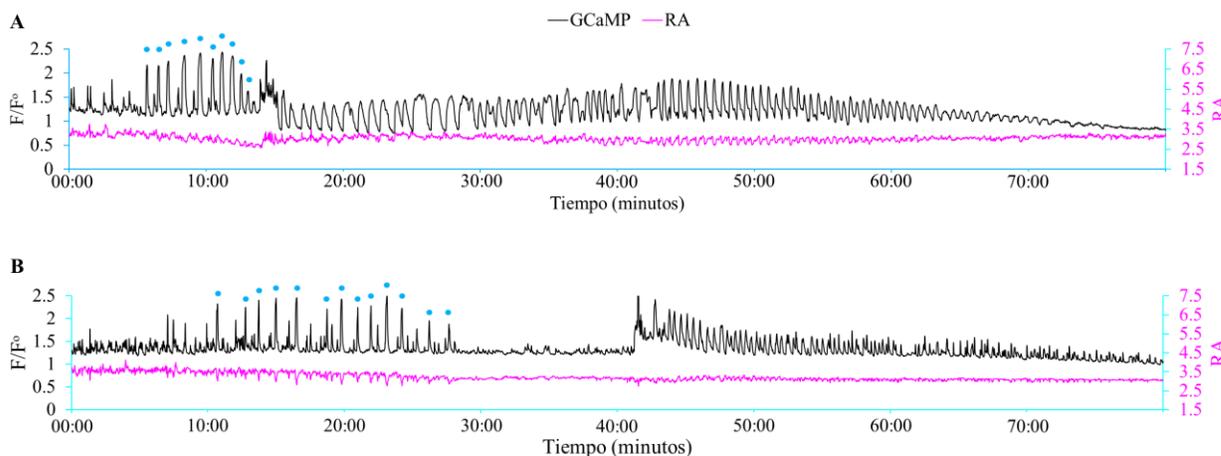


Figura 33. **A)** Patrón GCaMP de una larva *dilp8*^{+/−}. Se observan todas las fases características del PMP. **B)** Patrón GCaMP de una larva con genotipo *-dilp8*^{M100727}. Se observan las 3 fases de un PMP: preGSB, GSB y postGSB. **A, B)** Los picos de GCaMP indicados con puntos color cian corresponden a contracciones generalizadas del cuerpo durante la fase preGSB.

Luego, se procedió a caracterizar cada una de las fases del PMP de los mutantes hipomorfos para *dilp8*. Llamativamente, se observó un incremento en el número de contracciones preGSB. Al comparar esta variable con el genotipo control (*dilp8*^{+/−}), esta vez se identificó que el número de contracciones preGSB es significativamente mayor ($p \ll 0,01$) en el genotipo experimental (Figura 34A). Aún más, similar a lo obtenido en las comparaciones anteriores entre genotipos control y experimentales, los animales que tienen la expresión de *dilp8* disminuida no presentan diferencias significativas ($p = 0,114$) en la amplitud de las

contracciones preGSB (figura 34B), pero exhiben una duración significativamente menor ($p \ll 0,01$) de las contracciones (figura 34C), separadas por intervalos de tiempo mayores ($p < 0,05$; figuras 34D).

