

Universidad Autónoma de Madrid  
Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares  
Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias



**Estudio de los mecanismos que  
regulan el desarrollo del abdomen  
posterior y la asimetría en el aparato  
reproductor del macho de *Drosophila  
melanogaster*.**

**Tesis Doctoral**  
**Nuria Prieto Hueso**  
Madrid, 2018

Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias  
**Universidad Autónoma de Madrid**

**Estudio de los mecanismos que regulan el desarrollo del abdomen posterior y la asimetría en el aparato reproductor del macho de *Drosophila melanogaster*.**



**Nuria Prieto Hueso**  
Licenciada en Biología

**Dr. Ernesto Sánchez-Herrero Arbide**  
Director de Tesis

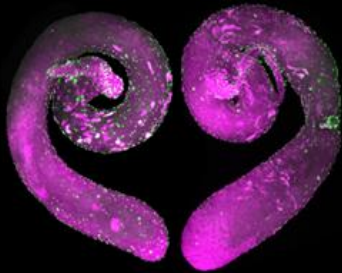
Madrid, 2018  
Trabajo realizado en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa

**“Si Alicia hubiera mirado a través de un microscopio,  
habría encontrado muchas más maravillas”.**

**-Anónimo**

**“Con las herramientas y el conocimiento, podría convertir  
un huevo de caracol en desarrollo en un elefante.  
No se trata tanto de productos químicos, pues los  
caracoles y los elefantes no difieren demasiado.  
Es una cuestión de sincronizar la acción de los genes”.**

**-Barbara McClintock**



# A mi padre

**“Cada hombre llega a un campo cada vez más refinado  
de conocimiento en el cual debe ser experto  
para poder competir con otras personas.  
El especialista sabe más y más sobre menos y menos;  
finalmente, lo sabe todo acerca de nada”.**

**-Konrad Lorentz**

# **Índice de Contenidos**

■ <b>Resumen/Summary</b> .....	<b>1</b>
--------------------------------	----------

■ <b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>7</b>
--------------------------------------	----------

■ <b>Introducción</b> .....	<b>11</b>
-----------------------------	-----------

I.1. ¿Cómo se hace un ser vivo? .....	13
I.2. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo .....	14
I.3. Anatomía de <i>D. melanogaster</i> : discos imaginales e histoblastos.....	14
I.4. Genes Hox .....	16
I.5. Dimorfismo sexual: determinación del sexo y gen <i>doublesex</i> .....	18
I.6. Formación del abdomen posterior y extrusión del A7 en machos .....	20
I.7. Tendencia evolutiva a la reducción abdominal: <i>doublesex</i> en otras especies.....	24
I.8. Asimetría en el reino animal y en <i>Drosophila</i> : el gen <i>MyoID</i> .....	26
I.8.1. La rotación de la placa genital en el macho .....	27
I.8.2. Asimetría en la espiralización de los testículos .....	29

■ <b>Objetivos</b> .....	<b>33</b>
--------------------------	-----------

■ <b>Materiales y métodos</b> .....	<b>37</b>
-------------------------------------	-----------

M.1. Líneas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	39
M.1.1. Estirpes mutantes y construcciones .....	39
M.1.1.1. Mutantes .....	39
M.1.1.2. Construcciones .....	40
M.1.2. Expresión ectópica de genes.....	40
M.1.2.1. Líneas Gal4 .....	41
M.1.2.2. Líneas UAS .....	43
M.1.2.3. Líneas UAS-RNAi .....	44
M.1.2.4. Líneas LexA y LexO .....	44
M.1.2.5. Otras estirpes .....	44

<b>M.2. Análisis clonal</b> .....	<b>45</b>
M.2.1. Clones en <i>-trans</i> .....	45
M.2.2. Clones en <i>-cis</i> .....	46
<b>M.3. Análisis de linajes celulares</b> .....	<b>46</b>
<b>M.4. Métodos inmunohistoquímicos y montaje para confocal</b> .....	<b>47</b>
<b>M.5. Detección de muerte celular por métodos independientes de caspasas</b> .....	<b>47</b>
M.5.1. Detección de fragmentación de DNA por TUNEL.....	47
M.5.2. Detección de apoptosis con Naranja de Acridina.....	48
<b>M.6. Montaje de pupas para experimentos de <i>live imaging</i></b> .....	<b>48</b>
<b>M.7. Montaje de cutículas de adultos</b> .....	<b>49</b>
<b>M.8. Fenotipo de rotación en genitales y testículos</b> .....	<b>50</b>
<b>M.9. Análisis de fertilidad</b> .....	<b>51</b>
<b>M.10. Requerimiento temporal de MyoID</b> .....	<b>51</b>
<b>M.11. Producción de líneas LexA y Gal80 del gen <i>Eip71CD</i></b> .....	<b>52</b>
<b>M.12. Adquisición y tratamiento de imágenes</b> .....	<b>55</b>
<b>M.13. Mediciones y análisis estadístico</b> .....	<b>55</b>

## **Resultados.....57**

<b>R.1. Estudio de los mecanismos que regulan el desarrollo del abdomen posterior del macho de <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	<b>59</b>
R.1.1. Estudio de la muerte celular en el abdomen posterior del macho .....	60
R.1.1.1. Apoptosis en el abdomen posterior del macho silvestre .....	60
R.1.1.2. Inhibición de la apoptosis en el abdomen posterior del macho .....	62
R.1.2. Implicación de proteínas HLH en la extrusión del segmento A7 del macho.....	65
R.1.3. Requerimiento a nivel autónomo celular del gen <i>Hox Abdominal-B</i> y los genes de determinación sexual en la extrusión del segmento A7.....	66
R.1.3.1. Papel de <i>Abdominal-B</i> en la extrusión celular del segmento A7 .....	66
R.1.3.2. Extrusión de las células del A7 según su sexo .....	69
R.1.4. Requerimiento del estado proliferativo del nido de histoblastos para la extrusión de las CELs en el abdomen terminal y estudio del ciclo celular en el A7 .....	70
R.1.5. Requerimiento de la proteína Miosina II no muscular para la extrusión del A7.....	73
<b>R.2. Estudio funcional de la proteína Doublesex male (<i>Dsx<sup>M</sup></i>) de diferentes especies de Dípteros en el abdomen de <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	<b>75</b>
R.2.1. La expresión de la proteína <i>Dsx<sup>M</sup></i> de otros Dípteros en individuos intersexo de <i>D. melanogaster</i> reduce el tamaño del A7 .....	77

R.2.2. La expresión de la proteína Dsx <sup>M</sup> de otros Dípteros en <i>D. melanogaster</i> , en un fondo mutante para <i>Abd-B</i> , reduce el A7 en machos.....	79
R.2.3. Posible efecto indirecto de las CELs en los fenotipos observados .....	81
<b>R.3. Generación de nuevas líneas para la expresión génica selectiva en las poblaciones celulares del A7 .....</b>	<b>81</b>
<b>R.4. Relación entre la eliminación de segmentos del abdomen y la rotación de la genitalia del macho de <i>Drosophila melanogaster</i> .....</b>	<b>83</b>
R.4.1. La rotación de la placa genital del macho durante la pupación .....	83
R.4.1.1. Estudio de fertilidad según la posición externa de la placa genital.....	83
R.4.1.2. El cambio de sexo del A8 del disco genital provoca fenotipos de rotación en hembras .....	84
R.4.2. Mutaciones que producen un A7 en machos también causan fenotipos de rotación incompleta de la placa genital .....	86
R.4.3. Las CELs del A8 están en contacto con la placa genital al inicio de la rotación .....	89
R.4.4. Disminución en la velocidad de rotación al sobreexpresar la vía EGFR o disminuir los niveles de Emc en el abdomen posterior .....	91
R.4.5. Posibles mecanismos para la correcta interacción entre el abdomen terminal y el disco genital .....	93
R.4.5.1. Niveles de expresión de DE-cadherina.....	93
R.4.5.2. Implicación de la degradación de la Membrana Basal.....	94
R.4.5.3. El retraso en la extrusión de las CELs del A8 impide la correcta rotación genital .....	95
R.4.6. Posible papel de los histoblastos del A7 en la inhibición de la rotación genital.....	97
<b>R.5. Estudio de la asimetría de los testículos de los machos de <i>Drosophila melanogaster</i> .....</b>	<b>99</b>
R.5.1. Desarrollo de los testículos y análisis de fertilidad según la dirección de espiralización .....	99
R.5.2. El músculo es el tejido organizador en la asimetría del testículo.....	101
R.5.3. Posible implicación de los genes Hox <i>abd-A</i> y <i>Abd-B</i> en la asimetría de los testículos .....	105
R.5.4. Posible implicación de la vía de la Polaridad Celular Planar (PCP) .....	108

## **■ Discusión.....III**

<b>D.1. Mecanismos de muerte y delaminación en el A7 .....</b>	<b>113</b>
D.1.1. Apoptosis y requerimiento de la Miosina II no muscular.....	113
D.1.2. Implicación de las proteínas HLH en la extrusión del segmento A7 del macho .....	114
<b>D.2. Células epiteliales larvarias e histoblastos .....</b>	<b>115</b>
<b>D.3. Relación entre la eliminación de segmentos abdominales y la rotación genital del macho ...</b>	<b>117</b>
D.3.1. La rotación de la placa genital desde un punto de vista autónomo de disco .....	117
D.3.2. La rotación de la placa genital desde un punto de vista no autónomo de disco .....	118

D.3.2.1. Implicación de la extrusión de las CELs del A8 en el proceso de la rotación.....	118
D.3.2.2. Posible implicación de la extrusión de los histoblastos en el proceso de rotación .....	122
<b>D.4. Asimetría en los testículos de <i>D. melanogaster</i> .....</b>	<b>123</b>
D.4.1. Requerimiento espacial y temporal de MyoID.....	123
D.4.2. Requerimiento de <i>abd-A</i> y <i>Abd-B</i> en el giro dextral de los testículos .....	124
D.4.3. Implicación de la vía de Polaridad Celular Planar (PCP) .....	125
<b>■ Conclusiones/Conclusions.....</b>	<b>129</b>
<b>■ Bibliografía.....</b>	<b>135</b>
<b>■ Agradecimientos.....</b>	<b>155</b>
<b>■ Anexo 1: Índice y pies de Películas.....</b>	<b>161</b>
<b>■ Anexo 2: Publicaciones.....</b>	<b>167</b>



# **Resumen/Summary**

Para la perpetuación de especies con reproducción sexual es indispensable la correcta formación durante el desarrollo de los órganos sexualmente dimórficos que aseguren la reproducción. En esta Tesis hemos estudiado los mecanismos que determinan procesos morfogenéticos en tres estructuras sexualmente dimórficas en machos de un organismo modelo, *Drosophila melanogaster*: la eliminación del segmento séptimo abdominal (A7), la rotación dextral de la genitalia y la espiralización, también dextral, de los testículos.

El último segmento abdominal (A7) de los machos es eliminado durante la metamorfosis (pupación), bajo el control del gen Hox *Abdominal-B* (*Abd-B*) y la vía de determinación sexual, requiriendo además la actividad del gen *extramacrochaetae* (*emc*), que codifica para una proteína HLH, y la inhibición de la vía EGFR. Hemos ahondado en el estudio de los mecanismos que dan lugar a la extrusión de las células del A7, mostrando los requerimientos de muerte celular, actividad de la Miosina II no muscular, y el papel de otras proteínas HLH como Daughterless y Grainyhead. También hemos estudiado el requerimiento a nivel autónomo celular de *Abd-B* y *doublesex* (*dsx*), gen clave en la determinación sexual, en este proceso, así como el posible papel de este último gen en la regulación de este rasgo dimórfico a lo largo de la evolución de los Dípteros.

Asimismo, hemos investigado mecanismos necesarios para establecer o implementar procesos de asimetría. El aparato reproductor masculino de *Drosophila* desarrolla durante la pupación dos modelos de órganos asimétricos: su genitalia externa sufre una rotación de 360° y sus testículos forman llamativas espirales, desarrollándose ambos procesos siempre en sentido dextral. La rotación de la genitalia ocurre casi simultáneamente a la eliminación del segmento A7 y ambos procesos requieren el gen Hox *Abd-B*. Hemos encontrado que elementos que se requieren para la eliminación del A7 (*Abd-B*, *dsx*, *emc*, la vía EGFR, *wg*) también se necesitan para la correcta rotación genital. La actividad de estos genes se requiere en las células epidérmicas larvarias del segmento A8 para la especificación propia de estas células o bien para su extrusión ordenada, proceso que está asociado al giro correcto de la placa genital. Para este giro se precisa, además, la actividad en las células epiteliales abdominales de metaloproteinasas que degraden la membrana basal. En cuanto al establecimiento de la asimetría en los testículos, hemos determinado que se requiere la actividad de Miosina ID, la proteína determinante de la dirección de giro en todos los procesos asimétricos de *Drosophila* estudiados, en el tejido muscular que rodea el testículo. También hemos determinado que *Abd-B*, *abd-A* y la vía de Polaridad Celular Planar son necesarios para el correcto desarrollo y espiralización dextral de los testículos. Nuestro trabajo ha contribuido a esclarecer los mecanismos de desarrollo de estructuras sexualmente dimórficas en los machos de *D. melanogaster*.

The correct formation of sexually dimorphic organs is essential to ensure reproduction and the preservation of sexually-reproducing species. In this Thesis we have studied the mechanisms that underlie different morphogenetic processes in three male-specific structures of a model organism, *Drosophila melanogaster*: the elimination of the seventh abdominal segment (A7), the dextral rotation of the genitalia and the spiralization, also dextral, of the testicles.

The posterior abdominal segment (A7) is removed in males during metamorphosis under the control of the Hox gene *Abdominal-B* (*Abd-B*) and the sex determination pathway, requiring also the activity of *extramacrochaetae* (*emc*), a gene that codes for a HLH protein, and the inhibition of the EGFR pathway. We have studied the mechanisms that lead to the extrusion of A7 cells, showing the requirement of cell death, non-muscular Myosin II activity, and the role of other HLH proteins such as Daughterless and Grainyhead. We have also analyzed the cell autonomy of *doublesex* (*dsx*), a key gene in sexual determination, and *Abd-B* activity in this process, as well as the possible role of the former gene in the regulation of this dimorphic trait in the evolution of the Diptera.

Additionally, we have investigated the mechanisms that establish or implement asymmetry processes in two organs of the male reproductive system of *Drosophila* during pupation: the external genitalia, which undergo a 360° dextral/clockwise rotation, and the testicles, which form striking spirals in the same direction. Genitalia rotation occurs almost simultaneously with A7 segment elimination and both processes require the Hox gene *Abd-B*. We have found that elements that are required for A7 elimination (*Abd-B*, *dsx*, *emc*, EGFR pathway, *wingless*) are also needed for proper genital rotation. The activity of these genes is required in the larval epidermal cells of the A8 segment for the correct specification of these cells or their ordered extrusion, a process that is associated with the correct rotation of the genital plate. The activity of metalloproteinases in the abdominal epidermal cells, which degrade the basement membrane, is also required for genitalia rotation. Regarding the establishment of testes asymmetry, we have discovered that the activity of Myosin ID, the protein that determines the direction of looping in these asymmetric processes, is required in the muscle tissue surrounding the testicle. We have also established that the Hox genes *Abd-B* and *abdominal-A*, and the Planar Cellular Polarity pathway, are needed for the correct development and dextral spiralization of the testes. Our work has helped to clarify the developmental mechanisms of sexually dimorphic structures in *D. melanogaster* males.

# **Lista de Abreviaturas**

90D, 180D, 270D, 360D	Grados de rotación dextral (D)
90S, 180S, 270S, 360S	Grados de rotación sinistral (S)
a	Compartimento anterior. Generalmente referido a un segmento en concreto
A/P	eje antero-posterior
A7, A8, etc	Segmento abdominal (A) seguido del número correspondiente
<i>abd-A</i>	<i>abdominal-A</i>
<i>Abd-B</i>	<i>Abdominal-B</i>
<i>Act</i> o <i>Act5c</i>	<i>Actina</i>
Ag	<i>Anopheles gambiae</i>
Ao	<i>Anastrepha obliqua</i>
B	<i>Bar</i>
<i>bab</i>	<i>bric a brac</i>
C-BX	complejo Bithorax
<i>cdc2</i>	<i>sinónimo de Cdk1: Kinasa dependiente de ciclina 1</i>
CDG	células del disco genital
CELS	Células Epidérmicas Larvarias
CGSs	Células Gonadales Somáticas
CPs	Células Pigmentarias
<i>CycB</i>	<i>Ciclina B</i>
<i>d</i>	<i>dachs</i>
<i>da</i>	<i>daughterless</i>
<i>De-cad</i>	<i>DE-cadherina</i>
DFP	Después de la formación del pupario
Dm	<i>Drosophila melanogaster (D. melanogaster)</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>Dronc</i>	<i>death regulator Nedd2-like caspase</i>
<i>dsx</i>	<i>doublesex</i>
<i>dsx<sup>F</sup></i>	<i>doublesex female</i> (isoforma de hembra)
<i>dsx<sup>M</sup></i>	<i>doublesex male</i> (isoforma de macho)
e	epitelio
<i>EcR</i>	<i>Receptor de la Ecdisona</i>
EGFR	Vía del factor de crecimiento epidérmico
<i>emc</i>	<i>extramacrochaetae</i>
<i>en</i>	<i>engrailed</i>
<i>esg</i>	<i>escargot</i>
<i>flp</i>	<i>flipasa</i>
FRT	"Flipase Recombination Target"
<i>ft</i>	<i>fat</i>
<i>fw</i>	<i>furrowed</i>
<i>fz</i>	<i>frizzled</i>
G/g	genitalia
GAD	dominio de activación de Gal4
<i>gce</i>	<i>germ cell-expressed bHLH-PAS</i>
GFP	"Green Fluorescent Protein"/Proteína Fluorescente Verde
<i>grh</i>	<i>grainyhead</i>
h	histoblastos
<i>hh</i>	<i>hedgehog</i>
<i>hid</i>	<i>head involution defective</i>

HLH	proteína Hélice-Bucle-Hélice. Con su variante básica (bHLH)
hs	promotor del gen <i>heat-shock</i>
I/D	asimetría izquierda-derecha
<i>iab-7</i>	<i>infra-abdominal-7</i>
JNK	vía de la quinasa N-terminal c-jun
Larva III	Larva de tercer estadio
m	músculo
Md	<i>Musca domestica</i>
<i>Mmp1</i>	<i>Metaloproteinasa1</i> (Mmps para metaloproteinasas: Mmp1 y Mmp2)
<i>MyoIC</i>	<i>Miosina IC</i>
<i>MyoID</i>	<i>Miosina ID</i>
<i>MyoII</i>	<i>Miosina II no muscular</i>
NA	Naranja de Acridina
nds	no diferencia significativa
NR	No Rotación
p	Compartimento posterior. Generalmente referido a un segmento en concreto
pCGs	precursores de las células germinales
PCP	vía de la Polaridad Celular Planar
<i>pk</i>	<i>prickle</i>
<i>pnr</i>	<i>pannier</i>
<i>ppl</i>	<i>pumpless</i>
PS	Parasegmento
RFP	"Red Fluorescent Protein"/Proteína Fluorescente Roja
<i>Rho1</i>	<i>rhomboid</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
<i>Rok</i>	<i>Rho Kinasa</i>
<i>rpr</i>	<i>reaper</i>
<i>sage</i>	<i>Salivary gland-expressed bHLH</i>
spi.m	Spitz (ligando vía EGF) anclado a membrana
<i>sqh</i>	<i>spaguetti-squash</i>
<i>Sxl</i>	<i>Sex lethal</i>
te	testículo
<i>Timp</i>	" <i>tissue inhibitor of metalloproteases</i> ". Inhibidor de las metaloproteasas
Topro	To-pro-3
<i>tra</i>	<i>transformer</i>
tsh	teashirt
<i>tub</i>	<i>tubulina</i>
UAS	"Upstream Activating Sequences"
<i>Ubi</i>	<i>Ubiquitina</i>
<i>Vang</i>	<i>Vang Gogh</i>
vd	vas deferens
w	<i>white</i>
wg	<i>wingless</i>
y	<i>yellow</i>
λ-TOP	Torpedo (receptor de la vía EGFR) constitivamente activo
<i>RHG</i>	<i>reaper, hid y grim</i>

# **Introducción**

### I.1. ¿Cómo se hace un ser vivo?

Los más atrevidos contestarán, sin falta de razón, que a través del sexo; o explicado pulcramente: a través de la capacidad de los individuos de autoperpetuarse, es decir, de producir nuevos organismos semejantes a ellos. Este proceso recibe el nombre de reproducción, y es una función necesaria para la supervivencia de las especies, constituyendo por lo tanto una característica crucial de los seres vivos. La reproducción sexual es prácticamente universal entre los eucariotas pluricelulares (aunque algunas especies han evitado tener sexo gracias a otras estrategias como la partenogénesis) (Barton y Charlesworth, 1998), permitiendo la recombinación genética sobre la cual puede actuar la selección natural que determina la evolución de las especies. Los naturalistas observaron hace tiempo la existencia de diferentes morfologías en machos y hembras, lo que se conoce como dimorfismo sexual, que confiere una ventaja selectiva a las especies que la poseen (Andersson, 1994; Williams y Carroll, 2009). Cabe preguntarse entonces: ¿cómo se generan las características para cada sexo durante el desarrollo? (Marin y Baker, 1998), lo que nos devuelve a nuestra pregunta original.

Hasta donde alcanzan las evidencias, podemos afirmar que todos los seres vivos están conformados por células que son copias “inexactas” de una misma célula u organismo ancestral. A lo largo de millones de años de evolución muchos mecanismos de diversificación, como la mutación o la recombinación, han generado la sorprendente variedad de células que conocemos actualmente, tan diferentes y a la vez con características tan conservadas entre sí. De igual manera, todas las células que constituyen un individuo pluricelular provienen, por proliferación, de una sola célula llamada cigoto y tienen exactamente la misma información en su genoma. Sin embargo, cada célula utiliza únicamente una parte de esta información desarrollando formas y funciones muy diferentes, lo que se conoce como diferenciación. La pregunta inicial es por tanto compleja, y la ciencia que se ocupa de intentar darle respuesta es la Biología del Desarrollo. Esta disciplina estudia todos los procesos que tienen lugar desde que se forma el cigoto hasta que este desarrolla un individuo adulto que cierre el ciclo a través de la formación de gametos fértiles y de la reproducción sexual.

Sorprendentemente, aunque la vida se manifieste de maneras tan variadas, todos los organismos se construyen en base a mecanismos y genomas muy conservados (Carroll et al., 2001), lo que permite comparar los resultados obtenidos en diferentes especies. Gracias a ello, la Biología del desarrollo se vale del empleo de animales modelo, que serán elegidos como objeto de estudio para después extrapolar los resultados al conjunto de los animales.



## 1.2. *Drosophila melanogaster* como modelo

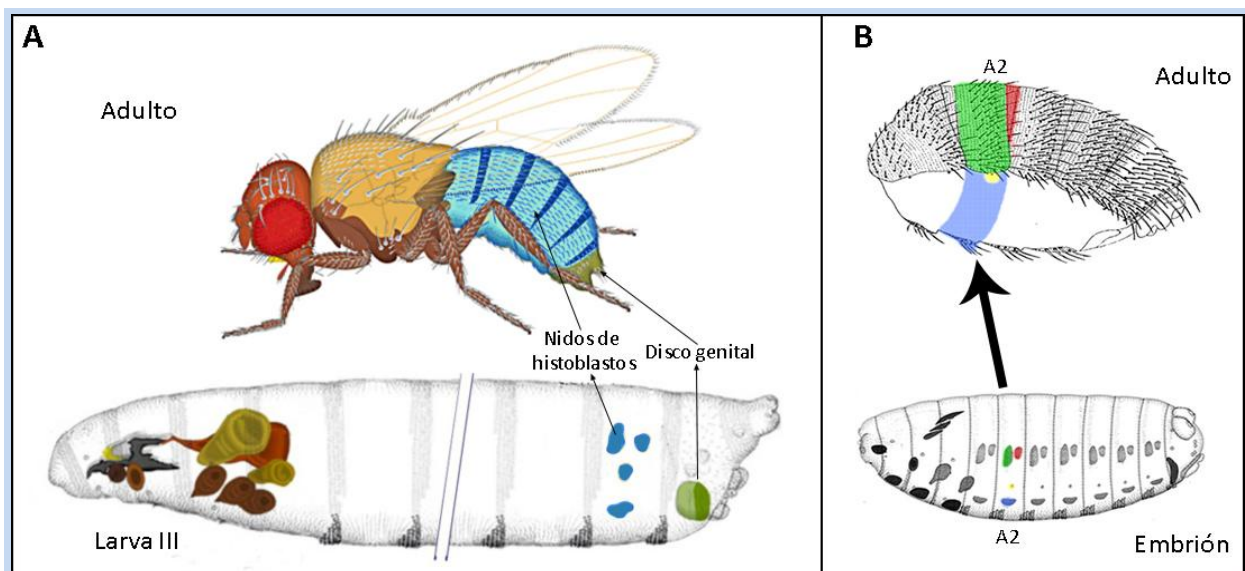
En este trabajo utilizamos como sistema modelo la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*). Desde que este díptero fue descrito en 1830, ha sido tal vez el organismo modelo más estudiado en biología del desarrollo por sus ventajas ampliamente descritas en la bibliografía (revisado en Hales et al., 2015), entre las que destacan: su pequeño tamaño (y por tanto facilidad y bajo coste de su cría en cautividad), genética sencilla y DNA completamente secuenciado, gran cantidad de herramientas genéticas y moleculares (como los cromosomas balanceadores o el sistema Gal4/UAS), y abundante descendencia, con un rápido ciclo vital (unos 10 días a 25°C). Como insecto holometábolo, sufre una metamorfosis completa durante el desarrollo. Después de la fecundación, la embriogénesis es seguida de tres estadios larvarios, tras los cuales se forma la pupa (unos 5 días tras la fecundación), estadio en el que el animal permanece 4-5 días, durante los cuales se produce la metamorfosis y el reemplazamiento de los tejidos larvarios por estructuras del adulto. Todos los procesos estudiados en esta Tesis tienen lugar durante la fase de pupa.

## 1.3. Anatomía de *D. melanogaster*: discos imaginales e histoblastos

El cuerpo del adulto se organiza en un tagma cefálico (seis segmentos), uno torácico (tres segmentos) y uno abdominal (once segmentos, aunque el último se fusiona con el anterior y se observan diez, que se nombrarán en adelante con la letra A y el número de segmento correspondiente), siendo los dos primeros tagmas apendiculados (Ferris, 1950; Jürgens, 1987; Matsuda, 1976). Los segmentos se definen en la fase embrionaria gracias a una cascada génica que activará determinados genes a lo largo del eje antero-posterior (A/P). Están formados por dos poblaciones celulares de linajes separados, denominados compartimentos, y que definen un compartimento anterior y uno posterior (referenciados en el texto por "a" o "p" después del número de segmento, respectivamente) (García-Bellido et al., 1973), este último caracterizado por la expresión de genes como *engrailed* o *hedgehog* (Ingham, 1988).

Todas las estructuras externas del adulto provienen de precursores imaginales determinados ya en el embrión. Estos precursores son de dos tipos: Los que formarán la cabeza y tórax (y sus apéndices), la genitalia (externa e interna) y la analia, están organizados en unidades epiteliales discretas disociadas de la epidermis denominadas "discos imaginales". Los que darán lugar al abdomen están organizados en los llamados "nidos de histoblastos", que permanecerán quiescentes hasta la pupación, fase en la cual se produce su explosión proliferativa y sustituirán a las células epidérmicas larvarias (CELs) (Madhavan y Madhavan, 1980; Ninov et al., 2007), como se explica más adelante. A diferencia de los histoblastos (h), los discos imaginales proliferan fundamentalmente durante las etapas larvarias y diferencian durante la pupación (Cohen, 1993). Tanto los discos imaginales como los histoblastos son particulares para cada segmento y son responsables de la formación de estructuras concretas (Fig. I1A).

El disco genital, estudiado en el presente trabajo, es el más posterior y el único impar, y se origina a partir de la fusión de primordios independientes de los segmentos A8, A9 y A10 (Jürgens y Hartenstein, 1993). A pesar de que su origen es similar en ambos sexos, presenta un fuerte dimorfismo sexual debido a su determinación por el gen de especificación sexual *doublesex* (véase apartado I.5.), estando en machos más desarrollado el A9 que el A8, al contrario de lo que se observa en hembras. En machos, que son el actual objeto de estudio, el A8 dará lugar en el adulto a un terguito octavo no esclerotizado, el A9 a la genitalia interna (a excepción de las gónadas) y externa, y el A10 a la analia y parte final del intestino (Christiansen et al., 2002; Estrada et al., 2003; Keisman et al., 2001; Nöthiger et al., 1977; Sánchez y Guerrero, 2001). En esta Tesis se estudia tanto la rotación que sufre este disco en el macho, desarrollando un órgano asimétrico, como su implicación en el desarrollo de la asimetría de los testículos (véanse apartados I.8.1. y I.8.2.).



**Figura I 1. Discos imaginales y nidos de histoblastos de *D. melanogaster*.** (A) Se muestran los discos imaginales en estadio larvario (parte inferior de la Figura) y las estructuras a las que darán lugar en el adulto (parte superior) del mismo color. Se ha resaltado el disco genital (verde, parte posterior) que dará lugar a la genitalia y analia adultas. Se esquematizan a modo de ejemplo los cuatro nidos de histoblastos de un hemisegmento del abdomen (azul). (B) Esquema del embrión (parte inferior de la Figura) y el abdomen adulto (parte superior). Se definen en el embrión cuatro nidos de histoblastos por hemisegmento (ocho por segmento); durante la metamorfosis los nidos de histoblastos se desarrollan para formar las diferentes estructuras que componen la epidermis del abdomen del individuo adulto: el nido anterior dorsal dará lugar al terguito (verde), el posterior dorsal a la membrana intersegmental y parte anterior del segmento posterior (rojo), el nido espiracular al espiráculo (amarillo), y el nido ventral a la pleura y esternito (azul). El segundo segmento abdominal (A2) viene resaltado pero esto ocurre desde el segmento A1 al A7 (modificado de Hartenstein, 1993; Ninov et al., 2007).

Respecto al abdomen, se observan ocho nidos de histoblastos por cada segmento, con estos cuatro grupos por hemisegmento: dos dorsales (uno anterior que dará lugar al terguito, la pieza cuticular dorsal del abdomen, y uno posterior, que dará lugar a la membrana intersegmental y la parte más anterior del segmento siguiente), uno ventral (que dará lugar al esternito y la pleura), y uno espiracular (que dará lugar al espiráculo) (Fig. I1B) (véase apartado I.6.). Estos grupos de células diploides se encuentran durante las fases larvarias integrados en la epidermis, rodeados por las CELs (células poliploides), y están

formados por entre 3 y 16 células (según el nido) (Kopp et al., 1999; Madhavan y Madhavan, 1980; Madhavan y Schneiderman, 1977; Ninov et al., 2007). Estas células, llamadas histoblastos, se encuentran detenidas, durante el periodo larvario, en la fase G2 del ciclo celular (Madhavan y Schneiderman, 1977). Durante la metamorfosis proliferan activamente, a la vez que se produce la eliminación de las CELs, de forma que reemplazan por completo a la epidermis larvaria. Los nidos de cada segmento se fusionan finalmente para, tras la diferenciación, formar la cutícula abdominal del adulto (Fig. 11) (Madhavan y Madhavan, 1980; Madhavan y Schneiderman, 1977; Ninov et al., 2007, 2009). Este reemplazamiento de CELs por histoblastos ocurre en todos los segmentos desde el A1 al A7 tanto en machos como en hembras, independientemente de que el A7 en machos sufra una posterior extrusión (Foronda et al., 2012, 2015; Ninov et al., 2007; Wang et al., 2011; Wang y Yoder, 2012) como se detalla en el apartado correspondiente.

Los discos imaginales han sido, y continúan siendo, un modelo experimental de gran utilidad para el estudio de los principales problemas en biología. Por su parte, la epidermis del abdomen presenta una ventaja: el desarrollo de este tejido y la expresión génica pueden visualizarse mediante experimentos de imagen *in vivo* que no requieren de la manipulación y fijación de tejido necesarios en el análisis de los discos imaginales. Esta ventaja también se aplica al estudio de la genitalia externa pupal, y será aprovechada en ambos tejidos en la presente Tesis. Por ello, el abdomen ha adquirido relevancia recientemente en análisis de proliferación, apoptosis o competición celular (Bischoff, 2012; Bischoff y Cseresnyes, 2009; Nakajima et al., 2011; Teng et al., 2017; Verma y Cohen, 2015).

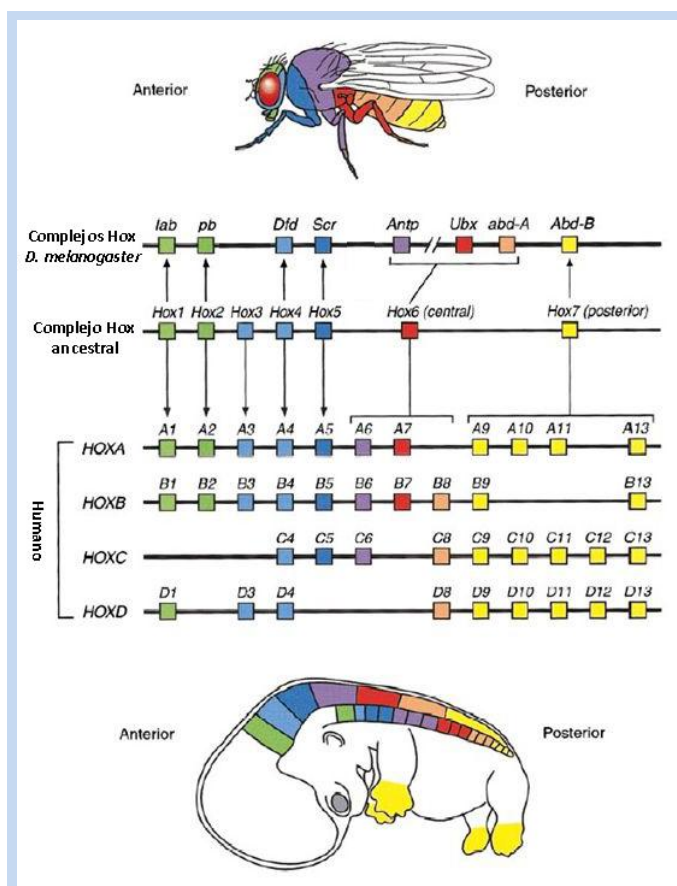
### I.4. Genes Hox

Como se ha explicado, *D. melanogaster* presenta el cuerpo dividido en segmentos. Los genes *Hox* son un grupo de genes que dan identidad a estas regiones del eje A/P en todos los organismos bilaterales (Akam, 1998). Cabe indicar que, en realidad, las unidades básicas metaméricas de funcionalidad genética en *Drosophila* son los parasegmentos (PS), conformados por la parte posterior de un segmento y la anterior del siguiente (Martinez-Arias y Lawrence, 1985). Así, los bordes de expresión de los genes *Hox* (al menos los que se estudian en esta Tesis) se ajustan a los PS, a pesar de que, por simplificar, en el texto se referencien los segmentos ya que se reconocen más fácilmente en el adulto.

Mutaciones en estos genes provocan transformaciones de unas estructuras en otras (por su función en la adquisición de identidad parasegmental), o eliminación de estructuras (indicando que también poseen funciones morfogenéticas) (Hombría y Lovegrove, 2003; Mallo et al., 2010).

En *Drosophila melanogaster* los genes *Hox* presentan varias particularidades, entre las que cabe destacar:

- 1) Se agrupan en dos “complejos génicos”: el complejo Antennapedia que engloba los genes *labial*, *proboscipedia*, *Deformed*, *Sex combs reduced* y *Antennapedia*; y el complejo Bithorax (C-BX) que incluye a *Ultrabithorax*, *abdominal-A (abd-A)* y *Abdominal-B (Abd-B)* (Kaufman et al., 1990; Lewis, 1978; Sánchez-Herrero et al., 1985; Tiong et al., 1985). La agrupación en complejos génicos está conservada evolutivamente, con pocas excepciones (Duboule, 2007; Negre et al., 2005).
- 2) Presentan “colinearidad”: sorprendentemente, el orden de los genes *Hox* en el cromosoma se corresponde con los dominios de expresión que abarcan dichos genes a lo largo del eje A/P del organismo (Lewis, 1978; Tschopp y Duboule, 2011) (Fig. I2). En vertebrados se ha descrito, además de esta colinearidad espacial, una colinearidad temporal y una colinearidad espacial de dos complejos Hox en el eje secundario (apéndices) (Dollé et al., 1989; Duboule, 1994; Kmita y Duboule, 2003; Tschopp y Duboule, 2011).



**Figura I2. Conservación y colinearidad de los genes Hox.** Se muestra un esquema de los genes que conforman los complejos Hox en *D. melanogaster*, el hombre, y en un hipotético ancestro de ambos, así como su patrón de expresión en el eje A/P. Se representan de igual color los genes homólogos/ortólogos (dentro del hombre/entre especies). Nótese como el orden relativo de los genes dentro de los complejos coincide con el de sus expresiones en el eje corporal y también como este orden se ha conservado evolutivamente (modificado de Veraksa et al., 2000).

- 3) Presentan una secuencia muy conservada a nivel evolutivo (homeobox), de 180 nucleótidos (McGinnis et al., 1984; Scott y Weiner, 1984), que codifica para un dominio proteico (homeodominio) a través del cual las proteínas Hox se unen al DNA y ejercen su función como factores de transcripción, activando o reprimiendo un gran número de genes implicados en diversos procesos del desarrollo, tales como la proliferación, diferenciación o muerte celulares.

- 4) Prevalencia posterior: Cada gen Hox está regulado transcripcionalmente (negativamente) por aquellos cuyos patrones son posteriores al suyo en el eje A/P, lo que se conoce como “jerarquía transcripcional” (Hafen et al., 1984; Struhl y White, 1985), dándose además esta jerarquía entre las proteínas codificadas por ellos, lo que se conoce como “supresión fenotípica”. Este fenómeno podría deberse a una inactivación selectiva de unos productos por otros o a la competición de las proteínas Hox por las secuencias activadoras de sus genes diana (Duboule, 1991; Duboule y Morata, 1994; González-Reyes et al., 1990; González-Reyes y Morata, 1990).

En esta Tesis se han estudiado los genes del C-BX *abd-A* y *Abd-B*. Ambos son necesarios para la especificación del disco genital, junto con el gen *caudal* (A10) (Estrada et al., 2003; Freeland y Kuhn, 1996).

En el abdomen, *abd-A* y *Abd-B* se expresan tanto en los histoblastos como en las CELs. En *Drosophila*, el gen *Hox abd-A* da identidad a los segmentos A2-A4, aunque se expresa también en segmentos posteriores, donde coopera con *Abd-B* (Sánchez-Herrero et al., 1985; Tiong et al., 1985). El gen *Abd-B* se expresa y requiere en los segmentos A5-A9 (Sánchez-Herrero et al., 1985; Tiong et al., 1985), incrementando su expresión hacia los segmentos posteriores. Por tanto, y en relación al trabajo de esta Tesis, su expresión es mayor en el A7 que en el A6 (Celniker et al., 1989; Foronda et al., 2012; Kopp et al., 2000; Kopp y Duncan, 2002; Wang y Yoder, 2012), y esta mayor expresión reduce, a su vez, la de *abd-A* (Karch et al., 1990; Macías et al., 1990; Singh y Mishra, 2014). La falta de función de *Abd-B* en el abdomen provoca la transformación de los segmentos A5-A8 hacia anterior (A4) (Sánchez-Herrero et al., 1985; Tiong et al., 1985). Diferentes transcritos del gen *Abd-B* dan lugar a dos isoformas proteicas: la isoforma M que se expresa y requiere del A5 al A8 (abdomen y disco genital) y la R que se expresa y requiere en el A9 (disco genital) (Casanova et al., 1986; Foronda et al., 2006). Este gen Hox determina, por tanto, el desarrollo del abdomen posterior y la genitalia, junto con los genes de determinación sexual, como se explica a continuación. Tanto *abd-A* como *Abd-B* son necesarios para el correcto desarrollo de las gónadas (Boyle y DiNardo, 1995; Camara et al., 2008; DeFalco et al., 2004; 2008) (véase apartado I.8.2.).

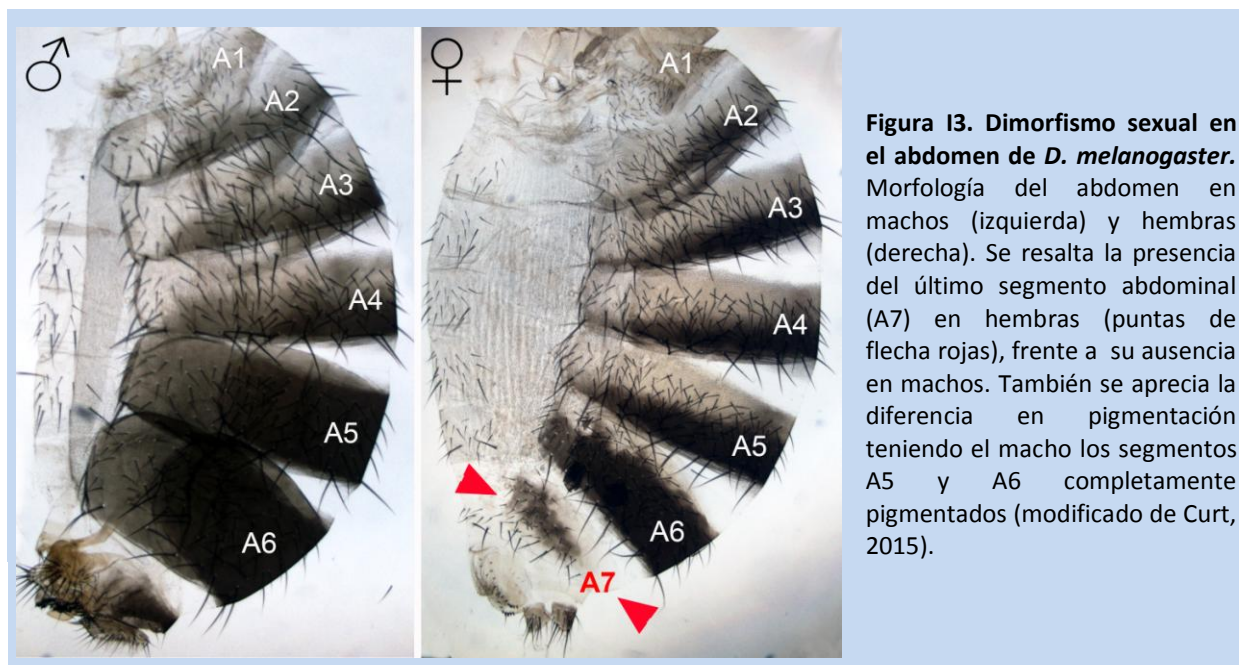
### I.5. Dimorfismo sexual: determinación del sexo y gen *doublesex*

La variedad de mecanismos de determinación sexual que aparecen durante la evolución es muy grande. Sin embargo, podemos extraer un principio común a la mayoría de los dípteros: una señal primaria, genética o ambiental, diferente en machos y hembras, lleva a la expresión diferencial de un gen clave que a través de una cascada de genes reguladores subordinados transforma la señal en un fenotipo sexual concreto (Saccone et al., 2002; Sanchez, 2008; Schütt y Nöthiger, 2000; Verhulst y Van de zande, 2015). La señal primaria en *Drosophila* es el ratio entre cromosomas X y autosomas (A), aunque también

se ha propuesto que varios factores de transcripción del cromosoma X determinan el sexo independientemente de este ratio (Erickson y Quintero, 2007). Este conteo cromosómico es llevado a cabo por cada célula somática independientemente y ocurre tempranamente durante la embriogénesis. En hembras, el ratio X:A de 1 activa el gen *Sex lethal (Sxl)*, lo que implementa el programa sexual femenino a través de una cascada basada en procesamientos alternativos de RNAs mensajeros: la actividad de *Sxl* produce la forma activa del gen *transformer (tra)*, que junto con el gen *transformer-2*, activo en ambos sexos, produce un procesamiento específico del gen bifuncional *doublesex (dsx)* hacia una forma específica de hembra, la proteína  $Dsx^F$ . En machos, con una ratio de 0,5, la ausencia de *Sxl* provoca que el transcrito de *dsx* origine, por procesamiento por defecto específico de macho, la proteína  $Dsx^M$  (revisado en Salz, 2011; Salz y Erickson, 2010; Sanchez, 2008).

El gen *dsx* es por tanto clave en este proceso, ya que determina en última instancia el sexo de cada célula (Baker y Ridge, 1980). Los dos productos de *dsx*,  $Dsx^M$  (macho) y  $Dsx^F$  (hembra), son factores de transcripción que controlan la actividad de los genes diana finales necesarios para la diferenciación sexual. Ambos comparten la región N-terminal pero difieren en sus extremos C-terminales (Burtis y Baker, 1989). Es importante remarcar que la forma en la que entendemos la especificación sexual ha sufrido un cambio drástico desde que se descubriera que *dsx* se expresa de forma localizada, y no ubicua (Hempel y Oliver, 2007; Rideout et al., 2010; Robinett et al., 2010). Así, no todas las células del organismo tienen identidad sexual. *dsx* se transcribe a distintos niveles en sus diferentes dominios de expresión. Por ejemplo, en la pupa, *dsx* se expresa en todo el epitelio abdominal, pero aumenta su expresión en el A7 respecto al A6, lo que puede explicarse por el hecho de que *Abd-B* (cuyos niveles de expresión también se incrementan en este segmento) activa a *dsx* en el abdomen posterior (Fig. I4B) (Foronda et al., 2012; Wang y Yoder, 2012).

Entre los rasgos externos de dimorfismo sexual en *D. melanogaster* cabe destacar un mayor tamaño en hembras, una morfología genital claramente distinguible (Fig. I3 y Fig. R16C,D), la presencia en machos del peine sexual en la región más distal del primer par de patas, una pigmentación diferencial del abdomen, estando los segmentos A5 y A6 pigmentados únicamente machos (Fig. I3 y Fig. R10A-B'), y un número de segmentos abdominales distinto: el macho cuenta con 6 segmentos, mientras que la hembra tiene 7 (Fig. I3 y Fig. R1A,B), siendo esta diferencia uno de los principales objetos de estudio en esta Tesis. Cabe mencionar que los niveles de expresión de *Abd-B* en el A7 son idénticos en hembra y machos (Kopp et al., 2000; Wang et al., 2011), por lo que este gen por sí solo no puede ser responsable de las diferencias de tamaño de este segmento entre los dos sexos.



**Figura 13. Dimorfismo sexual en el abdomen de *D. melanogaster*.** Morfología del abdomen en machos (izquierda) y hembras (derecha). Se resalta la presencia del último segmento abdominal (A7) en hembras (puntas de flecha rojas), frente a su ausencia en machos. También se aprecia la diferencia en pigmentación teniendo el macho los segmentos A5 y A6 completamente pigmentados (modificado de Curt, 2015).

Internamente, hembras y machos difieren, entre otros, en el desarrollo del disco genital y las gónadas, que en su conjunto formaran el sistema reproductivo, tal y como se explica más adelante. Los individuos que carecen del *dsx* son conocidos como intersexos y muestran rasgos fenotípicos intermedios entre ambos sexos o características tanto de hembras como de machos (Baker et al., 1991).

### I.6. Formación del abdomen posterior y extrusión del A7 en machos

El abdomen adulto de *Drosophila*, como ya se ha descrito, está formado por unas placas esclerotizadas dorsales que se encuentran pigmentadas en su zona posterior, llamadas terguitos, otras ventrales no pigmentadas, llamadas esternitos, y un epitelio flexible llamado pleura que los comunica lateralmente. En cada hemipleura hay un espiráculo que comunica el sistema traqueal con el medio exterior. Los terguitos adyacentes están conectados entre sí por una membrana flexible transparente, que suele estar replorada, llamada “membrana intersegmental”.

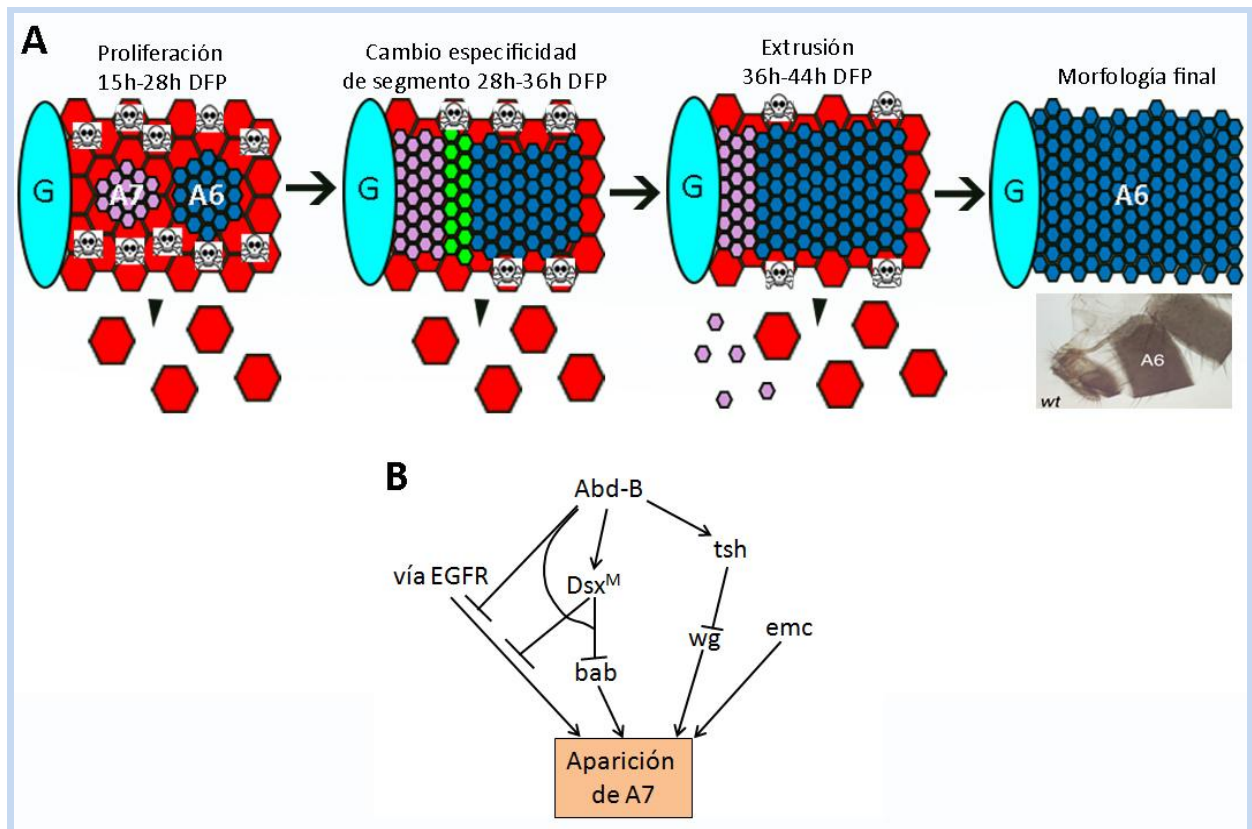
Todas estas estructuras derivan de los ya mencionados histoblastos, células diploides embebidas en la epidermis y rodeadas por las CELs (García-Bellido y Merriam, 1971; Madhavan y Madhavan, 1980; Madhavan y Schneiderman, 1977). La etapa proliferativa postembrionaria de estas células empieza nada más comenzar la pupación (unas 3h después de la formación del pupario o DFP), inducida por un pico en la expresión de *ecdisona* (Ninov et al., 2009). En este momento los histoblastos sufren 3 ciclos sincrónicos de división sin que haya crecimiento celular, por lo que las células son cada vez más pequeñas; a estas primeras divisiones le sigue una segunda ronda de proliferación de divisiones más lentas, asincrónicas y en las cuales el tamaño celular se mantiene estable (Ninov et al., 2007, 2009). Es durante ese periodo cuando los histoblastos se expanden y reemplazan a las CELs, que mueren y sufren

extrusión basal. Aproximadamente a las 40h DFP han desaparecido todas las células larvianas y el epitelio abdominal es un continuo de histoblastos (Fig. I4A) (Madhavan y Madhavan, 1980; Madhavan y Schneiderman, 1977; Ninov et al., 2007). Los dos procesos, extrusión de CELs y proliferación de histoblastos, están funcionalmente relacionados, pero a día de hoy queda aún por dilucidar si es la proliferación de los histoblastos la que se requiere para la muerte de las CELs, o si, a la inversa, es la desaparición de las CELs la que activa la expansión de los histoblastos, existiendo en la bibliografía experimentos que parecen respaldar ambas hipótesis (Madhavan y Madhavan, 1984; Nakajima et al., 2011; Ninov et al., 2007).

Este reemplazamiento celular ocurre durante la pupación en todos los segmentos abdominales de la mosca (del A1 al A7) (Película I1), a pesar de que el A7 esté solo presente en las hembras adultas (y con un tamaño reducido respecto al A6) (Foronda et al., 2012; Ninov et al., 2007). Cabe destacar que el abdomen larvario consta de ocho segmentos, pero sólo los siete anteriores cuentan con nidos de histoblastos y sufren este reemplazamiento (Foronda et al., 2012). Así, el A8 larvario (A8 abdominal; nótese que no debe confundirse lo que llamamos A8 abdominal, las CELs posteriores al A7, con el A8 del disco genital, así definido históricamente, y que formará en el macho adulto una región cuticular mínima) está formado únicamente por CELs y desaparece igualmente durante la pupación, lo que cuestiona las hipótesis que plantean que la proliferación de los histoblastos es necesaria para activar la muerte de las CELs de manera no autónoma celular (Madhavan y Madhavan, 1984; Nakajima et al., 2011; Ninov et al., 2007). Este segmento es muy importante en nuestro estudio, ya que es el que contacta con el disco genital (A8 genital) en estadios pupales, cuando este se fusiona con la epidermis del abdomen en el momento de su rotación.

La expresión de los genes Hox es la responsable de las características específicas de los diferentes segmentos del abdomen, regulando la pigmentación, tamaño y forma de los terguitos y esternitos, así como la presencia de cerdas y tricomas (Gyurkovics et al., 1990; Karch et al., 1985; Kopp y Duncan, 2002; Sánchez-Herrero et al., 1985; Singh y Mishra, 2014; Tiong et al., 1985). En esta Tesis vamos a centrar nuestro estudio en el abdomen posterior (A5-A8), que es sexualmente dimórfico (Fig. I3). Como se acaba de describir, en ambos sexos el segmento A7 se forma durante el desarrollo pupal temprano de la misma forma que los segmentos anteriores (Fig. I4A y Película I1). Sin embargo, hacia las 35h del comienzo de la pupación, y solo en machos, los histoblastos del A7 se extruyen basamente (Fig. I4A y Película I2) (excepto el espiráculo, que se incorpora al A6, y dos sensilas ventrales) bajo el control de *Abd-B* y *dsx*, a través de la regulación de diferentes genes y vías de señalización que controlan este proceso (Fig. I4B) y que vamos a desglosar a continuación (Foronda et al., 2012, 2015):





**Figura I4. Mecanismos para la eliminación del A7 de macho. (A)** Esquema de las diferentes fases pupales en el desarrollo del abdomen posterior de macho (para simplificar se muestran solo los nidos dorsales anterior y posterior, ya fusionados, del A6 y A7). Las CELs se representan por grandes hexágonos rojos y los histoblastos por hexágonos más pequeños azules-verdes (A6) o violetas (A7). El disco genital (G) está a la izquierda de cada dibujo. Las flechas inferiores indican delaminación celular basal. Los histoblastos proliferan y se expanden a la vez que las CELs son eliminadas (representado por calaveras). A las 28h DFP ya se observa un menor número de histoblastos en el A7 que en el A6, probablemente debido a diferencias en la tasa de proliferación. A las 28-36h DFP algunas células anteriores del A7 (verde) comienzan a expresar *engrailed* y se incorporan al A6p, lo que ayuda a reducir el tamaño del A7 (Wang et al., 2011). Aproximadamente a las 36h DFP los histoblastos del A7 que persisten se extruyen, permitiendo el contacto entre la genitalia y el A6, aproximadamente a las 42h DFP, como se observará en el adulto. **(B)** Esquema simplificado de las interacciones que regulan la morfogénesis del A7 del macho, bajo el control del gen Hox *Abd-B* (modificado de Foronda et al., 2015).

- 1) Menor ritmo de división: Al comienzo de la pupación, el tamaño de los nidos de histoblastos del A7 es semejante al de los otros segmentos (Madhavan y Schneiderman, 1977). Entre las 22-26h DFP el número de células en mitosis se reduce drásticamente en los machos, aunque también en las hembras (Wang et al., 2011), y en consecuencia, pocas horas después los nidos de histoblastos dorsales del A7 tienen menos células que los del A6 (Foronda et al., 2015). Cuando se fuerza la proliferación de los histoblastos de este segmento, activando la vía del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), aparece un A7 en el macho (Fig. I4B) (Foronda et al., 2012). La inhibición por *Abd-B* de la vía EGFR en el A7 ocurre tanto en machos como en hembras (aunque más débilmente) (Foronda et al., 2012), por lo que no puede ser el responsable total de la diferencia de desarrollo del A7 que se observa entre ambos sexos.

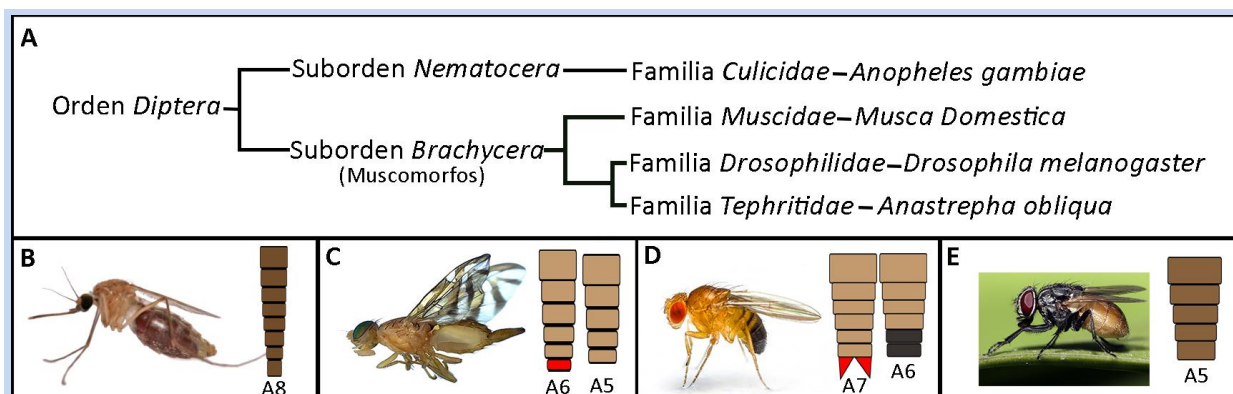
- 2) Transformación segmental: Algunas células del A7a, más próximas al A6p, ganan la expresión de En sufriendo una transformación compartimental y pasando a formar parte del A6p (Wang et al., 2011). De esta forma este mecanismo contribuye a reducir el tamaño del A7 (Fig. I4A).
- 3) Apoptosis: la apoptosis tiene un papel importante en la morfogénesis del abdomen, siendo necesaria para la correcta eliminación de las CELs (Ninov et al., 2007). Sin embargo, su bloqueo en el A7 de los machos no produce la aparición de un A7 en el adulto (Foronda et al., 2012; Wang et al., 2011). A pesar de ello, alrededor del espiráculo del A7 de ambos sexos hay mayores niveles de apoptosis que en el resto de segmentos abdominales, y algunos resultados sugieren un posible efecto de la apoptosis en la correcta eliminación de este segmento (Wang et al., 2011). El análisis detallado de la apoptosis en este segmento con nuevas técnicas será un punto importante en el desarrollo de esta Tesis.
- 4) Extrusión de los histoblastos: Alrededor de las 35-44h DFP, las células del A7 que persisten se eliminan por extrusión, y varios genes parecen tener una función en este proceso. El gen *wingless* (*wg*) se expresa en los nidos de histoblastos anteriores de todos los segmentos, salvo en el A7 de machos, donde se encuentra reprimido por *Abd-B* y *Dsx<sup>M</sup>* (Wang et al., 2011). Esta represión podría ser necesaria para la eliminación del segmento, ya que la expresión ectópica de *wg* en el mismo produce un pequeño A7 (Foronda et al., 2012, 2015; Singh y Mishra, 2014; Wang et al., 2011). El gen *bric a brac* (*bab*), además de ser el principal regulador de la pigmentación dimórfica del abdomen terminal (Fig. I3), debe estar reprimido para que se produzca la eliminación del A7 en machos (Kopp et al. 2000). Otro factor de transcripción que interviene en la extrusión es *teashirt* (*tsh*), un gen que se expresa con más intensidad en el A7 de ambos sexos que en los segmentos anteriores, y cuya activación se requiere para la completa eliminación del A7 en machos (Wang et al., 2013). El gen *extramacrochaetae* (*emc*), codifica para una proteína HLH que ha perdido su dominio de unión a DNA y por tanto realiza su función a través de su dominio de dimerización, secuestrando otras proteínas HLH, e impidiendo así que estas actúen como factores de transcripción (Campuzano, 2001; Ellis et al., 1990; Garrell y Modolell, 1990). La activación de *emc* es necesaria para la correcta eliminación del A7 (Fig. I4B) (Foronda et al., 2012). Por último, la Miosina II no muscular (*MyoII*) es necesaria para la constricción apical y delaminación celular (An et al., 2017; Burgess, 1982; Martin et al., 2009; Martin y Goldstein, 2014; Mason et al., 2013; Munjal et al., 2015). Si bien variaciones en la expresión de estos genes (vía EGFR, *wg*, *bab*, *tsh*, *emc*) producen la formación de un pequeño A7, la implicación de algunos de ellos en la extrusión celular no está determinada.

*Abd-B* afecta todos estos procesos morfogénéticos, los cuales pueden explicar el peculiar desarrollo del segmento A7 en machos y hembras. Dado que a día de hoy muchas preguntas quedan por responder

acerca de cómo realmente ocurre esta extrusión, esta Tesis se propone ahondar en los mecanismos que desencadenan la desaparición de las CELs e histoblastos de este segmento durante la pupación. Algunos de estos mecanismos afectan a otro proceso morfogénico, la rotación de la genitalia del macho, y que es objetivo de estudio también en esta Tesis.

### I.7. Tendencia evolutiva a la reducción abdominal: *doublesex* en otras especies

Una de las tendencias evolutivas más característica de los Insectos, muy acentuada en los Dípteros, es la reducción de los segmentos abdominales posteriores según avanzamos a lo largo del árbol filogenético. Además, el abdomen posterior es frecuentemente dimórfico en los Dípteros “superiores” (nomenclatura correspondiente generalmente al Suborden *Brachycera* y el Infraorden *Cyclorrapha*, y referidos en adelante como tal), estando los segmentos posteriores reducidos o modificados, dando lugar al ovopositor en la hembra, y frecuentemente ausentes en el macho (Matsuda, 1976; McAlpine et al., 1981). En los Dípteros “inferiores” (correspondiente al Suborden *Nematocera*) este dimorfismo sexual tan acusado es muy infrecuente, y ambos sexos generan ocho segmentos esclerotizados (Yoder y Carroll, 2006).



**Figura 15. Reducción en el número de segmentos abdominales de los Dípteros.** (A) Filogenia resumida para representar las cuatro especies que se utilizan en esta Tesis. Los Dípteros se subdividen en los Subordenes *Nematocera* y *Brachycera*. La filogenia de los Dípteros es aún motivo de controversia y algunos autores consideran a los *Cyclorrapha* (Dípteros “superiores”) como un Suborden independiente. En este caso se han incluido como un Infraorden dentro del Suborden *Brachycera*. (B) El único representante del Suborden *Nematocera* utilizado es el mosquito *Anopheles gambiae*. Es la especie con mayor número de segmentos: ocho tanto en hembras como en machos (♀-8; ♂-8). (C) El Tefritido *Anastrepha obliqua* cuenta con cinco segmentos en los machos y seis en las hembras (♀-6; ♂-5). (D) *Drosophila melanogaster*, como se ha explicado, cuenta con un segmento más en hembras que en machos (♀-7; ♂-6). (E) *Musca domestica* es la especie con el abdomen más reducido, con cinco segmentos tanto en machos como en hembras (♀-5; ♂-5). Para las especies monomórficas solo se ha dibujado un abdomen, y los abdómenes de los dos sexos para las especies dimórficas (hembra a la izquierda y macho a la derecha). Se muestra en rojo el segmento dimórfico (presente en el abdomen femenino y no masculino).

*Abd-B* no es quizás responsable de este fenómeno de reducción abdominal, ya que la expresión de este gen parece estar conservada en distintas especies de Dípteros (Yoder y Carroll, 2006). Por tanto, estos procesos reduccionales se deberán probablemente a las modificaciones de los programas de desarrollo

por debajo o en paralelo a *Abd-B*, siendo un posible candidato *Dsx* (Yoder, 2012). Esta proteína no sólo está ampliamente conservada entre los insectos (Price et al., 2015; Shukla y Nagaraju, 2010; Verhulst y Van de zande, 2015), sino que pertenece a la familia de proteínas *Dmrt*, implicada en el dimorfismo sexual de todos los animales estudiados hasta el momento (Kopp, 2012). En los insectos, *dsx* se encuentra al final de todas las cascadas de determinación sexual descritas, y sus reguladores, sin embargo, muestran una gran variabilidad. Sin embargo, se desconoce si este gen, o los genes que regula, son los responsables de la reducción en el número de segmentos abdominales a lo largo de la evolución de los Dípteros.

Estudios previos han logrado identificar el gen ortólogo al *dsx* de *Drosophila* en muchos Dípteros, así como en otros Insectos (Hediger et al., 2004; Price et al., 2015; Ruiz et al., 2005; Saccone et al., 2008; Salvemini et al., 2011; Scali et al., 2005). La proteína *Dsx* parece estar conservada estructuralmente, formándose isoformas específicas de macho y hembra que, como en *Drosophila*, comparten su región N-terminal pero difieren en la C-terminal.

