

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

**Análisis de la formación de los músculos indirectos de vuelo a
partir del cuarto estadio larvario del mosquito *Aedes aegypti***

TESIS

Que presenta

M. en C. ANTONIO CELESTINO MONTES

Para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

En la especialidad de
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Director de tesis: Dr. Fidel de la cruz Hernández Hernández

Ciudad de México.

Septiembre, 2018

El presente trabajo se realizó en el laboratorio No. 12 de Entomología Molecular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Fidel de la Cruz Hernández-Hernández.

Este proyecto recibió financiamiento por parte del CONACyT **No. 258595-B-1912**.

Agradezco al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN por el apoyo para la realización de mis estudios de doctorado, así también agradezco al CONACyT por la beca otorgada durante la realización del doctorado. Becario No. de registro 220626.

ASESORES

Dr. Fidel de la Cruz Hernández-Hernández

Profesor Titular 3C del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular,
CINVESTAV-IPN.

Dra. Bibiana Chávez Munguía

Profesora Titular 3A del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular,
CINVESTAV-IPN.

Dra. Febe Elena Cázares Raga

Profesora Visitante del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular,
CINVESTAV-IPN.

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Profesor Titular 3C del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular,
CINVESTAV-IPN

Dr. Leopoldo Flores Romo

Profesor Titular 3D del Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN.

Dr. Salvador Hernández Martínez

Profesor Titular en Ciencias Médicas Nivel D del Centro de Investigación Sobre
Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública.

Dr. Mario Henry Rodríguez López

Profesor Titular en Ciencias Médicas Nivel F Emérito del Centro de Investigación
Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública.

Agradecimientos especiales

Dr. Salvador Hernández Martínez. Agradezco su invaluable apoyo, su tiempo para la estructuración del proyecto, así también por la enseñanza en el cultivo y disección de las larvas. Muy agradecido con su familia por recibirme en su hogar.

Dra. Bibiana Chávez Munguía. Le agradezco por su apoyo en el procesamiento y análisis de los IFMs por MET y MEB, por sus sugerencias durante el desarrollo de este proyecto.

Biól. Exptl. Leticia Cortés Martínez. Auxiliar del Laboratorio 12 de Entomología Molecular del DIPM por su apoyo en el procesamiento de las muestras para el análisis proteómico de los IFMs, agradezco por su tiempo dedicado para que este proyecto se culminara, muchas gracias.

Biol. Anel Edith Lagunes Guillen. Auxiliar del DIPM por su gran apoyo en el procesamiento de los IFMs para su análisis por microscopía electrónica de transmisión y barrido.

QBP. Carlos Vásquez Calzada. Auxiliar del DIPM, muchas gracias por su apoyo en la observación de los IFMs por microscopía confocal. Mis sinceros agradecimientos.

Dra. Alicia Chagoya López. Auxiliar de investigación del área de Proteómica del CINVESTAV Unidad Irapuato. Gracias por su apoyo en el análisis del perfil proteico de los IFMs.

M. en C. Emmanuel Ríos Castro. De la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica (UGPM), LaNSE, CINVESTAV-IPN. Gracias por su apoyo en el análisis proteómico de los IFMs de *Aedes aegypti*.

Dra. Lorena González López. Gracias por tu gran apoyo y sugerencias durante el desarrollo de este proyecto.

Dra. Guillermina García Rivera. Auxiliar del DIPM por su apoyo en las sesiones de microscopía confocal.

M. en C. Romel Rosales. Gracias por las sesiones de microscopía confocal.

M en C. José Angel Rubio Miranda. Gracias por tu apoyo en el cultivo de los mosquitos *Aedes aegypti*.

Dr. Abel Trujillo Ocampo. Gracias por compartir tus conocimientos y comenzar juntos el cultivo de mosquitos en el laboratorio.

Juan Manuel Ceballos Ramírez. Técnico del Laboratorio 12 de Entomología Molecular del DIPM, gracias por su apoyo técnico en el laboratorio y que todo estuviera a la mano para trabajar.

Juan García Jiménez. Técnico del Laboratorio 12 de Entomología Molecular del DIPM, por su amistad, por su gran apoyo para que todo funcione dentro del laboratorio, así como dentro del departamento.

Martha Aguilar Romero y María Marcela Guzmán Rodríguez. Secretaria del DIPM y secretaria de la coordinación académica del DIPM, respectivamente, gracias por su apoyo en los trámites administrativos durante mi estancia.

Agradecimientos a mi comité de asesores

Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández

Por aceptarme como alumno en su laboratorio y por apoyarme durante la estructuración y el desarrollo del proyecto. Infinitas gracias doc.

Dra. Bibiana Chávez Munguía

Por su apoyo en la revisión y sugerencias en el proyecto de tesis, así como en área de microscopia electrónica.

Dra. Febe Elena Cazares Raga

Por su tiempo y apoyo en la revisión y estructuración del proyecto de tesis.

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Por sus observaciones y aportes en la estructuración del proyecto de tesis.

Dr. Leopoldo Flores Romo

Por su tiempo y apoyo en la revisión del proyecto de tesis.

Dr. Salvador Hernández Martínez

Por su apoyo y su tiempo aportado para la revisión, estructuración del proyecto, así como en la enseñanza en la anatomía de mosquitos.

Dr. Mario Henry Rodríguez López

Por su gran apoyo en la revisión, estructuración y sugerencias durante el desarrollo del proyecto de tesis.

Dedicatorias

Quiero dedicar este trabajo a mis padres, Pablo Celestino Rojas y Margarita Montes Poblete, gracias por su apoyo incondicional y ver realizado este gran proyecto de vida.

A mis hermanos Sabás, Eleuterio, Floriberta, Teodora, Roberto y Fernando. Gracias por sus palabras de aliento y ánimos. A Felicitas, Yadi, Geidi, Claudio y Sebastián por ser parte de la familia.

A mis sobrinos Ángel, Any Abigail, Fernando, Arwen Daiana, Fátima Odalis, Margarita, Jesús, Emanuel, Pablo, Itsani, Ytan Kalet, Quetzaly.

Dedico especialmente este logro a mi esposa y compañera de vida, Estrella Miranda Mercado y a la pequeña niña de mis ojos, Sofía. Gracias por su comprensión y paciencia durante esta etapa de mi vida, por sus palabras de aliento para que esto culminara de la mejor manera.

RESUMEN

El mosquito vector *Aedes aegypti* tiene hoy en día gran importancia porque transmite diferentes patógenos a los humanos, principalmente virus, entre los que sobresalen por su alta incidencia, los virus Dengue, Zika y Chikungunya, lo que ha motivado el desarrollo de poderosas herramientas informáticas y de biología molecular que ayuden a su estudio, incluyendo la biología de su desarrollo.

En este trabajo estudiamos el desarrollo de los músculos indirectos de vuelo en las etapas larvianas de *Ae. aegypti*. El desarrollo de los músculos de vuelo es realizado por los mioblastos, sus células generadoras. Estas células mononucleadas, las células fundadoras (FC) y los mioblastos competentes de fusión (FCM), se fusionan para finalmente formar una fibra muscular multinuclear. Mediante disecciones anatómicas de la región torácica de larvas de cuarto estadio de desarrollo (L4), se encontraron dos tipos diferentes de músculos, que con base a su ubicación y posición corresponden a los precursores de los músculos indirectos de vuelo (IFMs). Se detectaron los dos tipos de músculos de vuelo ya tipificados, los IFMs dorsoventrales (DVM) y los IFMs dorsolongitudinales (DLM) de los cuales se lograron identificar seis precursores DVMs (tres por hemitórax) y dos DLMs (uno por hemitórax), siendo estos precursores los de mayor tamaño. Estos precursores se unen de sus extremos a las células epiteliales adyacentes a la pared de la cutícula torácica mediante tendones. También se analizó la expresión de actina y miosina, dos proteínas fundamentales en la estructuración de los músculos de vuelo tanto en organismos vertebrados como invertebrados. Por otro lado, analizamos la expresión de genes que participan en la biología del desarrollo de la mosca de la fruta *D. melanogaster*, principalmente en la división y proliferación celular.

Nuestros resultados sugieren que la formación de los IFMs de *Ae. aegypti* ocurre de manera similar que en *D. melanogaster*.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* vector mosquito has great importance today because it transmits different pathogens to humans, mainly viruses, among which stand out for their high incidence, the Dengue, Zika and Chikungunya viruses, which has motivated the development of powerful bioinformatics tools and molecular biology that help its study, including the biology of its development.

In this work we study the development of indirect flight muscles in the larval stages of *Ae. aegypti*. The development of the flight muscles is performed by the myoblasts, their generating cells. These mononuclear cells (FC y FCM), fuse to finally form a multinuclear muscle fiber. Through anatomical dissections of the thoracic region of larvae of fourth stage of development (L4), we found two different types of muscles, which based on their location and position correspond to the precursors of indirect flight muscles (IFMs). IFMs are classified into two types, dorsoventral and dorsolongitudinal IFMs. We have identified six dorsoventral precursors (three per hemithorax) and two dorsolongitudinal (one per hemithorax), which are joined from their ends to the wall of the thoracic cuticle by tendons. On the other hand, we analyzed the expression of genes related to cell division and proliferation. Also, we analyzed the expression of actin and myosin, two fundamental proteins in the structuring of flight muscles in both vertebrate and invertebrate organisms. Our results suggest that the formation of the IFMs of *Ae. aegypti* occurs in a similar way as in *D. melanogaster*.

Indice

1. Indice.....	1
2. Lista de Figuras.....	5
3. Lista de tablas	7
4. Lista de abreviaturas	8
5. Introducción.....	11
5.1 Generalidades.....	11
5.2 Mosquitos vectores de patógenos.....	12
5.3 Aedes aegypti	13
5.3.1 Ciclo de vida de <i>Ae. aegypti</i>	13
5.4 Participación de los discos imagales en la formación de los apéndices en <i>Drosophila</i>	19
5.4.1 Disco imagal del ala.....	21
6. Antecedentes	23
6.1 Generalidades.....	23
6.2 El sarcómero es la unidad contráctil del músculo	23
6.3 Desarrollo de las miofibrillas y el músculo	26
6.4 La ontogenia del tejido muscular de <i>Drosophila</i>	29
6.5 Desarrollo de los músculos de vuelo de <i>Drosophila</i>	32
6.5.1 Formación de las miofibras mediante la fusión de los mioblastos	37
6.6 Genes que participan en proliferación y especiación celular	39
6.6.1 Glial cells missing (Gcm)	39
6.6.2 Lozenge	39

6.6.3 Serpent	40
6.6.4 Notch	40
6.6.5 Peroxidasinas	41
6.7 Antecedentes directos.....	43
6.7.1 Histología de la región torácica de L4 de <i>Ae. aegypti</i>	44
7. Justificación.....	47
8. Hipótesis.....	47
9. Objetivos	48
9.1 Objetivo General	48
9.2 Objetivos Particulares	48
10. Materiales y métodos	49
10.1 Mosquitos.....	49
10.2 Disección de los precursores de los músculos indirectos de vuelo (PMV).....	49
10.3 Diseño de oligonucleótidos	50
10.4 Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	53
10.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final.....	54
10.6 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	54
10.7 Preparación de muestras para microscopía confocal	55
10.8 Microscopía electrónica de barrido (MEB)	56
10.9 Microscopía electrónica de transmisión (MET)	56
10.10 Diseño de las sondas para FISH.....	57
10.11 Preparación de los precursores musculares para FISH.....	59

10.12 Preparaciones histológicas	59
10.13 Extracción de proteínas	60
10.14 Determinación de la concentración de proteínas	61
10.15 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).....	61
10.16 Espectrometría de masas	62
a) Preparación de las muestras en el Área de Proteómica del Cinvestav-Irapuato	62
b) Procesamiento de los datos	63
c) Preparación de las muestras en la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica del Cinvestav-Zacatenco	63
d) Procesamiento de los datos	64
11. Resultados	65
11.1 Localización de los precursores de los músculos indirectos de vuelo en larvas de cuarto estadio de desarrollo	65
11.2 Histología de tórax de larvas de cuarto estadio y pupas.....	67
11.3 Proyección tridimensional de un precursor de IFMsDV de L4	81
11.4 Análisis del desarrollo de los precursores de los IFMs en los estadios de L4, pupa y mosquito adulto	82
11.5 Análisis ultraestructural de los IFMs en formación en L4	89
11.6 Expresión de genes de proliferación celular en los precursores de los músculos indirectos de vuelo	99
11.7 Análisis de expresión transcripcional mediante FISH en precursores de los IFMs en L4	101

11.8 Análisis de expresión transcripcional de los precursores de los IFMs retados con LPS	104
11.9 Análisis proteómico de precursores de los IFMs en L4 tardía.....	107
AAEL006244	110
11.10 Análisis de expresión de miosinas en IFMs de L4	111
12. Discusión.....	115
12.1 La miogénesis de los músculos de vuelo.....	115
12.2 Desarrollo de los IFMs y el evento de fusión de los mioblastos.....	116
12.3 Participación de las proteínas actina y miosina en la formación de los músculos de vuelo	120
13. Conclusiones.....	123
14. Perspectivas.....	124
15. Referencias	125

2. Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida del mosquito <i>Aedes aegypti</i>	14
Figura 2. División y migración nuclear tempranas durante la embriogénesis de <i>Drosophila</i>	17
Figura 3. Discos imagales de <i>Drosophila</i>	20
Figura 4. Estructura de los discos imaginales de las alas de <i>D. melanogaster</i>	22
Figura 5. Estructura y dimensiones de los músculos de vuelo de <i>D. melanogaster</i> comparados con los del humano.	25
Figura 6. Desarrollo de los músculos indirectos de vuelo de <i>Drosophila</i>	28
Figura 7. La proximidad de los mioblastos al disco imagal del ala y al primordio del saco aéreo (ASP).....	31
Figura 8. Desarrollo de los músculos de vuelo de <i>Drosophila</i>	33
Figura 9. Origen de los músculos de vuelo de la mosca adulta.....	36
Figura 10. Desarrollo de los músculos dorsolongitudinales (DLMs) de <i>Drosophila</i>	38
Figura 11. Cortes histológicos de la región torácica de L3 y L4.....	45
Figura 12. Morfología del tórax de una L4 de <i>Ae. aegypti</i>	66
Figura 13. Corte histológico del tórax de L4 de <i>Ae. aegypti</i>	68
Figura 14. IFMs en cortes histológicos de pupa tardía.....	70
Figura 15. Microscopía electrónica de barrido de un IFMsDV de L4 tardía	73
Figura 16. Microscopía electrónica de barrido de un IFMsDL de L4 tardía	74
Figura 17. Distribución de actina y de núcleos en los IFMs en formación de L4 temprana.....	76
Figura 18. Formación de las fibras de actina en un IFMs de L4 tardía.....	78

Figura 19. Fibras que conforman un IFMs de L4 tardía.....	79
Figura 20. Proyección 3D de la distribución y organización de actina F en un precursor de IFMsDV de L4.....	81
Figura 21. Formación de los IFMs en pupa y mosquito adulto.....	83
Figura 22. Músculos y miofibrillas de un IFMs disecadas de un mosquito adulto.....	85
Figura 23. Miofibrillas de IFMs de pupas y mosquito adulto.....	87
Figura 24. Mioblastos jóvenes de L4.....	91
Figura 25 Mioblastos maduros de L4.....	93
Figura 26. Núcleos de mioblastos fusionados en L4.....	95
Figura 27. Formación de los miofilamentos en la fibra muscular.....	97
Figura 28. Expresión de genes de proliferación celular en embriones y precursores de los IFMs en L4.....	100
Figura 29. Análisis de expresión de genes de diferenciación en precursores de los IFMs en L4.....	102
Figura 30. Expresión de los mensajeros en los precursores de los IFMs de L4 tardía retados con LPS.....	105
Figura 31. Geles de proteínas totales de precursores de los IFMs de L4 tardía.....	108
Figura 32. Expresión de miosinas en precursores de los IFMs de L4.....	113
Figura 33. Detección de miosina en los precursores de los IFMs en L4 tardía.....	114

3. Lista de tablas

Tabla 1. Genes involucrados en proliferación y especiación celular.....	51
Tabla 2. Lista de oligonucleótidos utilizados para los experimentos de PCR punto final.....	52
Tabla 3. Lista de sondas y su fluoróforo acoplado.....	58
Tabla 4. Proteínas identificadas en los IFMs de L4 por MS.....	110

4. Lista de abreviaturas

% I	% Identidad
AMPs	Precusores del músculo del adulto
APF	Después de la formación de la pupa
ASP	Primordio del saco aéreo
bp	Pares de bases
BSA	Albúmina de suero bovino
cDNA	DNA complementario
Ct	Factor de transcripción <i>Cut</i>
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DEPC	Dietil pirocarbonato
DFMs	Músculos directos de vuelo
DLMs	Músculos dorsolongitudinales
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOMs	Músculos oblicuos dorsales
DR	Dominios Relevantes
DTT	Ditiotreitol
DVMs	Músculos dorsoventrales
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FC	Células fundadoras
FCMs	Mioblastos competentes de fusión
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
FITCI	Isotiocianato de fluoresceína
Gapdh	<i>Gliceraldehído 3-fosfato-deshidrogenasa</i>
Gcm	Gene Glial cells missing
GFP	Proteína Verde Fluorescente
HB	Amortiguador de hibridación

Hz	Hertz
IFMs	Músculos indirectos de vuelo
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
Kb	Kilo bases
kDa	Kilo Dalton
L1, 2, 3 y 4	Larvas en estadio 1, 2, 3 y 4
L-DOPA	3,4-Dihidroxil-L-Fenilalanina 4 mM
LOMs	Músculos oblicuos de la larva
LPS	Lipopolisacárido
Lz/Loz	Gene <i>Lozange</i>
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MET	Microscopía electrónica de transmisión
Mg	Miligramos
Mm	Milímetros
mr	Masa relativa
MS	Espectrometría de masas
NR	Número de Residuos a.a de aminoácidos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PBS	Amortiguador Fosfato Salino
PFA	Paraformaldehído
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso Molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PMV	Precusores de los músculos de vuelo
PSA	Persulfato de amonio
Pxn	Gene Peroxidasina
RNA	Ácido Ribonucleico

RNAm	RNA mensajero
S7	Gene ribosomal S7
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SSC	Amortiguador Citrato de sodio salino
Srp	Gene <i>Serpent</i>
TAE	Amortiguador Tris-Acetato EDTA
TA	Temperatura Ambiente
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
Vg	Factor de transcripción Vestigial
WB	Amortiguador de lavado

5. Introducción

5.1 Generalidades

Los insectos son miembros integrales del ecosistema, algunos participan en la reproducción de los bosques y cultivos, mientras que otros transmiten enfermedades infecciosas al hombre. Más de un millón de especies de insectos viven en la tierra y se considera que deben su prosperidad en gran parte a la miniaturización de sus cuerpos, así como al desarrollo de la capacidad de vuelo (Sane 2003; 2016). La mayoría de los insectos miden sólo milímetros, aunque en algunos casos pueden medir varios centímetros de largo. Por ejemplo, el insecto más pequeño conocido es una especie de avispa parásita (orden Himenóptera), de la familia *Trichogrammatidae*, que tiene una longitud corporal de 0.2 mm, la cual es capaz de parasitar los huevos de varias especies de lepidópteros como las trips o arañuelas (orden Thysanoptera) de una longitud corporal de 2 mm aproximadamente (Rakitov y Triapitsyn 2013), por lo cual pueden ser utilizadas como agentes de control biológico (Ahmadi y Poorjavad 2018)

Los holometábolos, dada su edad evolutiva, son el subgrupo de especies más abundante entre los insectos (hexápodos), entre los cuales se encuentran los dípteros que incluyen a los mosquitos del género *Aedes sp.* y la mosca de fruta *Drosophila melanogaster* (Rainfat *et al.* 2014; Trautwein *et al.* 2012). Los insectos holometábolos llevan a cabo una metamorfosis completa pasando por los estadios de larva y pupa, antes de alcanzar la etapa adulta. *D. melanogaster* es el organismo modelo invertebrado por excelencia y a la fecha se conoce ampliamente su genética, biología molecular y del desarrollo (Rainford *et al.* 2014). Dada las similitudes entre organismos, permite utilizar la información conocida como modelo de comparación para el estudio de procesos biológicos en otros organismos, ya sean invertebrados o vertebrados. La biología del desarrollo de *Drosophila* se ha estudiado a fondo aprovechando que tiene un ciclo de vida corto, es económica de cultivar, se obtiene en cantidades suficientes para tener material que se pueda analizar por métodos estadísticos, bioquímicos y moleculares y existen extensas colecciones de mutantes. En condiciones óptimas este insecto tiene un ciclo de vida de diez días a una temperatura de 25 °C (Couso *et al.* 1993; Gleason y Powell 1997). Durante las

primeras 24 h después de la fertilización del huevo, se forma el embrión, luego emerge la larva que pasará por tres estadios larvarios y que mudará dos veces su cutícula. Finalizando el tercer estadio larvario (en aproximadamente cinco días) se forma la pupa, en donde ocurre la metamorfosis, proceso donde la mayoría de los tejidos larvarios son destruidos y en su lugar se forman nuevos. En muchos casos las estructuras del adulto se generan a partir de grupos de células formadas en el embrión, los discos imagales, que se localizan en puntos específicos y que se mantienen quiescentes hasta reactivarse en la metamorfosis. Una vez que finaliza la metamorfosis, el adulto emerge de la pupa aproximadamente al décimo día de desarrollo; su vida media, en condiciones óptimas, puede llegar a las ocho semanas (Couso *et al.*, 1993). La etapa reproductiva inicia entre las 6 y 8 h después de la eclosión del adulto, los individuos adultos pueden ser sexados con base a varios criterios; el tamaño, mayor en las hembras, la pigmentación y forma del abdomen y el "sex comb" o peine sexual del primer par de patas, el cual es propio de los machos (Demerec 1950).

5.2 Mosquitos vectores de patógenos

Varias especies de mosquitos son responsables de la transmisión de enfermedades parasitarias y virales a los humanos, entre las cuales, por el número elevado de casos y por su letalidad, sobresalen la malaria y el dengue, la primera transmitida por varias especies de anofelinos y el segundo principalmente por *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Wilder-Smith *et al.* 2010).

Para que la transmisión de los virus ocurra, los mosquitos hembras del género *Aedes sp.* necesitan llegar mediante el vuelo hasta donde se encuentra su huésped, de esta forma los virus serán ingeridos por la hembra al alimentarse de sangre de un individuo portador, en el cuerpo del insecto se multiplican hasta invadir las glándulas salivales, paso indispensable para su transmisión a más personas y poder pasar a un nuevo huésped a través de la saliva (Schoepp *et al.* 1990; Salazar *et al.* 2007). En contraparte, estos agentes patógenos enfrentan mecanismos de defensa evolutivamente desarrollados en el mosquito para inmovilizarlos, aislarlos y

destruirlos, reduciendo el daño al insecto (Michel y Kafatos 2005; Wang y Jacobs-Lorena 2013).

5.3 *Aedes aegypti*

Ae. aegypti es un mosquito vector de varias especies virales como dengue, chikongunya y zika entre otros, distinguiéndose por el elevado número de casos, el virus dengue (Bennett *et al.* 2006). El género *Aedes* pertenece al orden Díptera (presenta un solo par de alas y un par de halterios), a la familia *Culicidae* y subfamilia *Aedinae*. Este mosquito es de color negro con manchas negras y plateadas en diferentes partes del cuerpo. En el dorso del tórax tiene un dibujo característico “en forma de lira” con franjas claras. Se caracteriza y se distingue de otros géneros de mosquito por tener palpos cortos y adoptar una posición horizontal durante el reposo. Cuando las hembras de *Ae. aegypti* se alimentan de sangre lo hacen varias veces durante el día, de uno o más hospederos (Severson *et al.* 2004; Cabezas 2005).