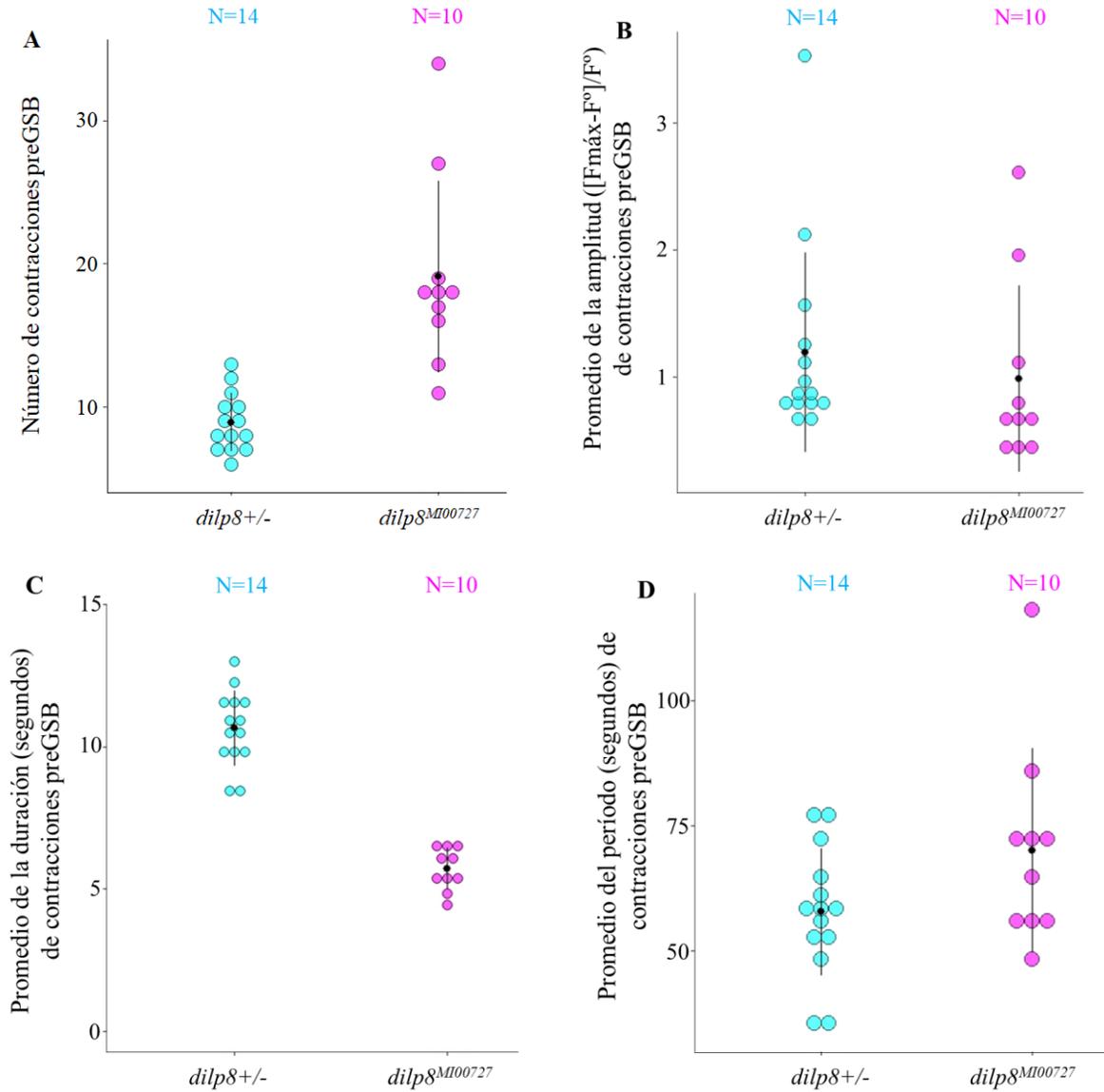


Figura 34. **A**) Número de contracciones preGSB, donde cada larva está representada por un círculo. Individuos representativos del genotipo control (*dilp8*^{+/-}) se indican en color cian mientras que los representativos al genotipo experimental (*-dilp8*^{MI00727}) se indican en color magenta. El número de contracciones preGSB es significativamente menor ($p \ll 0,01$) en animales salvajes. **B**) Se observa el promedio de la amplitud de contracciones preGSB, donde cada círculo representa la amplitud promedio de las contracciones preGSB de una larva. No hay diferencias significativas ($p = 0,114$) en la amplitud promedio entre individuos salvajes y con expresión disminuida de *dilp8*. **C**) Promedio de la duración de contracciones preGSB, donde cada círculo representa el valor promedio de duración de una contracción preGSB de una larva. Típicamente la duración de las contracciones es significativamente mayor ($p \ll 0,01$) en moscas con expresión normal de *dilp8*. **D**) Promedio del período de contracciones preGSB, donde cada círculo representa el período promedio transcurrido entre contracciones sucesivas preGSB de una larva. El período de contracciones es significativamente mayor ($p < 0,05$) en moscas con niveles de expresión de *dilp8* disminuidos en comparación con los genotipos control. En **A**, **B**, **C** y **D** se muestra la media (círculo negro) y la desviación estándar (línea vertical negra) del conjunto de datos analizados.

En definitiva, en individuos con niveles de expresión de *dilp8* disminuidos se representa un patrón preGSB defectuoso particular donde se caracterizan contracciones de baja duración, alto período y, adicionalmente, un mayor número de contracciones en comparación con el genotipo control. Posteriormente, el tiempo que transcurre entre la última contracción preGSB y el inicio de la fase GSB fue caracterizado en *-dilp8^{MI00727}* y comparado con el grupo control, de expresión normal de *dilp8*. Resultó concluyente que el tiempo transcurrido es significativamente mayor ($p \ll 0,01$) en *-dilp8^{MI00727}*, donde los individuos comúnmente demoran más de 10 minutos en iniciar la fase GSB luego de transcurrida la última contracción preGSB (Figura 35).

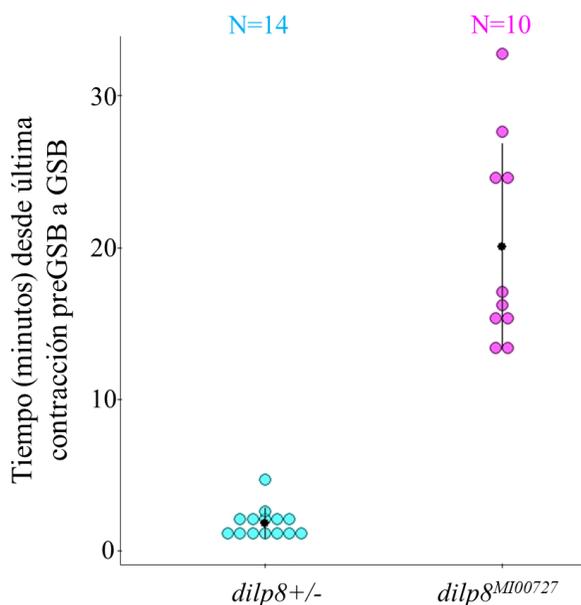


Figura 35. Tiempo (minutos) que transcurre entre la última contracción preGSB y el inicio del comportamiento GSB para los animales salvajes *dilp8*^{+/-} (cian claro) y mutantes hipomorfos *-dilp8^{MI00727}* (magenta), donde cada círculo representa un individuo. El tiempo transcurrido entre el fin la fase preGSB y el inicio de la siguiente (GSB) es significativamente mayor ($p \ll 0,01$) en animales con expresión disminuida de *dilp8*. Media y desviación estándar son mostradas con un círculo negro y líneas verticales negras respectivamente.

Para concluir la caracterización de la fase preGSB de animales *-dilp8^{MI00727}*, se procedió a comparar la duración de la fase preGSB entre este grupo y su respectivo control. Los animales *-dilp8^{MI00727}* atraviesan una fase preGSB de duración significativamente mayor ($p \ll 0,01$, figura 36). Esto podría deberse a, como se describió previamente, un mayor número de contracciones desarrolladas y dispersas entre sí (alto período) en los animales experimentales con respecto al grupo control.

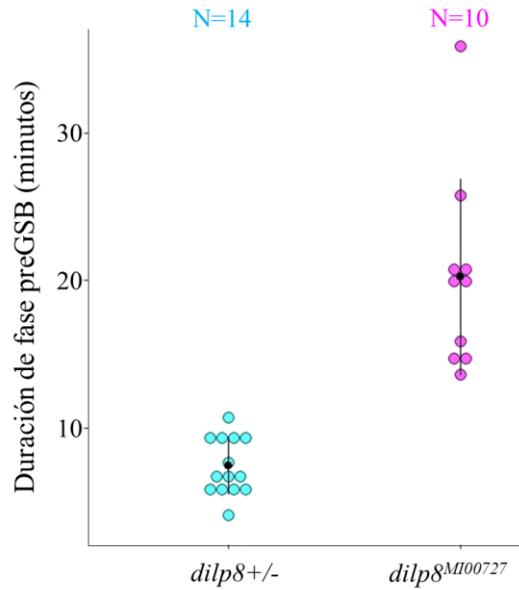


Figura 36. Duración total de la fase preGSB, donde cada círculo representa la duración de la fase preGSB de una larva. La duración de la fase preGSB es significativamente mayor ($p \ll 0,01$) en moscas *-dilp8^{MI00727}* con respecto a su control (*dilp8*^{+/-}). Media y desviación estándar son expuestas con un círculo negro y líneas verticales negras respectivamente.

En individuos *-dilp8^{MI00727}*, la fase GSB siempre está presente y es de similar duración a la fase GSB desarrollada por animales del grupo control. A pesar de ello, ocasionalmente en los animales experimentales no se ve el comportamiento motor típico de la fase GSB observado en animales salvajes. Probablemente sería necesario hacer filmaciones con mayor resolución durante el PMP de larvas mutantes *-dilp8^{MI00727}* para identificar diferencias concretas en el comportamiento con respecto a larvas salvajes.