Para algunas especies de Dípteros, ha sido ya demostrada la capacidad de las isoformas de macho y hembra de producir rasgos fenotípicos específicos de cada sexo en *D. melanogaster*, en características tales como el peine sexual o la pigmentación (Alvarez et al., 2009; Hediger et al., 2004). Sin embargo, sorprendentemente, en ningún caso se han llevado a cabo estudios sobre si estas proteínas conservan la función de su ortólogo en *Drosophila* de eliminar el segmento A7 en machos. Por tanto, en esta Tesis se intentará dar respuesta a esta pregunta, a través de la sobreexpresión de la proteína *Dsx<sup>M</sup>* de diferentes especies de Dípteros, elegidas por el diferente número de segmentos del abdomen y/o dimorfismo sexual en este carácter: el mosquito (Familia *Culicidae*) *Anopheles gambiae* (Ag), el más alejado filogenéticamente hablando de *Drosophila*, es monomórfico (8 segmentos en ambos sexos) ([http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Anopheles\\_gambiae/](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Anopheles_gambiae/)) (Matsuda, 1976); el Tefrítido *Anastrepha obliqua* (Ao), muy próximo filogenéticamente hablando a *Drosophila*, es sexualmente dimórfico (macho 5 segmentos y hembra 6) (<http://delta-intkey.com/anatox/morphol.htm>) (Matsuda, 1976); y *Musca domestica* (Md) que es la especie utilizada con el abdomen más reducido (5 segmentos) tanto en machos como en hembras (Hewitt, 1914; Matsuda, 1976) ([http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Musca\\_domestica/](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Musca_domestica/)) (Fig. 15).

### I.8. Asimetría en el reino animal y en *Drosophila*: el gen *MyoID*

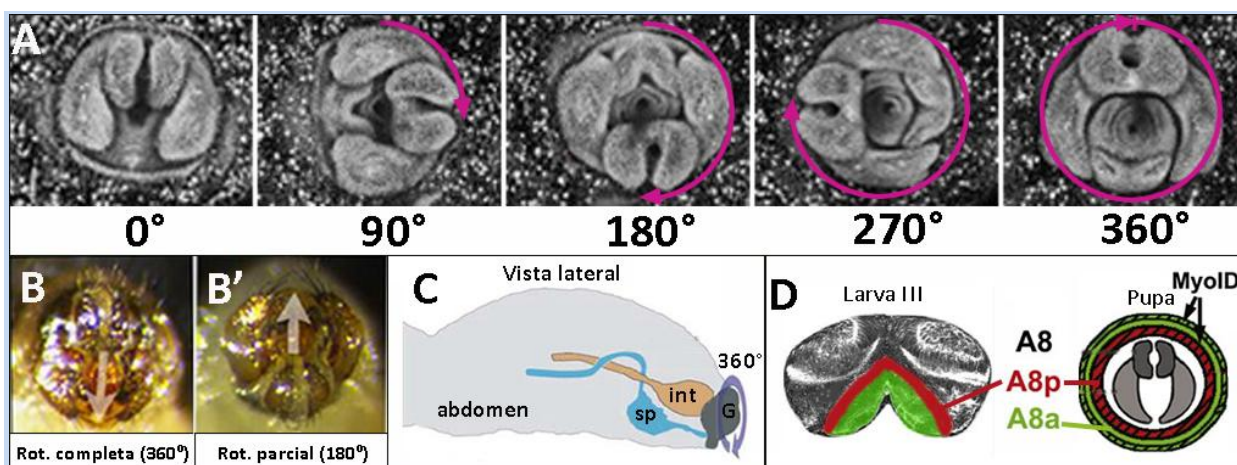
Aunque externamente simétricos, la mayoría de los organismos bilaterales albergan en su interior rasgos con asimetrías izquierda/derecha (I/D), tales como órganos asimétricos en su forma o colocación que se repiten generalmente en todos los individuos de la especie de forma estereotipada. Por ejemplo, en los mamíferos, entre ellos el ser humano, el corazón siempre se posiciona en el lado izquierdo del eje A/P. El correcto establecimiento de esta asimetría I/D está sujeto a un programa genético estricto y es crucial para la funcionalidad del organismo (Levin, 2006). Estas asimetrías se han descrito en todos los grupos filogenéticos del reino animal (Neville, 1976), y se han propuesto diversas hipótesis que expliquen la selección de estos eventos, como sería la capacidad de albergar órganos de mayor volumen (para órganos tubulares como el intestino del ser humano), o por adaptación a cambios en el estilo de vida (como dos ojos a un lado del cuerpo en los llamados peces planos) (Friedman, 2008). *D. melanogaster* alberga en su interior varios órganos asimétricos o que sufren procesos asimétricos, como son el intestino, los testículos y la placa genital. Recientemente, se ha caracterizado la Miosina ID (*MyoID*) como el determinante de la rotación de la genitalia del macho, los testículos y el intestino en el sentido de las agujas del reloj (dextral) durante la pupación. Así, en ausencia de *MyoID* se produce una inversión en la dirección de asimetría de estos órganos (Hozumi et al., 2006; Spéder et al., 2006; revisado en Coutelis et al., 2008; Géminard et al., 2014; Spéder y Noselli, 2007).

El gen *MyoID* codifica para una miosina monomérica no convencional de clase I, que ejerce su función como proteína motora moviéndose a lo largo de los filamentos de actina, y a través de su interacción con proteínas de uniones adherentes como DE-cadherina o  $\beta$ -catenina (Petzoldt et al., 2012). Así, la asimetría en *Drosophila* y otros invertebrados se basa en el citoesqueleto de actina/miosina mientras que en vertebrados se basa en la presencia de un flujo asimétrico producido por el batido de cilios en el nódulo primitivo (revisado en Coutelis et al., 2014; Spéder y Noselli, 2007). El flujo asimétrico producido por este movimiento cilial se ha establecido como el mecanismo de rotura de la simetría, y desencadenante de la activación de *nodal* solo en el lado izquierdo corporal, que desencadenará el desarrollo asimétrico de los órganos internos (revisado en Dasgupta y Amack, 2016; y Grimes y Burdine, 2017). Sin embargo, este sistema se encuentra ausente en aves, reptiles, y en algunos mamíferos como ballenas y artiodáctilos (entre ellos el cerdo o la vaca), en los que aún se desconoce que mecanismo activa asimétricamente a *nodal* (revisado en Blum y Ott, 2018; Schweickert et al., 2018); y parece que el citoesqueleto de actina/miosina puede tener un papel conservado en la adquisición de asimetrías I/D a lo largo de la evolución de todos los organismos bilaterales (revisado en Dasgupta y Amack, 2016; Ocaña et al., 2017). Además, recientemente se ha descrito que la Miosina ID se requiere para la determinación de la lateralidad y expresión génica asimétrica en rana, pez cebra y ratón, sugiriendo un origen evolutivo común en la lateralidad de artrópodos y cordados (Hegan et al., 2015; Tingler et al., 2018). En esta tesis

nos vamos a centrar en el estudio de la correcta adquisición de la asimetría de dos órganos en los machos de *D.melanogaster*: la placa genital y los testículos.

### I.8.1. La rotación de la placa genital en el macho

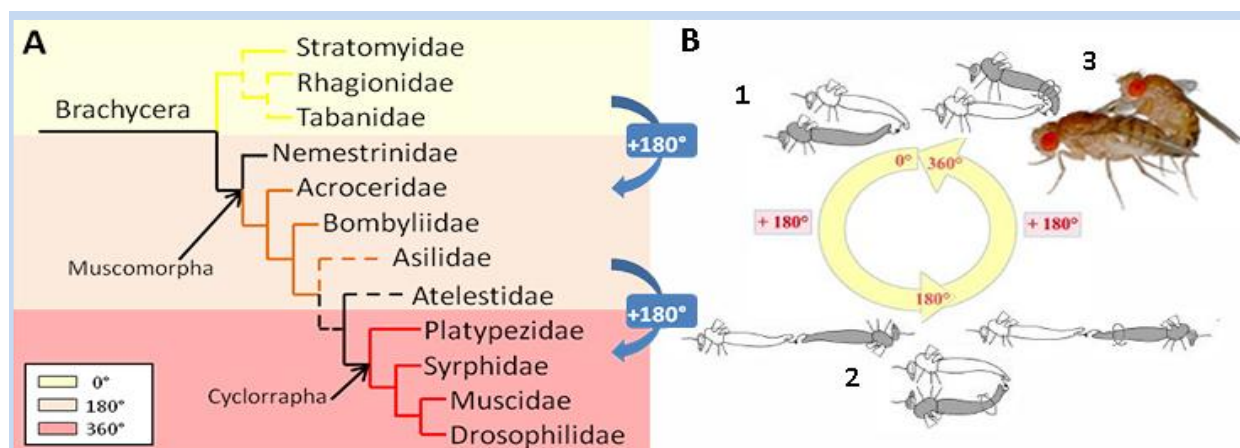
Durante la pupación, la placa genital del macho sufre una rotación de 360°, siempre en dirección dextral (visto desde posterior) (Fig. I6A). Este evento ocurre aproximadamente a las 24h DFP y se completa en unas 12h. Debido a que la genitalia (y la analia) sufren un giro completo, su posición externa será idéntica a la inicial (Fig. I6B,B'); sin embargo, la presencia y, en su caso, dirección de rotación, pueden ser visualizados en el adulto gracias al giro que el espermiducto (derivado del disco genital y que conecta las gónadas con el exterior) lleva a cabo alrededor del intestino durante el giro (Fig. I6C) (Spéder et al., 2006), o a través de su seguimiento durante la pupa en experimentos de *time-lapse*.



**Figura I6. Giro de la genitalia.** (A) Se muestran imágenes de diferentes momentos del giro de la placa genital durante la pupación hasta completar 360°. El proceso completo dura unas 12-15h. Se ha marcado el giro en cada momento, desde el inicio de la rotación, con flechas rosas. (B) Posición final de la genitalia en el macho adulto silvestre y en un macho con rotación parcial de 180° (B'). La posición se ha hecho coincidir en A y B para comparar, las flechas indican la dirección de la analia (A) al pene (P). (C) Esquema del abdomen en visión lateral para mostrar el giro que el espermiducto (sp, azul) hace alrededor del intestino (int, naranja) durante la rotación de la genitalia (G), y que permite su análisis en el adulto. (D) Expresión de MyoID en larva III (izquierda) y pupa (derecha) en el A8 del disco genital. Se han esquematizado el A8p (rojo) y A8a (verde). El A8 forma un anillo que rodea la genitalia en el momento de la rotación (derecha) (modificado de Kuranaga et al., 2011; Petzoldt et al., 2012; Spéder et al., 2006; Suzanne et al., 2010).

El tejido en el que se requiere la expresión de *MyoID* para este proceso es el A8 del disco genital (véase apartado I.3.) (Spéder et al., 2006) (nótese, como se indicó anteriormente, la co-existencia de dos segmentos A8 hasta la pupación: uno abdominal, formado solo por CELs, y otro genital). Este segmento formará un anillo que rodea el resto de la genitalia externa en el momento en que va a producirse la rotación, quedando el compartimento posterior (A8p) en el interior del anillo, y el anterior (A8a), en el exterior (Fig. I6D). Así, el giro es completado gracias a la suma de dos módulos independientes: primero el anillo A8p (junto con el tejido interno a él) gira 180° respecto al A8a y el abdomen, y seguidamente el A8a (junto con el resto de la genitalia) gira otros 180° respecto al abdomen, de manera que el interior

del anillo sufre un giro total de  $360^\circ$  (Suzanne et al., 2010). Este hallazgo de una rotación por módulos es muy significativo, pues durante la evolución de los *Brachycera* y *Cyclorrapha* se produjo un aumento en el grado de rotación de la genitalia en los machos, debido posiblemente a un cambio en la posición de la cópula a posturas más ventajosas (Bickel, 1990; Griffiths, 1972; Huber, 2009; Huber et al., 2007; Richards, 1927) (Fig. 17). Además, este rasgo podría haber coevolucionado junto con la disminución en el número de segmentos abdominales que se observa a lo largo del árbol filogenético de los dípteros (véase apartado I.7.) (Yoder, 2012; Yoder y Carroll, 2006).



El gen Hox *Abd-B* es clave para la rotación de la genitalia de *D. melanogaster*, ya que activa a *MyoID*. En ausencia de *Abd-B* no se produce *MyoID* y la genitalia no rota (Coutelis et al., 2013). Una respuesta similar se ha encontrado con la asimetría del intestino (González-Morales et al., 2015). Recordemos que la ausencia de *MyoID* producía el giro de todos los órganos en sentido inverso. Estos resultados indican que el estado basal del órgano es la simetría, y que *Abd-B* activa tanto al determinante dextral (*MyoID*) como a un aún no descrito determinante sinistral. En presencia de *Abd-B* se activa la transcripción de ambos, y el dextral debe inhibir al sinistral, prevaleciendo el giro a la derecha (revisado en Géminard et al., 2014).

El gen Hox *Abd-B* es clave para la rotación de la genitalia de *D. melanogaster*, ya que activa a *MyoID*. En ausencia de *Abd-B* no se produce *MyoID* y la genitalia no rota (Coutelis et al., 2013). Una respuesta similar se ha encontrado con la asimetría del intestino (González-Morales et al., 2015). Recordemos que la ausencia de *MyoID* producía el giro de todos los órganos en sentido inverso. Estos resultados indican que el estado basal del órgano es la simetría, y que *Abd-B* activa tanto al determinante dextral (*MyoID*) como a un aún no descrito determinante sinistral. En presencia de *Abd-B* se activa la transcripción de ambos, y el dextral debe inhibir al sinistral, prevaleciendo el giro a la derecha (revisado en Géminard et al., 2014).

Por qué este proceso ocurre en pupas de 24h es aún una respuesta por resolver, aunque puede deberse a la subida de Ecdisona y la bajada de Hormona juvenil (Adám et al., 2003; Baumann et al., 2010). La apoptosis juega un papel importante: se observa un incremento de muerte celular entre el A8a y el A8p,

y a su vez entre el A8p y el abdomen, y su inhibición provoca la disminución de la velocidad de giro, así como fenotipos de rotación parcial (Kuranaga et al., 2011; Suzanne et al., 2010). Igualmente, la vía de la Quinasa N-terminal c-jun (JNK), es necesaria para la correcta rotación genital (Benitez et al., 2010; Macías et al., 2004; Rousset et al., 2010). La matriz extracelular (MEC) parece estar igualmente implicada (Fraichard et al., 2010), aunque se desconoce en qué tejido los cambios en la matriz extracelular producen el fenotipo. Por último, recientemente se ha descrito que el movimiento colectivo del A8 se explica por un mecanismo autónomo de intercalación celular, dependiente de una distribución asimétrica de MyoII. Este estudio se basa en simulaciones numéricas que demuestran que una intercalación asimétrica es suficiente para inducir un movimiento unidireccional (Sato et al., 2015). Los autores demuestran que las células que se intercalan poseen una quiralidad celular planar (QCP), concepto descrito previamente en el estudio de la asimetría del intestino, que describe que las células adoptan una forma asimétrica respecto al eje A/P (Taniguchi et al., 2011).

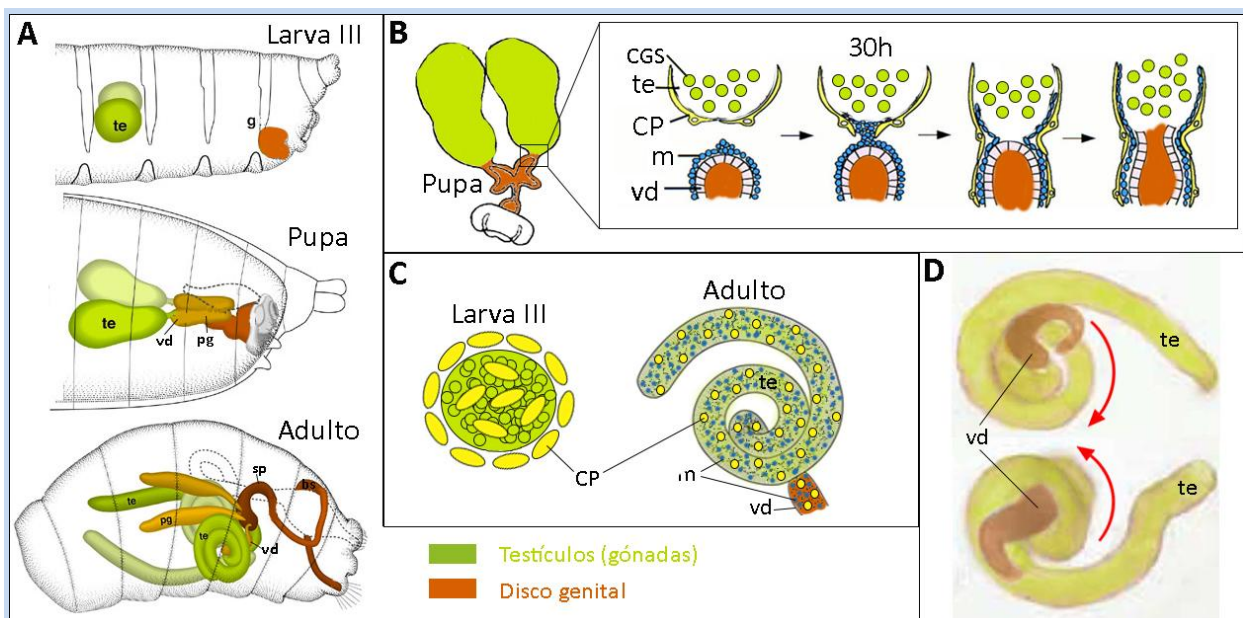
Se ha sugerido que la dirección de la asimetría no es determinante, mientras que sí lo es la rotura del estado simétrico y la correcta adquisición de una asimetría en cualquiera de las direcciones (Levin y Palmer, 2007). Así, si la genitalia no rota correctamente el macho no podrá copular (no será fértil), por lo que la finalización del proceso de rotación es un evento muy importante para la perpetuación de especie en estos insectos. Ya que la rotación se produce con respecto a un sistema de referencia que no gira (el abdomen), es interesante saber si las células abdominales pueden afectar a la rotación de la placa genital.

### **I.8.2. Asimetría en la espiralización de los testículos**

El sistema reproductivo de *D. melanogaster* es una estructura compleja que deriva de la fusión de dos órganos que contactan durante la pupación: las gónadas y el disco genital (Dobzhansky, 1931; Dobzhansky y Tan, 1937; Epper, 1983a, 1983b). En el macho, las gónadas, localizadas en los segmentos A4-A5 (Szabad y Nöthiger, 1992), contienen los precursores de las células germinales (pCGs) y las células gonadales somáticas (CGSs), y están rodeadas en estadios larvarios por unas células especiales llamadas células pigmentarias (CP), que derivan del cuerpo gordo. En la correcta determinación de los precursores de las CGSs intervienen los genes Hox *abd-A* y *Abd-B*, que especifican la parte anterior y posterior de la gónada embrionaria, respectivamente (Boyle y DiNardo, 1995; Camara et al., 2008; DeFalco et al., 2004, 2008). *Abd-B* determina además unas CGSs específicas de macho que darán lugar al epitelio terminal del testículo, región de unión con el disco genital (DeFalco et al., 2004; Nanda et al., 2009), y la posición y arquitectura del "hub" (CGSs especiales que permiten el mantenimiento de las pCGs) (Papagiannouli et al., 2014; Schardt et al., 2015). Ambos genes Hox se expresan también en el cuerpo gordo que rodea la gónada en estadios larvarios (Banreti et al., 2014; Marchetti et al., 2003).



Del disco genital (véase apartado I.3.), deriva toda la genitalia interna que contacta la gónada con el exterior a través del vas deferens (zona en contacto directo con los testículos) y el espermiducto (o ducto eyaculatorio). También derivan del disco genital dos glándulas accesorias (paragonias) y la bomba espermática (Fig. I8A) (Miller, 1941). Todas estas estructuras se desarrollan paulatinamente durante la pupación. El contacto entre el disco genital y la gónada es un requisito imprescindible para la correcta elongación y espiralización del testículo, por lo que alguna señal debe pasar desde el disco genital a la gónada que determine el crecimiento de esta última de manera no autónoma (Donzhansky y Beadle, 1936; Stern y Hadorn, 1939).



**Figura I8. Desarrollo y asimetría de los testículos. (A)** Esquema en vista lateral del desarrollo del sistema reproductor de *D. melanogaster*, formado por los testículos (te, verde) y los derivados del disco genital (naranja). En larva III (arriba), ambos tejidos se encuentran distantes; en pupa (medio) el disco genital (g) comienza a evertir hacia el interior del abdomen hasta que contacta con las gónadas. En el adulto el sistema reproductor masculino está formado por los testículos, que se espiralizan, y los derivados del disco genital. En gris se representan los derivados del disco genital que dan lugar a la genitalia externa o el final del intestino. **(B)** El contacto entre el disco genital (en concreto el vas deferens) y el testículo ocurre a las 30h DFP. Se muestra una ampliación de la zona de contacto en ese momento para esquematizar la doble migración celular: del testículo pasan células pigmentarias al vas deferens, y a la inversa, tejido muscular pasa del vas deferens al testículo. **(C)** Esquema del testículo larvario (izquierda) y adulto (derecha). En larva, el testículo solo está rodeado por las células pigmentarias. En adulto estará rodeado por una capa de células musculares y una de células pigmentarias, al igual que el vas deferens. **(D)** Asimetría en el testículo adulto. Se muestran fotos de testículos con giro silvestre (superior), que es dextral (flecha roja) y con giro inverso (inferior), en dirección sinistral (flecha roja). Se ha seguido en toda la figura el siguiente código de colores: verde para las gónadas (testículos), naranja para los derivados del disco genital, amarillo para las células pigmentarias y azul para el músculo. Abreviaturas: testículo (te), disco genital (g), paragonias (pg), vas deferens (vd), espermiducto (sp), células pigmentarias (CP), músculo (m), células gonadales somáticas (CGS) (modificado de Hartenstein, 1993; Hozumi et al., 2006; Kozopas et al., 1998).

Los precursores de los músculos no se encuentran presentes en la gónada antes de que esta contacte con el vas deferens, de lo que se deduce que este tejido debe proceder del disco genital (Rothenbusch-Fender et al., 2017; Susic-Jung et al., 2012). Este contacto se produce aproximadamente a las 30h DFP y, en este momento, ocurre una doble migración celular, pues las células musculares pasan del vas

deferens al testículo (por debajo de las CP), y a su vez las CP migran en dirección opuesta, hacia el vas deferens. Así, durante las fases larvianas, la gónada está recubierta solo por CP y tiene forma esférica, y en el adulto tiene una forma alargada y helicoidal y está recubierto por músculo y CP (Fig. 18B, C) (Kozopas et al., 1998; Kuckwa et al., 2016; Rothenbusch-Fender et al., 2017; Susic-Jung et al., 2012). *Abd-B* se requiere para la correcta determinación de este tejido muscular, así como para la correcta formación del citoesqueleto de actina/miosina de la capa muscular del testículo adulto (Olivera, 2017; Schardt et al., 2015).

Diferentes especies de *Drosophila* muestran diferente grado de espiralización del testículo, lo que además parece tener una relación con la longitud del esperma (Joly y Schiffer, 2010), siendo por tanto esta espiralización determinante para la fertilidad del macho, aunque estudios recientes han encontrado machos fértiles sin testículos espiralizados. Esta rotación es en *D. melanogaster* de dos vueltas y media, siempre en la misma dirección (dextral) (Fig. 18D), lo que hace de este órgano un buen modelo para el estudio de la generación de asimetrías.

La vía de la Polaridad Celular Planar (PCP) es un mecanismo que determina el alineamiento colectivo celular a lo largo de los tejidos, y en *Drosophila* se ha descrito que los genes que intervienen en este proceso pueden agruparse en dos grupos funcionalmente separados, el "central" (*core*) y "Fat/Dachsous" (revisado en Devenport, 2014). Ambos sistemas se basan en la distribución asimétrica a nivel celular de sus componentes. El sistema "central" se compone de las proteínas transmembrana Frizzled (Fz), Van Gogh (Vang) y Starry night, y los componentes citoplasmáticos Dishevelled, Diego y Prickle (Pk). Además, la proteína de membrana Furrowed (Fw) media las interacciones de estas proteínas a través de la estabilización de Fz (Chin y Mlodzik, 2013). Por su parte, la vía "Fat/Dachsous" incluye las cadherinas de membrana Fat (Ft) y Dachsous, la quinasa transmembrana del retículo de Golgi Fourjointed, y la miosina Dachs (D) (revisado en Devenport, 2014). La primera vez que se relacionó la vía PCP con asimetrías, fue a raíz de la identificación en ratón del gen *inversina*, ya que es un homólogo distante de *diego* (un gen del sistema "central" de PCP en *Drosophila*), cuyas mutaciones producen un alto porcentaje de inversión de las asimetrías en vertebrados (Morgan et al., 1998). Más recientemente se demostró que en rana y ratón el sistema "central" controla la posición de los cilios en el nódulo primitivo, lo que determina la correcta adquisición de la asimetría izquierda/derecha (Antic et al., 2010; Song et al., 2010). En *Drosophila*, ambos sistemas PCP han sido implicados en el establecimiento de la asimetría del intestino a través de su interacción con MyoID (González-Morales et al., 2015). Por último, muy recientemente, esta interacción entre la PCP y MyoID para la determinación de la asimetría izquierda/derecha se ha encontrado en rana y pez cebra (Tingler et al., 2018), lo que podría indicar que el mecanismo de *MyoID* en el establecimiento de las asimetrías está conservado a nivel evolutivo, y opera a través de la vía PCP.

En la asimetría testicular, hasta el momento, solo ha sido descrito que mutantes para *Myo1D* (gen que determina asimetría dextral en la genitalia externa e intestino), producen también inversión en la rotación del testículo, girando en este caso en sentido inverso (Fig. I8D) (Hozumi et al., 2006). Por todo ello, en esta Tesis intentamos definir el requerimiento de *Myo1D*, así como el posible papel de los genes *Hox*, y la vía de la PCP en este proceso.

# Objetivos

El propósito de esta Tesis es el estudio de los mecanismos que determinan el desarrollo durante la pupación de varias estructuras o procesos sexualmente dimórficos en la región posterior de los machos de *Drosophila melanogaster*. Estos son: la desaparición del segmento séptimo abdominal, y la adquisición de la asimetría en la rotación de la placa genital del macho y en la espiralización de los testículos. Para ello, se han propuesto los siguientes objetivos:

- 1)** Estudiar los mecanismos por los que *Abd-B* y la vía de determinación sexual controlan la eliminación del segmento séptimo abdominal en los machos.
- 2)** Analizar la regulación por las poblaciones celulares abdominales posteriores de la rotación de la placa genital del macho durante la pupación.
- 3)** Investigar los requerimientos de la Miosina ID, los genes Hox *abdominal-A* y *Abdominal-B* y la vía de Polaridad Celular Planar (PCP) en determinar la asimetría de la espiralización de los testículos.

# **Materiales y métodos**

## M.1. Líneas de *Drosophila melanogaster*

La cepa silvestre utilizada fue en todos los casos la cepa Vallecas, que será referenciada en las figuras como "+".

### **M.1.1. Estirpes mutantes y construcciones**

#### M.1.1.1. Mutantes

Mutaciones en *Abdominal-B*:

*Abd-B*<sup>M1</sup> (Casanova et al., 1986; Sánchez-Herrero et al., 1985) amorfo, *Abd-B*<sup>D18</sup>, una pequeña deficiencia que elimina la homeobox y secuencias adyacentes (Hopmann et al., 1995), y *Abd-B*<sup>M5</sup>, mutante para la isoforma M del gen (Casanova et al., 1986; Sánchez-Herrero et al., 1985); y el alelo de pérdida de función de *Abd-B* en el A7: *iab-7*<sup>MX2</sup> (Karch et al., 1985; Sánchez-Herrero et al. 1985) producido por una inversión en la región reguladora *infra-abdominal-7*.

Se utilizó la línea *Dp(3;1)P115* (Capdevilla y Garcia-Bellido, 1981), que es una duplicación del C-BX en el cromosoma X, para descartar la posible aparición de A7 en machos debido al posible efecto dominante de la línea usada en muchos experimentos, *MD761-Gal4*, que es una inserción en la secuencia reguladora *iab-7* (como se explica más adelante).

Mutantes en *doublesex*:

El alelo amorfo *dsx*<sup>1</sup> (Bloomington 1679) y la deficiencia *Df(3R)683/7058* (Bloomington 66710).

Mutantes en *MyoID*:

*MyoID*<sup>k2</sup> (Spéder et al., 2006), producido por una escisión imprecisa de un elemento-P, es una deleción que elimina secuencias del gen *MyoID*.

Mutantes en *spaghetti-squash*:

El alelo amorfo *sqh*<sup>AX3</sup> (Jordan y Karess, 1997).

Mutantes para las vías de Polaridad Celular Planar (PCP):

Se utilizó el alelo amorfo *d*<sup>GC13</sup> (Bloomington 6389) para el gen *dachs*; el alelo amorfo *ft*<sup>G-rv</sup> (Bryant et al., 1988) y *ft*<sup>SZ44</sup> (Mahoney et al., 1991), que produce una proteína truncada, para el gen *fat*; el alelo amorfo *pk*<sup>sple-1</sup> (Bloomington 422) y el alelo de pérdida de función *pk*<sup>sple-13</sup> (Gubb et al., 1999) para el gen *prickle*; el alelo *fz*<sup>21</sup> (Bloomington 41787), que produce una proteína truncada, y el alelo

hipormorfo *fz*<sup>1</sup> (Gubb y Garcia-Bellido, 1982) para el gen *frizzled*; y el alelo de pérdida de función *Vang*<sup>stbm-6cn</sup> (Wolff y Rubin, 1998) para el gen *Van Gogh*.

### M.1.1.2. Construcciones

Se usaron como marcador de membrana el gen *Neuroglian* fusionado a GFP, al que nos referiremos como *Nrg*-GFP (Dubreuil et al., 1996), y el marcador *zcl*<sup>2207</sup>-GFP (Kyoto DGRC 110860). Para el seguimiento de células se usaron los marcadores nucleares de histonas *His2Av*-GFP (Bloomington 5941) y *His2Av*-RFP (Schuh et al., 2007). Además, se usaron tanto para seguir células en experimentos *time-lapse* como para análisis de las proteínas Cadherina y Miosina II, las herramientas *DE-cadherina*-GFP (Huang et al., 2009) y *sqh*-GFP (Royou et al., 2003), que expresan la proteína GFP a través de proteínas de fusión (un alelo “Knock-in” para el caso de la Cadherina; y una construcción en otro cromosoma para la Miosina, que rescata la falta de función del gen). Para marcar el compartimento posterior de cada segmento se ha usado *hh*-Dsred (Kyoto DGRC 109137), una inserción del marcador rojo nuclear en el gen *hh*. Para la detección de la Metaloproteasa1 (*Mmp1*) se utilizó la construcción indicadora *Mmp1*-GFP (Wang et al., 2010). Para detectar apoptosis por presencia de caspasas *in vivo*, se utilizó una línea “reportera” que consiste en el anclaje del fluoróforo GFP nuclear a la membrana celular a través de la secuencia de reconocimiento de Dronc, de manera que en la presencia de esta caspasa la proteína GFP se libera de la unión a la membrana y cambia su localización subcelular al núcleo (cedido por el laboratorio del Dr. Jean-Paul Vincent, TFCI, y referenciado en esta tesis como “reportero JPV”).

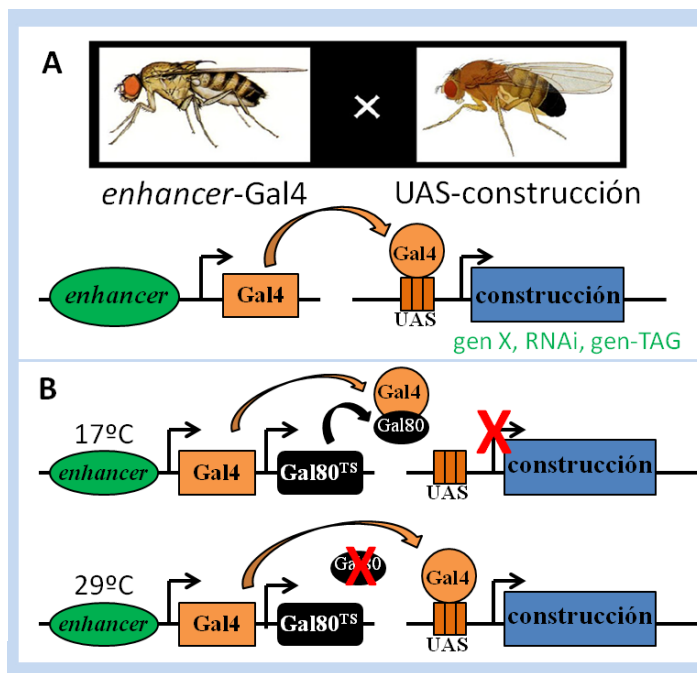
### **M.1.2. Expresión ectópica de genes**

Mediante el sistema de regulación transcripcional Gal4/UAS (Brand y Perrimon, 1993; Elliott y Brand, 2008), se puede expresar un producto que bajo el control de las secuencias activadoras UAS, se active sólo en el lugar en que se produzca la proteína Gal4, la cual responde a determinados *enhancers* génicos que varían en cada línea de moscas y otorga especificidad de tejido (Fig. M1A). A 29°C se consigue una activación del sistema mayor que a menores temperaturas. En las figuras, la herramienta Gal4/UAS se referencia como “>”.

Además de conseguir la sobreexpresión de determinada proteína, el sistema permite su inhibición mediante la expresión de RNAs de interferencia (RNAi). El uso de RNAi permite el silenciamiento de genes debido a la degradación de sus RNA mensajeros a través de RNA de doble cadena (dsRNA) (Fire et al., 1998; revisado en Boutros y Ahringer, 2008). En *Drosophila*, la combinación de técnicas permite interferir la función de un gen en un tejido y momento determinados del desarrollo (Dietzl et al., 2007).



El control temporal de estas expresiones se lleva a cabo gracias al sistema termosensible Gal4-Gal80<sup>TS</sup>. El uso de la proteína Gal80 unida a las secuencias reguladoras de la *tubulina*1 (*tub*-Gal80<sup>TS</sup>) (Lee y Luo, 1999; McGuire et al., 2003), inhibe la producción de proteína Gal 4 en todos los tejidos cuando las moscas son mantenidas a una temperatura de 17°C, bloqueando el sistema Gal4/UAS e impidiendo por tanto la expresión bajo el control de UAS. A 29°C, sin embargo, la proteína Gal80 queda inactivada, permitiéndose el correcto funcionamiento del sistema Gal4/UAS (Fig. M1B) (McGuire et al., 2003). Los cambios de temperatura de 17°C a 29°C en este estudio se realizaron en el tercer estadio larvario, o en pupa blanca (0h DFP), a no ser que se especifiquen otras condiciones. Para los cruces sin *tub*-Gal80<sup>TS</sup> se indica en cada experimento la temperatura utilizada.



**Figura M1. El sistema Gal4/UAS/Gal80<sup>TS</sup>.**

**(A)** Sistema Gal4/UAS. La proteína Gal4 se produce solo en aquellos tejidos donde se activan las secuencias reguladoras o *enhancers*, y se une a las secuencias UAS, activando la expresión del gen o RNAi de interés. **(B)** Sistema Gal4-Gal80<sup>TS</sup>. A 17°C la proteína Gal80 (presente en todas las células al expresarse su cDNA bajo control de *tubulina*) se une a la proteína Gal4 inhibiendo su función, por lo que no se produce la activación transcripcional de las secuencias unidas a UAS. A 29°C el Gal80 se inactiva y el sistema Gal4/UAS funciona con normalidad.

En *Drosophila* se utiliza también el sistema LexA/LexO, que funciona de manera similar al Gal4/UAS: la proteína LexA (que también puede ser susceptible a inhibición por Gal80 cuando la secuencia GAD se fusiona a la proteína LexA) activa en determinadas células la transcripción génica bajo el control de la secuencia LexO, uniéndose a esta. Estos dos sistemas binarios son independientes, lo que permite mediante diversas combinaciones la activación o inactivación génica en pequeñas subpoblaciones celulares, así como la activación simultánea de dos productos génicos diferentes en dos poblaciones celulares distintas (Yagi et al., 2010). Con este último objetivo, se han creado nuevas líneas transgénicas LexA o Gal80.

#### M.1.2.1. Líneas Gal4

Para el análisis del abdomen posterior y la genitalia se usó la línea MD761-Gal4 (Calleja et al., 1996), que es una inserción en la región reguladora *iab-7* de *Abd-B*, y dirige la expresión en los segmentos A7 y A8 (A6p-A8) en histoblastos y CELs; la inserción causa una mutación hipomorfa en la región

reguladora *iab-7* de *Abd-B*; *esg-Gal4 Act>y<sup>+</sup>>Gal4 UAS-GFP UAS-*flp** (Ninov et al., 2007), que dirige una expresión permanente de la proteína Gal4 en el dominio del gen *escargot* (cuya expresión desaparece en condiciones silvestres en estadios pupales), en los histoblastos y parte de las células del disco genital y que será referenciada en el texto como *esg-Gal4* para simplificar; *Abd-B-Gal4<sup>LDN</sup>* (de Navas et al., 2006), que dirige la expresión a los segmentos A7p-A8 en histoblastos, CELs y el segmento A8 del disco genital; *Eip71CD-Gal4* (Cherbas et al., 2003), que se expresa en las CELs; y *myoID-Gal4* (Kyoto DGRC NP1548), que dirige la expresión en el segmento A8 genital, y aunque débilmente, también en los segmentos A7 y A8 abdominales (también se ha utilizado esta línea para el estudio de asimetría en los testículos).

Se estudió la pigmentación en el abdomen con la línea *pnr-Gal4*, que se expresa en la parte más dorsal del abdomen (Calleja et al., 2000). Para el estudio del peine sexual se utilizó la línea *dsx-Gal4* (Rideout et al., 2010), que dirige la expresión correspondiente al gen *doublesex*, incluyendo, entre otros dominios, el peine sexual.

Líneas que se usaron para el análisis de los testículos: 1151-Gal4 (cedida por el Dr. L.S. Shashidhara, IISER), *Duf-Gal4* (Bloomington 66682) y *Mef2-Gal4* (Bloomington 27390), que se expresan en todas las células musculares; *Mj12 $\alpha$ -Gal4* (Bloomington 6991) para dirigir la expresión a las células pigmentarias; la línea *ppl-Gal4* (Bloomington 58768), de expresión en el cuerpo graso que rodea al testículo y del cual derivan las PC. También se probaron para estos estudios las líneas *c85 $\alpha$ -Gal4* (Bloomington 6990), *bab-Gal4* (Bloomington 6803), *abd-A-Gal4* (de Navas et al., 2006) y *Abd-B-Gal4<sup>199</sup>* (de Navas et al., 2006).

Además de las líneas 1151-Gal4 y *Mef2-Gal4*, para dirigir la expresión en los músculos o uniones neuromusculares para el estudio de la rotación de la genitalia se usaron las líneas C57-Gal4 (Bloomington 52001), A51-Gal4 (Bloomington 8764), c179-Gal4 (Bloomington 6450) y H94-Gal4 (Bloomington 8762).

Para la detección de apoptosis *in vivo* se utilizó la herramienta mCD8-DQVD-Gal4 (Ding et al., 2016; Tang et al., 2015), referenciada en este trabajo como CasExpress. Es una construcción que da lugar a una proteína Gal4 que se encuentra anclada a membrana mediante una secuencia reconocida por las caspasas efectoras; en presencia de estas se produce un corte de esta secuencia específica, permitiendo la translocación de la proteína Gal4 al núcleo, activando así secuencias UAS determinadas que permiten la detección de células en las que se han activado las caspasas.

Para el análisis de ciclo celular se usó una línea de expresión ubicua bajo el promotor de *Actina*, *Act5c-Gal4* (Bloomington 4414).

### M.1.2.2. Líneas UAS

Para seguir dominios de expresión se utilizaron las construcciones UAS-GFP (Ito et al., 1997) o UAS-CD8-RFP (Bloomington 27391), que marcan las células en verde o rojo, respectivamente. Para sobreexpresar la isoforma Dsx<sup>M</sup> de diferentes especies se usaron las construcciones UAS-*dsx*<sup>M</sup> de *D. melanogaster* (Lee et al., 2002), UAS-*dsx*<sup>M</sup> de *A. obliqua* (Alvarez et al., 2009), UAS-*dsx*<sup>M</sup> de *M. domestica* y UAS-*dsx*<sup>M</sup> de *A. gambiae* producidas (estas dos últimas líneas) en el laboratorio previamente, a través del clonaje de los cDNAs correspondientes en el vector pUAST (siguiendo referencias Hediger et al., 2004; Scali et al., 2005).

Para inhibir la apoptosis se usó la línea UAS-*p35* (Bloomington 5072), y para producirla, UAS-*rpr* (Bloomington 5823). Para activar la vía EGFR se usaron las inserciones UAS- $\lambda$ -TOP, que sobreexpresa el receptor de la vía constitutivamente activo (cedido por el Dr. Carlos Estella, CBMSO), UAS-*spi.m*-GFP, que sobreexpresa el ligando de la vía *spitz* anclado a membrana (Tsruya et al., 2002) y UAS-*ras*<sup>v12</sup> (Bloomington 64196), que sobreexpresa constitutivamente el oncogen Ras85D. Se utilizó UAS-*wg*<sup>E1</sup> (Klein y Arias, 1998) para activar la proliferación. Para transformar de machos a hembras se utilizó UAS-*tra*<sup>F</sup> (Bloomington 4590). Para sobreexpresar diferentes proteínas HLH: UAS-*emc* (Baonza et al., 2000), UAS-*da* (Bhattacharya y Baker, 2011), su homodímero UAS-*da-da* (Tanaka-Matakatsu et al., 2014) y UAS-*grh* (Bloomington 42227). Para sobreexpresar la proteína que produce rotación dextral y sinistral, UAS-*MyoID*-GFP y UAS-*MyoIC*, respectivamente (cedidos por el Dr. Stéphane Noselli; iBV). Para inhibir el Receptor de Ecdisona en las CELS se utilizó el dominante negativo para la isoforma B1, la línea UAS-EcR.B1<sup>W650A</sup> (Bloomington 6872). Para inhibir la degradación de la membrana basal se utilizó UAS-*Timp* (Bloomington 58708), que inhibe a las Metaloproteinasas (que degradan la membrana basal).

Para inhibir la Miosina II no muscular (*MyoII*) se utilizó el sistema deGRAD-GFP (Pasakarnis et al., 2016) en un fondo mutante para el gen que codifica la cadena ligera reguladora de la MyoII (*sqh*) complementado con la construcción *sqh*-GFP, de manera que toda cadena ligera del individuo está marcada con GFP, y la MyoII será degradada al expresar la construcción deGRAD-GFP. Se utilizaron además, con este mismo fin (inactivar MyoII) las líneas UAS-*Mbs*<sup>N300</sup> (Lee y Treisman, 2004), que es una forma constitutivamente activa de su fosfatasa inhibidora, UAS-*zipper*<sup>DN</sup> (Franke et al., 2005), que es el dominante negativo de la cadena pasada, y UAS-*Rho1*<sup>N19</sup> (Bloomington 7328), que es una forma dominante negativa de la GTPasa *Rho1*, activadora de Rok, que a su vez activa a MyoII. Para, por el contrario, aumentar la actividad de la Miosina II, se utilizaron UAS-*Rho1*<sup>Sph</sup> (Bloomington 7334), UAS-*Rho1*<sup>V14</sup> (Bloomington 7332) (forma constitutivamente activa), UAS-*Rok*<sup>CAT</sup> (Bloomington 6669) y UAS-*sqh*<sup>E20E21</sup> (Bloomington 64411) (forma constitutivamente activa). Para sobreexpresar la

Cadherina epitelial, UAS-DE-*cad* (Bloomington 58494, 58445 y 65589). Para el estudio de la PCP se utilizaron las siguientes líneas: UAS-*fz* (Bhat 1998) y UAS-*d*<sup>V5</sup> (Bloomington 28814). Para analizar el ciclo celular en los histoblastos del A7 se utilizó la herramienta Fly-Fucci (Zielke et al., 2014), que consiste en la combinación de las construcciones UAS-*ubi*-GFP-E2F<sub>1-230</sub> y UAS-*ubi*-mRFP1-CycB<sub>1-266</sub> (se designan como UAS-GFP-E2F y UAS-RFP-CycB en Resultados). Por último, se utilizó el stock UAS-*y*<sup>+</sup> (Calleja et al., 1996), para titular las dosis de UAS, y conseguir las mismas dosis tanto en los casos experimentales como en el control.

#### M.1.2.3. Líneas UAS-RNAi

Para inhibir la apoptosis se usó UAS-*RHG* miRNA (Siegrist et al., 2010), una construcción que dirige un miRNA contra los tres genes proapoptóticos *reaper*, *hid* y *grim*. Para inhibir genes Hox se utilizaron UAS-*abd-A*-RNAi (Vienna VDRC 106155) y UAS-*Abd-B*-RNAi (Vienna VDRC 104872). Para producir cambio de sexo de hembra a macho, UAS-*tra*-RNAi (Bloomington 28512). Para inhibir la proliferación UAS-*cdc2*-RNAi (Bloomington 36117). Para inhibir el gen responsable de la rotación dextral de la genitalia y los testículos, UAS-*MyoID*-RNAi (Spéder et al., 2006). Para inhibir proteínas HLH se usaron las construcciones UAS-*emc*-RNAi (Vienna 100587 y NIG-FLY 1007 R-2), UAS-*da*-RNAi (Vienna 51300), UAS-*grh*-RNAi (Bloomington 28820), UAS-*similar*-RNAi (Bloomington 26207), UAS-*spineless*-RNAi (Bloomington 26208), UAS-*sage*-RNAi (Bloomington 25980) y UAS-*gce*-RNAi (Bloomington 26323). Para inhibir la presencia de MyoII, UAS-*Rho1*-RNAi (Vienna 12734) y UAS-*sqh*-RNAi (Vienna 7917). Para inhibir en las CELs el receptor de la Ecdisona se utilizó UAS-*EcR*-RNAi (Vienna 37058, Bloomington 9326). Para el estudio de las vías de PCP se utilizaron las siguientes líneas: del sistema *core*, UAS-*fw*-RNAi (Bloomington 28307 y 38975) y UAS-*fz*-RNAi (Bloomington 34321 y 31036); y del sistema Dachsous-Fat, UAS-*ft*-RNAi (Bloomington 29566 y 34970) y UAS-*ds*-RNAi (Vienna 9396, Bloomington 27664 y 33754).

#### M.1.2.4. Líneas LexA y LexO

*hh*-LexA (González-Méndez et al., 2017) para marcar el compartimento posterior. LexO-*p35* (Ren et al., 2016) para inhibir la apoptosis. LexO-GFP (Bloomington 66544 y 52266) (para la expresión de GFP en una copia o multicopia 13x) o LexO-mCherry-CAAX (referenciado en el texto como LexO-Cherry) (Yagi et al., 2010) para localizar el dominio de expresión de una línea LexA, en verde o rojo, respectivamente.

#### M.1.2.5. Otras estirpes

El balanceador *TM6B* se usó para distinguir, respectivamente, larvas y pupas silvestres o mutantes, gracias a la mutación *Tb*, que produce individuos más cortos y anchos. Así mismo, para diferenciar los

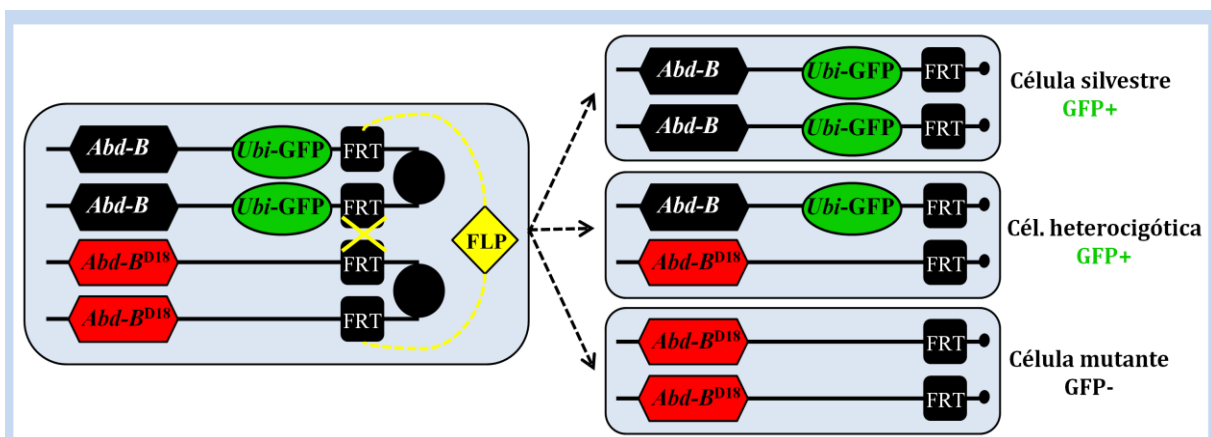
individuos machos (XY) del genotipo intersexo  $B^S Y$ ;  $dsx^1/Df(3R)683/7058$ , se utilizó como marcador la mutación *Bar* ( $B^S$ ; ojo en forma de barra) en el cromosoma Y ( $B^S Y$ ).

## M.2. Análisis clonal

Se han realizado clones para estudiar el comportamiento de pequeños grupos celulares con diferente identidad génica a la del resto del tejido. Estos clones se generan mediante el sistema FLP/FRT. Las secuencias FRT (>), provenientes de levadura, recombinan entre sí en presencia de la enzima flipasa (*flp*), produciendo células homocigóticas para el brazo cromosómico en el que se encuentra la secuencia FRT (Golic, 1991; Xu y Rubin, 1993) para los llamados clones en *-trans*, o eliminando la secuencia de DNA comprendida entre ellas para los conocidos como clones en *-cis* o *flip-out* (Figura MM2). Se utilizó para inducir los clones la flipasa *hs-flp122* (Struhl y Basler, 1993), que está controlada por un promotor dependiente de temperatura, por lo que solo se producirá la recombinación entre secuencias FRT tras inducir en las larvas o pupas un choque térmico (gracias al promotor “*heat-shock*”, *hs*) en el momento deseado y durante un tiempo determinado. Los clones fueron identificados gracias a la activación de UAS-CD8-RFP (Fig. M3), o por pérdida del marcador *Ubi-GFP* en fondo *His2Av-RFP* (Fig. M2). Para el análisis clonal se usaron los cromosomas que se describen a continuación.

### M.2.1. Clones en *-trans*

Se utilizó el cromosoma *y w hs-flp122* ;; *FRT82B Ubi-GFP* en trans con *FRT82B Abd-B<sup>D18</sup>* (Estrada y Sánchez-Herrero, 2001), para producir clones mutantes para *Abd-B* (Fig. M2).



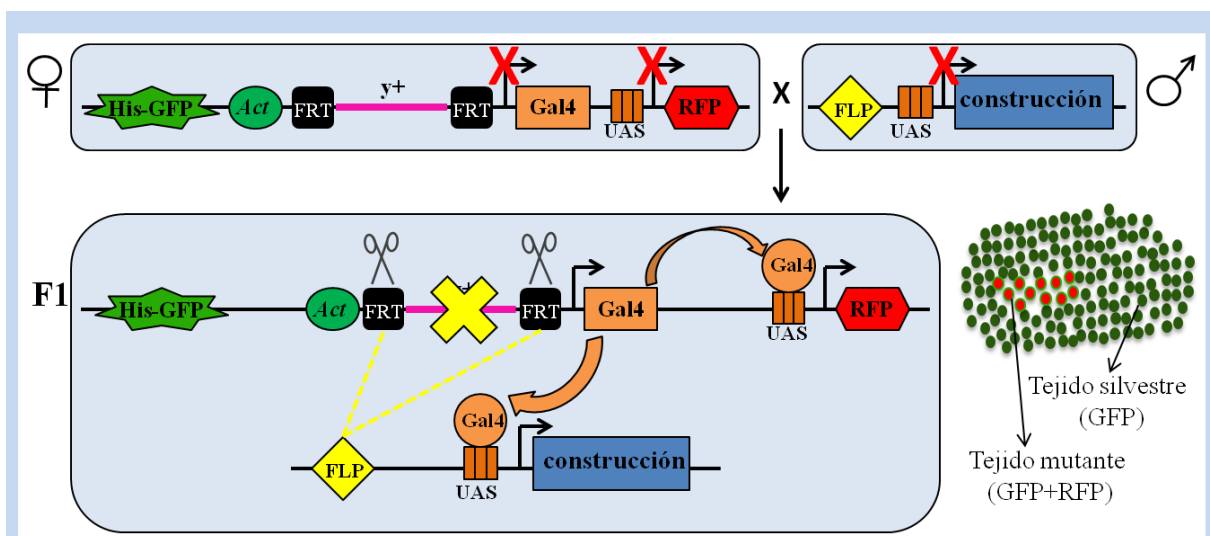
**Figura M2. Clones en *-trans*.** Cuando se induce la producción de proteína Flipasa en células mitóticas (o detenidas en fase G2 para el caso de los histoblastos) (Ninov et al., 2009), esta reconoce las secuencias FRT y produce su sobrecruzamiento. Cuando se produzca el reparto de cromátidas durante la anafase, se podrán producir, según la segregación, tres tipos de células: una igual a la parental (heterocigótica), una silvestre para el gen de interés, y una mutante homocigótica para el gen de interés, que estará marcada respecto al resto por ausencia de GFP (en fondo *His2Av-RFP*).

Los clones se han inducido en estadio larva III. La duración y temperatura del choque térmico es de 1,5h a 37°C.

### M.2.2. Clones en *-cis*

*Act>y<sup>+</sup>>Gal4 UAS-CD8-RFP* (cedido por el Dr. Kenneth D. Irvine, WIM), se cruzó por las líneas ya citadas *UAS-tra<sup>F</sup>*, *UAS-tra-RNAi* y *UAS-AbdB-RNAi* en presencia de *hs-flp122*, para producir clones de cambio de sexo o disminución de la cantidad de *Abd-B*, respectivamente. Como marcador general se utilizó el ya descrito *His2Av-GFP* (Fig. M3).

Los clones se han inducido en estadio de pupa blanca. La duración y temperatura del choque térmico es de 17 min a 37°C.



**Figura M3. Clones en *-cis*.** Cuando se induce la producción de proteína Flipasa con choque térmico esta reconoce las secuencias FRT y hace “saltar” el DNA espaciador (en este caso el cDNA *y<sup>+</sup>*) que impedía la producción de Gal4. En las células en las que esto ocurra se producirá proteína Gal4 que activará la expresión de la construcción determinada (*AbdB-RNAi*, *tra<sup>F</sup>* o *tra-RNAi*) y del CD8-RFP, que permitirá detectar la expresión de los RNAs. Todas las células estarán marcadas con *His2Av-GFP*.

### M.3. Análisis de linajes celulares

Para las líneas Gal4 utilizadas en el análisis de los testículos se marcaron todas las células que expresaban en algún momento cada Gal4, desde estadios de larva III hasta adulto. Para ello se cruzó cada línea Gal4 con la construcción *tub-Gal80<sup>TS</sup>* y con la línea *UAS-flp Ubi-P63E>STOP>Gal4 UAS-Stinger (GFP)* (Bloomington 28282), y se cambió la temperatura de 17°C a 29°C en larva III. De esta manera, con el cambio de temperatura la proteína Gal4 se induce y activa la transcripción del gen *flipasa*, lo que permite la expresión de GFP bajo las secuencias promotoras del gen *Ubiquitina*, de forma permanente en todas sus células descendientes.

#### **M.4. Métodos inmunohistoquímicos y montaje para confocal**

Se seleccionaron pupas blancas (0h DFP) para controlar el tiempo de desarrollo a cada temperatura previo a la disección (Madhavan y Madhavan, 1980). Las pupas se colocaron en cinta adhesiva de doble cara, se disectaron con una cuchilla, fueron lavadas con PBS para quitar las tráqueas y cuerpo graso, y fueron fijadas en Paraformaldehído (PFA) al 4% durante 45 min. Para los discos genitales se disectaron larvas en PBS frío y se procedió a la fijación en PFA 4% durante 30 min. Para el análisis de testículos se disectaron adultos o faratos en PBS, separando el abdomen del tórax y abriendo la cutícula hasta medio abdomen por su zona dorsal o lateral, tras lo cual se procedió a la fijación en PFA 4% durante 45 min.

A continuación, para todos los casos, se realizaron 3 lavados con PBT (PBS- 0,1% Tritón X-100), y un bloqueo de 20 min en PBT-BSA (PBT- albúmina de suero bovino BSA 1%). Los anticuerpos primarios se incubaron toda la noche a 4°C. Tras la incubación se realizaron 4 lavados de 10 min con PBT y se incubó con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 2 h a temperatura ambiente. Se usó To-pro-3 (referenciado en adelante como Topro) (Life Technologies) para marcar los núcleos (Incubación al final del anticuerpo secundario 20 min, dilución 1:500). Finalmente, se lavaron las muestras 3 veces durante 10 min en PBT y se almacenaron en Vectashield (Vector laboratorios, Inc.) para su posterior montaje. En algunos casos se sustituyó el uso de Topro por Dapi (Vector laboratorios, Inc.) para el marcaje nuclear por el almacenaje de muestras en Vectashield. Para el análisis de cutículas de pupas y testículos se realizó un montaje con volumen, formando un canal con dos cubres para evitar plegamientos del tejido.

Los anticuerpos primarios usados fueron:

Anti-Dcp-1: Cell Signaling Technology. Desarrollado en conejo, usado a 1:200.

Anti-Abd-A: Desarrollado en ratón, usado a 1:400 (Kellerman et al., 1990).

Anti-Abd-B: Hybridoma Bank. Desarrollado en ratón, usado a 1:25.

Los anticuerpos secundarios anti ratón o conejo conjugados con el fluorocromo Alexa 555 (rojo) (ThermoFisher) se utilizaron a una concentración 1:200.

#### **M.5. Detección de muerte celular por métodos independientes de caspasas**

##### **M.5.1. Detección de fragmentación de DNA por TUNEL**

La técnica de "Tunel" permite detectar células que van a morir a través del marcaje de roturas en las cadenas de DNA. Se utilizó el "kit In situ Cell Death Detection" (TMR red, Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante para "marcaje de tejidos difíciles" sin microondas, y con incubaciones independientes del buffer de marcaje (30 min) y la enzima (2h).

### **M.5.2. Detección de apoptosis con Naranja de Acridina**

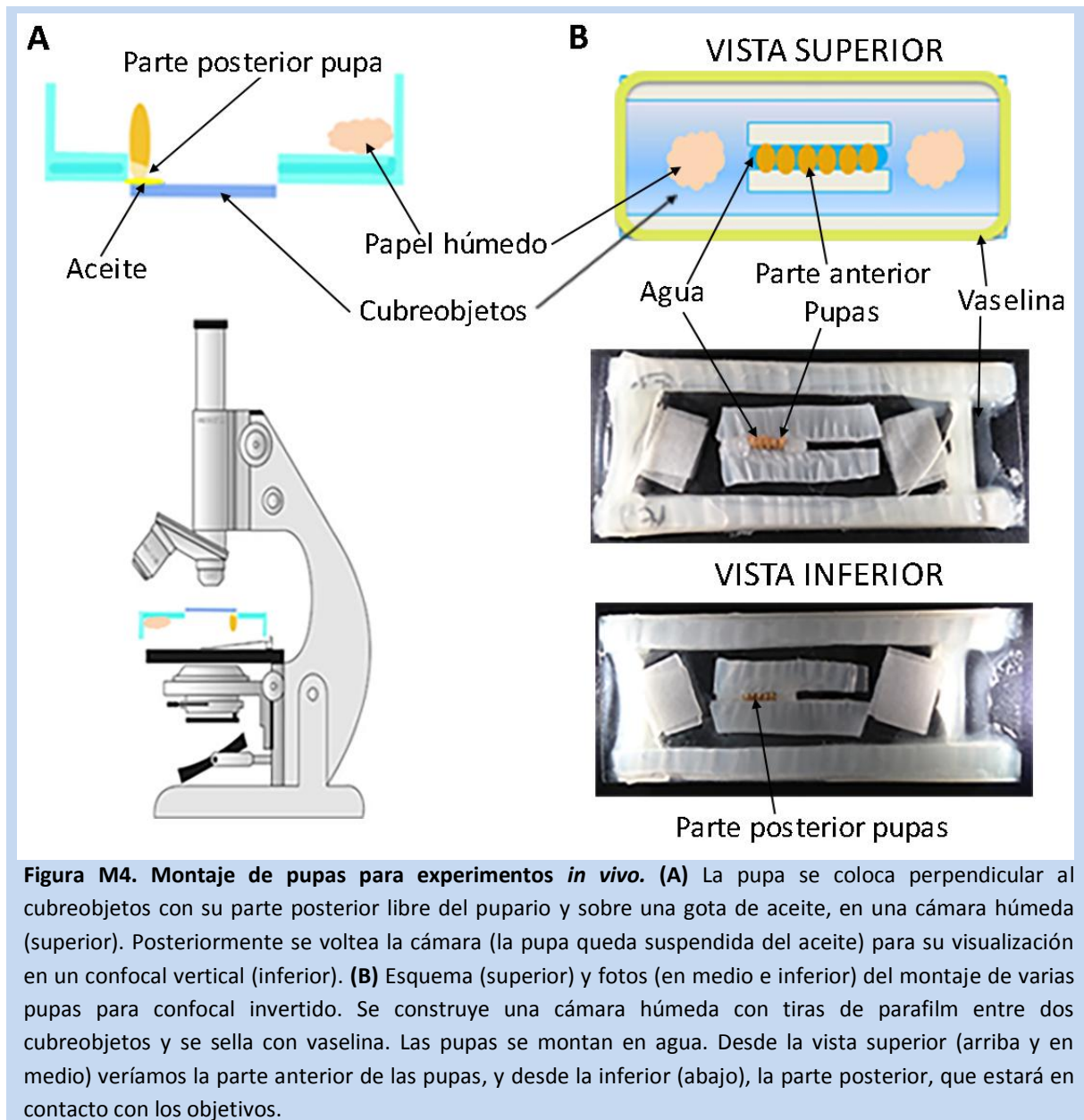
La Naranja de Acridina (NA) es un colorante vital fluorescente (verde), que se incorpora a las células apoptóticas (Abrams et al., 1993). Para el marcaje con NA se crecieron en ausencia de luz las moscas parentales y su descendencia hasta el momento de la disección en medio de cultivo estándar instantáneo (Formula 4-24, Carolina), suplementado con 100-140 µg de NA (Sigma) por tubo.

### **M.6. Montaje de pupas para experimentos de *live imaging***

Se seleccionaron las pupas blancas como ya se ha descrito, se pusieron en cinta de doble cara por su parte ventral dejando la zona posterior fuera de la cinta, y se reservaron a la temperatura deseada en los mismos tubos donde se desarrollan normalmente para interferir lo menos posible en su desarrollo. En el momento determinado se separó la parte posterior del pupario con agujas finas, con cuidado de no tocar a la pupa, y se separó con cuidado la pupa de la cinta con agua. A partir de este momento se llevaron a cabo dos montajes diferentes:

- 1) Secar las pupas en papel absorbente, y colocarlas una a una con cuidado sobre una pequeña gota de aceite de inmersión, en un cubreobjetos en el que se ha colocado un pequeño escalón para apoyar la pupa de manera que quede prácticamente perpendicular a los objetivos, apoyadas tan solo por su parte más posterior. A continuación, añadir papel mojado y cerrar esta cámara húmeda con un portaobjetos. Dar la vuelta a la cámara (la pupa quedará ahora en la parte superior, pegada por el aceite) y observar en un microscopio vertical (Fig. M4A).
- 2) Colocar en los laterales de un cubreobjetos largo unas tiras estrechas de parafilm (13 capas). A continuación con dos tiras de parafilm estrechas (11 capas), hacer un canal en el medio del cubreobjetos de grosor un poco superior al grosor de la pupa. Colocar con cuidado las pupas en el interior del canal, con su parte caudal tocando el cubreobjetos. Añadir en los extremos papel de filtro mojado (para crear una cámara húmeda), y unas gotas de agua en el canal con las pupas. Por último, colocar encima otro cubreobjetos y ejercer una leve presión de manera que se maximice el contacto entre la pupa y el cubreobjetos, y sellar toda la cámara de manera exhaustiva con vaselina pura (Vaseline) previamente calentada (Figura M4B). No girar la cámara y moviéndola lo menos posible, colocarla en un confocal invertido con cámara de control de temperatura 2 h antes del inicio del experimento para que la cámara se asiente y atempere.



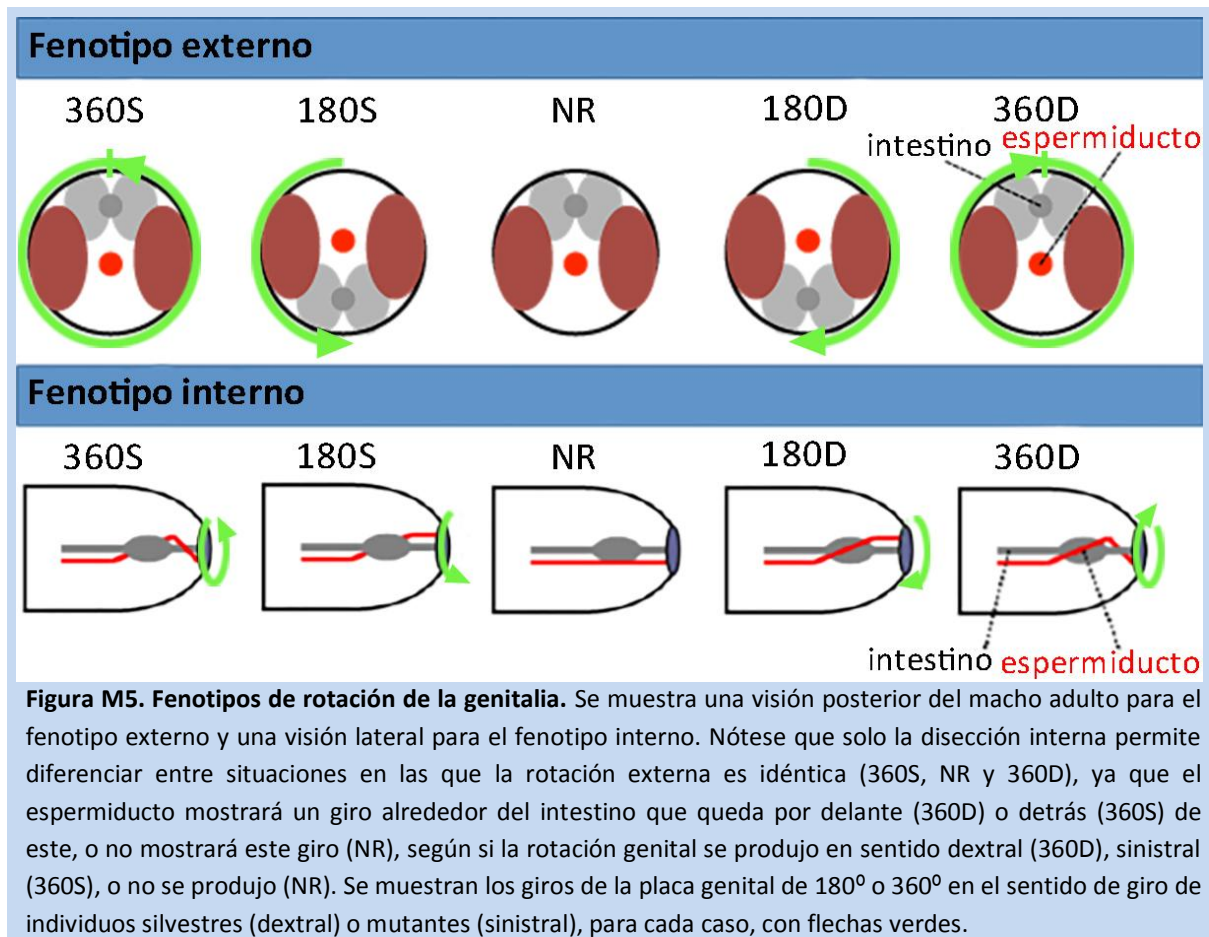


### M.7. Montaje de cutículas de adultos

Las moscas fueron almacenadas previamente a su montaje en medio etanol-glicerol (3:1). Se calentaron en agua destilada a 95°C y se realizaron los cortes de las estructuras deseadas con tijeras de diseccionar. Dichas estructuras fueron incubadas en KOH 10% a 95°C durante 3 min para la eliminación de grasa. Posteriormente fueron lavadas con agua destilada y concentraciones crecientes de etanol hasta su completa deshidratación y montaje en Etanol absoluto y Euparal, para ser observadas en un microscopio óptico compuesto.