La secuencia del genoma de *Ae. aegypti* fue publicada en 2007, contiene cerca de 1.4×10^9 pares de bases, notablemente el 47% del genoma corresponde a transposones (Nene *et al.* 2007), está organizado en tres pares de cromosomas y no existe par sexual (Severson *et al.* 2004). Comparativamente, el genoma de *Ae. aegypti* es cinco veces más grande que el de otro mosquito vector, *Anopheles gambiae* transmisor de la malaria en África (Nene *et al.* 2007).

5.3.1 Ciclo de vida de *Ae. aegypti*

Los mosquitos presentan dos etapas en su ciclo de vida: una fase acuática con tres estadios de desarrollo bien diferenciados: huevo, larva y pupa (donde ocurre la metamorfosis completa), y una fase aérea (adulto o imago) (Figura 1). Para su reproducción sexual, los machos tienen un órgano intromitente que, durante la copulación, coloca de manera superficial en el orificio genital de la hembra. Las glándulas accesorias del macho se contraen y los espermatozoides son expulsados hacia la espermateca de la hembra, donde se almacenan hasta la fecundación de los huevos, la cual ocurre al momento de la oviposición (Spielman 1964).

Cabe mencionar la importancia del vuelo en la táctica de apareamiento de los mosquitos, donde la cópula se lleva a cabo durante el “vuelo nupcial” que consiste en

batir las alas en la misma frecuencia (“convergencia armónica”) por ambos sexos, emitiendo un sonido característico como parte del cortejo (Cator *et al.*, 2009; Cator y Zanti, 2016); este aleteo armónico es generado miogénicamente por los músculos de vuelo (Aldersley *et al.*, 2018) (*vide infra*).

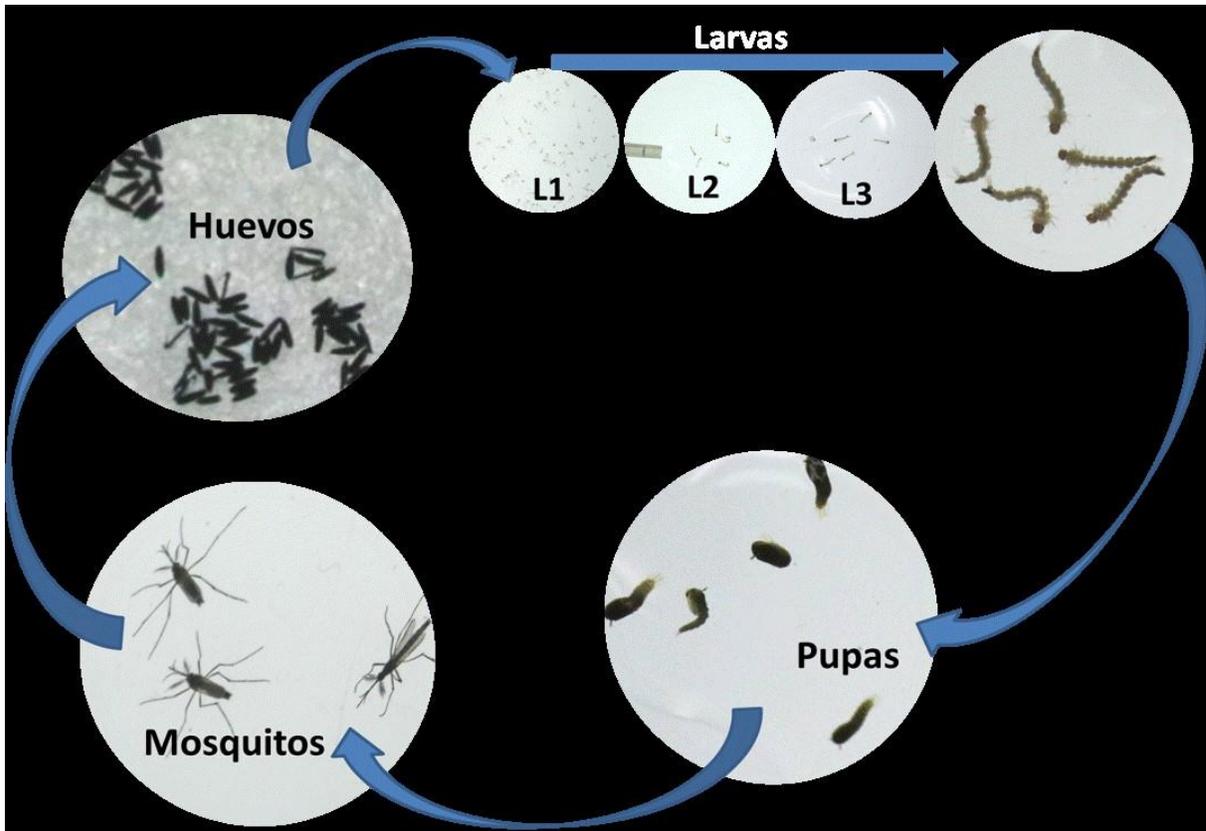


Figura 1. Ciclo de vida del mosquito *Aedes aegypti*. Los mosquitos durante su ciclo de vida presentan dos fases, una acuática con varias etapas, huevo, larva 1, 2, 3 y 4 y pupa que, en conjunto, ocurre en aproximadamente 10 días. La segunda fase (adulto o imago) es aérea, con una duración variable y en condiciones naturales el adulto puede llegar a vivir hasta 30 días.

La hembra de *Ae. aegypti* deposita sus huevos, que tienen un tamaño de 1 mm aproximadamente, sobre superficies rugosas y húmedas, usualmente sitios oscuros y con una cantidad moderada de materia orgánica (Lenhart *et al.* 2005). La fecundación de los huevos ocurre cuando éstos pasan por el oviducto que se conecta con la espermateca, por lo que a partir de ese momento se inicia el proceso de desarrollo. Al ser expulsados, los huevos son blancos y suaves, pero rápidamente se endurecen y cambian a un color negro brillante debido al proceso de melanización. Si el ambiente es húmedo y cálido la embriogénesis ocurre rápidamente y las larvas emergen en 48 h, pero a bajas temperaturas el desarrollo puede prolongarse por varios días. La cubierta externa del huevo es formada en parte por la hembra y en parte por el embrión, ésta es semipermeable y permite el intercambio de gases entre el embrión y el ambiente, evitando la pérdida de agua, lo que le da la capacidad de resistir desecación y temperaturas extremas hasta por siete meses a un año (Clements 1992).

El desarrollo embrionario de *Drosophila* se utiliza comúnmente como el modelo al que se compara el de otros insectos, sin embargo, existen diferencias significativas en el desarrollo de las moscas y los mosquitos, aún cuando pertenecen al mismo orden díptera. A pesar de las diferencias conocidas, describiremos comparativamente lo descrito para el desarrollo de estos dos insectos.

En las fases iniciales de la embriogénesis de *Drosophila*, a partir del cigoto ocurren rápidamente divisiones nucleares sin citocinesis formando una célula multinucleada (*sincitio*). Las primeras trece divisiones nucleares se completan en aproximadamente 3 h, originándose un embrión de aproximadamente 6000 núcleos con un citoplasma común, llamado blastodermo sincitial, y durante la interfase del ciclo nuclear catorce, los núcleos son repartidos en células individuales en un proceso conocido como celularización y se produce el blastodermo celular (Zalokar y Erk 1976; Foe y Alberts 1983).

Al inicio del desarrollo, el embrión de *Drosophila* está dotado de abundantes RNAm y proteínas aportados maternalmente, los cuales le permiten evitar la transcripción cigótica durante las primeras divisiones, en las cuales ocurren directamente síntesis de DNA y divisiones nucleares sin citocinesis, por lo que los ciclos ocurren

rápidamente, en un rango de 10 a 15 min, comparado al ciclo celular típico de 24 h. Durante las divisiones, los núcleos migran, siguiendo patrones bien establecidos. Durante las primeras tres divisiones, los núcleos permanecen agrupados en el tercio anterior del embrión, en tanto que en los ciclos nucleares 4-6, en un proceso denominado expansión axial, los núcleos se distribuyen uniformemente a lo largo del embrión. Durante el ciclo nuclear ocho se inicia la migración nuclear hacia la corteza y el primer núcleo llega al extremo de la parte posterior de la corteza en el ciclo nuclear nueve. Estos núcleos son los precursores de la línea germinal y sobresalen a través de la membrana plasmática para formar los polos de las células durante el ciclo nuclear 10. Estos núcleos corticales son sometidos a cuatro divisiones más y finalmente, como ya se describió, se celularizan durante la interfase del ciclo nuclear 14. El espacio es limitado durante las divisiones sincitiales y esta situación se incrementa durante las divisiones corticales, cuando cientos de núcleos se dividen rápidamente en una monocapa confinada y el espacio para cada núcleo se reduce (Figura 2) (Kotadia *et al.* 2010).

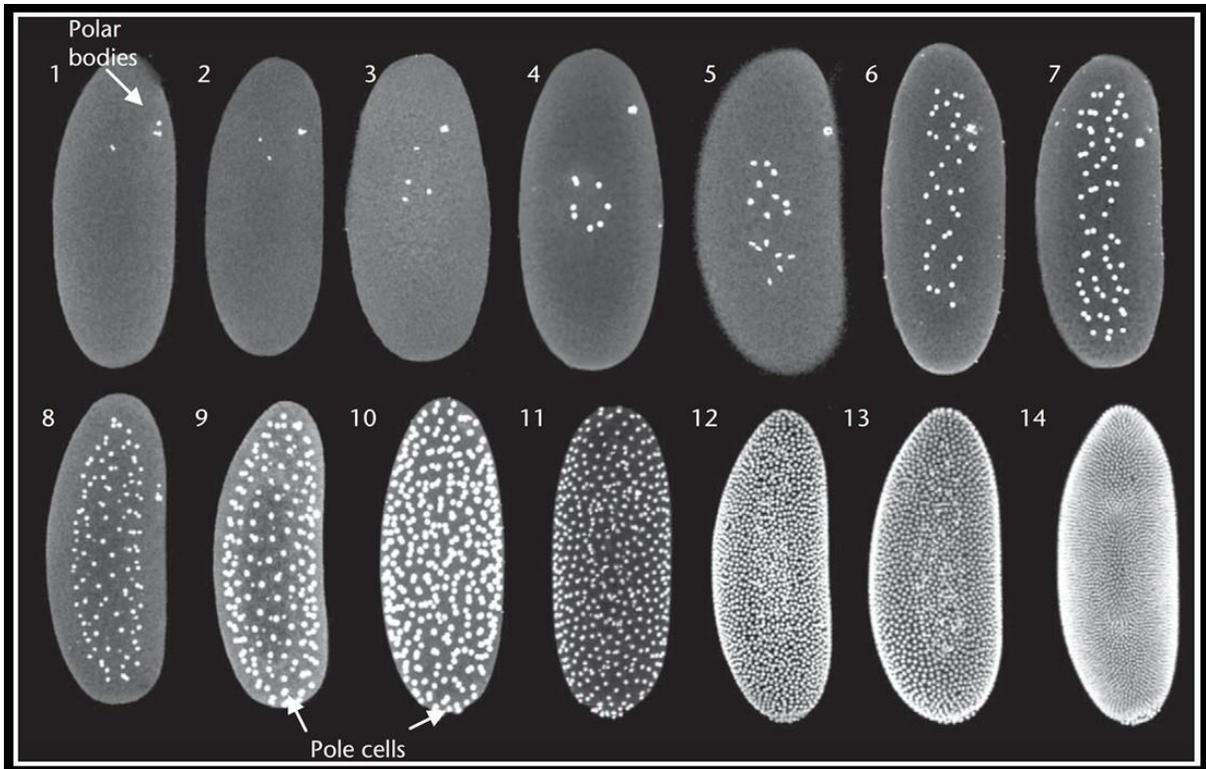


Figura 2. División y migración nuclear tempranas durante la embriogénesis de *Drosophila*. El ciclo de división 1 es iniciado después de la fusión del pronúcleo del macho y la hembra. Durante las divisiones 1-3, el núcleo se divide en una zona en forma de esfera en el lado anterior del embrión. Durante las divisiones 4-6, el núcleo se divide y se extiende a lo largo del eje anteroposterior (expansión axial). El núcleo migra hacia la corteza del embrión durante las divisiones 8-10 (migración cortical). Las células polares se forman en el extremo posterior del embrión (ciclo 9). Después de cuatro rondas de divisiones sincitiales corticales, durante la interfase del ciclo nuclear 14, la invaginación de la membrana plasmática alrededor de cada núcleo produce un embrión celularizado (Tomada de Kotadia *et al.* 2010).

El hábitat óptimo para las larvas del mosquito *Ae. aegypti* son cuerpos de agua dulce con poco movimiento. Esta fase del ciclo de vida tiene adaptaciones para el ambiente acuático, que incluyen un sifón respiratorio ubicado en la región caudal, que le permite obtener oxígeno atmosférico cuando la larva sube a la superficie del agua, y en la parte anterior posee un sistema de filtración de partículas que le permite tomar alimento suspendido en el agua (principalmente bacterias, algas y tejidos vegetales principalmente) (Clements 1992).

Durante el periodo larvario el mosquito crece de 1 a 7 mm y comprende cuatro estadios con tres mudas, a diferencia del de *Drosophila*, donde ocurren tres con dos mudas. La duración del desarrollo larvario del mosquito depende de la temperatura, la disponibilidad de alimento, así como de la densidad de larvas en el recipiente. En condiciones óptimas el periodo larval, desde la eclosión hasta la fase de pupa, puede ser de cinco a siete días. El tiempo promedio para pasar de un estadio a otro es de aproximadamente 48 h. La diferencia principal entre las etapas larvarias es el tamaño, comparadas con otros géneros de mosquito, las larvas de *Aedes* se distinguen porque se mantienen casi verticales en la superficie del agua y nadan con un movimiento serpentino característico (Chico-Aldama *et al.* 2001).

El estadio de pupa corresponde a la última etapa de desarrollo de la fase acuática, ésta no se alimenta y en ella ocurre la metamorfosis con la transformación total del cuerpo acuático de la larva al del adulto aéreo, tiene una duración de dos a tres días a una temperatura entre 28 y 32 °C. La pupa del mosquito, a diferencia de otros insectos que son sésiles, nada en el agua desplazándose del fondo a la superficie y cuando la parte anterior del cefalotórax está en contacto con la superficie los sifones toman oxígeno atmosférico. Durante la metamorfosis algunos órganos y tejidos de la pupa se destruyen por histólisis y son reemplazados por nuevos, lo mismo ocurre con el corazón y el cuerpo graso. Cuando el adulto está completamente formado dentro de la cutícula de la pupa, el insecto permanece cerca de la superficie y comienza a tomar aire. Como consecuencia del aumento en la presión interna, el adulto se expande lentamente, se abre una línea a lo largo de la cutícula dorsal de la pupa y por esta abertura el adulto sale a la superficie (Clements 1992).

El adulto de *Ae. aegypti* es de color negro, con escamas plateadas en los segmentos dorsales y apéndices locomotores. Cuando los mosquitos emergen se alimentan con néctares de los vegetales o, en cautividad, de soluciones de azúcar. Las hembras se alimentan con sangre por primera vez entre las 48 y 72 h posteriores a la eclosión, esta alimentación es necesaria para la maduración de los huevos y esta característica es fundamental para la transmisión de los patógenos, ya que utilizan la sangre como vehículo para invadir a su huésped. Las alimentaciones sanguíneas posteriores son aproximadamente cada tres días al completar el ciclo gonotrófico, periodo entre que se alimenta de sangre, ovipone y vuelve a alimentarse. En cada ciclo gonotrófico se ha observado que, a diferencia de otros géneros, *Aedes* se alimenta varias veces de uno o varios hospederos, hasta satisfacer su requerimiento de sangre (2-3 mg). Las hembras después de las 48 h post-alimentación, llegan a ovipositar de 100 a 200 huevos y pueden tener varias oviposiciones durante su ciclo de vida (Cabezas 2005). Los mosquitos adultos en su ambiente natural pueden vivir hasta unas cuatro semanas ya que se ven afectados por las condiciones climáticas, principalmente la temperatura humedad, en cambio, en condiciones de laboratorio pueden permanecer vivos de cuatro a seis semanas. Con una mortalidad diaria del 10%, la mitad de los mosquitos mueren durante la primera semana y el 95% durante el primer mes. A pesar de la gran reducción en número, si la población emergente original es grande, la población adulta será suficiente para transmitir los patógenos y mantener una epidemia (Nelson *et al.* 1986). A una temperatura inferior a 4°C o superior a los 40°C, los mosquitos generalmente no sobreviven.

5.4 Participación de los discos imagales en la formación de los apéndices en *Drosophila*

Los discos imagales en *Drosophila* y otros dípteros superiores son sacos de células epiteliales, de tamaño pequeño y de apariencia indiferenciada, su proliferación es rápida en todo el desarrollo larval y tienen la capacidad única de proliferar en cultivo durante periodos prolongados (Hadorn 1965). Los discos imagales se encargan de originar estructuras del adulto que incluyen alas, patas, antenas, tórax, estómago y otras partes cuticulares. Los discos imagales se forman durante la embriogénesis temprana y se localizan en regiones específicas del embrión (Simcox y Sang 1983).

Los primordios de los discos imagales en un inicio están conformados por 20 a 50 células, que proliferan hasta alcanzar aproximadamente 1000 células durante el estadio larvario y estas células se organizan para formar los discos imagales (Figura 3). Algunos de estos discos como los de las alas y patas se subdividen en compartimentos anterior y posterior. En el cuarto estadio larvario y en la pupa temprana los discos imagales alcanzan su tamaño final, cambian su morfología y las células se comprometen a destinos específicos. Durante la metamorfosis las células larvales entran en apoptosis en respuesta a señales hormonales y moleculares, y los discos inician su diferenciación terminal, llevando a la formación del exoesqueleto (Fristrom y Fristrom 1993), las hojas de las alas, halterios, el fémur, la tibia, el tarso de las patas, ojos, antenas, cabeza, cápsula, y órganos genitales del adulto (Schubiger 1968; Bergantiños *et al.* 2010).

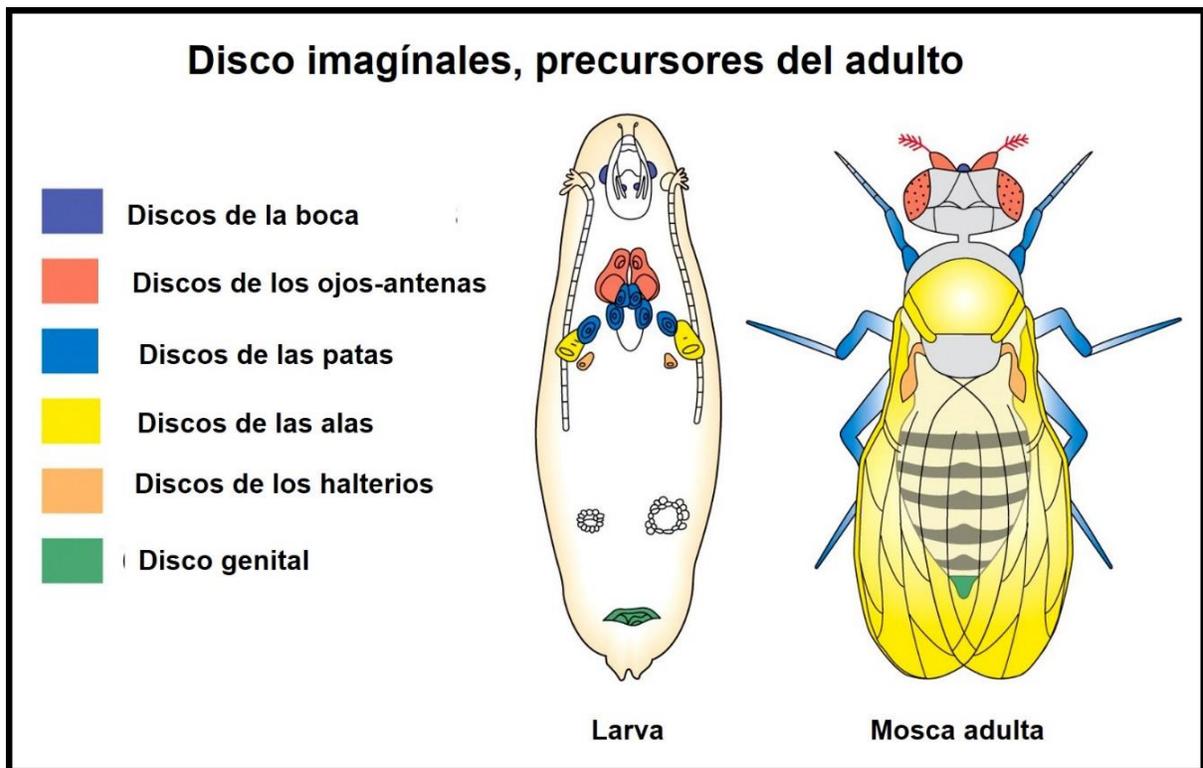


Figura 3. Discos imagales de *Drosophila*. Se indica la ubicación de los discos imagales en la larva de la mosca de la fruta, y los colores indican la parte corporal que forman en la etapa adulta. (Modificada de Fristrom y Fristrom 1993).

5.4.1 Disco imagal del ala

El disco imagal del ala es un saco aplanado que presenta las superficies apicales de dos láminas epiteliales conectadas a través de un lumen estrecho. Una de las láminas, denominada epitelio columnar, debe su nombre a sus células alargadas o columnares situadas a lo largo de su eje apical/basal, las cuales son las encargadas de generar la hoja del ala y la mayor parte de la cutícula dorsal del tórax (Fristrom y Fristrom 1993). El disco del ala está encapsulado por una membrana basal y una rama del sistema traqueal que penetra la membrana basal en varios sitios de la región dorsal del disco (Figura 4) (Pastor *et al.* 2004; Guha *et al.* 2009).