Por último, un patrón GCaMP correspondiente a la fase postGSB de animales *-dilp8^{MI00727}* fue visualmente distinguible del patrón representativo de animales salvajes. Las contracciones de mutantes hipomorfos conforman un patrón en el cual no es posible diferenciar las 2 fases (definidas previamente) de la etapa postGSB (figura 37). Posiblemente, las contracciones postGSB desarrolladas en mutantes hipomorfos representen una de las 2 fases de la etapa postGSB de los individuos salvajes. Esto podría identificarse ya que, como se describió previamente, las fases 1 y 2 de individuos *dilp8*^{+/-} son comportamientos diferentes, observándose diferencias significativas en la duración y período de sus contracciones. La fase 1 desarrolla contracciones en promedio de mayor duración y período que la fase 2. Por ello, se procedió a comparar las características de las contracciones postGSB de animales *-dilp8^{MI00727}* con las desarrolladas en la fase 1 y 2 (por separado) de animales salvajes *dilp8*^{+/-}.

Los individuos experimentales presentan contracciones en promedio de duración significativamente menor ($p \ll 0,01$) con respecto a tanto la fase 1 como la fase 2 de animales salvajes (figura 39).

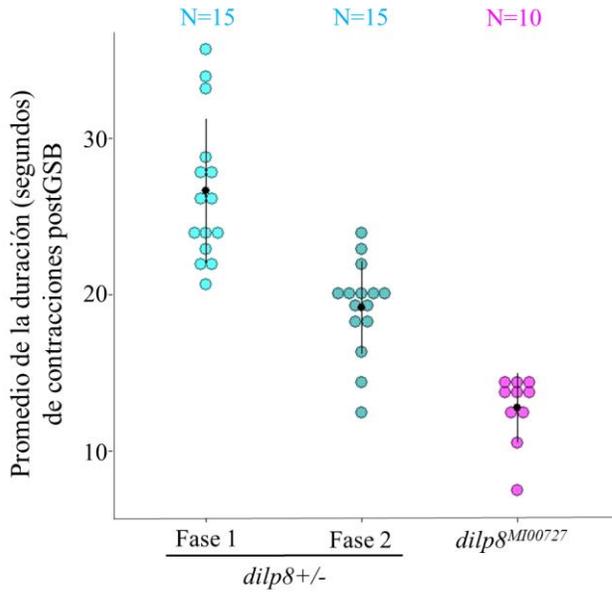


Figura 39. Promedio de la duración de contracciones postGSB. En cian claro (fase 1) y oscuro (fase 2) se representa el promedio de las contracciones desarrolladas por larvas *dilp8*+/. En magenta está representado el promedio de contracciones postGSB en animales con expresión disminuida de *dilp8*. El promedio de la duración de contracciones postGSB es significativamente menor ($p << 0,01$) en animales hipomorfos *-dilp8^{MI00727}* con respecto a la duración promedio de contracciones de cualquiera de las 2 fases de individuos salvajes. Media y desviación estándar son mostradas con un círculo negro y líneas verticales negras respectivamente.

Además, el período de contracciones postGSB en promedio es significativamente menor ($p << 0,01$) en animales *dilp8* hipomorfos en comparación con las contracciones de la fase 1 de animales salvajes. La fase 2 de animales *dilp8*+/- presenta un período de contracciones postGSB similar ($p = 0.731$) con respecto a mutantes hipomorfos (figura 40).

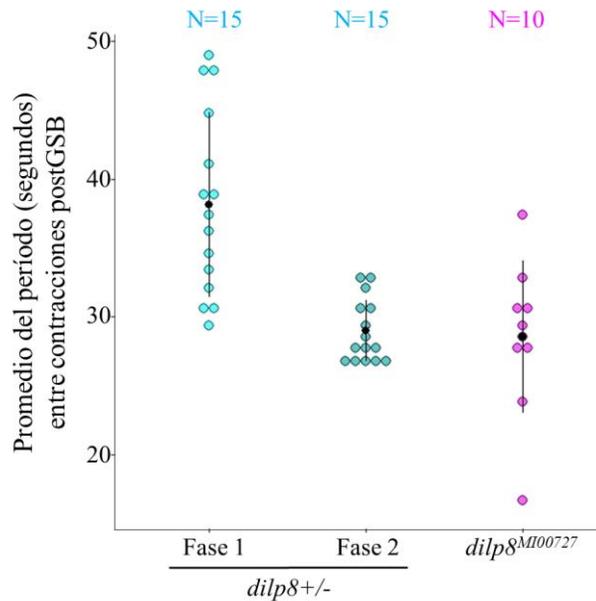


Figura 40. Promedio del período de contracciones postGSB. En cian claro (fase 1) y oscuro (fase 2) se representa el promedio de las contracciones desarrolladas por larvas *dilp8*+/. En magenta está representado el promedio de contracciones postGSB en animales con expresión disminuida de *dilp8*. El promedio del período de contracciones postGSB es significativamente menor ($p << 0,01$) en animales *-dilp8^{MI00727}* con respecto al período promedio de contracciones de la fase 1 de animales salvajes. No hay diferencias significativas ($p = 0.731$) entre las contracciones de animales mutantes hipomorfos y las de la fase 2 de animales salvajes. Media y desviación estándar son mostradas con un círculo negro y líneas verticales negras respectivamente.

Finalmente, si bien no hay diferencias significativas ($p = 0,484$) en la media de la duración de la fase postGSB entre individuos salvajes $dilp8^{+/-}$ y animales $-/dilp8^{M100727}$, la varianza de la duración es visualmente mayor en el segundo caso (Figura 41).

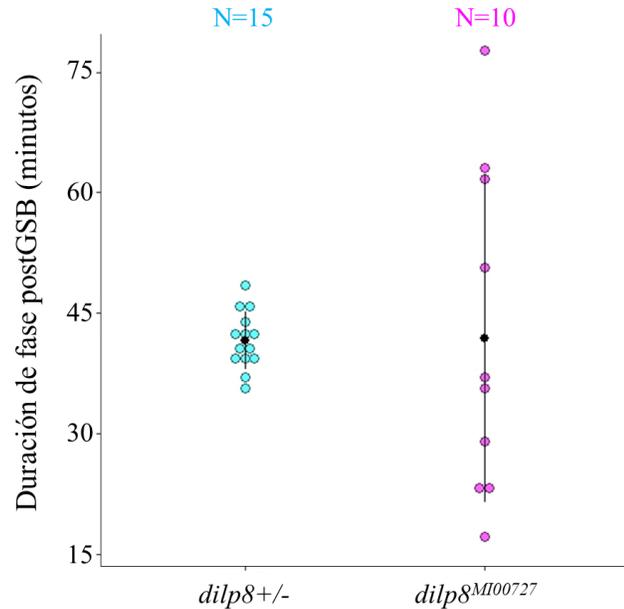


Figura 41. Duración de la fase postGSB en minutos. En cian se representa la duración de la fase postGSB de larvas $dilp8^{+/-}$ mientras que en magenta está representada la duración de la etapa postGSB de animales con expresión disminuida de $dilp8$. No hay diferencias significativas en la media de la duración postGSB entre larvas mutantes y salvajes, pero se evidencia una varianza mayor para animales $-/dilp8^{M100727}$. Media y desviación estándar son mostradas con un círculo negro y líneas verticales negras respectivamente.