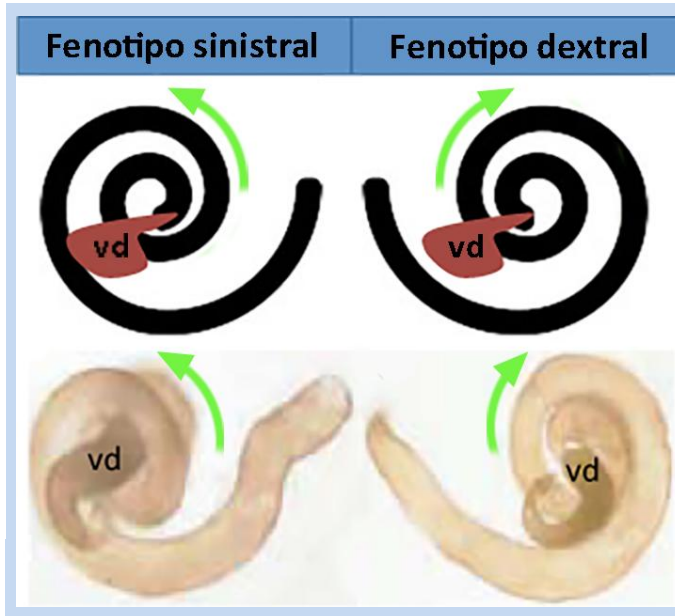
### M.8. Fenotipo de rotación en genitales y testículos

Determinamos el fenotipo de rotación de la genitalia a través de una disección del abdomen posterior de adultos o faratos, para determinar el tipo de giro que el espermiducto (aparato genital) realiza alrededor del intestino. La observación en paralelo de la posición de la genitalia de manera externa y la información que brinda la disección interna, permite determinar tanto la dirección como el grado de rotación. Se nombrarán durante la tesis los siguientes rangos: 360S para sinistral total, 180S para sinistral parcial, NR para no rotación, 180D para dextral parcial y 360D para dextral total (giro silvestre) (Fig. M5). Se pueden observar fenotipos intermedios tales como  $90^\circ$  o  $270^\circ$  en ambas direcciones.



**Figura M5. Fenotipos de rotación de la genitalia.** Se muestra una visión posterior del macho adulto para el fenotipo externo y una visión lateral para el fenotipo interno. Nótese que solo la disección interna permite diferenciar entre situaciones en las que la rotación externa es idéntica (360S, NR y 360D), ya que el espermiducto mostrará un giro alrededor del intestino que queda por delante (360D) o detrás (360S) de este, o no mostrará este giro (NR), según si la rotación genital se produjo en sentido dextral (360D), sinistral (360S), o no se produjo (NR). Se muestran los giros de la placa genital de  $180^\circ$  o  $360^\circ$  en el sentido de giro de individuos silvestres (dextral) o mutantes (sinistral), para cada caso, con flechas verdes.

La rotación de los testículos se analizó a través de la disección del abdomen de individuos adultos o faratos. Se extrajo la genitalia interna y se tuvo en cuenta el giro del testículo respecto a la posición de la inserción del vas deferens que se coloca siempre en la parte superior como punto de referencia, encontrándose testículos que giran de manera sinistral o dextral (giro silvestre) (Fig. M6). En este caso, se considera NR al testículo que no se ha elongado y ha mantenido una forma esférica o parcialmente alargada.



**Figura M6. Fenotipos de rotación de los testículos.** Esquema (superior) y foto (inferior). El vas deferentes (vd) se coloca siempre superior al testículo desde el campo de visión, como referencia para el giro. Nótese que desde el vd, el testículo realiza el giro (flechas verdes) hacia la derecha (dextral) o izquierda (sinistral), permitiendo así distinguir entre el giro silvestre y el mutante, respectivamente (modificado a partir de Hozumi et al., 2006).

### M.9. Análisis de fertilidad

Para el estudio de la fertilidad de los machos, tanto en el estudio de la asimetría genital como testicular, se cruzaron los machos individualmente con 3 hembras vírgenes de la línea Vallecas. Se consideró fértil a cada macho que produjo descendencia, tras analizar esa primera generación filial para asegurar que provenía del macho de estudio. Posteriormente se diseccionó cada macho para asignarle una categoría de rotación genital o testicular. Para el estudio de la asimetría de los testículos solo se tuvieron en cuenta machos con la genitalia bien rotada externamente (360S, NR o 360D), para evitar subestimar la fertilidad de machos con testículos inversamente rotados debido a su infertilidad por defectos en la genitalia. De igual manera, para el estudio de la fertilidad según la rotación genital se utilizaron machos cuyos testículos estuvieran dextralmente rotados.

### M.10. Requerimiento temporal de *MyoID*

Se consiguió la expresión condicional de *MyoID* cruzando *UAS-MyoID-RNAi tub-Gal80<sup>TS</sup>* con la línea 1151-Gal4. A 17°C (temperatura permisiva para Gal80<sup>TS</sup>) se recogieron machos con rotación silvestre y a 29°C (temperatura restrictiva para Gal80<sup>TS</sup>) con rotación inversa. Se realizaron puestas de 24h durante 21 días que se mantuvieron a 17°C y se cambiaron todas de manera simultánea a 29°C. Inversamente, se realizaron puestas de 12h durante 8 días a 29°C y se cambiaron todas de manera simultánea a 17°C. De esta manera se consiguieron individuos que habían pasado su desarrollo a las dos temperaturas cubriendo todo el rango posible, cada 12-24h. Se analizaron los individuos adultos de cada puesta para acotar el momento del desarrollo en el cual debe expresarse el gen *MyoID* para la correcta rotación de los testículos.

### M.11. Producción de líneas LexA y Gal80 del gen *Eip71CD*

Se llevo a cabo el clonaje de las secuencias reguladoras del gen *Eip71CD*, utilizadas previamente para la producción de una línea Gal4 con expresión en las CELs, desde la posición -657 hasta la +11 del promotor (Cherbas et al., 1986, 1991, 2003). Dichos autores llevaron a cabo un proceso de clonaje con enzimas de restricción; sin embargo, nosotros hemos optado por llevar un clonaje a través de PCR, desde la posición -668 a la +11, con el uso de los siguientes *primers*:

*Eip71CD* “forward”: TTATGGATGGATCTATAGATTAGG.

*Eip71CD* “reverse”: TGAAGTGCATCTGCAG.

Se extrajo el DNA genómico de 6 moscas de la línea *Eip71CD*-Gal4, de manera independiente, siguiendo los siguientes pasos: homogeneizar una mosca en 50 µl de buffer de homogenización (10 mM Tris-HCl pH 8.2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl, 200 µg/ml proteinasa K fresca), incubar 30 min a 37°C, inactivar la proteinasa K incubando 2 min a 95°C y recoger el sobrenadante. Se llevó a cabo una PCR con la polimerasa “Taq extension High Fidelity” (ThermoFisher) (T<sup>a</sup> anillamiento=59°C) seguida de un alargamiento de poli-A con la enzima Taq Amplitaq (ThermoFisher) durante 30 min a 72°C. Estas colas poli-A son necesarias para la posterior unión del inserto al vector (con colas poli-T) (Fig. M8). Se corrió el producto de PCR en un gel de electroforesis con agarosa de baja temperatura de fusión (Nusieve) al 1% (tras previa comprobación en gel de electroforesis con agarosa estándar de que los fragmentos tenían el tamaño esperado), y se purificó la banda que contenía el inserto para cada mosca con el “kit” de purificación de PCR QIAquick (Qiagen). Las purificaciones se secuenciaron en el Parque Científico de Madrid.

Las secuenciaciones independientes revelaron pequeñas discrepancias con la secuencia publicada, que sin embargo no afectaban a las secuencias mínimas descritas necesarias para el correcto funcionamiento del *enhancer* (Cherbas et al., 1986) (subrayadas en rojo) (Fig. M7). Repetimos el proceso de extracción de DNA, PCR, purificación y secuenciación, y otras tres muestras independientes dieron los mismos resultados. Además, dado que nuestras secuenciaciones proceden de una línea *Eip71CD*-Gal4, con expresión correcta en las células larvarias, decidimos seguir adelante con el proceso de clonaje con nuestra secuencia.

Drosophila genes z600, gdl, Eip28/29 and mex1  
Sequence ID: X58286.1 Length: 9620 Number of Matches: 1

Range 1: 1558 to 2270 GenBank Graphics

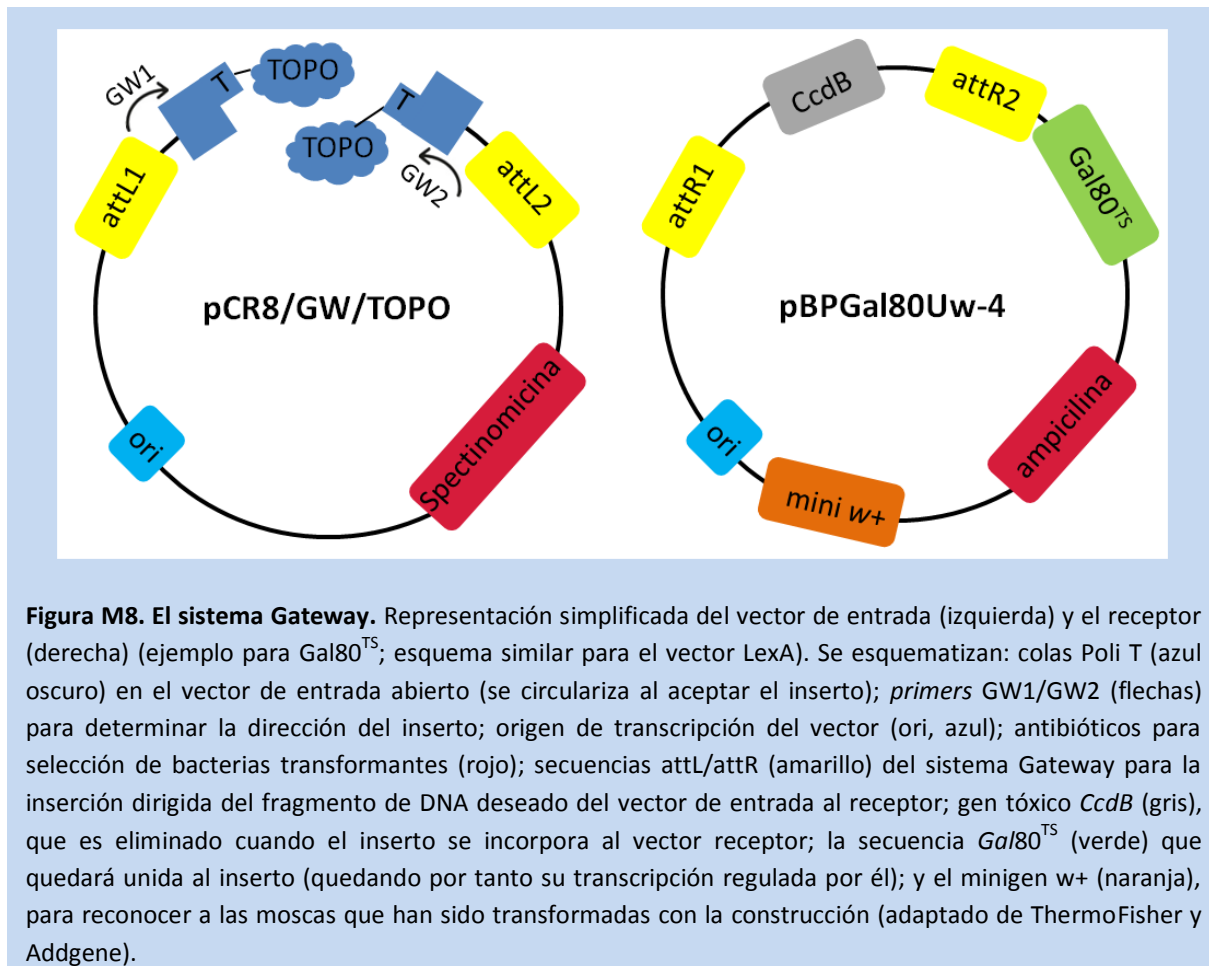
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1249 bits(676)	0.0	706/719(98%)	8/719(1%)	Plus/Plus
Query 1	TTATGGATGGATCTATAGATTAGGTATATTTTAGTATATATTTATCTGCAGATTCTTAT	60		
Sbjct 1558	TTATGGATGGATCTATAGATTAGGTATATTTTAGTATATATTTATCTGCAGATTCTTAT	1617		
Query 61	AATTGAAATGAAATTATAGATAAAATCGTACAATATTTATATTCAGATCGGCTTTATCACT	120		
Sbjct 1618	AATTGAAATGAAATTATAGATAAAATCGTACAATATTTAATTCAGATCGGCTTTATCACT	1677		
Query 121	AAAGATATTTGTTTGTAAATACAAAGTATTTCTAATCATAACTTTAAATGCTTATATGG	180		
Sbjct 1678	AAAGATATTTGTTTGTAAATACAAAGTATTTCTAATCATAACTTTAAATGCTTATATGG	1737		
Query 181	AAATACGAATTTATATTTTGCTACTTTTACTCTCTTCGTTTTTGA-IGTTGAACAAATA	239		
Sbjct 1738	AAATACGAATTTATATTTTGCTACTTTTACTCTCTTCGTTTTTGA-IGTTGAACAAATA	1797		
Query 240	TCTAATATCATTACCGCAGGTTAATGACCAACAATCCACACTTCAAAGGCCGGCGTTCCC	299		
Sbjct 1798	TCTAATATCATTACCGCAGGTTAATGACCAACAATCCACACTTCAAAGGCCGGCGTTCCC	1857		
Query 300	GGCTTCTATGTCACCGAGAATCCCAAGGAGATAAAAAACAATGTTCTGTGGACTTC	359		
Sbjct 1858	G---TCTATGTCACCGAGAATCCCAAGGAGATAAAAAACAATGTTCTGTGGACTTC	1914		
Query 360	ATTTTGCCTTTGAGCCGGC-TAAATACGAGCCCGCAAAATACAGTTAGTCCACAATCC	418		
Sbjct 1915	ATTTTGCCTTTCA-CGGCCGTAAAATACGAGCCCGCAAAATACAGTTAGTCCACAATCC	1973		
Query 419	GGAGAACAACAAAGACTGCACCTTGACTTGTTCAAATAGAAATTTAAAGCAATTAATTT	478		
Sbjct 1974	GGAGAACAACAAAGACTGCACCTTGACTTGTTCAAATAGAAATTTAAAGCAATTAATTT	2033		
Query 479	ATAACCTGATCAAAATGTCAGCTGTACGATCAATTTGGCCCCAAGAACTGTAGAG	538		
Sbjct 2034	ATAACCTGATCAAAATGTCAGCTGTACGATCAATTTGGCCCCAAGAACTGT--AG	2091		
Query 539	CGCTGCGCAGTTTTAATCAGCCTAGAAATCGGGAGAGGAGAAAGAGACGGGACCGGCCGC	598		
Sbjct 2092	CGCTGCGCAGTTTTAATCAGCCTAGAAATCGGGAGAGGAGAAAGAGACGGGACCGGCCGC	2151		
Query 599	CAGAAGACTGAAGAGCGGGAGAATGATAACGATAGCCGGCACTCTCCACATTCCCGTA	658		
Sbjct 2152	CAGAAGACTGAAGAGCGGGAGAATGATAACGATAGCCGGCACTCTCCACATTCCCGTA	2211		
Query 659	GAAAGCGGGAGAGCGGAGTATAAATGGACCGACCTTTCTGCAGATGCATCAGTTCA	717		
Sbjct 2212	GAAAGCGGGAGAGCGGAGTATAAATGGACCGACCTTTCTGCAGATGCATCAGTTCA	2270		

**Figura M7. Clonaje de Eip71CD-Gal4.** Alineamiento de secuencias conocidas para el gen Eip28/29 (sinónimo de Eip71CD-Gal4) y la secuencia obtenida, con la herramienta Blastn (NCBI). Las secuencias son coincidentes en un 98%. Se marcan en rojo las dos secuencias que han sido descritas como necesarias para el correcto funcionamiento del *enhancer*, en las posiciones -440 y -188 del gen (Cherbas et al., 1986)

Se partió de una de las purificaciones para continuar con el protocolo de clonaje, que se llevó a cabo con la técnica Gateway (Life Technologies) (Liang et al. 2013), se utilizó el “kit” de clonaje y el vector de entrada pCR8/GW/TOPO (ThermoFisher) (Fig. M8), que se encuentra en forma lineal (al aceptar el inserto pasa a forma circular replicable) con colas poli-T permitiendo la inserción de fragmentos purificados de PCR con colas poli-A. Se llevó a cabo la inserción del fragmento producto de PCR en el vector de entrada (mezclar 1 µl producto PCR purificado, 1 µl de solución salina, 1 µl de H<sub>2</sub>O y 3 µl de vector de entrada, incubar a temperatura ambiente 30 min) y transformación de células químicamente competentes (Top10, ThermoFisher) (añadir 5 µl de ligación en un vial de bacterias, incubar en hielo 20 min, dar choque térmico 42°C 45 seg y pasar a hielo inmediatamente, añadir 250 µl de medio SOC a temperatura ambiente e incubar a 37°C 1h horizontalmente), y se plaquearon diferentes volúmenes en placas LB-espectinomicina (10 mg/ml) e incubaron a 37°C toda la noche.

Se comprobó por PCR la orientación de la inserción en 10 colonias, gracias a los *primers* GW1 y GW2 del vector propuestos por el fabricante (Fig. M8) y dos *primers* internos de nuestro inserto (uno en la hebra molde y otro en la complementaria). Se realizó un cultivo líquido toda la noche (LB-espectinomicina) de tres colonias cuyo inserto estaba en la orientación deseada, y se realizó la extracción del vector a partir de 9 ml de cultivo, mediante el “kit Wizard Plus SV Minipreps” (Promega). Tras analizar la concentración de DNA en un espectrofotómetro Nanodrop

(ThermoFisher) se secuenciaron los insertos, y puesto que se obtenía en todos ellos la misma secuencia, se eligió uno de los plásmidos para continuar el protocolo.



Se realizaron dos clonajes diferentes para producir dos líneas: *Eip71CD-LexA* y *Eip71CD-Gal80<sup>TS</sup>*, por lo que en adelante el protocolo se produjo de manera independiente y en paralelo para cada uno de ellos. Se utilizaron los vectores receptores pBPnlsLexA::GADfUw y pBPGal80Uw-4 (Fig. M8) (Addgene) (Pfeiffer et al., 2010), para las líneas LexA y Gal80 respectivamente. Se realizó la inserción del fragmento de DNA desde el vector de entrada al receptor (que será un vector de expresión), como sigue: añadir en un *ependorf* 150 ng/μl vector entrada, 150 ng/μl vector receptor, buffer LR 1x, buffer TE 1x, llenar con H<sub>2</sub>O hasta 8 μl, mezclar con la pipeta y añadir 2 μl de enzima clonasa LR, incubar 2h a 25°C y parar la reacción añadiendo 1 μl de proteinasa K e incubando a 37°C durante 10 min. De cada reacción coger 5 μl y añadir a 50 μl de bacterias *E. coli* DH5α. Repetir protocolo de transformación ya descrito, y plaquear diferentes volúmenes en placas LB-ampicilina (100 μg/ml) para incubar a 37°C *overnight*. Gracias al sistema Gateway, solo las bacterias que incorporen un vector con el inserto deseado sobrevivirán, ya que las que incorporen un vector sin recombinar morirán debida al efecto tóxico del gen *CcdB*; y no es necesario comprobar la orientación del inserto gracias a la recombinación attL/attR (vector de entrada secuencias L1/L2 y receptor R1/R2) (Fig. M8)

(Liang et al., 2013). Se realizó una minipreparación de las colonias obtenidas para las dos construcciones y la posterior secuenciación de los insertos, y se seleccionaron las colonias finales para transformar embriones de *Drosophila*.

La transformación (Servicio de Transgénesis de *Drosophila*, CBMSO) se llevo a cabo en los dos brazos de los cromosomas 2 y 3 para cada construcción. Se cruzaron las posibles moscas transformantes por individuos *w*, se seleccionaron los transformantes (la construcción se reconoce gracias a un minigen *w+*) (Fig. M8), se establecieron líneas estables para estos y se utilizaron posteriormente las líneas que mostraron la señal esperada.

### M.12. Adquisición y tratamiento de imágenes

Los tejidos de gran tamaño que no fueron montados se fotografiaron con una Lupa M205FA con cámara DFC500 para fotos a color (Leica Microsystems). Las imágenes de microscopia confocal se obtuvieron en los siguientes microscopios de fluorescencia: Leica TCS SPE, Leica TCS SP8, Zeiss LSM510, Zeiss LSM710, Zeiss LSM710 AxioObserver, Nikon A1R+ Eclipse Ti-E. Los experimentos de *time-lapse* que se realizaron en los microscopios invertidos Leica SP8 o Zeiss LSM710 AxioObserver fueron con cámara de control de temperatura a 25°C.

Los experimentos de *time-lapse* se tomaron a calidad 512 x 512 *pixels* manteniendo los láseres en el menor nivel posible para evitar dañar a las pupas. Las imágenes se procesaron posteriormente con el software Fiji/ImageJ (NIH). Los experimentos *time-lapse* se guardaron en formato de video a 6 fotogramas por segundo para las tomas de imágenes cada 10 min o más y a 15 para los experimentos en que se tomaron imágenes cada 3 min.

En las figuras y películas, todos los abdómenes (tanto adultos, como disecciones pupales o experimentos de *time-lapse*) se muestran orientados: anterior arriba, posterior abajo. Para las disecciones pupales e individuos adultos, además, se ofrece un visión lateral con orientación ventral a la izquierda y dorsal a la derecha. Los experimentos *time-lapse* de abdomen se realizaron desde una visión dorsal. Las imágenes y películas de genitalias se tomaron desde una visión posterior del individuo, y se muestran siempre orientadas: dorsal arriba, ventral abajo. Para los individuos en estadios pupales provenientes de experimentos realizados a 29°C se muestra el tiempo de desarrollo correspondiente a 25°C, estimado por el grado de desarrollo de las estructuras presentes.

### M.13. Mediciones y análisis estadístico

Las medidas de intensidad de fluorescencia y de área se realizaron con las herramientas correspondientes del programa Fiji/ImageJ (NIH). Para la medida de intensidad de fluorescencia los experimentos se realizaron a la vez, siguiendo idénticos tiempos y temperaturas, y las imágenes

fueron tomadas en las mismas condiciones y con escala de 12bits. Se midió la intensidad de igual cantidad de área, en el mismo lugar para todas las muestras.

Se realizaron las medidas de área de los últimos segmentos (A6 y A7) en adulto con el objetivo de dilucidar si hay diferencias significativas entre los grupos control y experimentales en el tamaño del último segmento abdominal (se toma la medida del sexto segmento A6 para normalizar los resultados). Para estos experimentos, así como para el análisis de la velocidad de rotación de la placa genital, se realizó un análisis estadístico U de Mann-Whitney, tomando un  $\alpha=0,05$ .

Para todos los experimentos de los testículos, los análisis de fertilidad y el estudio de la rotación parcial o silvestre de la placa genital se realizó la prueba  $\chi^2$  de Pearson. Téngase en cuenta que en los experimentos de testículos se ha utilizado como número de muestras (n), el número de testículos totales, y no de individuos analizados (excepto para el análisis de fertilidad). Esto produce una disminución en el dato de penetrancia del fenotipo en la población.

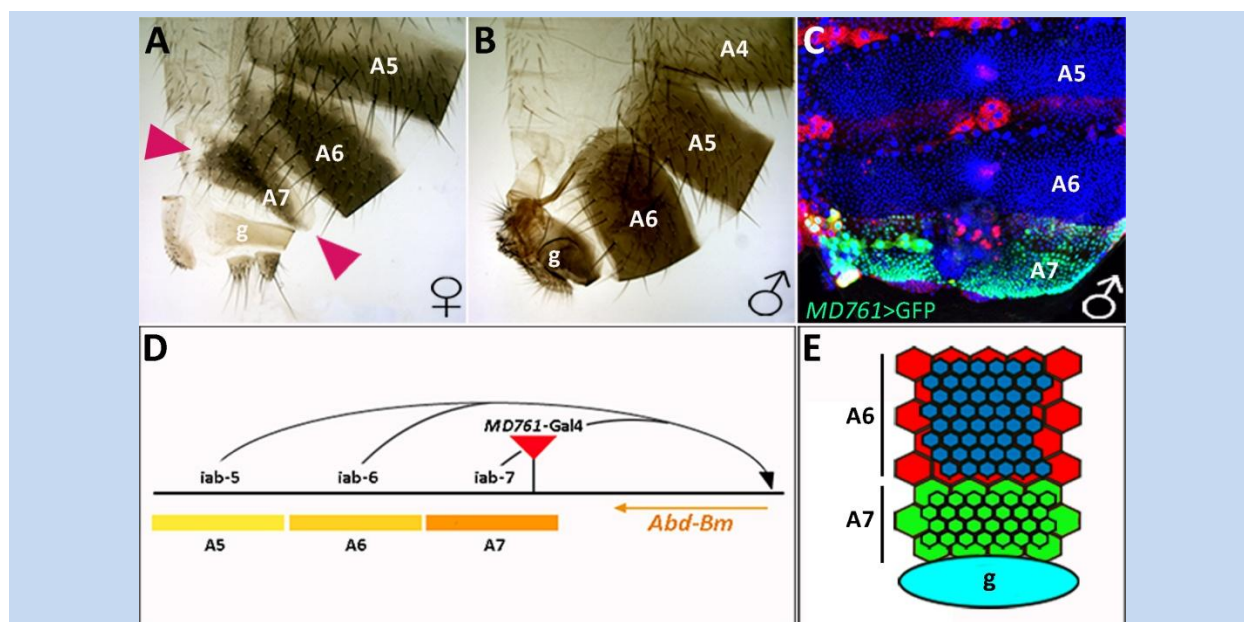
Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa Prism5 (Graphpad). Los resultados se muestran con el error estándar de la media (SEM). Se concluye diferencia significativa entre el grupo control y experimental para un p-valor menor a 0,05 y se ha utilizado un código de asteriscos para representar el grado de significación (\* para  $p<0,05$ , \*\* para  $p<0,005$ , \*\*\* para  $p<0,001$ ). Cuando menor sea el p-valor, más fuerte es la evidencia de que un resultado no se debe al azar.



# **Resultados**

### R.1. Estudio de los mecanismos que regulan el desarrollo del abdomen posterior del macho de *Drosophila melanogaster*

Como se ha explicado, el abdomen de *D. melanogaster* es sexualmente dimórfico, encontrándose el segmento A7 ausente en machos (Fig. R1A,B). Para poder entender los mecanismos que dan lugar a esta diferencia entre machos y hembras se ha utilizado mayoritariamente la línea *MD761-Gal4*, ya que dirige la expresión a las dos poblaciones celulares (CELS e histoblastos) que forman este último segmento (Fig. R1C, E). Realmente, la expresión de esta línea obedece a un patrón parasegmental, debido a que es una inserción P-Gal4 en la región 3' reguladora del gen Hox *Abdominal-B*, que a su vez se expresa con un patrón parasegmental (véase Introducción apartado I.4.); en concreto, en la zona reguladora *iab-7*, responsable de la activación de la transcripción de *Abd-B* en el PS 12 (A6p a A7a, denominado en adelante A7 para simplificar) (Fig. R1C,D).



**Figura R1. El abdomen terminal del adulto y la línea *MD761-Gal4*.** (A) Abdomen de una hembra silvestre que muestra una segmento A7 (puntas de flecha granates), frente a (B) el abdomen de un macho silvestre, en el que este A7 está ausente. (C) Expresión de la línea *MD761-Gal4* en los segmentos posteriores abdominales durante el desarrollo pupal de un macho de genotipo *w<sup>1118</sup>; UAS-GFP; MD761-Gal4 hh-LexA LexO-Cherry*, visualizándose la expresión a través de GFP en el A7. Nótese que la expresión realmente corresponde al parasegmento 12, que incluye el A6p (que se observa marcado en rojo gracias al marcaje de los compartimentos posteriores de cada segmento con *hh-LexA LexO-Cherry*) y el A7a. Topro (en azul), marca los núcleos. (D) Esquema de la inserción *MD761-Gal4* en la región 3' reguladora de *Abd-B*, en concreto en el dominio *iab-7*, que es el responsable de la activación de la transcripción de *Abd-B* en el segmento A7. Se muestran el transcrito *Abd-Bm*, y las zonas reguladoras *iab-5*, *iab-6* e *iab-7*, que regulan la expresión de *Abd-B* en los segmentos A5, A6 y A7, respectivamente. En la parte inferior se indica como los niveles de la proteína *Abd-B* aumentan en segmentos posteriores. (E) Esquema del dominio de expresión de la línea *MD761-Gal4* durante estadios pupales tanto en el macho como en la hembra. Esta línea se expresa (indicado en la figura en verde, como sería gracias a la expresión de GFP) en el segmento A7 (PS12, se utiliza en adelante segmento A7 para simplificar). Nótese que esta línea Gal4 se expresa tanto en las CELS (hexágonos grandes verdes, células GFP positivas grandes en C) como en los histoblastos (hexágonos verdes pequeños, células GFP positivas pequeñas en C) de este segmento. No se observa expresión en el segmento A6 (con excepción del A6p, no dibujado para simplificar) ni en CELS (hexágonos grandes rojos) ni en histoblastos (hexágonos pequeños azules), ni en genitalia (g, azul claro).

### **R.1.1. Estudio de la muerte celular en el abdomen posterior del macho**

A pesar de que ya se había estudiado previamente la muerte celular tanto en las CELs como en el nido de histoblastos del A7 (Foronda et al., 2012, 2015; Ninov et al., 2007), decidimos ahondar en este tema debido a la aparición de nuevas herramientas, tanto para la detección de apoptosis como para su inhibición, con el fin de esclarecer la implicación de este proceso en la desaparición del último segmento abdominal en los machos.

#### **R.1.1.1. Apoptosis en el abdomen posterior del macho silvestre**

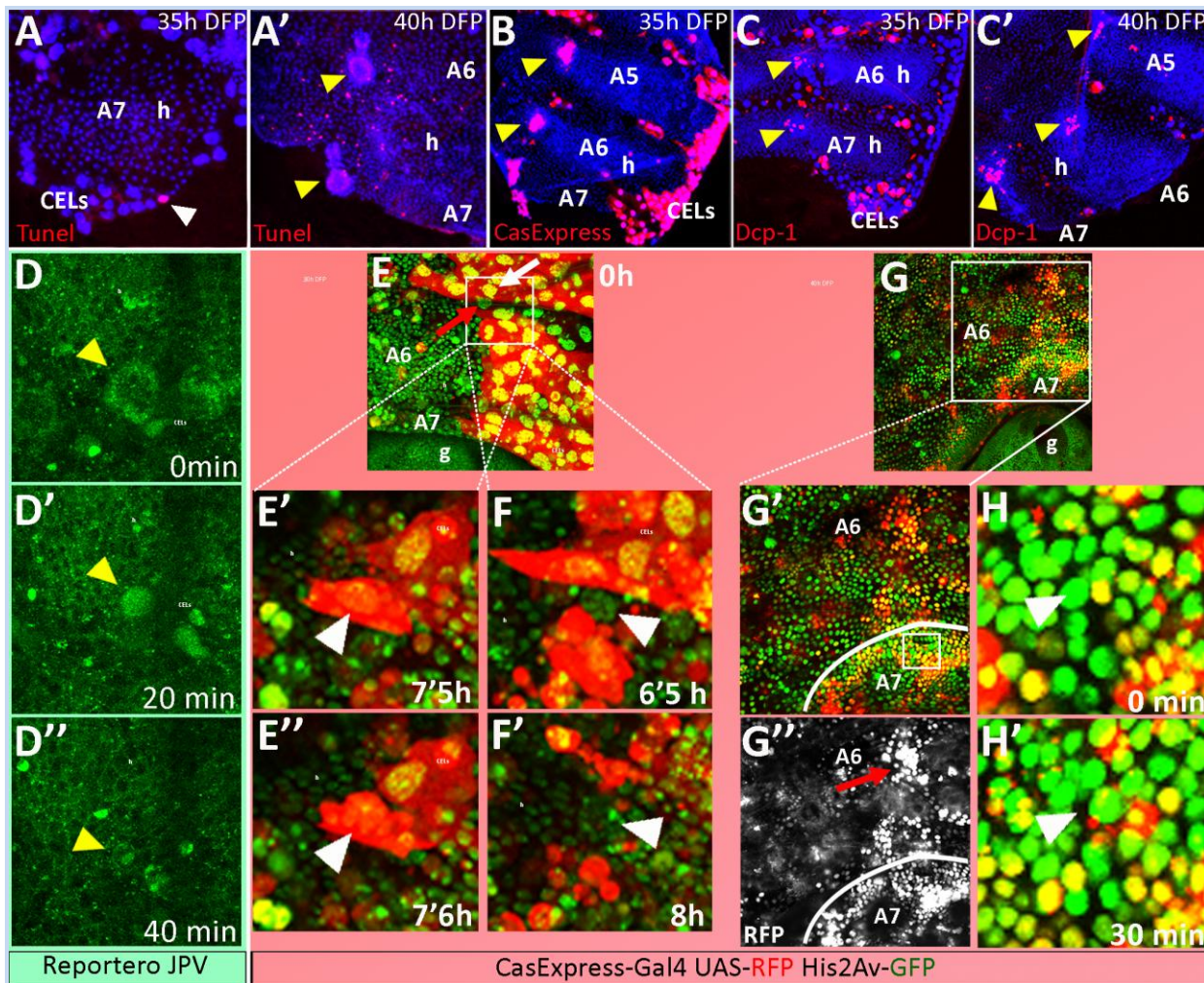
Durante este trabajo se analizaron varios marcadores de muerte celular, basados o no en la detección de caspasas, observándose una gran variabilidad en las células detectadas como apoptóticas en histoblastos y CELs según la herramienta analizada, así como en el tiempo en el que se activan estos marcadores antes de la delaminación celular (para experimentos *time-lapse*).

Respecto a los marcadores independientes de caspasa, se analizaron los marcadores Naranja de Acridina y Tunel. Para Naranja de Acridina no se consiguieron las condiciones necesarias para marcar de manera consistente los nidos de histoblastos o CELs sin que el tratamiento produjera una alta letalidad. Mediante la técnica de Tunel se analizaron un total de 26 abdómenes pupales. Se detectaron muy pocas CELs marcadas (Fig R2A), entre una y ninguna por abdomen analizado, para estadios inmediatamente anteriores a la extrusión de las mismas. Se ha descrito que las CELs se marcan con TUNEL durante su delaminación o justo tras esta (Ninov et al., 2007), lo que puede explicar la escasa señal observada. En estadios posteriores, alrededor de las 40h DFP, cuando se están delaminando los histoblastos del A7, no se observaron más células positivas para TUNEL en este segmento que en el A6 (Fig. R2A'). Sí se observa un aumento de células positivas alrededor de los espiráculos de todos los segmentos posteriores (puntas de flecha amarillas en Fig. R2A'), siendo este patrón común a todas las herramientas de muerte celular analizadas (Fig. R2A'-C').

Se analizaron los siguientes marcadores de apoptosis basados en la detección de caspasas:

- El indicador CasExpress. Se basa en la activación del sistema Gal4/UAS ante la presencia de varias caspasas. Con esta herramienta, a diferencia de la detección por TUNEL, se observa apoptosis en todas o casi todas las CELs del abdomen (Fig. R2B), en todos los estadios previos a su delaminación analizados (24h DFP-38h DFP) (n=70). La activación del "reportero" se produce como mínimo 8 horas antes de la delaminación de cada CEL (tiempo de observación en experimentos de *time-lapse*, las células están marcadas antes del inicio de cada experimento) (Fig. R2E-E''. Película 1). Curiosamente, en algunos casos, aunque con baja frecuencia, se observan CELs que se extruyen del tejido sin llegar a activar nunca este indicador (Fig. R2E, F-F'. Película1), sugiriendo que estas células no necesitan la activación de caspasas para su delaminación. En general, estas CELs negativas para CasExpress se extruyen más

tardíamente que el resto. Respecto a los histoblastos, y a diferencia de los resultados obtenidos con TUNEL o anticuerpo anti Dcp-1 (véase más adelante), se observa una mayor concentración de células marcadas positivamente en el A7 que en el A6 en los estadios en los que este último se está extruyendo (Fig. R2G-G''. Película 2). Sin embargo, en todos los casos analizados se obtuvieron histoblastos del A7 que se extruyen del tejido sin activar el "reportero" (Fig. R2H, H'. Película 2). Curiosamente, en estas filmaciones, realizadas desde una vista dorsal (a diferencia de las disecciones, que se realizaron en vista lateral), se observó en todos los casos un aumento de la señal en los histoblastos de la línea dorsal de todos los segmentos posteriores (Fig. R2G-G''. Película 2).



**Figura R2. Muerte celular en el segmento A7 del macho.** En la fila superior se muestran disecciones de abdomenes de machos en diferentes estadios de la pupación con marcadores de muerte celular. Topro (en azul), marca los núcleos. **(A)** La tinción para TUNEL (rojo), permite detectar células con fragmentación nuclear que van a morir. En estadios previos a la extrusión del A7 (35h DFP) muy pocas CELs (que si se están extruyendo en este estadio) mostraron marcaje positivo de TUNEL. En la imagen se destaca una sola célula positiva para TUNEL en el A7 (punta de flecha blanca). **(A')** En estadios durante la extrusión del A7 (40h DFP), las CELs ya se han extruido, y no se observa mayor número de células (histoblastos, h) TUNEL positivas en el A7 que en el A6. **(B)** La herramienta CasExpress (*CasExpress-Gal4 UAS-GFP/+*, el color ha sido modificado a rojo para facilitar la comparación con el resto de marcadores), marca la mayoría de las CELs. **(C, C')** La tinción con anticuerpo anti Dcp-1 (rojo) permite detectar la muerte de algunas CELs en estadios tempranos (35h DFP) (C) y tardíos (40h DFP; C'). Nótese la diferencia en número de CELs que se detectan con cada marcador de muerte celular. Respecto a los histoblastos (h), no se encuentra mayor número de células marcadas en el nido dorsal del A7 que

del A6 (muy escasas en ambos), y se observa un acúmulo de células marcadas alrededor de los espiráculos en todos los segmentos (puntas de flecha amarillas). **(D-D'')** Ampliaciones de imágenes de la Película 3. Se ha resaltado la activación del "reportero JPV", que pasa de la membrana (**D**) al núcleo (**D'**) de una CEL (punta de flecha amarilla). Nótese que una vez activado el "reportero", la célula se extruye (**D''**) al cabo de veinte minutos (comparar tiempo de D'' con D'). **(E-H')** Detección de muerte celular mediante el "reportero" CasExpress visualizado gracias a la expresión de RFP (genotipo *w*; CasExpress-Gal4/UAS-RFP *His2Av*-GFP). **(E-F')** Imágenes tomadas de la Película 1. **(E)** A las 30h DFP, la activación del "reportero" se detecta en casi todas las CELs (células grandes respecto a histoblastos, más pequeños). **(E')** Detalle de E: La expresión de este "reportero" se puede observar desde (cómo mínimo) ocho horas antes de la delaminación de cada CEL. Se resalta el momento de fragmentación nuclear (**E''**). Nótese que la misma CEL ya era RFP positiva al inicio del experimento (flecha blanca en E). **(F-F')** Detalle de E mostrando la extrusión de una CEL sin mostrar activación del "reportero" (misma CEL RFP negativa del inicio del experimento, flecha roja en E). **(G-H')** Expresión del "reportero" CasExpress es los segmentos A6 y A7, durante la extrusión de este último (se han eliminado los macrófagos para facilitar la visión) (Película 2). **(G'-G'')** Detalle del recuadro en G. La identificación del límite de separación entre A6 y A7 se ha llevado a cabo por la posterior desaparición de histoblastos del A7 en el experimento *in vivo*. Se observan grupos de histoblastos (h) RFP positivos en todos los segmentos, encontrándose una mayor densidad en la línea dorsal (flecha roja en G''). Nótese que hay más acumulación de células RFP (en rojo en G', en blanco en G'') en el A7 que en el A6. **(H-H')** Detalle (zoom del área delimitada en G') de la delaminación de un histoblasto sin mostrar signos de presencia de caspasas (RFP negativo) (punta de flecha blanca). Los tiempos mostrados en los paneles inferiores no son tiempos de desarrollo sino tiempos referenciados al inicio de los experimentos *in vivo* (0 horas). Experimentos realizados a 29°C.

- El anticuerpo contra la caspasa efectora Dcp-1. En estadios tempranos, durante la extrusión de las CELs, se detectaron varias células positivas por segmento (Fig. R2C), siendo este número menor que el observado con el "reportero" CasExpress, pero mayor que con Tunel. La tinción de estadios posteriores (alrededor de 40h DFP) no permite detectar diferencias en el número de histoblastos marcados en el A6 respecto a los del A7 (Fig. R2C'), al igual que ocurría con la tinción Tunel. Como con el resto de marcadores, la zona espiracular muestra en todo momento un elevado número de histoblastos positivos (puntas de flecha amarillas en Fig. R2C, C') ( $n > 30$  abdómenes pupales).

- El "reportero JPV". Se activa por la presencia de la caspasa iniciadora Dronc, y es una construcción en la que la proteína GFP pasa de la membrana al núcleo al activarse esta caspasa. Este "reportero" no mostró apenas señal en los histoblastos. Se observó su activación en las CELs ( $n=6$  películas), pero a diferencia de lo obtenido con la herramienta CasExpress, solo unos 20 minutos previos a su delaminación (Fig. R2D-D''). Película 3).

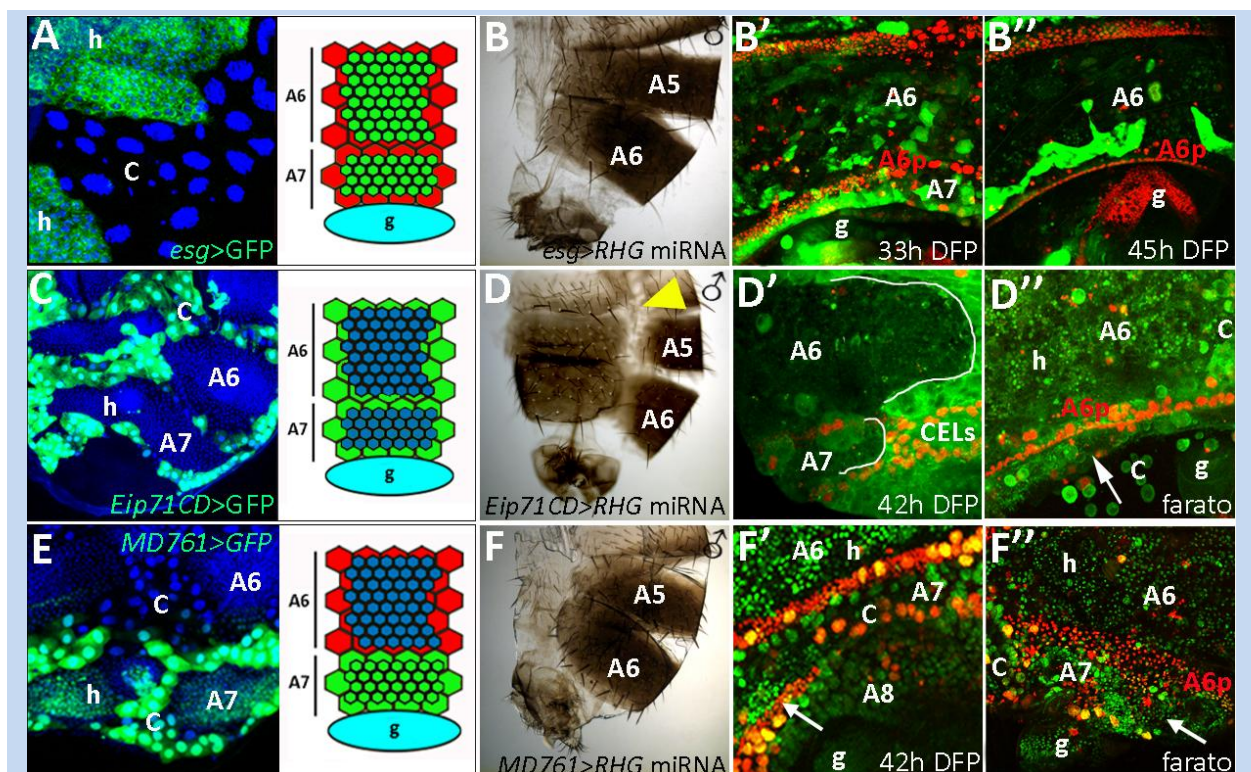
Vemos pues que con distintas herramientas obtuvimos distinta detección de células apoptóticas, con señal distinta o no en el segmento A7 respecto al A6 (véase Discusión).

### R.1.1.2. Inhibición de la apoptosis en el abdomen posterior del macho

Para probar si existía requerimiento de la muerte celular para la extrusión del A7 del macho llevamos a cabo la sobreexpresión de un miRNA contra los tres genes proapoptóticos, *reaper*, *hid* y *grim* (Siegrist et al., 2010), en las diferentes poblaciones celulares implicadas.

La sobreexpresión de este miRNA con la línea *esg-Gal4*, que se expresa en los histoblastos pero no en las CELs (Fig. R3A), no impidió la correcta delaminación del A7 en los machos en su estadio pupal correcto, entre las 35h y las 44h DFP (n=56 adultos y 5 películas) (Fig. R3B-B''). Película 4). La inhibición de la apoptosis solo en las CELs, con la línea *Eip71CD-Gal4* (Fig. R3C), impidió el cierre dorsal de los terguitos de todos los segmentos (punta de flecha amarilla en Fig. R3D), pero no produjo la aparición de un A7 en el macho adulto (n=100 adultos) (Fig. R3D). Durante experimentos de *time-lapse* (n=17 películas) (Película 5), se observó, como se esperaba, un retraso en la delaminación de las CELs de todos los segmentos, pues estas se encontraban presentes en estadios en los que ya deberían haber desaparecido (40h DFP). Interesantemente, encontramos un diferente comportamiento entre el nido de histoblastos del A7 y los nidos anteriores (Fig. R3D'), pues los histoblastos del A7 no eran capaces de proliferar y cubrir el abdomen previamente a su extrusión (como ocurre en machos silvestres), mientras que los nidos anteriores acababan cubriendo casi con totalidad el abdomen (excepto por unas CELs que permanecen en la línea media). Respecto a la delaminación de los histoblastos del A7, el análisis de estas películas no permitió ver con claridad si todos se delaminaban (en su caso, lo harían de manera anormal, rodeados de CELs) o si algunos permanecían en el tejido, por lo que recurrimos al estudio de faratos (n=15). Algunos faratos mostraban pequeñas agrupaciones de tejido (flecha blanca en Fig. R3D'') posterior al A6p (rojo en Fig. R3D''), lo que podría indicar que algunos histoblastos no se han delaminado al inhibir la apoptosis en las CELs (aunque el posible tejido A7 es menor que al inhibir la muerte en ambas poblaciones celulares, véase a continuación). Por último, cuando se inhibió la apoptosis en todo el A7, tanto en los histoblastos como las CELs, con la línea *MD761-Gal4* (Fig. R3E), tampoco se obtuvo la aparición de un A7 en el macho adulto (n=80 adultos) (Fig. R3F). Sin embargo, el estudio del proceso durante el desarrollo pupal en experimentos de *time-lapse* (n=12 películas), o de los faratos de este mismo genotipo (n=5), mostró que las CELs sufren un retraso en su delaminación (Fig. R3F'), no se extruyen totalmente del tejido, quedando algunas incluso en estadios adultos (Fig. R3F''); y al menos parte del nido de histoblastos del A7 de estos faratos no se ha extruido y permanece en el tejido abdominal (flechas blancas en Fig. R3F, F''). Película 6, comparar con Fig. R3D''), a pesar de no diferenciar un segmento A7 en el adulto (Fig. R3F). Esto sugiere que el retraso producido en la eliminación de las CELs (Fig. R3F') puede impedir la correcta expansión y posterior delaminación o diferenciación de los histoblastos.

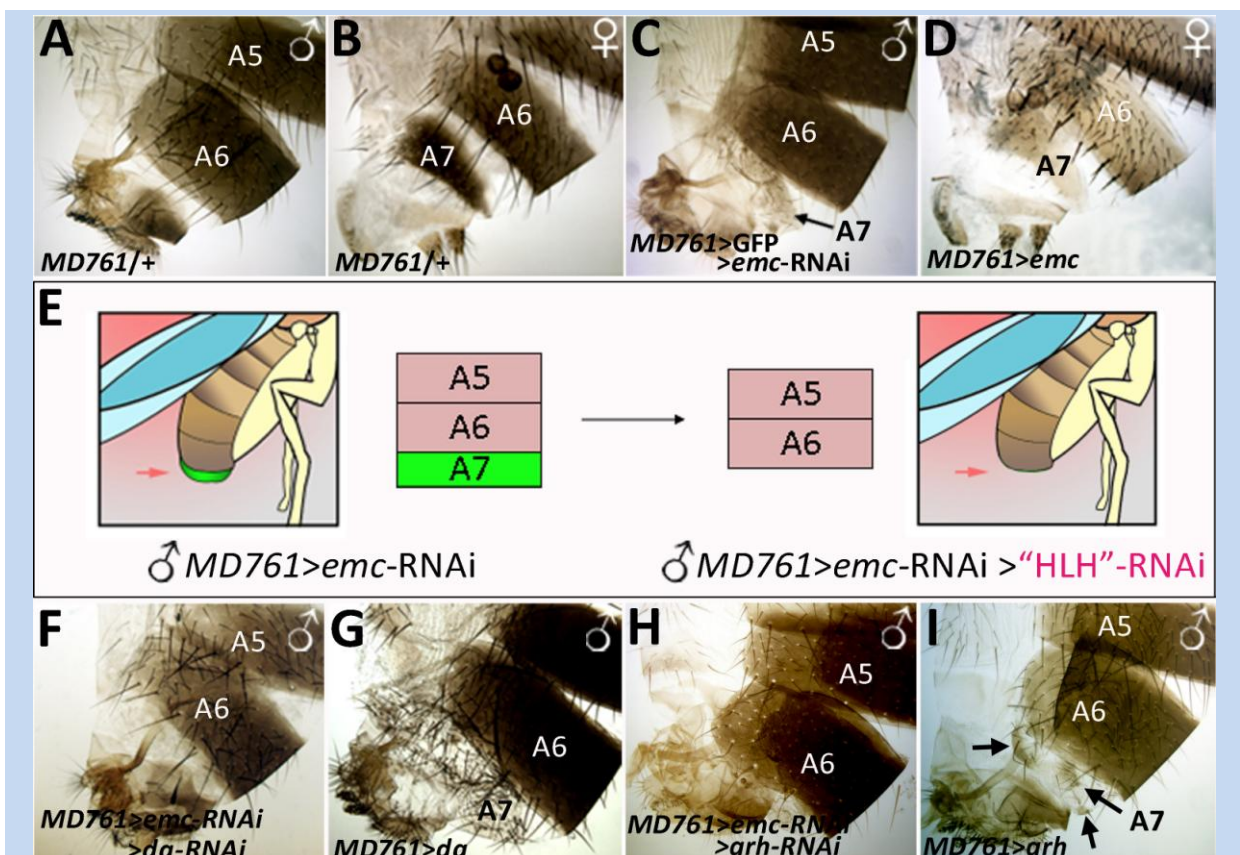
Los resultados sugieren que cuando no se produce una eliminación correcta y en el momento adecuado de las CELs, los histoblastos del A7 no se extruyen en su totalidad, si bien los remanentes no llegan a diferenciar en el adulto. Los resultados más extremos obtenidos con la línea *MD761-Gal4* que con las otras dos usadas pueden deberse a que la primera afecta a los dos tipos celulares o a que su nivel de expresión es probablemente mayor.



**Figura R3. Inhibición de la apoptosis en el segmento A7. (A-B'')** Fila superior: resultados para la inhibición de la apoptosis en histoblastos. **(A)** *esg*-Gal4 UAS-GFP en el abdomen pupal y esquema. Esta línea se expresa en los histoblastos (h) de todos los segmentos (hexágonos pequeños verdes y células pequeñas), pero no en las CELs (hexágonos rojos grandes y células de mayor tamaño, C). No se esquematiza su expresión en la genitalia (g). **(B)** Cuando se inhibe la apoptosis en este tejido (*w*; *esg*-Gal4 UAS-GFP/UAS-*RHG* miRNA), el adulto no muestra un A7. **(B'-B'')** Imágenes tomadas de experimentos *in vivo* (Película 4) durante el desarrollo pupal de estos machos (*w*; *esg*-Gal4 UAS-GFP/UAS-*RHG* miRNA; *hh*-Dsred/+). Se observa como el A7 (B'), desaparece durante la pupación (B''). **(C-D'')** Fila intermedia: resultados para la inhibición de la apoptosis en las CELs. **(C)** *Eip71CD*-Gal4 UAS-GFP en el abdomen pupal y esquema. Esta línea se expresa en las CELs (C) de todos los segmentos (hexágonos grandes verdes y células grandes), pero no en histoblastos (hexágonos azules pequeños y células pequeñas, h). **(D)** Cuando se inhibe la apoptosis en este tejido (*w*; *Eip71CD*-Gal4/UAS-*RHG* miRNA) el adulto no muestra un A7, pero se impide el cierre dorsal (punta de flecha amarilla). **(D')** Imagen tomada de experimento *in vivo* durante el desarrollo pupal de estos machos (Película 5) (*w*; *Eip71CD*-Gal4 UAS-GFP/UAS-*RHG* miRNA; *sqh*-GFP/*hh*-Dsred). Se observa un diferente comportamiento entre el nido de histoblastos del A7 (que no prolifera) y del A6. Se marcan los bordes de los nidos (línea blanca). **(D'')** En los faratos de este genotipo algunos histoblastos del A7 permanecen sin delaminar (flecha blanca por detrás de A6p, en rojo) y muchas CELs (C) quedan delaminadas en forma esférica. **(E-F'')** Fila inferior: resultados para la inhibición de la apoptosis en las CELs y histoblastos del A7. **(E)** *MD761* UAS-GFP en el abdomen pupal y esquema. Esta línea se expresa en los histoblastos (h, hexágonos pequeños verdes y células pequeñas) y CELs (C, hexágonos grandes verdes y células grandes) del A7, pero no en segmentos anteriores (hexágonos rojos grandes y pequeños azules). **(F)** Cuando se inhibe la apoptosis en el A7 (*w*; UAS-*RHG* miRNA/+; *MD761*-Gal4/+), el adulto no muestra un A7 (a pesar de haber tejido A7, véase F''). **(F')** Imagen tomada de experimento *in vivo* (Película 6) durante el desarrollo pupal de estos machos (*w*; UAS-*RHG* miRNA/+; *MD761*-Gal4 *hh*-Dsred *His2Av*-GF /+). Las CELs (C, células grandes) del A7 y A8 sufren un retraso en su extrusión (comparar con el A6, en el que ya no hay CELs, y está formado exclusivamente por histoblastos, h). Los histoblastos del A7 no proliferan con normalidad (nótese la diferencia en tamaño del nido de histoblastos de A7 (flecha blanca) respecto al A6, cubierto totalmente por histoblastos). **(F'')** El farato de este genotipo muestra tejido A7 (flecha blanca) que no se ha extruido, y que se reconoce porque queda comprendido entre el A6p (rojo) y la genitalia (g) (fenotipo más drástico que al afectar solo las CELs, comparar con D''). Nótese también las CELs (C, de mayor tamaño respecto a histoblastos, h) persistentes. Topro (azul) marca núcleos. Compartimentos posteriores marcados en rojo (*hh*-Dsred). Experimentos a 29°C.

### R.1.2. Implicación de proteínas HLH en la extrusión del segmento A7 del macho

Como ya se ha explicado, la proteína HLH Extramacrochaetae (Emc) parece tener un papel clave en la regulación de la extrusión del A7 (Foronda et al., 2012, 2015). Cuando se reducen sus niveles con la línea *MD761-Gal4* aparece un A7 en los machos ( $n=176$ ) (Fig. R4C, comparar con A); sin embargo, su sobreexpresión con esta misma línea no es suficiente para producir la extrusión del A7 de las hembras ( $n=30$ ) (Fig. R4D, comparar con B), siendo por tanto una proteína necesaria, pero no suficiente para el proceso en estudio.



**Figura R4. Función de las proteínas HLH en la supresión del A7 del macho.** (A, C) Cuando se reduce la cantidad de la proteína Emc ( $w$ ; *UAS-emc-RNAi/UAS-GFP*; *MD761-Gal4/+*). Véase Fig. R1 para la expresión dirigida por esta línea), aparece un segmento extra (A7), en el macho (C), ausente en el control (A) ( $w$ ; *MD761-Gal4/+*), que muestra, como los individuos silvestres, 6 segmentos abdominales. (B, D) Sin embargo, Emc no es suficiente para producir la extrusión del A7, pues su sobreexpresión en hembras (*UAS-emc/+*; *MD761-Gal4/+*) no elimina este segmento (nótese que sí produce la pérdida de cerdas) (D), incluso parece que presenta un tamaño similar al de una hembra control (B). (E) Modelo experimental para encontrar otras proteínas HLH, que compitan con Emc en su función de extrusión del A7. En un fondo genético en el que aparece un A7 ( $w$ ; *UAS-emc-RNAi/UAS-GFP*; *MD761-Gal4/+*) se reduce la cantidad de otras proteínas HLH mediante la expresión de sus RNAis, y se observa si el pequeño A7 se elimina. En este modelo, la inhibición de Da (F) ( $w$ ; *UAS-emc-RNAi/+*; *MD761-Gal4/UAS-da-RNAi*) produce el rescate del fenotipo silvestre en machos (comparar con C). (G) Cuando se aumentan los niveles de Da ( $w$ ; *UAS-da/tub-Gal80<sup>TS</sup>*; *MD761-Gal4/+*) aparece un A7 grande y despigmentado con muchas cerdas. (H) De manera similar a Da, la inhibición de Grh ( $w$ ; *UAS-emc-RNAi/+*; *MD761-Gal4/UAS-grh-RNAi*) suprime la formación de un segmento extra (comparar con C) y su sobreexpresión (I) ( $w$ ; *tub-Gal80<sup>TS</sup>/UAS-grh*; *MD761-Gal4/+*), produce la aparición de un pequeño A7 (flechas negras). Experimentos realizados a 29°C; los cambios de temperatura para experimentos con *tub-Gal80<sup>TS</sup>* se llevaron a cabo en pupas blancas. En la Figura (y posteriores) se utiliza el símbolo "+" para indicar el cruce con cepa silvestre.

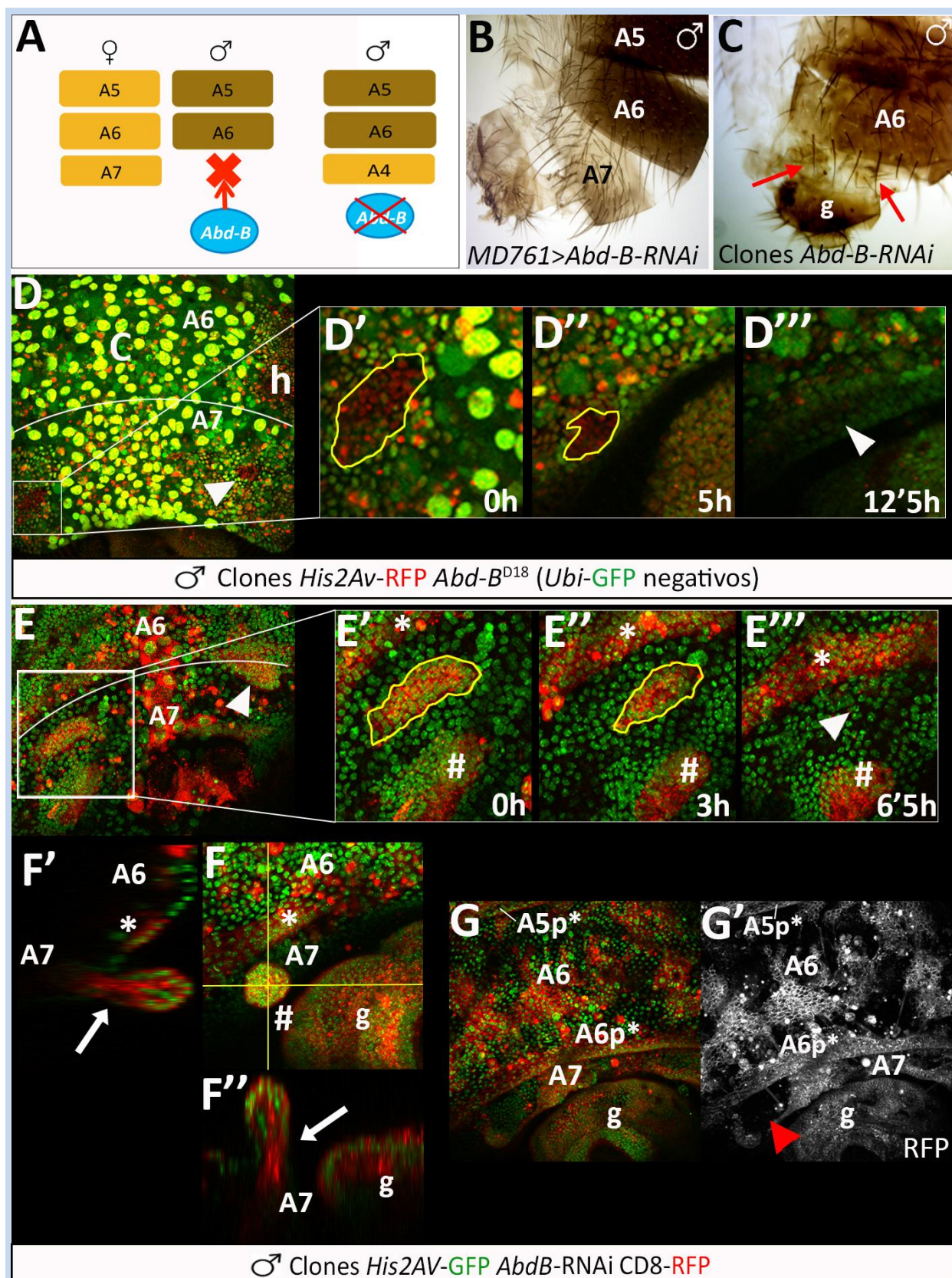


Debido a que esta proteína ha perdido su región al DNA y actúa secuestrando a otras HLH, impidiendo así su función propia como factores de transcripción (Campuzano, 2001; Ellis et al., 1990; Garrell y Modolell, 1990), decidimos buscar otras proteínas HLH que pudieran estar implicadas en la extrusión de este último segmento abdominal. Para ello se diseñó por D. Foronda un experimento en el que, en un fondo mutante en el que aparece un pequeño A7 en el macho, se redujeran los niveles de otras proteínas HLH, de manera que las proteínas que compitieran con Emc producirían un rescate del fenotipo (Fig. R4E). Las proteínas elegidas para ser testadas bajo este modelo experimental se seleccionaron a partir de experimentos previos realizados en el laboratorio, habiendo mostrado en ellos su capacidad para reducir el tamaño del segmento A7 que aparece en un fondo mutante para Emc. Se seleccionaron y testaron las siguientes proteínas: Similar (Sima), Spineless (Ss), Salivary gland-expressed bHLH (Sage), germ cell-expressed bHLH-PAS (Gce), Daughterless (Da) y Grainyhead (Grh). Aunque al reducir los niveles de todas ellas se consiguió reducir el tamaño o eliminar el A7, fueron la reducción de los niveles de expresión de los genes *da* (n=189) y *grh* (n=20) los que arrojaron mejores resultados, inhibiéndose en ambos casos de manera completa la aparición del A7 (Fig. R4F, H). Además, la sobreexpresión de estas proteínas con la línea *MD761* bastó para producir la aparición de este segmento (n=127 para *Da* y 51 para *Grh*) (Fig. R4G, I). Por el contrario, para el caso de *Da*, la sobreexpresión de esta proteína en forma de homodímero (n=20) no produjo esta aparición de un segmento extra en el macho, indicando que su función en el A7 no se debe a su función como homodímero, y puede ser debida, al menos en parte, a su interacción con Emc.

### **R.1.3.Requerimiento a nivel autónomo celular del gen *Hox Abdominal-B* y los genes de determinación sexual en la extrusión del segmento A7**

#### **R.1.3.1. Papel de *Abdominal-B* en la extrusión celular del segmento A7**

*Abdominal-B* es un gen clave para la correcta regulación de la extrusión del A7 del macho, y en su ausencia aparece un A7 transformado en A4 (Sánchez-Herrero et al., 1985; Tiong et al., 1985) (Fig. R5A, B). Para estudiar si la falta de *Abd-B* impide la extrusión de forma autónoma celular decidimos estudiar la extrusión celular en clones de pérdida de *Abd-B* durante la pupa. Dado este objetivo, el marcaje diseñado para los mismos no incluía marcadores cuticulares. Aun así, se observaron grupos de células en el abdomen adulto con pérdida de pigmentación en el A5 y A6 (sugiriendo transformación hacia anterior) y, aunque en baja proporción, tejido A7 (Fig. R5C). Para analizar el proceso de formación de los clones en este segmento durante el desarrollo pupal se analizaron películas con clones mutantes.