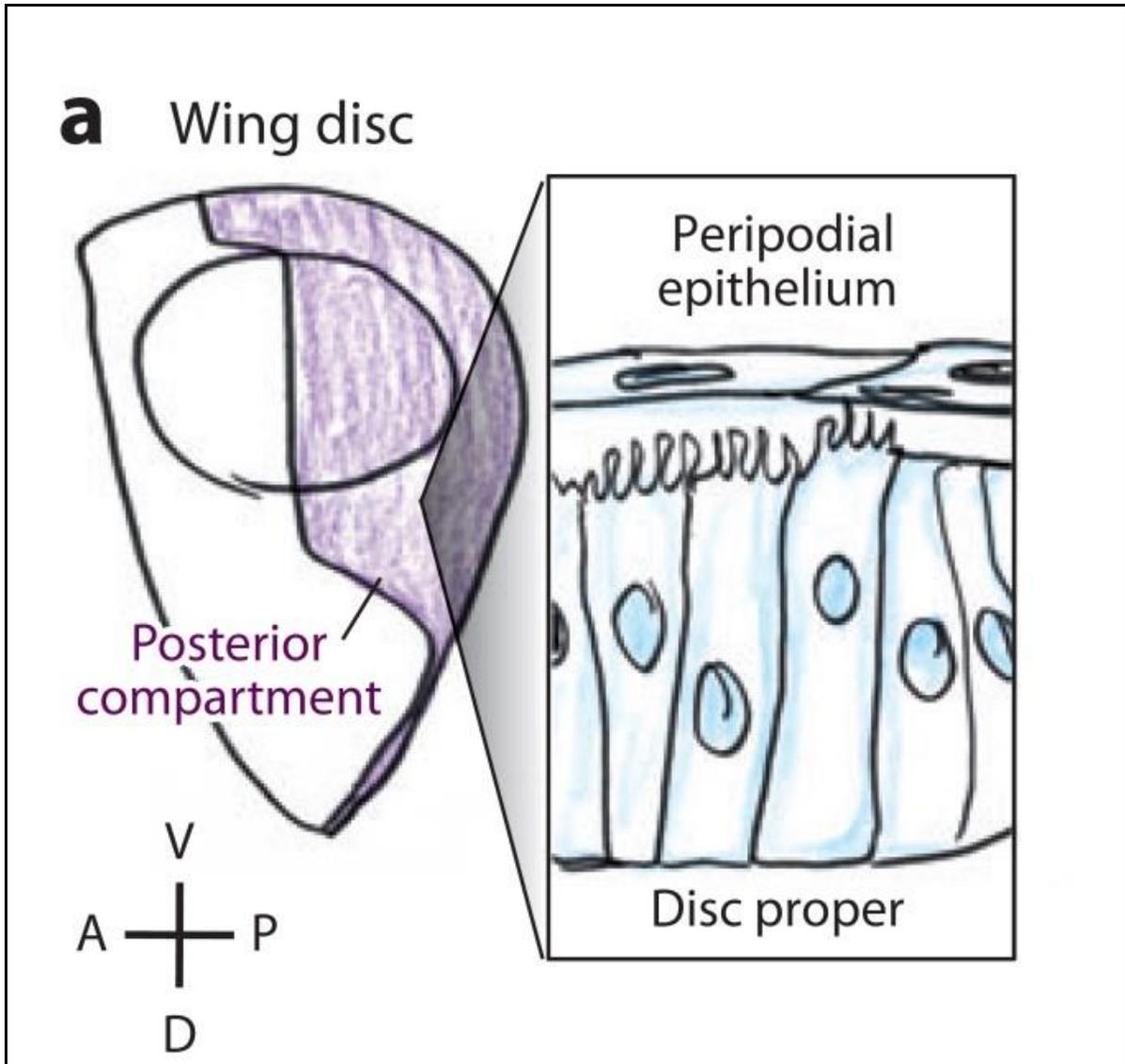


Figura 4. Estructura de los discos imagales de las alas de *D. melanogaster*. Los discos imagales tienen forma de sacos aplanados y se componen de dos capas epiteliales. Los discos propios están integrados por células columnares y el epitelio peripodial lo integran células escamosas. Las superficies apicales de ambas capas apuntan hacia el lumen del saco. Se indica la dirección anterior (A), posterior (P), dorsal (D) y ventral (V). (Modificada de Worley *et al.* 2012).

6. Antecedentes

6.1 Generalidades

En este proyecto se describe el desarrollo de los precursores de los músculos indirectos de vuelo (IFMs) del mosquito *Ae. aegypti* en L4 y pupa, ya que la evolución y formación de estas estructuras les da la capacidad y eficiencia para alcanzar a sus huéspedes y poder obtener la sangre para su subsistencia.

6.2 El sarcómero es la unidad contráctil del músculo

Los insectos pequeños requieren altas frecuencias de aleteo para generar suficiente poder aerodinámico para el vuelo. Muchas adaptaciones musculares de vuelo han evolucionado para permitir la generación de energía a altas velocidades musculares. En *Drosophila*, algunas de estas adaptaciones son los músculos indirectos de vuelo (IFM), los cuales no están unidos directamente a las alas (de donde toman su nombre), que oscilan el tórax en altas frecuencias para impulsar el vuelo; además, estos músculos poseen proteínas que han evolucionado para permitir una velocidad muscular más rápida y la generación de energía cíclica para producir el vuelo (Wang *et al.*, 2014). Durante el vuelo de *Drosophila*, los músculos indirectos de vuelo se contraen a 200 Hz y sostienen una potencia estimada de alrededor de 80 W/kg de masa muscular durante muchas horas de vuelo (Lehmann y Dickinson 1997; Dudley 2000). La unidad contráctil de todos los músculos es el sarcómero, el cual está formado por varias proteínas principalmente miosina, troponina, tropomiosina, actina, α -actinina y titina, entre otras, estructuradas de manera específica para mantener la función del músculo de vuelo en el adulto (Figura 5). Durante la contracción, el sarcómero se acorta mediante un mecanismo de deslizamiento, en donde los filamentos gruesos de miosina bipolar se introducen entre los filamentos delgados de actina reticulada y de esta forma se acorta el sarcómero (Huxley y Niedergerke 1954). Los sarcómeros se organizan en series de miofibrillas lineales, las cuales abarcan todo el músculo. La contracción coordinada de todos los sarcómeros a lo largo de una miofibrilla acorta el músculo entero y generan fuerza mecánica. Se ha encontrado que tanto el mecanismo de contracción muscular, como la mayor parte de los componentes moleculares están conservados evolutivamente desde los

gusanos y moscas hasta los seres humanos, por lo tanto, el sarcómero es una máquina molecular antigua y conservada (Vigoreaux 2001; Ehler y Gautel 2008; Lemke y Schnorrer 2016).

En *Drosophila*, las fibras de los músculos de vuelo tienen una longitud de aproximadamente 1 mm en tanto que, en los seres humanos, las fibras musculares pueden tener varios centímetros de largo (Huxley y Niedergerke 1954). Cada fibra muscular está conformada de muchas miofibrillas, las cuales recorren linealmente toda la longitud de la fibra muscular de un tendón a otro. La longitud del sarcómero es similar en el músculo indirecto de vuelo de *Drosophila* y en el músculo esquelético humano relajado, *in vivo* varía de 3.0 a 3.4 μm (Vigoreaux 2001; Ehler y Gautel 2008; Llewellyn *et al.* 2008; Regev *et al.* 2011). En *Drosophila*, alrededor de 300 sarcómeros deben estar dispuestos linealmente para formar una miofibrilla que abarque toda la fibra del músculo de vuelo, mientras que los músculos de organismos vertebrados superiores pueden requerir hasta 100,000 sarcómeros para construir una miofibrilla (Figura 5) (Lemke y Schnorrer 2016).

La mayoría de los músculos relajados están bajo tensión pasiva, incluso si no producen fuerzas contráctiles activas. La fuente de esta tensión pasiva son las miofibrillas mismas (Magid y Law 1985), con una importante contribución de la proteína elástica titina o conectina, que en los vertebrados se extiende a través de la mitad de un sarcómero desde el disco Z a la línea M y por lo tanto se conecta de forma estable con filamentos delgados (Maruyama *et al.* 1976; Fürst *et al.* 1988; Gautel *et al.* 1996; Linke *et al.* 1996; Tskhovrebova y Trinick 2003; Gautel 2011a) y por esta propiedad se acuñó el término "*filamentos de conexión*" para los filamentos de titina (Maruyama *et al.* 1977; Maruyama 2002).

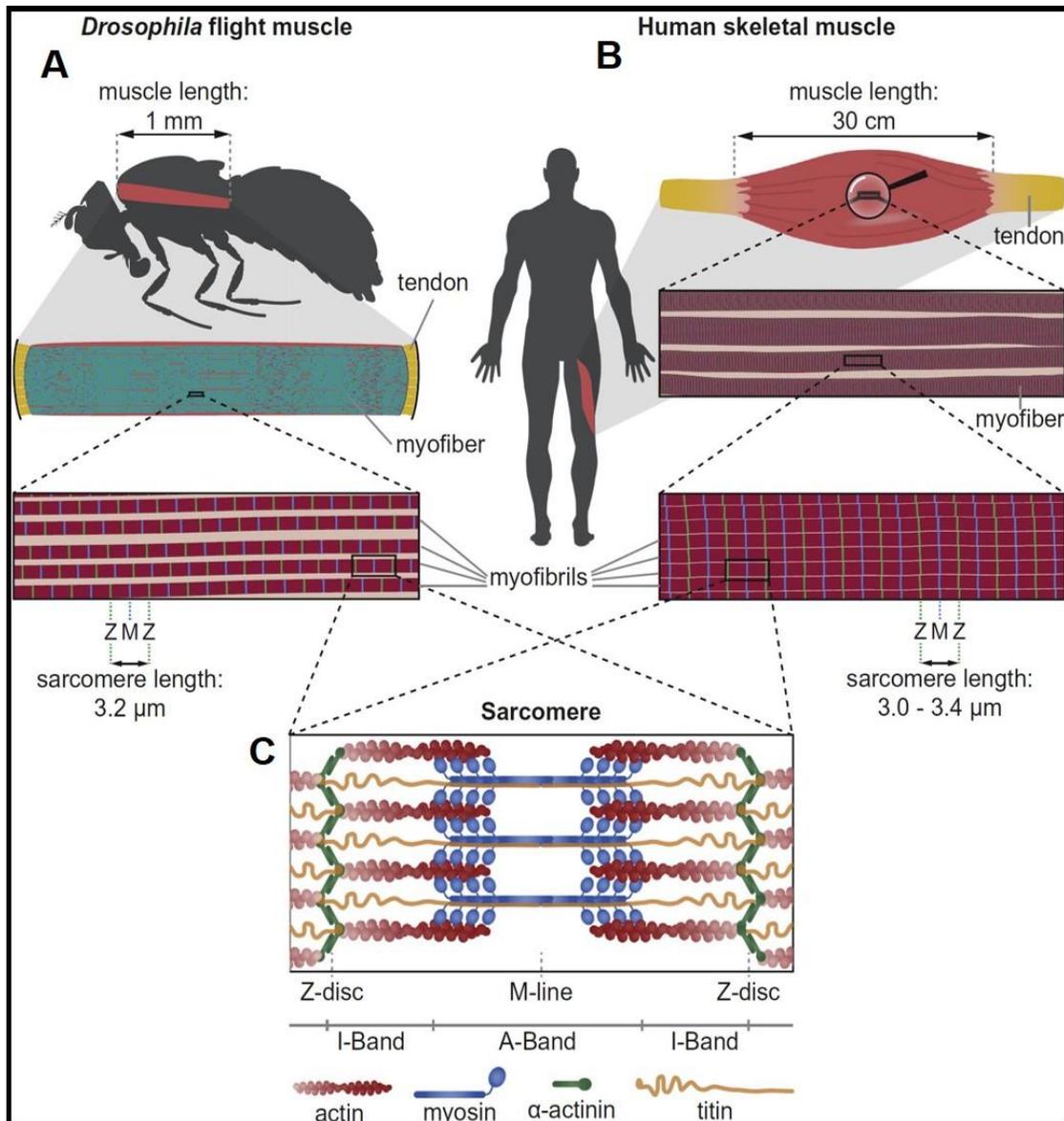


Figura 5. Estructura y dimensiones de los músculos de vuelo de *D. melanogaster* comparados con los del humano. A y B) Cada fibra muscular contiene cientos de miofibrillas que abarcan toda la longitud de la miofibrilla. Los sarcómeros deben estar montados perfectamente en una miofibrilla para conectar los accesorios del músculo-tendón en los extremos de la fibra. En la mosca y el humano los sarcómeros son similares en longitud ($3.2 \mu\text{m}$ en los músculos de vuelo y de 3 a $3.4 \mu\text{m}$ en músculos relajados de humanos) y muchas proteínas sarcoméricas están conservadas. C) Esquema del sarcómero. Los filamentos de actina polares (también llamados filamentos delgados) están anclados en el disco Z (en verde) por α -actinina. Los filamentos gruesos constituidos por haces de miosina están centrados en la línea M (en azul) e interactúan con la actina a través de sus cabezas de miosina. La titina, es una proteína que forma los filamentos de conexión, se ancla en el disco Z y se extiende a través de la banda I hasta la línea M. (Tomada de Lemke y Schnorrer 2016).

6.3 Desarrollo de las miofibrillas y el músculo

Durante el estadio pupal de *Drosophila*, el miotubo se alarga por ambos extremos hacia las futuras células del tendón (Schnorrer y Dickson 2004; Schweitzer *et al.* 2010). Al principio de esta fase las puntas de los miotubos extienden numerosos filopodios (Schnorrer *et al.* 2007; Weitkunat *et al.* 2014a), el citoesqueleto de actina está polarizado a lo largo del eje del miotubo y probablemente produce una fuerza que lo impulsa hacia los futuros accesorios del tendón. Después del alargamiento del miotubo, los filamentos de actina necesitan unirse a los tendones para formar filopodios dinámicos en su lado basal que se entrelazan con los filopodios del tubo para iniciar la unión miotubo-tendón (Figura 6 A y B). Durante la fase de unión y maduración, el miotubo acorta su longitud mientras que las células del tendón forman prolongaciones para mantener la conexión estable con ambos extremos del miotubo (Figura 6 B y C). Estas extensiones celulares, que se originan desde el lado basal del epitelio del tendón, se observan como líneas rectas, lo que indica una fuerte tensión tisular producida por la compactación del miotubo. De hecho, los experimentos de corte con láser *in vivo* han demostrado que después de iniciar la fusión, la tensión mecánica dentro del sistema músculo-tendón aumenta gradualmente a medida que la unión madura y los miotubos se compactan (Weitkunat *et al.* 2014b). Durante el inicio de la fusión, cuando los accesorios son dinámicos y la tensión es baja, dentro del miotubo los filamentos cortos de actina son abundantes (Figura 6 B). Estos filamentos de actina dinámicos están orientados preferentemente a lo largo del eje de tensión, pero no son periódicos ni estriados. Cuando se establece la tensión del tejido y se compacta el miotubo al máximo, el primer patrón de miosina muscular periódica surge dentro del miotubo a medida que se transforma a una miofibrilla. Este patrón de miosina muscular periódica se localiza en una fibrilla de actina continua que representa una miofibrilla inmadura (Figura 6 C). La formación de estas miofibrillas inmaduras, así como el patrón de miosina muscular periódica se producen simultáneamente a través de toda la fibra muscular. Como consecuencia, cada miofibrilla se extiende por toda la miofibrilla de un extremo fijo al otro y es indistinguible de sus fibrillas vecinas en términos de madurez (Weitkunat *et al.* 2014a).

Una vez construidas, las miofibrillas inmaduras crecen, tanto en anchura como en longitud, los sarcómeros se observan como una matriz pseudocristalina regular y adquieren su tamaño final de fibra muscular madura (Spletter *et al.* 2015). Durante esta fase de maduración, las miofibrillas se ajustan adicionalmente a las necesidades del tipo de fibra muscular, siendo un tipo de fibra más duradera o de elevada fuerza, ya sea por la incorporación de proteínas sarcoméricas particulares o isoformas de proteínas, en conjunto, esto genera fibras musculares que se ajustan perfectamente a las demandas biomecánicas del organismo (Schiaffino y Reggiani 2011; Spletter y Schnorrer 2014; Spletter *et al.* 2015).

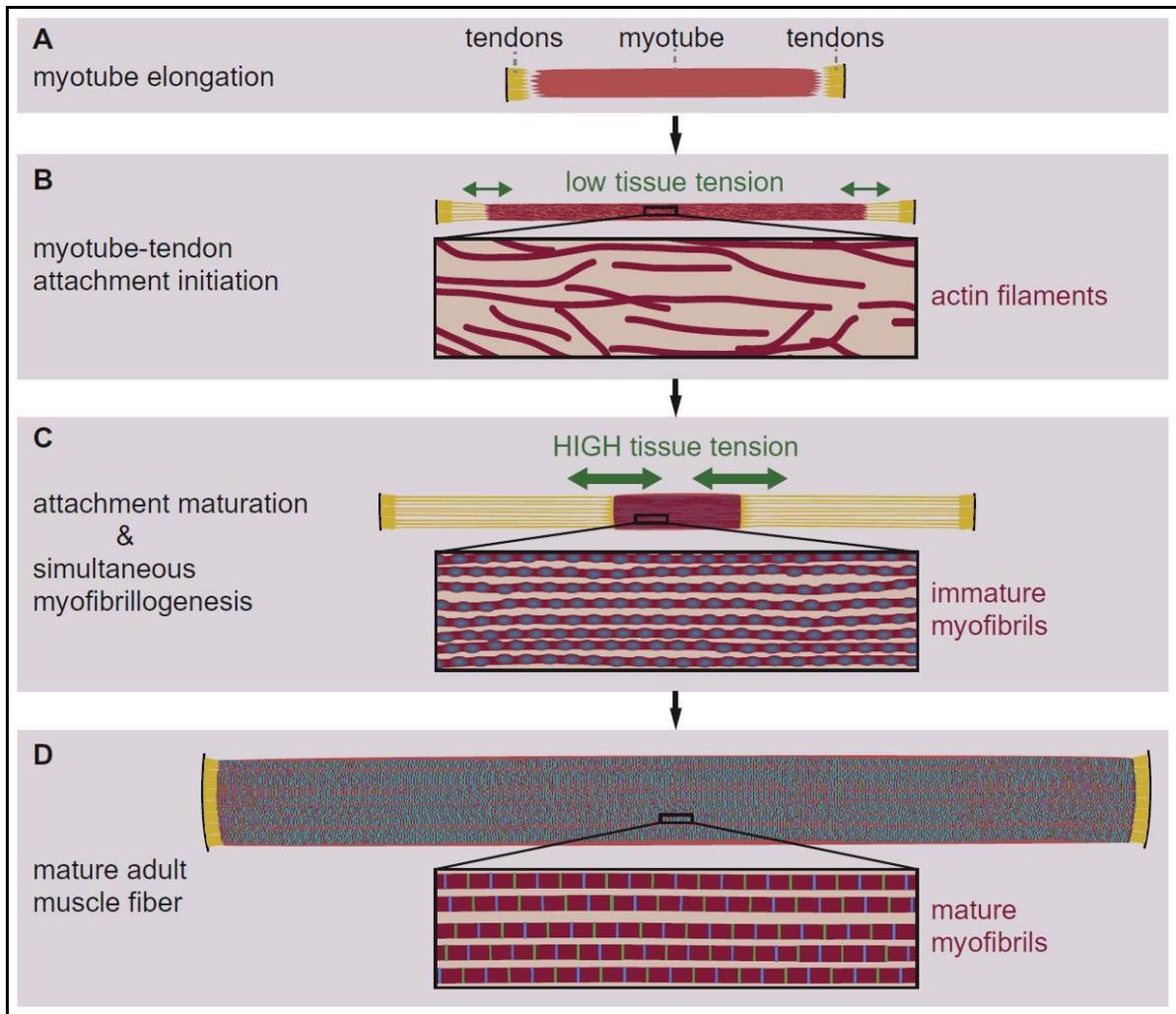


Figura 6. Desarrollo de los músculos indirectos de vuelo de *Drosophila*. (A) El miotubo (en rojo) se alarga hacia su tendón diana (en amarillo). (B) El miotubo inicia la unión a las células del tendón. Los filamentos de actina en el miotubo son cortos, pero preferentemente orientados a lo largo del eje del músculo largo; la tensión del tejido es baja (flechas verdes). (C) Durante la maduración de unión, se genera la compactación del miotubo y alta tensión del tejido (flechas verdes). Al mismo tiempo, las miofibrillas inmaduras se forman simultáneamente a través del miotubo. (D) La fibra muscular crece en longitud y anchura, y finalmente maduran hasta alcanzar su tamaño final. (Tomada de Lemke y Schnorrer 2016).

6.4 La ontogenia del tejido muscular de *Drosophila*

La miogénesis en *Drosophila* durante el desarrollo embrionario incluye la proliferación de mioblastos, su migración y alineación física, y finalmente su diferenciación. En *Drosophila*, la miogénesis se produce en dos momentos. La primera ocurre durante la embriogénesis, aquí se generan los músculos de la etapa larvaria (Bate *et al.* 1991), que luego desaparecen durante la metamorfosis. La segunda etapa de miogénesis ocurre durante la pupación, y conduce a la formación de los músculos de la pared corporal, patas y los músculos de vuelo necesarios para la etapa adulta (Fernandes *et al.* 1991; Roy y Vijay Raghavan 1998; Sudarsan *et al.* 2001).

Los mioblastos primordiales de los músculos de vuelo están ubicados en la superficie basal del epitelio columnar de los discos imagales, así como en las proximidades de las ramas traqueales. Los mioblastos proliferan durante el tercer estadio larvario (L3) para posteriormente extenderse sobre la mayor parte del lado dorsal de los discos imagales (Sudarsan *et al.* 2001; Gunage *et al.* 2014).

La función primordial de los músculos de vuelo del adulto es realizar y coordinar el movimiento de las alas y la cutícula torácica para ejercer el vuelo. Los músculos son oxigenados constantemente por las traqueolas, una red de tubos delgados unidos a los sacos aéreos dorsales torácicos que, a su vez, se generan a partir del primordio del saco aéreo (ASP, Air Sac Primordium). El cual es el progenitor de los sacos aéreos dorsales y de las traqueolas que penetran los músculos de vuelo para oxigenarlos (Sudarsan *et al.* 2001; Sato y Kornberg 2002; Gunage *et al.* 2014; Huang 2015). La anatomía y fisiología de los músculos, las alas, la cutícula torácica y la tráquea están íntimamente ligadas. Las células progenitoras de los músculos de vuelo se desarrollan junto a los discos imagales del ala (Figura 7) (Sato y Kornberg 2002; Huang 2015).

Durante la metamorfosis de *D. melanogaster* ocurre la formación de los músculos de vuelo del organismo adulto (Merkey *et al.* 2011; Zeng y Hou 2012; Lyubov y Douglas 2013; Kuleesha *et al.* 2016). Durante este proceso la mayoría de los tejidos de la larva sufren histólisis, incluyendo los músculos y tejidos adultos se forman *de novo* a

partir de células imagales (Fernandes y Keshishian 1999; Roy y VijayRaghavan 1999; Dutta *et al.* 2004). Otros tejidos larvales no son degradados completamente, por ejemplo, el sistema traqueal y parte del sistema nervioso se someten a la eliminación de algunas de sus ramas y luego se remodelan (Truman 1990; Marin *et al.* 2005; Weaver y Krasnow 2008).

Drosophila dispone de dos sistemas musculares distintos durante su ciclo de vida, el embrionario-larvario y el de la etapa adulta. En estas etapas se han descrito varios tipos de músculos, incluyéndose el músculo somático, el músculo visceral, y el músculo cardíaco, todos ellos se desarrollan del mesodermo embrionario y cada uno presenta un patrón morfofuncional específico y definido en cada estadio de desarrollo. Los músculos hipodérmicos o somáticos son fibras únicas, multinucleadas, se establecen en el embrión tardío y permanecen sin cambios a medida que la larva experimenta dos mudas antes de la pupación; poseen tamaños, formas y sitios característicos de adherencia epidérmica, se encargan de mantener la integridad de la larva, así como su locomoción. Por otro lado, los músculos viscerales longitudinales y transversales, son los responsables de los movimientos peristálticos del sistema digestivo y, por último, los músculos alares que sostienen y mueven el vaso dorsal o cardíaco, estos combinan las funciones del corazón y la aorta de los vertebrados (Bate 1990; Couso *et al.* 1993).