En definitiva, animales con expresión disminuida de $dilp8$ desarrollan un patrón postGSB único con propiedades que permiten su diferenciación con respecto a las 2 fases postGSB de animales salvajes. Si bien no hay diferencias significativas en el período de contracciones postGSB de la fase 2 entre larvas $dilp8^{+/-}$ y larvas $-/dilp8^{M100727}$, las diferencias en la duración y el patrón visual GCaMP sugieren que no son comportamientos motores semejantes. Comparando la fase 1 postGSB de animales salvajes con larvas mutantes $-/dilp8^{M100727}$, a pesar de que el patrón visual GCaMP de la fase 1 de larvas $dilp8^{+/-}$ insinúa una similitud con el patrón desarrollado en animales $-/dilp8^{M100727}$, la duración y el período de contracciones postGSB son significativamente diferentes. Sin embargo, es posible sugerir que la fase postGSB desarrollada en animales con expresión disminuida de $dilp8$ es un comportamiento defectuoso de la fase 1 postGSB de animales salvajes (Figura 42).

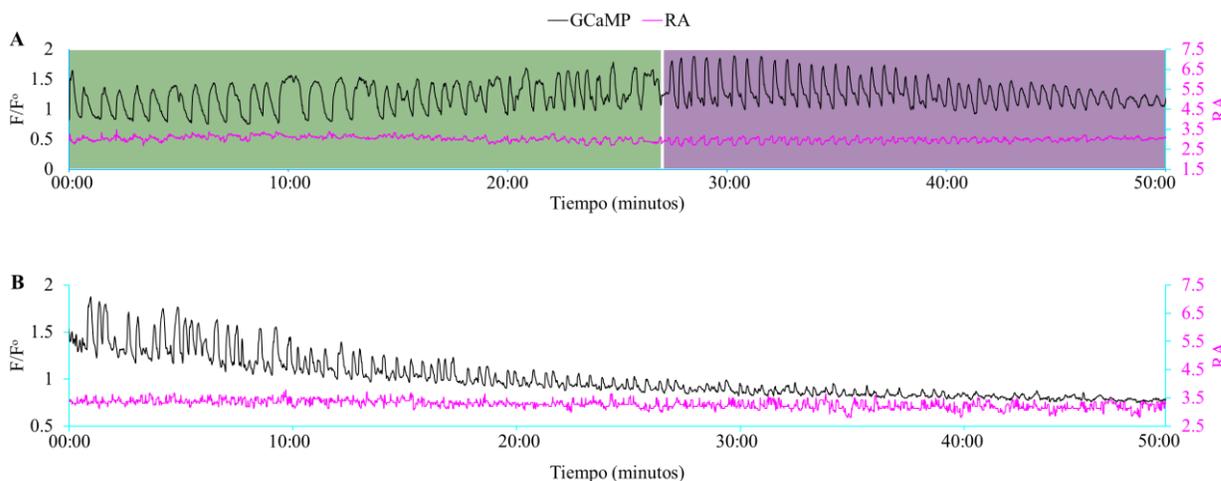


Figura 42. **A)** Patrón GCaMP de la fase postGSB de larvas *dilp8*^{+/-}. Se identifican con verde y violeta las fases 1 y 2 respectivamente. **B)** Patrón GCaMP de la fase postGSB de larvas *-dilp8*^{M100727}.

Llamativamente, durante el análisis del comportamiento postGSB de larvas *-dilp8*^{M100727}, en un individuo mutante (de un total de 10 analizados) se visualizó un patrón GCaMP diferente, previamente no identificado. Este patrón comienza a desarrollarse de igual forma a los 9 individuos restantes del grupo experimental, hasta alcanzar un punto en el cual el comportamiento es más bien similar a la fase 2 postGSB de animales salvajes (Figura 43). La disminución de la expresión de *dilp8* conduce a alterar el comportamiento postGSB ya que se desarrollan contracciones más cortas y dispersas con respecto al grupo control. Pero, además, *-dilp8*^{M100727} podría representar un umbral de expresión de *dilp8* crítico para el desarrollo de la fase 2. Quizás, cuando dicho umbral es levemente superado, se desarrolla una símil fase 2 postGSB posterior a la fase 1 defectuosa.

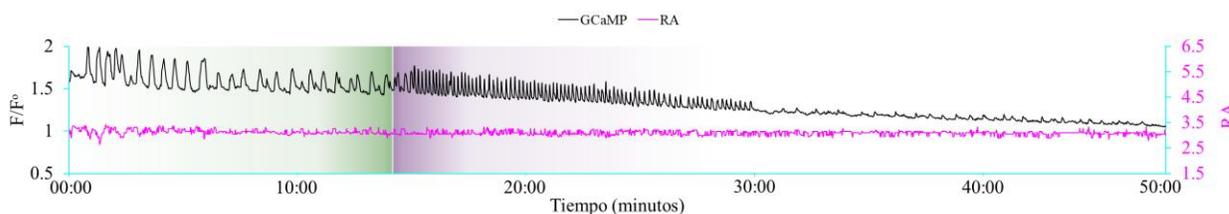


Figura 43. Patrón GCaMP de la fase postGSB de una larva *-dilp8*^{M100727}. La transición entre las hipotéticas fases 1 y 2 se encuentran diferenciadas con verde y violeta respectivamente.

DISCUSIÓN

Diversas moléculas regulatorias, así como sus conexiones y la conformación de redes complejas que subyacen al desarrollo de los programas biológicos han sido identificadas (2). Por ejemplo, diferentes programas biológicos pueden ser ejecutados debido a la acción concertada de redes de genes y moduladores fisiológicos tales como hormonas (8). Estos programas pueden ser comportamientos innatos, es decir, patrones biológicos robustos y estereotipados programados por circuitos neuronales determinados genéticamente. Si bien está programado, dicho comportamiento es flexible y responde variablemente a la modulación de diversas redes moleculares (38). Entonces, dilucidar los mecanismos por los cuales un comportamiento es ejecutado puede ser complejo. Sin embargo, con la ayuda de nuevas herramientas genéticas, se han logrado grandes avances para abordar este tipo de comportamientos en organismos modelos como *Drosophila melanogaster* (10, 38).