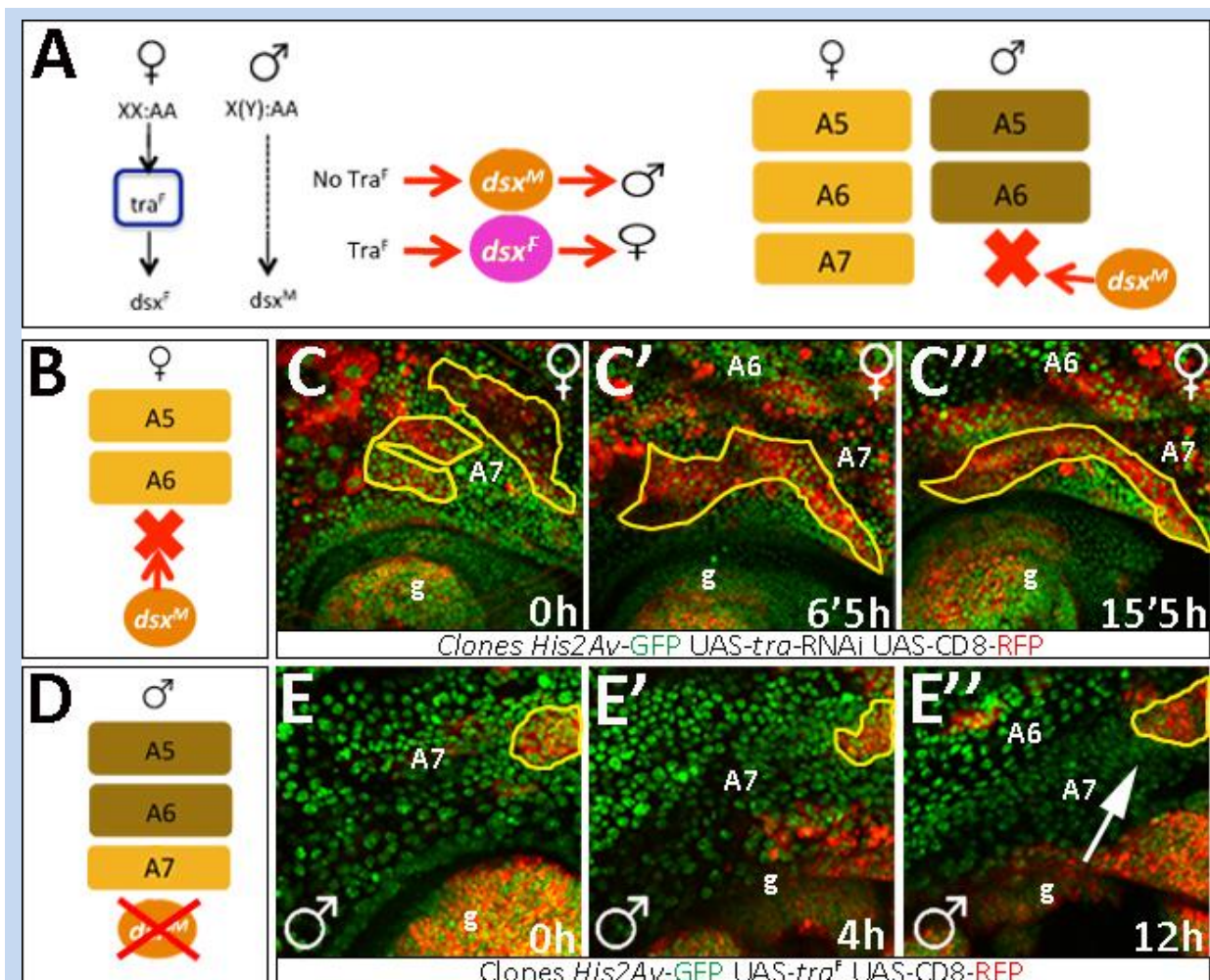
**Figura R5. Papel de *Abd-B* en la extrusión celular del segmento A7. (A)** Esquema que muestra el requerimiento de *Abd-B* (junto con *dsx<sup>M</sup>*) para producir la eliminación del segmento A7 del macho. Cuando se inhibe *Abd-B* (derecha), aparece un segmento A7. **(B)** Macho adulto (*w*; *MD761-Gal4/UAS-Abd-B-RNAi*) que muestra la aparición de un A7 que se asemeja a un A4. **(C)** Cuando se producen clones de pérdida de *Abd-B* (*hs-flp122*; *Act>y<sup>+</sup>>Gal4 UAS-CD8-RFP/+*; *UAS-Abd-B-RNAi/His2Av-GFP*) aparece en el adulto, aunque con poca frecuencia, tejido en la zona presuntiva del A7 (flechas rojas entre el A6 y la genitalia, g). **(D-D''')** Extrusión de clones

mutantes para *Abd-B* en el A7 del macho. Imágenes tomadas de un experimento *in vivo* (Película 7, individuos de genotipo *hs-flp122; His2Av-RFP/+; FRT82B Abd-B<sup>D18</sup>/FRT82B Ubi-GFP*). Se muestra en **(D)** una vista general del abdomen al inicio de la película (CELS, C; histoblastos, h) con varios clones en el A7 (se han separado el A6 y el A7 por una línea blanca); los clones se identifican por ser grupos celulares expresando el marcador rojo, pero no el verde, como el destacado con una punta de flecha blanca. **(D'-D''')** Detalle del comportamiento de uno de estos clones (delimitado en amarillo para su mejor seguimiento) en el tiempo. Nótese que el clon sufre extrusión basal (D'' y punta de flecha blanca en D'''). **(E-E''')** Eliminación de clones mutantes para *Abd-B* en el A7 del macho. Imágenes tomadas de un experimento *in vivo* (Película 8, individuos de genotipo *hs-flp122; Act>y<sup>+</sup>>Gal4 UAS-CD8-RFP/+; UAS-Abd-B-RNAi/His2Av-GFP* para E-G'). Se muestra en **(E)** una vista general del abdomen posterior al inicio de la película, con varios clones en el A7 (se han separado el A6 y el A7 por una línea blanca), identificados como grupos celulares rojos, como el destacado con una punta de flecha blanca. **(E'-E''')** Detalle de la extrusión basal sufrida por uno de estos clones mutantes, delimitado en amarillo para su mejor seguimiento (punta de flecha blanca en E'''). Se han marcado también en E'-E''' otros clones que persisten en el tejido, encontrándose dos grupos de clones persistentes que muestran diferentes características: algunos clones están bien integrados en el tejido (\*) mientras que otros forman esferas y no muestran una integración normal con el tejido silvestre (#) (similar a # en F). **(F-F'')** Clon que persiste en el tejido (#) tras la extrusión del A7, y que muestra poca afinidad por el tejido silvestre (tipo # en E'-E'''), de la Película 9. Se muestran los cortes ortogonales para destacar que el clon aún sigue unido al tejido abdominal (verde, no rojo) (flechas blancas de F' y F''), aunque sufre un desplazamiento hacia el plano apical. Se observa en esta misma imagen otro clon persistente, bien integrado en el tejido (\*). **(G)** Parte posterior de un abdomen pupal de un macho en un estadio posterior a la desaparición del A7. Se ha separado el canal rojo (**G'**) para facilitar la visualización. Se observa un A7 formado por clones (rojo) y tejido silvestre (verde, no rojo, marcado con punta de flecha roja). Nótese además que los clones de los compartimentos posteriores de cada segmento son continuos y están bien integrados en el tejido (A5p, A6p, reconocidos por su comportamiento durante la filmación de la Película 10) (comparar con \* en E'-E''' y F-F'', frente a # en E'-E''' y F'-F''). Los tiempos mostrados en los paneles inferiores no son tiempos de desarrollo sino los obtenidos tomando como inicio de los experimentos *in vivo* el tiempo 0 horas. g, genitalia. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a 29°C.

Se estudiaron dos tipos de clones: homocigóticos para una mutación *Abd-B* (n=3 películas) y de sobreexpresión de un *Abd-B-RNAi* (n=15 películas) (véase Materiales y métodos). Se observaron dos tipos de clones, sin que se haya contabilizado con detalle la preeminencia de uno u otro tipo: unos clones sufrían extrusión basal (Fig. R5 D-D''' y E-E'''). Películas 7 y 8) y otros permanecían en el tejido, pudiéndose observar en estos últimos dos comportamientos diferentes: algunos permanecían perfectamente integrados en el tejido (generalmente observados en el compartimento posterior, clones tipo \* en Fig. R5E'-G'. Películas 8, 9 y 10); otros clones, por el contrario, permanecían en el tejido pero no integrados en él, mostrando una forma ovalada (minimizando así la superficie de contacto con el resto del tejido), y sus células mostraban una ligera extrusión apical (aunque sin llegar a extruirse) (clones tipo # en Fig. R5 E'-F''. Películas 8 y 9). Los motivos de los distintos comportamientos de los clones mutantes se desconocen, aunque la posición (A o P) podría influir en su afinidad con el resto del tejido. Hemos observado, además, que el tejido que permanece sin extruirse en el A7 se encuentra formado por tejido mutante (clones) y silvestre (rojo y verde, respectivamente; punta de flecha roja en Fig. R5G'. Película 10). Estos resultados sugieren que en el proceso de extrusión celular en el A7 debido a *Abd-B* se producen casos de no autonomía celular.

### R.1.3.2. Extrusión de las células del A7 según su sexo

La cascada de determinación sexual de *D. melanogaster*, ya explicada (véase Introducción apartado I.5.) da lugar finalmente a la proteína Dsx<sup>M</sup> en los machos. La presencia de esta proteína (junto con *Abd-B*) determina la desaparición del A7 del macho (revisado en Foronda et al., 2015) (Fig. R6A).



**Figura R6. Extrusión de las células del A7 según su sexo.** (A) Esquema resumido (izquierda) de la cascada de determinación sexual en *D. melanogaster*. La presencia de Tra (solo en hembras) será determinante para la formación de la proteína Dsx<sup>F</sup>. En ausencia de *tra*, se forma Dsx<sup>M</sup>, que determina el desarrollo como macho. A la derecha se muestra un dibujo esquematizado del abdomen de una hembra (7 segmentos) y un macho (6 segmentos). La presencia de Dsx<sup>M</sup> (junto con *Abd-B*) determina la desaparición del A7 en el macho. (B) Esquema de transformación del A7 de hembra a macho cuando se fuerza la aparición de Dsx<sup>M</sup> y se elimina Dsx<sup>F</sup> (*MD761-Gal4/UAS-tra-RNAi*). La hembra mostrará 6 segmentos. (C-C'') Imágenes de experimento *in vivo* (Película 11) de una hembra con clones de transformación hacia macho (hembra de genotipo *hs-flp122/+; Act>y<sup>+</sup>>Gal4 UAS-CD8-RFP/+; UAS-tra-RNAi/His2Av-GFP*). Los clones inducidos en el A7 (contorneados en amarillo, marcados en rojo) no se extruyen. (D) Esquema de transformación del A7 de macho a hembra al no producirse Dsx<sup>M</sup> y producirse Dsx<sup>F</sup> (*UAS-tra<sup>F</sup>/+; MD761-Gal4/+*). El macho mostrará 7 segmentos. (E-E'') Imágenes de experimento *in vivo* (Película 12, se han eliminado los macrófagos para mejor visualización) de un macho con clones de transformación hacia hembra (*hs-flp122; Act>y<sup>+</sup>>Gal4 UAS-CD8-RFP/UAS-tra<sup>F</sup>; His2Av-GFP/+*). Se resalta un clon del A7 (marcado en rojo, contorneado en amarillo), que persiste en el tejido durante la pupación. El A7 resultante estará formado por tejido clonal (rojo y verde) y silvestre (verde, no rojo, flecha blanca en E''). Los tiempos mostrados en los paneles inferiores no son tiempos de desarrollo si no tiempos desde inicio del experimento. Experimentos a 29°C.

Cuando en el A7 de las hembras se fuerza la expresión de  $dsx^M$  en lugar de  $dsx^F$ , gracias a la herramienta *tra*-RNAi, este segmento se extruye y las hembras muestran solo 6 segmentos en el adulto (Fig. R6B). Como en el caso anterior, decidimos estudiar la autonomía celular de la extrusión debida a variaciones en la determinación sexual, y observamos que hembras con clones mutantes para *tra*-RNAi mostraban un A7 reducido (clones sin marcador para adulto, datos no mostrados). Al igual que con *Abd-B*, decidimos estudiar estos clones durante el desarrollo pupal en experimentos *in vivo*. Este análisis (n=7 películas) reveló que algunos clones permanecían en el tejido (Fig. R6C-C''. Película 11), al contrario de lo que se esperaría si estos se comportaran como tejido de macho a nivel autónomo celular. Una posible explicación de este comportamiento es que el RNAi no elimine totalmente la proteína Tra, lo que se podría solucionar con el análisis de clones mutantes nulos para *tra*.

Para el caso opuesto, cuando en el A7 del macho se induce la forma  $Dsx^F$  en vez de la  $Dsx^M$  (sobrexpresando  $tra^F$  con la herramienta *MD761*-Gal4) se forma un segmento A7 (Fig. R6D). Los adultos en los que se produjeron clones de sobreexpresión de *tra* (produciendo así la isoforma de hembra  $Dsx^F$ ) mostraron tejido A7 (clones sin marcador cuticular, datos no mostrados). Durante los experimentos *in vivo* observamos (n=4 películas), al igual que en casos anteriores, un comportamiento no autónomo celular: si bien los clones de tejido transformado hacia hembra permanecieron en el tejido (Fig. R6E-E''. Película 12), se observa tejido de macho que no se extruye (flecha blanca en Fig. R6E'') en estadios en los que ya debería haberse delaminado (47h DFP).

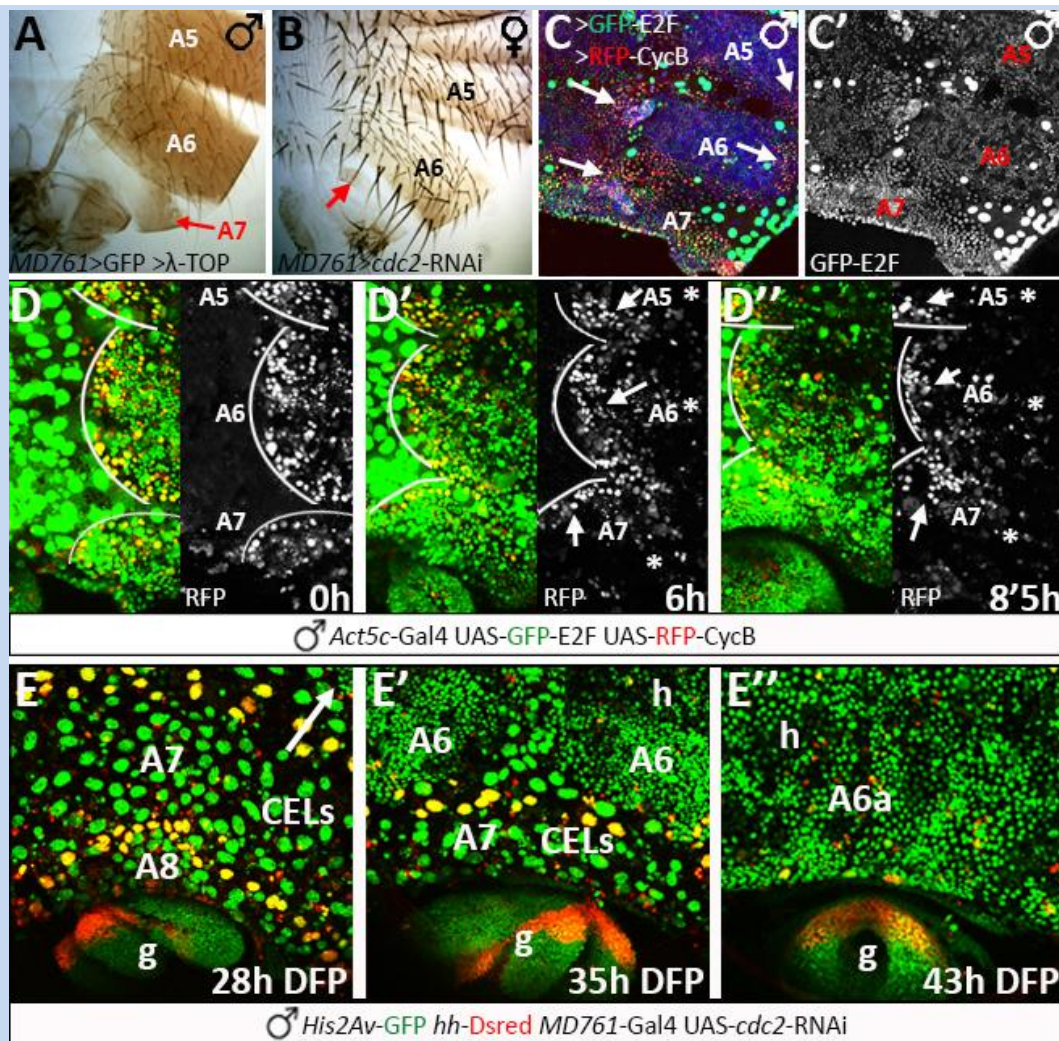
#### **R.1.4. Requerimiento del estado proliferativo del nido de histoblastos para la extrusión de las CELs en el abdomen terminal y estudio del ciclo celular en el A7**

Como se ha descrito (véase Introducción apartado I.6.), el número de células en mitosis (22-26h DFP) en el A7 es menor que en el A6 (Foronda et al., 2015; Wang et al., 2011), lo que podría explicar que pocas horas después los nidos de histoblastos dorsales del A7 tengan menos células que los del A6 (Foronda et al., 2015). Aunque este proceso ocurre en los dos sexos y por tanto no puede ser el único responsable en la diferencia de desarrollo del A7 entre macho y hembra, es interesante estudiar si los histoblastos del A7 en el macho presentan alguna variación en el ciclo celular respecto a segmentos anteriores y analizar su proliferación en relación con la eliminación de las CELs circundantes (Nakajima et al., 2011).

Cuando se fuerza la expresión de la vía EGFR en el A7, ya sea sobreexpresando su ligando (n=156) (Foronda et al. 2012), su receptor constitutivamente activo (n=114) o el oncogen *ras* de la vía (n=63) (véase Materiales y métodos para las líneas utilizadas), aparece un A7 grande en el macho (Fig. R7A). Por el contrario, cuando se inhibe por completo la proliferación de los histoblastos del A7 a través de la inhibición de la proteína Cdc2, que se requiere para la proliferación celular (Stern et al., 1993), las hembras adultas carecen de este segmento (Fig. R7B).

Para el estudio de ciclo celular *in vivo* en los histoblastos se utilizaron los sensores UASGFP-E2F y UAS-RFP-CycB del sistema FlyFucci (Zielke et al., 2014), inducidos bajo control de una línea Gal4 ubicua. Estas proteínas varían su expresión a lo largo del ciclo celular: E2F regula la expresión de genes que determinan la entrada en la fase S de ciclo, mientras que Ciclina B (CycB) es una ciclina cuya síntesis comienza en fase S, alcanzando sus mayores niveles durante G2, y cuya unión a Cdc2 permite la entrada en mitosis (Murray y Hunt, 1993; Nigg, 1995; Ohtani y Nevins, 1994). Gracias a sus asociación con fluorocromos podemos seguir la progresión G1/S/G2/M a través del siguiente código de colores: G1, señal fuerte GFP debido a los niveles altos de E2F y ausencia de señal RFP; S, señal suave RFP (comienzo de síntesis de CycB) y nada de señal GFP (E2F va a degradación); G2, señal débil GFP e intensa RFP; M, señal intensa de ambos fluorocromos (Zielke et al., 2014). En diversas disecciones (n=21) y filmaciones (n=10) (Película 13) se observó: 1) en estadios tardíos (aproximadamente 40h DFP), se observan más células GFP no RFP en el A7 que en nidos anteriores, por lo que parece que este segmento se encuentra mayoritariamente detenido en fase G1 cuando los histoblastos se están extruyendo (Fig. R7C, C' y D''); 2) en el nido espiracular de todos los segmentos se concentran células RFP positivas, lo que indica que se encuentran en fase G2 (Fig. R7C); y 3) en el borde de los nidos de histoblastos de todos los segmentos se observa mayor concentración de células RFP y RFP-GFP positivas (Fig. R7C-D''), indicando que están en fase M. Existe, por tanto, un comportamiento proliferativo distinto, excepto en los espiráculos y en los bordes de los nidos dorsal y ventral, en los nidos del A7 con respecto a segmentos anteriores.

Estudios previos indicaban que la progresión S/G2 de los histoblastos, era necesaria para la entrada en apoptosis de las CELs colindantes (Nakajima et al., 2011). Esta hipótesis no se puede aplicar al segmento A8, ya que este está formado solo por CELs que se extruyen sin problemas a pesar de no tener histoblastos proliferando en sus inmediaciones, haciéndolo además antes que las CELs del A7 u otros segmentos anteriores (véase más adelante Fig. R20). Para estudiar el comportamiento de las CELs en ausencia de proliferación de los histoblastos decidimos llevar a cabo experimentos de *time-lapse* (n=6) en los cuales se ha inhibido la proteína Cdc2 en todo el A7 (ya que las CELs no se dividen, la inhibición solo afectaría a los histoblastos) (Fig. R7E-E''. Película 14). La inhibición de esta proteína impide, en machos y hembras, la proliferación del nido A7 (así como el A6p, pues recordemos que la línea *MD761-Gal4* se expresa de manera parasegmental), lo que provoca un retraso en la extrusión normal de las CELs de este segmento (Fig. R7E') pero que no impide su eliminación total finalmente del tejido, contactando el nido A6a con la genitalia durante la pupación (Fig. R7E''). Es decir, la ausencia de proliferación no impide la extrusión de las CELs, como se había propuesto (Nakajima et al., 2011), al menos en el A7, pero la retrasa. Además, la ausencia de proliferación en los histoblastos del A7 no produce tampoco ningún retraso en la delaminación del A8 (formado exclusivamente por CELs), lo que confirma que la extrusión de estas células es excepcional respecto a las presentes en los demás segmentos abdominales, pues no precisan de histoblastos proliferando ni en ese segmento ni en el inmediatamente anterior (A7).



**Figura R7. Ciclo celular y proliferación en el A7.** (A) La sobreexpresión de la vía EGFR (*yw* UAS- $\lambda$ -TOP;; *MD761*-Gal4 UAS-GFP/+) da lugar a un A7 en machos (flecha roja). (B) La inhibición del ciclo celular (UAS-*cdc2*-RNAi/+; *MD761*-Gal4/+) en hembras produce la desaparición del A7 (apareciendo a veces un pequeño remanente, flecha roja), quizás por la no proliferación del nido de histoblastos. (C) Disección (lateral) del abdomen de un macho (aproximadamente 38h DFP) que muestra las células en diferentes momentos del ciclo celular (*w*; *Act5c-Gal4/UAS-GFP-E2F UAS-RFP-CycB*) y el canal GFP por separado (C'). Nótese una mayor concentración de células GFP positivas en los histoblastos del A7 que en segmentos anteriores (también en D''). Se observa mayor acumulación de células RFP positivas en los bordes de los nidos de histoblastos (para mejor visión, dorsal, véase D-D'') y espiráculos (flechas blancas). Topro (azul) marca núcleos. (D-D'') Imágenes tomadas durante un experimento *in vivo* (Película 13), de un macho (visión dorsal) del genotipo anterior. La señal correspondiente a RFP para cada momento se muestra a la derecha de D-D'', en blanco. Nótese una mayor acumulación de células RFP positivas (en la sección izquierda de cada panel se visualizan como amarillas) en el borde de los nidos (flechas blancas), en contacto con las CELs, en todos los segmentos (frente al centro de los nidos, asteriscos). Se han dibujado los bordes entre los nidos y las CELs, y eliminado la señal inespecífica de macrófagos para facilitar la visualización. (E-E'') Imágenes tomadas de la Película 14, que muestran que la inhibición de la proliferación de los histoblastos del A7 (*w*; *UAS-cdc2-RNAi/tub-Gal80<sup>TS</sup>*; *MD761-Gal4 hh-Dsred His2Av-GFP/+*) no impide la extrusión de las CELs de este segmento. El compartimento posterior de cada segmento se marca en rojo. Nótese como el nido anterior de histoblastos (h) del A6 (A6a) si prolifera (nidos casi unidos dorsalmente en E') hasta contactar con la genitalia (g) en E''. Sin embargo el A6p y el A7 no aparecen (debido a la expresión parasegmental de la línea *MD761*). Se obtuvieron resultados similares en ambos sexos. Las CELs del A7 muestran un retraso en su extrusión (cubren todo el segmento, comparar con A6 donde casi han desaparecido) (E'), pero acaban desapareciendo (E''). Los tiempos indicados en D-D'' no son tiempos de desarrollo sino a partir del inicio del experimento. Experimentos a 29°C (para *tub-Gal80<sup>TS</sup>* cambio a 29°C en larva III).

### R.1.5. Requerimiento de la proteína Miosina II no muscular para la extrusión del A7

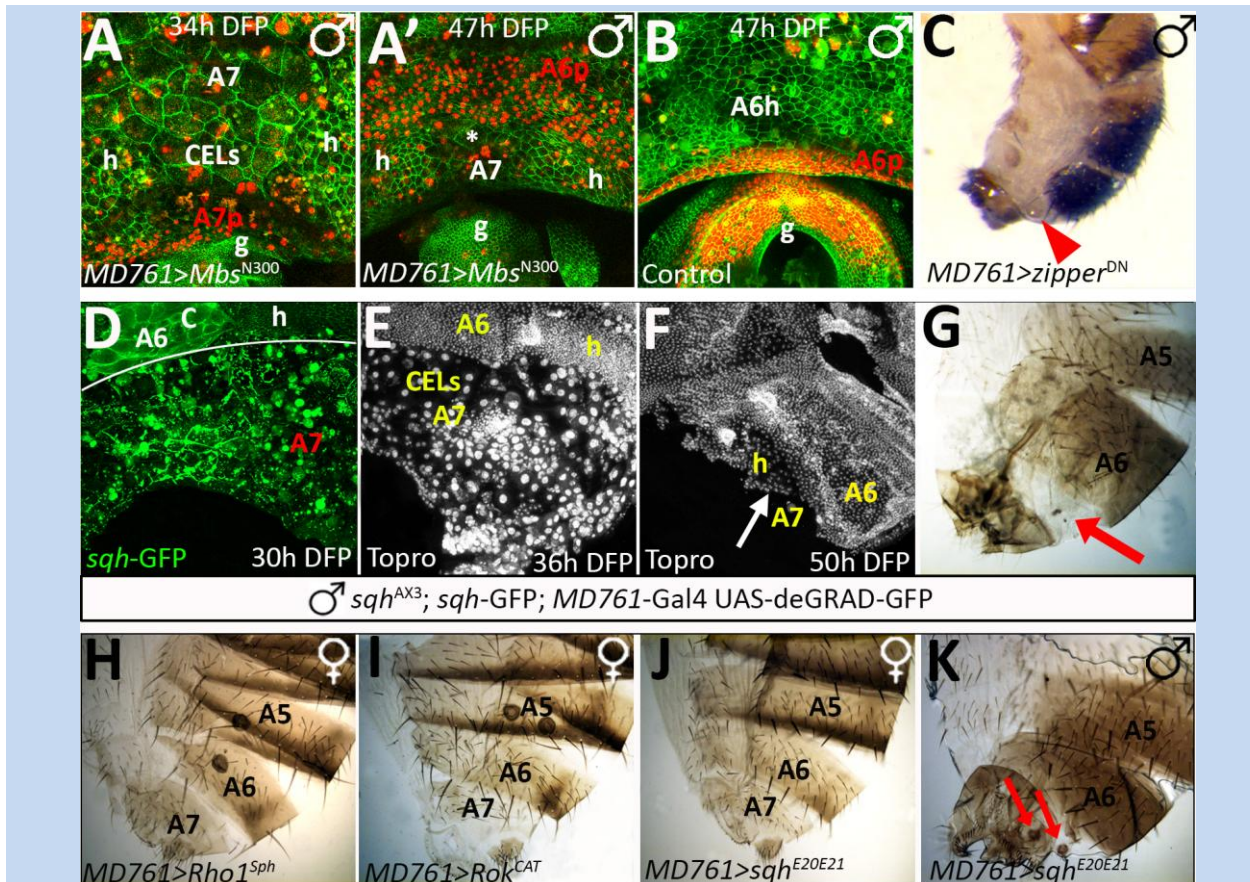
Se ha demostrado que la Miosina II no muscular (MyoII) es necesaria para la formación de un anillo contráctil apical que permite la extrusión celular en muchos contextos durante el desarrollo (An et al., 2017; Burgess, 1982; Martin et al., 2009; Martin y Goldstein, 2014; Mason et al., 2013; Munjal et al., 2015). Experimentos previos habían mostrado un retraso en la delaminación de las CELs (Foronda et al., 2012; Ninov et al., 2007) y un ligero efecto en los histoblastos del A7 al inhibirse la actividad de esta proteína mediante la expresión de la forma constitutivamente activa de su fosfatasa inhibidora (*Mbs<sup>N300</sup>*) (Foronda et al., 2012; Ninov et al., 2007). Hemos estudiado de nuevo la función de MyoII inhibiendo su actividad mediante: a) la sobreexpresión de *Mbs<sup>N300</sup>* (n=16 películas, 3 faratos, 50 adultos); b) la expresión de un dominante negativo de su cadena pasada *zipper* (*zipper<sup>DN</sup>*) (n=50 adultos); o c) a través del sistema el sistema deGRAD-GFP (Pasakarnis et al., 2016) con la línea *MD761-Gal4* (n=15 disecciones de abdómenes pupales y 76 adultos) (véase Materiales y métodos). En los tres casos se produce un retraso en la extrusión de las CELs (aunque estas finalmente se extruyen del tejido). Además, se impide la correcta eliminación de los histoblastos de este segmento, permaneciendo estos en el tejido (Fig. R8A-G. Película 15) y apareciendo en el adulto un tejido A7 sin diferenciar (Fig. R8C) o, para el caso del sistema deGRAD-GFP, pequeñas zonas de tejido pigmentado en el A7 (Fig. R8G). Se obtuvieron resultados similares para el A7 en los adultos al sobreexpresar el dominante negativo de la cadena pesada de la MyoII y su RNAi (*zipper<sup>DN</sup>* y *zipper-RNAi*).

La inhibición de la proteína MyoII solo en histoblastos (con *esg-Gal4*) o solo en CELs (con *Eip71CD-Gal4*) fue letal para el sistema deGRAD-GFP, y en ningún caso dio lugar a la aparición de un A7 al expresar *Mbs<sup>N300</sup>* (n=5 películas y 36 adultos para *Eip71CD* y 1 película y 82 adultos para *esg*), *zipper<sup>DN</sup>* (n=40 faratos para *Eip71CD* y 53 adultos para *esg*), *sqh-RNAi* (n=38 adultos para *Eip71CD* y 18 faratos para *esg*), el dominante negativo de la proteína Rho1, que activa a Rok que a su vez activa a MyoII (*Rho1<sup>N19</sup>*, n=30 faratos para *Eip71CD* y 50 adultos para *esg*) o su RNAi (*Rho1-RNAi*, n=20 para *Eip71CD*, letal para *esg*). Conjuntamente, estos resultados indicarían que la proteína MyoII es necesaria para la correcta extrusión de los histoblastos del segmento séptimo abdominal, aunque la línea utilizada (*MD761-Gal4*) afecta a histoblastos y CELs.

Intentamos provocar la extrusión del A7 de la hembras mediante la sobreexpresión de Miosina II o el aumento de su actividad a través del uso de varias herramientas con la línea *MD761-Gal4*: a) la sobreexpresión de *Rho1* (*UAS-Rho1<sup>Sph</sup>*); b) de su forma constitutivamente activa *UAS-Rho1<sup>V14</sup>*; c) de la forma constitutivamente activa del activador *Rok* (*UAS-Rok<sup>CAT</sup>*); y d) de *UAS-sqh<sup>E20E21</sup>*, que es una forma constitutivamente activa de *sqh* (la cadena ligera de la MyoII). No se consiguió, en ningún caso (n= mínimo 30 hembras por genotipo), el efecto deseado (Fig. R8H-J). En algunas ocasiones incluso se consiguió el efecto opuesto al esperado, apareciendo en el macho pequeños grupos de tejido en el A7



(Fig. R8K). Cabe tener en cuenta, que esta proteína de citoesqueleto debe, quizás, estar regulada a unos niveles muy concretos para el correcto funcionamiento celular, y que su sobreexpresión puede no producir el efecto inicialmente deseado.



**Figura R8. Implicación de la Miosina II en la extrusión del A7 del macho.** (A-A') Imágenes tomadas de la Película 15. La inhibición de MyoII (*w*; *DE-cadherina-GFP/+*; *hh-Dsred MD761-Gal4/UAS-Mbs<sup>N300</sup>*) impide la correcta extrusión de los histoblastos (h) del A7 en el macho (comparar con B). Las CELs sufren un retraso en su extrusión, pero finalmente casi todas terminan delaminándose del tejido (comparar cantidad de CELs en A y A'). Nótese cómo en el compartimento posterior del A6 (A6p; marcado en rojo) solo hay histoblastos (h), mientras que en el A7 aún permanece alguna CEL (marcada con asterisco). (B) Macho control (*w*; *DE-cadherina-GFP/+*; *hh-Dsred MD761-Gal4/+*) de las mismas horas de desarrollo, donde no se observa tejido de A7 por detrás del A6p (rojo), que contacta con la genitalia (g) (comparar con A'). (C) En el adulto, la inhibición de la MyoII (*MD761-Gal4/UAS-zipper<sup>DN</sup>*) provoca la aparición de un tejido A7 entre el A6 y la genitalia, despigmentado y sin cerdas (punta de flecha roja). (D-G) Fenotipos producidos por la expresión de deGRAD-GFP en individuos *sqh<sup>AX3</sup>; sqh-GFP; MD761-Gal4/UAS-deGRAD-GFP*. (D) Abdomen pupal de un macho de este genotipo. Compárese la degradación de la MyoII (GFP) en el A7, con su correcta organización celular en el A6, tanto en histoblastos (h) como en CELs (C). Se han separado los segmentos por una línea para su mejor visualización. La degradación del GFP en el A7 no permite diferenciar histoblastos de CELs. (E) El uso de esta herramienta provoca el retraso en la extrusión de las CELs (células grandes, comparar A7 frente al A6, donde ya se han extruido). (F) Finalmente (50h DFP), las CELs son capaces de extruirse (nótese su ausencia en el A7), pero una población de histoblastos (h) persiste en el tejido (flecha blanca). (G) El macho adulto muestra un tejido de separación entre el A6 y la genitalia despigmentado, con pequeñas zonas de tejido pigmentado (flecha roja). (H) Hembra *MD761-Gal4/UAS-Rho1<sup>Sph</sup>*, que muestra 7 segmentos. (I) Hembra *MD761-Gal4/UAS-Rok<sup>CAT</sup>*, que muestra también A7. (J) Hembra *MD761-Gal4/UAS-sqh<sup>E20E21</sup>*, igualmente con A7. (K) Macho *MD761-Gal4/UAS-sqh<sup>E20E21</sup>*, mostrando tejido pigmentado entre el A6 y la genitalia, que podría corresponder al A7 (flechas rojas). Todos los experimentos fueron llevados a cabo a 29°C (para el caso de *tub-Gal80<sup>TS</sup>* cambio a 29°C en larva III). Las imágenes A' y B no se muestran con el mismo aumento. Topro marca núcleos en E y F.

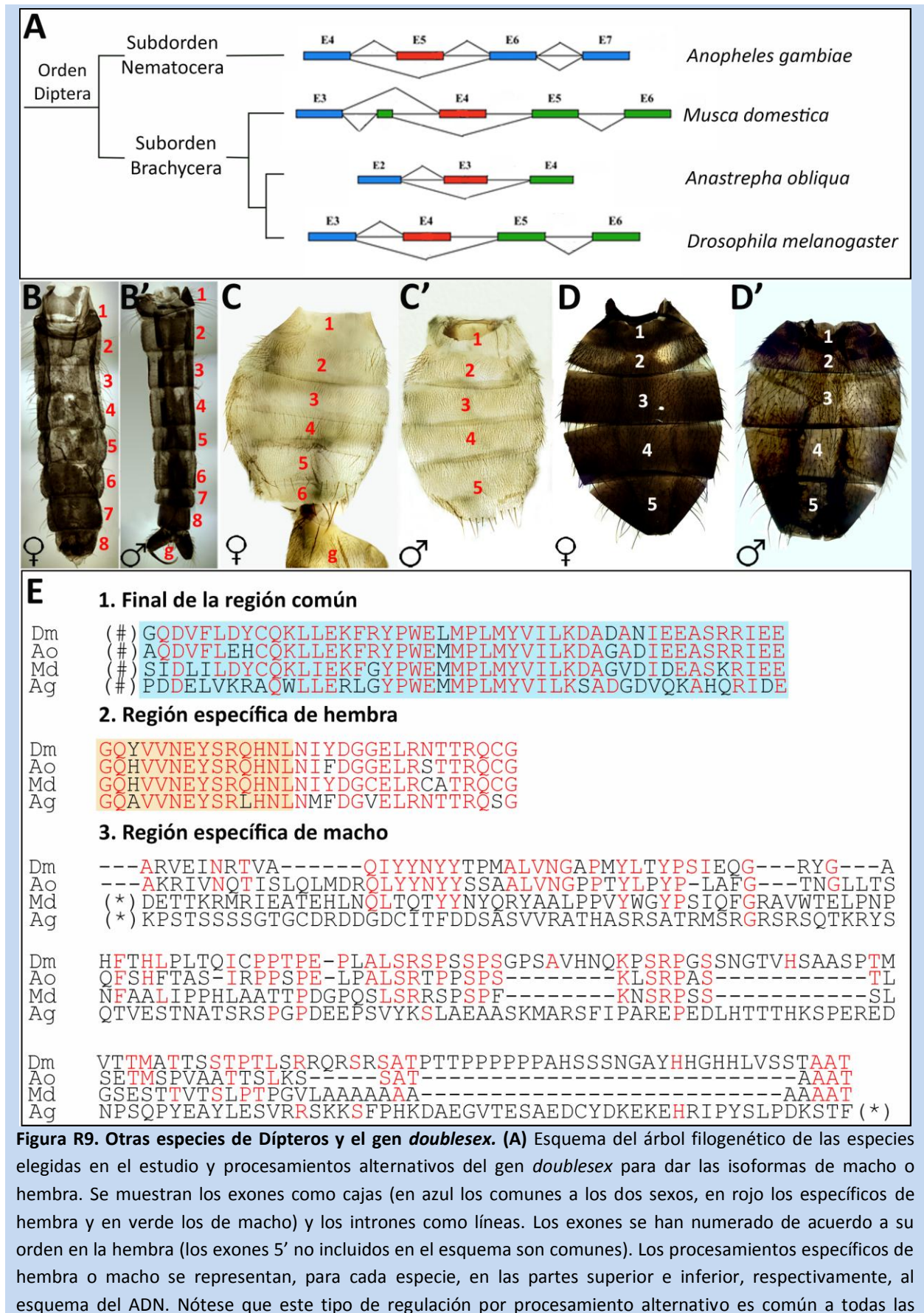
## R.2. Estudio funcional de la proteína Doublesex male (Dsx<sup>M</sup>) de diferentes especies de Dípteros en el abdomen de *Drosophila melanogaster*

Decidimos realizar una aproximación evolutiva al estudio de los mecanismos de eliminación del segmento A7 en machos. A lo largo del árbol filogenético de los Dípteros se observa una tendencia a la disminución del número de segmentos abdominales (véase Introducción, apartado I.7), que además se acentúa de manera dimórfica, solo en machos, en los *Cyclorhapha*. La expresión de *Abd-B* es similar entre las distintas especies de Dípteros (Yoder y Carroll, 2006), por lo que no es quizás responsable de este fenómeno. Para estudiar la posibilidad de que el gen *dsx*, que como ya se ha explicado está conservado evolutivamente, fuera responsable de esta reducción abdominal en distintas especies, y especialmente en machos, decidimos analizar el efecto de la expresión de las isoformas de Dsx de macho (Dsx<sup>M</sup>) de diferentes especies de Dípteros en el abdomen de *D. melanogaster*.

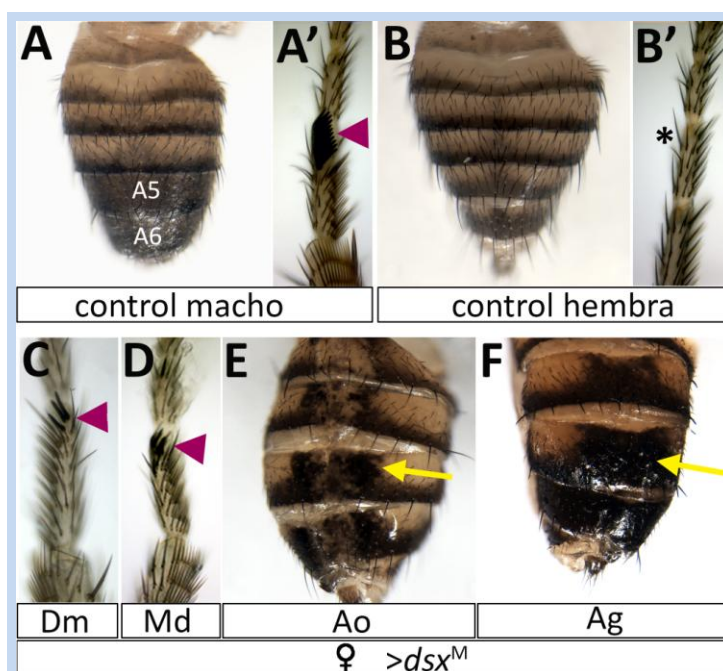
Las especies de Dípteros cuyas proteínas Dsx<sup>M</sup> se testaron fueron seleccionadas intentando cubrir diferentes ejemplos de reducción abdominal y dimorfismo sexual: a) ningún sexo disminuye el número de segmentos (*A. gambiae*, Ag; 8 segmentos abdominales ambos sexos), b) el macho lo reduce más drásticamente que la hembra, como en el caso de *D. melanogaster* (*A. obliqua*, Ao; 6 segmentos abdominales la hembra y 5 el macho), o c) ambos sexos lo reducen (*M. domestica*, Md; 5 segmentos abdominales ambos sexos) (Fig. R9A-D'). Se utilizó además la expresión de la propia isoforma Dsx<sup>M</sup> de *D. melanogaster* (Dm) como control experimental. Cabe destacar que, dado que las líneas transgénicas para cada especie no se realizaron mediante inserción en la misma región cromosómica, no podemos comparar los fenotipos producidos de forma precisa, debido a una posible diferencia en los niveles de expresión de cada transformante. Una posible solución a este problema sería estudiar los niveles de expresión para cada línea mediante PCR cuantitativa; sin embargo, la región específica de macho no se encuentra conservada entre las diferentes especies (Fig. R9E). Además, si bien las regiones común o específica de hembra sí se muestran conservadas a nivel de secuencia proteica (Fig. R9E), no muestran suficiente homología a nivel de secuencia génica que nos permitiera encontrar unos oligos comunes para todas las proteínas Dsx utilizadas. El uso obligatorio de diferentes parejas de oligos para cada gen hacía más complicado el análisis por PCR cuantitativa por lo que decidimos continuar nuestro estudio sin conocer los niveles relativos de expresión para cada línea.

Debido a que la desaparición del A7 podría producirse por toxicidad de las líneas, decidimos primero testarlas en otros órganos o tejidos sexualmente dimórficos que nos permitieran observar su correcta funcionalidad. La expresión de las isoformas de macho de las distintas especies seleccionadas en las hembras de *D. melanogaster* produjo fenotipos característicos del desarrollo de macho, tales como peine sexual en la pata protorácica (todas las especies) o pigmentación oscura abdominal (Ao y Ag; con Md no se obtuvieron adultos) (Fig. R10). Nuestros resultados confirman y extienden resultados previos

que obtuvieron, en general, menores efectos que los que hemos descrito (Alvarez et al., 2009; Hediger et al., 2004), y confirman la funcionalidad de las proteínas expresadas.



especies (Hediger et al., 2004; Ruiz et al., 2005; Scali et al., 2005). **(B-D')** Abdómenes de una hembra **(B)** y un macho **(B')** adultos de *Anopheles gambiae* (Ag) (8 segmentos; g, genitalia), una hembra **(C)** y un macho **(C')** adultos de *Anastrepha obliqua* (Ao) (6 segmentos la hembra y 5 el macho; g, genitalia), y una hembra **(D)** y un macho **(D')** adultos de *Musca domestica* (Md) (5 segmentos). **(E)** Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de las proteínas ortólogas Dsx de estas especies. Se muestran en rojo todas las coincidencias encontradas respecto a *Drosophila melanogaster* (Dm). Nótese un mayor grado de conservación en la región común a ambos sexos (1) y la específica de hembra (2), que en la específica de machos (3). El dominio de oligomerización (DO2) se resalta en azul para la región común y en naranja para la región de hembra. Se han omitido las secuencias 3' y 5' de Ag y Md de la región de macho (\*), que no muestran ninguna homología, así como el inicio de la región común de todas las especies (#), que sí muestran elevado grado de homología. Esta región común (#) incluye el dominio de unión de DNA (DO1).



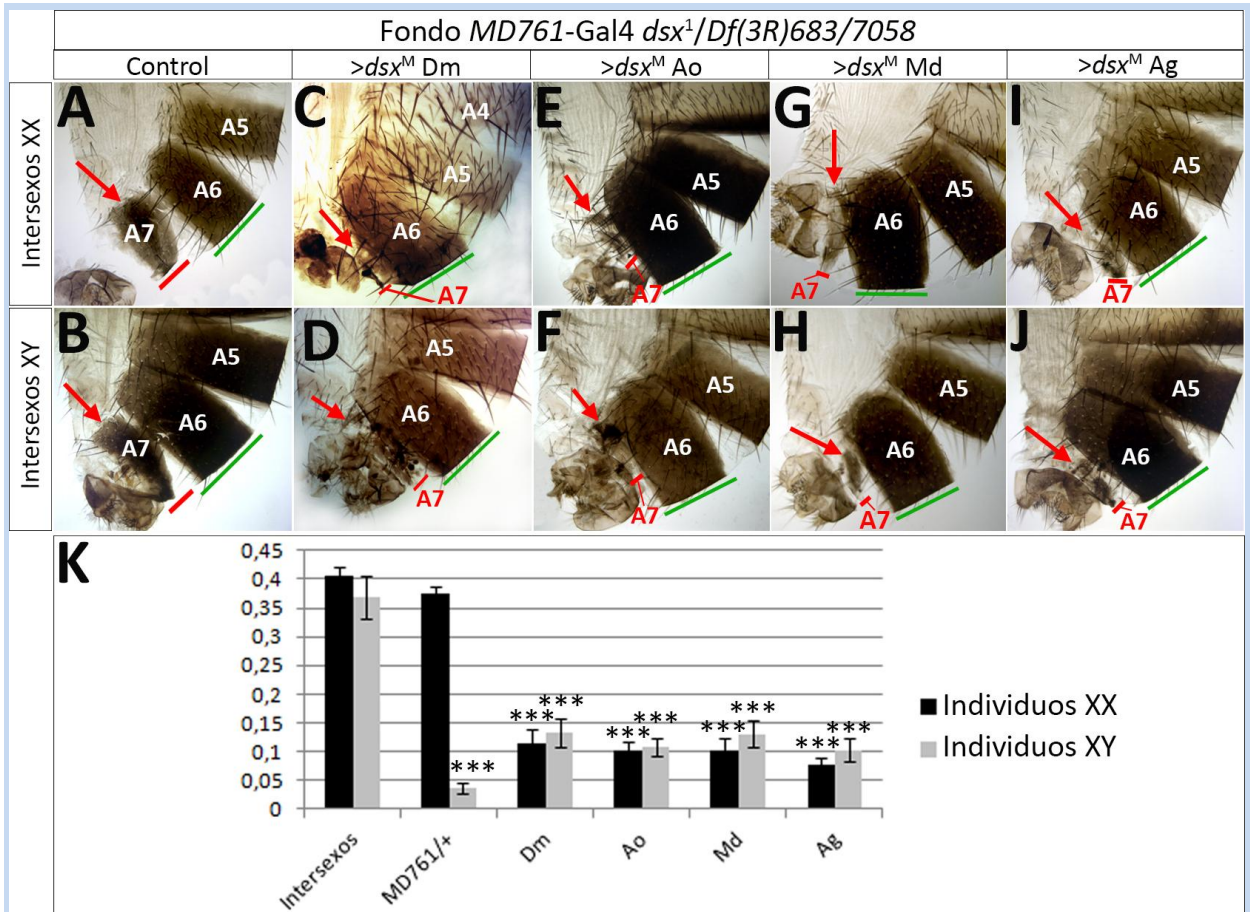
**Figura R10. Comprobación funcional de las proteínas Dsx<sup>M</sup> de las diferentes especies.**

**(A)** Macho de *Drosophila melanogaster* (Dm) con pigmentación uniforme y oscura en los segmentos A5 y A6. **(A')** Peine sexual de un macho de Dm (punta de flecha granate). **(B)** Hembra de Dm, con segmentos abdominales posteriores sin la pigmentación uniforme y oscura propia de machos. **(B')** Ausencia de peine sexual (asterisco) en las hembras de Dm. **(C, D)** Aparición de un pequeño peine sexual (punta de flecha granate, comparar con B') al sobreexpresar el UAS-*dsx*<sup>M</sup> de Dm **(C)** o de *Musca domestica* (Md; **D**) en las hembras de Dm. **(E-F)** Fenotipos de pigmentación del abdomen (flechas amarillas, comparar con B) al sobreexpresar el UAS-*dsx*<sup>M</sup> de

*Anastrepha obliqua* (Ao; **E**) o *Anopheles gambiae* (Ag; **F**) en las hembras de Dm. Los experimentos para la pigmentación se realizaron con la línea *pnr*-Gal4 (que dirige la expresión a la zona central dorsal) a 25°C para Ao y 17°C para Ag; y los del peine sexual con la línea *dsx*-Gal4 a 25°C para Dm y 29°C para Md.

### R.2.1. La expresión de la proteína Dsx<sup>M</sup> de otros Dípteros en individuos intersexo de *D. melanogaster* reduce el tamaño del A7

Decidimos probar el efecto de las diferentes proteínas Dsx<sup>M</sup> en el tamaño del A7 introduciéndolas en un fondo genético carente del gen *dsx* (intersexos), para evitar la posible interacción o competencia de la isoforma Dsx<sup>M</sup> introducida en cada caso con las proteínas Dsx<sup>M</sup> o Dsx<sup>F</sup> endógenas. Los individuos intersexo muestran un A7 (Fig. R11A, B), de tamaño similar al de la hembra silvestre (comparar con control MD761-Gal4/+, Fig. R11K). Se expresaron las proteínas Dsx<sup>M</sup> en este fondo mutante con la línea MD761-Gal4. Se observó en todos los casos una reducción drástica del tamaño del A7, similar para todas las especies, tanto en individuos cromosómicamente machos (XY) como hembras (XX), aunque en ningún caso esta disminución fue total (ni siquiera para el caso de la propia proteína de Dm se recupera el tamaño del A7 del macho heterocigótico para la línea MD761-Gal4) (Fig. R11C-K).

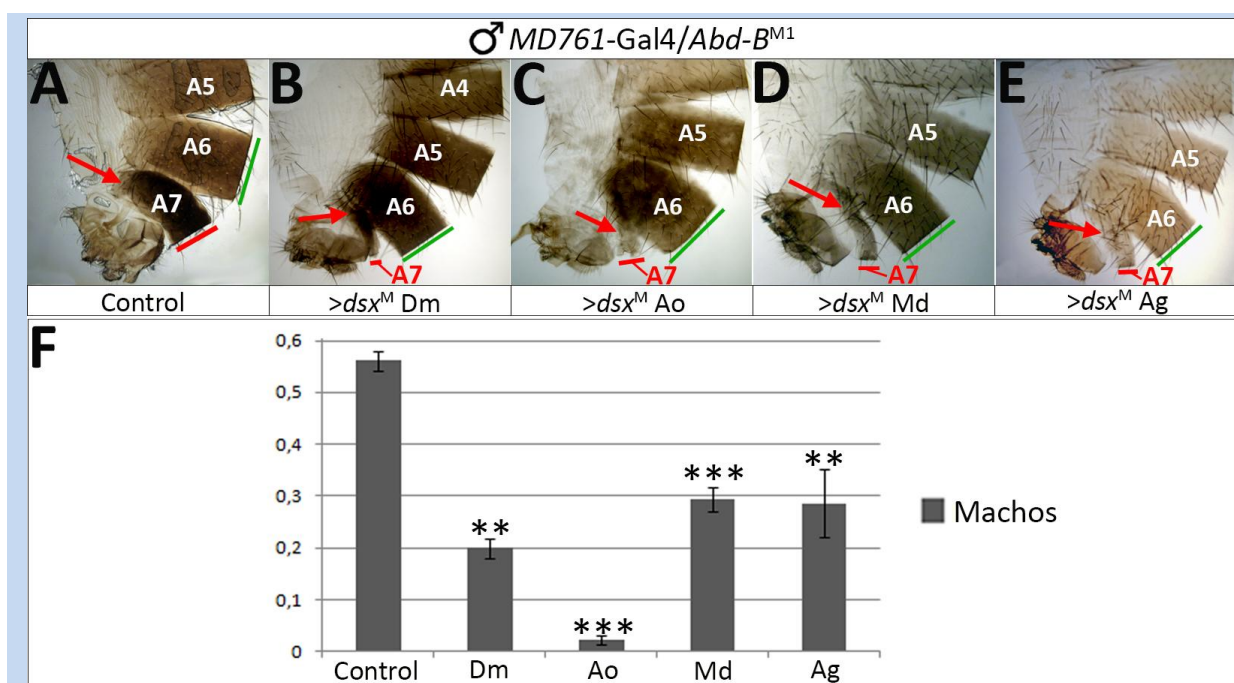


**Figura R11. Sobreexpresión de la proteína Dsx<sup>M</sup> de las distintas especies en individuos sin *dsx* endógeno.** Los individuos del fondo genético *w*; MD761-Gal4 *dsx*<sup>1</sup>/Df(3R)683/7058 no tienen Dsx y son, por tanto, intersexos: tanto en los XX (A) como en los XY (B), aparece un gran A7. Para todos los casos experimentales (C-J), aparece un A7 muy disminuido respecto al del control, tanto en individuos XX (fila superior; comparar con A), como XY (fila inferior; comparar con B). En toda la figura se resalta el A7 con una flecha roja y se muestran barras rojas para marcar de manera aproximada el tamaño del A7 respecto al A6 (barras verdes) y facilitar la comparación. Genotipos: (C-D) *w*; UAS-*dsx*<sup>M</sup> de *Drosophila melanogaster* (Dm)/+; MD761-Gal4 *dsx*<sup>1</sup>/Df(3R)683/7058. (E-F) *yw* UAS-*dsx*<sup>M</sup> de *Anastrepha obliqua* (Ao)/(*w*); MD761-Gal4 *dsx*<sup>1</sup>/Df(3R)683/7058. (G-H) *w*; UAS-*dsx*<sup>M</sup> de *Musca domestica* (Md)/+; MD761-Gal4 *dsx*<sup>1</sup>/Df(3R)683/7058. (I-J) *w*; UAS-*dsx*<sup>M</sup> de *Anopheles gambiae* (Ag)/+; MD761-Gal4 *dsx*<sup>1</sup>/Df(3R)683/7058. Todos los experimentos se realizaron a 17°C (excepto para Ao a 29°C). (F) Gráfica de barras para mostrar la drástica reducción de tamaño del A7 respecto al control, tanto en individuos XX como XY respecto a sus controles (intersexos XX e intersexos XY, respectivamente), debida a la sobreexpresión de la proteína Dsx<sup>M</sup> de cada especie en el fondo genético MD761-Gal4 *dsx*<sup>1</sup>/Df(3R)683/7058. Se muestran las unidades relativas de área del A7 respecto al A6. Control XX (n=10), control XY (n=15). Sobreexpresión de Dm: individuos XX (n=13, p-valor<0,0001), XY (n=13, p-valor=0,0008). Sobreexpresión de Ao: individuos XX (n=21, p-valor<0,0001), XY (n=24, p-valor<0,0001). Sobreexpresión de Md: individuos XX (n=22, p-valor<0,0001), XY (n=21, p-valor<0,0001). Sobreexpresión de Ag: individuos XX (n=23, p-valor<0,0001), XY (n=16, p-valor<0,0001). Se muestra también el genotipo MD761-Gal4/+ (n=10 para hembras, n=17 para machos) (p-valor=0,1903 para las hembras respecto al intersexo XX y p-valor<0,0001 para los machos respecto al intersexo XY). No hay diferencia significativa entre los dos intersexos (p-valor=0,7389), ni en la disminuciones observadas entre las diferentes especies. Si hay diferencia significativa entre la disminución en individuos XY de cada especie y el ratio en el macho MD761-Gal4/+ (p-valor del individuo XY en cada especie respecto a este macho: 0,0003 para Dm, 0,0017 para Ao, 0,0008 para Md y 0,0055 para Ag). Los asteriscos graficados son para cada caso experimental respecto a su control (intersexo XX o XY según corresponda). Código de colores: negro para XX y gris para XY.

Que el propio producto de *Drosophila* no consiga el fenotipo silvestre puede deberse a que la distribución y cantidad de la proteína obtenida con el sistema Gal4 no reproduce el patrón normal, siendo quizás el fenotipo muy sensible a estas variaciones. Se puede concluir que la funcionalidad de la isoforma de macho de la proteína Dsx de las especies analizadas está conservada en su función de reducir el tamaño del A7 en el macho, así como en el desarrollo de otras características sexuales.

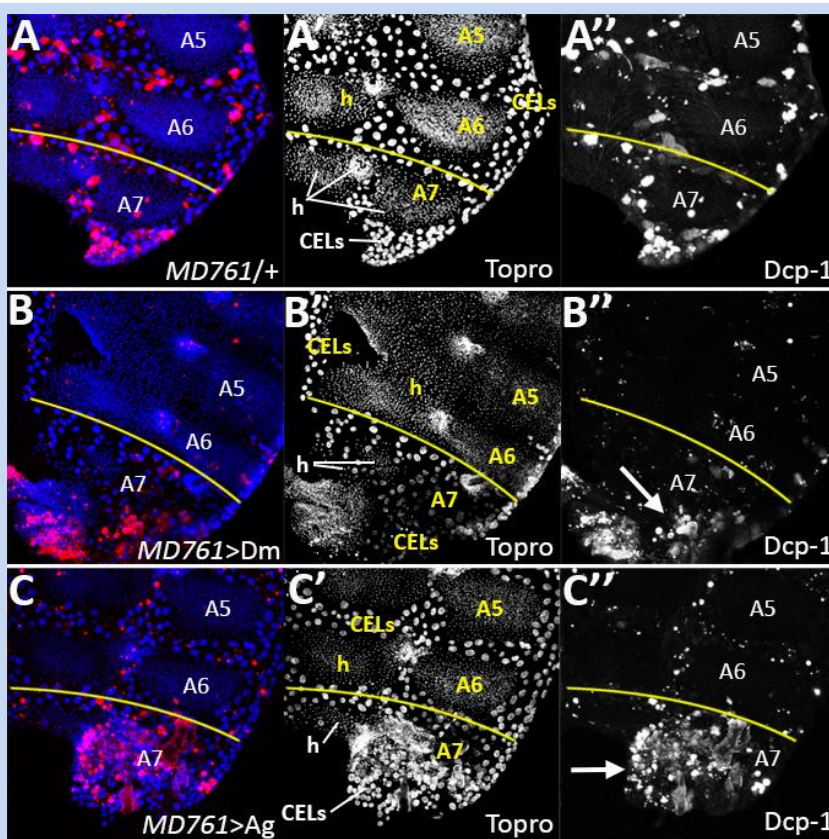
### R.2.2. La expresión de la proteína Dsx<sup>M</sup> de otros Dípteros en *D. melanogaster*, en un fondo mutante para *Abd-B*, reduce el A7 en machos

La eliminación del A7 en machos depende de *Abd-B* y *dsx*, y *Abd-B* regula los niveles de este gen (véase Introducción). Parte del efecto del gen Hox, por tanto, podría estar mediada por *dsx*. Expresamos las proteínas Dsx<sup>M</sup> de los distintos Dípteros en un fondo mutante para *Abd-B* (que transforma el A7 en A6) (Fig. R12A) para comprobar si *dsx* era capaz de revertir, al menos en parte, este fenotipo.



**Figura R12. Análisis de los fenotipos producidos por las proteínas Dsx<sup>M</sup> de las diferentes especies en un fondo con reducción de los niveles de *Abd-B*.** (A) Abdomen posterior de un macho control, de genotipo MD761-Gal4/Abd-B<sup>M1</sup>, en el que aparece un A7 de gran tamaño. (B-E) El A7 de machos de *Drosophila melanogaster* en los que, en el fondo genético MD761-Gal4/Abd-B<sup>M1</sup>, se ha expresado la proteína Dsx<sup>M</sup> de *Drosophila melanogaster* (Dm; B) *Anastrepha obliqua* (Ao; C), *Musca domestica* (Md; D) o *Anopheles gambiae* (Ag; E) muestra una fuerte reducción. Se resalta el A7 con una flecha roja y se muestran barras rojas para marcar de manera aproximada el tamaño del A7 respecto al A6 (barras verdes) y facilitar la comparación. Todos los experimentos a 17°C (excepto para Ao a 29°C). (F) Gráfica de barras para mostrar la reducción de tamaño del A7. Se muestran las unidades de área del A7 respecto al A6 (ratio A7/A6). Genotipos y p-valor: (A) Control MD761-Gal4/Abd-B<sup>M1</sup> (n=12). (B) UAS-dsx<sup>M</sup> Dm/+; MD761-Gal4/Abd-B<sup>M1</sup> (n=6, p-valor=0,0011). (C) UAS-dsx<sup>M</sup> Ao/+; MD761-Gal4/Abd-B<sup>M1</sup> (n=8, p-valor=0,0003). (D) UAS-dsx<sup>M</sup> Md/+; MD761-Gal4/Abd-B<sup>M1</sup> (n=8, p-valor=0,0003). (E) UAS-dsx<sup>M</sup> Ag/+; MD761-Gal4/Abd-B<sup>M1</sup> (n=6, p-valor=0,0011). La mayor reducción se consigue con el Dsx<sup>M</sup> de Ao, mientras que las proteínas de Md y Ag son las que producen un menor efecto. Se obtuvieron diferencias significativas entre las reducciones producidas por cada especie, excepto para Md respecto a Ag y Dm respecto a Ag. Los asteriscos corresponden a cada experimento respecto al control.

En este fondo genético la expresión de las proteínas de las diferentes especies produjo la disminución del tamaño del A7 en machos de forma significativa (Fig. R12B-F). A diferencia del experimento anterior, en ausencia de *Abd-B* sí se observan diferencias en el rescate del fenotipo mutante entre las distintas proteínas. La mayor reducción del segmento A7 se observa con la proteína de Ao (mayor incluso que la de Dm) y siendo similar el rescate con las proteínas de Ag y Md, las que logran una menor reducción (Fig. R12F). Aunque estos experimentos sugieren una diferencia entre Ao y las otras especies, la interpretación de los resultados es complicada debido a dos factores: a) puede haber efectos dominantes negativos, particulares para cada proteína, y b) los niveles de expresión obtenidos con cada proteína pueden ser diferentes, ya que los sitios de inserción de los transformantes UAS son distintos. De hecho, los cruces con *Dsx<sup>M</sup>* de Ao se hicieron a 29°C para ver claramente los fenotipos mientras que con las otras proteínas se tuvieron que hacer a 17°C (temperatura a la que el sistema Gal4/UAS es menos funcional) para evitar la letalidad. Los resultados obtenidos apoyan que *dsx* mantiene la capacidad de reducir el A7 cuando la expresión de *Abd-B* en este segmento disminuye, aunque las proteínas de cada especie muestran un grado de funcionalidad diferente.



**Figura R13. Retraso en el desarrollo y aumento de la apoptosis en el segmento A7 al sobreexpresar o expresar ectópicamente las proteínas *Dsx<sup>M</sup>* de las diferentes especies. (A-A'') Parte posterior del abdomen de una pupa macho control (*MD761-Gal4/+*) en el que se observa un desarrollo similar en el A7 y el resto de segmentos (A') así como una tinción de Dcp-1 en algunas células larvianas, de forma similar en A7 y A6 (A''). (B-B'') Imagen similar de una pupa macho de genotipo *UAS-dsx<sup>M</sup>/+; MD761-Gal4/+*. Se observa que la sobreexpresión de la proteína *Dsx<sup>M</sup>* propia de *Drosophila melanogaster* (Dm) produce un retraso en el crecimiento del A7. Véase la mayor cantidad de CELs y grupos de histoblastos (h) más pequeños en el A7 que en el A6 o segmentos anteriores (B'). Véase asimismo una mayor abundancia de células Dcp-1 positivas (flecha blanca) en el A7 (B''). (C-C'') Abdomen pupal posterior de un macho de genotipo *UAS-dsx<sup>M</sup>* de *Anopheles gambiae* (Ag)/+; *MD761-Gal4/+*. En C' y C'' se pueden observar características similares a las descritas al expresar *Dsx<sup>M</sup>* de Dm: retraso en el desarrollo del A7 (CELs que no se eliminan, menor expansión de los nidos de histoblastos, h; C') y aumento de apoptosis en este segmento, muy significativa en este caso (C''). En toda la figura: se ha marcado con una línea amarilla la separación aproximada entre el segmento A6 y el A7. Topro (azul) marca núcleos. Dcp-1 (rojo) marca muerte celular. Experimentos a 17°C.**

### R.2.3. Posible efecto indirecto de las CELs en los fenotipos observados

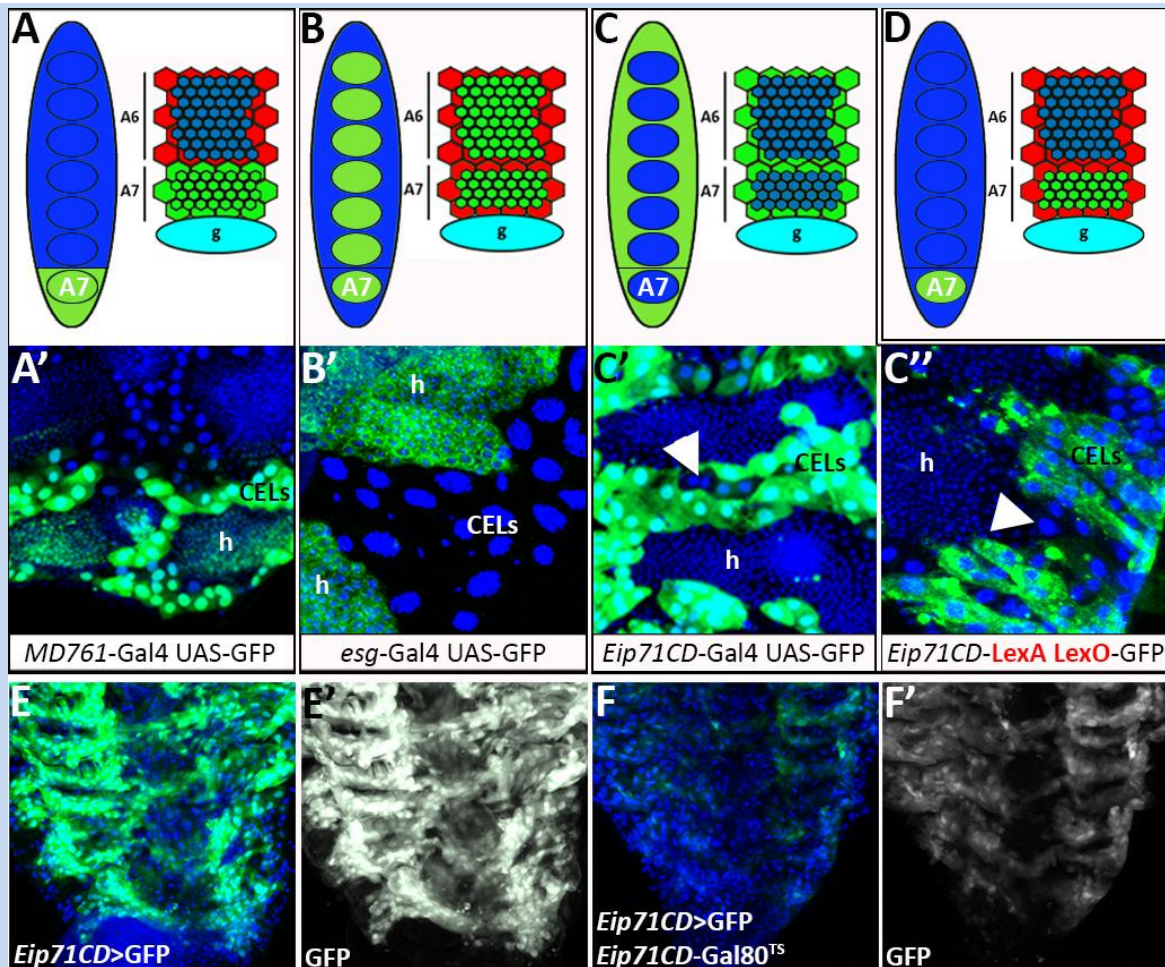
Al analizar el comportamiento celular en estadios pupales, al expresar las diferentes proteínas  $Dsx^M$ , se observó en todos los casos ( $n=23$  disecciones de abdómenes pupales) un retraso en la extrusión de las CELs de este segmento, así como un aumento de muerte celular (detectada con un anticuerpo contra la proteína Dcp-1) (Fig. R13). Esto nos llevó a pensar que tal vez la reducción del A7 descrita en experimentos anteriores podía no estar causada, o no solo, por el efecto morfogenético que realice dicha proteína en el desarrollo de los histoblastos, sino por un efecto indirecto causado por el retraso en la delaminación de las CELs (véase mismo problema para apartados R.1.1.2. y R.1.5.).