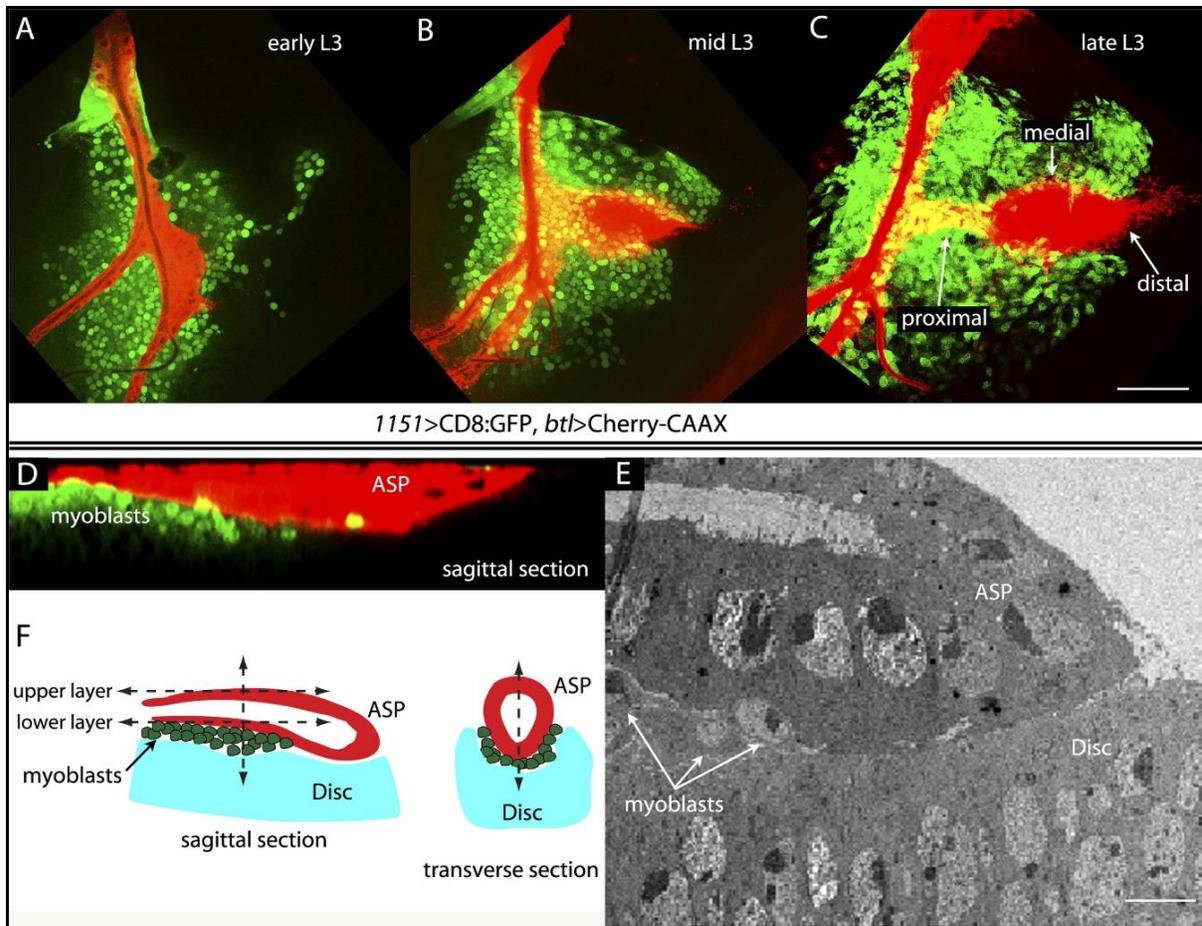


Figura 7. La proximidad de los mioblastos al disco imagal del ala y al primordio del saco aéreo (ASP). (A-C) Imágenes confocales muestran la tráquea y los mioblastos en etapas temprana (A), media (B) y tardía (C) de L3. (Genotipo: *1151-Gal4/+; btl-LHG/+; UAS-CD8GFP/lexO-mCherry-CAAX*). Escala de la barra: 50 μm . (D) La sección transversal sagittal muestra mioblastos adyacentes a la porción proximal del ASP. Genotipo como en (A-C). Escala de la barra: 50 μm . (E) Figura de microscópica electrónica que muestra una vista sagital del epitelio columnar del disco del ala, mioblastos asociados (flechas blancas) y el ASP. Escala de la barra: 5 μm . (F) Dibujo que ejemplifica una sección transversal del ASP (rojo) y del epitelio del disco del ala (azul). En el dibujo de la izquierda, las líneas punteadas representan las posiciones aproximadas de la capa superior e inferior del ASP y la línea vertical discontinua corresponde a la ubicación de la sección óptica transversal a la derecha (Tomada de Huang 2015).

6.5 Desarrollo de los músculos de vuelo de *Drosophila*

Los músculos de vuelo de *Drosophila* se forman a partir de células primordiales de músculo adulto (AMPs, por sus siglas en inglés) (Borkowski *et al.* 1995; Baylies y Bate 1996; Baylies *et al.* 1998; Currie y Bate 1991; Fernandes *et al.* 1991; Roy y VijayRaghavan 1999) las cuales se originan del mesodermo embrionario y proliferan post-embrionariamente formando los primordios precursores (Bate *et al.* 1991; Fernandes *et al.* 1991; Roy y VijayRaghavan 1999). Los AMPs están asociados al epitelio columnar del disco imagal del ala, están ubicados por debajo de la membrana basal, muy cercanos de las ramas traqueales. Los AMPs son una población de células madre que preparan las primeras fases de desarrollo de los músculos de vuelo del adulto, estas células comienzan a proliferar rápidamente a través de divisiones simétricas y son seguidas por un cambio a divisiones asimétricas en las que los AMPs se auto-renuevan generando mioblastos post-mitóticos para finalmente aumentar en número de aproximadamente 250 a 2500 células en la larva de tercer estadio de desarrollo (L3) y conforme va creciendo la población celular se van extendiendo sobre el disco imagal del ala, en donde se desarrollan las células que producirán la cutícula del primordio (Sudarsan *et al.* 2001; Gunage *et al.* 2014). Durante el desarrollo embrionario tardío, los AMPs que van a formar los músculos de vuelo se sitúan en el segmento metatorácico T2 y los que van a formar los músculos de los halterios (alas transformadas) se ubican en el segmento metatorácico T3 (Roy *et al.* 1997; Sudarsan *et al.* 2001). Durante el inicio de la proliferación, el número de AMPs en los segmentos T2 y T3 se mantiene invariable, en seguida se observa una mayor proliferación en los AMPs del T2 con respecto a los AMPs del segmento T3 (Fernandes *et al.* 1994; Roy *et al.* 1997). Para el análisis del desarrollo de los músculos indirectos de vuelo, en *Drosophila* se han hecho construcciones genéticas utilizando la proteína verde fluorescente (GFP) como reportero, que a su vez es regulada por el promotor *UH3-Gal4* del gen de la troponina, este sistema ha permitido el seguimiento del desarrollo de los IFMs en la mosca ya que su expresión es exclusiva en los IFMs (Figura 8) (Herojeet *et al.* 2014).

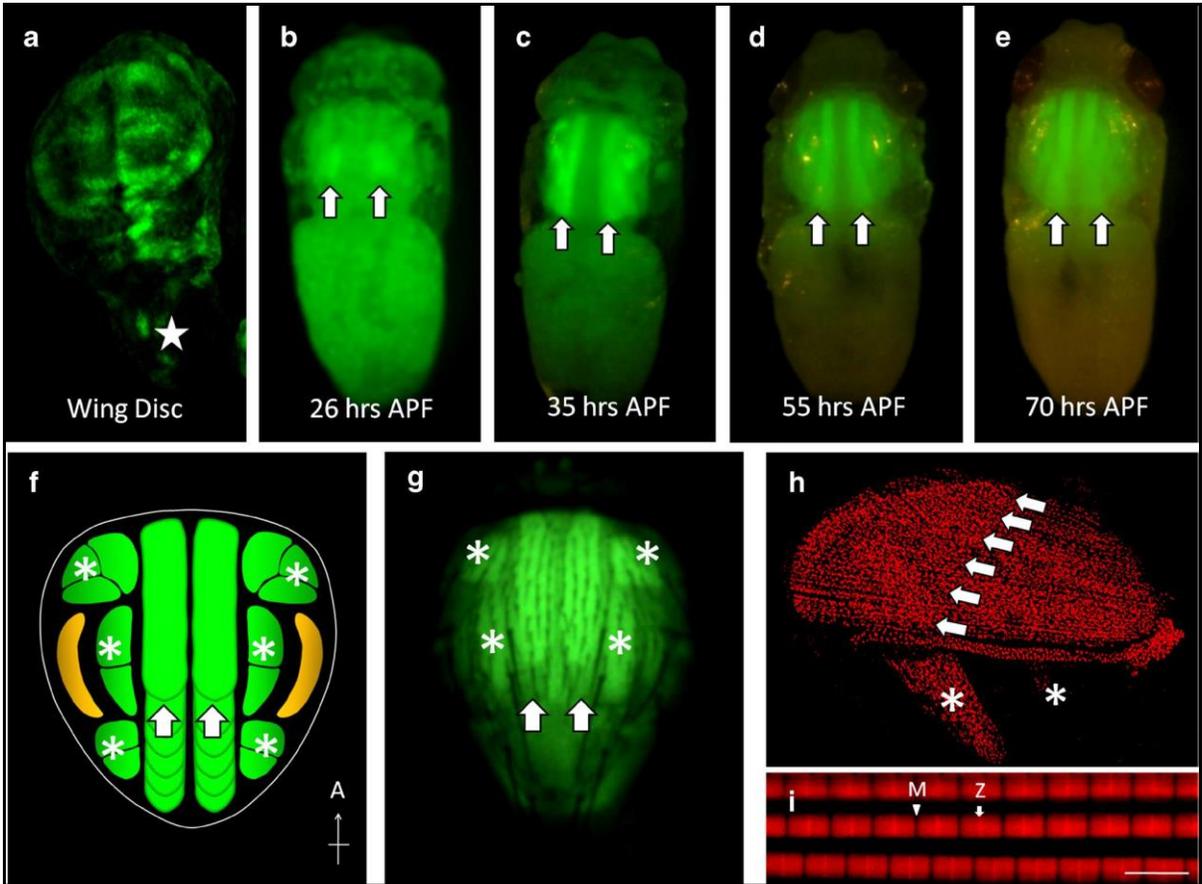


Figura 8. Desarrollo de los músculos de vuelo de *Drosophila*. Imágenes de fluorescencia del gene reportero GFP *UH3-Gal4* expresado bajo el control del gen de troponina. (a) Disco imagal del ala de una L3 de *D. melanogaster*. que muestra una alta expresión de troponina en la región basal (la estrella indica la región del *notum*). (b-e) Pupas a diferentes tiempos de desarrollo donde se muestra la formación de los músculos indirectos de vuelo (IFMs) usando como marcador la expresión de GFP (f). Esquema de la vista del plano dorso-coronal del tórax de la mosca adulta. Los músculos dorso-longitudinales (DLMs) están organizados en dos grupos de seis unidades colocados a lo largo del tórax, alineados verticalmente siguiendo el eje medio anteroposterior (flechas), también se indican tres fascículos separados de los músculos dorsoventrales (DVMs) empaquetados en fibras musculares 3: 2: 2 (asteriscos). El músculo de salto está representado por dos estructuras en forma de media luna color naranja, en la esquina inferior derecha se representa la posición anatómica (A). (g) En el tórax de un adulto se observa una alta expresión de GFP en los IFMs. (h) Hemitórax que muestra la expresión de *UH3-Gal4* tanto en DLMs y DVMs representados por flechas y asteriscos, respectivamente. (i) Miofibrillas marcadas con faloidina TRITC de *UH3-Gal4*. Los DLM y los DVM están representados por flechas y asteriscos, respectivamente. M y Z indican la línea M y el disco Z, respectivamente. Escala =5 μm . (Tomada de Herojeet *et al.* 2014).

Al iniciar la metamorfosis, todas las fibras musculares larvales son histolizadas, excepto dos conjuntos de músculos larvales: el músculo intersegmentario abdominal, que se transformará en los músculos dorsales oblicuos temporales (DOMs, *Dorsal Oblique Muscles*) (Kimura y Truman 1990; Wasser *et al.* 2007); y el conjunto, formado por los tres músculos oblicuos de la larva (LOMs, *Larval Oblique Muscles*) que darán origen a seis músculos indirectos de vuelo (IFMs, *Indirect Flight Muscles*) (Fernandes *et al.* 1991a; Fernandes y Keshishian 1996). Aunque los LOMs escapan a la histólisis, durante su desarrollo muestran vacuolas como signos de degeneración. En ausencia de mioblastos imagales, los LOMs no se dividen y se degeneran (Roy y VijayRaghavan 1998), lo que indica que los mioblastos son necesarios para su supervivencia y remodelación.

De acuerdo con su función, los músculos de vuelo se clasifican en dos grandes grupos, el primer grupo está integrado por los músculos directos de vuelo (DFMs, *Direct Flight Muscles*) y el segundo por los músculos indirectos de vuelo (IFMs). Los DFMs están ubicados cerca de la bisagra del ala y su contracción permite un control fino de la posición y orientación de las alas durante el vuelo (Bate *et al.* 1991; Fernandes *et al.* 1991b), éstos son pequeños músculos tubulares que surgen de la fusión de las células epiteliales cercanas y expresan altos niveles de la proteína Cut (CT) (Sudarsan *et al.* 2001). Con respecto al segundo grupo, los IFMs, éstos son los más grandes y constituyen el mayor volumen de los músculos torácicos, participan en el vuelo por deformación del tórax, tienen una estructura estriada semejante a los músculos de organismos vertebrados (Figura 9) (Bate *et al.* 1991). A su vez, los IFMs se subdividen en dos subgrupos, los músculos dorsolongitudinales (DLMs, *Dorsolongitudinale Muscles*) y los músculos dorsoventrales (DVMs, *Dorsoventral Muscles*). Por cada hemitórax, los IFMs tienen un paquete de seis fibras de DLMs y tres paquetes de DVMs. Los DVMs están integrados por tres fibras DVMs I, dos fibras DVMs II, y dos fibras de DVMs III. En total, los IFMs están integrados por doce fibras DLMs y catorce fibras DVMs dentro del tórax (Bate y Arias 1991; Curri y Bate 1991; Fernandes *et al.* 1991b).

El desarrollo y remodelación de los DLMs depende de una población de mioblastos indiferenciados, diferentes de los generados durante la miogénesis embrionaria de *Drosophila* (Soler y Taylor 2009).

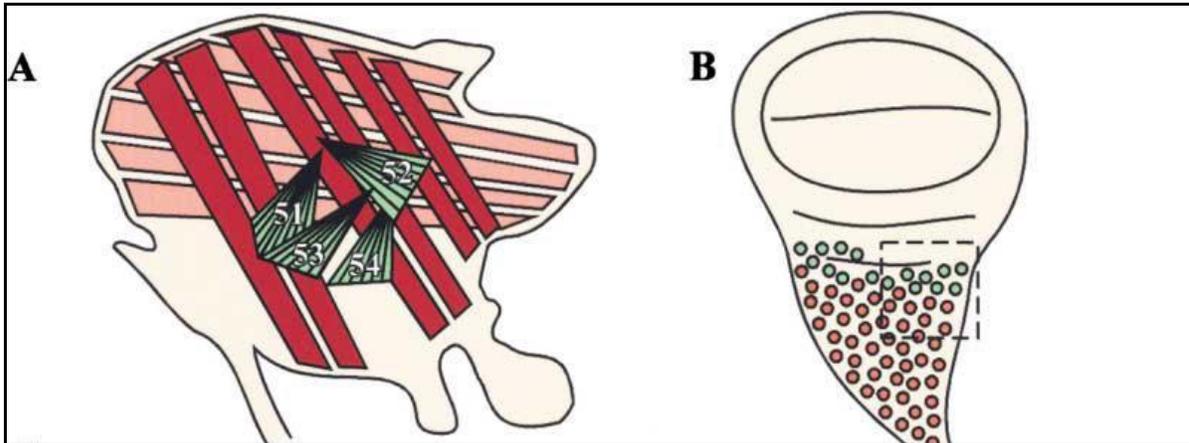


Figura 9. Origen de los músculos de vuelo de la mosca adulta. (A) Diagrama de un tórax adulto que muestra los músculos indirectos de vuelo (IFMs en rojo) y los músculos directos de vuelo (DFMs en verde). Los DFMs están integrados por cuatro conjuntos de músculo (numerados del 51-54) y hay dos grupos de IFMs, los músculos dorso-longitudinales (DLMs, rojo pálido) y músculos dorsoventrales (DVMs, rojo oscuro). (B) Diagrama del disco del ala que muestra los mioblastos que recubren el epitelio del primordio. Las células que expresan Cut se muestran en verde y las que expresan el factor de transcripción Vestigial (Vg) en rojo. (Tomada de Sudarsan *et al.* 2001).

6.5.1 Formación de las miofibras mediante la fusión de los mioblastos

El desarrollo muscular comienza con la especificación del destino de dos tipos de mioblastos, las células fundadoras (FC) y los mioblastos competentes de la fusión (FCMs), que a su vez se fusionan para formar un miotubo multinucleado. Cada miotubo se alarga y se fija establemente por sus extremos a las células del tendón. Sólo después de su unión se ensamblan sus miofibrillas y así da lugar a una fibra muscular (Dobi *et al.* 2015).

Cada músculo es formado a partir de un único mioblasto especializado, llamado célula fundadora, que en seguida se fusiona con otros mioblastos cercanos para formar una fibra sincitial (Baylies *et al.* 1998; Frasch 1999; Taylor 2002; Chen y Olson 2004). Aproximadamente 8 h APF los mioblastos migran de los discos imagales para rodear los tres músculos larvales oblicuos (LOMs) e iniciar la fusión entre ellos y entre las 12 y 20 h APF los mioblastos se fusionan con los LOMs y éstos se vacuolizan y se dividen en seis DLMs y hacia las 30 h APF la mayoría de los mioblastos se han fusionado con los DLMs recién formados. La fusión completa entre los DLMs en desarrollo y los mioblastos se logra hasta las 36 h APF. Las miofibras generadas se diferencian y se agrandan para completar la formación del músculo adulto (Fernandes *et al.* 1991). Inicialmente, los IFMs son gruesos y delgados, de 1.6 μm en la etapa de pupas tempranas, estos aumentan de longitud hasta alcanzar un milímetro aproximadamente en el adulto, tienen un diámetro entre 100 y 200 μm y cuando se observan en sección transversal presentan una forma ovalada (Figura 10) (Reedy y Beall 1993; Josephson 2005).

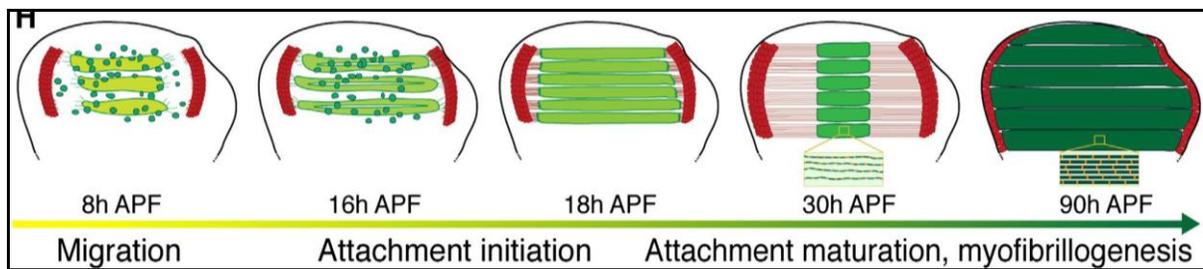


Figura 10. Desarrollo de los músculos dorsolongitudinales (DLMs) de *Drosophila*. Los tendones se muestran en rojo, los mioblastos y los DLMs en verde. El zoom a las 30 h y 90 h APF muestra la organización miofibrilar. (Tomada de Weitkunat *et al.* 2014).

6.6 Genes que participan en proliferación y especiación celular

Las funciones y los destinos celulares específicos dependen de la expresión génica diferencial, la cual ocurre inicialmente a nivel transcripcional y que son controladas por un complejo de redes regulatorias de factores de transcripción (TFs) (Rhee *et al.* 2014). Dada su función en diversos procesos celulares es de gran relevancia analizar algunos genes durante el desarrollo de los precursores de los IFMs en el mosquito.

6.6.1 Glial cells missing (Gcm)

La función de los genes Gcm se comenzó a analizar en mutantes del desarrollo de axones de *D. melanogaster* (Hosoya *et al.* 1995; Jones *et al.* 1995). Altos niveles de expresión de la proteína GCM dirigen la diferenciación de las células precursoras de neuronas hacia células gliales, mientras que durante su ausencia induce predominantemente la maduración a neuronas (Jones 2001; Van De Bor y Giangrande 2002).

Los genes Gcm (Glide; Glial cells missing o Glial cell deficient) codifican factores de transcripción de la familia dedos de zinc, tienen un dominio GCM de unión a DNA que reconoce la secuencia consenso (5'-ATGCGGGT-3'). El dominio GCM consta de 150 aminoácidos altamente conservados (Akiyama *et al.* 1996; Schreiber *et al.* 1997; 1998; Cohen *et al.* 2002; 2003). Los factores de transcripción Gcm participan en el control de la diferenciación de células gliales, hemocitos y tendones en *Drosophila* (Vincent *et al.* 1996; Van De Bor y Giangrande 2002; Soustelle *et al.* 2004; Cattenoz *et al.* 2016a; 2016b).

En mamíferos se han identificado dos genes Gcm, nombrados GCMa/Gcm1 y GCMb/Gcm2 (Akiyama *et al.* 1996; Kim *et al.* 1998; Schreiber *et al.* 1998).

6.6.2 Lozenge

Las proteínas con dominios Runt comprenden una familia de reguladores transcripcionales conservados, en los que se incluye a Runt y Lozenge (Lz) de *D. melanogaster*, Cs-runt de la araña *Cupiennius salei*, SpRunt del erizo de mar, Xaml de *Xenopus* y las proteínas AML1/PEBP2 α /CBF α de mamíferos (Kagoshima *et al.* 1993; Coffman *et al.* 1996; Daga *et al.* 1996; Tracey *et al.* 1998; Damen *et al.* 2000). El dominio Runt consta de 128 aminoácidos y es responsable de la unión al DNA y

su dimerización con la proteína *Brother (Bro)* y/o *Big-brother (Bgb)* (Ogawa *et al.* 1993; Golling *et al.* 1996).

La proteína Lz de *Drosophila* participa en la diferenciación y determinación del destino celular en el desarrollo del ojo, de la antena y la garra dorsal, en la hemopoyesis y la fertilidad de la hembra (Stifani *et al.* 1992).

6.6.3 Serpent

Los factores GATA son una familia de factores de transcripción, conservados desde las levaduras a los vertebrados, tienen de uno a dos motivos del tipo de dedos de zinc correspondientes a Cys-X-Asn-Cys-X₁₇-Cys-Asn-Ala-Cys y actúan como factores de transcripción que reconocen y se unen con alta afinidad al motivo consenso de DNA (A/T)GATA(A/G) de los genes blanco (Evans y Felsenfeld 1989; Tsai *et al.* 1989; Orkin 1992). Los factores GATA regulan una variedad de procesos del desarrollo, diferenciación, así como el control de la proliferación celular (Lowry y Atchley 2000; Patient y McGhee 2002).

En vertebrados, los genes GATA están clasificados en dos grupos, *GATA-1/-2/-3* involucrados en la hematopoyesis y *GATA-4/-5/-6*, necesarios para el desarrollo de los tejidos derivados del endodermo (Arceci *et al.* 1993; Bossard y Zaret 1998; Fujikura *et al.* 2002).

Los genes GATA también son esenciales para el desarrollo del endodermo en los organismos protostomados *Caenorhabditis elegans* y *D. melanogaster* (Maduro y Rothman 2002; Murakami *et al.* 1999).

6.6.4 Notch

La señalización Notch es un proceso de comunicación célula-célula que permite el establecimiento de patrones de expresión y diferenciación génica, regula la elección del destino de una célula binaria y el mantenimiento de las poblaciones de células madre. Los genes Notch conforman una familia de receptores que participan en eventos de señalización de corto alcance. Un gene Notch típico codifica un solo receptor transmembranal, constituido en su región extracelular por una secuencia conservada de hasta 36 repetidos similares al del factor de crecimiento epidérmico (EGF), implicado en la interacción del ligando, y tres repetidos yuxtamembranales

conocidos como repetidos Lin-12-Notch (LN) que modulan las interacciones entre los dominios extracelulares y dominios intracelulares vinculados a la membrana (Wharton *et al.* 1985; Yochem *et al.* 1988). La primera mutante Notch fue aislada en *Drosophila* (1914), la cual mostraba letalidad y una muesca haploinsuficiente del ala que le da el nombre al gene (Metz y Bridges 1917).