Recientemente, se ha identificado un comportamiento innato durante la transición de larva a pupa en *D. melanogaster*, denominado programa motor de pupariación (PMP). Es un patrón estereotipado y repetitivo de contracciones musculares donde se identifican tres fases sucesivas: preGSB, GSB y postGSB (29). La denominación de estas fases es funcional al comportamiento más conspicuo denominado Glue Spreading Behavior (GSB), durante el cual la larva expulsa una sustancia pegajosa desde las glándulas salivales que permite la adhesión del pupario al sustrato (15,21,24).

La transición larva-pupa es iniciada por la hormona esteroide Ecdisona (16,25). Un primer pico de actividad de Ecdisona induce un cambio en el comportamiento de la larva, la cual deja de alimentarse y se desplaza activamente hacia un nuevo sitio donde, tras un segundo pico de ecdisona, se detendrá e iniciará el PMP(36). Aquí, la Ecdisona es una señal hormonal que activa la expresión del gen *dilp8*, codificante de la hormona peptídica Dilp8, en la epidermis cuticular (29). Además, Dilp8 actúa a través de Lgr3, un receptor neuronal acoplado a proteína G (31,33).

En esta tesina probamos que Dilp8, proveniente de la epidermis cuticular, y su receptor neuronal Lgr3 son necesarios para la ejecución del PMP. En los animales mutantes que carecen de la hormona o el receptor, una vez la larva se detiene e inicia el comportamiento de pupariación, el PMP queda bloqueado en el inicio de la fase preGSB. Durante la transición larva-pupa, el remodelado corporal permite generar una cubierta endurecida (o pupario) que contendrá al individuo durante la metamorfosis. Observamos que los animales que no tienen Dilp8 o Lgr3 desarrollan un pupario defectuoso cuya principal característica es una relación de aspecto (RA) atípicamente grande. En otras palabras, vimos que las larvas carentes de Dilp8 o Lgr3 no transitan el acortamiento típico de su cuerpo (elevada RA), sin embargo la cutícula se endurece y pigmenta normalmente. Esto podría ser posible ya que la Ecdisona ejecuta diferentes subprogramas en la epidermis cuticular. Por un lado, activa la expresión de *dilp8* y el consecuente remodelado corporal a partir del PMP. Por otro lado, promueve la esclerotización cuticular activando una red génica que involucra la

síntesis de Dopamina a partir de Tirosina debido a la acción de enzimas codificadas por los genes *pale* y *Ddc* (29). Esto sugiere que los programas de esclerotización y reestructuración corporal son paralelos.

Estudiamos el PMP de animales salvajes para conocer el rol de *Dilp8* y *Lgr3* en este proceso y comprender porqué su ausencia conduce a la formación de un pupario morfológicamente defectuoso. Identificamos las tres fases del PMP (preGSB, GSB y postGSB). Con mayor detalle, identificamos un patrón ascendente en la duración de las contracciones a medida que transcurre la fase preGSB, siendo entonces las últimas contracciones de mayor duración que las primeras. La fase preGSB tiene una duración rara vez mayor a 10 minutos y pocos minutos después, la etapa GSB da inicio. Esta fase resulta ser la de menor duración (~1 minuto) luego de la cual, de forma inmediata, comienza la última etapa denominada postGSB. En esta etapa, de 35 a 50 minutos de duración, logramos diferenciar 2 comportamientos secuenciales: el primero donde se desarrollan contracciones dispersas en el tiempo y de larga duración, el segundo en contraposición con contracciones frecuentes en el tiempo y de menor duración.

Luego de caracterizar el PMP de animales salvajes, hicimos lo mismo con el PMP de animales mutantes, carentes de expresión de *dilp8* y *Lgr3* (*dilp8*^{-/-} y *lgr3*^{-/-}). Encontramos que el PMP se encuentra alterado o incompleto ya que los comportamientos GSB y postGSB no son ejecutados. Más aún, en un 43,5% de los animales el programa estaba totalmente bloqueado, es decir, sin fase preGSB. Complementariamente, en el 56,4% observamos contracciones preGSB pero resumiéndose en un comportamiento defectuoso: la duración de las contracciones no seguían un patrón de duración incremental, siendo típicamente de menor duración que las desarrolladas por animales salvajes. Además, las contracciones se desarrollaban muy distantes en el tiempo unas de otras, a veces definiendo una fase preGSB que fácilmente superaba los 10 minutos de duración. De esta forma, sugerimos que *Dilp8* y *Lgr3* probablemente no son imprescindibles para iniciar el PMP, pero son necesarios para permitir la continuidad de las sucesivas fases de un PMP completo. En ausencia de *Dilp8* o *Lgr3*, la esclerotización se ejecuta al igual que animales salvajes (un programa paralelo activado por Ecdisona), pero sin desarrollar en simultáneo el comportamiento motor que permite remodelar por completo la morfología de una larva en pupa. Como consecuencia, una vez que la cutícula está endurecida, las pupas mutantes exhiben una forma alargada definitiva, es decir, con una RA mayor a la de animales salvajes.

Entonces, es concluyente que la vía de señalización *Dilp8/Lgr3* es necesaria para la ejecución del PMP. Además, la idea de que la esclerotización y el PMP son programas paralelos es sustentado por el hecho de que el pico de expresión de *dilp8* asociado a la pupariación es producido por la expresión del gen *dilp8* en la epidermis cuticular, posterior al estímulo por ecdisona (29). En otras palabras, la Ecdisona actúa sobre la epidermis activando el endurecimiento cuticular y, simultáneamente, la expresión de *dilp8*. *Dilp8* es una señal hormonal cuyo tejido diana es el cerebro, donde se une a receptores *Lgr3* desbloqueando el programa motor. De esta forma, *Dilp8* actúa como una señal que coordina ambos programas, la esclerotización y el remodelado corporal.

Lgr3 es un receptor neuronal necesario que permite detectar la señal de Dilp8 proveniente de la epidermis y, acoplado a proteína G, responde ante la interacción con Dilp8 activando en el SNC el circuito neuronal implicado en el programa motor de pupariación. Esto explica por qué, aunque existiera expresión de *dilp8*, la falta de expresión de *Lgr3* impide también el desarrollo de un PMP completo y, por ende, el remodelado corporal. Se ha descrito que Dilp8, secretada desde los discos imaginales en respuesta al daño de los tejidos larvales, se asocia a *Lgr3* en un par de neuronas bilaterales del cerebro de la larva (denominadas neuronas PIL). Así, Dilp8 modula la actividad de las glándulas endócrinas que controlan la transición entre las etapas del desarrollo en *D. melanogaster*, retrasando el inicio de la metamorfosis cuando los discos imaginales están dañados (30,31,32,35). Por ello, resultaría sugerente suponer que este mismo grupo de neuronas también recibe la señal de Dil8 para ejecutar el PMP. Sin embargo, al silenciar la expresión de *Lgr3* en las neuronas PIL, el desarrollo del PMP no resulta afectado (29).