### R.3. Generación de nuevas líneas para la expresión génica selectiva en las poblaciones celulares del A7

Como se ha explicado, las tres líneas principales para dirigir la expresión al abdomen terminal disponibles son: la línea *MD761-Gal4*, de expresión en ambas poblaciones celulares del A7 (CELs e histoblastos) (Fig. R14A, A'), *esg-Gal4* que expresa solo en los histoblastos (Fig. R14B, B') y *Eip71CD-Gal4* que expresa en CELs (Fig. R14C, C'). Los fenotipos más extremos en distintos experimentos se obtuvieron con la línea *MD761-Gal4*, pero con ella no era posible distinguir si el efecto en el desarrollo del abdomen se debía a un efecto directo en los histoblastos o a uno indirecto, debido al retraso en desarrollo de las CELs. La línea *esg-Gal4* mostró bajos niveles de expresión, o letalidad debido a su expresión generalizada en todos los segmentos (y en muchos otros tejidos diploides de la mosca), por lo que decidimos llevar a cabo la construcción de una línea de expresión que permitiera restringir la expresión Gal4 a los histoblastos del A7 (Fig. R14D). Para ello, clonamos la secuencia reguladora de la línea *Eip71CD-Gal4* (véase Materiales y métodos) junto a la secuencia inhibidora Gal80. El diseño experimental proponía unir la expresión de la línea *MD761-Gal4* con la nueva línea creada *Eip71CD-Gal80*, de manera que la expresión en las CELs se inhiba y se produzca únicamente expresión en los histoblastos del A7 (Fig. R14D). Se produjeron y seleccionaron 16 líneas diferentes, con los insertos en los dos brazos cromosómicos de los cromosomas II y III. Aunque todas mostraron una reducción en los niveles de expresión dirigida por *Eip71CD-Gal4*, ninguna pudo suprimirla (Fig. R14E-F'). Por tanto, no fue posible, bajo esta aproximación, inhibir la expresión del Gal4 en las CELs.

De manera paralela a este clonaje, se llevó a cabo la construcción (véase Materiales y métodos) de una línea *Eip71CD-LexA*, con el fin de usarla en experimentos futuros en un sistema de expresión binario (Fig. R14C''). Se seleccionaron 3 líneas insertas en diferentes posiciones de los cromosomas II y III, produciendo todas ellas expresión de GFP en las CELs, aunque en menores niveles que la línea equivalente Gal4. Se validaron funcionalmente las líneas a través de su cruce con LexO-P35 y observando cómo producen fenotipos similares a los observados en el cruce equivalente Gal4/UAS (datos no mostrados).





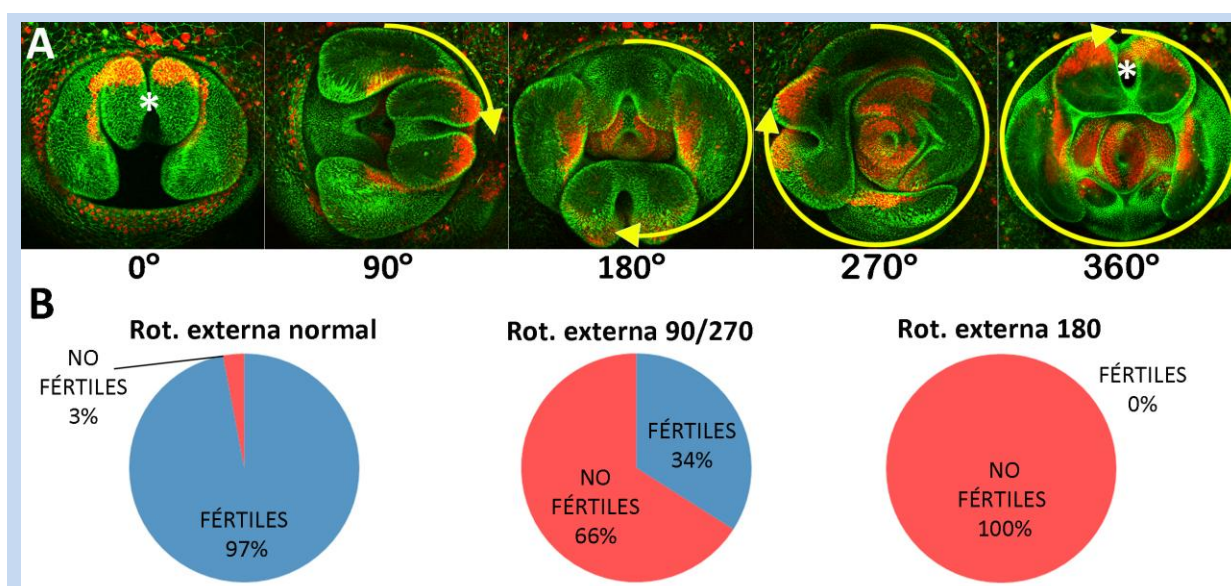
**Figura R14. Generación de nuevas líneas para la expresión génica selectiva en las poblaciones celulares del A7. (A-D)** Se muestran esquemas muy simplificados de pupas (solo la parte abdominal) en las que se señala la expresión dirigida por una determinada línea (en verde; resto del individuo en azul), los nidos de histoblastos como una circunferencia por segmento abdominal y un detalle (a la derecha en cada panel) del abdomen posterior (se dibujan las CELs como hexágonos grandes y los histoblastos como hexágonos pequeños); La genitalia se marca como g en azul claro, y su expresión en la línea *esg* no ha sido incluida por simplificar. **(A)** *MD761-Gal4* dirige expresión en histoblastos y CELs del A7. **(B)** *esg-Gal4* dirige la expresión en los nidos de histoblastos del abdomen pero no en las CELs (hexágonos grandes rojos). **(C)** *Eip71CD-Gal4* dirige la expresión en todas las CELs del abdomen, y no en histoblastos (hexágonos azules pequeños). **(D)** Esquema de la combinación genética que permitiría la expresión solo en los histoblastos del A7 y no en el resto de histoblastos de otros segmentos ni en las CELs del A7. **(A'-C')** Imágenes de abdomenes pupales de individuos *MD761-Gal4 UAS-GFP* **(A')**, *esg-Gal4 UAS-GFP* **(B')** y *Eip71CD-Gal4 UAS-GFP* **(C')**, en las que se observa marcaje GFP, en correspondencia con los esquemas de la fila superior: tanto en los histoblastos como en las CELs del A7 **(A')**, solo en histoblastos **(B')** o solo en las CELs **(C')**. **(C'')** Expresión de la línea generada *Eip71CD-LexA LexO-GFP*, similar a la línea Gal4 correspondiente (comparar con C'). Nótese que algunas CELs no están marcadas con GFP (puntas de flecha blancas) en ambos genotipos, aunque la línea LexA muestra parches mayores con falta de expresión. **(E)** Abdomen de una pupa de genotipo *Eip71CD-Gal4 UAS-GFP* (GFP, en blanco, en E'). **(F)** Abdomen de una pupa de genotipo *Eip71CD-Gal4 UAS-GFP/Eip71CD-Gal80<sup>TS</sup>* y canal verde de este mismo abdomen (F', en blanco). Nótese que los niveles de GFP disminuyen (comparar con E') pero que la línea *Eip71CD-Gal80<sup>TS</sup>* no es capaz de inhibir completamente la actividad de *Eip71CD-Gal4*. El análisis de los niveles para E y F fue llevado a cabo a 17°C (pues es la temperatura a la que mejor funciona el Gal80<sup>TS</sup>), la disección se realizó en el mismo momento del desarrollo (24h DFP) y se fijaron las muestras, montaron y fotografiaron en el confocal en paralelo, para evitar variaciones en el GFP debidas a cambios en los procedimientos. Topro (azul) marca núcleos. Las imágenes A'-C'' no se muestran con el mismo aumento. h; histoblastos.

## R.4. Relación entre la eliminación de segmentos del abdomen y la rotación de la genitalia del macho de *Drosophila melanogaster*

### R.4.1. La rotación de la placa genital del macho durante la pupación

#### R.4.1.1. Estudio de fertilidad según la posición externa de la placa genital

Como se ha detallado en la Introducción (véase apartado I.8.1.), la placa genital del macho sufre durante la pupación un giro de 360°, siempre en dirección dextral (Fig. R15A. Película 16), formando así un órgano asimétrico dentro del cuerpo simétrico bilateral de la mosca. La consecución de una correcta posición externa genital es importante para la fertilidad del individuo, no existiendo diferencias entre la fertilidad observada en el grupo control y los grupos con rotaciones que externamente conforman una posición silvestre (360D, 360S o NR) (Fig. R15B), como ya habían mostrado previamente otros autores (Coutelis et al., 2013; Hozumi et al., 2006; Suzanne et al., 2010).



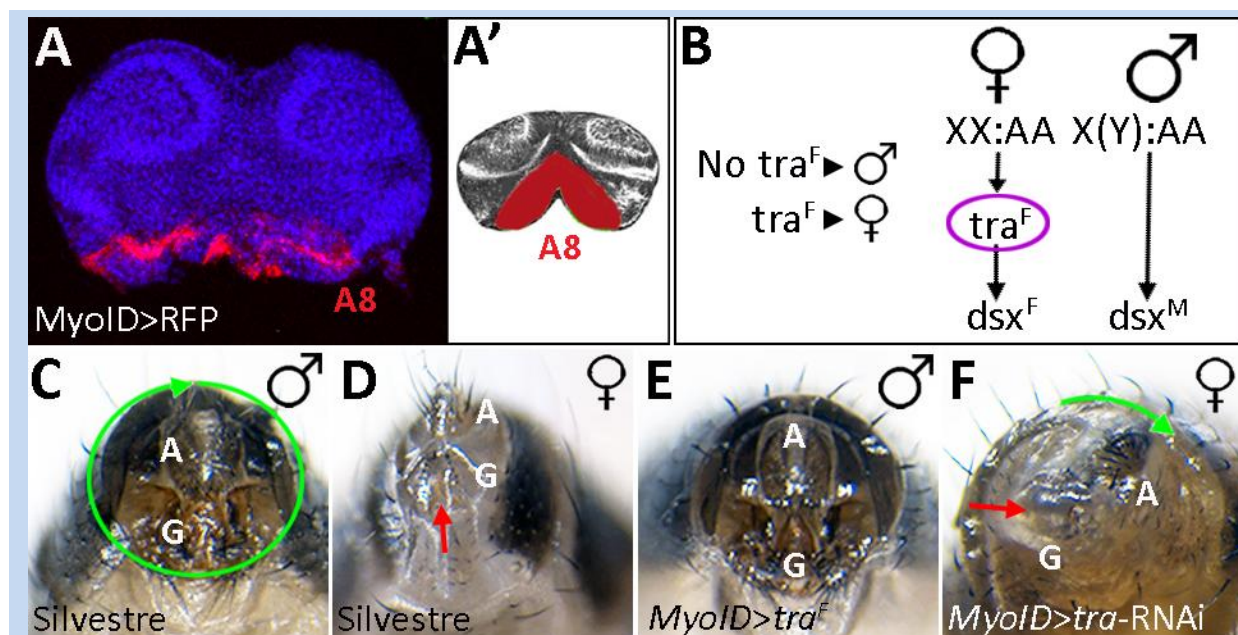
**Figura R15. Rotación de la genitalia durante la pupación y análisis de fertilidad.** (A) Fotos del proceso de rotación de la placa genital de un individuo de genotipo *Nrg-GFP*; *zcl<sup>2207</sup>-GFP hh-Dsred/+*, extraídos de la Película 16. Se muestran distintos momentos de la rotación: previa a la rotación (0°), 90°, 180°, 270° y posición final (360°). Nótese que el giro se produce en el sentido de las agujas del reloj (dextral, flechas amarillas), y que la posición inicial y final coinciden (se marca la analia con un asterisco). (B) Diagrama del análisis de fertilidad para individuos mutantes en la rotación genital. Se muestra el porcentaje de machos fértiles para el genotipo *MyoID-Gal4 UAS-MyoID-RNAi* a diferentes temperaturas, para obtener todo el rango de fenotipos mutantes. Se consideraron individuos solo con testículos bien formados y orientados. Se han dividido los individuos en tres clases: a) con rotación externa normal o casi normal (engloba rotaciones completas sinistral (360S), dextral (360D), no rotación (NR) y posiciones muy próximas a estas tres; n= 32); b) con rotación externa de 90° o 270° (engloba las rotaciones parciales para esos grados tanto dextral como sinistral; n=47); y c) con rotación externa de 180° (tanto dextral como sinistral; n=17). No se encontraron diferencias en fertilidad respecto al control (machos silvestres; n=40. Fertilidad= 97,5%. p-valor= 1) para el grupo de posición externa normal. Nótese que en posiciones cercanas a la normal (90° o 270° grados) aproximadamente el 30% de los machos fueron fértiles (p-valor respecto a control < 0,0001), mientras que en las posiciones más diferentes respecto a la normal (180°) todos los individuos son estériles p-valor < 0,0001). Código de colores: Azul para porcentaje de machos fértiles y rojo para machos estériles. Experimentos realizados a 25°C.

Como era de esperar, posiciones externas opuestas a la silvestre (180D y 180S) producen la total infertilidad del individuo (Fig. R15B). Posiciones cercanas a la silvestre, no mostraron disminución de su fertilidad, al menos en las condiciones en las que se llevo a cabo esta medida. Sorprendentemente, más del 30% de los machos con posiciones externas de 90° o 270° mostraron ser fértiles en las condiciones de estudio (Fig. R15B). Para todos estos últimos casos, cabe remarcar que el análisis realizado no permite estudiar otros parámetros como número de cópulas efectivas u otras variables que podrían verse afectadas.

#### R.4.1.2. El cambio de sexo del A8 del disco genital provoca fenotipos de rotación en hembras

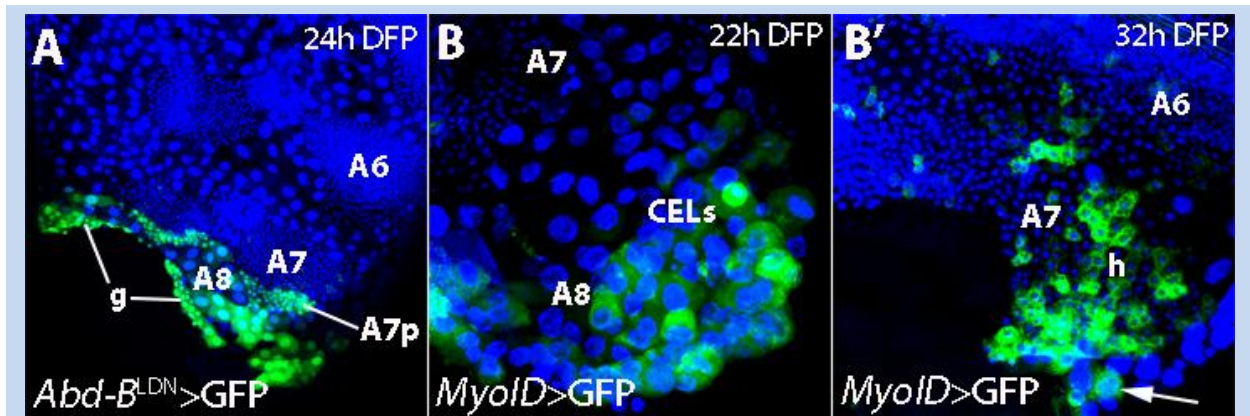
El gen Hox *Abd-B* es clave para la rotación de la genitalia de *D. melanogaster*, ya que activa a *MyoID*. En ausencia de *Abd-B* no se produce *MyoID* y la genitalia no rota (Coutelis et al., 2013). El tejido en el que se requiere la expresión de *MyoID* para el proceso de rotación es el A8 del disco genital (véase Introducción apartado I.8.1.) (Spéder et al., 2006). Cuando se sobreexpresa el gen *MyoID* la hembra no muestra ningún fenotipo (n= 40, datos no mostrados) siendo por tanto no suficiente esta proteína para inducir la asimetría en este sexo. La ausencia de *dsx* en intersexos (n=49) o el cambio de sexo de macho a hembra en esta región (con las líneas *MyoID-Gal4* o *Abd-B-Gal4<sup>LDN</sup>*) (n= 28) (Fig. R16A-B), inhibe la rotación de la placa genital del macho (Fig. R16E, comparar con C). Por el contrario el cambio de sexo hacia macho en el A8 genital (con la línea *Abd-B-Gal4<sup>LDN</sup>*) provoca la rotación de la genitalia de hembra, al igual que ocurre al usar la línea *MyoID-Gal4*, mostrando las hembras afectadas una rotación de hasta 90° dextral (n= 16) (Fig. R16F, comparar con D). Cuando intentamos en un fondo sin *Abd-B* (*Abd-B-RNAi*) sobreexpresar la proteína *Dsx<sup>M</sup>* con la línea *MyoID-Gal4*, no obtuvimos ningún macho adulto que poder analizar, y solo nacieron tres hembras, las cuales no mostraron ninguna rotación genital. Estos resultados indicarían que tanto la vía de determinación sexual de macho como *Abd-B* son necesarios para la adquisición de la asimetría, aunque experimentos previos de otros investigadores, en los que se rescata la rotación de la placa genital en el macho al sobreexpresar *MyoID* en un fondo carente de *Abd-B* (Coutelis et al., 2008) (véase apartado R.4.6. y Fig. 25F), arrojan incongruencias que serán discutidas más adelante (véase Discusión).

Ambas líneas Gal4 (*MyoID* y *Abd-B<sup>LDN</sup>*) han sido utilizadas clásicamente como de expresión en el A8 genital del macho para estudios de la rotación de este órgano (Coutelis et al., 2013; Petzoldt et al., 2012; Sato et al., 2015; Suzanne et al., 2010). Sin embargo, también dirigen la expresión al abdomen terminal (Fig. R17), por lo que no podemos descartar que los fenotipos obtenidos de rotación genital en experimentos realizados con ellas se deban a un efecto no autónomo del abdomen.



**Figura R16. Efectos fenotípicos del cambio de sexo en el A8 del disco genital.** (A) Disco genital de larva III, y esquema (A') de un macho de genotipo *MyoID-Gal4 UAS-CD8-RFP*, para mostrar cómo esta línea Gal4 dirige la expresión en el A8 del disco genital (en rojo en A'). (B) Esquema resumido de la cascada de determinación sexual en *D. melanogaster*. La presencia de Tra ( $\text{Tra}^F$ , solo en hembras) será determinante para la formación de la proteína  $\text{Dsx}^F$ . En ausencia de *tra*, se sintetiza la isoforma  $\text{Dsx}^M$ , que determina el desarrollo como macho. (C) Posición final de la genitalia en un macho adulto silvestre. La rotación durante la pupación se esquematiza con una flecha verde. (D) Posición final de la genitalia de una hembra adulta silvestre. La genitalia no sufre ningún proceso de rotación. (E) Genitalia de un macho de genotipo *MyoID-Gal4/UAS-tra<sup>F</sup>*. Nótese que la posición final es idéntica a la del macho control (comparar con C). Sin embargo, en estos machos no se produce la rotación de la placa genital durante la pupación (100% a 29°C, n=30. Observado a través de la disección interna y esquematizado por la ausencia de la flecha presente en C). (F) Genitalia de una hembra del genotipo *MyoID-Gal4/+; UAS-tra-RNAi/+*, en el que se observa como esta ha sufrido un giro de 90° (flecha verde, comparar con D. Dirección seguida por la posición de la doble fila de dientes vaginales característica de la genitalia hembra, marcada con un flecha roja en ambos casos) (n=16, 100% de los casos con rotación 45°- 90° a 29°C).

La placa genital, para girar, necesita sujetarse sobre algún tejido que sirva de soporte para la fuerza que ejerce de manera autónoma y que en principio crea el movimiento de rotación (véase Introducción apartado I.8.1.). A nivel epitelial la placa genital se une a la cutícula del abdomen, pero internamente muchos otros tejidos podrían estar implicados en ejercer de punto de referencia sobre el cual girar, o incluso en ejercer ellos mismos una fuerza que ayudara al giro. Para descartar la implicación de los músculos, provocamos la muerte de este tejido expresando el gen proapoptótico *reaper* con líneas Gal4 específicas de músculo (véase Materiales y métodos) durante la pupación. Las moscas afectadas no podían eclosionar, pero la rotación de su genitalia era silvestre (n= mínimo 20 por genotipo). Más adelante, otro grupo demostró que cortando el final del abdomen la placa genital podía desarrollar (en cultivo) de manera completa su rotación (Sato et al., 2015). Sin embargo, y a pesar de que estos autores interpretan que este experimento demuestra la total autonomía del proceso por la placa genital, en los cortes no solo se encontraba tejido del disco genital, sino que este iba unido al abdomen posterior, pudiendo este por tanto aún estar implicado en el control o permisividad de la rotación genital.

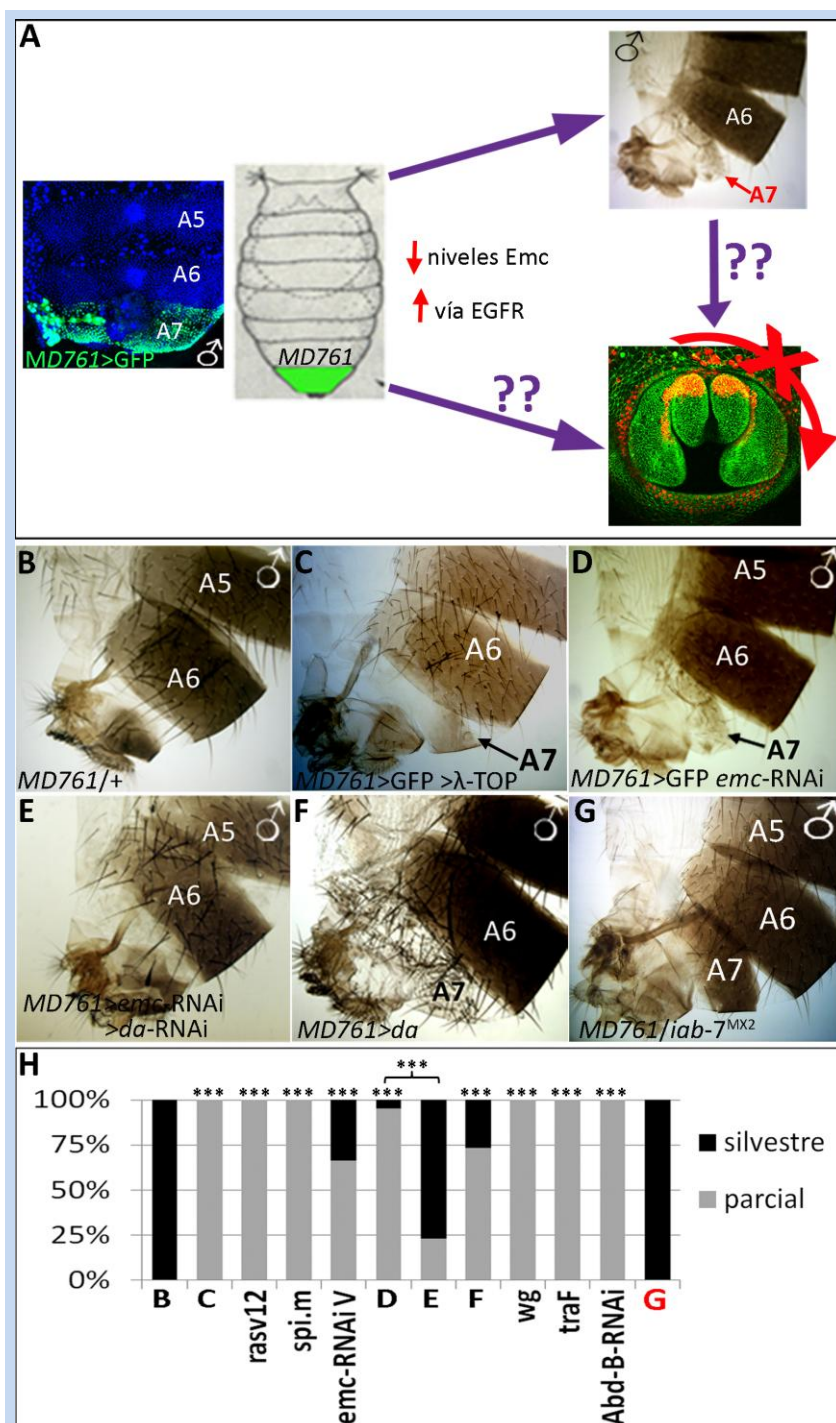


**Figura R17. Expresión de las líneas *Abd-B-Gal4<sup>LDN</sup>* y *MyoD-Gal4* en el abdomen posterior.** A pesar de haber sido considerada su expresión específica del A8 genital (Coutelis et al., 2013; Petzoldt et al., 2012; Sato et al., 2015; Suzanne et al., 2010), ambas dirigen también la expresión al abdomen posterior. **(A)** Abdomen pupal de un macho de genotipo *Abd-B-Gal4<sup>LDN</sup> UAS-GFP* en el que se observa la expresión de esta línea con un patrón parasegmental, desde el A7p (histoblastos y CELs), incluyendo el A8 abdominal (formado solo por CELs) hasta el A8a genital (g, expresión tenida en cuenta por otros autores). **(B-B')** Abdomen pupal de un macho de 22h DFP (B) y 32h DFP (B') de genotipo *MyoD-Gal4 UAS-GFP*. Esta línea dirige la expresión a las CELs del A8 en contacto con la genitalia (B y flecha blanca en B'), y, más tarde, a los histoblastos del A7 (B').

#### R.4.2. Mutaciones que producen un A7 en machos también causan fenotipos de rotación incompleta de la placa genital

Observamos que combinaciones genéticas que daban lugar a un A7 en el macho, también impedían la correcta rotación genital (Fig. R18A). Dado que, como se ha descrito, la rotación de la genitalia al igual que la desaparición del A7 solo ocurre en machos, ambos eventos solapan en el tiempo durante la metamorfosis, están regulados por el gen *Abd-B*, y pueden haber coevolucionado en respuesta a un cambio en la posición de cópula, nos propusimos analizar si existe una relación entre ambos procesos.

Los dos experimentos en los que inicialmente observamos una relación entre ambos procesos fueron la sobreexpresión de la vía EGFR a través de diferentes herramientas (Fig. R18C, H), y la reducción de los niveles de *Emc* (Fig. R18D, H) en el segmento A7. En estos experimentos la aparición de un A7 se correspondía con un fenotipo de rotación parcial. Se obtuvieron resultados similares para el cambio de sexo, la sobreexpresión de *wg*, o la inhibición de *Abd-B* en el abdomen posterior. Además, el rescate obtenido con las proteínas HLH de eliminación del A7 (véase apartado R.1.2), iba acompañado en todos los casos por un rescate en el fenotipo de rotación incompleta, aunque de nuevo el mejor resultado se obtuvo para el gen *da* (Fig. R18E, F, H). Todos estos experimentos fueron llevados a cabo con la línea *MD761-Gal4* (Fig. R18H). Dado que esta línea es una inserción en *Abd-B*, y que este gen Hox controla el proceso de estudio, decidimos repetir algunos cruces en un fondo *Dp(3;1)P115*, una duplicación del C-BX, para descartar que los fenotipos observados pudieran estar afectados por la heterocigosis para la inserción *Gal4* (aunque los machos *MD761-Gal4/+* no muestran A7 ni defectos en la rotación). La sobreexpresión de la vía EGFR o la inhibición de *emc* mediante su RNAi en este fondo genético llevaron a la aparición de un A7 en el macho así como al impedimento de la rotación de la placa genital.

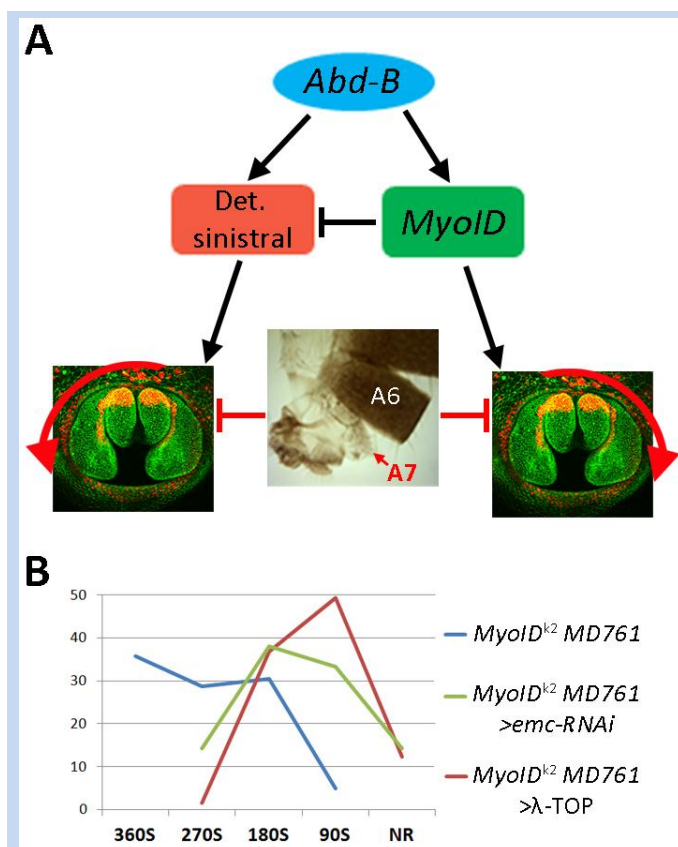


**Figura R18. Relación entre la eliminación del A7 en machos y la rotación de la placa genital.**

**(A)** Las combinaciones genéticas que producen la aparición de un A7, tales como sobreexpresar la vía EGFR o disminuir los niveles de Emc (con la herramienta *MD761-Gal4*, cuya expresión en pupa en el A7 se muestra a la izquierda), impiden la correcta rotación genital. Las interrogaciones señalan la duda sobre si la aparición de un A7 implica una rotación anormal o este es un fenotipo independiente. **(B)** Abdomen posterior de un macho control heterocigótico para la línea *MD761-Gal4*. **(C)** La sobreexpresión de la vía EGFR en el A7 (*yw UAS-λ-TOP;; MD761-Gal4 UAS-GFP/+*) produce la aparición de un gran A7 en el macho. **(D)** Los machos del genotipo *w; UAS-emc-RNAi (NIG-FLY)/UAS-GFP; MD761-Gal4/+* muestran también un A7. En este fondo genético, la inhibición simultánea de otras proteínas HLH, como Daughterless **(E)** (*w; UAS-emc-RNAi/+; MD761-Gal4/UAS-da-RNAi*) produce un rescate del fenotipo mutante (comparar con D). **(F)** Cuando se aumentan los niveles de Da (*w; UAS-da/tub-Gal80<sup>TS</sup>; MD761-Gal4/+*) aparece un A7 grande y

despigmentado con muchas cerdas (los cruces para los individuos mostrados en C-E se realizaron a 29°C; para el caso de F se cambió la temperatura de 17°C a 29°C en estadio de pupa blanca). **(G)** Abdomen de un macho de genotipo *MD761-Gal4/iab-7<sup>MX2</sup>* (a 25°C) que muestra siete segmentos. **(H)** Gráfica que muestra el grado de rotación genital para cada genotipo (B-G, correspondencia con paneles). Se muestran además otros genotipos: *UAS-rasv<sup>12</sup>/+; MD761-Gal4/+* y *UAS-spi.m-GFP;; MD761-Gal4/+* (ambos para sobreexpresión de EGFR), *MD761-Gal4/UAS-emc-RNAi* (Vienna), *UAS-wg<sup>E1</sup>/+; MD761-Gal4/+*, *UAS-tra<sup>F</sup>/+; MD761-Gal4/+* (cambio de sexo) y *MD761-Gal4/UAS-Abd-B-RNAi*. Los genotipos que no muestran un A7 (B, E) ( $n=300$  y  $n=189$   $p$ -valor  $<0,0001$  frente a D), se corresponden con una rotación silvestre, y los que producen la aparición de un A7 (C, *rasv<sup>12</sup>*, *spi.m*, *emc-RNAi* Vienna, D, F, *wg*, *tra<sup>F</sup>*, *Abd-B-RNAi*) ( $n=114$ ,  $n=63$ ,  $n=156$ ,  $n=255$ ,  $n=176$ ,  $n=127$ ,  $n=25$ ,  $n=40$  y  $n=27$ , respectivamente) inhiben la rotación (rotación parcial;  $p$ -valor  $<0,0001$  para todos los casos). Nótese, sin embargo, que en el genotipo G aparece un A7 y la rotación genital es silvestre ( $n=30$ ,  $p$ -valor=1). Código de colores: negro para rotación silvestre (360°), gris para rotación parcial. Los  $p$ -valor y asteriscos graficados son para genotipo experimental respecto al control (*MD761-Gal4/+*, B), excepto para el rescate de E, frente a D.

A la luz de todos estos resultados, parecía haber una correlación entre la aparición de un segmento séptimo y rotación parcial genital. Sin embargo, encontramos genotipos mutantes para *Abd-B* en el A7 (mutaciones en la secuencia reguladora *iab-7*), con un gran segmento A7 pero rotación correcta de la placa genital (Fig. R18G, H). Por tanto, la supresión de la eliminación del A7 no parecía ser, o al menos no únicamente, la responsable del impedimento del proceso de rotación. ¿Por qué, entonces, se obtienen fenotipos de rotación incompleta al expresar diversas construcciones con la línea *MD761-Gal4*, que hemos dicho que dirige la expresión en el segmento A7? La razón, explicada en más detalle en el apartado siguiente, reside en la expresión de esta línea posterior al A7.



**Figura R19. Combinaciones genéticas que no eliminan el A7 también impiden la correcta rotación de la placa genital en dirección sinistral.** (A) Esquema para representar la hipótesis en la que la no correcta eliminación del A7 en el macho impediría tanto la rotación dextral como la sinistral. *Abd-B* activa tanto a *MyoID* (determinante dextral) como a un posible determinante sinistral (Coutelis et al., 2013). Si la sobreexpresión de EGFR o inhibición de Emc inhibiera a *MyoID*, en un fondo homocigótico *MyoID<sup>k2</sup>* el fenotipo de rotación sinistral se vería aumentado. Por el contrario, si estos genotipos (sobreexpresión de EGFR o inhibición de Emc) inhiben el giro de la placa genital, sin interferir con la genes determinantes de la dirección de giro, se espera que en un fondo homocigótico *MyoID<sup>k2</sup>*, produzcan un rescate del giro sinistral del mutante, hacia situaciones de no rotación. (B) Gráfica que muestra el porcentaje de individuos (ordenadas) para cada genotipo analizado con rotación total sinistral (360S), rotaciones parciales sinistras (270S, 180S o 90S), o no rotación (NR).

El genotipo control (a 25°C: línea azul, *MyoID<sup>k2</sup>/MyoID<sup>k2</sup>; MD761-Gal4/+*, n=59) muestra mayor porcentaje de individuos con rotación total sinistral, y no muestra individuos sin rotación genital (NR). Por el contrario, los dos casos experimentales (a 29°C: línea verde para el genotipo *UAS-emc-RNAi MyoID<sup>k2</sup>/MyoID<sup>k2</sup>; MD761-Gal4/+*, n=42; línea roja para el genotipo *yw UAS-λ-TOP; MyoID<sup>k2</sup>/MyoID<sup>k2</sup>; MD761-Gal4/+*, n=65), producen un desplazamiento de la gráfica hacia situaciones con menor grado de rotación sinistral, inhibiendo en un 100% de los casos la rotación total sinistral (no se observó ningún individuo 360S), y alcanzando incluso fenotipos de no rotación (NR) (p-valor<0,0001 para ambos casos respecto al control). Análisis estadístico realizado teniendo en cuenta dos clases: rotación total (360S) y rotación parcial (NR a 270S).

Por otra parte, al inicio de nuestro estudio nos preguntábamos si quizás la sobre-activación de la vía EGFR o la inhibición de Emc en el abdomen posterior podría inhibir de manera directa o no la expresión o actividad de *MyoID*, siendo esta inhibición la causante de los problemas en la rotación. Debido a la ausencia de anticuerpo contra esta proteína, o de otras herramientas funcionales para su detección (las construcciones existentes no reproducen el patrón de expresión de *MyoID* descrito por su anticuerpo en

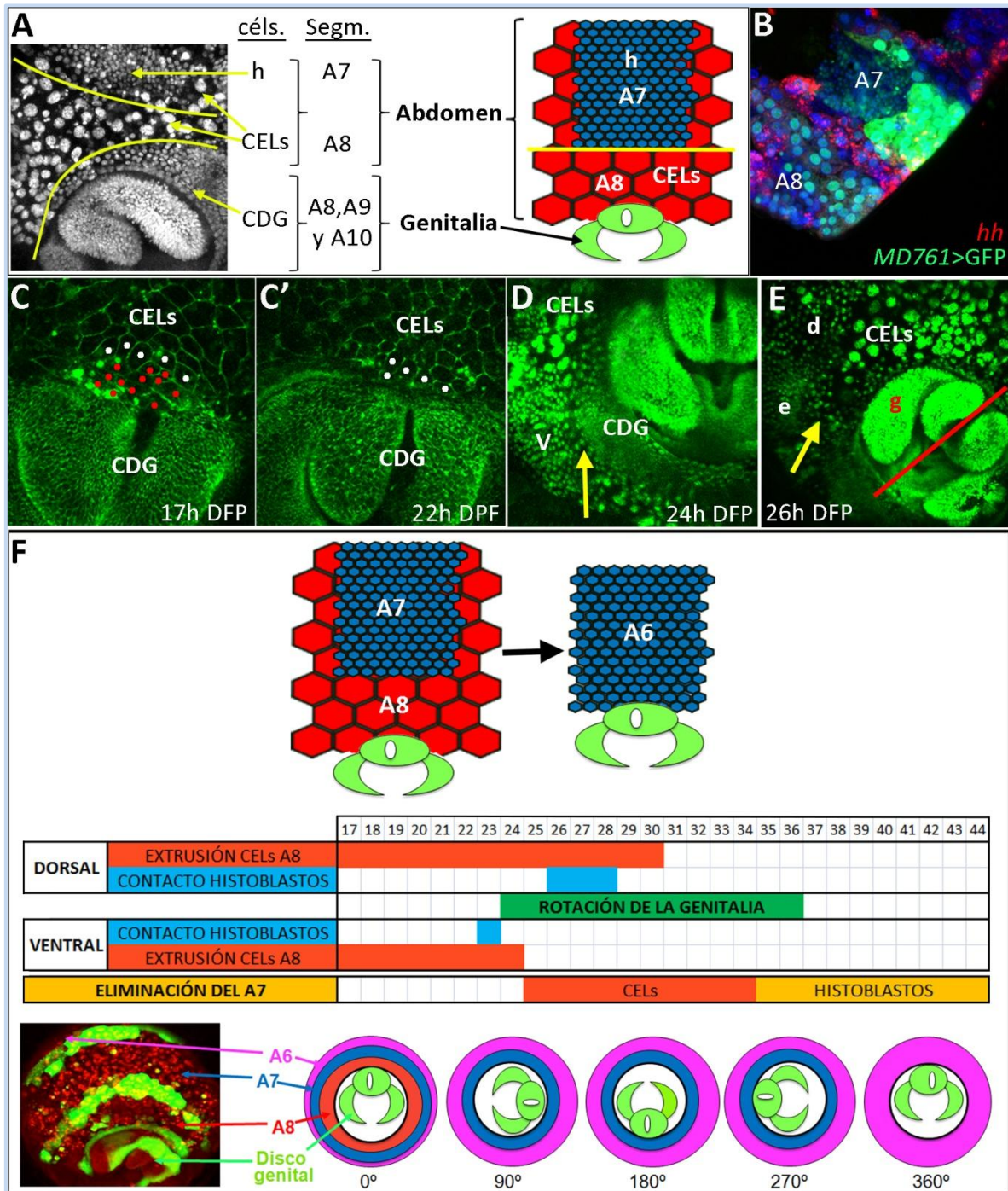
el A8 del disco de macho y muestran señal ectópica en el de hembra, datos no mostrados), decidimos llevar a cabo un diseño experimental para confirmar o negar esta relación. En primer lugar, cabe remarcar que todos los fenotipos de rotación parcial obtenidos fueron rotación parcial dextral. Dado que *Abd-B* activa tanto a *MyoID* como a un posible determinante sinistral, que está inhibido por *MyoID* (Coutelis et al., 2013) (Fig. R19A), si la sobreexpresión de EGFR o la eliminación de *Emc* inhibiera a *MyoID*, se esperaría un aumento de fenotipo sinistral en un fondo homocigótico *MyoID*<sup>k2</sup> (que por sí mismo no muestra el 100% de fenotipo 360S) (Fig. R19B). Por el contrario, si estos genotipos inhiben el giro de la placa genital sin interferir con los genes determinantes de la dirección de giro, se espera que produzcan un rescate del giro sinistral en este fondo homocigótico *MyoID*<sup>k2</sup>, hacia situaciones de no rotación (Fig. R19A). Tras sobreexpresar la vía EGFR o inhibir *Emc* en el abdomen terminal, en un fondo mutante para *MyoID*, observamos que los fenotipos de rotación obtenidos rescataban parcialmente el fenotipo mutante sinistral (Fig. R19B), por lo que podemos concluir que los fenotipos observados se deben a un impedimento del propio proceso morfogenético del giro, y son independientes de las vías de regulación que determinan la dirección de giro de manera autónoma en el disco genital.

#### **R.4.3. Las CELs del A8 están en contacto con la placa genital al inicio de la rotación**

Como se ha descrito, parecía que la formación de un A7 no podía ser el responsable de los fenotipos de rotación parcial, por lo que decidimos analizar con más detalle las poblaciones celulares que contactan durante el proceso en estudio, que resultó ser más complejo y dinámico de lo esperado. Tres poblaciones celulares (células del disco genital, histoblastos y CELs), y varios segmentos (A6, A7 y A8 abdominales y A8 genital) (nótese que hay dos segmentos A8 implicados y en contacto: uno proveniente del disco genital y otro del abdomen, estando este último solo formado por CELs; véase esquema Fig. R20A), están implicados e intercambian los contactos entre ellos durante la rotación genital (Fig. R20A). Esto se debe a la coincidencia en el tiempo y espacio de tres procesos morfológicos: la rotación genital, la delaminación de las CELs del abdomen y la extrusión de los histoblastos del A7. Las delaminaciones celulares que ocurren en la zona terminal del abdomen hacen que los contactos del disco genital con el abdomen sean muy dinámicos en el tiempo. Lo primero que pudimos observar es que es el segmento A8 abdominal, formado únicamente por CELs, el que contacta con la genitalia en los estadios previos a la rotación (24h DFP) (Fig. R20A). Además, la línea *MD761-Gal4*, usada en todos los experimentos en los que se obtuvo una correlación entre aparición de un A7 y rotación parcial, no se expresa solo en el PS12 como pensábamos: análisis detallados revelaron que dirige la expresión también en las CELs del A8 abdominal (Fig. R20B). Quizás esta expresión había pasado hasta el momento desapercibida ya que el proceso que estudiamos primero (la extrusión del A7) ocurre en estadios en los cuales el segmento A8 abdominal ya se ha delaminado, y por tanto no visualizábamos la expresión dirigida por esta inserción. Al analizar estadios previos a la rotación (n= 8 películas) (17h DFP), observamos como el inicio de la



delaminación de las CELs del A8 precede al proceso de rotación, y continúa hasta terminado el giro (36h DFP) (Fig. R20C,C' y R20F, Películas 16 y 17). Además, observamos como la desaparición de las CELs del A8, precede a la desaparición de las CELs del A7 (Fig. R20F). Para añadir un nivel más de complejidad, los procesos no ocurren a igual ritmo en el lado dorsal y ventral, ocurriendo primero en ventral tanto la delaminación de las CELs (Fig. R20F) como los contactos de los histoblastos del A7 con el disco genital: el contacto con el nido ventral coincide con el inicio de la rotación (24h DFP) (n= 10 películas) (Fig. R20D, F. Película 18), mientras que el dorsal contacta unas tres horas más tarde, cuando la genitalia ha girado casi 90° (n= 16 películas) (Fig. R20E, F. Película 19). Los constantes cambios de contactos entre tejidos (Fig. R20F) dificultan el estudio de la relación entre todos estos procesos.

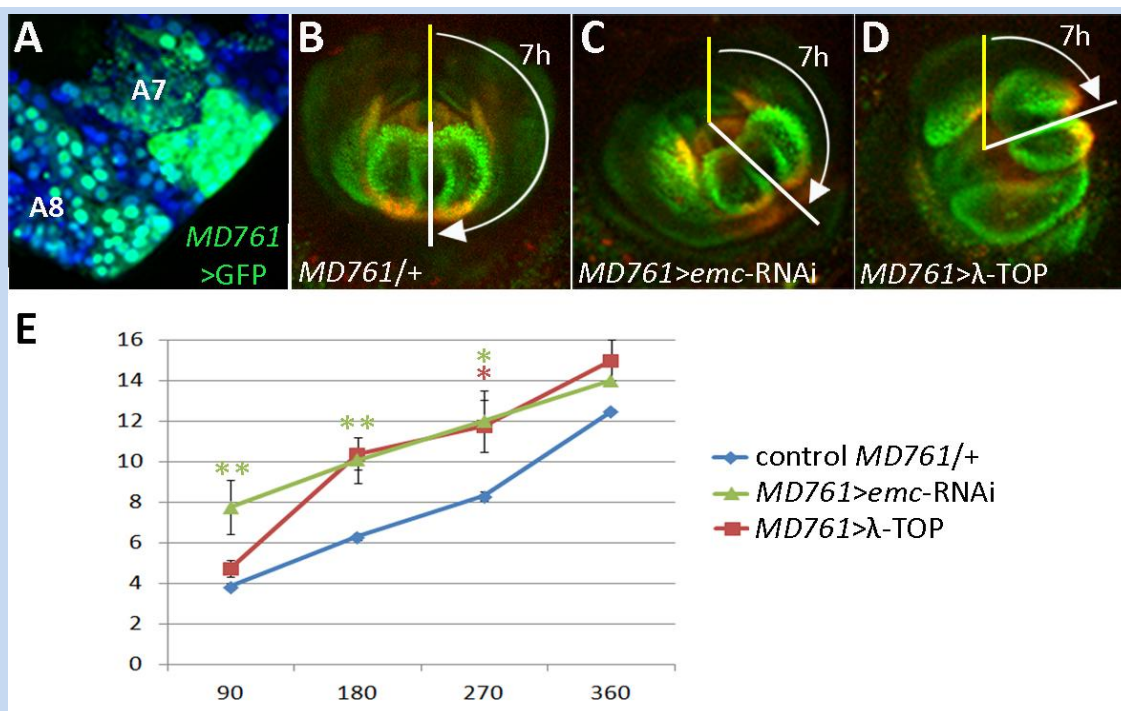


**Figura R20. Las células larvianas del A8 están en contacto con el disco genital al inicio de la rotación. (A)** Imagen (izquierda) y esquema (derecha) de las poblaciones celulares y segmentos abdominales que contactan, de manera dinámica, con la placa genital durante la rotación de la misma. La placa genital está formada por células diploides del disco genital (CDG, verde en los esquemas) de los segmentos A8, A9 y A10. Al inicio de la rotación, la genitalia contacta con el A8 abdominal, formado únicamente por CELs (hexágonos rojos grandes en el esquema), y no con el A7, que está formado por histoblastos (h, hexágonos pequeños) y CELs. Durante la metamorfosis las CELs del A8 desaparecen y la genitalia contactará entonces con el A7. La imagen es una vista lateral del abdomen terminal de un macho de genotipo *w*; *His2Av-GFP/hh-Dsred* a las 24h DFP. El canal rojo se ha eliminado para facilitar la visualización, pero se ha utilizado para marcar los límites entre segmentos (líneas amarillas). Anterior arriba, posterior abajo. **(B)** Parte posterior de un abdomen pupal de un macho del genotipo *w*; *UAS-GFP/+; MD761-Gal4 hh-LexA LexO-cherry/+*, a las 24h DFP. El Gal4 utilizado en los experimentos previos no solo dirige la expresión al A7, sino que también lo hace al A8. Topro (azul) marca núcleos. **(C, C')** La extrusión de las CELs del A8, en contacto con las células del disco genital (CDG) precede al proceso de rotación y puede visualizarse hasta siete horas antes del inicio del giro. Se marcan con un punto rojo las CELs que van a desaparecer, y en blanco las que aún están presentes dos horas previas al inicio de la rotación. Nótese como las CELs marcadas con puntos blancos se encuentran en C' más cercanas a las CDG. Imágenes tomadas de la Película 17 de genotipo *Nrg-GFP*. **(D)** Visión ventral de un macho de genotipo *w*; *His2Av-GFP* en el momento de inicio de la rotación (24h DFP). El nido de histoblastos ventral del A7 (v) ha entrado en contacto (flecha amarilla) con las CDG (Película 18). **(E)** Visión dorsal de un macho de genotipo *w*; *His2Av-GFP* tras dos horas de rotación. Se muestra una línea roja para representar el grado de rotación genital. El nido de histoblastos dorsal (Película 19) del A7 (d) aún no ha contactado con la genitalia (g), y se observan CELs entre ambas poblaciones celulares. Nótese como el nido espiracular (e) sí ha contactado ya con el disco genital (flecha amarilla). **(F)** Gráfica y esquemas para resumir los contactos dinámicos entre estos tejidos. Arriba: En un inicio, la genitalia (en verde) está en contacto con las CELs del A8 abdominal (hexágonos rojos grandes). Cuando estos se extruyen los contactos entre tipos celulares irán cambiando hasta que, finalmente, tras la rotación de la genitalia y la extrusión del A7, el A6 (formado por histoblastos, hexágonos azules pequeños) contacte con la genitalia. En medio y abajo: se representa en verde la genitalia (y la duración de su rotación), en rojo el A8 (y su extrusión así como la extrusión de las CELs del A7 en la gráfica), en azul el A7 (y su momento de contacto con la genitalia), en naranja la eliminación de los histoblastos del A7; y en rosa el A6, que contactará finalmente con la genitalia. La gráfica muestra tiempos aproximados y se ha elaborado teniendo en cuenta diferentes películas *in vivo* desde visión dorsal y ventral. Nótese cómo el desarrollo en ventral parece ir adelantado respecto a dorsal, cómo el nido de histoblastos ventral del A7 contacta desde el inicio de la rotación con la genitalia, y cómo la desaparición de las CELs del A8 precede a la desaparición de las CELs del A7. Dado que tanto CELs (A8 y A7) como histoblastos (A7), contactan con la genitalia durante su rotación, no se puede descartar que la extrusión del A7 tenga una función permisiva sobre el proceso de rotación. A la izquierda, abajo, imagen del genotipo *en-Gal4 UAS-GFP/ His2Av-RFP* (tomada de Foronda et al., 2012). Experimentos realizados a 25°C.

#### R.4.4. Disminución en la velocidad de rotación al sobreexpresar la vía EGFR o disminuir los niveles de Emc en el abdomen posterior

Independientemente de que el fenotipo de rotación parcial observado al sobreexpresar la vía EGFR o inhibir Emc en el abdomen posterior con la línea *MD761-Gal4* (Fig. R21A) se deba al A7, al A8 o a ambos, se observa no solo una falta en la finalización del giro, sino una disminución en la velocidad del proceso en las rotaciones parciales (Fig. R21B-E. Películas 20, 21 y 22). Así, el cambio producido en los segmentos terminales abdominales, impide, de manera no autónoma, el correcto giro de la placa genital, que en individuos silvestres ocurre a una velocidad relativamente constante (Kuranaga et al., 2011). Este efecto sugiere que el cambio genético en el abdomen provoca quizás una señal dirigida a las células del disco

genital o un impedimento mecánico que impide que el tejido del disco genital pueda cambiar sus contactos con la suficiente fluidez para girar a la velocidad normal. Esta disminución de la velocidad no se observa en todos los casos, aunque si es una tendencia si se observan todos los individuos de cada grupo experimental (Fig. R21E). La razón de aquellos casos en que no se aprecia una disminución clara puede deberse al método experimental: el experimento requiere el cambio de temperatura a 29°C (para activar/inhibir genes; sistema Gal4/Gal80<sup>TS</sup>) pero la filmación necesita un cambio de temperatura tardío (cambios previos producen necrosis en el tejido lo que dificulta su análisis *in vivo*). Por tanto, aquellos individuos en los que el cambio fuera ligeramente más tardío quizás no han sufrido una activación/inactivación génica suficiente para producir una disminución obvia de la velocidad.

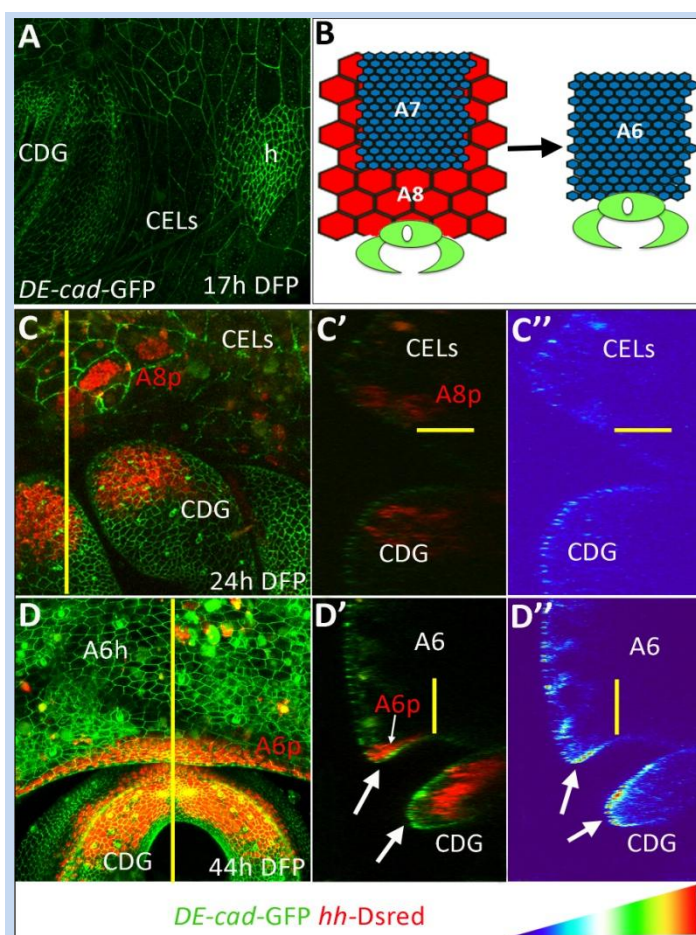


**Figura R21. La velocidad de rotación de la genitalia disminuye al sobreexpresar la vía EGFR o bajar los niveles de *Emc* en los segmentos A7 y A8. (A)** Abdomen pupal de un macho del genotipo *MD761-Gal4 UAS-GFP* que muestra GFP tanto en el A7 como en el A8. Topro (azul) marca núcleos. **(B-D)** Imágenes que muestran la posición de la genitalia de un macho control (B, *w*; *MD761-Gal4 hh-Dsred His2Av-GFP/+*), un macho experimental con niveles reducidos de *Emc* (C, *w*; *UAS-emc-RNAi (NIG-FLY)/ tub-Gal80<sup>TS</sup>; MD761-Gal4 hh-Dsred His2Av-GFP/+*) o elevados para la vía EGFR (D, *yw UAS-λ-TOP; tub-Gal80<sup>TS</sup>/+; MD761-Gal4 hh-Dsred His2Av-GFP/+*) en el abdomen posterior, siete horas tras el inicio de la rotación (Películas 20, 21 y 22, respectivamente). Se representa con una línea amarilla la posición inicial, con una blanca la posición actual, y con una flecha blanca la trayectoria recorrida en cada caso para el mismo periodo de tiempo. Se han escogido unos casos en los que el retraso es más evidente, porque existe variabilidad en el tiempo de rotación. **(E)** Gráfica que muestra la cantidad de grados recorridos (eje de abscisas, el giro total se ha dividido en las posiciones 90°, 180°, 270° y 360°), por unidad de tiempo (eje de ordenadas, en horas) para el control (corresponde a panel B, en azul, n=6 películas), y los genotipos experimentales: inhibición de *emc* (corresponde a panel C, en verde, n=7 películas) y sobreexpresión de EGFR (corresponde a panel D, en rojo, n=9 películas). Se observa una disminución en la velocidad del proceso de rotación para los dos grupos experimentales respecto al control, no obteniéndose en todas las posiciones una diferencia significativa aunque si una tendencia a aumentar el tiempo necesario para alcanzar la misma posición (p-valor para el tiempo transcurrido hasta alcanzar las posiciones 90°, 180°, 270° y 360° respecto al correspondiente control: para la inhibición de *emc* p-valores de 0,0026; 0,0053; 0,0256 y 0,0684 y para la sobreexpresión de EGFR 0,1432; 0,0747; 0,0247 y 0,0684). Cambios a 29°C en pupa blanca.

## R.4.5. Posibles mecanismos para la correcta interacción entre el abdomen terminal y el disco genital

### R.4.5.1. Niveles de expresión de DE-cadherina

En las células epiteliales, las uniones adherentes son las principales responsables de la unión célula-célula, teniendo además un papel clave en la coordinación y organización de movimientos celulares dentro del tejido. La principal proteína de este tipo de uniones celulares es la E-cadherina (Gorfinkiel y Arias, 2007; Harris, 2012; Letizia y Llimargas, 2012; Pocha y Montell, 2014). Dado que la DE-cadherina (la E-cadherina de *Drosophila*) se requiere por tanto para la adhesión celular y la cohesión del tejido, pensamos que quizás se expresase a niveles bajos (o fuera menos activa) en las células que deben disminuir sus contactos celulares ya sea para delaminarse (CEs), o porque estos contactos deben variar con las células colindantes durante una migración celular (células del A8 genital durante la rotación o borde de los nidos de histoblastos).



**Figura R22. Los niveles de DE-cadherina se mantienen bajos en la interfase entre la genitalia y el abdomen durante la rotación y aumentan tras la extrusión del A7. (A)** Abdomen de un macho (*DE-cad-GFP*) en estadio de pupa temprana. La expresión de cadherina es menor en las CELs que en el nido de histoblastos (h). **(B)** Esquema de los cambios de contactos durante la pupación entre el abdomen y la genitalia. En un inicio, la genitalia (verde) contacta con las CELs del A8 abdominal (hexágonos rojos grandes). Cuando estas se extruyen los contactos entre tipos celulares irán cambiando (véase Fig. R20), hasta que tras la rotación de la genitalia y la extrusión del A7, el A6 (formado por histoblastos, hexágonos azules pequeños) contacte con la genitalia. **(C-D'')** Región de contacto de las células del abdomen posterior (CELs) y las células del disco genital (CDG) de machos de genotipo *DE-cad-GFP/+; hh-Dsred/+* al inicio de la rotación (24hDFP) **(C-C'')** y tras la extrusión del A7 (44h DFP), cuando el A6 (histoblastos, A6h) contacta con la genitalia **(D-D'')**. Se muestra en detalle la DE-cad-GFP en cortes ortogonales **(C', D')**, señalados en C y D como líneas verticales amarillas, y para facilitar la visualización de la intensidad de señal se ha procesado con un filtro Thermal **(C''-D'')**. En los cortes ortogonales (C',C'',D',D'') se marca con líneas amarillas el límite entre el abdomen y las células del disco genital (CDG) (reconocido gracias al marcaje rojo con *hh-Dsred* del A8p abdominal (CELs), en C, y del A6p (histoblastos), en D). Al inicio de la rotación **(C-C'')** no se observan zonas de alta intensidad. Por el contrario, más tarde **(D-D'')** los niveles de Cadherina son más altos al final del abdomen (correspondiendo con el A6p), y en algunas CDG (flechas blancas en D' y D''), coincidiendo con el fin de los intercambios en contactos celulares en el abdomen y la genitalia que se producen durante la rotación genital y la extrusión de CELs e histoblastos. Experimentos a 25°C.

En los cortes ortogonales (C', D'), señalados en C y D como líneas verticales amarillas, y para facilitar la visualización de la intensidad de señal se ha procesado con un filtro Thermal (C''-D''). En los cortes ortogonales (C', C'', D', D'') se marca con líneas amarillas el límite entre el abdomen y las células del disco genital (CDG) (reconocido gracias al marcaje rojo con *hh-Dsred* del A8p abdominal (CELs), en C, y del A6p (histoblastos), en D). Al inicio de la rotación (C-C'') no se observan zonas de alta intensidad. Por el contrario, más tarde (D-D'') los niveles de Cadherina son más altos al final del abdomen (correspondiendo con el A6p), y en algunas CDG (flechas blancas en D' y D''), coincidiendo con el fin de los intercambios en contactos celulares en el abdomen y la genitalia que se producen durante la rotación genital y la extrusión de CELs e histoblastos. Experimentos a 25°C.

Por eso decidimos estudiar sus niveles de expresión en el abdomen posterior. En estadios tempranos, previos a la rotación (Fig. R22A), los niveles de DE-cadherina observados en el abdomen son muy bajos en las CELs, que ya se están delaminando en el segmento A8, y en las células del borde de los nidos de histoblastos (Ninov et al., 2007; Teng et al., 2017), que deben intercalarse entre las CELs a medida que el nido avanza y cubre todo el abdomen. Los niveles también son bajos en el A8 genital, pues estas células deben sufrir una migración previa a la propia rotación, hasta que se unen en posición dorsal formando un anillo alrededor del resto de la placa genital (Keisman et al., 2001). Los intercambios celulares se suceden hasta que finalmente la genitalia contacta con el A6, en ese momento formado ya solo por histoblastos (Fig. R22B). Los niveles bajos de Cadherina se mantienen en la unión entre el abdomen y la genitalia durante la rotación de esta última (n= 40 pupas) (Fig. R22C-C''), y experimentan una drástica subida en la zona de unión dorsal entre ambos tejidos (estando el abdomen formado por histoblastos del A6) tras el proceso de rotación y de extrusión de las CELs y de los histoblastos del segmento A7 (44h DFP) (n= 5 pupas) (Fig. R22D-D''), es decir, cuando ya han concluido todos los movimientos celulares.

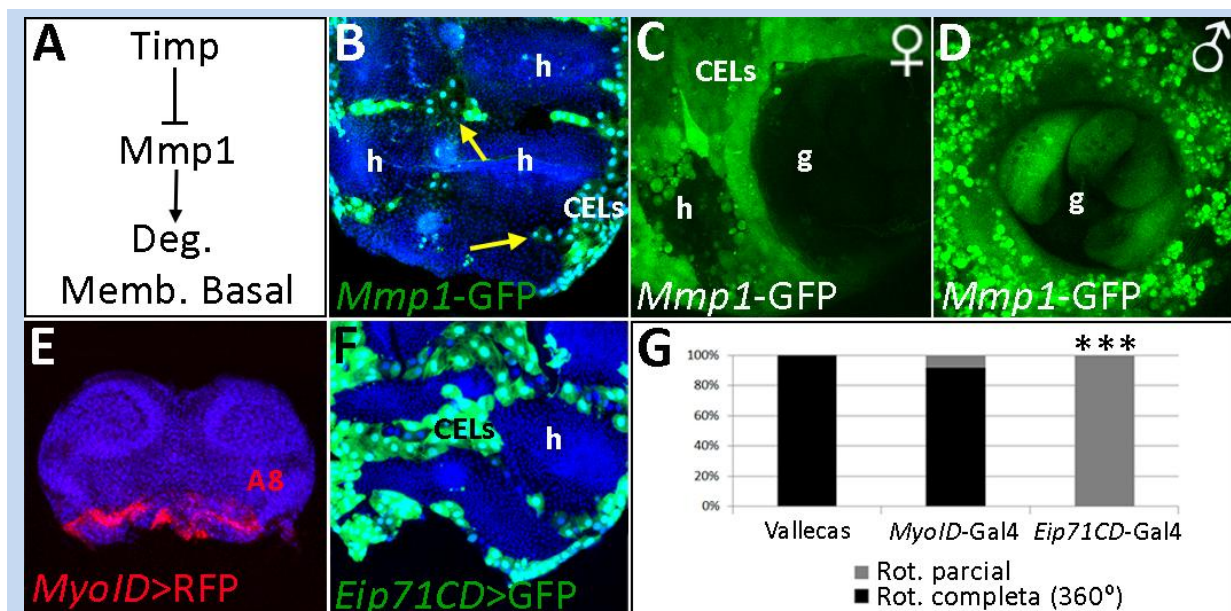
Sin embargo, la sobreexpresión de DE-cadherina en el abdomen posterior (en todas las CELs con la línea *Eip71CD-Gal4* o en el A7 y A8 con la línea *MD761-Gal4*) no produjo ningún fenotipo destacable. Además, la sobreexpresión en el A7 de la vía EGFR (n= 8 disecciones de abdómenes pupales) mediante su receptor constitutivamente activo, o la reducción de los niveles de Emc (n= 12 disecciones de abdómenes pupales), no produjeron un aumento de la DE-cadherina (datos no mostrados).