En mamíferos hay cuatro genes *Notch* y cinco genes que codifican ligandos de Notch, tres Delta-like y dos Jagged, en *Drosophila* hay solo un gene que codifica *Notch* y dos ligandos, un homólogo de Delta y Jagged (Serrate) (Maine *et al.* 1995; Lissemore y Starmer 1999).

Al ser Notch una proteína transmembranal al igual que sus ligandos, el contacto célula-célula es un prerequisite imprescindible para desencadenar la cascada de señalización. Otra característica más de Notch es que actúa al mismo tiempo como receptor transmembranal y factor de transcripción (Lissemore y Starmer 1999).

6.6.5 Peroxidasinas

Las peroxidasinas (Pxn) son proteínas multidominio, contienen un dominio hemo de peroxidasa con alta homología a la lactoperoxidasa humana que efectúa reacciones de oxidación de uno y dos electrones. Las Pxn participan en la defensa antimicrobiana, la formación de matriz extracelular (ECM) y la consolidación en diversas etapas del desarrollo (Zamocky *et al.* 2008).

Las Pnx representan la subfamilia 2 de la superfamilia peroxidasa-ciclooxigenasa y están cercanamente relacionadas con las peroxidasas de los cordados (subfamilia 1) y las peroxinectinas (subfamilia 3). Mediante una reconstrucción filogenética de los genes que codifican Pxn tanto en vertebrados e invertebrados, se establecieron cinco clados, los primeros cuatro integran las Pxn de invertebrados, mientras que en el clado cinco se encuentran las oxidoreductasas de vertebrados (Soudi *et al.* 2012).

La primera Pxn humana se detectó en células de cáncer de colon, después se encontró en células de carcinoma escamoso de pulmón, en donde inicialmente se denominó gene 50 de melanoma (MG50) (Mitchell *et al.* 2000). En el genoma humano están codificadas dos Pxn (Zamocky *et al.* 2008), la peroxidasa vascular

(VPO) 1 y la 2 (en algunas ocasiones denominada peroxidasa cardíaca), en relación con su alta expresión en el sistema vascular (Cheng *et al.* 2008).

El genoma del nematodo *C. elegans* codifica dos genes ortólogos de peroxidasa, CelPxd01 (PXN-1) y CelPxd02 (PXN-2), ambas son peroxidasas extracelulares, con funciones aparentemente antagónicas (Gotenstein *et al.* 2010; Lee *et al.* 2015). El gene *pxn-2* se identificó tras el análisis de mutantes defectuosas en el desarrollo durante la etapa embrionaria de los gusanos y se ha observado que interviene en la unión músculo-epidérmica durante la morfogénesis embrionaria y en la guía específica del axón neural (Gotenstein *et al.* 2010; Lee *et al.* 2015). La mutación del gene *pxn-1* en *C. elegans* muestra alta letalidad en condiciones de estrés por calor y se ha observado su expresión en varios tejidos, incluyendo neuronas, músculos e hipodermis. La proteína es secretada y localizada en la matriz extracelular, particularmente a lo largo de los músculos de la pared del cuerpo y los músculos faríngeos (Lee *et al.* 2015).

6.7 Antecedentes directos

A pesar de la importancia fisiológica de los músculos de vuelo en los mosquitos vectores de enfermedades humanas, estos tejidos han sido poco estudiados en estos organismos, caso contrario a *D. melanogaster*, en donde se conoce gran parte de la biología molecular y celular del desarrollo de los IFMs, que también ha servido como modelo de estudio de miopatías en humanos.

Entre las funciones de los músculos de vuelo están las de accionar el vuelo en los adultos para salir del agua inmediatamente después de la emergencia, dispersarse para poder ser buenos transmisores de enfermedades, buscar el nectar de flores para alimentarse y conseguir la energía para volar, una pareja para aparearse y el huésped para alimentarse con sangre. En *Ae. aegypti*, los músculos de vuelo del mosquito sólo han sido descritos morfológicamente y de manera parcial en la etapa adulta (Lehane y Laurence 1977; Joblin 1985), pero se desconoce su ontogenia y formación durante la fase acuática de desarrollo.

En *Ae. aegypti* se conoce muy poco sobre la biología molecular del músculo de vuelo, durante la búsqueda de promotores que controlan genes específicos de sexo y estadio de desarrollo del mosquito, mediante la hibridación substractiva de bibliotecas de expresión de pupas hembras y machos, se encontró que el gene de Actina-4 (*AeAct-4*) se sintetiza específicamente y de manera abundante en los IFMs en pupas hembras. El gen *AeAct-4* es diferente de los otros 4 genes de actina descritos (*Act-1-5*), principalmente en la región nucleotídica 3'UTR (Muñoz *et al.* 2004).

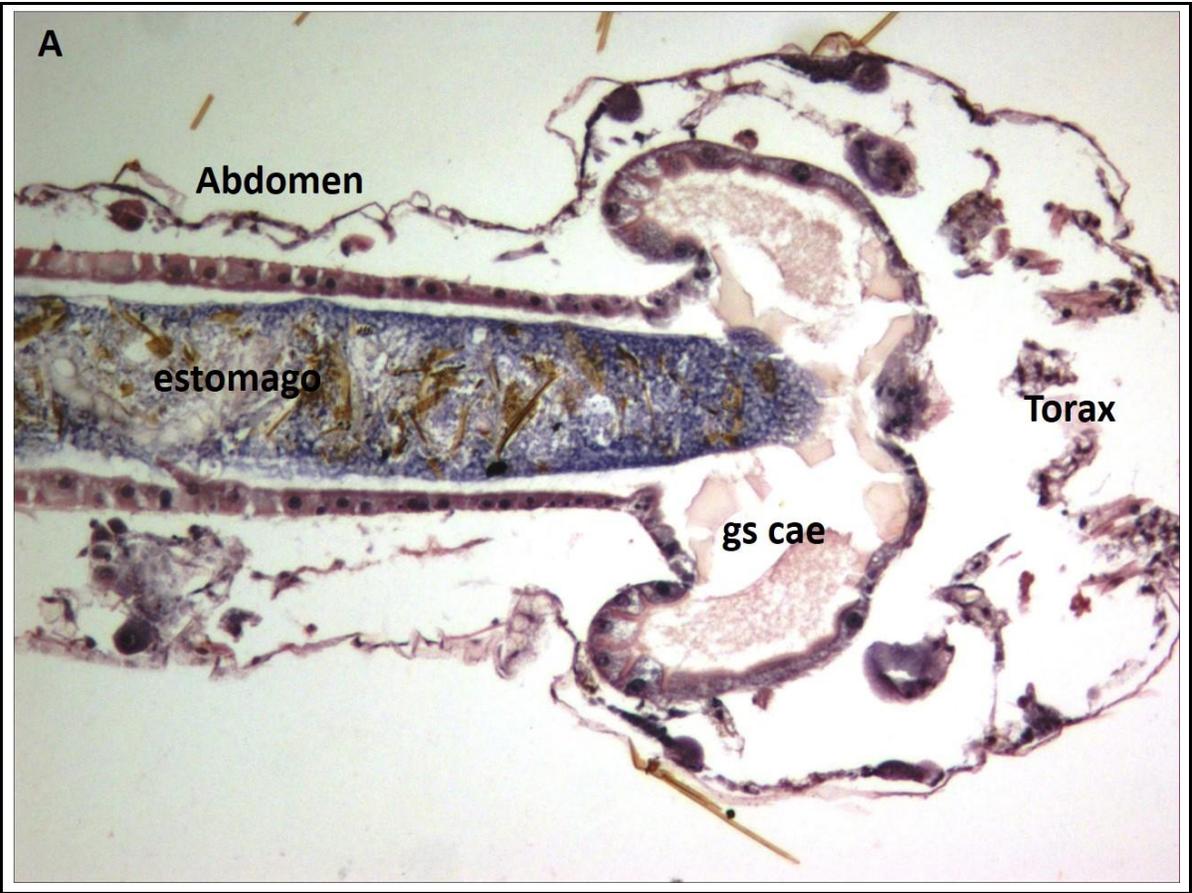
Uno de los estudios realizados en los músculos de vuelo de *Drosophila* demuestran la inducción de respuesta inmune innata, ya que, al ser retados con bacterias o parásitos, mostraron cambios en la expresión de péptidos antimicrobianos como Defensina, Diptericina, Drosomicina y Cecropina (Apidianakis *et al.* 2005; Chatterjee *et al.* 2016), además de otros genes relacionados con respuesta inmune en mutantes de miosina y tubulina de esos músculos (Madan *et al.* 2017).

Por otro lado, en el mosquito *Ae. aegypti* se han hecho algunos estudios en las mitocondrias de los músculos de vuelo para conocer su fisiología durante el

procesamiento de diferentes fuentes de energía (néctares de flores, azúcar o sangre), encontrando cambios morfológicos y moleculares en genes relacionados con el metabolismo oxidativo y energético de este organelo, lo que sugiere un mecanismo de adaptación a la hematofagia, además de facilitar su capacidad vectorial (Goncalves *et al.* 2009; Soares *et al.* 2015).

6.7.1 Histología de la región torácica de L4 de *Ae. aegypti*.

En experimentos previos sobre el desarrollo del mosquito *Ae. aegypti* en nuestro grupo de trabajo, se realizaron estudios histológicos de la región torácica de larvas L3 y L4 (Hernández-Martínez, comunicación personal). En estos ensayos, al analizar los cortes teñidos con hematoxilina-eosina (HE) en L4 se encontraron dos poblaciones de células formando estructuras, las cuales no se observaron al analizar diferentes cortes de la región torácica de L3 (Figura 11 A). Estas estructuras, por su ubicación y posición los hace fácilmente identificables en la región torácica, un par está en el lado anterior del tórax, en posición longitudinal, ambas poseen prolongaciones en formación, unidas a la lámina torácica. De su lado posterior, las estructuras se observan sueltas (Figura 11 B). Un segundo conjunto de estructuras (tres por hemisegmento) están ubicadas en la parte media del tórax, lateral al esófago, cercanos a las patas y alas ya formadas en L4. Particularmente estas estructuras se asemejan a discos ovalados (por la posición del corte histológico) con cuatro o cinco subunidades que lo conforman y están en posición vertical de acuerdo con el plano dorsal de los cortes analizados (Figura 11 C). De acuerdo con lo observado durante el desarrollo de los precursores del músculo de vuelo en *Drosophila*, estas estructuras sugirieron fuertemente que podían corresponder a los primordios precursores de los músculos de vuelo (PVM) del mosquito adulto, cuyo desarrollo inicia durante el estadio larvario. Basandonos en estas observaciones, en este proyecto nos propusimos estudiar el desarrollo de los IFMs durante la metamorfosis del mosquito *Ae. aegypti*.



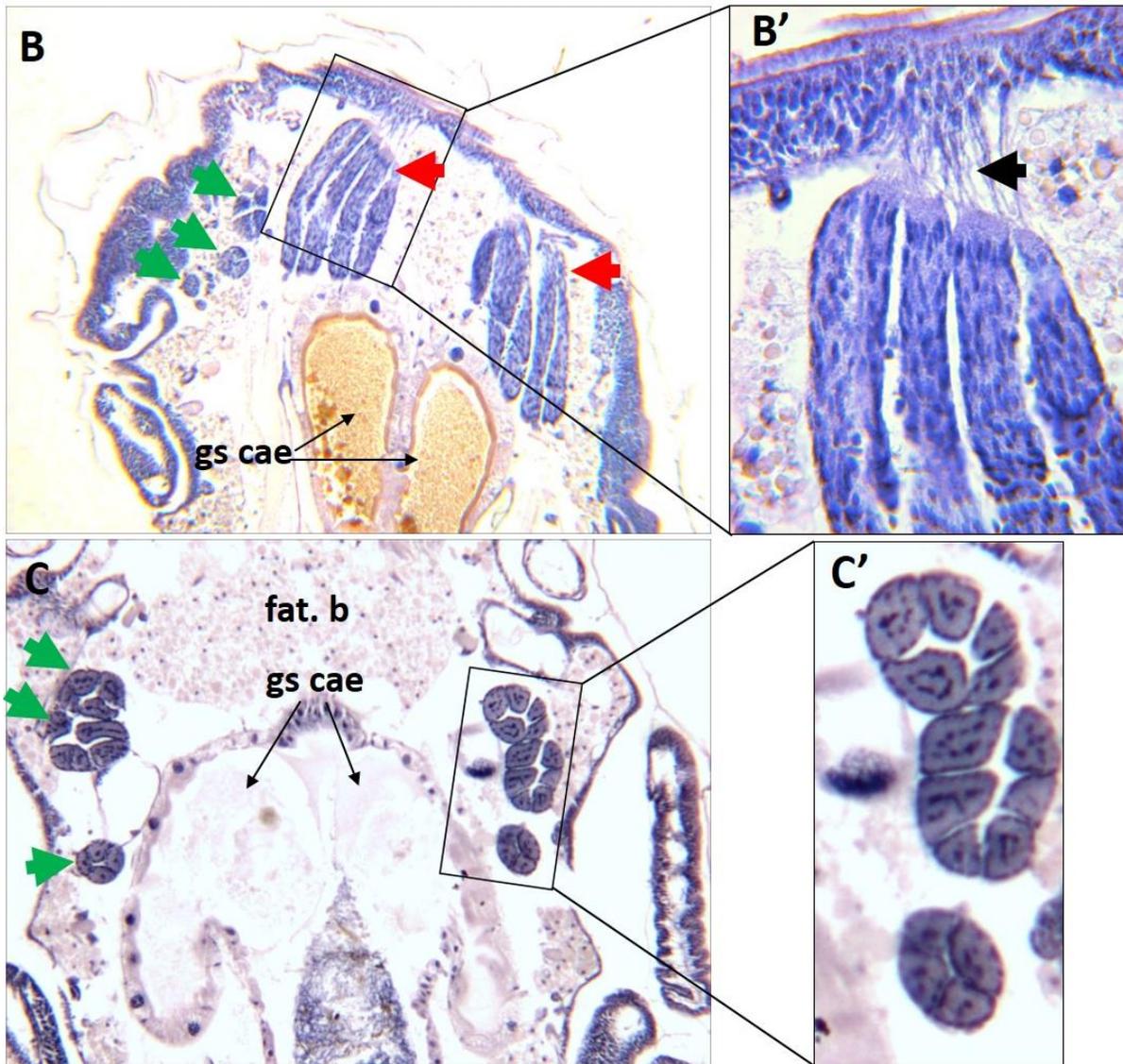


Figura 11. Cortes histológicos de la región torácica de L3 y L4. A) Corte histológico longitudinal de una L3 que muestra la región torácica, ausencia de los precursores musculares. B y C) Los cortes histológicos longitudinales de L4 muestran dos tipos de estructuras en la región torácica de L4. B) Estructuras alargadas unidas por su lado anterior a la lámina torácica. B') Detalle de la figura B donde se señalan las prolongaciones que unen las estructuras alargadas longitudinales a la lámina torácica frontal (flecha negra). C) Corte longitudinal del tórax que muestra grupos de células formando discos a los costados de la región torácica. fat. b=cuerpo graso; gs cae=ciego gastrico. Imágenes A, B y C 10X. (Hernández-Martínez, datos no publicados).

7. Justificación

La investigación del mosquito vector *Ae. aegypti* es de gran relevancia en México debido a su capacidad de transmitir agentes infecciosos que afectan a los humanos, entre los que destacan por su alta incidencia, los virus Dengue, Zika y Chikungunya, principalmente.

A través de la evolución, los mosquitos han desarrollado la capacidad del vuelo, que hace a las hembras hematófagas eficientes para alcanzar a sus huéspedes, animales y humanos, y obtener la sangre que requieren para la ovogénesis y asegurar la supervivencia de la especie. Los músculos trabajan durante el vuelo produciendo la fuerza necesaria para el movimiento dirigido y coordinado de las alas. Conociendo la importancia del vuelo de las hembras de *Ae. aegypti* en la propagación de los agentes virales en la población humana, resulta de gran interés identificar y describir el desarrollo de los músculos de vuelo.

8. Hipótesis

El desarrollo de los precursores de los músculos indirectos de vuelo de *Aedes aegypti* inicia en la etapa larvaria y se completa en la pupa tardía.

9. Objetivos

9.1 Objetivo General

Describir la formación de los músculos indirectos de vuelo durante la metamorfosis del mosquito *Ae. aegypti*.

9.2 Objetivos Particulares

1. Describir el desarrollo de los precursores de los músculos indirectos de vuelo en L4, pupa y el mosquito adulto.
2. Analizar la expresión transcripcional de genes relacionados con proliferación y especiación celular en los precursores de músculos indirectos de vuelo de L4.
3. Determinar el perfil proteico de los precursores de los músculos indirectos de vuelo de L4.

10. Materiales y métodos

10.1 Mosquitos

Para este trabajo se utilizaron mosquitos *Ae. aegypti* cepa Rockefeller proporcionados por el insectario del Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) de Cuernavaca, Morelos. Los mosquitos fueron crecidos a 28 °C, con una humedad relativa del 80% y fotoperiodos de luz/oscuridad de 12 h; se alimentaron con solución de sacarosa al 10% y para su reproducción, cuando fue necesario, se alimentaron con sangre de ratón. Las larvas se crecieron a una densidad de 500 larvas/litro de agua, alimentandolas con croquetas para gatos (Whiskas) pulverizadas y esterilizadas a 120°C a 20 lb por 20 min, permitiendo el desarrollo de las pupas, separando las tempranas (Pe) de las tardías (Pt) cuando fue requerido.

10.2 Disección de los precursores de los músculos indirectos de vuelo (PMV)

Los precursores de los músculos de vuelo (PMV) fueron disecados de larvas de cuarto estadio temprano (L4e, sifones aún no expuestos) y tardío (L4t, sifones expuestos) así como de pupas tempranas y tardías, y mosquitos adultos. Para este fin los especímenes se colocaron en una caja de Petri en hielo. Enseguida, se colocaron en un portaobjetos limpio con una gota de PBS (NaCl 137 mM, KCl 10 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 4.5 mM, pH 7.4), con agujas de disección se retiró la cabeza en el caso de las larvas y las patas, alas y cabeza en el caso de mosquitos adultos, después se realizó un corte entre el segundo y tercer segmento abdominal, la aguja de disección se insertó en la cavidad torácica y con el bisel de una aguja se cortó el lado ventral del abdomen, los órganos viscerales fueron desechados. El tejido se lavó suavemente con PBS 1X frío para eliminar la hemolinfa y el cuerpo graso. Los precursores de los DLMS están ubicados en la parte central del tórax, unidos por el lado anterior a la lámina torácica, en cambio los precursores de los DVMs están a los costados del vaso dorsal, junto a las patas que están en formación. Los precursores musculares se separaron cuidadosamente para no romperlos, se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml con PBS 1X en hielo y fueron utilizados para microscopía o para estudios de biología molecular.

10.3 Diseño de oligonucleótidos

Para analizar el desarrollo de los PMV del mosquito *Ae. aegypti*, se analizó la literatura para seleccionar genes de *D. melanogaster* que participan en proliferación y especiación celular (Tabla 1) (<http://flybase.org/>), y usando sus secuencias como sondas se realizó la búsqueda por BLAST de los posibles ortólogos en la base de datos del genoma versión AaegL5 de *Ae. aegypti* (<https://www.vectorbase.org/>). Los posibles ortólogos de *Ae. aegypti* se organizaron y almacenaron con el programa DNAsis Max V3.0, seleccionando las secuencias con mayor porcentaje de identidad. Una vez obtenidas las secuencias de los RNAm de los genes de la base de datos Vectorbase se utilizó el software de libre acceso, Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/site>) para diseñar los pares de oligonucleótidos que flanquean a estas secuencias y usarlos para amplificar fragmentos específicos en ensayos de RT-PCR (Tabla 2).

Gene e ID	% I	pl	PM	NR	DR
AAEL000623-RA (Glial cells missing)	62.31	6.96	60.67	545	Gcm
AAEL000631-RA (Glial cells missing)	62.37	8.18	60.58	547	Gcm
AAEL006167-RA (Lozange)	62.32	7.54	49.58	461	Runt
AAEL010222-RA (Serpent)	72.22	6.91	111.51	1034	GATA
AAEL018119-RA (L1)	57.84	6.05	36.83	324	NE
AAEL010210-RA (Notch)	65.62	5.04	280.62	2599	ANK, NOD, LNR, sitios de unión a Ca ²⁺
AAEL000342-RA (Peroxidasina)	62.32	6.50	100.69	886	Dominio tipo Pxn

Tabla 1. Genes involucrados en proliferación y especiación celular.

ID en VectorBase; % I=% Identidad; pl= punto Isoeléctrico; PM=Peso Molecular en kDa; NR=Número de Residuos de a.a; DR=Dominios Relevantes; NE=No Encontrado. Los datos de las proteínas son calculados bioinformáticamente.

Gene	Oligonucleótidos	Secuencia	Amplificado
Gcm-623 (AAEL000623)	Ae Gcm For (140-163)	ACTGCCGCTACATCTACCGTTCAA	180 pb
	Ae Gcm Rev (296-319)	TGGCAGGTCTCAGGTGAATCTTGT	
Gcm2-631 (AAEL000631)	Ae Gcm2 For (137-159)	TATCTGGCTGGGCTATGCGAAACA	131 pb
	Ae Gcm2 Rev (244-267)	TGCCGGTCGTAGATGTATTTGGCT	
Srp-222 (AAEL010222)	Serpent For (1814-1837)	TGGGCATAGAGGCGGACTTGTTTA	130 pb
	Serpent Rev (1920-1943)	ATCTTGTGATAGAGACCGCACGCA	
Notch-210 (AAEL010210)	Notch For (1650-1673)	ATTCACGGGTCTTCGCTGTCAGAT	156 pb
	Notch Rev (1782-1805)	GCGCAGTCGTTGATGTTCGTTTCA	
Loz-167 (AAEL006167)	Loz For (432-455)	GGGTGCATTCAATCCGTTTCATGCT	127 pb
	Loz Rev (535-558)	ATTCGGTTGACTCGCTTGTGCTG	
L1-554 (AAEL006554)	L1 For (141-164)	ATGCTACGAACACTCGCTCGAACT	141 pb
	L1 Rev (258-281)	ACAAACTCCAGAATCTCCGCCAGT	
Pxn-376 (AAEL000376)	Aed Pxn For (185-208)	TCACCATCGAACACGTCAAGGAGT	181 pb
	Aed Pxn Rev (342-365)	TTACAGGGCAACTCGATGGTCGTT	
S7 (AAEL009496)	S7 For (135-156)	GGGACAAATCGGCCAGGCTATC	298 pb
	S7 Rev (411-432)	TCGTGGACGCTTCTGCTTGTTG	

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para los experimentos de PCR punto final.

El nombre de los genes se asignó con base en la identidad de su secuencia con el posible ortólogo de *D. melanogaster*, y la designación utilizada aquí se formó con nombre abreviado del gene y los tres últimos dígitos del ID de VectorBase. Para la anotación de los oligonucleótidos, se tomó el nombre del gene abreviado y su orientación *Forward* (en sentido) y *Reverse* (en antisentido) y en cada uno se da su ubicación en el mensajero. La última columna muestra el tamaño del producto amplificado. La secuencia S7 corresponde a una proteína ribosomal de expresión constitutiva utilizada como control interno de expresión.