Alternativamente, identificamos que *Lgr3* es requerido en un grupo específica de 6 neuronas (o un subgrupo de ellas) para detectar la señal de Dilp8 y desbloquear el PMP. Dicho grupo neuronal se encuentra contenido en las poblaciones estudiadas mediante las inserciones 48H10 y 18A01. Estas inserciones representan secuencias situadas río arriba de Gal4 y reproducen parte del patrón de expresión de *Lgr3*. Ante el silenciamiento de *Lgr3* por ARN de interferencia en los mencionados grupos neuronales (*48H10>Lgr3IR* y *18A01>Lgr3IR*), observamos que las larvas no sufren un acortamiento del cuerpo durante la pupariación. De hecho, visualizamos que el PMP quedaba bloqueado en el inicio de la fase preGSB al igual que animales *dilp8*^{-/-} y *lgr3*^{-/-}. Entonces, Dilp8 no es detectable para la ejecución del PMP completo cuando las poblaciones neuronales 48H10 o 18A01 carecen de receptores *Lgr3*. En otras palabras, 18A01 y 48H10 son poblaciones que incluyen a las neuronas *Lgr3*⁺ sensibles a Dilp8 durante la pupariación.

Procedimos a estudiar la transición de larva a pupa en la intersección de dichas poblaciones (*18A01* \cap *48H10*), es decir, en un grupo específico de 6 neuronas que se encuentran presentes tanto en la población *18A01* como en la *48H10*. Para conocer la implicancia de este subgrupo neuronal en el desarrollo del PMP, se promovió el silenciamiento de *Lgr3* sólo en estas 6 neuronas (*18A01* \cap *48H10>Lgr3IR*). Aquí demostramos que las 6 neuronas de la cuerda ventral tienen un rol clave en el desarrollo del programa motor. Inicialmente, vimos que las pupas experimentales tienen una RA mayor, es decir que carecen de un programa de remodela corporal y el consecuente acortamiento del cuerpo. Por ello, procedimos a describir el PMP y observamos que, ante la ausencia de expresión de *Lgr3* en este subgrupo específico de neuronas, las larvas no desbloquean el PMP más allá de la fase preGSB. Nuevamente, este PMP consiste en un preGSB defectuoso cuyas contracciones (cuando presentes) tienen una baja duración y alto período, sin continuación de fases GSB y postGSB. Simultáneamente, observamos que la inserción *18A01* tiene un efecto característico sobre el desarrollo del PMP. En este sentido, las líneas control *18A01-Gal4/+* y *FlpC/18A01-LexA* expresan *Lgr3* en las neuronas sensoras de Dilp8 para ejecutar el PMP completo, pero visualizamos la ausencia de la fase GSB. El impedimento de *18A01-Gal4* y *18A01-LexA* para el desarrollo de la fase

GSB no es consecuencia de la presencia de una inserción transgénica en el genoma ya que ambas construcciones se encuentran insertas en sitios diferentes del genoma (18A01-Gal4 está en el cromosoma 3 mientras que 18A01-LexA en el cromosoma 2). Esto sugiere entonces que la presencia de la secuencia 18A01, independientemente del sitio en el que esté insertada, bloquea la ejecución del GSB. Además, procedimos a medir la RA de las pupas con genotipo *18A01-Gal4/+* y *FlpC/18A01-LexA* y observamos que la RA es similar a la de animales salvajes. Esto permite concluir que el GSB no tiene significativas implicancias en el remodelado corporal ya que cuando dicha fase está ausente, existe un acortamiento típico del cuerpo en la transición larva-pupa. Entonces, el comportamiento motor detectado durante la fase GSB parece estar exclusivamente implicado en la liberación de una sustancia pegajosa desde las glándulas salivales y la transferencia de esta sustancia por gran parte de la superficie ventral del animal permitiendo la adhesión del pupario al sustrato.

En conclusión, resulta sugerente pensar que la señal hormonal Dilp8 es específicamente requerido en el grupo de 6 neuronas de la cuerda ventral, o un subgrupo de ellas, para ejecutar todas las fases del PMP y, por ende, el remodelado corporal de larva a pupa. Dentro de este grupo, el soma de un par de neuronas, denominadas MIL, se sitúan en la parte interna anterior del segmento torácico de la cuerda nerviosa mientras que los somas de los 2 pares restantes de neuronas están ubicadas a nivel posterior en la línea media ventral de la cuerda nerviosa. La anatomía de estas neuronas no ha sido estudiada en detalle, pero un análisis inicial muestra que sus proyecciones se dirigen hacia los lóbulos cerebrales y no hacia la cuerda nerviosa ventral, donde se alojan las neuronas motoras (29). Esto sugiere que las neuronas *Lgr3+* que participan en el remodelado corporal forman parte de un circuito neuronal extenso, comunicando la señal dependiente de Ecdisona proveniente desde tejidos periféricos con las neuronas que transmiten el patrón rítmico de contracciones musculares. Las neuronas *Lgr3+* podrían controlar directamente la actividad de estas neuronas o, alternativamente, modular la liberación de neuropéptidos cuya acción es desencadenar cada una de las etapas del PMP. Esta segunda posibilidad sería semejante a la cascada de péptidos descrita durante el proceso de ecdisis o muda, donde la hormona desencadenante de la ecdisis (ETH) activa neuronas peptidérgicas al asociarse a receptores de ETH (ETHR). Consecuentemente, por activación de ETHR se promueve la síntesis directa de múltiples péptidos, entre ellos la hormona de la eclosión (EH), CCAP (Crustacean cardioactive peptide) y Bursicona, que ejecutan diferentes procesos implicados en la ecdisis (39,40).