#### R.4.5.2. Implicación de la degradación de la Membrana Basal

Para la correcta delaminación de las CELs, estas sufren constricción apical, se desplazan hacia basal y son finalmente captadas por macrófagos circundantes que ejercerán su función fagocítica sobre estas células eliminadas. Para que esto ocurra, estas CELs deben atravesar la membrana basal de la cutícula (Ninov et al., 2007). La membrana basal de *Drosophila* está formada, entre otras proteínas, por Perlecan, Nidógeno, dos Lamininas y Colágeno IV (codificado por los genes *viking* y *Cg25C*) (Broadie et al., 2011; Hynes y Zhao, 2000); y se degrada mediante las Metaloproteinasas Mmp1 y Mmp2, cuyo principal inhibidor es Timp (revisado en Page-McCaw, 2008) (Fig. R23A). La expresión de *Mmp1* es elevada en todas las CELs del abdomen, de machos y hembras, para todos los estadios analizados en los cuales estas células se están delaminando (Fig. R23B). Se observó por otra parte, una mayor señal de *Mmp1* en la genitalia de machos que de hembras (Fig. R23C, D). La posible implicación de la propia placa genital en la degradación de la membrana basal se discutirá más adelante (véase Discusión).

La inhibición de la degradación de la membrana basal (a través de la sobreexpresión de Timp) en el A8 del disco genital con la línea *MyoID-Gal4* (Fig. R23E), no impidió la correcta migración de estas células para completar la rotación (Fig. R23G). Tampoco se obtuvo ningún fenotipo de rotación parcial con la línea *esg-Gal4*, que se expresa en la genitalia (n= 38 machos). Por el contrario, la sobreexpresión de

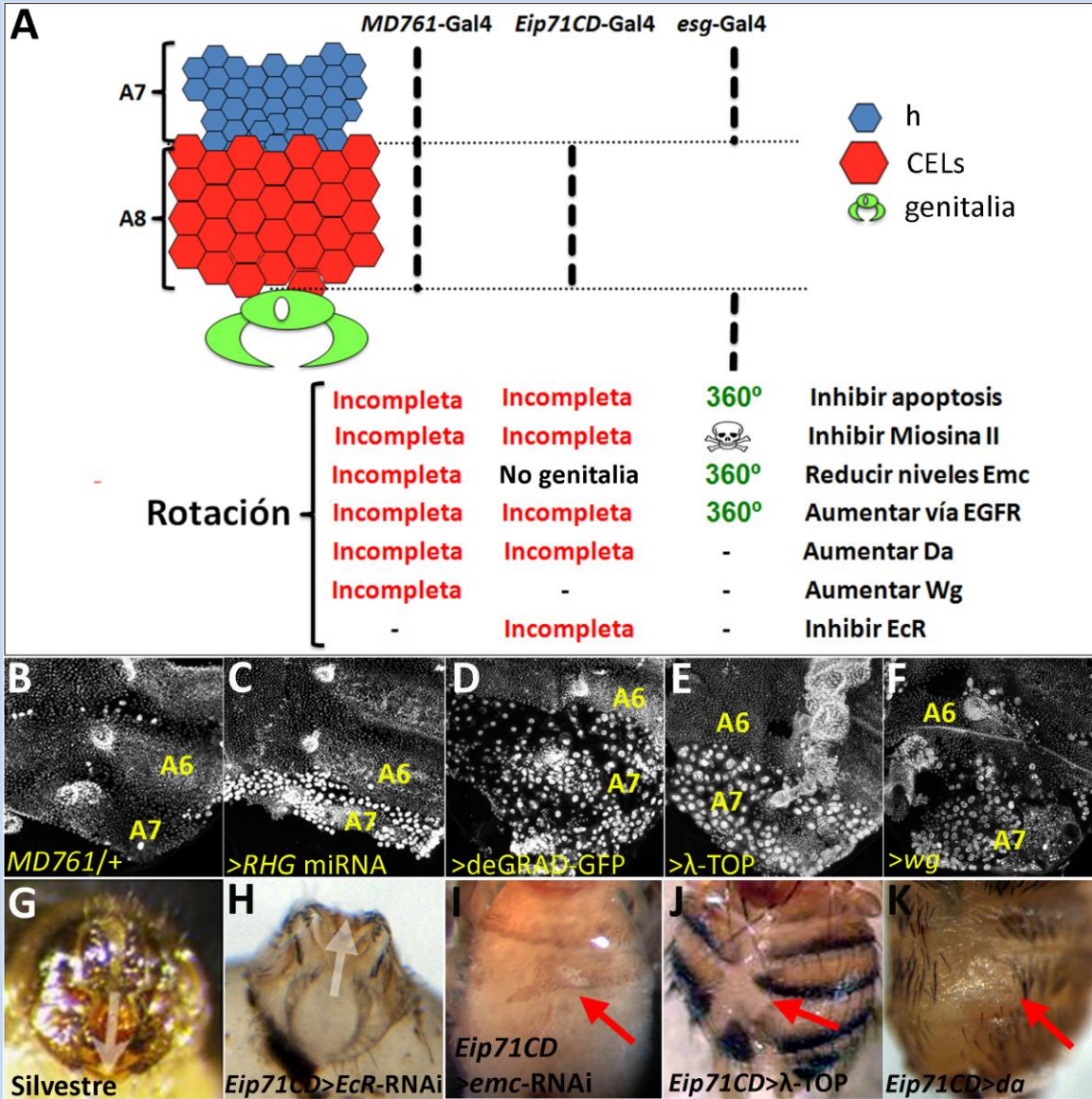
Timp en las CELs del abdomen (Fig. R23F), si produjo un fenotipo de rotación parcial en el 100% de los casos (Fig. R23G), lo que podría corresponder con un retraso en su extrusión debido a la no correcta degradación de la membrana basal, aunque finalmente acabaran delaminándose del tejido (datos no mostrados). Estos resultados sugieren un papel clave de las CELs, a través de la correcta degradación de la Lamina Basal para su extrusión, en la correcta rotación de la placa genital.



**Figura R23. Implicación de la degradación de la Membrana Basal en la rotación de la genitalia. (A)** Interacciones entre las proteínas implicadas en la regulación de la Membrana Basal. Timp inhibe a Mmp1, que a su vez degrada la Membrana Basal. **(B)** Abdomen de un macho de genotipo *Mmp1-GFP* que muestra como esta metaloproteinasas se expresa en todas las CELs durante la pupación (flechas amarillas), y no en los histoblastos (h). **(C)** Terminalia de una hembra del mismo genotipo cuya genitalia (g) no expresa Mmp1, al igual que los histoblastos (h), mientras que sí hay expresión en las CELs. **(D)** Por el contrario, la genitalia (g) de los machos de este mismo genotipo sí expresa Mmp1. **(E)** Expresión de la línea *MyoID-Gal4 UAS-CD8-RFP* en el A8 del disco genital de macho. **(F)** Expresión de la línea *Eip71CD-Gal4 UAS-GFP* en las CELs del abdomen. Topro (azul) marca núcleos en B, E y F. **(G)** Gráfica que muestra el porcentaje de machos con rotación de la genitalia completa (360°, en negro), o parcial (en gris), para individuos control (Vallecas, n=50), o de los genotipos *MyoID-Gal4 UAS-CD8-RFP/+; UAS-Timp/tub-Gal80<sup>TS</sup>* y *Eip71CD-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-Timp/tub-Gal80<sup>TS</sup>*, cambiados de 17°C a 29°C en pupa blanca para el caso de *MyoID* y en larva III para el de *Eip71CD*. Nótese como la inhibición de la degradación de la lámina basal debido a la sobreexpresión de Timp en el disco genital inhibe de forma muy leve la correcta rotación (8% rotación parcial, n=50, p-valor=0,1175), mientras que esta se ve totalmente impedida cuando Timp se sobreexpresa desde el abdomen en las CELs (100% rotación parcial, n=56, p-valor<0,0001).

#### R.4.5.3. El retraso en la extrusión de las CELs del A8 impide la correcta rotación genital

Todos los experimentos llevados a cabo con la línea *MD761-Gal4*, y que habían mostrado un fenotipo de rotación parcial, se repitieron con las otras dos líneas de expresión en el abdomen posterior (*Eip71CD-Gal4*, de expresión en las CELs y *esg-Gal4*, en los histoblastos) (Fig. R24A). Ningún experimento realizado con la línea *esg-gal4* dio lugar a la inhibición de la completa rotación genital. Sin embargo, todos los experimentos realizados expresando solo en las CELs (inhibir la apoptosis, MyoII a través de diferentes herramientas o *emc*; o sobreexpresar la vía EGFR, *wg* o *da*), reprodujeron los fenotipos de falta de rotación encontrados con la línea *MD761-Gal4* (Fig. R24A).



**Figura R24.** El retraso en la extrusión de las CELs del A8 impide la correcta rotación de la placa genital. (A) Esquema de expresión (líneas discontinuas) de las líneas utilizadas para deducir qué células son las responsables de la inhibición del proceso de rotación de la genitalia y los correspondientes fenotipos. Genitalia: verde; CELs: hexágonos rojos grandes (A7 y A8, se dibuja solo el A8 por simplificar); histoblastos (h) del A7: hexágonos azules pequeños. La línea *MD761-Gal4* se expresa en el A7, tanto en CELs como en h, y en las CELs del A8; la línea *Eip71CD-Gal4* solo se expresa en las CELs y *esg-Gal4* solo en los h (y la genitalia). Nótese como la rotación se ve impedida (al variar la expresión o actividad de distintos genes, como se indica) en los experimentos realizados con la líneas *MD761-Gal4* o *Eip71CD-Gal4*, que comparten su expresión en CELs, y no en los realizados con la línea *esg-Gal4*. Se deduce que los fenotipos observados con la línea *MD761-Gal4* se deben a la expresión de esta línea en las CELs y no en h. (B-F) Retraso en la extrusión de las CELs del A7 y A8 respecto al control (*MD761-Gal4/+*; B), en el que el A7 y el A6 no muestran diferencia, para machos de genotipos *UAS-RHG miRNA*; *MD761-Gal4* (C), *sqh<sup>AX3</sup>*; *sqh-GFP/tub-Gal80<sup>TS</sup>*; *MD761-Gal4/UAS-deGRAD-GFP* (inhibición de MyoII) (D), *UAS-λ-TOP*; *MD761-Gal4* (E) y *UAS-wg<sup>E1</sup>*; *MD761-Gal4* (F). Véase la persistencia de las CELs del A7 y A8 en comparación con las del segmento A6, ya extruidas (B), para cada individuo. (G,H) La inhibición del receptor de Ecdisona (*Eip71CD-Gal4 UAS-Ecr-RNAi*), impide la rotación correcta de la genitalia (H, comparar con el silvestre en G; se han dibujado flechas blancas de la analia a la genitalia para facilitar la visualización). (I-K) Retraso en la extrusión de las CELs observado por la falta de cierre dorsal de los terguitos o incluso su no formación (flechas rojas) para los genotipos *Eip71CD-Gal4/UAS-emc-RNAi* (I), *UAS-λ-TOP*; *Eip71CD-Gal4* (J) y *Eip71CD-Gal4; UAS-da/tub-Gal80<sup>TS</sup>* (K). Todos los cruces a 29°C (excepto para *UAS-Ecr* a 25°C. Con *tub-Gal80<sup>TS</sup>* cambios en larva III).

En todos los casos analizados en que se utilizó la línea *MD761-Gal4* pudimos observar un retraso en la delaminación de las CELs del A7 y del A8 respecto a las de segmentos anteriores (n= mínimo 15 disecciones para cada genotipo) (Fig. R24B-F). Además, cuando los experimentos se realizaron con la línea *Eip71CD-Gal4*, se observaron fenotipos de unión dorsal de terguitos incompleta (Fig. R24I-K) asociados a los fenotipos de rotación parcial, indicando la no correcta eliminación de CELs durante la pupación. Por último, la inhibición del receptor de la Ecdisona en las CELs (a través de dos RNAis o de la sobreexpresión de un dominante negativo), produjo de nuevo fenotipos de rotación parcial (n= mínimo 10 faratos por genotipo, mínimo 50% fenotipo de rotación parcial) (Fig. R24G, H). Sin embargo, cuando se produce un retraso en la delaminación de las CELs del A7, y no las del A8, como ocurre al inhibir la proliferación del nido de histoblastos del A7, la genitalia rota con normalidad (Fig. R7E-E". Película 14). Estos resultados, y los anteriores descritos al utilizar la línea Gal4 de expresión en CELs, sugieren fuertemente que una función incorrecta de las CELs del A8 origina un impedimento en la rotación, siendo su correcta delaminación necesaria para permitir el giro.

Es curioso que la inhibición de la apoptosis con la línea *esg-Gal4* no produjera fenotipos de pérdida de rotación de la placa genital (Fig. R24A), ya que esta línea se expresa también en el disco genital y había sido previamente descrito el requerimiento de la muerte celular en el A8 genital en este proceso (Kuranaga et al., 2011; Suzanne et al., 2010). Estos resultados sugieren de nuevo que esta línea expresa quizás niveles muy bajos de Gal4, al menos en estadios tardíos de pupación.

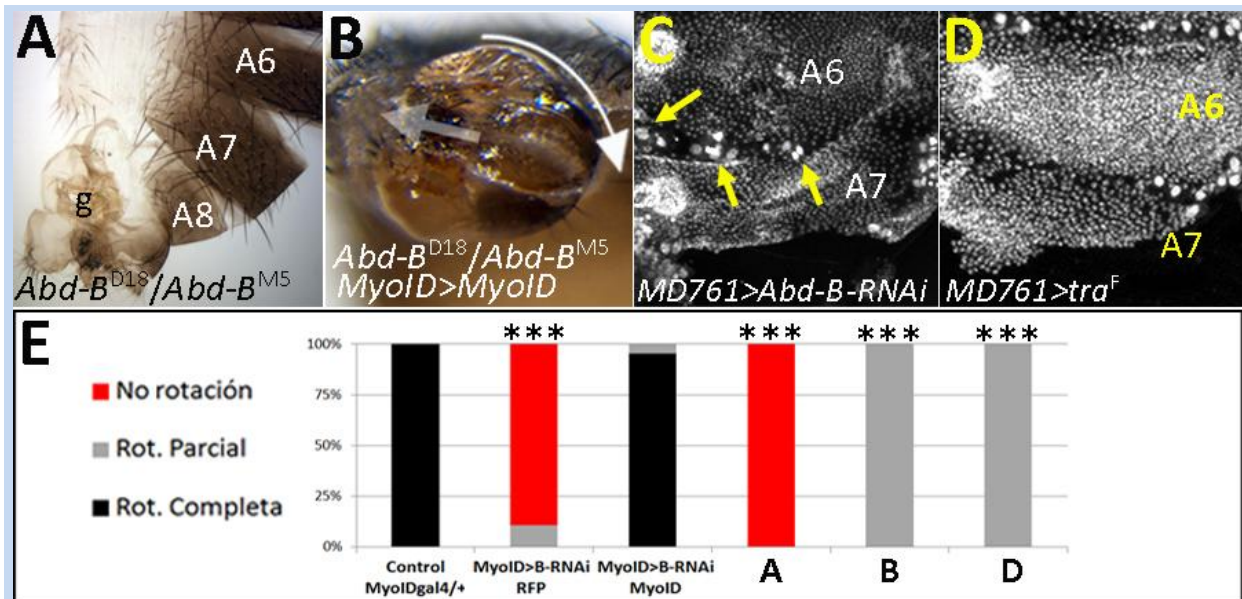
#### **R.4.6. Posible papel de los histoblastos del A7 en la inhibición de la rotación genital**

Por todo lo expuesto, debido a las líneas utilizadas, no podemos descartar de manera absoluta la implicación de los histoblastos del A7 en permitir con su extrusión la correcta rotación genital, pues estos tejidos contactan desde el inicio de la rotación o pocas horas más tarde (véase apartado R.4.3).

Ciertas combinaciones mutantes para *Abd-B* producen la aparición de un terguito octavo (A8) en los individuos adultos (Estrada et al., 2002) (Fig. R25A). Las genitalias de estos individuos, a pesar de parecer externamente silvestres, no llevan a cabo el proceso de rotación durante la pupación, como era de esperar bajo la premisa de que *Abd-B* controla la activación de *MyoID* en el A8 genital y es requerido para la rotación (Coutelis et al., 2013). Cuando en un fondo genético de estas características se sobreexpresa el gen *MyoID* en el A8 genital, se consigue un ligero rescate del fenotipo mutante, observándose genitalias que giran un máximo de 90° (Fig. R25B, E). Por el contrario, este experimento de rescate es total cuando esta sobreexpresión se lleva a cabo en un fondo en el que se ha inhibido *Abd-B*, a través del sistema Gal4, solo en el A8 genital (Fig. R25E). Además, cuando analizamos los estadios pupales de machos en los que se ha inhibido *Abd-B* en el A7 y el A8 abdominal con la línea *MD761-Gal4*, observamos que no se produce un drástico retraso en la delaminación de las CELs de estos segmentos como si ocurría en otros experimentos al sobreexpresar/inhibir otras proteínas (véase apartado



R.4.5.3.), aunque sí se observaron algunas CELs retrasadas (n =23 abdómenes pupales) (Fig. R25C), y que la genitalia no finaliza su rotación (Fig. R18H).



**Figura R25. Posible papel de los histoblastos en la inhibición de la rotación de la placa genital. (A)** Los machos mutantes para *Abd-B* (*Abd-B<sup>D18</sup>/Abd-B<sup>M5</sup>*) presentan ocho segmentos abdominales, y su genitalia no rota durante la pupación, por lo que externamente parece estar en posición silvestre. **(B)** Cuando en este fondo genético se sobreexpresa *MyoID* en el disco genital (*MyoID-Gal4/UAS-MyoID-GFP*; *Abd-B<sup>D18</sup>/Abd-B<sup>M5</sup>*) no se rescata la rotación silvestre, observándose fenotipos de rotación parcial (máximo unos 90°) (gráfica E). Este rescate, por el contrario, es casi total cuando se realiza en un fondo genético en el que se inhibe *Abd-B* con un *UAS-Abd-B-RNAi* en el disco genital (gráfica E, genotipo *MyoID-Gal4/UAS-MyoID-GFP*; *UAS-Abd-B-RNAi/+*). La diferencia principal entre estos dos experimentos, en cuanto al dominio de inactivación de *Abd-B*, es que en el primero se elimina este gen en el abdomen, y esta falta conduce a la formación de segmentos extra (véase A), por lo que parece que son estos segmentos los que impiden el rescate completo del giro genital. **(C)** La inhibición de *Abd-B* en el abdomen posterior (*MD761-Gal4/UAS-Abd-B-RNAi*) no produce un fuerte retraso de la extrusión de las CELs del A7 respecto al A6, y solo se observan algunas CELs retrasados (flechas amarillas), pero si impide la correcta rotación genital (véase Fig. R18H) El efecto de *Abd-B* en los histoblastos (produciendo segmentos adicionales) podría por tanto ser responsable de la falta de rescate de la rotación de la placa genital mostrada en C. **(D)** El cambio de sexo de macho a hembra del abdomen posterior (*UAS-tra<sup>F</sup>/+*; *MD761-Gal4/+*) no produce un retraso en la inhibición de las CELs, y sin embargo da lugar a un A7 en el adulto e impide la correcta rotación de la genitalia (véase E). **(E)** Gráfica que muestra el porcentaje de machos con rotación completa (negro), parcial (gris) o sin rotación (rojo) para los siguientes genotipos: *MyoID-Gal4/+* (control a 29°C, 100% rotación completa, n=90), *MyoID-Gal4 UAS-CD8-RFP/+*; *UAS-Abd-B-RNAi/+* (89,4% no rotación a 29°C, n=66, p-valor<0,0001), *MyoID-Gal4/UAS-MyoID-GFP*; *UAS-Abd-B-RNAi/+* (95% rescate rotación completa a 29°C, n=84, p-valor=0,0523 respecto a los machos *MyoID-Gal4/+* y p-valor<0,0001 respecto a su control el genotipo *MyoID-Gal4 UAS-CD8-RFP/+*; *UAS-Abd-B-RNAi/+*), *Abd-B<sup>D18</sup>/Abd-B<sup>M5</sup>* (panel A, 100% no rotación a 25°C, n=5, p-valor<0,0001), *MyoID-Gal4/UAS-MyoID-GFP*; *Abd-B<sup>D18</sup>/Abd-B<sup>M5</sup>* (panel B, 0% rescate rotación completa a 29°C, 100% rescate rotación parcial, n=4, p-valor<0,0001 respecto a los machos *MyoID-Gal4/+* y su control, el genotipo *Abd-B<sup>D18</sup>/Abd-B<sup>M5</sup>*) y *UAS-tra<sup>F</sup>/+*; *MD761-Gal4/+* (panel D, 100% rotación parcial a 29°C, n=40, p-valor<0,0001). Solo se han graficado los asteriscos para las diferencias entre cada experimento y los machos silvestres. Núcleos marcados con Topro en C y D.

Es posible que en el segundo experimento (*MyoID-Gal4/UAS-MYOID-GFP; UAS-Abd-B-RNAi/+*), *Abd-B* no se elimine completamente en el disco genital, y sea más fácil rescatar el giro al expresar *MyoID*. Pero otra interpretación posible es que la rotación correcta requiera dos elementos: a) la expresión silvestre de *MyoID* en el segmento A8 genital, y b) la determinación correcta del abdomen posterior. Dentro de este segundo apartado se incluye la delaminación en el momento preciso de las CELs del A8 abdominal, pero también, quizás, la ausencia de histoblastos en el A8. Por tanto, en este caso, parece que la presencia de extra-segmentos formados por histoblastos, impide el rescate completo de la rotación genital.

Por otra parte, otro tipo de experimento que podría apoyar la implicación no solo de las CELs, sino de los histoblastos en este proceso, es el que cambia el sexo de los últimos segmentos abdominales (experimentos realizados con la línea *MD761-Gal4*, que se expresa en el A7 y el A8 abdominal). En este caso, cuando esta región se transforma hacia hembra (*UAS-tra<sup>F</sup>*), las CELs parecen delaminarse sin sufrir ningún tipo de retraso ( $n = 18$  abdómenes pupales) (Fig. R25D), los histoblastos del A7 no se delaminan, y darán lugar a un A7 tipo hembra en el adulto, y la rotación genital se ve impedida (Fig. R25E). Además, el cambio de sexo hacia hembra en las CELs (con la línea *Eip71CD-Gal4*), no dió lugar a ningún fenotipo remarcable ni en el abdomen ni en la rotación de la genitalia de los machos ( $n = 50$ ), lo que indicaría de nuevo que las CELs se extruyen de manera silvestre, sin ningún retraso, independientemente de su sexo. Por tanto en esta ocasión las CELs no parecen responsables del fenotipo de rotación parcial observado en el 100% de los casos (al cambiar el sexo con la línea *MD761-Gal4*), siendo los histoblastos del A7, que no se extruyen con normalidad, quizás los posibles responsables del fenotipo.

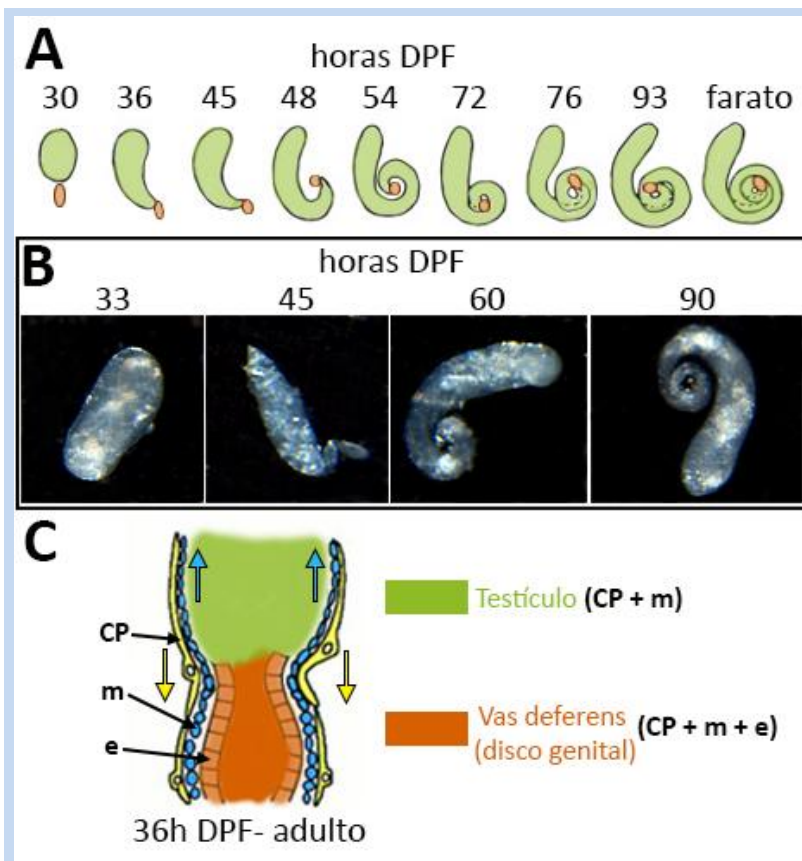
## R.5. Estudio de la asimetría de los testículos de los machos de *Drosophila melanogaster*

### **R.5.1. Desarrollo de los testículos y análisis de fertilidad según la dirección de espiralización**

Como ya se ha explicado (véase Introducción, apartado 1.8.2.), la gónada del macho de *D. melanogaster* experimenta un cambio morfológico durante la pupación por el que pasa de forma esférica a espiralada, siendo esta espiral siempre dextrógira, formando así otro órgano asimétrico dentro del abdomen adulto. Este proceso se desarrolla a lo largo de toda la pupación, formándose poco a poco una espiral en la zona de contacto entre la gónada y el disco genital que finalmente alcanzará las dos vueltas y media (Fig. R26A, B). Para que esto suceda, debe ocurrir el contacto entre la gónada y el vas deferens, estructura que deriva del disco genital, aproximadamente a las 30h DFP. Cuando se produce este contacto ocurre una doble migración celular: tejido muscular pasa del vas deferens al testículo y células pigmentarias (CP) invaden la genitalia en sentido opuesto desde la gónada (Fig. R26C).

En los mutantes para el gen *MyoID*, los testículos muestran una espiral en sentido opuesto, levógira (Fig. R27A) (Hozumi et al., 2006). Sin embargo, esto no sucede en el 100% de los testículos (84% levógiros,

n=60), y se encontraron otras anomalías asociadas a este genotipo, como la no correcta elongación terminal, que mantiene en ocasiones la forma esférica. Esta asimetría no afecta a la fertilidad del individuo (Fig. R27B) (Hozumi et al., 2006). A diferencia del modelo de rotación genital, no se encuentra ningún estado “simétrico” en el cual se observe la elongación pero sin una dirección preferencial que cree una asimetría, por lo que parece que la elongación va ligada a la elección direccional y espiralización, quizás por un simple problema de impedimento de volumen en el interior del abdomen.



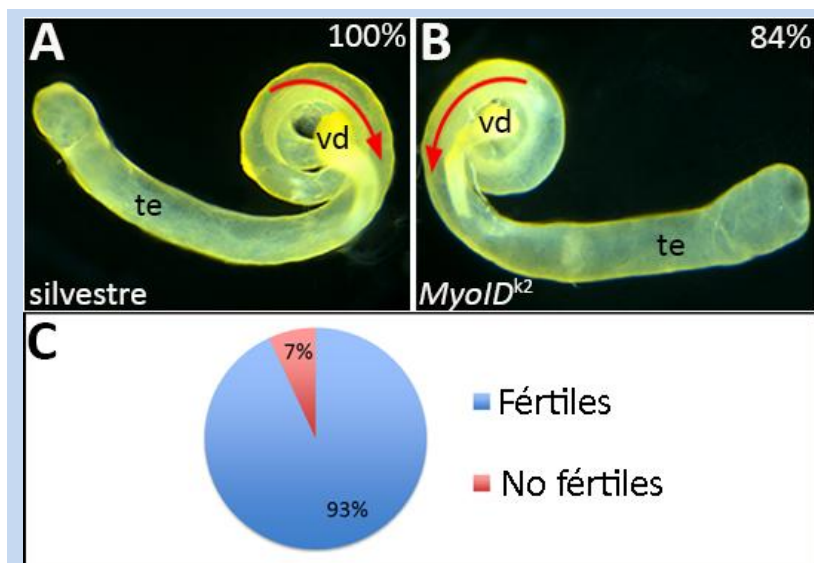
**Figura R26. Desarrollo del testículo pupal y poblaciones celulares. (A)**

Esquema de la espiralización del testículo (verde) durante el desarrollo de la pupa. Se indican las horas aproximadas DFP para cada esquema. Se ha dibujado el vas deferens (naranja) simplificado. El testículo y el vas deferens contactan aproximadamente a las 30h DFP. A partir del contacto, el testículo comienza su elongación (previamente muestra una forma esférica) y espiralización. Nótase que la zona que va sufriendo la espiralización, es la más cercana al vas deferens. **(B)** Fotos de testículos de individuos silvestres durante su desarrollo pupal a 25°C, en correspondencia con el esquema en A. Se han elegido los momentos del desarrollo más significativos para simplificar la figura. Las imágenes no

se muestran a la misma escala. **(C)** Esquema de las poblaciones celulares que conforman el testículo y el vas deferens desde aproximadamente 36h DFP hasta el adulto. Tras el contacto entre ambos tejidos (30 DFP) ocurre una migración de tejido muscular (m) desde el vas deferens al testículo (flechas azules), y una migración de células pigmentarias (CP) en sentido inverso (flechas amarilla). Desde aproximadamente 36h DFP hasta el adulto, el vas deferens (naranja) muestra las siguientes poblaciones celulares (de fuera hacia dentro): células pigmentarias (CP), músculo (m) y epitelio (e). El testículo (verde), por su parte, muestra: células pigmentarias (CP) y músculo (m). Nótase la ausencia de un epitelio propio del testículo. Se ha seguido en toda la figura el siguiente código de colores, siguiendo el utilizado en la introducción: verde para las gónadas (testículos), naranja para el vas deferens (derivado del disco genital), amarillo para células pigmentarias, azul para músculo, naranja para el epitelio del vas deferens (modificado de Kozopas et al., 1998; Rothenbusch-Fender et al., 2017). Por simplificar, no se incluyen en los esquemas de esta figura, ni en las siguientes, los precursores de las células germinales (pCGs) y las células gonadales somáticas (CGSs) del testículo.

Nada se sabía hasta la fecha acerca del tejido organizador de la asimetría del testículo, el cual debe expresar el gen determinante dextral *MyoID*, así como de si este modelo se asemeja al encontrado en la placa genital en su control bajo el gen Hox *Abd-B*, que activaría a *MyoID* y a un determinante sinistral (Coutelis et al., 2013); tampoco del requerimiento de otras vías de señalización para producir la

asimetría, como la PCP, tal como ocurre en el intestino (González-Morales et al., 2015). Por todo ello, decidimos abordar estos problemas.



**Figura R27. Espiralización de testículos y fertilidad de individuos mutantes para MyoID.** (A) Testículo (te) con rotación dextral (nótese el giro a la derecha, flecha roja, desde el vas deferens, vd) de un macho adulto silvestre (100%, n=400). (B) Testículo (te) con rotación sinistral (nótese el giro a la izquierda, flecha roja, desde el vas deferens, vd) de un macho adulto de genotipo homocigótico *MyoID<sup>k2</sup>* (84% de los testículos muestran este fenotipo, n=60). (C) Diagrama del análisis de fertilidad para el fenotipo mutante

de espiralización testicular. Se muestra el porcentaje de machos estériles para el genotipo *MyoID<sup>k2</sup>*. Solo se han tenido en cuenta individuos con la genitalia externa correctamente orientada y los dos testículos rotados en dirección levógira (n=28). No se encontraron diferencias en fertilidad respecto al control (machos silvestres, 97,5% de fertilidad, n=40, p-valor=0,5642). Código de colores: azul para fértiles, rojo para estériles. Experimentos llevados a cabo a 25°C.

### R.5.2. El músculo es el tejido organizador en la asimetría del testículo

Debido a que, como ya se ha explicado, no disponíamos de un anticuerpo anti MyoID ni de “reporteros” eficientes, decidimos llevar a cabo una aproximación funcional que nos permitiera saber donde debe expresarse *MyoID* para producir el giro dextral del testículo. Así, cruzamos todas las líneas Gal4 a nuestra disposición que dirigían la expresión en el testículo o el vas deferens con el RNAi de *MyoID* (Fig. R28. Tabla 1) para ver cuál de los tipos celulares implicados -células musculares, CP o células epiteliales- producía un fenotipo levógiro.

		cuerpo graso		CPs		epitelio		músculo				Varios tejidos	
Gal4	silvestre	ppl	abd-A	Mj12a	esg	6990	1151	Mef2	Duf	Abd-B	MyoID	bab	
% Sinistral	0	2	0	6	0	9	96	82	89	83	8	75	
n	400	50	20	32	28	54	88	42	80	34	68	52	

**Tabla 1. Fenotipos de espiralización sinistral para los testículos obtenidos al inhibir MyoID.** Se han separado las líneas Gal4 por el tejido en el que se expresan mayoritariamente. Las líneas que se expresan en varios tejidos son: *MyoID*-Gal4 (CP y músculo cerca de la unión del vas deferens y el testículo) y *bab*-Gal4 (alguna CP en zona de unión vas deferens y testículo, y en músculo de manera no homogénea) (Fig. R28A, B). Se han marcado en naranja los porcentajes en los que se consiguió mayor fenotipo sinistral (nótese que ocurre con todas las líneas de músculo y *bab*, que también se expresa en este tejido). Nótese también que en ocasiones el fenotipo obtenido es mayor que el propio del mutante *MyoID<sup>k2</sup>* en homocigosis, que mostró un 84% de espiralización sinistral. Todos los cruces fueron llevados a cabo a 29°C y cada línea fue testada por separado para comprobar que no producía fenotipo de inversión de la asimetría por sí misma (excepto *MyoID*-Gal4/+, 5% de giro sinistral).

Expresión de las principales líneas Gal4 en el testículo			Espiralización sinistral
<p><b>A</b></p> <p><i>MyoID</i>&gt;GFP</p>	<p><b>A'</b></p>	<p><b>A''</b></p>	<p><b>A'''</b></p> <p><b>8%</b></p> <p><i>MyoID</i> &gt;<i>MyoID</i>-RNAi</p>
<p><b>B</b></p> <p><i>bab</i>&gt;GFP</p>	<p><b>B'</b></p>	<p><b>B''</b></p>	<p><b>B'''</b></p> <p><b>75%</b></p> <p><i>bab</i> &gt;<i>MyoID</i>-RNAi</p>
<p><b>C</b></p> <p><i>Mj12a</i>&gt;GFP</p>	<p><b>C'</b></p>	<p><b>C''</b></p>	<p><b>C'''</b></p> <p><b>6%</b></p> <p><i>Mj12a</i> &gt;<i>MyoID</i>-RNAi</p>
<p><b>D</b></p> <p><i>1151</i>&gt;GFP</p>	<p><b>D'</b></p>	<p><b>D''</b></p>	<p><b>D'''</b></p> <p><b>96%</b></p> <p>1151 &gt;<i>MyoID</i>-RNAi</p>
<p><b>E</b></p> <p><i>esg</i>&gt;GFP</p>	<p><b>E'</b></p>	<p><b>E''</b></p>	<p><b>E'''</b></p> <p><b>0%</b></p> <p><i>esg</i> &gt;<i>MyoID</i>-RNAi</p>

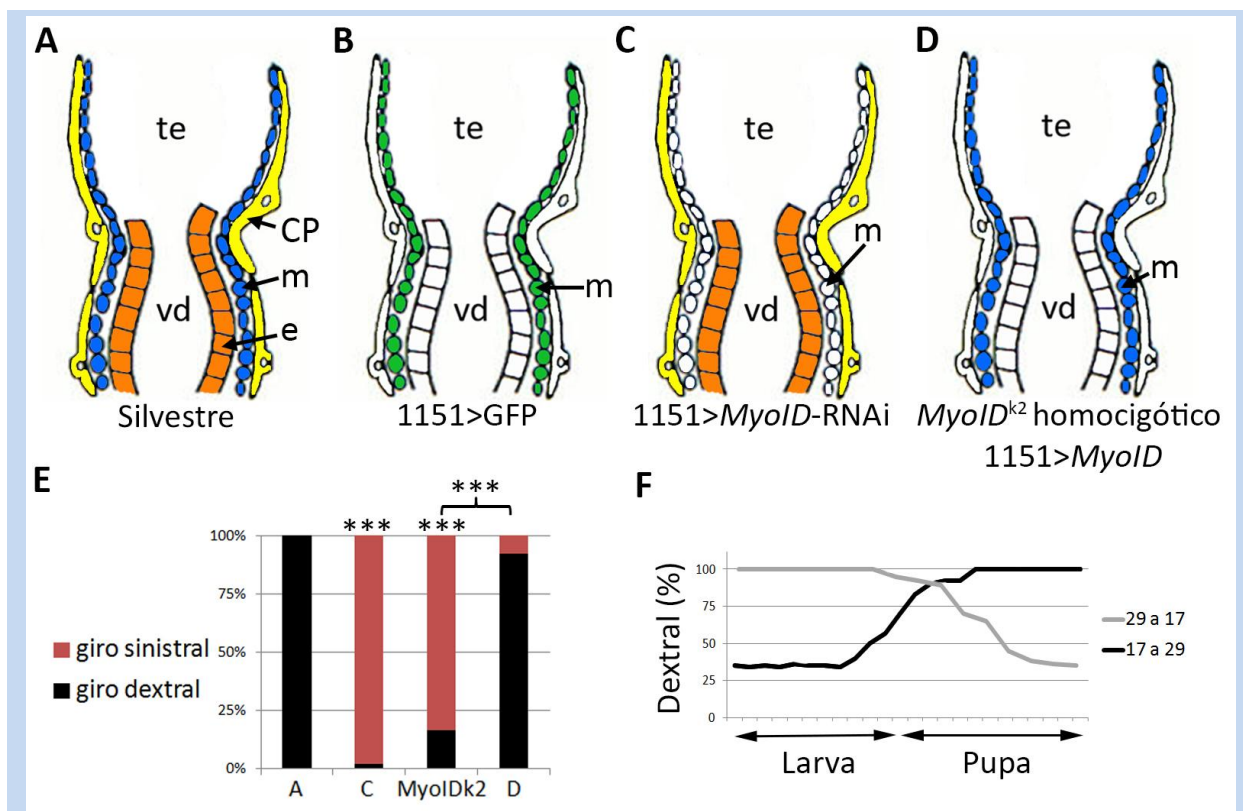
**Figura R28. Expresión dirigida por las principales líneas Gal4 de los testículos utilizadas y fenotipos de espiralización sinistral producidos al inhibir MyoID con las mismas.** Para el fenotipo de espiralización sinistral de todas las líneas analizadas véase Tabla 1. Se muestra, en sucesivas columnas de izquierda a derecha, lo siguiente: en la columna más a la izquierda, esquemas de la expresión de las líneas Gal4 en células pigmentarias (CP), músculo (m) o epitelio (e); en la siguiente columna, la expresión dirigida por cada línea (cruzada con UAS-GFP) en pupas de 40h-45h DFP (A', B', D') o larva III (C'); en la siguiente columna, detalles de la expresión en la zona de unión entre el vas deferens (vd) y el testículo (te); y en la columna más a la derecha, el porcentaje de testículos con rotación sinistral al expresar *MyoID*-RNAi. **(A-A''')** *MyoID*-Gal4. Dirige la expresión a algunas CP y m (no de manera homogénea; A, A'). El asterisco en A' muestra ausencia de expresión en alguna CP, solo se ve expresión en m a muy bajos niveles en la zona de unión del vas deferens y el testículo. Nótese la ausencia de expresión en epitelio (A''). La inhibición de la proteína MyoID con esta línea (genotipo *MyoID*-Gal4; UAS-*MyoID*-RNAi) produce un fenotipo de espiralización sinistral muy débil (8%, n=68). **(B-B''')** *bab*-Gal4. Dirige la expresión en algunas CP (mayoritariamente cerca de la unión del vd y el te) y m (a bajos niveles y no de manera homogénea), y no en epitelio. La inhibición de la proteína MyoID con esta línea (genotipo *bab*-Gal4/UAS-*MyoID*-RNAi) produce un 75% de espiralización sinistral (n=52). **(C-C''')** *Mj12a*-Gal4. Se expresa en CP (C' muestra expresión en testículo de larva III). Nótese que esta línea también se expresa en el cuerpo graso (cg) que rodea a los testículos durante todo el desarrollo (C'). La inhibición de la proteína MyoID con esta línea (genotipo *Mj12a*-Gal4/+; UAS-*MyoID*-RNAi/+) no produce espiralización sinistral (0%, n=32). **(D-D''')** 1151-Gal4. Dirige la expresión en m. Nótese la ausencia de expresión en CP (D'''). La inhibición de la proteína MyoID con esta línea (genotipo 1151-Gal4; UAS-*MyoID*-RNAi/+) produce un fenotipo muy fuerte de espiralización sinistral (96%, n=88). Otras líneas de expresión en este tejido producen resultados similares (véase Tabla 1). **(E-E''')** La línea *esg*-Gal4 dirige la expresión al epitelio (e) del vas deferens (vd). **(E')** Testículo pupal (45h DFP) del genotipo *esg*-Gal4 UAS-GFP. Se observa expresión en el vas deferens (vd). **(E'')** Detalle de la zona de unión entre el vas deferens (vd) y el testículo (te) para el genotipo y estadio anterior. Se observa expresión solo en células epiteliales (e) y no en pigmentarias (CP) ni musculares (m). **(E''')** La inhibición de la proteína MyoID con esta línea (genotipo *esg*-Gal4/+; UAS-*MyoID*-RNAi/+) no produce espiralización sinistral (0%, n=28). Las imágenes no se muestran al mismo aumento. Topro (azul) marca núcleos. Todos los experimentos se realizaron a 29°C.

Lo primero que nos llamó la atención es que al inhibir *MyoID* con la propia línea *MyoID*-Gal4 no se conseguía la inversión de la asimetría (Fig. R28A'''), por lo que dedujimos que esta línea no reproducía el patrón de expresión del gen *MyoID*. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con todas las líneas analizadas, los fenotipos de rotación sinistral se obtuvieron con líneas de expresión en tejido muscular (Fig. R28B''', D'''. Tabla 1). Además, la expresión exclusiva de *MyoID* en las células musculares con la línea 1151-Gal4, consiguió rescatar de manera casi total el fenotipo mutante sinistral *MyoID* homocigótico (Fig. R29A-E). Estos resultados confirmaban a este tejido como el requerido funcionalmente, y casi con seguridad como aquel en el que se expresa *MyoID*.

Una vez confirmado el tejido muscular como el tejido organizador para la determinación dextral de la espiralización testicular, nos propusimos estudiar el requerimiento temporal de *MyoID* en este tejido. Para ello llevamos a cabo un análisis de expresión condicionada gracias a la proteína *tub*-Gal80<sup>TS</sup>, inhibiendo a *MyoID* a diferentes momentos del desarrollo durante toda la pupación. De nuestros resultados, parece deducirse que la expresión de *MyoID* es necesaria durante la pupación (Fig. R29F).

Realizamos una serie de experimentos para determinar hasta qué punto los requerimientos genéticos para la asimetría eran comunes entre las asimetrías genital y testicular. La sobreexpresión de *MyoIC*,

que provoca rotación sinistral de la genitalia y ha sido propuesto como un posible determinante sinistral (Petzoldt et al., 2012), no produjo ningún fenotipo con ninguna de las líneas de músculo utilizadas. Sin embargo, esta miosina ha sido cuestionada como determinante sinistral y se le ha atribuido una función redundante a MyoID en la determinación dextral del giro de la genitalia (Okumura et al., 2015).



**Figura R29. Requerimiento espacial y temporal de MyoID en las células musculares del testículo. (A)** Esquema de las poblaciones celulares del testículo (te) y el vas deferens (vd), desde su contacto en pupa hasta adulto. Se esquematizan las células pigmentarias (amarillo, CP), musculares (azul, m) y epiteliales (naranja, e). **(B)** Esquema de la expresión de la línea 1151-Gal4. Esta línea dirige la expresión (en verde, por similitud al UAS-GFP) exclusivamente a las células musculares (m). **(C)** Esquema de la (supuesta) desaparición de proteína MyoID en las células musculares (m) en machos del genotipo 1151-Gal4; UAS-MyoID-RNAi/+. La expresión silvestre de la proteína se desconoce, y el esquema se basa en los efectos fenotípicos de la combinación mutante. **(D)** Se esquematiza en blanco la ausencia de proteína MyoID en un fondo mutante *MyoID<sup>k2</sup>*, y su rescate (azul) en células musculares (m) para el genotipo 1151-Gal4; UAS-MyoID-GFP *MyoID<sup>k2</sup>/MyoID<sup>k2</sup>*. **(E)** Gráfica que muestra el porcentaje de espiralización dextral (negro) y sinistral (granate) para los genotipos A, C y D, y para el mutante *MyoID<sup>k2</sup>*. Nótese como la expresión de MyoID exclusivamente en células musculares (genotipo D; véase patrón de expresión de la línea 1151-Gal4 en B), es capaz de rescatar el giro dextral de los testículos con respecto al fondo mutante *MyoID<sup>k2</sup>*, con rotación mayoritariamente sinistral. Genotipos: (panel A) Machos silvestres (0% sinistral a 25°C, n=400); (panel C) 1151-Gal4; UAS-MyoID-RNAi/+ (96% sinistral a 29°C, n=88, p-valor=0,0025); *MyoID<sup>k2</sup>* homocigótico (84% sinistral a 25°C, n=60, p-valor<0,0001); (panel D) 1151-Gal4; UAS-MyoID-GFP *MyoID<sup>k2</sup>/MyoID<sup>k2</sup>* (7,5% sinistral a 29°C, n=40, p-valor<0,0001 respecto al genotipo *MyoID<sup>k2</sup>* homocigótico). **(F)** Esquema de requerimiento temporal de MyoID durante el desarrollo. El genotipo de los individuos experimentales es 1151-Gal4; *tub-Gal80<sup>TS</sup>/UAS-MyoID-RNAi*. Se muestra el porcentaje de espiralización dextral de los testículos correspondientes a los cambios de temperatura de 17°C a 29°C (línea negra) y en sentido opuesto (línea gris) (n mínimo 30 en cada medida). De la intersección de ambas líneas se deduce que para la correcta rotación de los testículos se requiere funcionalmente MyoID durante la pupación. Para poder encontrar un punto de intersección, se ha realizado un escalado temporal de las horas de desarrollo, a 17°C y 29°C, para hacer coincidir el desarrollo temporal total de ambos experimentos con el de 10 días a 25°C.

### R.5.3. Posible implicación de los genes Hox *abd-A* y *Abd-B* en la asimetría de los testículos

Dado que el gen Hox *Abd-B* había sido descrito como el activador de *MyoID* en otros tejidos asimétricos (Coutelis et al., 2013), decidimos investigar su papel, y el del gen Hox *abd-A*, en la asimetría de los testículos. Ambos genes se expresan en el testículo y el vas deferens durante estadios pupales (40h DFP): *abd-A* en las CP y en unas células en el inicio del testículo (Fig. R30A) que podrían ser las células epiteliales terminales provenientes del testículo (Nanda et al., 2009). *Abd-B*, por su parte, mostró expresión en células musculares y en las células epiteliales del vas deferens (Fig. R30B). La expresión de estos genes parece variar a lo largo del desarrollo de la gónada y la genitalia interna, pues en estadios adultos su expresión se restringe a las CP para el caso de *abd-A* y a las células musculares para el caso de *Abd-B* (datos no mostrados).

Llevamos a cabo la inhibición de ambos genes Hox (Tabla 2) con las líneas Gal4 de expresión en los tipos celulares implicados en el sistema.

	cuerpo graso	CPs	epitelio		músculos	CPs+músculo	
Gal4	ppl	Mj12a	6990	esg	1151	MyoID	bab
abd-A-RNAi	5% (40)	7% (72)	5,5% (36)	0% (50)	3% (64)	5% (20)	<b>50% (26)</b>
Abd-B-RNAi	0% (40)	<b>33% (94)</b>	13% (94)	No unión (16)	No unión (66)	6% (66)	No unión (20)

**Tabla 2. Fenotipos de espiralización sinistral para los testículos obtenidos al inhibir los genes Hox *abd-A* o *Abd-B*.** Para cada genotipo se muestra el porcentaje de testículos levógiros y, entre paréntesis, el número de testículos analizados. Se han separado los Gal4 por el tejido en el que se expresan mayoritariamente. Se han marcado en naranja los porcentajes en los que se consiguió mayor fenotipo sinistral (véase Fig. R28 para la expresión de cada línea). Todos los cruces fueron llevados a cabo a 29°C y cada línea fue testada por separado para comprobar que no producía fenotipo de inversión de la asimetría por sí misma (excepto *MyoID*-Gal4/+, que produce un 5% de espiralización levógira).

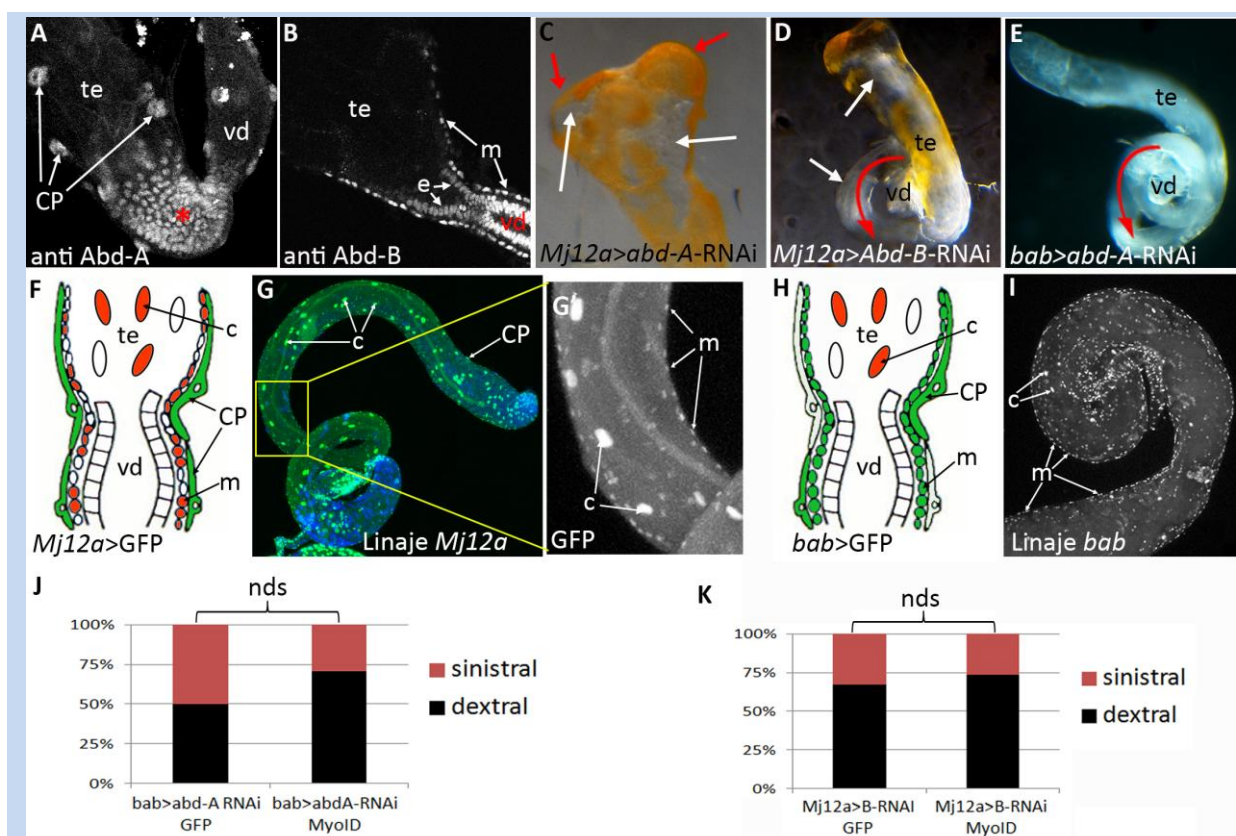
Experimentos de inhibición de ambos genes Hox con la línea *Mj12a*, de expresión en CP (Fig. R30F) dio lugar en ambos casos a parches de pigmentación (Fig. R30C, D), a anomalías en el desarrollo del testículo, como la bifurcación de la zona terminal para el caso de *abd-A* (Fig. R30C), y al giro sinistral del testículo (33%, n=94) para el caso de *Abd-B* (Fig. R30D). El estudio del linaje de expresión de esta línea mostró, sin embargo, además de la señal en CP, expresión en algunas células musculares (Fig. R30F-G') de manera muy variable entre individuos, lo que indica una activación de la expresión transitoria y espacialmente variable en un momento del desarrollo sin determinar. Esta activación en células musculares podría explicar el fenotipo de inversión en la espiralización observado al inhibir *Abd-B* (Fig. R30D). Sin embargo, cuando se inhibe *Abd-B* con líneas de expresión en células musculares (Olivera, 2017; Tabla 2), el testículo no se une correctamente al vas deferens o, si se une, no se elonga ni espiraliza, permaneciendo en forma esférica. Si se inhibe *Abd-B* en el epitelio del vas deferens (con la línea *esg*-Gal4, Tabla 2) también se produce este fenotipo, pero de forma más débil, obteniéndose un bajo porcentaje de testículos que empiezan a espiralizar y lo hacen en sentido dextral. El hecho de que



*Abd-B* sea necesario para el correcto desarrollo del testículo dificulta estudiar si se requiere o no para la adquisición de la dirección de asimetría. Así, si establecemos un paralelismo con el modelo de la genitalia, en el que en ausencia de *Abd-B* no hay rotura de simetría (la placa genital no rota) podríamos decir en este caso que al quitar *Abd-B* del sistema el testículo no se desarrolla y queda de la única manera que puede permanecer simétrico: en forma esférica. Tanto *Abd-B* como *MyoID* se expresan en las células musculares (en el caso de *MyoID* su posible expresión en este tejido se supone a partir de los fenotipos que produce su inhibición con distintas líneas Gal4), por lo que no se puede descartar que en este modelo *Abd-B* active también a *MyoID* (como ocurre en el disco genital). Por tanto, quizás la inhibición de este gen Hox de forma transitoria y en algunas células podría permitir la elongación del testículo tras la unión de derivados del disco genital con la gónada, pero determinaría su espiralización levógira al reducir la expresión de *MyoID*. Los intentos de rescate del fenotipo producido por inhibición de *Abd-B* mediante la expresión de *MyoID* con líneas musculares como la 1151-Gal4 no fueron posibles ya que, como se ha explicado, en ausencia de *Abd-B* no se produce la unión de la gónada y el disco ni el desarrollo posterior. El rescate del fenotipo observado con la línea *Mj12a* produjo un 27% de fenotipo sinistral (n=30), lo que parece disminuir el fenotipo sinistral del fondo mutante (33%), pero sin suponer una diferencia significativa (Fig. R30J).

Un fenotipo similar de rotación sinistral (50%, n=26) se obtuvo para la inhibición de *abd-A* con la línea *bab-Gal4* (Fig. R30E), que se expresa en varios tipos celulares durante el desarrollo: CP, músculo y células de los cistos, como pudimos comprobar con el análisis de su linaje de expresión (Fig. R30H, I). Intentamos rescatar este fenotipo con la sobreexpresión de *MyoID*, obteniendo un 29% (n=24) de rotación sinistral, lo que supone una disminución del fenotipo obtenido con el genotipo mutante, pero sin llegar a producir una diferencia estadísticamente significativa (Fig. R30K). En estos experimentos de inhibición de *Abd-B* y *abd-A* cabe tener en cuenta, para su mejor interpretación, que tanto con análisis de linaje de las líneas Gal4 como con tinciones con anticuerpos para *Abd-A*, hemos observado expresiones en tipos celulares (epitelio terminal del testículo y cistos) que no se incluyen en los tejidos en los que, para simplificar, habíamos centrado nuestro análisis: músculo, CP y epitelio del vas deferens (Fig. R30A, F-I). No podemos destacar un papel de estos tipos celulares en la correcta espiralización.

*Abd-B* activa en otros tejidos la cascada de determinación sexual (Foronda et al., 2012; Wang y Yoder, 2012) pero se desconoce si también la activa en las gónadas o el disco genital. Esta determinación sexual es necesaria para el correcto establecimiento de las gónadas de *D. melanogaster*, para la formación de los gametos, y por tanto para la perpetuación de la especie (revisado en Whitworth et al., 2012). En los testículos, *dsx* se expresa, entre otros tejidos, en las CGSs específicas de macho y en el "hub" junto con *Abd-B* (Hempel y Oliver, 2007).



**Figura R30. Posible implicación de los genes Hox *abd-A* y *Abd-B* en la asimetría de los testículos.** (A) Presencia de *Abd-A* en las células pigmentarias (CP, de gran tamaño), y el epitelio terminal del testículo (\*) en la zona de contacto con el vas deferens (vd) de un macho en estadio de pupa (anticuerpo anti *Abd-A*, 40h DFP). (B) Presencia de *Abd-B* en las células musculares (m) del testículo y el epitelio (e) del vd de un macho en estadio de pupa (anticuerpo anti *Abd-B*, 40h DFP). (C) Detalle del testículo de un macho adulto (*Mj12a-Gal4/UAS-abd-A-RNAi*) en el que se observan parches de pérdida de pigmentación (flechas blancas) y el final del testículo bifurcado (flechas rojas). Esta línea dirige la expresión principalmente a las CP (véase F). (D) Testículo (te) de un macho adulto (*Mj12a-Gal4/+; UAS-Abd-B-RNAi/+*) en el que se observan parches de pérdida de pigmentación (flechas blancas) y una espiralización sinistral (flecha roja a partir del vas deferens, vd). (E) Testículo (te) de un macho adulto (*UAS-abd-A-RNAi/+; bab-Gal4/+*) en el que se observa una espiralización sinistral (flecha roja a partir del vas deferens, vd). La línea *bab-Gal4* dirige la expresión a varios tipos celulares (véase H). (F) Esquema representativo de la expresión de la línea *Mj12a-Gal4* en las CP durante pupa (en verde), y la expresión observada al estudiar su linaje (G, detalle en blanco del canal GFP en G') (*Mj12a-Gal4/+; UAS-flp Ubi>STOP>Gal4 UAS-GFP/tub-Gal80<sup>TS</sup>*) en músculo (m, en G') y células de los cistos (c). (H-I) Esquema representativo (H) de la expresión de la línea *bab-Gal4* en pupa (en verde) en CP y músculo (m) y la observada al estudiar su linaje (*tub-Gal80<sup>TS</sup>/+; bab-Gal4/ UAS-flp Ubi>STOP>Gal4 UAS-GFP*, se muestra en blanco la señal para GFP en I) también en células de los cistos (c). (J) Gráfica que muestra el porcentaje de espiralización sinistral para el genotipo *UAS-abd-A-RNAi/+; bab-Gal4 UAS-GFP/+* (50% a 29°C, n=26), y la ausencia de rescate que se produce en este fondo genético cuando se expresa simultáneamente *MyoID* (*UAS-abd-A-RNAi UAS-MyoID-GFP/+; bab-Gal4/+*) (29% a 29°C, n=24, p-valor=0,133). (K) Gráfica que muestra el porcentaje de espiralización sinistral para el genotipo *Mj12a-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-Abd-B-RNAi/+* (33% a 29°C, n=94), y la ausencia de rescate con la expresión simultánea de *MyoID* (*Mj12a-Gal4/UAS-MyoID-GFP; UAS-Abd-B-RNAi/+*) (27% a 29°C, n=30, p-valor=0,5168). En ambos rescates (J, K) se obtuvo una tendencia a la disminución del fenotipo sinistral del fondo genético mutante, pero en ningún caso se ha conseguido una diferencia estadísticamente significativa (nds=no diferencia significativa). Para el análisis de los linajes se cambió de 17°C a 29°C en larva III y se mantuvo esta temperatura hasta la eclosión. No todos los individuos mostraron la misma expresión en el análisis de linaje. Los tipos celulares que mostraron expresión en estos análisis (y que no la mostraron en pupa de 40h DFP) se representan en rojo en los esquemas. Topro (azul, en G) marca núcleos. Gráficas: sinistral en granate y dextral en negro.

El análisis de intersexos (carecen de *dsx*) reveló que la determinación sexual es necesaria para la correcta unión de las gónadas a los derivados genitales, pues estos se mantienen en forma esférica sin llegar a unirse o formando uniones con órganos incorrectos (n=49). El cambio de sexo (a través de la sobreexpresión de *tra<sup>F</sup>*) en las CP o el cuerpo graso, aunque en algún caso produjo otro tipo de fenotipos como testículos muy finos o que no alcanzan las dos vueltas y media, no produjo inversión de la dirección de espiralización (n>80 para cada caso). El cambio de sexo con la línea *MyoID-Gal4* (*MyoID-Gal4/UAS-tra<sup>F</sup>*) (Fig. R28A-A'' para la expresión de esta línea), dio lugar a la espiralización sinistral de aproximadamente el 30% de los testículos (n=34), aunque también produjo otros fenotipos de falta de espiralización (testículos se quedan en forma esférica, unidos o no a la genitalia interna). Cabe tener en cuenta que la línea *MyoID-Gal4* por sí sola produce un fenotipo, aunque débil, de inversión en la dirección de espiralización (5%, n=40). El cambio de sexo de las células musculares (con la línea 1151-Gal4, n=34) o en el epitelio del vas deferens (con la línea *esg-Gal4*, n=40) impide la correcta unión de los testículos a la genitalia interna y su elongación de manera similar a lo observado al inactivar *Abd-B*. Cuando estos experimentos (con la línea 1151-Gal4) se realizaron en condiciones de menor expresión de proteína Gal4 (17°C), las gónadas llegaban a unirse al vas deferens e iniciar una pequeña espiral a pesar de no elongarse. En este caso se obtuvo un 6% de giro sinistral (n=32, observado en el inicio de espiral entre el vas deferens y la gónada en forma esférica), pero no podemos descartar que en estas condiciones el cambio de sexo no sea realmente efectivo.

Nuestros experimentos de cambio de sexo del tejido muscular y del epitelio del vas deferens indican que estos tejidos deben expresar *dsx<sup>M</sup>* para la correcta formación del testículo. Los fenotipos obtenidos fueron muy similares a los observados al inhibir en este tejido *Abd-B*, lo que podría indicar una regulación de la cascada de determinación sexual por este gen Hox. Respecto al estudio de la asimetría y como ocurre para el caso de *Abd-B*, la no correcta formación del tejido impide estudios en profundidad y debemos realizar más experimentos en condiciones que permitan separar el proceso de espiralización y la elección de la dirección.

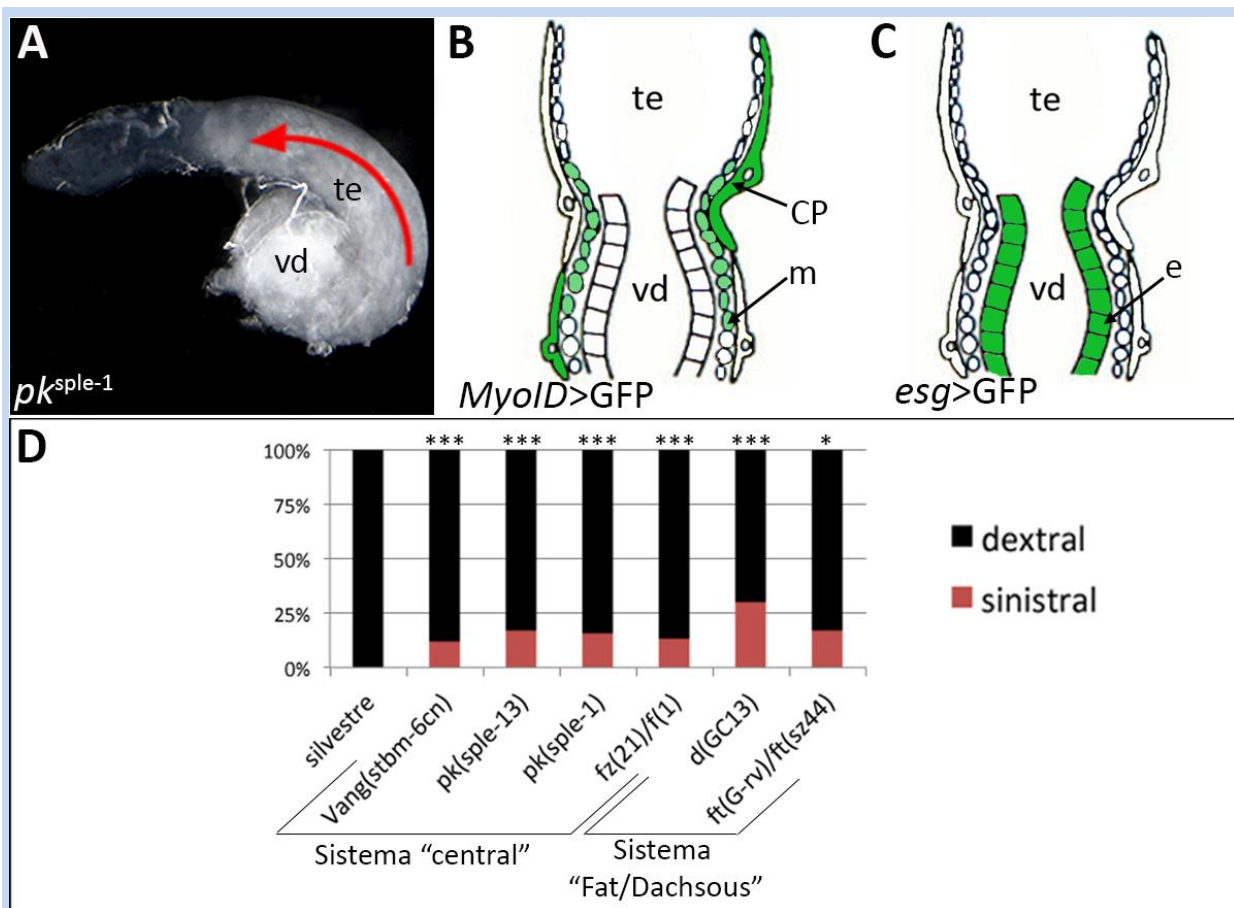
#### **R.5.4. Posible implicación de la vía de la Polaridad Celular Planar (PCP)**

La vía de Polaridad Celular Planar (PCP) ha sido implicada en la asimetría del intestino de *D. melanogaster* (González-Morales et al., 2015), y muy recientemente en la asimetría de un vertebrado como *Xenopus* (Tingler et al., 2018), en ambos casos a través de la interacción con MyoID. Por ello, decidimos indagar en su posible implicación en la asimetría de los testículos, estudiando distintos mutantes o expresando líneas de RNA interferente para algunos de los genes de esta vía.

		cuerpo graso	CPs	epitelio		músculo		CPs+epitelio	
		ppl	6991	6990	esg	1151	Mef2	MyoID	bab
sistema "central"	UAS-fz Bhat 1998	0%(36)	0%(28)	0%(26)	-	13% (30)	11,1% (36)	12,5% (32)	0%(20)
	fz-RNAi 34321	0%(24)	0%(32)	0%(26)	2,3% (44)	0% (22)	0% (22)	10%(30)	7%(28)
	fz-RNAi 31036	4%(24)	0%(22)	0%(24)	8,1%(74)	0% (16)	0% (32)	0%(30)	4%(24)
	fw RNAi 28307	0%(22)	0%(20)	0%(40)	<b>29,5% (44)</b>	3,5% (28)	0% (38)	<b>20%(20)</b>	10,7%(56)
	fw-RNAi 38975	3,5%(28)	0%(20)	0%(20)	6,8%(44)	0% (20)	0% (24)	0%(34)	3%(30)
sistema "Fat-Dachsous"	UAS-dV5 28814	0%(22)	0%(20)	0%(22)	4% (50)	0% (30)	0% (30)	13% (30)	0%(34)
	ft-RNAi 34970	0%(20)	0%(22)	0%(22)	8,6% (58)	0% (26)	0% (20)	<b>37,5% (40)</b>	0%(24)
	ft-RNAi 29566	3,8%(26)	0%(26)	1,3%(42)	11,1% (18)	0% (22)	0% (20)	3,3%(30)	0%(26)
	d-RNAi 27664	0%(30)	0%(24)	0%(30)	5,7%(70)	0% (26)	0% (26)	<b>23,3%(30)</b>	0%(22)
	d-RNAi 33754	0%(24)	0%(30)	0%(24)	5,5%(36)	0% (20)	0% (34)	13,3%(30)	0%(20)

**Tabla 3. Fenotipos de espiralización sinistral para los testículos obtenidos al inhibir/sobreexpresar diferentes proteínas de la vía PCP.** Para cada genotipo se muestra el porcentaje de testículos levógiros y, entre paréntesis, el número de testículos analizados. Se han separado los Gal4 por el tejido en el que se expresan mayoritariamente. Se han marcado en verde todos los genotipos que dieron algún fenotipo levógiro, y en naranja los porcentajes en los que se consiguió mayor fenotipo sinistral (líneas *MyoID*-Gal4 y *esg*-Gal4, véase Fig. R28 para su expresión). Todos los cruces fueron llevados a cabo a 29°C y cada línea fue testada por separado para comprobar que no producía fenotipo de inversión de la asimetría por sí misma (excepto *MyoID*-Gal4/+, que produce un 5% de espiralización levógiro).