10.4 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Para evaluar la expresión transcripcional de los genes involucrados en el desarrollo de los músculos de vuelo, se procedió a extraer el RNA total de los precursores musculares por el método de TRIzol bajo las indicaciones del fabricante. Brevemente, a 200 precursores musculares se les adicionaron 200 μ l de TRIzol (No. Catálogo 15596026, Invitrogen), y se homogenizaron con un pistilo estéril. Posteriormente, al lisado se le adicionó 1 vol. de cloroformo y la muestra se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4 °C. A la fase acuosa superior se le adicionaron 2 vol. de isopropanol frío (No. Catálogo 19516, Sigma Aldrich), se incubó por 30 min a -20 °C y se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4 °C. La pastilla de RNA se recuperó, se lavó por centrifugación con 100 μ l de etanol al 70% (No. Catálogo 603002005, Merck), se resuspendió en 100 μ l de agua inyectable tratada con dietil pirocarbonato (DEPC, No. Catálogo 159220, Sigma Aldrich) y el material se almacenó a -70 °C. Para eliminar el DNA contaminante, las muestras fueron tratadas con DNasa TURBO (No. Catálogo AM1907, Ambion) bajo las instrucciones del fabricante. La ausencia de DNA se verificó por PCR utilizando al RNA como molde y los iniciadores para el gene constitutivo S7.

Para la preparación de DNA complementario (cDNA) a partir del RNA total libre de DNA genómico, en un tubo de 0.5 ml se colocaron 500 ng de RNA, 0.5 μ l de oligodT (250 μ g/ml) (No. Catálogo 18418-020, Invitrogen) y la mezcla se incubó a 70 °C por 10 min en un termociclador modelo 480 (Perkin Elmer). A continuación, se agregaron 2 μ l de amortiguador 5X, 1 μ l de DTT 0.1 M y 1 μ l de dNTPs 10 mM (No. Catálogo 18427013, Invitrogen), se llevó a un volumen final de 12 μ l con agua inyectable y la mezcla de reacción se incubó a 42 °C por 2 min. Posteriormente, a la mezcla se le agregaron 2U de enzima SuperScript II (No. Catálogo 18064014, Gibco-BRL), la mezcla se incubó a 42 °C durante 50 min y después la enzima se inactivó a 70 °C por 15 min. Las muestras generadas se utilizaron para ensayos de RT-PCR.

10.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final

Para preparar una reacción de amplificación de fragmentos de DNA por PCR se agregaron 2.5 µl de amortiguador 10X, 0.5 µl de Mg₂SO₄ 50 mM, 0.5 µl de dNTPs 10 mM, 0.5 µl del oligonucleótido directo y reverso a 10 pM, 50 ng de cDNA, 2U de enzima Taq polimerasa (No. Catálogo 10342020, Invitrogen), la mezcla se llevó a 25 µl con agua inyectable. Las condiciones generales para los ciclos de amplificación fueron: desnaturalización inicial: un ciclo único a 94 °C por 4 min; desnaturalización: 94 °C por 30 s, alineamiento: 60 °C (dependiendo de la temperatura de alineamiento del par de oligonucleótidos a utilizar) por 45 s, extensión: 72 °C (1kb/min), durante 35 ciclos; una extensión final a 72 °C por 10 min. De los productos de amplificación obtenidos, una parte se resolvió en geles de agarosa al 2% y otra se verificó por secuenciación en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca Mor.

10.6 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Los fragmentos de DNA, incluyendo los generados por PCR, se analizaron en geles de agarosa preparada en amortiguador TAE 1X (0.04 M Tris-Acetato, 0.001 M EDTA pH 8.0), a la cual se le agregó 1 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) y se vertió en el contenedor de Lucita de una cámara de electroforesis horizontal submarina de 8 cm de longitud (Gibco-BRL). El gel fue cubierto con amortiguador TAE 1X. 5 µl del producto de amplificación se mezclaron en 1 µl de amortiguador de carga 5X (Azul de bromofenol 0.25% p/v, azul de xilencianol, 30% glicerol en agua bidestilada), se depositaron en los pozos del gel y en un carril independiente se cargó 1 µL de marcador de banda Gene Ruler DNA Ladder Mix (No. Catálogo SM0331, Thermo Fisher Scientific). La resolución de las muestras se realizó a 100 Volts. La captura de las imágenes de los geles y el análisis densitométrico de las bandas se realizó en el equipo ImageQuant LAS4000 (General Electric Healthcare®).

10.7 Preparación de muestras para microscopía confocal

Para observar los PMV por microscopía confocal, los tejidos se fijaron en paraformaldehído (PFA, No. Catálogo 19208, Electron Microscopy Sciences) al 4% en amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 , NaHPO_4 0.4 M pH 7.4) durante 30 min, se lavaron dos veces (2x) con PBST 1X (PBS 1X, 0.1% de Tween 20). Las muestras se permeabilizaron 30 min en PBSt 1X (PBS 1X, 0.2% de Triton X100), se bloquearon 2 h en solución de bloqueo (PBS1X, 10% SFB, BSA 3%, glicina 10 mM) y se lavaron 3x con PBST. La incubación con los anticuerpos primarios se hizo en amortiguador de dilución (PBS1x, 3% SFB, 1% BSA, 15 mM glicina) por 3 h a temperatura ambiente (TA) o a 4 °C toda la noche. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-Myo1G (No. Catálogo ab121657, Abcam) dilución 1:300; anticuerpo de cadena pesada anti-miosina A4. 1025 (No. Catálogo 05-716, Millipore) dil. 1:300; anticuerpo A-140 anti-miosina de *An. albimanus* 1:300 (Lecona *et al.* 2016); anti-tubulina (No. Catálogo ab6160, Abcam) diluida 1:300. Los anticuerpos secundarios utilizados, anti-IgG de conejo Alexa Fluor 488 (No. Catálogo ab150089, Abcam) y anti-IgG de ratón Alexa Fluor 594 (No. Catálogo A-11032, Thermo Fisher Scientific) se utilizaron a una dilución 1:500. Para marcar la actina filamentosa se utilizó faloidina rodaminada (No. Catálogo R37112, Thermo Fisher Scientific) diluida 1:500 en PBS 1X, incubada durante 30 min a TA en oscuridad. Los precursores de los IFMs se lavaron 5x con PBST por 5 min, se colocaron en portaobjetos y se añadió VECTASHIELD con 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (No. Catálogo T0216, Vector laboratories) para la tinción de núcleos. Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 700 y las imágenes se analizaron con el software de libre acceso Zen-Lite (www.zeiss.com).

10.8 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Los PMV fijados con glutaraldehído se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol y fueron secados usando un protocolo de punto crítico de CO₂ en un aparato de Samdri (Tousimis Research Corporation). Después, las muestras fueron recubiertas con partículas de oro en un dispositivo de pulverización iónica (Jeol-JFC-1100) y finalmente se examinaron en el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Jeol JSM-7100F (Espinosa *et al*, 1998).

10.9 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para el análisis ultraestructural, los precursores de los IFMs se fijaron 1 h con 2.5% (v/v) de glutaraldehído en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.2. Enseguida se fijaron 1 h en tetróxido de osmio (v/v) al 1% en amortiguador de cacodilato. Después se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol y óxido de propileno. Las muestras fueron embebidas en resina epoxi Polybed (No. Catálogo 08792-1, Polysciences, Inc. Warrington, UK) y polimerizadas a 60 °C durante 24 h. Las secciones finas de aproximadamente 60 nm cortadas con cuchilla de diamante, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo antes de ser examinadas en un microscopio electrónico de transmisión JEM Jeol-1011. Para los experimentos de inmunomarcaje con partículas de oro de 20 nm, los precursores musculares se fijaron 1 h a TA con PFA al 4% y glutaraldehído 0.5% en PBS. Las muestras fueron embebidas en resina LR White (No. Catálogo 62661, Sigma-Aldrich) y se polimerizaron bajo UV a 4 °C toda la noche. Las secciones finas se incubaron por separado con el anticuerpo de ratón anti-actina o anti-miosina (1:20) (No. Catálogo ab8227 abcam y 05-716 Millipore, respectivamente) toda la noche a TA, a continuación, se incubaron, igualmente en experimentos separados, con anticuerpos IgGs anti-ratón conjugados con partículas de oro de 20 nm (1:60) (Ted Pella Inc.) (Chávez y Martínez 1995). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (xxxx)

10.10 Diseño de las sondas para FISH

Para estudiar la expresión y ubicación de algunos marcadores de desarrollo descritos en *Drosophila*, se utilizó la hibridación detectada por fluorescencia *in situ*, FISH (*fluorescence in situ hybridization*). Este método permite la visualización de RNAm mediante microscopia de fluorescencia en muestras de tejidos fijados. En este trabajo se utilizaron sondas de DNA generadas *in silico*, las cuales llevan un fluoróforo acoplado en su extremo 3'. Para el análisis por FISH de los genes de desarrollo utilizados en este trabajo se diseñaron sondas de DNA tomando como molde la secuencia complementaria del mensajero utilizando la plataforma Stellaris Probe Designer versión 4.0 (<http://www.biosearchtech.com/stellarisdesigner/>). Como control interno se utilizó el gen *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gapdh)*. Las sondas se mandaron a sintetizar a la compañía biosearchtech (www.biosearchtech.com) (Tabla 3) (Raj y Tyagi 2010; Shih *et al.* 2011).

Genes	Nombre de la sonda	Ex	Em
Glial cells missing	Gcm623-Ae-Quasar 670	647	670
Lozenge	Loz167A-Ae-TAMRA Dye	557	583
Serpent	Srp222A-Ae-Fluor Red 635	618	637
Notch	Notch210-Ae-Fluor Red 590	569	591
Peroxidasine	Pxn342-Ae-Fluor Orange 560	538	559
GAPDH	GAPDH-Quasar 570	548	566

Tabla 3. Lista de sondas moleculares y su fluoróforo acoplado. Los genes para la preparación de sondas se seleccionaron con base a lo reportado en *D. melanogaster* y a que se detectó su expresión mediante PCR punto final. Se eligieron cinco genes diana y el gene *gapdh* como control de expresión constitutiva. Para el etiquetado de cada sonda se tomó el nombre del gene, el ID de la secuencia en VectorBase y por último el fluoróforo acoplado a cada sonda. Ex=Longitud de onda de Excitación y Em=Longitud de onda de Emisión de cada fluoróforo utilizado.

10.11 Preparación de los precursores musculares para FISH

El método de detección de marcadores de desarrollo en mosquitos fue adaptado a partir del protocolo descrito por Abbaszadeh y Gavis, (2016). Brevemente, los precursores musculares se fijaron 30 min a TA en PFA 4% y se lavaron con PBST. En seguida las muestras se deshidrataron 5 min en PBST:MeOH 7:3, PBST:MeOH 1:1, PBST:MeOH 3:7 y 10 min en metanol 100%. Las muestras se rehidrataron en PBST:MeOH 3:7, PBST:MeOH 1:1, PBST:MeOH 7:3. La prehibridación se hizo por 10 min en 500 µl de amortiguador de lavado (WB): 4X SSC, 35% formamida desionizada, 0.1% Tween-20 a 37 °C. Se adicionaron 100 µl de amortiguador de hibridación (HB): 4X SSC, 35% formamida desionizada, 0.1% Tween-20, 2 mM vanadil ribonucleósido (No. Catálogo S1402S, New England Biolabs), 0.1 mg/ml DNA esperma de salmón, 100 mg/ml dextran sulfato, 20 µg/ml BSA libre de RNAsa (No. Catálogo B9000S, New England Biolabs) que contiene la sonda. La muestra se incubó por 16 h en oscuridad a 37 °C. Los precursores de los IFMs se lavaron 2x con WB precalentado a 37 °C y 4x con PBST. Se utilizó DAPI para contrastar los núcleos (Abbaszadeh y Gavis 2016). Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 700 y las imágenes se analizaron con el software de libre acceso Zen-Lite.

10.12 Preparaciones histológicas

Las preparaciones histológicas se realizaron con el apoyo y asesoría del doctor Salvador Martínez Hernández del INSP-Cuernavaca, Mor. Brevemente, para conocer el desarrollo y la ubicación anatómica de los precursores de los IFMs, tóraces de L4 y pupas completas fueron fijados con solución de Bouin (5% ácido acético, 5% formaldehído y 0.9% ácido pícrico) durante 24 h a TA y transferidas a etanol al 70% hasta el momento de ser embebidos en parafina. Las muestras fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol, infiltradas en Paraplast X-TRA (No. Catálogo P3808, Sigma-Aldrich) toda la noche a 58 °C y montadas en casetes. Se hicieron secciones seriadas de 8 µm con un micrótopo 820-II (Leica) y se colocaron en portaobjetos precubiertos con 3-aminopropiltriétoxissilano al 3% (No. Catálogo A3648, Sigma-Aldrich) en acetona. (alguna Ref de Chavita).

Para analizar los cortes mediante FISH, éstos se desparafinaron a 58 °C, se incubaron 2x durante 3 min en xilol (No. Catálogo 534056, Sigma-Aldrich), se rehidrataron en concentraciones descendentes de etanol y se lavaron con PBS-DEPC. Los portaobjetos se sumergieron 20 min en HCl 2 M, se lavaron 2x con PBS-DEPC, después se sumergieron en Triton X-100 PBS-DEPC-0.1% (No. Catálogo 1610407, Bio-Rad) por 10 min y se lavaron 3x con PBS-DEPC. Las muestras se incubaron con proteinasa K (10 µg/mL en PBS-DEPC) (No. Catálogo P6556, Sigma-Aldrich) precalentada a 37 °C, los portaobjetos fueron colocados en una cámara húmeda e incubados 20 min a 37 °C. La reacción fue detenida lavando con PBS-DEPC y 5 min en glicina al 0.2% en PBS-DEPC. Posteriormente, las muestras fueron fijadas 10 min en PFA 4% sobre hielo y se lavaron 3x con PBS-DEPC. En seguida se siguió el protocolo para FISH previamente descrito (Abbaszadeh y Gavis 2016).

10.13 Extracción de proteínas

Para el análisis de proteínas, se disecaron 500 PMV de L4, se lavaron con PBS 1X, se agregó amortiguador de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, desoxicolato de sodio 0.5% y NP-40 1%) con inhibidores de proteasas Complete (No. Catálogo 11 697 498 001, Roche Diagnostics) y fosfatasas PhosSTOP (No. Catálogo 04 906 837 001, Roche Diagnostics), EDTA 0.5 M, *N,N* Bis-salicilaldehído *etilendiamina* 200 mM (PMSI). Las muestras fueron maceradas mecánicamente con un pistilo eléctrico a 4 °C, con dos ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido/hielo. Las muestras se centrifugaron a 13, 000 x g por 10 min a 4 °C para remover el material insoluble. El sobrenadante se recuperó y las proteínas se precipitaron con tres volúmenes de acetona a -20 °C toda la noche. La muestra se centrifugó a 15, 000 x g por 20 min a 4 °C. La pastilla de proteínas se disolvió en amortiguador de muestra con IPG (GE HealthCare) al 2% en presencia de inhibidores de proteasas.

10.14 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se cuantificó utilizando el kit BCA Protein Assay siguiendo las instrucciones del fabricante (No. Catálogo 23225, Pierce Thermo Scientific). Se utilizó como estándar albumina sérica bovina a una concentración de 2 mg/ml. La cuantificación se realizó en el espectrofotómetro DU 640 (Beckman).

10.15 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

La separación de proteínas por peso molecular se realizó mediante electroforesis en una dimensión en condiciones reductoras, en geles al 12 % de poliacrilamida (PAGE) en presencia de duodecil-sulfato de sodio (SDS) (Laemmli *et al.* 1970). Se prepararon dos geles, los cuales se dejaron madurar durante un día a TA. El corrimiento electroforético se realizó a 80 V durante aproximadamente 2 h en un equipo Mini-Protean II (Bio-Rad). Para cargar las muestras, a 70 µg de extracto proteico se le adicionaron 2 µl de β-mercaptoetanol y 2 µl de azul de bromofenol al 10% y se sometieron a ebullición en baño María por 5 min, la muestra se concentró por centrifugación. Para la estimación del peso molecular se cargó un carril del gel con una mezcla comercial de marcadores con los valores de 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, y 250 kDa (Precision Plus Protein Bio-Rad, No. Catálogo 161-0374). El amortiguador de corrimiento se preparó con Trizma base 0.025 M (No. Catálogo 161-0719, Bio-Rad), Glicina 0.192 M (No. Catálogo 161-0724, Bio-Rad) y SDS al 0.1%, pH 8.3. Los geles se fijaron en una solución de etanol al 30 %, y ácido acético al 10% en agua bidestilada y se tiñeron con Bio-Safe™ Coomassie G250 (No. Catálogo 1610787, Bio-Rad) y se destiñeron en H₂O MiliQ (MQ). La identificación del perfil proteico por espectrometría de masas de ambos geles se realizó de manera separada en dos laboratorios diferentes, uno fue en el Área de Proteómica de la Unidad Irapuato (por la **Dra. Alicia Chagoya López**), y otro se analizó en la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica, LaNSE, ambos del Cinvestav-IPN (por el **M. en C. Emmanuel Ríos Castro**). La preparación de las muestras, así como el procesamiento de los datos se describe en el siguiente apartado.

10.16 Espectrometría de masas

a) Preparación de las muestras en el Área de Proteómica del Cinvestav-Irapuato

A partir del gel de acrilamida (1D) se cortaron ocho bandas, las cuales mostraron mayor abundancia con la tinción de azul de Coomassie. La identificación de las proteínas presentes en cada banda se realizó por espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Los datos de los espectros de masas se obtuvieron a través de un sistema de cromatografía de nano flujo “nanoAcquity”, acoplado a un espectrómetro de masas tipo trampa lineal de iones (LTQ Velos, Thermo Fisher Scientific) equipado con un recurso nano para ionización por electrospray. Brevemente, las proteínas extraídas (3 μ l) de las secciones de acrilamida seleccionadas fueron digeridas con tripsina (Shevchenko *et al.*, 1996; 2006) y se inyectaron a una pre-columna (Symmetry® C18, 5 μ m, 180 μ m x 20 mm, Waters). Enseguida, el flujo se activó en una columna capilar de 10 cm UPLC (ID BEH-C18 1.7 μ m particle size 100 μ m) a 35 °C. Los péptidos se separaron por un método de gradiente por 60 min a una tasa de flujo de 400 nl/min. El gradiente se programó de la siguiente manera: 3–50% del solvente A (ácido fórmico al 1%) por más de 30 min, 50– 85% del solvente B (acetonitrilo al 100% en ácido fórmico al 0.1%) por arriba de 2 min, 85% del solvente A por arriba de 4 min y finalmente 3% del solvente B por más de 22 min. Los péptidos se eluyeron en la fuente de nano electrospray acoplada al espectrómetro de masas por medio de una punta estándar recubierta de silicio (New Objective). El espectrómetro de masas se manipuló en un modo positivo de adquisición dependiente de datos con el fin de alternar automáticamente entre el escaneo completo (400–1600 m/z) y el subsecuente escaneo de los fragmentos obtenidos por disociación inducida por colisión (CID) de los iones moleculares, en la cual se utilizó helio como gas de colisión a una energía normalizada al 35% y un tiempo de activación de 10 ms. Los fragmentos MS/MS generados se detectaron en la trampa lineal de iones con una exclusión dinámica activada. La adquisición de datos se obtuvo por el software Xcalibur 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific) (Referencia de Chagoya-Irapuato).

b) Procesamiento de los datos

El espectro de masas en tándem se obtuvo mediante el software Proteome Discoverer V 1.3 y la identificación de proteínas se llevó a cabo utilizando la base de datos de *Ae. aegypti*. La búsqueda se ejecutó bajo los siguientes parámetros: una ventana de 2 Da principal de ion MS, una ventana de 1 Da de ion MS/Ms y dos fisiones perdidas permitidas. La iodoacetamida derivada de la cisteína (carbamida metilcisteína) se especificó como una modificación fija y la oxidación de la metionina como una modificación variable.

c) Preparación de las muestras en la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica del Cinvestav-Zacatenco

Los once fragmentos en que se dividió el gel al 12% SDS-PAGE (1D) fueron digeridos enzimáticamente con tripsina de acuerdo con el protocolo adaptado de Shevchenko *et al.* 2007. Brevemente, para obtener los péptidos las muestras se concentraron a 20 μ l, enseguida se cargaron 3 μ L en columnas Symmetry C18 Trap, la muestra se desaló, utilizando como fase móvil A ácido fórmico (AF) en agua y 0.1% de AF en acetonitrilo como fase móvil B. Posteriormente los péptidos fueron cargados y separados en una columna HSS T3 C18 (Waters, Milford, MA); 75 μ m X 150 mm, con poros de 100 Å. Los datos del espectro fueron adquiridos en un espectrómetro de masas con ionización por electroespray (ESI) y separación por movilidad iónica (IMS), usando adquisición independiente de datos (DIA) y enfoque por el modo HDMSE (Waters, Milford, MA). Se adquirieron dos cromatogramas de baja y alta energía en modo positivo en un rango de m/z 50-2000 con una velocidad de 0.5 escaneos por segundo. No se aplicó energía de colisión para obtener el cromatograma de baja energía, mientras que, para los cromatogramas de alta energía, los iones precursores se fragmentaron utilizando una rampa de energía de colisión de 19-55 V.

Los parámetros de flujo de trabajo fueron: tripsina como enzima de corte y una división permitida; carbamidometilo (C) como una modificación fija y amidación (N-term), desamidación (N, Q), oxidación (M), fosforilo (S, T, Y) como modificaciones variables. La tolerancia automática de péptidos y fragmentos y la Tasa de

descubrimientos falsos (FDR) fue de $\leq 4\%$. Synapt G2-Si fue calibrado con [Glu¹] - Fibrinopeptido, $[M + 2H]^{2+} = 785.84261$ a ≤ 1.5 ppm.

d) Procesamiento de los datos

Se generaron archivos .raw que contienen los espectros MS/MS, en donde los datos obtenidos se compararon con la base de datos de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* utilizando Protein Lynx Global SERVER (PLGS) v3.03 software 2 (Última modificación el 5 de enero de 2018 y el 3 de enero de 2018, respectivamente).

Todas las identificaciones en este análisis tienen un porcentaje de $\geq 95\%$ de confiabilidad (proteína Auto Curate en color verde).

11. Resultados

11.1 Localización de los precursores de los músculos indirectos de vuelo en larvas de cuarto estadio de desarrollo

Para analizar el desarrollo de los IFMs en larvas y pupas de *Ae. aegypti*, como en todos los mosquitos, el cuerpo de las larvas y mosquitos adultos está dividido en tres regiones anatómicas: cabeza, tórax y abdomen (Figura 12A, B). En el caso del estadio pupal, la cabeza y el tórax integran una sola región denominada cefalotórax.

Al hacer la disección del tórax de larvas de cuarto estadio (L4) de *Ae. aegypti* encontramos, cercanos a las trompetas respiratorias (sifones), varias estructuras de forma lobular, un par está adherido sólo por su lado anterior a la parte frontal torácica y de su lado posterior quedan suspendidos, por su ubicación y posición anatómica estas estructuras corresponden a los IFMsDL presentes en la etapa adulta del mosquito. Otro grupo de tres lóbulos más pequeños y redondeados correspondientes a músculos indirectos de vuelo, están ubicados en los costados del tórax, cercanos a las patas y alas ya formadas en L4 tardía, a su vez, estas estructuras corresponden a los IFMsDV (Figura 12-C), cuya distribución y posición es similar a los precursores de los IFMs de *D. melanogaster*.

Otra característica, independiente de la ubicación y posición, es la diferencia de tamaño de los dos subgrupos de músculos, los IFMsDL son más grandes con respecto a los IFMsDV.