De igual forma, es relevante conocer cómo una única señal proveniente desde la periferia (Dilp8) es capaz de producir un comportamiento tan complejo como el PMP. Una posibilidad sería que la activación de *Lgr3* es un evento suficiente para que se ejecute todo el programa motor, similar al fenómeno de ecdisis. Aquí la hormona ETH es suficiente para activar a los receptores ETHR en el sistema nervioso central, desencadenando la producción de péptidos (EH, CCAP, Bursicona, etc.) funcionales al proceso de muda (40). Alternativamente, cada fase secuencial del PMP podría desencadenarse en respuesta a umbrales

incrementales de concentración de Dilp8. En otras palabras, un umbral de Dilp8 puede desbloquear el inicio del PMP (y por ende el desarrollo de la fase preGSB), pero umbrales crecientes serían necesarios para que las fases consecutivas (GSB y postGSB) también sean ejecutadas. Previamente se detectó que la expresión de *dilp8* aumenta a medida que transcurre el PMP, incrementándose su expresión hasta mil veces al finalizar el programa (29). Entonces, procedimos a trabajar con un genotipo (*-/dilp8^{MI00727}*) cuya expresión de *dilp8* se encuentra reducida en un 30%. Contrastando el comportamiento de pupariación de animales *-/dilp8^{MI00727}* con animales salvajes, logramos evaluar si los umbrales crecientes de Dilp8 son necesarios para la continuidad de todas las fases del PMP. Nuestros resultados sugieren que esta última hipótesis es la correcta.

En primera medida vimos que los animales *-/dilp8^{MI00727}* desarrollan todas las fases del PMP. Entonces, procedimos a estudiar las características de las fases del PMP para identificar posibles alteraciones en el PMP. Inicialmente vimos una fase preGSB defectuosa con un mayor número de contracciones, más cortas y dispersas que las de animales salvajes. Esto sugiere que la expresión disminuida de *dilp8* permite que se inicie el PMP, pero los niveles de expresión no son suficientemente altos provocando que las contracciones preGSB sean defectuosas. Además, el tiempo que transcurre entre la última contracción preGSB al inicio de la fase GSB es mayor en animales *-/dilp8^{MI00727}*. Posiblemente, no hay una ejecución de la fase GSB hasta tanto no se alcance un umbral crítico de concentración de *dilp8* y por ello, los animales con expresión disminuida de *dilp8* demoran más tiempo en alcanzar dicho umbral. También, en animales mutantes *-/dilp8^{MI00727}* la fase postGSB presenta contracciones de muy corta duración y no logra desarrollarse por completo. Nuevamente, esto sugiere que la expresión disminuida de *dilp8*, a pesar de ir en incremento, ocasiona que las contracciones de la fase postGSB sean defectuosas. Además, no pudimos diferenciar las fases 1 y 2 postGSB en animales *-/dilp8^{MI00727}*. Sugerimos que la etapa postGSB observada en la mayoría de los mutantes hipomorfos puede representar una fase 1 defectuosa. En este sentido, los niveles de Dilp8 no alcanzarían el umbral necesario para desbloquear la ejecución de la fase 2. Esto nos permite pensar a las fases del PMP como unidades discretas, independientes unas de otras. Es decir, no sería necesario el desarrollo de la fase preGSB para que ocurra la fase GSB, así como esta última no sería necesaria para que se desarrolle el comportamiento postGSB. La progresión en forma secuencial de las diferentes fases del PMP podría estar definida porque cada una de estas requiere un umbral crítico de expresión de *dilp8* diferente. Menores concentraciones de Dilp8 ejecutarían la fase preGSB y luego, siendo la concentración de Dilp8 incremental en el tiempo, se alcanzaría el umbral crítico para el desarrollo de la fase GSB y postGSB.

En definitiva, a pesar de que las fases preGSB, GSB y postGSB se estén ejecutando en animales mutantes hipomorfos *-/dilp8^{MI00727}*, las fases son incompletas, su ejecución puede estar demorada y las contracciones repetitivas son defectuosas. Entonces, para poder entender como Dilp8 puede ejecutar un comportamiento innato ordenado, es verosímil que Dilp8 podría estar actuando como un neuromodulador, modificando la actividad de la red neuronal ejecutante del PMP. Es conocido que los neuromoduladores

pueden estimular la producción de segundos mensajeros uniéndose a receptores de proteína G y cambiar las propiedades intrínsecas de las neuronas (41). En otras palabras, la excitabilidad neuronal u otras propiedades como la fuerza de la sinapsis de las neuronas Lgr3+ ejecutantes del PMP podría estar modulada por Dilp8. Además, se sabe que ciertos patrones rítmicos y comportamientos innatos dependen de la presencia de niveles específicos de un neuromodulador y las variaciones en su concentración pueden alterar en mayor o menor medida dicho patrón o comportamiento (42). En consecuencia, podemos plantear que en animales mutantes *-dilp8^{M100727}* las neuronas Lgr3+ reciben una señal débil de Dilp8, desencadenando que la propagación de sinapsis nerviosas (o la liberación de otros neuromoduladores), a través de la red neuronal ejecutante del PMP, resulten disminuidas.

En conclusión, describimos una red molecular concreta para el desarrollo del PMP: Ecdisona necesaria para la expresión de *dilp8* en la epidermis cuticular de larvas L3 y la consecuente activación de receptores Lgr3 por parte de Dilp8 (proveniente de la epidermis) en un grupo de 6 neuronas (18A01 \cap 48H10) del SNC de la larva. Más aún, en la transición larva-pupa es necesario un incremento de la expresión de *dilp8* para que la red neuronal ejecutante del PMP permita el desarrollo de todas sus fases, con contracciones repetitivas completas y, finalmente, previo a la concreción de la esclerotización cuticular, se realice el remodelado corporal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nicholson, D. Organisms \neq Machines. *Science*, 44, 669-678 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2013.05.014>.
2. Garcia, H. G., Berrocal, A., Kim, Y. J., Martini, G., & Zhao, J. Lighting up the central dogma for predictive developmental biology. *Current topics in developmental biology* 137, 1-35 (2020).
3. Schlitt, T. and Brazma, A. Modelling gene networks at different organisational levels. *FEBS Letters*, 579, 1859-1866 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.073>.
4. Chan, Jia Jia, and Yvonne Tay. Noncoding RNA: RNA regulatory networks in cancer. *International journal of molecular sciences* 19, 1310 (2018).
5. Davidson, E. and Levine, M. Properties of developmental gene regulatory networks. *PNAS* (2008). <https://doi.org/10.1073/pnas.0806007105>.
6. Peter, I. S., & Davidson, E. H. Implications of Developmental Gene Regulatory Networks Inside and Outside Developmental Biology. *Essays on Developmental Biology, Part B*, 237–251 (2016). doi:10.1016/bs.ctdb.2015.12.014.
7. Vea, Isabelle M.; Shingleton, Alexander W. Network-regulated organ allometry: The developmental regulation of morphological scaling. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 10, p. e391 (2021).
8. Davis, M. M., O’Keefe, S. L., Primrose, D. A., & Hodgetts, R. B. A neuropeptide hormone cascade controls the precise onset of post-eclosion cuticular tanning in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 134, 4395–4404 (2007). doi:10.1242/dev.009902
9. Schlitt, T., Brazma, A. Current approaches to gene regulatory network modelling. *BMC Bioinformatics* 8, S9 (2007). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-S6-S9>
10. Ankeny, R.A., Leonelli, S. What's so especial about model organisms? *Science*, 44, 313-323 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.shpsa.2010.11.039>
11. Tata, J. R. Gene expression during metamorphosis: An ideal model for post-embryonic development. *BioEssays*, 15(4), 239–248 (1993). doi:10.1002/bies.950150404
12. Church, R.B. and Robertson, F.W. A biochemical study of the growth of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.*, 162, 337-351 (1966). <https://doi.org/10.1002/jez.1401620309>
13. Tennessen, J.M. and Thummel, C.S. Coordinating Growth and Maturation — Insights from *Drosophila*. *Current Biology*, 21, 750-757 (2011).
14. Robertson, C. W. The metamorphosis of *Drosophila melanogaster*, including an accurately timed account of the principal morphological changes. *Journal of Morphology*, 59, 351–399 (1936). doi:10.1002/jmor.1050590207
15. Thummel, C.S. Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila*. *Dev. Cell*, 1, 453-465 (2001).