Llevamos a cabo el cruce de todas las líneas Gal4 disponibles, de expresión en la gónada o la genitalia interna, con una batería de RNAis para los sistemas "central" (*core*) y "Fat/Dachsous", así como el análisis de mutantes para varios genes implicados en ambas vías (Fig. R31 y Tabla 3). En todos los casos se observaron fenotipos variables de anomalías en la unión y elongación del testículo (datos no mostrados). Nuestros análisis se han centrado, sin embargo, en la dirección de espiralización cuando esta se llevaba a cabo. Mutantes para ambas vías mostraron un fenotipo, aunque con baja penetrancia, de espiralización sinistral (Fig. R31D). Respecto al análisis con los RNAis, los mayores fenotipos se obtuvieron con las líneas *MyoID*-Gal4, que se expresa en algunas CPs y en algunas células musculares cerca de la unión entre el testículo y el vas deferens (a las 40h DFP) (Fig. R31B), y *esg*-Gal4, que dirige la expresión al epitelio del vas deferens (Fig. R31C). Los porcentajes de espiralización sinistral no son en ningún caso elevados, y se debe recordar, además, que la línea *MyoID*-Gal4 es ligeramente mutante para *MyoID* (5% espiralización levógiro por sí sola) (véase apartado R.5.2.). Sin embargo, la espiralización sinistral de los testículos observada en los mutantes (Fig. R31D) y con las líneas RNAis (Tabla 3) nos hacen pensar que la vía PCP está implicada en nuestro proceso de estudio.



**Figura R31. Posible implicación de la vía de la Polaridad Celular Planar (PCP) en la asimetría de los testículos.** (A) Testículo (te) con espiralización sinistral (nótese el giro a la izquierda, flecha roja, desde el vas deferens, vd) de un macho adulto del genotipo *pk<sup>sple-1</sup>*. (B) Esquema de la expresión de la línea *MyoID*-Gal4 en el testículo pupal, en algunas células musculares (m) y células pigmentarias (CP), tanto del testículo (te) como del vas deferens (vd) (se observa mayor expresión en las células musculares de la zona de unión del testículo y el vas deferens). (C) Esquema de la expresión de la línea *esg*-Gal4 en el testículo pupal, en el epitelio del vas deferens. Con estas líneas (B y C) se han obtenido los mayores porcentajes de fenotipos de rotación sinistral en testículos al expresar diferentes RNAsi para varios genes de las vías PCP (véase Tabla 3). (D) Gráfica que muestra el porcentaje de rotación sinistral (granate; dextral en negro) en testículos de machos: silvestres (0%, n=400), y mutantes *Vang<sup>stbm-6cn</sup>* (12%, n=42), *pk<sup>sple-13</sup>* (16,6%, n=30), *pk<sup>sple-1</sup>* (15,6%, n=32), *fz<sup>21</sup>/fz<sup>1</sup>* (13%, n=30), *d<sup>GC13</sup>* (30%, n=24) y *ft<sup>G-rv</sup>/ft<sup>sz44</sup>* (16,6%, n=6). p-valor de cada genotipo respecto al control <0,0001 excepto para *ft<sup>G-rv</sup>/ft<sup>sz44</sup>* (p-valor=0,0148). Experimentos realizados a 25°C.

## **Discusión**

## D.1. Mecanismos de muerte y delaminación en el A7

La eliminación de una parte del cuerpo es un cambio significativo que ocurre a lo largo del desarrollo de los organismos así como a lo largo de la evolución. En esta Tesis hemos estudiado la eliminación del segmento séptimo abdominal (A7) en el macho de *Drosophila*. Inicialmente, en ambos sexos el segmento A7 se forma durante el desarrollo pupal de la misma forma que los segmentos anteriores, pero hacia las 35h DFP y solo en machos, los histoblastos del A7 (excepto los que formarán el espiráculo y dos sensilas ventrales) se extruyen bajo el control de *Abd-B* y *dsx* (revisado en Foronda et al., 2015). En esta Tesis nos hemos propuesto ahondar en el estudio de los mecanismos genéticos y celulares que llevan a la supresión de este segmento durante la metamorfosis.

### **D.1.1. Apoptosis y requerimiento de la Miosina II no muscular**

Se ha descrito que las CELs se delaminan del epitelio a través de apoptosis y constricción apical (Bischoff, 2012; Bischoff y Cseresnyes, 2009; Ninov et al., 2007), pero se desconoce el requerimiento de estos procesos para la delaminación de los histoblastos del A7 del macho.

Estudios previos mostraron la activación de caspasas (mediante el "reportero" Apoliner) en algunos histoblastos de este segmento (Foronda et al., 2012), y mayor concentración de células "caspasa positivas" (visualizadas con un anticuerpo contra Caspasa-3 activada) en el espiráculo de este segmento que en espiráculos anteriores en ambos sexos (Wang et al., 2011). Nuestro estudio abarca varios marcadores de muerte celular (Fig. R2), dependientes de caspasa (anticuerpo anti Dcp-1, "reporteros" JPV y CasExpress) o no (Tunel). Los marcadores CasExpress, Dcp-1 y Tunel detectan mayor marcaje alrededor de los espiráculos, quizás más acusado en el A7 que en segmentos anteriores (Wang et al., 2011). Tanto con Dcp-1 como con Tunel no se observa mayor cantidad de células apoptóticas en el A7 que en segmentos anteriores, como se ha descrito previamente (Wang et al., 2011), pero sí con el "reportero" CasExpress. Respecto a las CELs, el escaso marcaje conseguido con Tunel puede deberse a una falta en la optimización del método utilizado (descrito para tejidos imaginales), o a que las CELs fragmenten su núcleo (y se marquen por tanto con Tunel) una vez delaminadas, siendo estas células eliminadas durante los lavados del protocolo de tinción. Se observaron muchas más CELs marcadas con CasExpress que con Dcp-1. Se observa entre los diferentes métodos utilizados, como se acaba de describir, una diferencia en el número de células marcadas, pero también en el tiempo en el que los reporteros se activan previamente a la delaminación (CasExpress horas antes, y JPV minutos antes).

Todas estas diferencias pueden deberse a los distintos métodos utilizados. La detección con un anticuerpo puede necesitar de mayores niveles de expresión (y solo reconocen una caspasa activada) que los requeridos para cortar la secuencia específica de caspasas en los casos de JPV y CasExpress (en este caso, además, con una secuencia de reconocimiento común a todas las caspasas), lo que explicaría

el mayor número de células marcadas con estas herramientas. Se sabe además que las caspasas tienen funciones en el desarrollo independientes de la apoptosis (revisado en Nakajima y Kuranaga, 2017). Niveles mínimos de caspasa activada que no desencadenen la cascada apoptótica (Florentin y Arama, 2012) podrían activar estas funciones, lo que además explicaría por qué con el sistema CasExpress se observan fenómenos de anastasia (células que han activado la muerte celular pero forman el tejido adulto). Además, el sistema Gal4/UAS puede hacer perdurar la señal por más tiempo, lo que explicaría por qué el sistema CasExpress parece el más sensible. A este respecto, es interesante señalar la existencia de algunas pocas CELs y un gran número de histoblastos del A7 que se extruyen sin activarse este sistema, y por tanto sin presencia de caspasas.

En estudios previos en los que se inhibió la apoptosis no se observó que se impidiera la extrusión de los histoblastos (Foronda et al., 2012; Yoder, 2012). Hemos repetido estos experimentos (Fig. R3) con una nueva y potente herramienta para inhibir la apoptosis, un miRNA contra los tres genes pro-apoptóticos (Siegrist et al., 2010), y observado que la inhibición de la apoptosis en los histoblastos (con *esg-Gal4*) no evita la delaminación de estos. Cuando las poblaciones afectadas son las CELs (con *Eip71CD-Gal4*), o ambas (con *MD761-Gal4*), sí se observa la falta de extrusión de los histoblastos del A7, o anomalías en su proliferación y expansión, siendo el fenotipo obtenido mayor cuando se afectaron ambas poblaciones. Aunque estos resultados sugieren que la inhibición de la apoptosis inhibe la extrusión de histoblastos de forma no autónoma celular, otra interpretación es que los niveles de expresión de la línea *esg-Gal4* son insuficientes para producir un efecto apreciable.

Respecto a la constricción apical, la Miosina II no muscular (*MyoII*) es una proteína clave para la formación del anillo contráctil que permite la extrusión celular basal (An et al., 2017; Martin et al., 2009; Martin y Goldstein, 2014; Munjal et al., 2015). Nuestros experimentos al inhibir esta proteína a través de varias vías (Fig. R8) demuestran que las CELs sufren un retraso en su delaminación, como previamente descrito (Foronda et al., 2012; Ninov et al., 2007). Como en el caso anterior, se observa un efecto en los histoblastos, que permanecen en el tejido (aunque en este caso la inhibición de la extrusión fue mayor y se observan fenotipos en el adulto), solo al utilizar la línea *MD761-Gal4* (de expresión en ambas poblaciones), por lo que no podemos afirmar que sea un efecto estrictamente autónomo celular. Medidas para intentar solucionar esta posible limitación se discuten más adelante.

#### **D.1.2. Implicación de las proteínas HLH en la extrusión del segmento A7 del macho**

El gen *extramacrochaetae* (*emc*) codifica para una proteína HLH que carece de la región de unión a DNA y actúa como un regulador negativo de otras HLH (bHLH, que mantienen esta región) formando con ellas heterodímeros inactivos (Campuzano, 2001; Ellis et al., 1990; Garrell y Modolell, 1990). *Emc* se requiere para la correcta eliminación del A7 (Foronda et al., 2012, 2015), aunque no es suficiente para



provocar este proceso morfogénico cuando se sobreexpresa en hembras (Fig. R4D) (Foronda et al. 2015). Nuestros resultados (Fig. R4F-I) muestran una regulación de la actividad de *Emc* por otras bHLH, especialmente *daughterless (da)* y *grainyhead (grh)* en el A7 del macho: la reducción de *da* o *grh* rescata el fenotipo de pérdida de *emc*, mientras que la sobreexpresión de estos genes mimetiza la pérdida de *emc*. Ya había sido descrito previamente una interacción similar *Emc-Da* en el desarrollo del ojo (Bhattacharya y Baker, 2011). Al inhibir *emc* se produce un cambio en los homodímeros y heterodímeros que puedan formarse entre proteínas HLH (Campuzano, 2001). El homodímero *Da-Da* es funcional en ojo (Tanaka-Matakatsu et al., 2014), pero no produjo la aparición de un A7 en nuestro modelo, sugiriendo que *Da* podría formar heterodímeros con otras bHLH, como podrían ser las proteínas del complejo *achaete/scute*. Estas interacciones deberán ser estudiadas en el futuro para entender cómo *Da* regula positivamente la aparición de un A7 en el macho.

## D.2. Células epiteliales larvarias e histoblastos

Durante la pupación, los histoblastos se expanden y reemplazan a las CELs, que mueren y sufren extrusión basal. Algunos autores han propuesto que la muerte en las CELs es necesaria para la proliferación de los histoblastos. Si se inhibe la apoptosis se impide también la eclosión del adulto y se producen fuertes defectos en la cutícula abdominal del farato, en la que permanecerían muchas CELs que no se han podido delaminar (Ninov et al., 2007). En nuestros estudios la inhibición de la apoptosis en este tejido, a pesar de que retrasa la delaminación celular y la expansión de los nidos de histoblastos, no impide finalmente la extrusión casi total de las CELs. Los adultos de estos experimentos pueden eclosionar y el abdomen solo muestra un pequeño fallo en el cierre dorsal de los terguitos (Fig. R3D'-D''). El fenotipo menor obtenido en nuestro caso puede ser debido a las distintas herramientas usadas: miRNA contra los tres genes pro-apoptóticos y línea *Eip71CD-Gal4* en vez de *P35* y *Act5c-Gal4*. En los experimentos en que se usa *P35* puede que se formen también células "undead" (Huh et al., 2004; Pérez-Garijo et al., 2004; Ryoo et al., 2004; revisado en Pérez-Garijo et al., 2009), y esto contribuya al fenotipo observado. Sin embargo, hemos repetido los experimentos publicados expresando *P35* y hemos obtenido fenotipos más débiles que los descritos, incluso menores a los obtenidos con el *RHG* miRNA (no mostrado), siendo este el mismo obtenido en otro estudio que utilizó nuestras mismas herramientas (Kester y Nambu, 2011). Respecto a qué ocurre con los histoblastos en nuestro segmento de interés, el A7, cuando se inhibe la muerte celular en las CELs de todos los segmentos, se observa una diferente respuesta en el nido de histoblastos de este segmento (que no prolifera ni se delamina con normalidad) respecto a segmentos anteriores (que finalmente proliferan y cubren todo el abdomen excepto por una fila dorsal que queda ocupada por CELs) (Fig. R3C-D''). Quizás esto se deba a que los histoblastos del A7 muestran menos células en mitosis que los de segmentos anteriores (Wang et al.,

2011), y a que, como hemos observado, parecen encontrarse detenidos en fase G1 del ciclo celular en estos estadios (Fig. 7C-D'').

Por el contrario, diversos estudios sostienen que la correcta proliferación de los histoblastos determina la apoptosis de las CELs (Madhavan y Madhavan, 1984; Nakajima et al., 2011; Ninov et al., 2007; Poodry, 1975; Roseland y Schneiderman, 1979). Nuestros datos demuestran, para el segmento A7, tanto en machos como en hembras, que la completa inhibición de la proliferación de los histoblastos retrasa pero no impide la extrusión de las CELs de dicho segmento (Fig. R7E-E'' y Película 14). Otros autores han obtenido defectos abdominales en el adulto debidos a CELs que no se han extruido (Nakajima et al., 2011; Ninov et al., 2007). No hemos observado estos defectos, quizás debido a las distintas herramientas utilizadas, o a una posible diferente respuesta del A7 respecto a segmentos anteriores. En relación a este proceso, cabe resaltar que las CELs del A8 se delaminan correctamente (de hecho, antes que las de otros segmentos anteriores) (Fig. R20) aunque no existan nidos de histoblastos en este segmento, y este proceso ocurre sin necesidad de proliferación de los histoblastos del segmento anterior (A7) (Fig. R7E-E'' y Película 14). Esto sugiere que la presencia (y expansión) de los histoblastos no es un requerimiento absoluto para la pérdida de CELs.

En el proceso de eliminación del A7 de machos tiene lugar, primero, el crecimiento de nidos de histoblastos y concordante eliminación de CELs, común a otros segmentos y con características similares, y más tarde la delaminación específica de histoblastos. Varias características celulares son propias de este segmento: los histoblastos son de un tamaño celular mayor (Foronda et al., 2012), hay menos células en mitosis (Wang et al., 2011), y hemos observado más histoblastos detenidos en fase G1 que en nidos anteriores (Fig. R7C-D'' y Película 13). El menor número de histoblastos puede ser un requisito que facilite la eliminación del segmento. Así, cuando se fuerza la actividad de la vía EGFR, que se requiere para la proliferación de los histoblastos (Ninov et al., 2009), aparece un A7 en el macho (Fig. R7A) (Foronda et al., 2012; Wang et al., 2011). No hemos seguido los procesos celulares en estas combinaciones mutantes, pero quizás se produzca un aumento de proliferación y el exceso de células no pueda ser eliminado por los mecanismos de extrusión. Otra posibilidad, sin embargo, es que la vía EGFR favorezca la supervivencia de estas células, como ocurre en ojo (Miller y Cagan, 1998; Yu et al., 2002) o que contrarreste la extrusión celular por otro mecanismo.

Un problema encontrado en los experimentos que intentan determinar las características funcionales específicas de histoblastos y CELs es la actividad de las líneas Gal4 utilizadas. Experimentos realizados con la línea *MD761-Gal4* dan lugar a fenotipos claros, pero esta línea se expresa en ambas poblaciones celulares del A7 (Fig. R14A, A'). *esg-Gal4* se expresa solo en los histoblastos (Fig. R14B, B') y *Eip71CD-Gal4* solo en CELs (Fig. R14C, C'), pero es posible que ambas (sobre todo la primera) consigan menores niveles de expresión que la línea *MD761-Gal4*. Por ejemplo, tanto para el estudio de la apoptosis como

de la constricción apical, no se obtuvieron fenotipos con la línea *esg*-Gal4 y sí con la *MD761*-Gal4. Esta diferencia se podría deber al efecto de expresión en las CELs o al menor nivel de expresión de *esg*-Gal4. Experimentos realizados con *MD761*-Gal4 a menor temperatura (como los realizados con *Dsx<sup>M</sup>* de distintas especies), no fueron conclusivos. Se podría estudiar si la expresión con las líneas *esg* y *Eip71CD* combinadas reproduce los fenotipos observados con la línea *MD761*-Gal4. Hay que decir, sin embargo, que el uso de la línea *Eip71CD*-Gal4 permite, en algunos experimentos, asignar los fenotipos a una u otra población celular.

Para intentar dirigir la expresión solo a los histoblastos del A7 con niveles superiores a los conseguidos con la línea *esg*-Gal4, decidimos llevar a cabo la construcción de nuevas líneas (Fig. R14D). Conseguimos líneas *Eip71CD*-Gal80 y *Eip71CD*-LexA (para un sistema binario de expresión génica), ambas en vectores optimizados para *D. melanogaster* (Pfeiffer et al., 2010). Por desgracia, ninguna ha dado los resultados esperados, aunque la expresión de los transgenes sea correcta. Los niveles de expresión de Gal80 y LexA no parecen ser suficientes para contrarrestar el efecto del Gal4 (caso de *Eip71CD*-Gal80; ni siquiera con dos dosis) (Fig. R14E-F') o no alcanzan los mismos niveles que la línea *Eip71CD*-Gal4 (caso de *Eip71CD*-LexA) (Fig. R14C''). Actualmente, estamos intentando la combinación *Eip71CD*-LexA *LexO*-*flp* *Act*>*STOP*>Gal80, confiando en que el promotor de *Actina* dirija niveles de expresión de la proteína Gal80 suficientes para, en combinación con la línea *MD761*-Gal4, permitir la expresión solo en los histoblastos del A7. Otra aproximación posible es el uso del sistema Q (Potter et al., 2010), que puede dar mayores niveles de expresión que el sistema LexA-LexO.

### D.3. Relación entre la eliminación de segmentos abdominales y la rotación genital del macho

#### **D.3.1. La rotación de la placa genital desde un punto de vista autónomo de disco**

Poco se sabe sobre la regulación génica que controla la rotación dextral de la placa genital, así como sobre los mecanismos que activan y detienen el proceso de rotación (independientemente de la dirección). Respecto al primer punto, parece claro que el gen *MyoID* es el principal determinante dextral (Hozumi et al., 2006; Spéder et al., 2006). Este gen es activado por *Abd-B* en el A8 del disco genital de macho, de manera que en ausencia de *Abd-B* la genitalia no gira, y si en este fondo genético se expresa *MyoID* se rescata el giro dextral (Coutelis et al., 2013). Estos resultados indicarían que *MyoID* es necesario y suficiente para activar el giro en el macho en ausencia de *Abd-B*. Debido a la ausencia de una herramienta que indique la presencia de *MyoID*, en nuestros experimentos, solo podemos inferir su presencia o ausencia por los fenotipos de rotación. Nuestros resultados (Fig. R16) indican que la sobreexpresión de *MyoID* en hembras, tanto en un fondo silvestre como en uno carente de *Abd-B*, no es suficiente para el giro de su genitalia; pero sí lo es el cambio de sexo hacia macho. Por el contrario, el cambio de sexo de macho a hembra o la ausencia de *dsx* en intersexos (tanto cromosómicamente XX

como XY) impide la rotación genital. En ausencia de *Abd-B*, la expresión forzada de *dsx*<sup>M</sup> no produjo el giro en hembras y fue letal en machos. Asumiendo que en el disco genital *Abd-B* regula la expresión de *dsx*, como ocurre en el abdomen (Wang y Yoder, 2012), *Abd-B* sería necesarios para activar *MyoID*, pero la conformación del tejido genital como tejido macho sería también necesaria para el proceso de rotación. Sin embargo, este modelo no concuerda con el dato de que la sola expresión de *MyoID* en ausencia de *Abd-B* active la rotación en machos (Coutelis et al., 2013), ya que en este caso suponemos, aunque no está demostrado, que no hay *dsx*. Una posibilidad es que al inhibir *Abd-B* no se active *dsx* (intersexo), siendo esta situación diferente al cambio de sexo donde se produce *Dsx*<sup>F</sup>, y que esta isoforma inhibiera a *MyoID*. Otras explicaciones posibles son que el *Abd-B*-RNAi de estos experimentos no elimine *Abd-B* totalmente, o que tal vez *Abd-B* no regule a *dsx*. Deben realizarse más experimentos de epistasia para dilucidar la interacción génica entre *Abd-B*, *dsx* y *MyoID* y sus efectos en la rotación de la genitalia.

### **D.3.2. La rotación de la placa genital desde un punto de vista no autónomo de disco**

La finalización del proceso de rotación en cualquiera de las direcciones es determinante para la perpetuación de la especie en los insectos que muestran este tipo de rotación genital (Levin y Palmer, 2007), ya que rotaciones parciales impedirán al macho adoptar la correcta postura de cópula. La genitalia se encuentra unida al abdomen y gira respecto a este, que ejerce de sistema de referencia. Varias evidencias sugieren una posible relación entre la rotación de la genitalia y la eliminación del último segmento abdominal (A7): ambos procesos solo ocurren en machos, solapan parcialmente durante la pupación, son regulados por *Abd-B* (Coutelis et al., 2013; Foronda et al., 2012; Wang y Yoder, 2012), y existe una posible coevolución del aumento del grado de rotación y la disminución en el número de segmentos abdominales en la evolución de los Dípteros (Bickel, 1990; Huber, 2009; Huber et al., 2007; Richards, 1927; Yoder, 2012; Yoder y Carroll, 2006). Además, estudios previos que sugerían un papel independiente del disco genital en el giro, no permiten excluir un papel del abdomen ya que: o bien cortan la genitalia para su estudio *in vitro*, pero incluyendo tejido abdominal (Sato et al., 2015), o las líneas Gal4 utilizadas como específicas de la genitalia muestran expresión en el abdomen posterior (Fig. R17) (Coutelis et al., 2013; Kuranaga et al., 2011; Petzoldt et al., 2012; Sato et al., 2015; Suzanne et al., 2010). Por todo ello, nos propusimos analizar si existe una relación entre la desaparición de segmentos abdominales y la rotación genital.

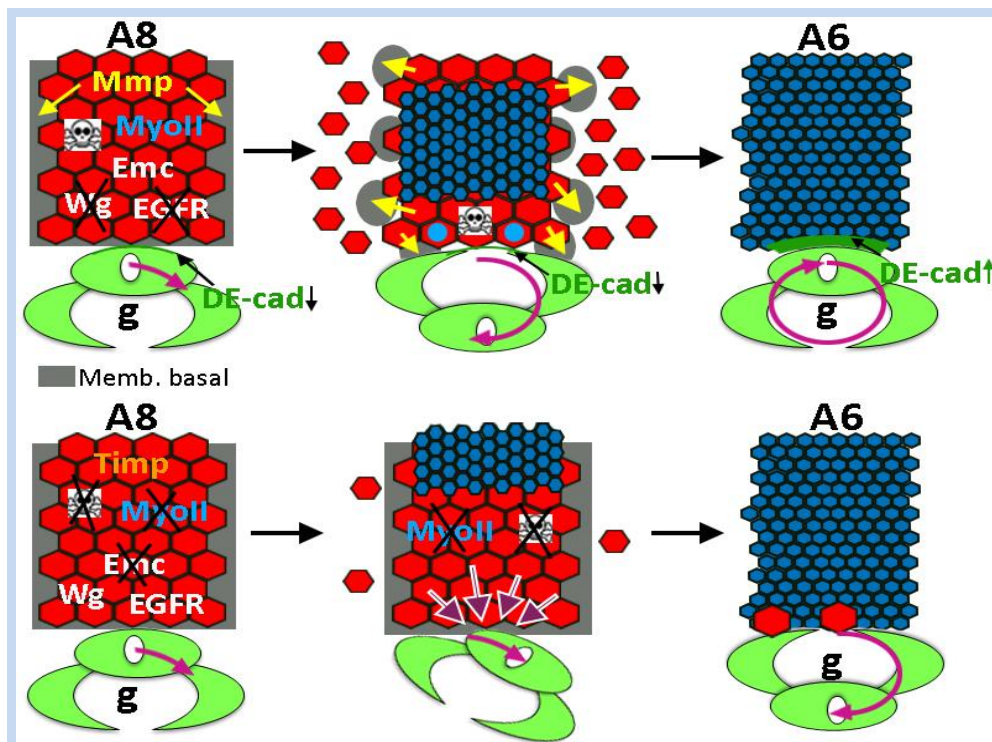
#### **D.3.2.1. Implicación de la extrusión de las CELs del A8 en el proceso de la rotación**

Nuestros resultados con combinaciones genéticas que impedían solo la eliminación del A7 sin impedir la correcta rotación de la placa genital (*iab7*<sup>MX2</sup>/*MD761*-Gal4) (Fig. R18), o que afectaban a histoblastos del A7 y CELs del A7 y A8 (las conseguidas con la línea *MD761*-Gal4 expresando o inactivando distintos

genes), y que alteraban ambos procesos, sugerían un papel de las CELs en la rotación de la placa genital (Fig. R20). Así, cuando se afectan ambos segmentos y poblaciones celulares (con la línea *MD761-Gal4*) se obtienen fenotipos de rotación parcial de la placa genital. La inhibición lograda en la rotación genital, ya sea causada por la expresión o inhibición de genes con esta línea en histoblastos o en CELs, es intrínseca a este proceso e independiente de la dirección de giro (Fig. R19). Este impedimento no solo produce fenotipos de rotación parcial, sino que, al menos para el caso de reducción de *Emc* o incremento de *EGFR*, causa una disminución en la velocidad de rotación (Fig. R21), y quizás los dos eventos estén relacionados. Uno de los factores que determinan la velocidad de rotación es la muerte celular entre el A8 genital y el abdomen, así como entre los dos anillos (A8a y A8p) del A8 genital (Kuranaga et al., 2011; Suzanne et al., 2010). Cuando se reduce la velocidad de rotación a través de la inhibición de las caspasas o de la vía *Jnk* en el A8 genital, se obtienen fenotipos de rotación parcial (Kuranaga et al., 2011). Esto sugiere que la falta de apoptosis impide el mecanismo de giro, o que el giro debe producirse en una ventana de tiempo determinada (de aproximadamente 12h) y si no se ha finalizado en ese periodo, la genitalia quedará en la posición alcanzada. Sin embargo, en nuestro análisis hemos obtenido casos silvestres y mutantes con una cierta variabilidad temporal en el ritmo y tiempo de rotación, por lo que no es claro que la ventana de tiempo para la rotación sea un suceso con una precisión extrema. El mecanismo de apoptosis es especialmente importante en el anillo exterior, el que contacta el abdomen, ya que parece que el giro de este anillo proporciona la aceleración necesaria para finalizar al movimiento en 12h (Kuranaga et al., 2011). En nuestros experimentos de sobreexpresión de la vía *EGFR* o reducción de *Emc* con la línea *MD761-Gal4*, que dan lugar a fenotipos de rotación parcial, es posible que ocurra una disminución de la muerte celular en las células del A8 genital que están en contacto con el abdomen o entre los dos anillos del A8 genital, causando la disminución de la velocidad de rotación que hemos observado. Esta hipótesis deberá ser confirmada en un futuro.

Uno de los posibles mecanismos que puede estar implicado en el giro de las células del disco genital sobre el abdomen es el cambio en las uniones adherentes entre las células de la genitalia y el abdomen posterior. Por ello decidimos analizar el estado de la DE-cadherina en estas uniones en individuos silvestres (Fig. R22). Investigaciones previas habían mostrado que esta proteína se mantiene a niveles bajos en el abdomen en células que van a migrar, como es el caso de los nidos de histoblastos (Ninov et al., 2007; Teng et al., 2017). Recientemente se demostró en las CELs que los niveles de esta proteína bajaban en el momento de su constricción apical y delaminación, lo que disminuye de manera transitoria la tensión en el tejido (Teng et al., 2017). Nuestras observaciones concuerdan con estas afirmaciones, pues encontramos unos niveles de DE-cadherina bajos tanto en el borde de los nidos de histoblastos, como en las CELs, durante todo el proceso de rotación (y por tanto delaminación de las CELs y expansión de los histoblastos); que aumentan entre el abdomen (formado ya solo por histoblastos) y la genitalia una vez finalizados los procesos de remodelación del epitelio abdominal que

suceden durante la metamorfosis (Fig. D1). Nuestros intentos de aumentar los niveles de DE-cadherina a través de su sobreexpresión en el abdomen posterior para comprobar si esto impedía la correcta rotación genital, no tuvieron éxito. La sobreexpresión de DE-cadherina parece ser funcional en el rescate de esta proteína en testículos, y en la morfogénesis de las tráqueas (Oda y Tsukita, 1999; Wang et al., 2006). Por el contrario, otros autores (Shaye et al., 2008) han publicado que esta herramienta (UAS-DE-cad) no aumenta los niveles de la proteína, y que la sobreexpresión de una construcción de De-cadherina fusionada a  $\alpha$ -catenina (Pacquelet y Rørth, 2005), que puede que estabilice correctamente la DE-cadherina (Jurado et al., 2016), produce un rescate leve pero reproducible. Quizás en nuestro modelo también sea necesario el uso de esta proteína de fusión para elevar los niveles de DE-cadherina.



**Figura D1. Modelo de relación entre la delaminación de las células epiteliales larvianas (CELs) del A8 y la rotación de la placa genital durante la pupación.** Se esquematiza arriba el proceso en machos silvestres y abajo se resumen todas las combinaciones genéticas descritas en esta Tesis que dieron lugar a fenotipos de rotación parcial

asociados a un retraso en la extrusión de las CELs. Se ha omitido la extrusión del A7 para facilitar la esquematización. Las células del disco genital sufren constantes cambios de uniones celulares con las células del abdomen. Nuestra hipótesis defiende que en ausencia de delaminación de las CELs abdominales, estos cambios de contactos se ven impedidos. En individuos silvestres, las CELs (hexágonos grandes rojos) degradan la membrana basal (gris) a través de Mmps (amarillo, flechas indican degradación), y se delaminan (esquematisadas como hexágonos separados) a través de mecanismos de constricción apical (Myo II; en azul, círculos azules) y apoptosis (calaveras). Esta delaminación permite a la genitalia rotar 360°, hasta que contacta finalmente con el A6 (formado por histoblastos, hexágonos pequeños azules); en ese momento los niveles de DE-cad (verde oscuro) entre genitalia y abdomen aumentan. Cuando en las CELs se reducen los niveles de Emc, se aumentan los de Wg o la vía EGFR, se impide la apoptosis, la constricción apical, la recepción de la señal de Ecdisona (no esquematizado), o la degradación de la membrana basal a través de la expresión de Timp (naranja), se produce un retraso en su delaminación. Este retraso no permitirá que se libere la tensión en el tejido (flechas moradas) y la genitalia no puede completar su rotación, de manera que finalmente cuando el A6 se une a la genitalia quedará en posiciones de rotación parcial. En algunos casos algunas CELs no se delaminarán y aparecen en el tejido adulto. Otras combinaciones genéticas (cambio de sexo o disminución de *Abd-B*) impiden la rotación de la genitalia, pero puede que lo hagan a través de un mecanismo diferente.

Otro de los posibles mecanismos de interacción entre el abdomen terminal y la genitalia es la membrana basal (MB), ya que esta debe degradarse para que las células del abdomen que se están delaminando se extruyan basalmente (Ninov et al., 2007). Estudios previos ya habían relacionado la MB con la rotación genital, pues mutantes para *tenectina* (un ligando de las integrinas) muestran fenotipos de rotación parcial (Fraichard et al., 2010). Nuestros resultados (Fig. R23) de inhibición de la degradación de la MB a través de la sobreexpresión de *Timp* (inhibidor de *Mmp1* y *Mmp2*) con la línea *Eip71CD-Gal4*, sugieren que la degradación de la MB en las CELs se requiere para la correcta rotación genital (Fig. D1), mientras que la inhibición de la degradación de la MB en el disco genital (con las líneas *esg-Gal4* y *MyoID-Gal4*), parece no ejercer un efecto drástico sobre la rotación. Sin embargo, cabe tener en cuenta que tanto *Mmp1* como *Timp* (o al menos su ortólogo en humanos, *Timp-3*) son proteínas secretables (Baker et al., 2002; Page-McCaw, 2008; Wei et al., 2003), lo que podría apuntar a un efecto no autónomo de la degradación de la MB por las CELs en la rotación de la placa genital. Sin embargo, contrariamente a lo que se creía, recientemente se ha descrito que ambas metaloproteinasas (*Mmp-1* y *Mmp-2*) pueden ser secretadas o anclarse a la membrana, y reconocer diferentes sustratos (Lafever et al., 2017), lo que arroja una mayor complejidad al estudio de la implicación de la MB en nuestro proceso de interés. La diferencia en la activación de *Mmp1* observada entre la genitalia pupal de ambos sexos (mayor en machos que en hembras) (Fig. R23C,D), sugiere la posible implicación del disco genital de macho en la degradación de la MB, o la implicación de *Mmp1* en otras vías o cascadas de señalización aún desconocidas en este modelo. Sin embargo, la ausencia de fenotipo al expresar *Timp* no parece asignar un papel importante a *Mmp1* en el disco genital. Se deben realizar más experimentos de inhibición de la degradación de la membrana basal con otras herramientas, y un estudio en profundidad del estado de sus componentes tanto en el abdomen como en la genitalia, en ambos sexos, para llegar a conclusiones definitivas.

Por último, parece que la correcta extrusión, en el momento adecuado, de las CELs del A8 y el A7 tiene un gran efecto en la permisividad del giro de la placa genital (Fig. R24). Todos los casos en los que se utilizó la línea *MD761-Gal4* y produjeron fenotipos de rotación parcial (excepto la reducción de *Abd-B* y el cambio de sexo, como se explica a continuación), mostraron un drástico retraso en la extrusión de las CELs de los segmentos A7 y A8. Fenotipos de rotación parcial se obtuvieron también repitiendo estos experimentos con una línea solo de CELs (*Eip71CD-Gal4*), obteniéndose además defectos en la formación de los terguitos, lo que indica un fallo en la eliminación de las CELs. La inhibición de la recepción de la señal de Ecdisona en las CELs impide su capacidad de llevar a cabo la constricción apical, apoptosis y extrusión, por lo que la morfogénesis del abdomen no se completa y se observan CELs en la epidermis de faratos y moscas adultas (Ninov et al., 2007). En nuestros experimentos, la inhibición tanto de todas las isoformas de este receptor como de la isoforma B1, de expresión preferencial en tejidos larvarios (Talbot et al., 1993), impidió la correcta rotación genital. Todos estos resultados apoyan

por tanto un mecanismo por el cual las CELs deben extruirse adecuadamente para permitir la rotación genital, probablemente debido a un proceso de liberación de tensión en el tejido (Teng et al., 2017), o a la facilitación de intercambios celulares entre las células del disco genital en el borde del anillo exterior y el abdomen. Hemos observado que cuando se inhibe la proliferación de los histoblastos del A7, las CELs del A8 no sufren retraso en su extrusión, a pesar de que lo hagan las del A7, y no se observan fenotipos de rotación parcial (Película 14). Una conclusión de todos los experimentos anteriores es que la eliminación de manera correcta del segmento A8 se requiere para la precisa rotación genital (Fig. D1).

#### D.3.2.2. Posible implicación de la extrusión de los histoblastos en el proceso de rotación

Tres datos indican que no debemos eliminar completamente a los histoblastos de nuestro modelo de inhibición de la rotación genital. En primer lugar, el nido de histoblastos ventral contacta con la genitalia al inicio de la rotación, y el dorsal unas horas más tarde, cuando se ha completado aproximadamente un cuarto del giro (aunque siguen en contacto CELs, aún sin delaminar) (Fig. R20D-F). Por tanto, su correcta extrusión puede ser necesaria para la liberación de tensiones en el tejido, permitiendo así el giro genital.

En segundo lugar, el rescate de la falta de rotación que se produce al sobreexpresar *MyoID* en un fondo en que eliminamos *Abd-B* solo en el A8 genital (*MyoID-Gal4/UAS-MyoID-GFP; Abd-B-RNAi/+*), no se consigue con esta misma sobreexpresión en un fondo mutante para *Abd-B* (Fig. R25A,B,E). En principio, la principal diferencia entre estos dos experimentos es la ausencia de *Abd-B* solo en el A8 genital, en el primer caso, o en todo el animal en el segundo caso, lo que produce la aparición de 8 terguitos en el macho adulto. Se puede interpretar, por tanto, que en este caso la aparición de extra-segmentos formados por histoblastos en el abdomen impide la correcta rotación genital. Sin embargo, es posible que el *Abd-B-RNAi* no inhiba por completo *Abd-B* en el A8 genital o que en el mutante *Abd-B* se produzca un efecto en las CELs que dificulte la rotación. Se ha publicado, sin embargo, que la inhibición de *Abd-B* en las CELs no produce ningún fenotipo remarcable (Singh y Mishra, 2014). Por otra parte, el genotipo *MD761-Gal4/UAS-Abd-B-RNAi*, no produce un retraso significativo en las CELs, y sin embargo causa fenotipos de rotación parcial. Los experimentos sugieren que este último fenotipo se debe a un cambio de identidad de los histoblastos del A7 (que se convierten hacia a A4) aunque puede ser también que la eliminación de *Abd-B* en las CELs del A8 sea superior a la obtenida en experimentos anteriores (Singh y Mishra, 2014), y el cambio de identidad en este segmento sea responsable de la falta de rotación completa.

Por último, el cambio de sexo con la línea *MD761-Gal4* produce la aparición de un A7 e impide la rotación genital, pero no conlleva ningún retraso en la extrusión de las CELs (Fig. R25D, E). Confirmamos que las CELs no se veían afectadas cambiando el sexo en estas células también con la línea *Eip71CD-Gal4*, y en ningún caso observamos ningún fenotipo de rotación parcial. El cambio de sexo en otros



tejidos como el cuerpo graso, que podría afectar a la membrana basal, tampoco produjo ningún fenotipo. Por tanto, esto sugiere que al impedirse la eliminación de los histoblastos del A7 se previene la correcta rotación de la placa genital.

Cabe remarcar, sin embargo, que los machos *iab-7<sup>MX2</sup>/MD761-Gal4* presentan un A7, y su rotación genital no se ve afectada (Fig. R18G, H). Este dato no concuerda con un posible papel de la extrusión de los histoblastos del A7 en la correcta rotación genital, como se acaba de exponer. Nuestros esfuerzos se centran actualmente en resolver que mecanismos operan en todos estos genotipos, y si existe una función, permisiva o no, del A7 sobre el giro de la genitalia.

#### D.4. Asimetría en los testículos de *D. melanogaster*

##### **D.4.1. Requerimiento espacial y temporal de MyoID**

Los testículos de *Drosophila* forman dos llamativas espirales en dirección siempre dextrógira. La adquisición de la asimetría parece un requisito para conseguir cierta longitud del esperma y por tanto para la fertilidad del individuo (Joly y Schiffer, 2010), ya que la falta de asimetría solo permite la conformación de la gónada en forma esférica o semi-alargada, por problemas de capacidad del abdomen para albergar una gónada grande. Aunque es posible encontrar esperma móvil en testículos esféricos no unidos a los derivados del disco genital (Woolf, 1966, 1968) y células gonadales capaces de completar la espermatogénesis *in vitro* (Gärtner et al., 2014), no se puede afirmar que estos gametos sean funcionales. La fertilidad puede verse reducida en genotipos que impiden la correcta adquisición del patrón espiralado y muestran defectos en el número de vueltas o engrosamientos terminales (Olivera, 2017; Rothenbusch-Fender et al., 2017). En nuestro estudio no hemos abordado la relación entre fertilidad y elongación/espiralización incompletas, y solo hemos considerado genotipos con espiralización completa, dextrógira o levógira.

La determinación de la dirección de giro del testículo depende, como en otros órganos asimétricos del abdomen de la mosca, de la Miosina ID (MyoID) (Hozumi et al., 2006). Aunque se ha descrito que el mutante *MyoID<sup>k2</sup>*, usado en nuestros experimentos, es un mutante nulo (Spéder et al., 2006), tanto en nuestros experimentos como en los de otros investigadores (Hozumi et al., 2006; Spéder et al., 2006), la inversión de la dirección de rotación en la placa genital o testículos no es del 100%, en algunos experimentos incluso menor a la inhibición de *MyoID* a través de su RNAi (Tabla 1). Una posibilidad es que el mutante no sea nulo o que exista redundancia, por ejemplo con el gen *MyoIC*, inicialmente propuesto como determinante sinistral (Petzoldt et al., 2012), y en otro trabajo como regulador de la dirección dextral en la genitalia (Okumura et al., 2015).

La expresión de *MyoID* no se ha podido estudiar, ya que el anticuerpo original contra esta proteína (Coutelis et al., 2013; Petzoldt et al., 2012; Spéder et al., 2006) se agotó, y otras herramientas no mostraron expresión en los testículos. Una posible alternativa sería realizar hibridación *In situ* con una sonda para este gen, como se ha llevado a cabo en el embrión (Okumura et al., 2015). Sin embargo, nuestro análisis funcional del requerimiento de *MyoID* a través de la expresión de su RNAi en diferentes tejidos (Tabla 1), así como el rescate del fenotipo mutante expresando *MyoID* en un tejido concreto (Fig. R29), permiten concluir que se requiere la expresión de este gen en el músculo.

Respecto al requerimiento temporal de *MyoID*, nuestros resultados (Fig. R29F) indican que esta proteína se requiere durante la pupación, periodo en el cual transcurre la completa formación de la espiral de dos vueltas y media (Fig. 26A, B) (Rothenbusch-Fender et al., 2017). Hay que tener en cuenta que en nuestro análisis solo hemos tenido en cuenta la dirección del giro en la región de contacto entre vas deferens y testículo, y no si se producían cambios en elongación, dirección durante la espiralización o número de vueltas. Otro factor a tener en cuenta en cuanto a la precisión de este dato es que se realizaron puestas de 24h para el cambio de 17°C a 29°C y de 12h para el cambio de temperaturas inverso, y que el sistema Gal4/Gal80<sup>TS</sup> implica un retraso en la funcionalidad/inhibición de los productos que puede llegar a ser importante (McGuire et al., 2003). Por tanto, se deben realizar estudios más exhaustivos para acotar esta ventana temporal.

El tejido muscular parece ser clave tanto en la elongación como en el giro dextrógiro (Olivera, 2017; Rothenbusch-Fender et al. 2017; esta Tesis) pero se desconocen los mecanismos que dan lugar a estos procesos. Recientemente se ha implicado a la MyoII no muscular en la migración de los mioblastos a través del testículo (Rothenbusch-Fender et al., 2017), lo que arroja otra similitud entre el modelo de giro en los testículos, la genitalia y el intestino, ya que la distribución asimétrica de MyoII es necesaria para la intercalación de las células del A8 genital (Sato et al., 2015) y para la distribución asimétrica de las células musculares viscerales del intestino (Okumura et al., 2010), produciendo así un movimiento dextral dependiente de MyoID. Por tanto, esta interacción entre MyoID y MyoII debe ser estudiada en la espiralización testicular, combinándose quizás con filmaciones del proceso *ex vivo* (Gärtner et al., 2014).

#### **D.4.2. Requerimiento de *abd-A* y *Abd-B* en el giro dextral de los testículos**

Como se ha explicado en la Introducción, *abd-A* y *Abd-B* son necesarios para la correcta especificación de la gónada embrionaria (Boyle y DiNardo, 1995; Camara et al., 2008; DeFalco et al., 2004, 2008). Además, *Abd-B* determina el epitelio terminal del testículo (DeFalco et al., 2004; Nanda et al., 2009), la posición del "hub" (Papagiannouli et al., 2014; Schardt et al., 2015), y la correcta formación del citoesqueleto de actina/miosina del músculo del testículo adulto (Schardt et al., 2015).

*Abd-B* activa la expresión de *MyoID* en los otros órganos asimétricos del abdomen, el intestino y la placa genital (Coutelis et al., 2013), por lo que hemos estudiado si también está implicado en la asimetría testicular. Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio (Olivera, 2017), y durante esta Tesis, muestran un requerimiento de *Abd-B* en el tejido muscular para su correcta migración desde el disco genital y para la elongación subsiguiente del testículo. Por tanto, en ausencia de *Abd-B* en el músculo, las gónadas mantienen la forma esférica larvaria, lo que supone un estado simétrico paralelo al requerimiento de *Abd-B* en el modelo genital o intestinal (Coutelis et al., 2013). Sin embargo, la inhibición de *Abd-B* (Fig. R30, Tabla 2) con una línea que dirige la expresión en varios tipos celulares (*Mj12a-Gal4*), entre ellos el músculo pero no de manera homogénea, dio lugar a fenotipos de espiralización sinistral, que sin embargo no pudieron ser rescatados al sobreexpresar *MyoID* de forma simultánea (como sí ocurre en el modelo de la placa genital). Estos resultados podrían sugerir una relación entre *Abd-B* y *MyoID* distinta a la descrita para el disco genital.

Para el caso de *abd-A* (Fig. R30, Tabla 2), solo su inhibición con una línea (*bab-Gal4*) de expresión mayoritaria en células musculares, aunque también se expresa en células pigmentarias (CP) y cistos, resultó en un fenotipo claro de espiralización sinistral. En este experimento, las únicas células que expresarían la proteína Gal4 y *abd-A* en pupa serían las CP; sin embargo, la inhibición de *abd-A* con una línea específica de estas células no dio lugar a fenotipos de espiralización sinistral. La expresión de *abd-A* durante el desarrollo parece ser dinámica, ya que su estudio en diferentes estadios mostró expresión en diferentes tejidos, por lo que no podemos descartar la implicación de otros tipos celulares con expresión transitoria de *abd-A* que expliquen los fenotipos obtenidos. Curiosamente, durante la pupación este gen *Hox* se expresa fuertemente en las células del epitelio terminal del testículo (Fig. R30A), tejido en el que se expresa previamente *Abd-B* (DeFalco et al., 2004; Nanda et al., 2009). Además, este tejido (el epitelio terminal) se encuentra en la zona de contacto entre el testículo y el vas deferens, que es la región que se va espiralizando paulatinamente durante la metamorfosis (Fig. R26) (Nanda et al., 2009).

#### **D.4.3. Implicación de la vía de Polaridad Celular Planar (PCP)**

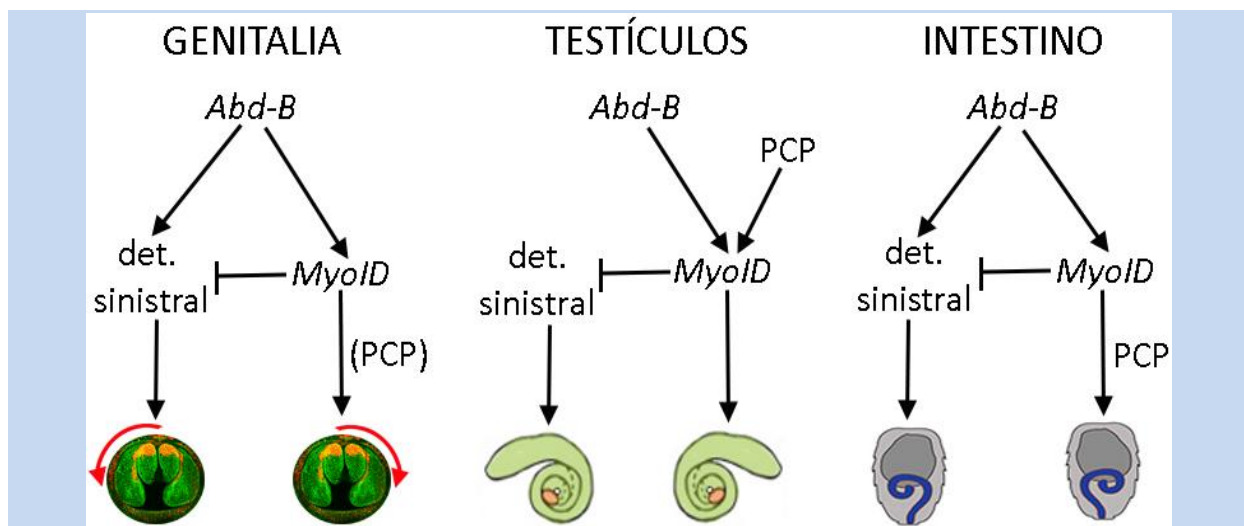
La implicación de la vía PCP en órganos asimétricos de *Drosophila* se conoce únicamente para el intestino, donde Dachous se une a *MyoID* transmitiendo una señal a través de otras proteínas PCP. En ausencia de proteínas PCP, el sistema se mantiene simétrico (González-Morales et al., 2015). Muy recientemente se ha descrito una interacción similar entre PCP y *MyoID* en rana y pez cebra (Tingler et al., 2018). En este caso, y en otros estudios en vertebrados, en ausencia de proteínas PCP se mantiene mayoritariamente un estado simétrico de los órganos (aunque se obtienen también fenotipos de inversión) (Antic et al., 2010; Song et al., 2010). Por el contrario, la descripción original de *inversina* (homólogo distante de *diego*, gen del grupo PCP en *Drosophila*) en ratón, apuntaba a un papel en la dirección de asimetría, pues mutantes para este gen mostraban una inversión total en la dirección de

sus órganos (Morgan et al., 1998). Cabe remarcar que estos estudios en vertebrados son difíciles de interpretar, pues una inversión en la posición de los cilios dentro de las células, fenotipo típico de mutaciones para genes PCP (revisado en Dasgupta y Amack, 2016; Schweickert et al., 2018), puede dar lugar a un flujo simétrico en el nódulo primitivo y a una activación simétrica de nodal (revisado en Schweickert et al., 2018). Así, según en qué punto se analice la cascada de señalización para cada mutante, se obtendrán diferentes conclusiones acerca de su función.

Para el caso de los testículos, se han obtenido fenotipos de inversión de rotación (Fig. R31, Tabla 3) en algunos mutantes en genes PCP y, mediante expresión de RNA interferente con dos líneas Gal4, una de expresión en el epitelio (*esg-Gal4*) y otra de expresión dinámica y a muy bajos niveles en varios tipos celulares, como son algunas CPs y el músculo en la región de unión al vas deferens (*MyoID-Gal4*). Es poco probable que la expresión en músculos de la línea *MyoID-Gal4* sea la causante de los fenotipos, en primer lugar porque otras líneas de músculos no arrojaron los mismos resultados, y en segundo lugar porque en *Drosophila*, la vía PCP parece no estar implicada en la orientación del tejido muscular (Krzemien et al., 2012), aunque sí se ha descrito su implicación en la elongación de tejido muscular en vertebrados (Gros et al., 2009). Esta línea también expresa en CPs, que derivan del cuerpo graso, tejido en el cual se ha descrito la presencia de Dachous (Revilla-Yates et al., 2015). Sin embargo estos resultados no concuerdan con los obtenidos con líneas de expresión específica en este tejido, aunque esto podría deberse al momento de expresión de cada línea utilizada. La línea *MyoID-Gal4* es además ligeramente mutante para *MyoID*, por lo que los fenotipos observados pueden deberse a un fondo génico sensibilizado. La vía PCP ha sido clásicamente estudiada en los epitelios de la mosca (Adler, 2012; Lawrence et al., 2007; Lawrence y Casal, 2013; Matis y Axelrod, 2013; Singh y Mlodzik, 2012). Por tanto, a diferencia de lo que ocurre para la línea *MyoID-Gal4*, que no se expresa en el epitelio del vas deferens, los resultados obtenidos con la línea *esg-Gal4* (de expresión en este epitelio) fueron más esperables.

Los resultados obtenidos en la determinación del giro dextrógiro de los testículos permiten establecer comparaciones entre este modelo de asimetría y los de la placa genital e intestino (Fig. D2): a) en los tres casos se necesita el gen *MyoID*, y mutaciones en el mismo producen giro levógiro en los tres órganos (Hozumi et al., 2006; Spéder et al., 2006; esta Tesis); b) el gen Hox *Abd-B* también es un requerimiento común. Sin embargo, mientras que en la placa genital e intestino la falta de *Abd-B* produce un fenotipo simétrico, su ausencia en los testículos causa, si bien en un porcentaje pequeño, y solo al inactivar el gen con ciertas líneas Gal4, una inversión de la asimetría. Ya que *Abd-B* controla la expresión de *MyoID* en el disco genital, la simetría producida en la rotación genital al inhibir este gen Hox se ha propuesto que es debida a la falta simultánea de *MyoID* y de un determinante levógiro. Es decir, en ausencia de *MyoID* este determinante realiza el giro levógiro (ya que *MyoID* lo reprimiría) (Fig. D2) y en ausencia de *Abd-B* se inhiben los dos determinantes y no hay rotación (Coutelis et al., 2013).

Nuestros datos en los testículos no concuerdan del todo con este modelo; y c) la vía PCP se necesita también para el giro dextrógiro. Mutaciones en genes PCP producen simetría en el intestino ya que se propone que las proteínas codificadas por genes de la vía PCP interaccionan con MyoID y transmiten la señal dextrógiro (González-Morales et al., 2015). Para el caso de la genitalia, en ausencia de PCP se obtienen fenotipos de rotación parcial dextral lo que indica un papel en la determinación dextral del giro; aunque a diferencia del modelo intestinal, en ningún caso da lugar a situaciones de no rotación (simetría) (Petzoldt et al., 2012). De nuevo, los resultados en los testículos se alejan de este modelo ya que, a pesar de haberse obtenido defectos en la unión y correcta elongación de los testículos (lo que equivaldría a un estado simétrico), en cierto número de casos se observa en estos mutantes una inversión de la asimetría, de manera similar a lo observado en mutantes para *inversina* en ratón (Morgan et al., 1998). Es posible que en los testículos *Abd-B* regule *MyoID* pero no (o no positivamente) el putativo determinante levógiro, y que en ausencia de la vía PCP y de proteína MyoID pierda la capacidad para reprimirlo. En estos supuestos, la ausencia de *Abd-B* o PCP inhibiría la expresión o función de MyoID, y eso daría lugar a la actividad del determinante levógiro y giro sinistral (Fig. D2).



**Figura D2. Posible regulación genética para los tres modelos de asimetría en machos.** Se esquematiza la regulación para el giro dextral o sinistral de la genitalia, los testículos y el intestino, a partir de los resultados obtenidos en esta Tesis y en estudios previos (Coutelis et al., 2013; González-Morales et al., 2005; Hozumi et al., 2006; Petzoldt et al., 2012; Spéder et al., 2006). No se incluye *abd-A* porque su implicación solo ha sido estudiada en los testículos. Los tres modelos precisan de *Abd-B* para llevarse a cabo, aunque en el caso de los testículos la presencia de este gen es totalmente necesaria para la morfogénesis del órgano. La cascada de determinación sexual es necesaria para el desarrollo del testículo y, según nuestros resultados, para el giro de la genitalia. La asimetría del intestino es independiente de esta vía y ocurre en ambos sexos. La vía PCP parece estar implicada en los tres modelos, aunque en el caso del intestino transmite la señal dextral, de manera que en ausencia de PCP se producen estados de simetría (o rotación parcial dextral para la genitalia). Para el caso de los testículos, la inhibición de la PCP produce en algún caso la inversión de la espiralización. En los tres modelos la ausencia de *MyoID* produce la inversión de la asimetría. En ausencia de *Abd-B* no hay expresión de *MyoID* en la genitalia ni el intestino. Para explicar por qué en esta condición mutante no hay rotación sinistral (ya que no hay *MyoID*), sino simetría, se ha propuesto un hipotético determinante sinistral, controlado también por *Abd-B*. En el testículo, sin embargo, en ausencia de *Abd-B* (en ciertas condiciones) se produce inversión de rotación (no descrita en los otros dos órganos) por lo que la existencia de un determinante sinistral no está clara.

## ***Conclusiones/Conclusions***

- 1) La actividad de la Miosina II no muscular en la constricción apical desempeña un papel más activo que la muerte celular en el proceso de delaminación de los histoblastos del segmento séptimo abdominal (A7) de los machos, aunque estos resultados pueden deberse, en parte, a un efecto no autónomo de las células epiteliales larvarias en los histoblastos.
- 2) Los histoblastos del segmento séptimo abdominal del macho no proliferan ni se expanden con normalidad, como los de segmentos anteriores, cuando se inhibe la muerte celular de las células epiteliales larvarias circundantes. La delaminación de las células epiteliales larvarias del segmento A8, al contrario de los segmentos anteriores, ocurre en ambos sexos sin requerimiento de un nido de histoblastos que proliferen en dicho segmento o en el segmento colindante (A7).
- 3) Al menos parte de la función de *extramacrochaetae* en la desaparición del A7 en machos se debe a su interacción con *daughterless* y *grainyhead*: la sobre-expresión de cualquiera de estos dos genes produce la aparición de un A7, y su falta reduce el fenotipo mutante *extramacrochaetae* (formación de un A7).
- 4) La delaminación de los histoblastos del A7 de los machos ocurre bajo el control del gen *Hox Abdominal-B* y la vía de determinación sexual; sin embargo, al menos en las condiciones estudiadas, esta delaminación demostró ser en algunos casos no autónoma celular para estas dos señales.
- 5) La función de *doublesex* con respecto a la eliminación del A7 en machos, se haya conservada en las especies de Dípteros analizadas (*Anastrepha obliqua*, *Musca domestica* y *Anopheles gambiae*).
- 6) El cambio de sexo, la reducción de la expresión de *Abdominal-B* o *extramacrochaetae*, o la actividad incrementada de *wingless* o de la vía EGFR en los histoblastos y células epidérmicas larvarias del segmento A7 y el A8, que dan lugar a la aparición de un segmento extra en los machos, también disminuyen el grado de rotación, y, al menos en el caso de *extramacrochaetae* y EGFR también la velocidad, en la placa genital.
- 7) La especificación y extrusión de las células epidérmicas larvarias del A8 (que contactan con el disco genital al principio de la rotación del mismo) debe llevarse a cabo de manera correcta para que este proceso de rotación sea completo. La extrusión de los histoblastos del A7 podría ser también necesaria para este proceso.
- 8) La degradación de la membrana basal de las células epidérmicas larvarias es necesaria para la correcta rotación de la placa genital.

**9)** El músculo es el tejido organizador de la asimetría de los testículos de *Drosophila melanogaster*. La expresión de *MyoID* en este tejido es necesaria para producir la espiralización dextral de estos órganos. Dicha expresión se requiere durante los estadios pupales del desarrollo.

**10)** Los genes Hox *abdominal-A* y *Abdominal-B* parecen ser necesarios para la correcta adquisición de la asimetría dextral de los testículos, aunque aún se desconoce la localización precisa de las células donde se requiere su expresión. La vía de la Polaridad Celular Planar (PCP) parece tener también un papel en la determinación de la asimetría de los testículos.



- 1) Non-muscle Myosin II has a more active role than cell death in male seventh abdominal segment (A7) histoblast delamination; although these results may be in part due to a non-autonomous effect of the larval epidermal cells on A7 histoblasts.
- 2) The histoblasts of the male seventh abdominal segment do not proliferate and expand like the more anterior segments when cell death is prevented in the surrounding larval epidermal cells. Larval epidermal cell delamination of the A8 segment, contrary to what is observed in more anterior segments, occurs in both sexes without requirement of a proliferating histoblasts nest in the A8 or in the adjacent anterior segment (A7).
- 3) At least part of the *extramacrochaetae* role in male A7 elimination is due to its interaction with *daughterless* and *grainyhead*: the over-expression of any of these two genes results in the development of an A7, and their absence reduces the *extramacrochaetae* mutant phenotype (formation of an A7).
- 4) Male A7 histoblast delamination occurs under the control of the Hox gene *Abdominal-B* and the sex determination pathway; however, at least in our experimental conditions, this delamination has proved to be in some cases non-cell-autonomous for both inputs.
- 5) *doublesex* function in male A7 elimination is conserved in the species of Diptera we have analyzed (*Anastrepha obliqua*, *Musca domestica* and *Anopheles gambiae*).
- 6) Sex transformation, the reduction of *Abdominal-B* or *extramacrochaetae* expression, or the increased activity of *wingless* or the EGFR pathway in A7 and A8 histoblasts and larval epidermal cells, which lead to the development of an extra segment in males, also reduce the degree and, at least for *extramacrochaetae* and EGFR, the speed of rotation of the genital plate.
- 7) The specification and extrusion of A8 segment larval epidermal cells (which contact the genital disc at the beginning of its rotation) must take place correctly for a complete genital plate rotation. A7 histoblast extrusion could be needed as well in this process.
- 8) The degradation of the larval epidermal cells basement membrane is required for a complete genital plate rotation.
- 9) The muscle is the left/right organizer in the *Drosophila melanogaster* testes asymmetry process. *MyoID* expression is needed in this tissue to produce the dextral looping of these organs. This expression is required during pupal stages of *Drosophila* development.

**10)** The Hox genes *abdominal-A* and *Abdominal-B* seem to be needed for the correct dextral asymmetry in testicles, although the precise location of the cells that express these genes is still unknown. The Planar Cell Polarity (PCP) pathway also seems to have a role in testicular asymmetry determination.

# **Bibliografía**

- Abrams J.M., White K., Fessler L.I. y Steller H. (1993). «Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis». *Development* 117(1):29-43.
- Adám G., Perrimon N. y Noselli S. (2003). «The retinoic-like juvenile hormone controls the looping of left-right asymmetric organs in *Drosophila*». *Development* 130(11):2397-406.
- Adler P.N. (2012). «The frizzled/stan pathway and planar cell polarity in the *Drosophila* wing». *Current Topics in Developmental Biology* 101: 1–31.
- Akam M. (1998). «Hox genes, homeosis and the evolution of segment identity: no need for hopeless monsters». *International Journal of Developmental Biology* 42(3):445-51.
- Alvarez M., Ruiz M.F. y Sánchez L. (2009). «Effect of the gene doublesex of *Anastrepha* on the somatic sexual development of *Drosophila*». *PLoS One* 4(4):e5141.
- An Y., Xue G., Shaobo Y., Mingxi D., Zhou X., Yu W., Ishibashi T., Zhang L. y Yan Y. (2017). «Apical constriction is driven by a pulsatile apical myosin network in delaminating *Drosophila* neuroblasts». *Development* 144(12):2153-64.
- Andersson M. (1994). «Sexual Selection». *Princeton University Press*.
- Antic D., Stubbs J.L., Suyama K., Kintner C., Scott M.P. y Axelrod J.D. (2010). «Planar cell polarity enables posterior localization of nodal cilia and left-right axis determination during mouse and *Xenopus* embryogenesis». *PLoS One* 5(2):e8999.
- Baker A.H., Edwards D.R. y Murphy G. (2002). «Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities». *Journal of Cell Science* 115(Pt 19):3719-27.
- Baker B.S., Hoff G., Kaufman T.C., Wolfner M.F. y Hazelrigg T. (1991). «The doublesex locus of *Drosophila melanogaster* and its flanking regions: a cytogenetic analysis». *Genetics* 127(1):125-38.
- Baker B.S. y Ridge K.A. (1980). «Sex and the single cell. I. On the action of major loci affecting sex determination in *Drosophila melanogaster*». *Genetics* 94(2):383-423.
- Baonza A., de Celis J.F. y García-Bellido A. (2000). «Relationships between extramacrochaetae and Notch signalling in *Drosophila* wing development». *Development* 127(11):2383-93.
- Banreti A., Hudry B., Sass M., Saurin A.J. y Graba Y. (2014). «Hox proteins mediate developmental and environmental control of autophagy». *Developmental Cell* 28(1):56-69.
- Barton N.H. y Charlesworth B. (1998). «Why sex and recombination?». *Science* 281(5385): 1986–90.
- Baumann A., Barry J., Wang S., Fujiwara Y. y Wilson T.G. (2010). «Paralogous genes involved in juvenile hormone action in *Drosophila melanogaster*». *Genetics* 185(4):1327-36.
- Benitez S., Sosa C., Tomasini N. y Macías A. (2010). «Both JNK and apoptosis pathways regulate growth and terminalia rotation during *Drosophila* genital disc development». *International Journal of Developmental Biology* 54(4):643-53.
- Bhat K.M. (1998). «Frizzled and frizzled 2 play a partially redundant role in Wingless signaling and have similar requirements to wingless in neurogenesis». *Cell* 95(7):1027-36.