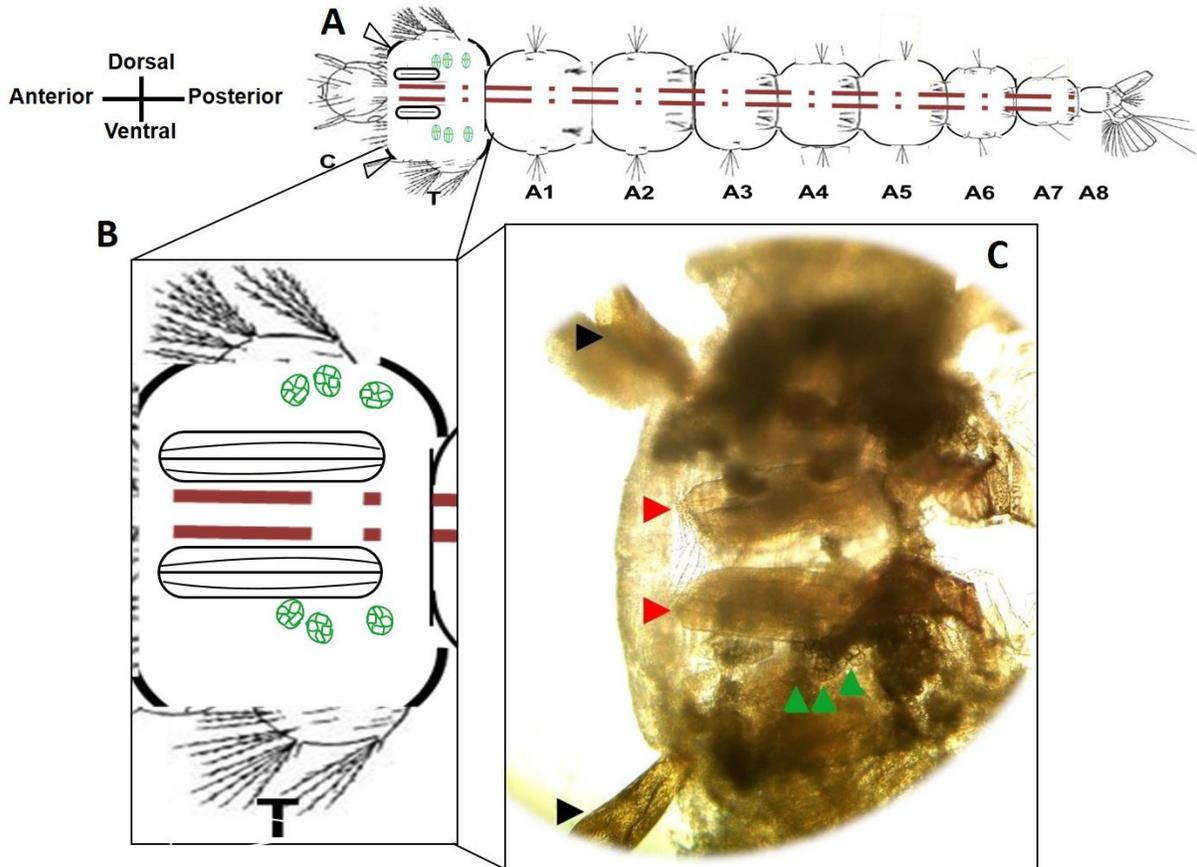


Figura 12. Morfología del tórax de una L4 de *Ae. aegypti*. **A)** Se indican las regiones en que se divide la larva. **C:** cabeza, **T:** tórax, **A1-A8:** segmentos abdominales. A lo largo del cuerpo, en posición centro-dorsal se encuentra el vaso dorsal (línea café discontinua). Los sifones respiratorios se esquematizan con triángulos. **B)** Amplificación de la región torácica en donde se marca la posición y ubicación de los precursores de los IFMs, en verde los IFMsDV y en negro los IFMsDL. **C)** Localización de los músculos de vuelo en el tórax de L4 de *Ae. aegypti*. Con cabezas de flecha rojas se señala el par de músculos IFMsDL unidos por su lado anterior a la lámina torácica frontal. Con cabezas de flecha verdes se señala la ubicación de los IFMsDV unidos a la lámina torácica superior del tórax. Con cabezas de flecha negras se señalan los sifones respiratorios.

11.2 Histología de tórax de larvas de cuarto estadio y pupas

Durante el desarrollo larvario ocurren cambios anatómicos que nos permitieron diferenciar los estadios de desarrollo y correlacionarlos con la etapa de maduración de los IFMs. Durante los estadios L1 y L2, las larvas únicamente se pueden diferenciar por su tamaño. Las L3 son refringentes en la luz, debido a la gran cantidad de tejido graso. Las larvas alcanzan su mayor tamaño en el estadio cuatro, donde la principal diferencia entre L4 temprana y tardía es la presencia del par de sifones respiratorios en la parte dorsal del tórax, en el caso de L4 temprana, los sifones ya están formados, pero aún no expuestos, en cambio en L4 tardía estos ya sobresalen al exterior del tórax y son de color negro.

Para conocer la ubicación de los IFMs durante la fase acuática de *Ae. aegypti*, en colaboración con el doctor Hernández Martínez S, se colectaron L4 y pupas que fueron embebidas en parafina para realizar cortes histológicos. Analizamos la expresión transcripcional mediante FISH del gen que codifica la enzima glucolítica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Esta enzima se expresa a lo largo de todo el sarcómero de los músculos de vuelo de *D. melanogaster* (Wojtas *et al.* 1997). Para conocer su expresión transcripcional se analizaron cortes histológicos, se apreció la expresión en los IFMsDV, los cuales están divididos en cuatro o cinco secciones o *gajos* que darán lugar al mismo número de fibras, ubicados en cada hemitórax de la larva (Figura 13 A). En el caso de los precursores de los IFMsDL, se observan a los costados del ciego gástrico, estos recorren toda la región torácica de la larva. En el estadio de pupa tardía los IFMsDL muestran un mayor desarrollo, (Figura 14 A), en este estadio se aprecian las patas, la cabeza y la probóscide ya formadas, necesarias para la fase aérea del mosquito. Como se mencionó anteriormente son dos subgrupos de IFMs, en la figura 14 B se muestra un corte histológico de una pupa tardía donde se observan tanto los IFMsDV y los IFMsDL ya completamente desarrollados.

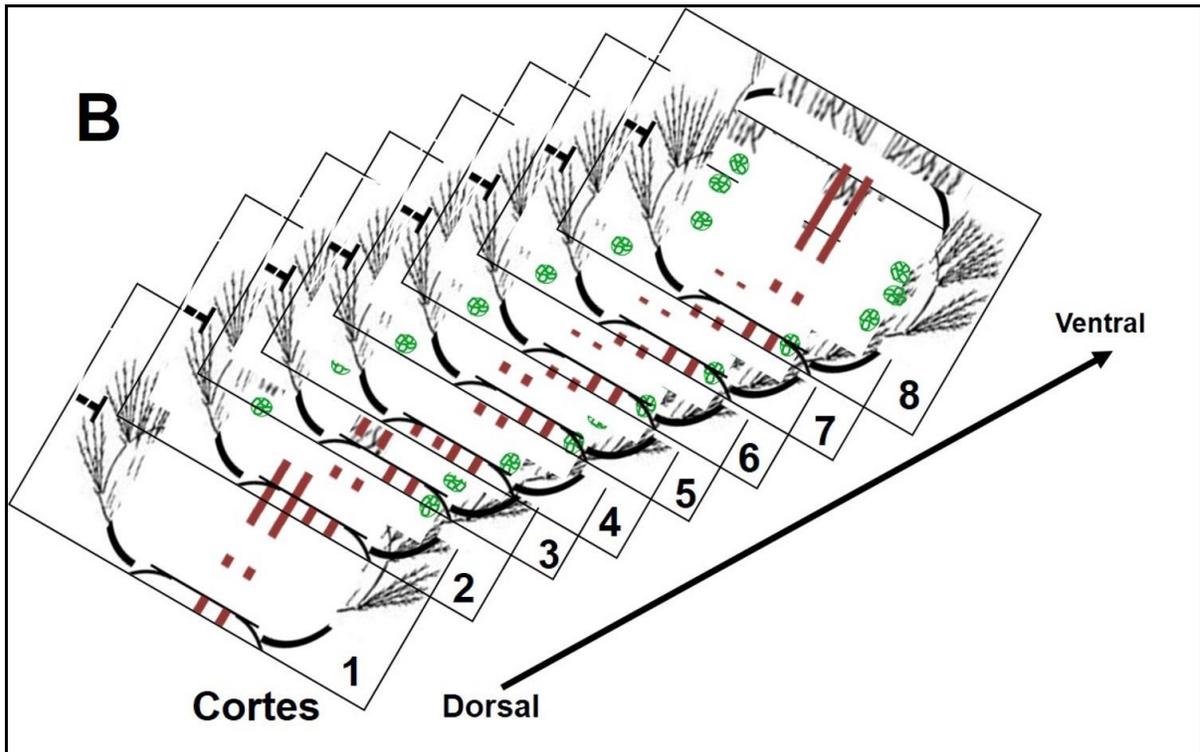
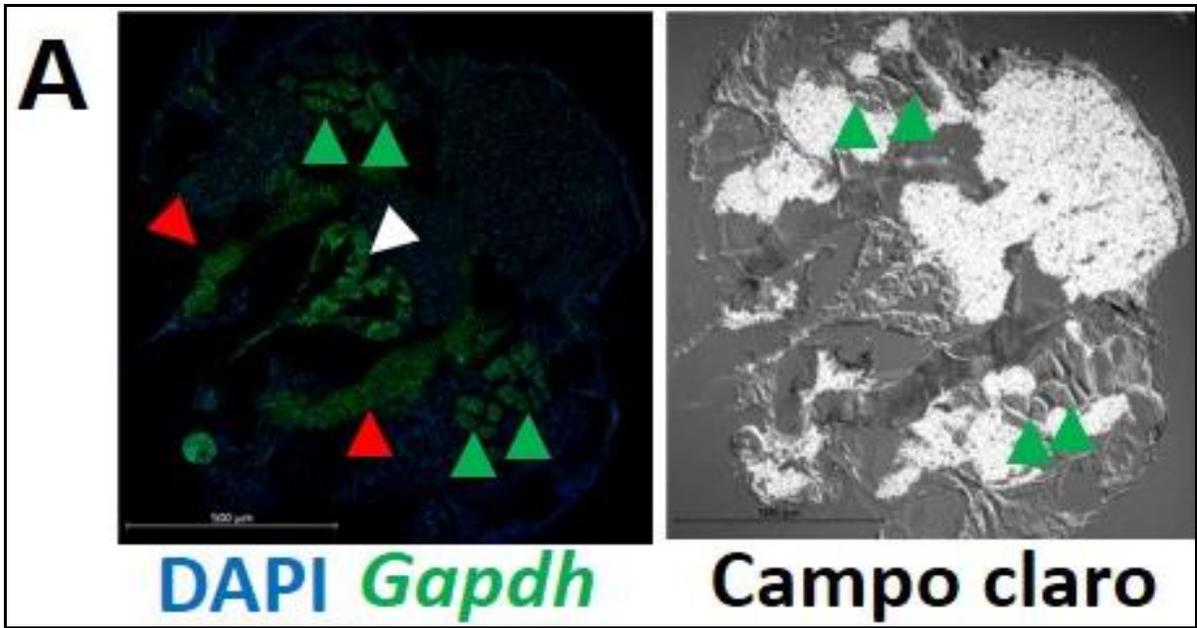
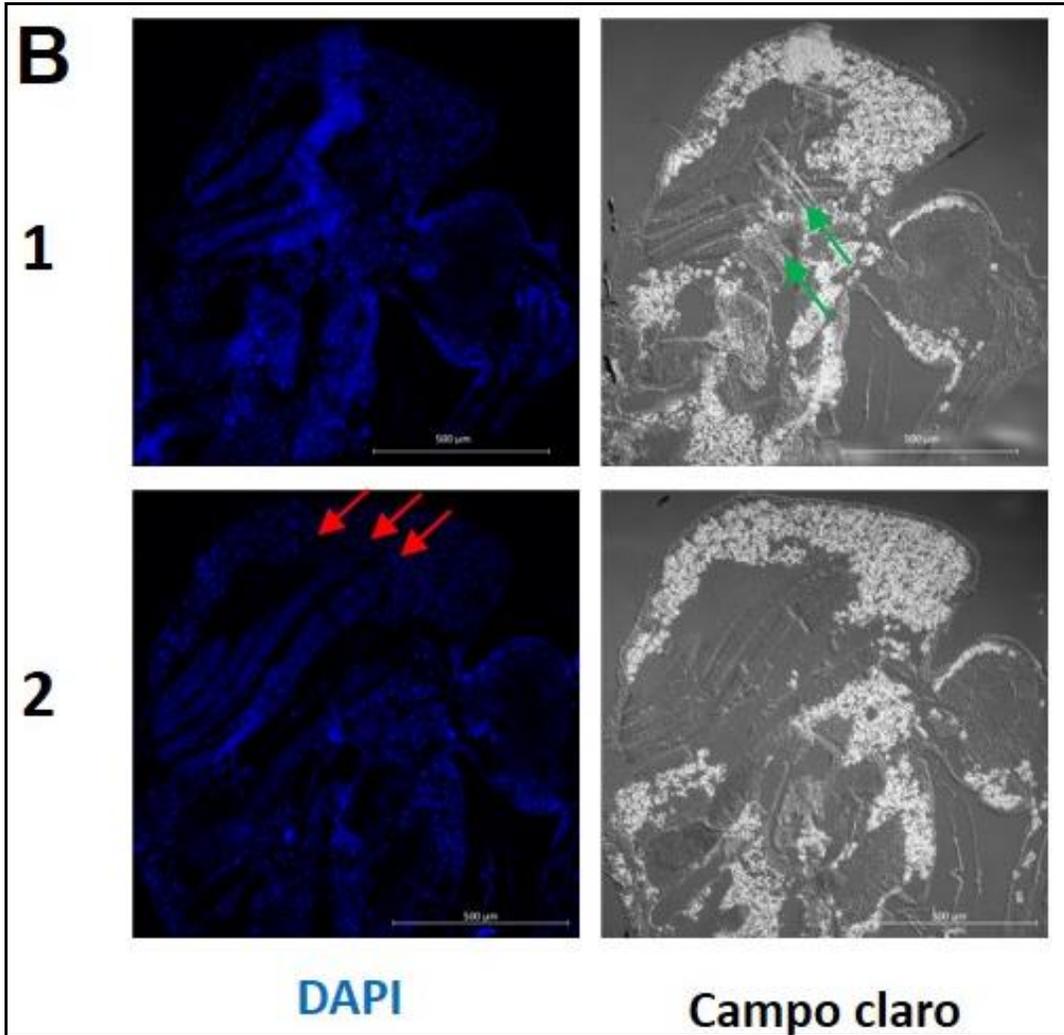
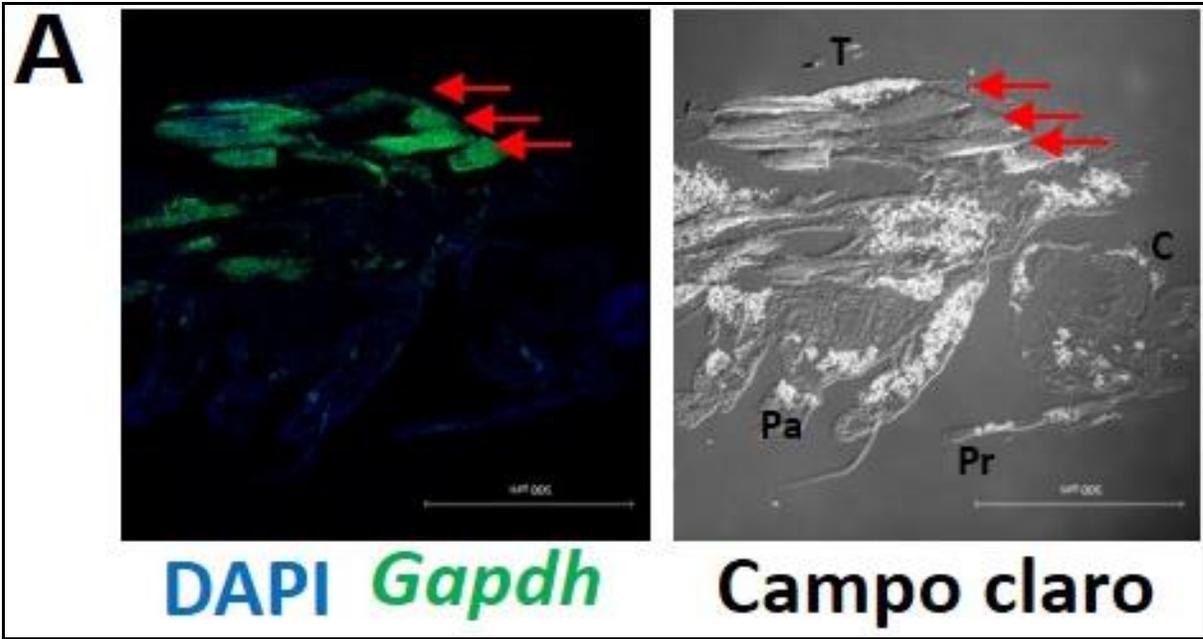


Figura 13. Corte histológico del tórax de L4 de *Ae. aegypti*. A) Corte histológico seriado de un tórax en vista dorsal muestra la ubicación de los IFMsDV, IFMsDL y el Ciego gástrico (señalados con cabezas de flechas verdes, rojas y blanca, respectivamente) en L4. El corte que se muestra inicia de la parte dorsal y termina en la parte ventral de un tórax en plano coronal. Los núcleos de color azul están teñidos con DAPI. Los cortes histológicos se observaron en un microscopio de fluorescencia con el filtro Cy3 para las sondas de *Gapdh* (señal en color verde). En el campo claro se observan cúmulos blancos de cuerpo graso, siendo más abundante en la región anterior del tórax. B) Dibujo que ejemplifica los niveles y el plano de los cortes histológicos. Barra=500 μ m.



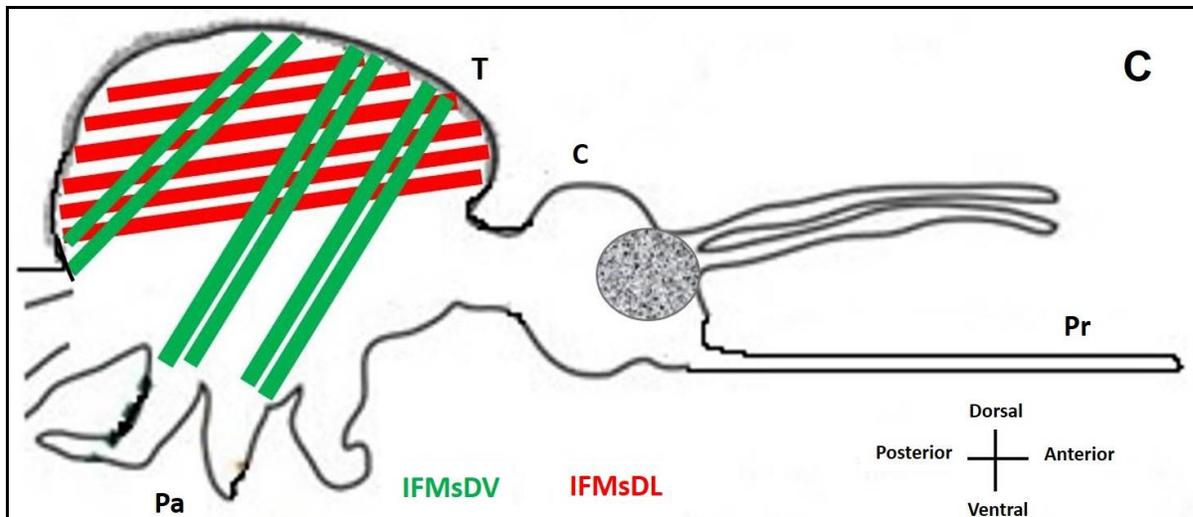


Figura 14. IFMs en cortes histológicos de pupa tardía. A) FISH de *gapdh* en cortes histológicos de la región torácica de pupas tardías en plano sagital. Se observa en verde la expresión de los mensajeros del gen *gapdh* en los IFMsDL (flechas rojas). Los núcleos marcados con DAPI se observan en color azul. B) Cortes histológicos de la región torácica de una pupa tardía. Las flechas rojas señalan tres fibras de IFMsDL en azul (núcleos teñidos con DAPI), las cuales recorren toda la región torácica. Dos pares de IFMsDV se señalan con flechas verdes en campo claro. También se observa gran cantidad de cuerpo graso (regiones en color blanco) en el tórax del mosquito ya formado. C) Esquema de la región torácica de un mosquito adulto en plano sagital, donde se muestra la ubicación y posición de los IFMsDL (ejemplificados en barras rojas) y los IFMsDV (ejemplificados en barras verdes) por hemitórax. **Pr**=probóscide; **C**=cabeza; **T**=tórax; **Pa**=patas. Barra=500 μ m. (Adaptada de King y Hillyer 2012).

Una vez que conocíamos la ubicación y posición de los IFMs (DV y DL), continuamos su análisis disecándolos para estudiarlos de forma aislada y conocer con mayor detalle su morfología mediante MEB. Observamos dos características que diferencian a ambos tipos de IFMs en formación, por un lado, el tamaño, así como el número de fibras (Figura 15, 16). Por otra parte, los IFMsDV son más pequeños respecto a los IFMsDL, en L4 son de alrededor de 200 y 300 μm , respectivamente. En cuanto al número de fibras, los IFMsDV se integran por entre cuatro a seis fibras (Figura 16), en cambio los IFMsDL están conformados por seis fibras (Figura 16 A). En la superficie de ambas estructuras musculares en formación se observan invaginaciones claramente definidas, están recubiertos por una membrana delgada y en su interior se observan poblaciones de mioblastos y organelos celulares sin compartimentarización aparente (Figura 16 A').

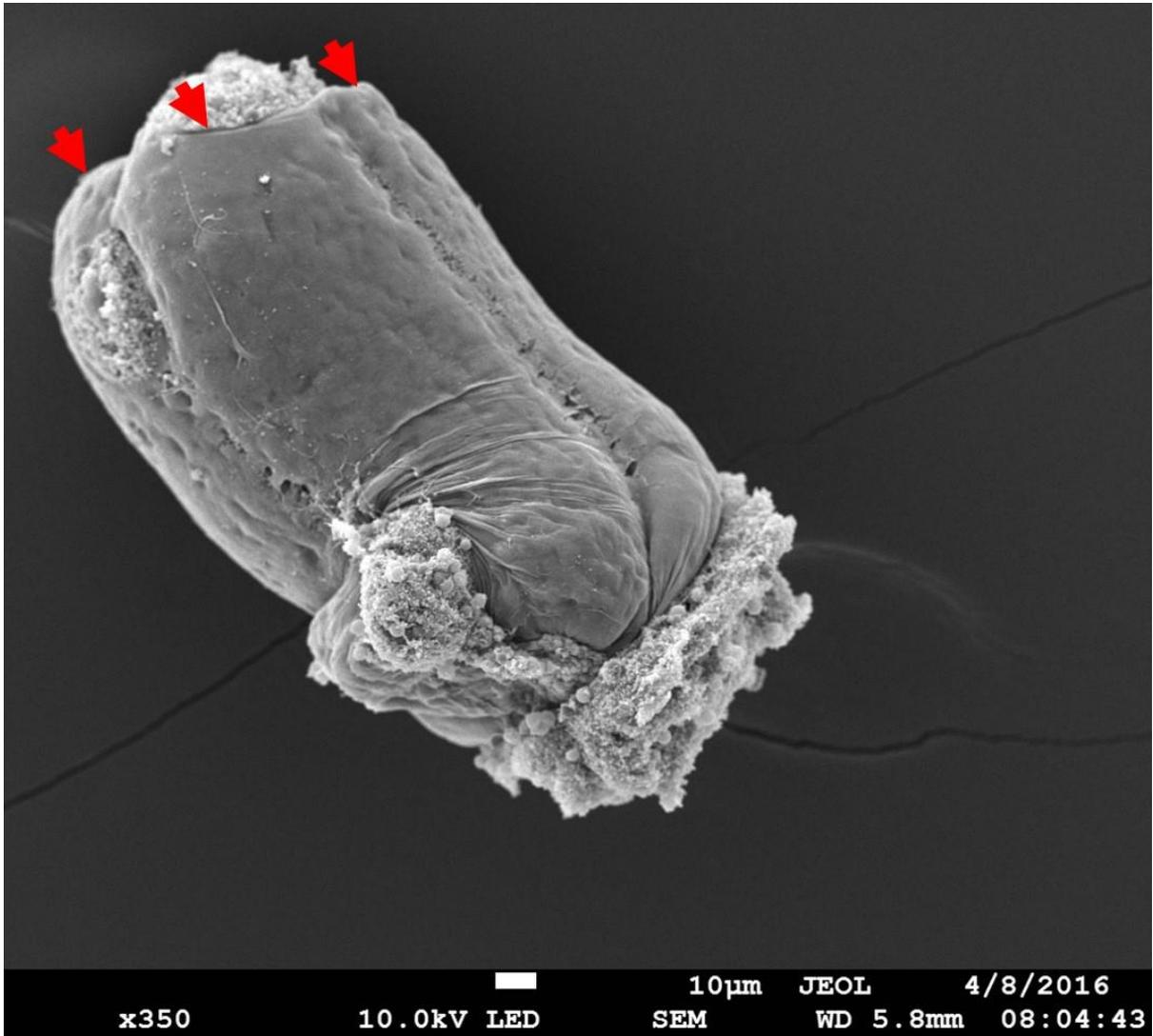


Figura 15. Microscopía electrónica de barrido de un IFMsDV de L4 tardía. El IFMsDV en desarrollo es de tamaño pequeño, formará cuatro fibras musculares (se señalan tres con flechas rojas), se aprecian las separaciones entre un *gajo* (futura fibra) y otro. Barra=10 µm.