16. Riddiford, L.M. Hormones and *Drosophila* Development. In *The Development of Drosophila melanogaster*, M. Bate and A. Martinez-Arias, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 899–939 (1993).
17. Denlinger, D. L. & Zdarek, J. Metamorphosis behavior of flies. *Annu. Rev. Entomol.* 39, 243–266 (1994).
18. Nilssen, A.C. Pupal biology and metamorphosis behavior. In: Colwell, H., Scholl, P.J. (Eds.), *The Oestrid Flies: Biology, Host–Parasite Relationships, Impact and Management*, CAB International Oxford, 124–139 (2006).
19. Chyb, S. and Gompel, N. *Atlas of Drosophila Morphology. Wild-type and classical mutants.* Academic Press (2013).
20. Sokolowski, M.B, Kent, C. and Wong, J. *Drosophila* larval foraging behaviour: developmental stages. *Anim. Behav.*, 32, 645-651 (1984).
21. Fraenkel, G. & Brookes, V. J. The process by which the puparia of many species of flies become fixed to a substrate. *Bio. Bull.* 105, 442–449 (1953).
22. Biyasheva, A., Do, T. V., Lu, Y., Vaskova, M. & Andres, A. J. Glue secretion in the *Drosophila* salivary gland: a model for steroid-regulated exocytosis. *DevBiol.* 231, 234–251 (2001)
23. Warren, J. T., Yerushalmi, Y., Shimell, M. J., O'Connor, M.B., Restifo, L.L and Gilbert, L.I. Discrete Pulses of Molting Hormone, 20-Hydroxyecdysone, During Late Larval Development of *Drosophila melanogaster*: Correlations with Changes in Gene Activity. *Dev. Dyn.*, 235, 315-326 (2006).
24. Benova-Liszekova, D., Beño, M., & Farkas, R. Fine infrastructure of released and solidified *Drosophila* larval salivary secretory glue and salivary gland ducts using SEM. *Bioinspiration & Biomimetics* (2019). doi:10.1088/1748-3190/ab2b2b
25. Berreur, P. & Fraenkel, G. Puparium formation in flies: contraction to puparium induced by ecdysone. *Science* 164, 1182–1183 (1969).
26. Henrich, V.C., Rybczynski, R., and Gilbert, L.I. Peptide hormones, steroid hormones, and puffs: mechanisms and models in insect development. *Vitam. Horm.*, 55, 73-125 (1999).
27. Zdarek, J., & Fraenkel, G. The mechanism of puparium formation in flies. *Journal of Experimental Zoology*, 179, 315–323 (1972). doi:10.1002/jez.1401790304
28. Zdarek, J., & Fraenkel, G. Correlated effects of ecdysone and neurosecretion in puparium formation (pupariation) of flies. *PNAS*, 64, 565-572 (1969).
29. Heredia, F., Volonté, Y., Pereirinha, J. *et al.* The steroid-hormone ecdysone coordinates parallel pupariation neuromotor and morphogenetic subprograms via epidermis-to-neuron Dilp8-Lgr3 signal induction. *Nat Commun* 12, 3328 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23218-5>.

30. Garelli, A., Gontijo, A. M., Miguela, V., Caparros, E. & Dominguez, M. Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Science* 336, 579–582 (2012).
31. Garelli, A. et al. Dilp8 requires the neuronal relaxin receptor Lgr3 to couple growth to developmental timing. *Nat. Commun.* **29**, 8732 (2015). <https://doi.org/10.1038/ncomms9732>
32. Colombani, J., et al. *Drosophila* Lgr3 couples organ growth with maturation and ensures developmental stability. *Curr. Biol.* **25**, 2723–2729 (2015).
33. Vallejo, D.M., Juarez-Carreno, S., Bolivar, J., Morante, J., Dominguez, M. A brain circuit that synchronizes growth and maturation revealed through Dilp8 binding to Lgr3. *Science* 350 (2015). doi:10.1126/science.aac6767.
34. Van Hiel, M.B., Vandersmissen, H.P., Proost, P., Vanden Broeck, J. Cloning, constitutive activity and expression profiling of two receptors related to relaxin receptors in *Drosophila melanogaster*. *Peptides* 68, 83–90 (2015).
35. Colombani, J., Andersen, D.S. and Leopold, P. Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science* 336, 582–585 (2012).
36. Gontijo, A. M. & Garelli, A. The biology and evolution of the Dilp8-Lgr3 pathway: A relaxin-like pathway coupling tissue growth and developmental timing control. *Mech. Dev.* 154, 44–50 (2018).
37. Kashio, S., et al. Tissue nonautonomous effects of fat body methionine metabolism on imaginal disc repair in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 1835–1840 (2016).
38. Su, C. Y. & Wang, J. W. Modulation of neural circuits: how stimulus context shapes innate behavior in *Drosophila*. *Current opinion in neurobiology* 29, 9-16 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.04.008>
39. Park, J.H., Park, Y., Filippov, V., Gill, SS and Adams, ME. Deletion of the ecdysis-triggering hormone gene leads to lethal ecdysis deficiency. *Development* 129, 493-503 (2002).
40. Kim, Y. J., Žitňan, D., Galizia, C. G., Cho, K. H., & Adams, M. E. A command chemical triggers an innate behavior by sequential activation of multiple peptidergic ensembles. *Current Biology*, 16, 1395-1407 (2006).
41. Marder, E. Neuromodulation of neuronal circuits: back to the future. *Neuron* 76, 1-11. doi:10.1016/j.neuron.2012.09.010
42. Taghert, P. H., & Nitabach, M. N. Peptide neuromodulation in invertebrate model systems. *Neuron*, 76, 82-97 (2012).