Bhattacharya A. y Baker N.E. (2011). «A network of broadly expressed hlh genes regulates tissue-specific cell fates». *Cell* 147(4):881-92.

Bickel D.J. (1990). «Sex with a twist in the tail». *New Scientist* 1731:34-37.

Bischoff M. (2012). «Lamellipodia-based migrations of larval epithelial cells are required for normal closure of the adult epidermis of *Drosophila*». *Developmental Biology* 363(1):179-90.

Bischoff M. y Cseresnyes Z. (2009). «Cell rearrangements, cell divisions and cell death in a migrating epithelial sheet in the abdomen of *Drosophila*». *Development* 136(14):2403-11.

Blum M. y Ott T. (2018). «Animal left-right asymmetry». *Current Biology* 28(7):R301-R304.

Boutros M. y Ahringer J. (2008). «The art and design of genetic screens: RNA interference». *Nature Reviews Genetics* 9(7):554-66.

Boyle M. y DiNardo S. (1995). «Specification, migration and assembly of the somatic cells of the *Drosophila* gonad». *Development* 121(6):1815-25.

Brand A.H. y Perrimon N. (1993). «Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes». *Development* 118(2):401-15.

Broadie K., Baumgartner S. y Prokop A. (2011). «Extracellular matrix and its receptors in *Drosophila* neural development». *Developmental Neurobiology* 71(11):1102-30.

Bryant P.J., Huettner B., Held L.I., Ryerse J. y Szidonya J. (1988). «Mutations at the fat locus interfere with cell proliferation control and epithelial morphogenesis in *Drosophila*». *Developmental Biology* 129(2):541-54.

Burgess D.R. (1982). «Reactivation of intestinal epithelial cell brush border motility: ATP-dependent contraction via a terminal web contractile ring». *Journal of Cell Biology* 95(3):853-63.

Burtis K.C. y Baker B.S. (1989). «*Drosophila* doublesex gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides». *Cell* 56(6):997-1010.

Calleja M., Herranz H., Estella C., Casal J., Lawrence P., Simpson P. y Morata G. (2000). «Generation of medial and lateral dorsal body domains by the pannier gene of *Drosophila*». *Development* 127(18):3971-80.

Calleja M., Moreno E., Pelaz S. y Morata G. (1996). «Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*». *Science* 274(5285):252-55.

Capdevila M.P. y Garcia-Bellido A. (1981). «Genes involved in the activation of the bithorax complex of *Drosophila*». *Wilhelm Roux's archives of Developmental Biology* 190(6):339-50.

Camara N., Whitworth C. y Van Doren M. (2008). «Chapter 3 The Creation of Sexual Dimorphism in the *Drosophila* Soma». *Current Topics in Developmental Biology* 83:65-107.

Campuzano, S. (2001). «Emc, a negative HLH regulator with multiple functions in *Drosophila* development». *Oncogene* 20(58):8299-307.

- Carroll S.B., Grenier J.K. y Weatherbee S.D. (2001). «From DNA to Diversity: Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design». *Blackwell Publishing Limited*.
- Casanova J., Sánchez-Herrero E. y Morata G. (1986). «Identification and characterization of a parasegment specific regulatory element of the abdominal-B gene of *Drosophila*». *Cell* 47(4):627-36.
- Celniker S.E., Keelan D.J. y Lewis E.B. (1989). «The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: characterization of the products of the Abdominal-B domain». *Genes & Development* 3(9):1424-36.
- Cherbas L., Hu X., Zhimulev I., Belyaeva E. y Cherbas P. (2003). «EcR isoforms in *Drosophila*: testing tissue-specific requirements by targeted blockade and rescue». *Development* 130(2):271-84.
- Cherbas L., Lee K. y Cherbas P. (1991). «Identification of ecdysone response elements by analysis of the *Drosophila* Eip28/29 gene». *Genes and Development* 5(1):120-31.
- Cherbas L., Schulz R.A., Koehler M.M., Savakis C. y Cherbas P. (1986). «Structure of the Eip28/29 gene, an ecdysone-inducible gene from *Drosophila*». *Journal of Molecular Biology* 189(4):617-31.
- Chin M.L. y Mlodzik M. (2013). «The *Drosophila* selectin furrowed mediates intercellular planar cell polarity interactions via frizzled stabilization». *Developmental Cell* 26(5):455-68.
- Christiansen A.E., Keisman E.L., Ahmad S.M. y Baker B.S. (2002). «Sex comes in from the cold: The integration of sex and pattern». *Trends in Genetics* 18(10):510-16.
- Cohen S.M. (1993). «Imaginal disc development». En *Drosophila Development*, Martínez-Arias A. y Bate M., eds. *Cold Spring Harbor Press* pp. 747-841.
- Coutelis J.B., Géminard C., Spéder P., Suzanne M., Petzoldt A.G. y Noselli S. (2013). «*Drosophila* Left/Right Asymmetry Establishment Is Controlled by the Hox Gene Abdominal-B». *Developmental Cell* 24(1):89-97.
- Coutelis J.B., González-Morales N., Géminard C. y Noselli S. (2014). «Diversity and convergence in the mechanisms establishing L/R asymmetry in metazoa». *EMBO Reports* 15(9):926-37.
- Coutelis J.B., Petzoldt A.G., Spéder P., Suzanne M. y Noselli S. (2008). «Left-right asymmetry in *Drosophila*». *Seminars in Cell and Developmental Biology* 19(3):252-62.
- Curt R.J. (2015). «Análisis funcional de la proteína Abdominal-B y de los genes extradenticle y homothorax en *Drosophila melanogaster*». Tesis doctoral.
- Dasgupta A. y Amack J.D. (2016). «Cilia in vertebrate left-right patterning». *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 371(1710).
- DeFalco T., Camara N., Le Bras S. y Van Doren M. (2008). «Nonautonomous Sex Determination Controls Sexually Dimorphic Development of the *Drosophila* Gonad». *Developmental Cell* 14(2):275-86.
- DeFalco T., Le Bras S. y Van Doren M. (2004). «Abdominal-B is essential for proper sexually dimorphic development of the *Drosophila* gonad». *Mechanisms of Development* 121(11):1323-33.
- Devenport D. (2014). «The cell biology of planar cell polarity». *The Journal of cell biology* 207(2):171-79.

Dietzl G., Chen D., Schnorrer F., Su K.C., Barinova Y., Fellner M., Gasser B., Kinsey K., Oppel S., Scheiblauer S., Coute A., Marra V., Keleman K. y Dickson B.J. (2007). «A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*». *Nature* 448(7150):151-56.

Ding A.X., Sun G., Argaw Y.G., Wong J.O., Easwaran S. y Montell D.J. (2016). «CasExpress reveals widespread and diverse patterns of cell survival of caspase-3 activation during development in vivo». *eLife* 5.

Dobzhansky T. (1931). «Interaction between female and male parts in gynandromorphs of *Drosophila simulans*». *Wilhelm Roux Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 123(3-4):719-46.

Dobzhansky T. y Beadle G.W. (1936). «Studies on hybrid sterility IV. Transplanted testes in *Drosophila pseudoscura*». *Genetics* (21):832-40.

Dobzhansky T. y Tan C.C. (1937). «Studies on hybrid sterility III». *Zeitschrift für Induktive Abstammungs- und Vererbungslehre* 72(1):88-114.

Dollé P., Izpisua-Belmonte J.C., Falkenstein H., Renucci A. y Duboule D. (1989). «Coordinate expression of the murine Hox-5 complex homeobox-containing genes during limb pattern formation». *Nature* 342(6251):767-72.

Duboule D. (1991). «Patterning in the vertebrate limb». *Current Opinion in Genetics and Development* 1(2):211-16.

Duboule D. (1994). «Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate Bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony». *Development Supplement*:135-42.

Duboule D. (2007). «The rise and fall of Hox gene clusters». *Development* 134(14):2549-60

Duboule D. y Morata G. (1994). «Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes». *Trends in Genetics* 10(10):358-64.

Dubreuil R.R., MacVicar G., Dissanayake S., Liu C., Homer D. y Hortsch M. (1996). «Neuroglian-mediated cell adhesion induces assembly of the membrane skeleton at cell contact sites». *Journal of Cell Biology* 133(3):647-55.

Elliott D.A. y Brand H.A. (2008). «The GAL4 system: a versatile system for the expression of genes». *Methods in Molecular Biology* 420(6):79-95.

Ellis H.M., Spann D.R. y Posakony J.W. (1990). «extramacrochaetae, a negative regulator of sensory organ development in *Drosophila*, defines a new class of helix-loop-helix proteins». *Cell* 61(1):27-38.

Epper F. (1983a). «The evagination of the genital imaginal discs of *Drosophila melanogaster* - I. Morphogenesis of the female genital disc». *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* 192(5):275-79.

Epper F. (1983b). «Three-dimensional fate map of the female genital disc of *Drosophila melanogaster*». *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* 192(5):270-74.

Erickson J.W. y Quintero J.J. (2007). «Indirect effects of ploidy suggest X chromosome dose, not the X:A ratio, signals sex in *Drosophila*». *PLoS Biology* 5(12):2821-30.

- Estrada B., Casares F., Busturia A. y Sánchez-Herrero E. (2002). «Genetic and molecular characterization of a novel iab-8 regulatory domain in the Abdominal-B gene of *Drosophila melanogaster*». *Development* 129(22):5195-204.
- Estrada B., Casares F. y Sánchez-Herrero E. (2003). «Development of the genitalia in *Drosophila melanogaster*». *Differentiation* 71(6):299-310.
- Estrada B. y Sánchez-Herrero E. (2001). «The Hox gene Abdominal-B antagonizes appendage development in the genital disc of *Drosophila*». *Development* 128(3):331-39.
- Ferris G.F. (1950). «External Morphology of the Adult». En *The Biology of Drosophila*. eds, Demerec M. pp. 368-419.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E. y Mello C.C. (1998). «Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*». *Nature* 391(6669):806-11.
- Florentin A. y Arama E. (2012). «Caspase levels and execution efficiencies determine the apoptotic potential of the cell». *Journal of Cell Biology* 196(4):513-27.
- Foronda D., Curt J.R., Prieto N., Martín P. y Sánchez-Herrero E. (2015). «The elimination of an adult segment by the Hox gene Abdominal-B». *Mechanisms of Development* 138(Pt 2):210-17.
- Foronda D., Estrada B., de Navas L. y Sánchez-Herrero E. (2006). «Requirement of abdominal-A and Abdominal-B in the developing genitalia of *Drosophila* breaks the posterior downregulation rule». *Development* 133(1):117-27.
- Foronda D., Martín P. y Sánchez-Herrero E. (2012). «*Drosophila* Hox and Sex-Determination Genes Control Segment Elimination through EGFR and extramacrochaetae Activity». *PLoS Genetics* 8(8):e1002874.
- Fraichard S., Bougé A.L., Kendall T., Chauvel I., Bouhin H. y Bunch T.A. (2010). «Tenectin is a novel  $\alpha$ PS2 $\beta$ PS integrin ligand required for wing morphogenesis and male genital looping in *Drosophila*». *Developmental Biology* 340(2):504-17.
- Franke J.D., Montague R.A. y Kiehart D.P. (2005). «Nonmuscle myosin II generates forces that transmit tension and drive contraction in multiple tissues during dorsal closure». *Current Biology* 15(24):2208-21.
- Freeland D.E. y Kuhn D.T. (1996). «Expression patterns of developmental genes reveal segment and parasegment organization of *D. melanogaster* genital discs». *Mechanisms of Development* 56(1-2):61-72.
- Friedman M. (2008). «The evolutionary origin of flatfish asymmetry». *Nature* 454(7201):209-12.
- García-Bellido A. y Merriam J.R. (1971). «Clonal parameters of tergite development in *Drosophila*». *Developmental Biology* 26(2):264-76.
- García-Bellido A., Ripoll P. y Morata G. (1973). «Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*». *Nature New Biology* 245(147):251-53.
- Garrell J. y Modolell J. (1990). «The *Drosophila* extramacrochaetae locus, an antagonist of proneural genes that, like these genes, encodes a helix-loop-helix protein». *Cell* 61(1):39-48.



Gärtner S.K., Rathke C., Renkawitz-Pohl R. y Awe S. (2014). «Ex vivo culture of Drosophila Pupal Testis and Single Male Germ-line Cysts: Dissection, Imaging, and Pharmacological Treatment». *Journal of Visualized Experiments* (91): 51868.

Géminard C., González-Morales N., Coutelis J.B. y Noselli S. (2014). «The myosin ID pathway and left-right asymmetry in Drosophila». *Genesis* 52(6):471-80.

Golic K.G. (1991). «Site-specific recombination between homologous chromosomes in Drosophila». *Science* 252(5008):958-61.

González-Méndez L., Seijo-Barandiarán I. y Guerrero I. (2017). «Cytoneme-mediated cell-cell contacts for hedgehog reception». *eLife* 6.

González-Morales N., Géminard C., Lebreton G., Cerezo D., Coutelis J.B. y Noselli S. (2015). «The Atypical Cadherin Dachshous Controls Left-Right Asymmetry in Drosophila». *Developmental Cell* 33(6):675-89.

González-Reyes A. y Morata G. (1990). «The developmental effect of overexpressing a Ubx product in Drosophila embryos is dependent on its interactions with other homeotic products». *Cell* 61(3):515-22.

González-Reyes A., Urquía N., Gehring W.J., Struhl G. y Morata G. (1990). «Are cross-regulatory interactions between homeotic genes functionally significant?». *Nature* 344(6261):78-80.

Gorfinkiel N. y Arias A.M. (2007). «Requirements for adherens junction components in the interaction between epithelial tissues during dorsal closure in Drosophila». *Journal of Cell Science* 120(18):3289-98.

Griffiths, G.C. (1972). «The phylogenetic classification of Diptera Cyclorrhapha, with special reference to the structure of the male postabdomen». *Series Entomologica*. Vol 8.

Grimes D.T. y Burdine R.D. (2017). «Left-Right Patterning: Breaking Symmetry to Asymmetric Morphogenesis». *Trends in Genetics* 33(9):616-28.

Gros J., Serralbo O. y Marcelle C. (2009). «WNT11 acts as a directional cue to organize the elongation of early muscle fibres». *Nature* 457(7229):589-93.

Gubb D. y Garcia-Bellido A. (1982). «A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in Drosophila melanogaster». *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 68:37-57.

Gubb D., Green C., Huen D., Coulson D., Johnson G., Tree D., Collier S. y Roote J. (1999). «The balance between isoforms of the Prickle LIM domain protein is critical for planar polarity in Drosophila imaginal discs». *Genes and Development* 13(17):2315-27.

Gyurkovics H., Gausz J., Kummer J. y Karch F. (1990). «A new homeotic mutation in the Drosophila bithorax complex removes a boundary separating two domains of regulation». *EMBO Journal* 9(8):2579-85.

Hafen E., Levine M. y Gehring W.J. (1984). «Regulation of antennapedia transcript distribution by the bithorax complex in Drosophila». *Nature* 307(5948):287-89.

- Hales K.G., Korey C.A., Larracuenta A.M. y Roberts D.M. (2015). «Genetics on the fly: A primer on the drosophila model system». *Genetics* 201(3):815-42.
- Harris, T.J. (2012). «Adherens junction assembly and function in the *Drosophila* embryo». *International Review of Cell and Molecular Biology* 293:45-83.
- Hartenstein V. (1993). «Atlas of *Drosophila* Development». *Cold Spring Harbor Laboratory Press*: 1-57.
- Hediger M., Burghardt G., Siegenthaler C., Buser N., Hilfiker-Kleiner D., Dübendorfer A. y Bopp D. (2004). «Sex determination in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* converges at the level of the terminal regulator doublesex». *Development Genes and Evolution* 214(1):29-42.
- Hegan P.S., Ostertag E., Geurts A.M. y Mooseker M.S. (2015). «Myosin ID is required for planar cell polarity in ciliated tracheal and ependymal epithelial cells». *Cytoskeleton* 72(10):503-16.
- Hempel L.U. y Oliver B. (2007). «Sex-specific DoublesexM expression in subsets of *Drosophila* somatic gonad cells». *BMC Developmental Biology* 7:113.
- Hewitt C.G. (1914). «The house-fly, *Musca domestica* Linn.: its structure, habits, development, relation to disease and control». *Cambridge: University Press*.
- Hombria J.C y Lovegrove B. (2003). «Beyond homeosis-HOX function in morphogenesis and organogenesis». *Differentiation* 71(8):461-76.
- Hopmann R., Duncan D. y Duncan I. (1995). «Transvection in the iab-5,6,7 region of the bithorax complex of *Drosophila*: Homology independent interactions in trans». *Genetics* 139(2):815-33.
- Hozumi S., Maeda R., Taniguchi K., Kanai M., Shirakabe S., Sasamura T., Spéder P., Noselli S., Aigaki T., Murakami R. y Matsuno K. (2006). «An unconventional myosin in *Drosophila* reverses the default handedness in visceral organs». *Nature* 440(7085):798-802.
- Huang J., Zhou W., Dong W., Watson A.M. y Hong Y. (2009). «From the Cover: Directed, efficient, and versatile modifications of the *Drosophila* genome by genomic engineering». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(20):8284-89.
- Huber B.A. (2009). «Mating positions and the evolution of asymmetric insect genitalia». *Genetica* 138(1):19-25.
- Huber B.A., Sinclair B.J y Schmitt M. (2007). «The evolution of asymmetric genitalia in spiders and insects». *Biological Reviews* 82(4):647-98.
- Huh J.R., Guo M. y Hay B.A. (2004). «Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role». *Current Biology* 14(14):1262-66.
- Hynes R.O y Zhao Q. (2000). «The evolution of cell adhesion». *Journal of Cell Biology* 150(2):F89-96.
- Ingham P.W. (1988). «The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*». *Nature* 335(6185):25-34.

Ito K., Awano W., Suzuki K., Hiromi Y. y Yamamoto D. (1997). «The Drosophila mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells». *Development* 124(4):761-71.

Joly D. y Schiffer M. (2010). «Coevolution of male and female reproductive structures in Drosophila». *Genetica* 138:105-18.

Jordan P. y Karess R. (1997). «Myosin light chain-activating phosphorylation sites are required for oogenesis in Drosophila». *Journal of Cell Biology* 139(7):1805-19.

Jurado J., de Navascués J. y Gorfinkiel N. (2016). « $\alpha$ -Catenin stabilises Cadherin-Catenin complexes and modulates actomyosin dynamics to allow pulsatile apical contraction». *Journal of Cell Science* 129(24):4496-508.

Jürgens G. (1987). «Segmental organisation of the tail region in the embryo of Drosophila melanogaster-A blastoderm fate map of the cuticle structures of the larval tail region». *Roux's Archives of Developmental Biology* 196(3):141-57.

Jürgens G. y Hartenstein V. (1993). «The terminal regions of the body pattern». En *Drosophila Development*, Martinez-Arias A. y Bate M., eds. Cold Spring Harbor Press pp. 687-746.

Karch F., Bender W. y Weiffenbach B. (1990). «abdA expression in Drosophila embryos». *Genes & Development* 4(9):1573-87.

Karch F., Weiffenbach B., Peifer M., Bender W., Duncan I., Celniker S., Crosby M. y Lewis E.B. (1985). «The abdominal region of the bithorax complex». *Cell* 43(1):81-96.

Kaufman T.C., Seeger M.A. y Olsen G. (1990). «Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of drosophila melanogaster». *Advances in Genetics* 27:309-62.

Keisman E.L., Christiansen A.E. Y Baker B.S. (2001). «The sex determination gene doublesex regulates the A/P organizer to direct sex-specific patterns of growth in the Drosophila genital imaginal disc». *Developmental Cell* 1(2):215-25.

Kellerman K.A., Mattson D.M. y Duncan I. (1990). «Mutations affecting the stability of the fushi tarazu protein of Drosophila». *Genes and Development* 4(11):1936-50.

Kester R.S. y Nambu J.R. (2011). «Targeted expression of p35 reveals a role for caspases in formation of the adult abdominal cuticle in Drosophila». *International Journal of Developmental Biology* 55(1):109-19.

Klein T. y Arias AM. (1998). «Different spatial and temporal interactions between Notch, wingless, and vestigial specify proximal and distal pattern elements of the wing in Drosophila». *Developmental Biology* 194(2):196-212.

Kmita M., y Duboule D. (2003). «Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering». *Science* 301(5631):331-33.

Kopp A. (2012). «Dmrt genes in the development and evolution of sexual dimorphism». *Trends in Genetics* 28(4):175-84.

Kopp A. y Duncan I. (2002). «Anteroposterior patterning in adult abdominal segments of Drosophila». *Developmental Biology* 242(1):15-30.

- Kopp A., Blackman R.K. y Duncan I. (1999). «Wingless, decapentaplegic and EGF receptor signaling pathways interact to specify dorso-ventral pattern in the adult abdomen of *Drosophila*». *Development* 126(16):3495-507.
- Kopp A., Duncan I., Godt D. y Carroll S.B. (2000). «Genetic control and evolution of sexually dimorphic characters in *Drosophila*». *Nature* 408(6812):553-59.
- Kozopas K.M., Samos C.H. y Nusse R. (1998). «DWnt-2, a *Drosophila* Wnt gene required for the development of the male reproductive tract, specifies a sexually dimorphic cell fate». *Genes and Development* 12(8):1155-65.
- Krzemien J., Fabre C.C., Casal J. y Lawrence P.A. (2012). «The muscle pattern of the *Drosophila* abdomen depends on a subdivision of the anterior compartment of each segment». *Development* 139(1):75-83.
- Kuckwa J., Fritzen K., Buttgerit D., Rothenbusch-Fender S. y Renkawitz-Pohl R. (2016). «A new level of plasticity: *Drosophila* smooth-like testes muscles compensate failure of myoblast fusion». *Development* 143(2):329-38.
- Kuranaga E., Matsunuma T., Kanuka H., Takemoto K., Koto A., Kimura K., Miura M. (2011). «Apoptosis controls the speed of looping morphogenesis in *Drosophila* male terminalia». *Development* 138(8):1493-99.
- Lafever K.S., Wang X., Page-Mccaw P., Bhave G., y Page-Mccaw A. (2017). «Both *Drosophila* matrix metalloproteinases have released and membrane-tethered forms but have different substrates». *Scientific Reports* 7:44560.
- Lawrence P.A. y Casal J. (2013). «The mechanisms of planar cell polarity, growth and the Hippo pathway: some known unknowns». *Developmental Biology* 377(1):1-8.
- Lawrence P.A., Struhl G. y Casal J. (2007). «Planar cell polarity: One or two pathways?». *Nature Reviews Genetics* 8(7):555-63.
- Lee A. y Treisman T.E. (2004). «Excessive Myosin activity in mbs mutants causes photoreceptor movement out of the *Drosophila* eye disc epithelium». *Molecular Biology of the Cell* 15(7):3285-95.
- Lee G., Hall J.C. y Park J.H. (2002). «Doublesex gene expression in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*». *Journal of Neurogenetics* 16(4):229-48.
- Lee T. y Luo L. (1999). «Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis». *Neuron* 22(3):451-61.
- Letizia A. y Llimargas M. (2012). «Adherens junctions and cadherins in *Drosophila* development». *Sub-Cellular Biochemistry* 60:251-77.
- Levin M. (2006). «Is the early left-right axis like a plant, a kidney, or a neuron? The integration of physiological signals in embryonic asymmetry». *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews* 78(3):191-223.
- Levin M. y Palmer AR. (2007). «Left-right patterning from the inside out: Widespread evidence for intracellular control». *BioEssays* 29(3):271-87.

Lewis E.B. (1978). «A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*». *Nature* 276(5688):565-70.

Liang X., Peng L., Baek C.H. y Katzen F. (2013). «Single step BP/LR combined Gateway reactions». *BioTechniques* 55(5):265-68.

Macías A., Casanova J. y Morata G. (1990). «Expression and regulation of the *abd-A* gene of *Drosophila*». *Development* 110(4):1197-207.

Macías A., Romero N.M., Martín F., Suárez L., Rosa A.L. y Morata G. (2004). «PVF1/PVR signaling and apoptosis promotes the rotation and dorsal closure of the *Drosophila* male terminalia». *International Journal of Developmental Biology* 48(10):1087-94.

Madhavan M.M. y Madhavan K. (1980). «Morphogenesis of the epidermis of adult abdomen of *Drosophila*». *Journal of embryology and experimental morphology* 60:1-31.

Madhavan M.M. y Madhavan K. (1984). «Do larval epidermal cells possess the blueprint for adult pattern in *Drosophila*?». *Journal of embryology and experimental morphology* 82:18.

Madhavan M.M. y Schneiderman H.A. (1977). «Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal discs and histoblast nests during the larval development of *Drosophila melanogaster*». *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* 183(4):269-305.

Mahoney P.A., Weber U., Onofrechuk P., Biessmann H., Bryant P.J. y Goodman C.S. (1991). «The fat tumor suppressor gene in *Drosophila* encodes a novel member of the cadherin gene superfamily». *Cell* 67(5):853-68.

Mallo M., Wellik D.M. y Deschamps J. (2010). «Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan». *Developmental Biology* 344(1):7-15.

Marchetti M., Fanti L., Berloco M. y Pimpinelli S. (2003). «Differential expression of the *Drosophila* BX-C in polytene chromosomes in cells of larval fat bodies: a cytological approach to identifying in vivo targets of the homeotic Ubx, Abd-A and Abd-B proteins». *Development* 130(16):3683-89.

Marin I. y Baker B.S. (1998). «The evolutionary dynamics of sex determination». *Science* 281(5385):1990-94.

Martin A.C. y Goldstein B. (2014). «Apical constriction: themes and variations on a cellular mechanism driving morphogenesis». *Development* 141(10):1987-98.

Martin A.C., Kaschube M. y Wieschaus E.F. (2009). «Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction». *Nature* 457(7228):495-99.

Martinez-Arias A. y Lawrence P.A. (1985). «Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo». *Nature* 313(6004):639-42.

Mason F.M., Tworoger M. y Martin A.C. (2013). «Apical domain polarization localizes actin-myosin activity to drive ratchet-like apical constriction». *Nature Cell Biology* 15(8):926-36.

Matis M. y Axelrod J.D. (2013). «Regulation of PCP by the fat signaling pathway». *Genes and Development* 27(20):2207-20.

Matsuda R. (1976). «Morphology and evolution of the insect abdomen». *Pergamon Press, Oxford*.

- McAlpine J.F, Petersen B.V, Shewell G.E, Teskey H.J, Vockeroth J.R y Wood D.M. (1981). «Manual of Nearctic Diptera, Volume 1». *Research Branch Agriculture Canada*.
- McGinnis W., Levine M.S., Hafen E., Kuroiwa A. y Gehring W.J. (1984). «A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila Antennapedia* and *bithorax* complexes». *Nature* 308(5958):428-33.
- McGuire S.E., Le P.T., Osborn A.J., Matsumoto K. y Davis R.L. (2003). «Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*». *Science* 302(5651):1765-68.
- Miller A. (1941). «Position of adult testes in *Drosophila melanogaster* Meigen». *Genetics* 27(1): 35-41.
- Miller D.T. y Cagan R.L. (1998). «Local induction of patterning and programmed cell death in the developing *Drosophila* retina». *Development* 125(12):2327-35.
- Morgan D., Turnpenny L., Goodship J., Dai W., Majumder K., Matthews L., Gardner A., Schuster G., Vien L., Harrison W., Elder F.F., Penman-Splitt M., Overbeek P. y Strachan T. (1998). «*Inversin*, a novel gene in the vertebrate left-right axis pathway, is partially deleted in the *inv* mouse». *Nature Genetics* 20(2):149-56.
- Munjal A., Philippe J.M., Munro E. y Lecuit T. (2015). «A self-organized biomechanical network drives shape changes during tissue morphogenesis». *Nature* 524(7565):351-55.
- Murray A.W. y Hunt T. (1993). «The cell cycle: an introduction». *Oxford University Press*.
- Nakajima Y., Kuranaga E., Sugimura K., Miyawaki A. y Miura M. (2011). «Nonautonomous Apoptosis Is Triggered by Local Cell Cycle Progression during Epithelial Replacement in *Drosophila*». *Molecular and Cellular Biology* 31(12):2499-512.
- Nakajima Y.I. y Kuranaga E. (2017). «Caspase-dependent non-apoptotic processes in development». *Cell Death and Differentiation* 24(8):1422-30.
- Nanda S., DeFalco T.J., Loh S.H., Phochanukul N., Camara N., Van Doren M. y Russell S. (2009). «*Sox100B*, a *drosophila* group E *sox*-domain gene, is required for somatic testis differentiation». *Sexual Development* 3(1):26-37.
- de Navas L., Foronda D., Suzanne M. y Sánchez-Herrero E. (2006). «A simple and efficient method to identify replacements of P-lacZ by P-Gal4 lines allows obtaining Gal4 insertions in the *bithorax* complex of *Drosophila*». *Mechanisms of Development* 123(11):860-67.
- Negre B., Casillas S., Suzanne M., Sánchez-Herrero E., Akam M., Nefedov M., Barbadilla A., de Jong P. y Ruiz A. (2005). «Conservation of regulatory sequences and gene expression patterns in the disintegrating *Drosophila* Hox gene complex». *Genome Research* 15(5):692-700.
- Neville A. (1976). «Animal asymmetry». *London: Edward Arnold*.
- Nigg E.A. (1995). «Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle». *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 17(6):471-80.
- Ninov N., Chiarelli D.A. y Martin-Blanco E. (2007). «Extrinsic and intrinsic mechanisms directing epithelial cell sheet replacement during *Drosophila* metamorphosis». *Development* 134(2):367-79.

Ninov N., Manjón C. y Martín-Blanco E. (2009). «Dynamic control of cell cycle and growth coupling by ecdysone, egfr, and PI3K signaling in *Drosophila* histoblasts». *PLoS Biology* 7(4):e1000079.

Nöthiger R., Dubendorfer A. y Epper F. (1977). «Gynandromorphs reveal two separate primordia for male and female genitalia in *Drosophila melanogaster*». *Wilhelm Roux's archives of Developmental Biology* 181(4): 367-73

Ocaña O.H., Coskun H., Minguillón C., Murawala P., Tanaka E.M., Galcerán J., Muñoz-Chápuli R. y Nieto M.A. (2017). «A right-handed signalling pathway drives heart looping in vertebrates». *Nature* 549(7670):86-90.

Oda H. y Tsukita S. (1999). «Nonchordate classic cadherins have a structurally and functionally unique domain that is absent from chordate classic cadherins». *Developmental Biology* 216(1):406-22.

Ohtani K. y Nevins J.R. (1994). «Functional properties of a *Drosophila* homolog of the E2F1 gene». *Molecular and Cellular Biology* 14(3):1603-12.

Okumura T., Fujiwara H., Taniguchi K., Kuroda J., Nakazawa N., Nakamura M., Hatori R., Ishio A., Maeda R. y Matsuno K. (2010). «Left-right asymmetric morphogenesis of the anterior midgut depends on the activation of a non-muscle myosin II in *Drosophila*». *Developmental Biology* 344(2):693-706.

Okumura T., Sasamura T., Inatomi M., Hozumi S., Nakamura M., Hatori R., Taniguchi K., Nakazawa N., Suzuki E., Maeda R., Yamakawa T. y Matsuno K. (2015). «Class I myosins have overlapping and specialized functions in left-right asymmetric development in *Drosophila*». *Genetics* 199(4):1183-99.

Olivera I. (2017). «Analysis of the determination of testis development in *Drosophila melanogaster*». Tesis doctoral.

Pacquelet A. y Rørth P. (2005). «Regulatory mechanisms required for DE-cadherin function in cell migration and other types of adhesion». *Journal of Cell Biology* 170(5):803-12.

Page-McCaw A. (2008). «Remodeling the model organism: Matrix metalloproteinase functions in invertebrates». *Seminars in Cell and Developmental Biology* 19(1):14-23.

Papagiannouli F., Schardt L., Grajcarek J., Ha N. y Lohmann I. (2014). «The Hox Gene Abd-B Controls Stem Cell Niche Function in the *Drosophila* Testis». *Developmental Cell* 28(2):189-202.

Pasakarnis L., Frei E., Caussinus E., Affolter M. y Brunner D. (2016). «Amnioserosa cell constriction but not epidermal actin cable tension autonomously drives dorsal closure». *Nature Cell Biology* 18(11):1161-72.

Pérez-Garijo A., Martín F.A. y Morata G. (2004). «Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*». *Development* 131(22):5591-98.

Pérez-Garijo A., Shlevkov E. y Morata G. (2009). «The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the *Drosophila* wing disc». *Development* 136(7):1169-77.

Petzoldt A.G., Coutelis J.B., Géminard C., Spéder P., Suzanne M., Cerezo D. y Noselli S. (2012). «DE-Cadherin regulates unconventional Myosin ID and Myosin IC in *Drosophila* left-right asymmetry establishment». *Development* 139(10):1874-84.

- Pfeiffer B.D., Ngo T.T., Hibbard K.L., Murphy C., Jenett A., Truman J.W. y Rubin G.M. (2010). «Refinement of tools for targeted gene expression in *Drosophila*». *Genetics* 186(2):735-55.
- Pocha S.M. y Montell D.J. (2014). «Cellular and Molecular Mechanisms of Single and Collective Cell Migrations in *Drosophila*: Themes and Variations». *Annual Review of Genetics* 48(1):295-318.
- Poodry C.A. (1975). «Autonomous and Non-autonomous Cell Death in the Metamorphosis of the Epidermis of *Drosophila*». *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* 178:333-36.
- Potter C.J., Tasic B., Russler E.V., Liang L. y Luo L. (2010). «The Q system: A repressible binary system for transgene expression, lineage tracing, and mosaic analysis». *Cell* 141(3):536-48.
- Price D.C., Egizi A. y Fonseca D.M. (2015). «The ubiquity and ancestry of insect doublesex». *Scientific Reports* 5:13068.
- Ren Q., Awasaki T., Huang Y.F., Liu Z. y Lee T. (2016). «Cell Class-Lineage Analysis Reveals Sexually Dimorphic Lineage Compositions in the *Drosophila* Brain». *Current Biology* 26(19):2583-93.
- Revilla-Yates E., Varas L., Sierra J. y Rodríguez I. (2015). «Transcriptional analysis of the dachsous gene uncovers novel isoforms expressed during development in *Drosophila*». *FEBS Letters* 589(23):3595-603.
- Richards O.W. (1927). «Sexual selection and allied problems in the insects». *Biological Reviews* 2(4):298-364.
- Rideout E.J., Dornan A.J., Neville M.C., Eadie S. y Goodwin S.F. (2010). «Control of sexual differentiation and behavior by the doublesex gene in *Drosophila melanogaster*». *Nature Neuroscience* 13(4):458-66.
- Robinett C.C., Vaughan A.G., Knapp J.M. y Baker B.S. (2010). «Sex and the single cell. II. there is a time and place for sex». *PLoS Biology* 8(5):e1000365.
- Roseland C.R. y Schneiderman H.A. (1979). «Regulation and metamorphosis of the abdominal histoblasts of *Drosophila melanogaster*». *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* 186(3):235-65.
- Rothenbusch-Fender S., Fritzen K., Bischoff M.C., Buttgereit D., Oenel S.F. y Renkawitz-Pohl R. (2017). «Myotube migration to cover and shape the testis of *Drosophila* depends on Heartless, Cadherin/Catenin, and myosin II». *Biology Open* 6(12):1876-88.
- Rousset R., Bono-Lauriol S., Gettings M., Suzanne M., Spéder P. y Noselli S. (2010). «The *Drosophila* serine protease homologue Scarface regulates JNK signalling in a negative-feedback loop during epithelial morphogenesis». *Development* 137(13):2177-86.
- Royou A., Field C., Sisson J.C., Sullivan W. y Karess R. (2003). «Reassessing the Role and Dynamics of Nonmuscle Myosin II during Furrow Formation in Early *Drosophila* Embryos». *Molecular Biology of the Cell* 15(2):838-50.
- Ruiz M.F., Stefani R.N., Mascarenhas R.O., Perondini A.L., Selivon D. y Sánchez L. (2005). «The gene doublesex of the fruit fly *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae)». *Genetics* 171(2):849-54.
- Ryoo H.D., Gorenc T. y Steller H. (2004). «Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the wingless signaling pathways». *Developmental Cell* 7(4):491-501.



Saccone G., Pane A. y Polito L.C. (2002). «Sex determination in flies, fruitflies and butterflies». *Genetica* 116(1):15-23.

Saccone G., Salvemini M., Pane A. y Polito L.C. (2008). «Masculinization of XX *Drosophila* transgenic flies expressing the *Ceratitis capitata* doublesexM isoform». *International Journal of Developmental Biology* 52(8):1051-57.

Salvemini M., Mauro U., Lombardo F., Milano A., Zazzaro V., Arcà B., Polito L.C. y Saccone G. (2011). «Genomic organization and splicing evolution of the doublesex gene, a *Drosophila* regulator of sexual differentiation, in the dengue and yellow fever mosquito *Aedes aegypti*». *BMC Evolutionary Biology* 11(1):41.

Salz H.K. (2011). «Sex determination in insects: a binary decision based on alternative splicing». *Current Opinion in Genetics & Development* 21(4):395-400.

Salz H.K. y Erickson J.W. (2010). «Sex determination in *Drosophila*: The view from the top». *Fly* 4(1):60-70.

Sánchez L. (2008). «Sex-determining mechanisms in insects». *The International Journal of Developmental Biology* 52(7):837-56.

Sánchez L. y Guerrero I. (2001). «The development of the *Drosophila* genital disc». *BioEssays* 23(8):698-707.

Sánchez-Herrero E., Vernós I., Marco R. y Morata G. (1985). «Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex». *Nature* 313(5998):108-13.

Sato K., Hiraiwa T., Maekawa E., Isomura A., Shibata T. y Kuranaga E. (2015). «Left-right asymmetric cell intercalation drives directional collective cell movement in epithelial morphogenesis». *Nature Communications* 6:10074.

Scali C., Catteruccia F., Li Q. y Crisanti A. (2005). «Identification of sex-specific transcripts of the *Anopheles gambiae* doublesex gene». *Journal of Experimental Biology* 208(19):3701-9.

Schardt L., Ander J.J., Lohmann I. y Papagiannouli F. (2015). «Stage-specific control of niche positioning and integrity in the *Drosophila* testis». *Mechanisms of Development* 138(Pt 3):336-48.

Schuh M., Lehner C.F. y Heidmann S. (2007). «Incorporation of *Drosophila* CID/CENP-A and CENP-C into Centromeres during Early Embryonic Anaphase». *Current Biology* 17(3):237-43.

Schütt C. y Nöthiger R. (2000). «Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects». *Development* 127(4):667-77.

Schweickert A., Ott T., Kurz S., Tingler M., Maerker M., Fuhl F. y Blum M. (2018). «Vertebrate Left-Right Asymmetry: What Can Nodal Cascade Gene Expression Patterns Tell Us?». *Journal of Cardiovascular Development and Disease* 5(1).

Scott M.P. y Weiner A.J. (1984). «Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81(13):4115-19.

Shaye D.D., Casanova J. y Llimargas M. (2008). «Modulation of intracellular trafficking regulates cell intercalation in the *Drosophila* trachea». *Nature Cell Biology* 10(8):964-70.

- Shukla J.N. y Nagaraju J. (2010). «Doublesex: A conserved downstream gene controlled by diverse upstream regulators». *Journal of Genetics* 89(3):341-56.
- Siegrist S.E., Haque N.S., Chen C.H., Hay B.A. y Hariharan I.K. (2010). «Inactivation of Both Foxo and reaper Promotes Long-Term Adult Neurogenesis in *Drosophila*». *Current Biology* 20(7):643-48.
- Singh J. y Mlodzik M. (2012). «Planar cell polarity signaling: Coordination of cellular orientation across tissues». *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 1(4):479-99.
- Singh N.P. y Mishra R.K. (2014). «Role of abd-A and Abd-B in Development of Abdominal Epithelia Breaks Posterior Prevalence Rule». *PLoS Genetics* 10(10):e1004717.
- Song H., Hu J., Chen W., Elliott G., Andre P., Gao B. y Yang Y. (2010). «Planar cell polarity breaks bilateral symmetry by controlling ciliary positioning». *Nature* 466(7304):378-82.
- Spéder P., Adám G. y Noselli S. (2006). «Type ID unconventional myosin controls left-right asymmetry in *Drosophila*». *Nature* 440(7085):803-7.
- Spéder P. y Noselli S. (2007). «Left-right asymmetry: class I myosins show the direction». *Current Opinion in Cell Biology* 19(1):82-87.
- Stern B., Ried G., Clegg N.J., Grigliatti T.A. y Lehner C.F. (1993). «Genetic analysis of the *Drosophila* *cdc2* homolog». *Development* 117(1):219-32.
- Stern C. y Hadorn E. (1939). «The relation between the colour of the testes and vasa deferentia in *Drosophila*». *Genetics* 24:162-79.
- Struhl G. y Basler K. (1993). «Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*». *Cell* 72(4):527-40.
- Struhl G. y White R.A. (1985). «Regulation of the Ultrabithorax gene of *Drosophila* by other bithorax complex genes». *Cell* 43(2 Pt 1):507-19.
- Susic-Jung L., Hornbruch-Freitag C., Kuckwa J., Rexer K.H., Lammel U. y Renkawitz-Pohl R. (2012). «Multinucleated smooth muscles and mononucleated as well as multinucleated striated muscles develop during establishment of the male reproductive organs of *Drosophila melanogaster*». *Developmental Biology* 370(1):86-97.
- Suzanne M., Pedtzoldt A.G., Spéder P., Coutelis J.B., Steller H. y Noselli S. (2010). «Coupling of apoptosis and L/R patterning controls stepwise organ looping». *Current Biology* 20(19):1773-78.
- Szabad J. y Nöthiger R. (1992). «Gynandromorphs of *Drosophila* suggest one common primordium for the somatic cells of the female and male gonads in the region of abdominal segments 4 and 5». *Development* 115(2):527-33.
- Talbot W.S., Swyryd E.A. y Hogness D.S. (1993). «*Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms». *Cell* 73(7):1323-37.
- Tanaka-Matakatsu M., Miller J., Borger D., Tang W.J. y Du W. (2014). «Daughterless homodimer synergizes with Eyeless to induce Atonal expression and retinal neuron differentiation». *Developmental Biology* 392(2):256-65.
- Tang H.L., Tang H.M., Fung M.C. y Hardwick J.M. (2015). «In vivo CaspaseTracker biosensor system for detecting anastasis and non-apoptotic caspase activity». *Scientific reports* 5:9015.

Taniguchi K., Maeda R., Ando T., Okumura T., Nakawaza N., Hatori R., Nakamura M., Hozumi S., Fujiwara H. y Matsuno K. (2011). «Chirality in planar cell shape contributes to left-right asymmetric epithelial morphogenesis». *Science* 333(6040):339-41.

Teng X., Qin L., Le Borgne R. y Toyama Y. (2017). «Remodeling of adhesion and modulation of mechanical tensile forces during apoptosis in *Drosophila* epithelium». *Development* 144(1):95-105.

Tingler M., Kurz S., Maerker M., Ott T., Fuhl F., Schweickert A., LeBlanc-Straceski J.M., Noselli S. y Blum M. (2018). «A Conserved Role of the Unconventional Myosin 1d in Laterality Determination». *Current Biology* 28(5):810-16.

Tiong S., Bone L.M. y Whittle J.R. (1985). «Recessive lethal mutations within the bithorax-complex in *Drosophila*». *Molecular & General Genetics* 200(2):335-42.

Tschopp P. y Duboule D. (2011). «A genetic approach to the transcriptional regulation of Hox gene clusters». *Annual review of genetics* 45:145-66.

Tsruya R., Schlesinger A., Reich A., Gabay L., Sapir A. y Shillo B.Z. (2002). «Intracellular trafficking by Star regulates cleavage of the *Drosophila* EGF receptor ligand Spitz». *Genes and Development* 16(2):222-34.

Veraksa A., Del Campo M. y McGinnis W. (2000). «Developmental patterning genes and their conserved functions: From model organisms to humans». *Molecular Genetics and Metabolism* 69(2):85-100.

Verhulst E.C. y Van de zande L. (2015). «Double nexus-Doublesex is the connecting element in sex determination». *Briefings in Functional Genomics* 14(6):396-406.

Verma P. y Cohen S.M. (2015). «miR-965 controls cell proliferation and migration during tissue morphogenesis in the *Drosophila* abdomen». *eLife* 4.

Wang H., Singh S.R., Zheng Z., Oh S.W., Chen X., Edwards K. y Hou S.X. (2006). «Rap-GEF signaling controls stem cell anchoring to their niche through regulating DE-cadherin-mediated cell adhesion in the *Drosophila* testis». *Developmental Cell* 10(1):117-26.

Wang Q., Uhlirova M. y Bohmann D. (2010). «Spatial Restriction of FGF Signaling by a Matrix Metalloprotease Controls Branching Morphogenesis». *Developmental Cell* 18(1):157-64.

Wang W., Kidd B.J., Carroll S.B. y Yoder JH. (2011). «Sexually dimorphic regulation of the Wingless morphogen controls sex-specific segment number in *Drosophila*». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(27):11139-44.

Wang W., Tindell N., Yan S. y Yoder JH. (2013). «Homeotic functions of the Teashirt transcription factor during adult *Drosophila* development». *Biology Open* 2(1):18-29.

Wang W. y Yoder J.H. (2012). «Hox-mediated regulation of doublesex sculpts sex-specific abdomen morphology in *Drosophila*». *Developmental Dynamics* 241(6):1076-90.

Wei S., Xie Z., Filenova E. y Brew K. (2003). «*Drosophila* TIMP Is a Potent Inhibitor of MMPs and TACE: Similarities in Structure and Function to TIMP-3». *Biochemistry* 42(42):12200-207.

Whitworth C., Jimenez E. y Van Doren M. (2012). «Development of sexual dimorphism in the *Drosophila* testis». *Spermatogenesis* 2(3):129-36.

- Williams T.M. y Carroll S.B. (2009). «Genetic and molecular insights into the development and evolution of sexual dimorphism». *Nature Reviews Genetics* 10(11):797-804.
- Wolff T. y Rubin G.M. (1998). «Strabismus, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in *Drosophila*». *Development* 125(6):1149-59.
- Woolf C.M. (1966). «Maternal effect influencing male genital disc development in *Drosophila melanogaster*». *Genetics* 53(2):295-302.
- Woolf C.M. (1968). «Male genital disc defect in *Drosophila melanogaster*». *Genetics* 60(1):111-21.
- Xu T. y Rubin G.M. (1993). «Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues». *Development* 117(4):1223-37.
- Yagi R., Mayer F. y Basler K. (2010). «Refined LexA transactivators and their use in combination with the *Drosophila* Gal4 system». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(37):16166-71.
- Yoder J.H. (2012). «Abdominal segment reduction development and evolution of a deeply fixed trait». *Fly* 6(4):240-45.
- Yoder J.H. y Carroll S.B. (2006). «The evolution of abdominal reduction and the recent origin of distinct Abdominal-B transcript classes in Diptera». *Evolution and Development* 8(3):241-51.
- Yu S.Y., Yoo S.J., Yang L., Zapata C., Srinivasan A., Hay B.A. y Baker N.E. (2002). «A pathway of signals regulating effector and initiator caspases in the developing *Drosophila* eye». *Development* 129(13):3269-78.
- Zielke N., Korzelius J., Van Straaten M., Bender K., Schuhknecht G.F., Dutta D., Xiang J. y Edgar B.A. (2014). «Fly-FUCCI: A Versatile Tool for Studying Cell Proliferation in Complex Tissues». *Cell Reports* 7(2):588-98.

# **Agradecimientos**

Decía el astrónomo Edwin Powell Hubble que "equipado con sus cinco sentidos, el Hombre explora el Universo que lo rodea y a sus aventuras las llama Ciencia". Durante mi aventura, he pasado buenísimos momentos en compañía de maravillosas personas (y de maravillosos confocales, pero no me caben tantos agradecimientos), por lo que me gustaría dejar constancia en unas líneas de lo agradecida que estoy por la compañía, el apoyo y los ánimos recibidos por cada uno de vosotros.

Gracias al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la beca FPU gracias a la cual pude disfrutar de cuatro años de tesis que, probablemente, sin la beca no hubieran sido posibles. Además, gracias a esta beca pude llevar a cabo dos estancias en el extranjero, muy enriquecedoras tanto a nivel científico como emocional. En este párrafo de financiación, gracias también a mí misma, por mi capacidad de ahorro para el tiempo de bolsa del CSIC.

Gracias a mi padre, por el gusanillo de los animales y la naturaleza. Ojalá pudiera agradecértelo hoy. A mi madre porque ha forjado mi forma de ser, en los estudios y emocionalmente. A toda mi familia por todo el apoyo y comprensión (y los millones de tápers. Y si, existe, lo he mirado en la RAE). A Patri, la persona más altruista que conozco.

A la familia que se elige, gracias por soportarme en los momentos de bajón y ser una vía de escape. Gracias a los salseros por derivar "la línea se marca flojito" en "ya empujo yo el aire y si eso tú notas las fluctuaciones en la atmósfera y las interpretas", por los pasos libres que a pesar de teóricamente hacer lo mismo a uno le quedan estilosos y a los demás nos quedan de "babber-monguer", clases de línea con dos chicas a la vez sin previo paso por el baile con una y a los finales inmarcables de espagar con triple tirabuzón. A los Sanblaseros por un piso franco que incluía cachimbas y serpientes, pero carecía de comida, por el YES y sus fiestas temáticas vampíricas, noches de Perseidas confundiendo la luna con el sol, el "viñatorio" y sus faunos, temazos como "panceta, creo que me van a endoscopiar", y juegos que educan a la par que divierten como el de los caramelos de comida de perro (esto en concreto a Isic, el único interesado en jugar). A Alba, la filóloga, gracias por todas las correcciones (espero que no hayas gastado muchas llamitas conmigo) y por descubrirme la palabra táper. A Pascual, por los días de croissants (o palomitas, o chino...) o excursiones temáticas a Decathlon solucionando el mundo. Por las subidas a la Marañososa con bici lastrados con pesas y botellas y los cálculos de quien lleva más peso proporcionalmente (picado) y la reticencia a las bajadas (somos unos cagones), y por casas Airbnb con cero habitaciones, que se convierten en tres. A Mar por las noches terapéuticas de "huevos con sidra sin sidra", porque vender cafeteras que no tengo que vender me encanta, por todas las fiestas improvisadas, tu tuerking de estilo impecable y elegante, todos los "¿y?" que deberían ser el regalo oficial del Cortingles por San Valentin, y todo el apoyo en los momentos (mini-)chungos. A Crispula, poseedora de todos los vestidos y complementos inventados por el ser humano (o por lo menos en China). Por estar siempre y desde hace mucho, en las situaciones más disparatadas que se me puedan ocurrir, por los móviles que confundes con plátanos y las clases de dibujo plataneros/Simpsoniles. Por tu inocencia y humor absurdo. A Ana porque pensamos taaan igual. Por los días de bibliotecas, barbacoas, patines, corriendo, montañeando, caboverdeando, concierteando, festivaleando, vacacioneando (en la playa o a menos 20), esperando al bus de Torrejón dando vueltas en el tranvía de Parla (un honor compartir esta pesadilla tantas veces contigo)... y por tanto apoyo (mami Montse cuenta en el grupo de los "millones de tápers"). A Miguel y Mario por los aportes estadísticos y de evolución, las buenas conversaciones con los pelos de la nariz congelados, disfrutando del olor a bicho muerto marino, aderezado con cantidades ingentes de colonia, compitiendo a "¡largas!" o atravesando Doñana (interminable) en bici viéndote el culo todo el rato delante (un minuto de silencio por Charlin). A Alberto, Bru y Salazar porque a pesar de la distancia y el tiempo, seguís igual de cerca. Por horas en la ribera solo escuchando el Ebro, aprendizajes de Lord Benedi, tardes con Seth, condimentos de pizzas que sientan tan mal que impiden competir, mandamientos "Currukukiles", "bughos shojshos" que "shjosjihsean" y los "yo nunca-nuncas" en inglespañoalemán. Gracias por poner una miguita en esta etapa de mi vida, visitándome en estancias, rescatándome ya en Madrid, o diseñando la portada por skype con la mesita del café, y sobre todo libre de órganos con mensaje subliminal oculto no deseado.

Ya en ciencia, quiero agradecer primero a toda la gente que conocí en las estancias, sobre todo a Manish, Jen y Pau por los intercambios de tapers por fregado de platos y todas las excursiones. Gracias a Stéphan por su visión práctica y dirigida de los experimentos y porque fue un rallo de luz con el que me planteé un postdoc. A Marcus le agradezco su perseverancia y pasión por la ciencia. Gracias por ser un líder y no un jefe, jamás nadie ha amado tanto pasar los fines de semana en un confocal. Por sus buenas intenciones ofreciéndome noches de confocal, o noches de fregar charcos para protegerlo (al confocal, por supuesto).

Ya en Madrid, agradezco a todos los profesores de la Complutense la pasión por la biología que consiguieron transmitirme. Gracias a Carmen y Charo por enseñarme en mis primeros pasos científicos, y ser tan grandes personas. A todos los Biólogos que resistimos unidos. A Juanjo, por seguir esforzándote en mantenernos juntos (a pesar de que eres el culpable de que no haya más "last baby free parties"). A Casti, por tu paso de baile sin menisco, noches en cualquier ciudad o en cualquier antro y escapadas con o sin actividades a Vega del Codorno (pero siempre con buena comida), a montar el caballito del Pilar o a celebrar que ya sois soldaditos. Gracias por advertirnos que ni entre todas nos tomábamos un chupito del resolí. A Lore, la dulzura en persona, por escapadas a Segovia en las que te ibas durmiendo apoyada en altavoces (y yo tosiendo a gente en la cara, menudas dos fiesteras), clases magistrales hispano-francesas del repertorio de Carmen de Mairena y por competiciones de lanzamiento de cencerro y tiro de paca de heno. Sobre todo por irnos a vivir juntos y quedarnos con muebles (¿Seguro que no queréis alguno más? Tengo una barra de bar muy bonita). A Clara Putova, hermanastra Rusa de Irina (conocida por todos), por todo el recorrido en lo más alto y en lo más bajo. Gracias por aguantarnos en Niza el ritmo de locas con nocturnidad y pateo mañanero, y por no llevar la mochila muy cargada. Nos quedan muchos viajes, festivales, cenas, nocheviejas y quién sabe si algún crucero. A Adri, el camarada Ruso, especialista en ser expulsado de taxis por las noches y el gran odiado en las nocheviejas por su altura y otros actos relacionados. Gracias por animarme a seguir y acompañarme en mi vida científica y social desde hace tanto tiempo, por las catacumbas, Tornados con Tom Collins, helados psicodélicos pre-cruceros, La puerta Negra (n veces), minutos de mimitos (bajo cronómetro y que me costaron el 50% de cada asignatura pues tus apuntes eran indescifrables hasta para ti), tus consejos de India y por introducirme en el "gueto sanblasero". A los profes de Genética de la UAM, especialmente a Pepe, cuya trayectoria conocía previamente y a quién ya admiraba como científico antes de conocerle, por la oportunidad de ayudar en las prácticas de Genética con *Drosophila*.

Gracias a Pitu, que ya cuenta como medio biólogo. Gracias por todo, por estar y por no estar. Por desaparecer (o irte de vacaciones, menudo esfuerzo :D) cuando lo necesito. Por alegrarme el día con un cocido (si no explota, mejor) o unas oreos. Por los dos millones de tapers. Por apoyarme y a la vez decirme las cosas claras. Por entenderme y por hacerme entender a mí, y obligarme a razonar. Por ver lo que es mejor para ti, pero también lo que es mejor para mí, y hacer que yo también lo vea. Gracias por comprender que mi poco tiempo libre necesitara repartirlo con tanta gente, y por toda tu paciencia. Perdón por mi ausencia. Gracias sobre todo, por intentar comprender, porque sé que desde fuera parecemos "loquitos". Por Mr. Noodles, tus pitufadas (Alhambrosas), plátanos en cunetas, tiendas de campaña en glaciales y sin guantes, concursos de voces en esperas de aeropuertos, observación de bailes caboverdianos y sorbos desmesurados de Groge, trekkings en los que nos adelantan cojos, parchises de alta montaña, tu estilo en tabla en un remonte y un sinfín de ocasiones esperpénticas. Por todas las aventuras que ya llevamos y por empujarme a esta nueva aventura que nos espera; seguiremos descubriendo la vida *deaquíparallá*.

Acotamos el círculo al CBM. Gracias a Eva y Mar de micro-inyección, por ser siempre tan encantadoras y risueñas. A todo el equipo del SMOC, porque merecen un diez por su absoluta capacidad resolutoria y eficiencia. Al Multifotón, porque he pasado más tiempo con él que con mis gatos (sumados), y al final le he cogido cariño y le voy a echar hasta de menos. A Miri, por los años locos de Uni, y los aún más locos viajes de Renfe. Por los paseos con Tuk (aspiradora oficial de residuos humanos o de dudosa procedencia). Por tu capacidad de fabricar un despertador alegre y estomagante a partes iguales. ¿Ya sabes dónde fue a parar el moquillo? Ahora lo podrás buscar en una ranita. A Sergio por las charlas siempre constructivas comparando resultados, teorías y divagaciones (llegarás lejos). A Benjas por tu *jacarandismo* en todo momento y por no ser solo un ente en el

CBM y proponer actividades fuera, gracias por la cumbia y por enseñarme a hablar otro idioma. A todos los que me dieron consejos, aportaron ideas o resolvieron dudas, gracias. Con vosotros he comprendido el concepto "hacer escuela" (o *Spanish Mafia*, como oí en un congreso).

Gracias a Natalia, porque admiro tu fuerza y tenacidad (dentro y fuera del laboratorio. Ya me gustaría a mí correr así), me alegro de todo reconocimiento que se te haga. A Manolo, Señor del Confocal y Lord de los Manolitos, por tus diapositivas indigitalizables y las horas tardías de supervivientes en el labo. Por cuando se te quedan los discos flácidos y te quitas antes del confocal. Gracias por tu humor ácido. A Noelia, por la tranquilidad y paz que transmites. A Izarne, terremoto de energía, gracias por salvarme cada mañana en el confocal ¡Sigue pisando fuerte que prometes! A Rosa, porque tus hortalizas son grandes pero tu corazón, más. Gracias por tus manos con los montajes. A Angélica, porque sin ti, el laboratorio se cae, y el 424 también. Por tener todo en la cabeza y bajo control, por lo valiente que eres, y porque en cualquier circunstancia contagias alegría. Por la saga "señora que busca los baños del camping" que por fin llegó a un eco-feliz desenlace. A Raquel, por todo, dentro y fuera del labo. Gracias por intentar mejorar la situación de todos en este mundillo. Gracias por tus consejos y por conseguir contagiarme tu sonrisa en la recta final (no solo mía) ¡Seguimos en contacto! A Ginés, por tu incalculable sabiduría, por todos los seminarios aportando ideas y separando el oro de la paja. Por tu entusiasmo científico, por la pasión que pones a cada resultado que te llega, y el brillo de tus ojos cuando aparece una nueva pregunta a la que dar respuesta. Gracias fuera del mundo drosophilero por tus consejos de montaña (intentaré aplicar para la aclimatación del Everest la técnica "periodos en terraza con botas de montaña"), tu prometido *powerpoint* de Nepal y tus correcciones sobre el "color rosa salmón de abril según de qué río". A Antonio, currante como el que más, por todas las charlas a última hora sobre ciencia (yo pensé que tu serías de los que aguantarían) y porque compartimos el modo en que entendemos el mundo. A Luna, un coquito como pocos, con una sonrisa perpetua. Gracias por los consejos en ciencia pero sobre todo por los consejos vitales. Gracias por animarme a continuar y por decirme que seré feliz en lo que elija. Gracias por todas las carreras, momentos en bici y viajes. Espero que corramos mil carreras más (sin tus rodillas, sin mis zapatillas pútridas, y con mucho gel de azúcar).

Gracias a *Drosophila* y al vocabulario que usamos diariamente. No me imagino en otro contexto maravillada por la preciosidad de la forma de unos testículos ni embobada siguiendo el movimiento de un órgano genital. Voy a echar de menos decir con tanta naturalidad "se me ha escapado una virgen", "ya he petado otro testículo", "A ver, enséñame tus genitales", "¿me miras mi genitalia?", o lo que se me antoja aún más complicado de encajar en el mundo exterior: "¿me la montas?". Gracias a Jaime y Javi por soportarme, por vuestra ayuda experimental, por saber en qué lado está el corazón, por un refinado gusto musical de temática "Bricolaje" o por intercalar estratégicamente silencios. Gracias a Jesusito, por enseñarme todas las disecciones, como hacer kebabs de *ependorfs*, el camping de Reikjavic y sus setos con frutos comestibles, y por descubrirnos "confo-confo-confocal" "*Abdominal-B*, exprésate" y (por evitar palabras malsonantes) "ricas ricas patatitas fritas". A Inés, por rascados gatunos y clases magistrales de plantas y aves. Gracias por "enseñarme tus testículos y genitales". A Paloma, por tu enorme sensibilidad, por todos los buenos momentos, por tu amor por los "bichéjulos" peludos y su vocabulario (por lo menos ya sabemos que dice el zorro), y por canciones odiosas que se aman a golpe de repetición y otras que se aman la primera vez que las escuchas. A Celia "pititos", por tu humor y desparpajo, tu técnica de ninja con capa de invisibilidad solo armada con una capucha, tu capacidad de ignorar y escuchar al mismo tiempo, por tu valoración musical de raps lentos, y tu dulce y delicado vocabulario (de linda flor). A David, el tercer mosquetero (o gambitero) en la lucha por el "sigue en esto". Gracias por tu humor "Jesusiano" (que resultó ser "Forondiano"), tu impresionante capacidad de trabajo manteniendo siempre una sonrisa y por todas tus opiniones. Eres de "los loquitos" que encajan en ciencia, pero sea donde sea, seguirás brillando (y durmiendo en lugares y momentos inverosímiles). Espérame en África, que en algún momento hago Toc Toc. A Delia, por lo fuerte y valiente que eres, y por ser fiel a tus ideales. Por todos los momentos dentro y fuera del labo, incontables. Todas las confianzas, y todo lo que compartimos y nos entendemos mutuamente. Porque has sido el espejo en el que me quería mirar, y porque todos los "errores" que tú cometiste (y que más tarde me advertiste que yo no cometiera), fui cometiendo. Es un camino que teníamos que recorrer y creo que ambas sabemos que era necesario el trayecto. Gracias porque seguirás



estando cerca y seguro que cometeremos muchos más errores juntas y jugaremos muchos ñus (compinchados todos contra Juanlu). A Rafa (llamado así por los que le conocen, y por los que no...también), compañero de viaje con todas las paradas incluidas (con mimitos y a "ritmo de procesión"). Gracias por ser tan diferente, porque toda la paciencia, autocontrol y capacidad de hacer las cosas en frío que yo no tengo, las tienes tú. Gracias por soportarme y cuidarme, a mí y a todos. Por todas las ayudas a nivel experimental o discutiendo resultados. Gracias por todos los momentos fuera del labo: bailes, monólogos, teatros, cenas a horas imposibles, viajes a sitios caros a solo ver un chorro de agua, sitios con salmones "dormidos" o sitios donde solo se puede beber cerveza. Porque sigas en ciencia, o no, espero que nunca digas "me rindo". Gracias a ti y a todos lo del labo ayudándome a diferenciar caras cuando tengo que ir a pedir moscas y con los exámenes anti-prosopagnesia (lo siento Ignoto).

Párrafo de honor para Ernesto. Perdón por mis malas caras, mis reacciones desproporcionadas y por mi nivel basal de disgusto con el sistema, la administración, o los derechos y deberes de cada uno. Sé que soy difícil de llevar y que, sobre todo en la recta final, he tenido la mecha muy corta. Por todo ello, gracias por cómo me has soportado. Gracias porque cada vez que he entrado en tu despacho subiéndome por las paredes has sido capaz de calmarme y has conseguido darme una visión más pacífica de todo, que me ha servido como bálsamo al menos para aguantar hasta la siguiente indignación. Gracias por tu enorme corazón, por lo que te preocupas por todos nosotros y nuestro futuro, y porque realmente has conseguido que me sienta valorada como científica. Gracias por animarme a seguir (a pesar de que hemos hablado muchas veces que incluso tú eres consciente de cómo están las cosas). Gracias por tus apreciaciones de gama cromática, por tu capacidad de poner apellidos a los colores, y sobre todo apellidos que me dan repelús. Gracias por todas tus aportaciones musicales, de mejor calidad que todo lo que se ha oído en el laboratorio. Gracias por todos los consejos de viajes para evitar en todo momento la cerveza, conversaciones de cualquier tema y tu especial humor (que ya denota tu inteligencia). Gracias por hacerme llegar frases como "trust no one, trust nothing. Total paranoia" porque definen a la perfección el día a día en el labo. Gracias por acordarte de todos los autores, años, pies de figura y tipo de letra de todos los papers publicados, que, al margen del humor, denota tu sorprendente capacidad. Gracias por ser un gran investigador, con principios que no he visto en otros, con la necesidad de demostrarte todo a ti mismo, y de asegurarte que cada experimento está limpio y bien hecho. Gracias por haberme enseñado ese tipo de ciencia y por transmitirme que lo importante es la calidad, el aprender y el disfrutar sabiendo más. Gracias en general porque todo esto, a nivel docente, ha sido magnífico, y he disfrutado todas y cada una de tus charlas sobre antiguos experimentos e investigadores (aunque ya no me acuerde de ningún nombre, ya sabes), y cada una de tus preguntas y retos para hacernos pensar un poco más allá. Gracias, porque has armado mi cabecita y la manera en que pienso hoy, te lo debo a ti. Parafraseando a Einstein (con toda la humildad posible, porque esto va de ti, y no de mi) "si he podido ver lejos, es porque me he subido sobre los hombros de gigantes". Gracias por ser ese gigante.

Gracias a todos los que me habéis ayudado a comprender que solo debo buscar mi felicidad. Gracias a todos, por lo bueno y lo malo, porque me ha hecho madurar, darme cuenta de mis propios límites, y conocerme mejor. He visto mis defectos, así que gracias por soportarlos y prometo que intento mejorar. Gracias porque si volviera al pasado, haría la tesis de nuevo (¡y qué tesis!, seguro que esto lo hemos pensado todos, *a posteriori*, ya sabiendo cómo enfocar las cosas y tras la madurez adquirida durante los años de rodaje). Gracias porque las cosas buenas, superan a las malas, y porque las malas también son importantes para avanzar y para tomar decisiones.

Gracias a todos los que en general han alzado o alzan la voz ante lo que consideran que es una injusticia, porque gracias a eso van mejorando (o empeorando menos) las condiciones de todos.

# ¡Gracias!