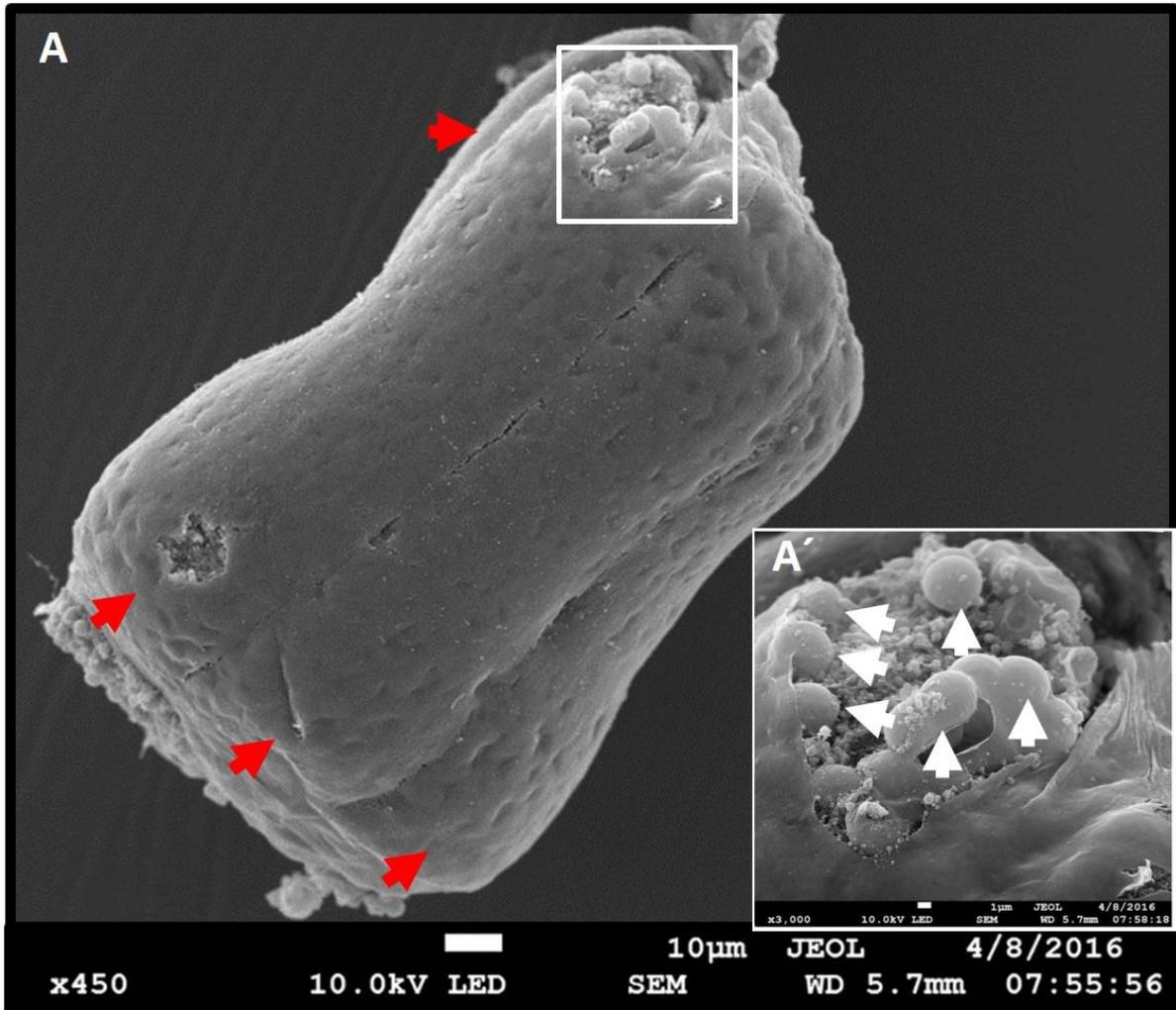


Figura 16. Microscopía electrónica de barrido de un IFMsDL de L4 tardía. Los IFMsDL en desarrollo son de mayor tamaño, formarán seis fibras musculares (se indican con flejas rojas), se aprecia claramente las separaciones entre un *gajo* (futura fibra) y otro. Figura 17 A' es una ampliación donde accidentalmente se realizó un pequeño corte con una aguja de disección, muestra estructuras esféricas, posiblemente mioblastos (flechas blancas). Barra=10 µm.

Para comprobar que las estructuras corresponden a precursores de los IFMs se buscó la expresión de la proteína marcadora actina. Para este propósito se disecaron los IFMs de L4 temprana y tardía, que hasta este momento era el estadio larvario que nos permitía una fácil disección de las muestras. La actina filamentosa se marcó con faloidina rodaminada y los núcleos con 2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamida (DAPI), las preparaciones se observaron en un microscopio confocal. En los precursores musculares de L4 temprana, los filamentos de actina están distribuidos a lo largo de todo el IFMs, así también, observamos una gran cantidad de núcleos distribuidos en todo el precursor muscular, en algunos casos se ven formando largas filas entre los filamentos de actina (Figura 17 A y B).

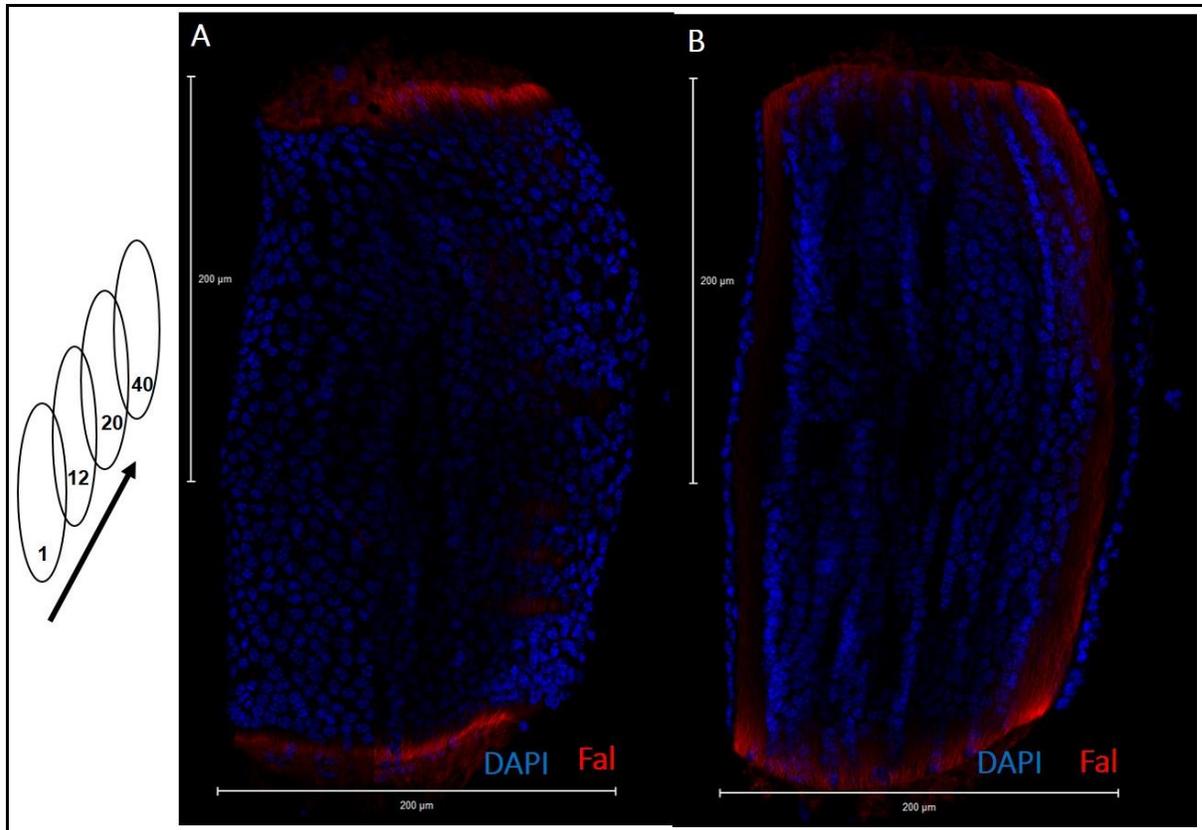


Figura 17. Distribución de actina y de núcleos en los IFMs en formación de L4 temprana. Los precursores de los IFMs en formación tienen forma cilíndrica, se observa la distribución de los núcleos (en azul) formando filas. Los filamentos de actina (en rojo) están a todo lo largo del musculo. Se muestran dos niveles de corte óptico, uno superficial (12, panel A) y otro más profundo (20, panel B). El esquema del lado izquierdo ejemplifica los niveles de cortes ópticos de los precursores musculares en formación. Barra=200 μm.

En el caso de los IFMs en formación de L4 tardía los filamentos de actina tienen una organización diferente, estos se observan ya formando las fibras que conformarán los músculos maduros del mosquito adulto, incluso se observan claramente separadas entre ellas, hay un espacio mayor (Figura 18), característica que no se observa en los precursores de L4 temprana. Por el número de fibras que se formarán posiblemente se trata de un IFMsDV. En el caso de los núcleos, hay una menor cantidad comparado con el estadio previo, hay presencia de núcleos distribuidos entre las invaginaciones que se forman entre una fibra y otra (Figura 18). En esta etapa de desarrollo, las fibras de los precursores musculares en formación son mecánicamente resistentes, de tal manera que se pueden separar de forma individual (Figura 19).

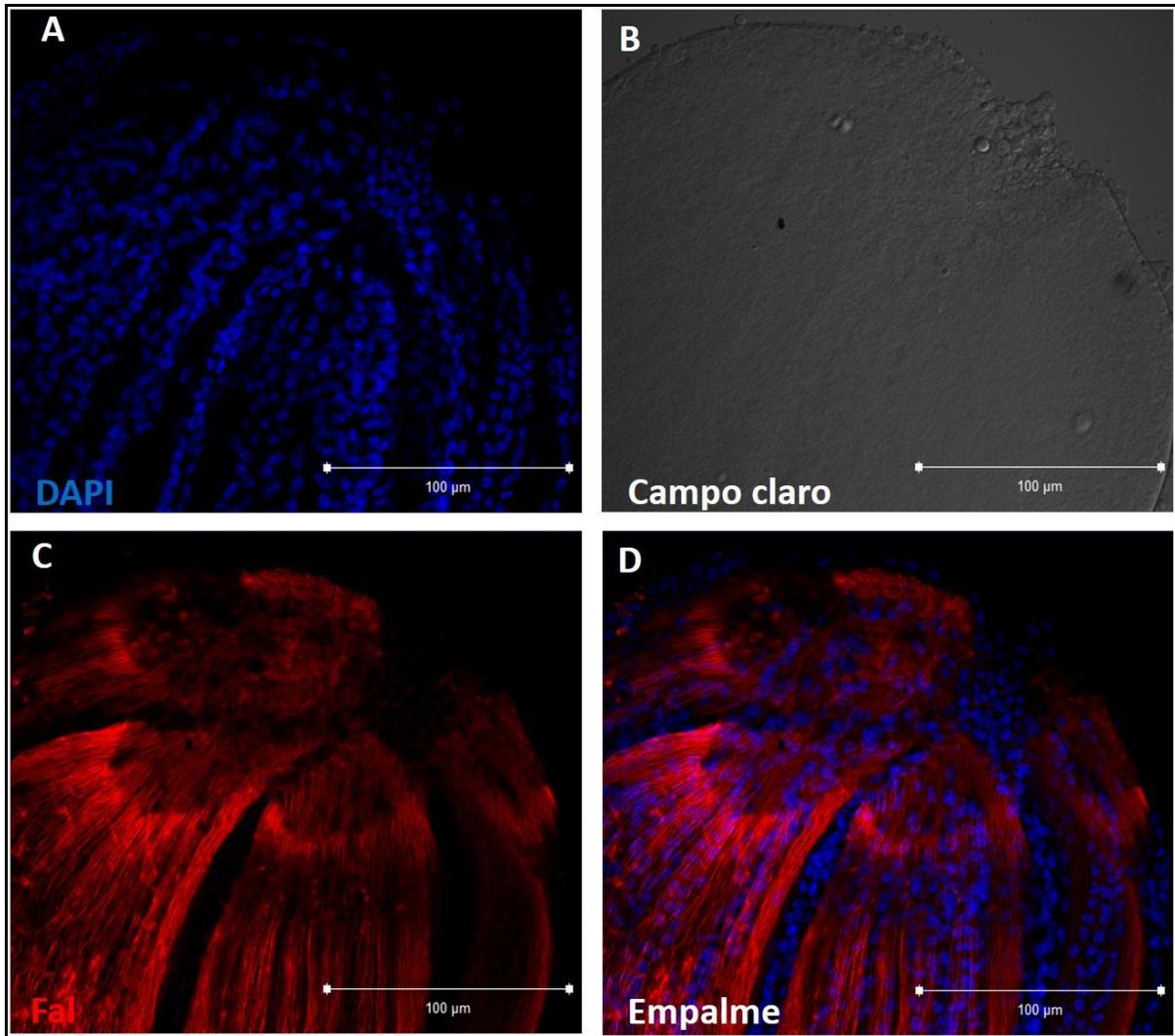


Figura 18. Formación de las fibras de actina en un IFMs de L4 tardía. Parte anterior de un IFMs (lado de fijación al tendón torácico) que muestra un corte transversal hecho con el bisel de la aguja insulínica, se pueden apreciar las cinco fibras que se formarán. A) Núcleos marcados con DAPI; B) Campo claro; C) Actina filamentososa marcada con faloidina rodaminada; D) Empalme de imágenes. Barra=100 µm.

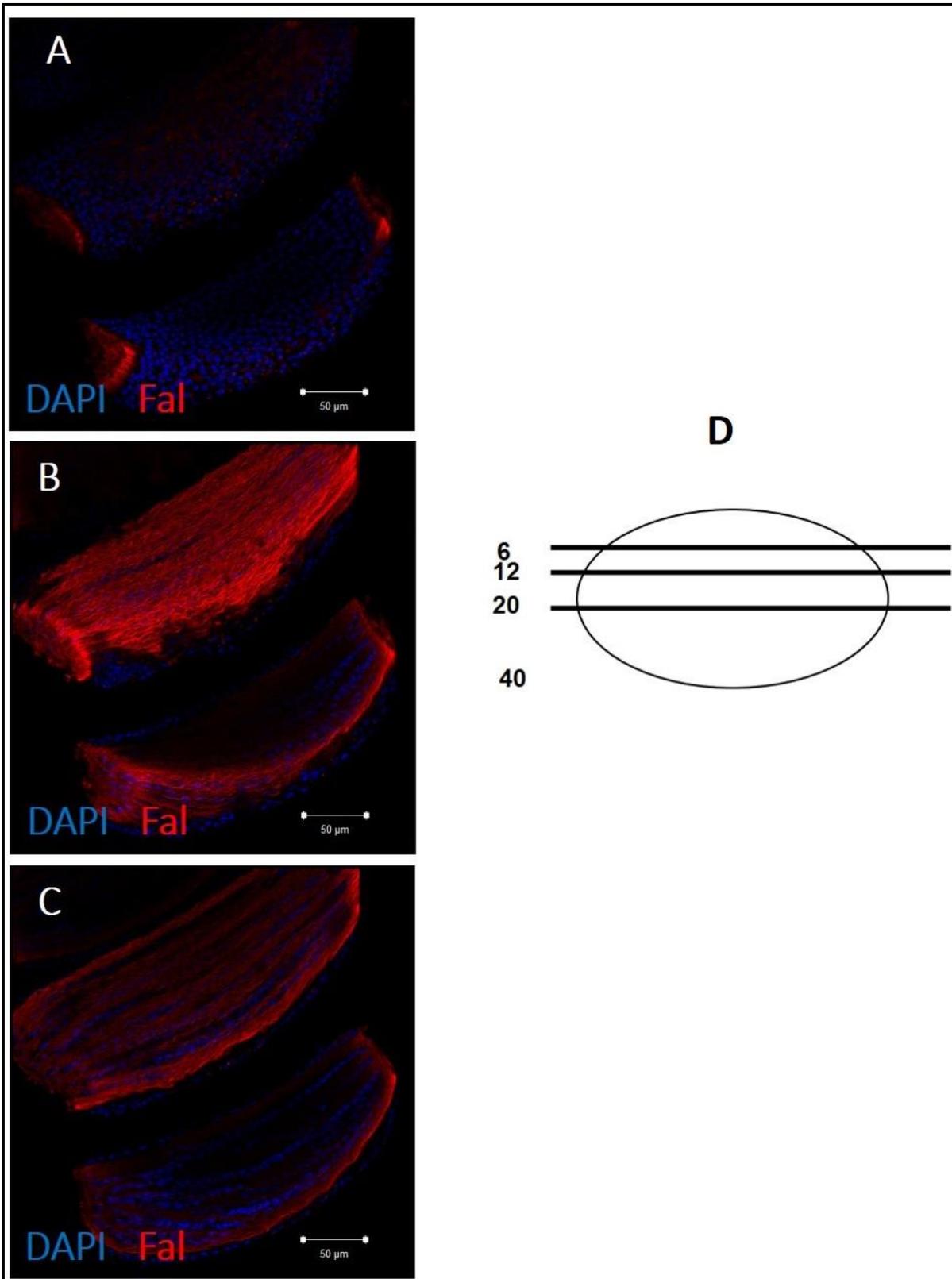


Figura 19. Fibras que conforman un IFMs de L4 tardía. De un total de 40 cortes ópticos se muestran tres niveles de cortes de un par de fibras. A) nivel 6. B) nivel 12 y en C) nivel 20. En cada imagen se muestra la distribución de los núcleos en azul y el arreglo de los filamentos de actina en rojo. D) Diagrama de los niveles de los cortes ópticos. Barra=50 μ m.

11.3 Proyección tridimensional de un precursor de IFMsDV de L4

Para conocer la distribución y organización tridimensional de la actina F en un precursor de un IFMsDV de L4 tardía, ésta se marcó con faloidina rodaminada, se colectaron imágenes por microscopia confocal a distintos planos y se realizó la reconstrucción tridimensional. Se observó claramente la separación de las fibras que integran el precursor muscular en este estadio y que a su vez las fibras están integradas por cientos de miofibrillas que le dan estructura al músculo de vuelo (Figura 20).

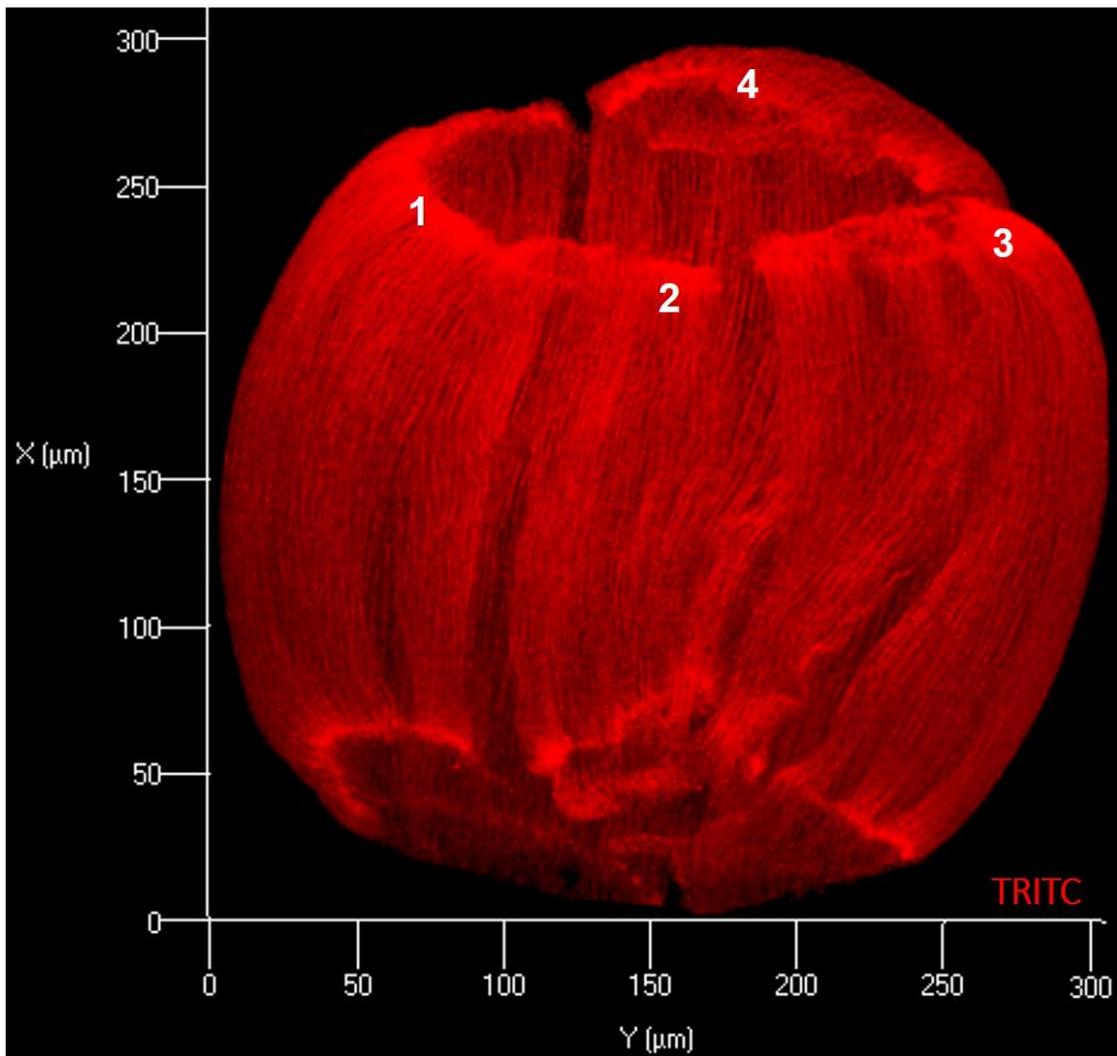
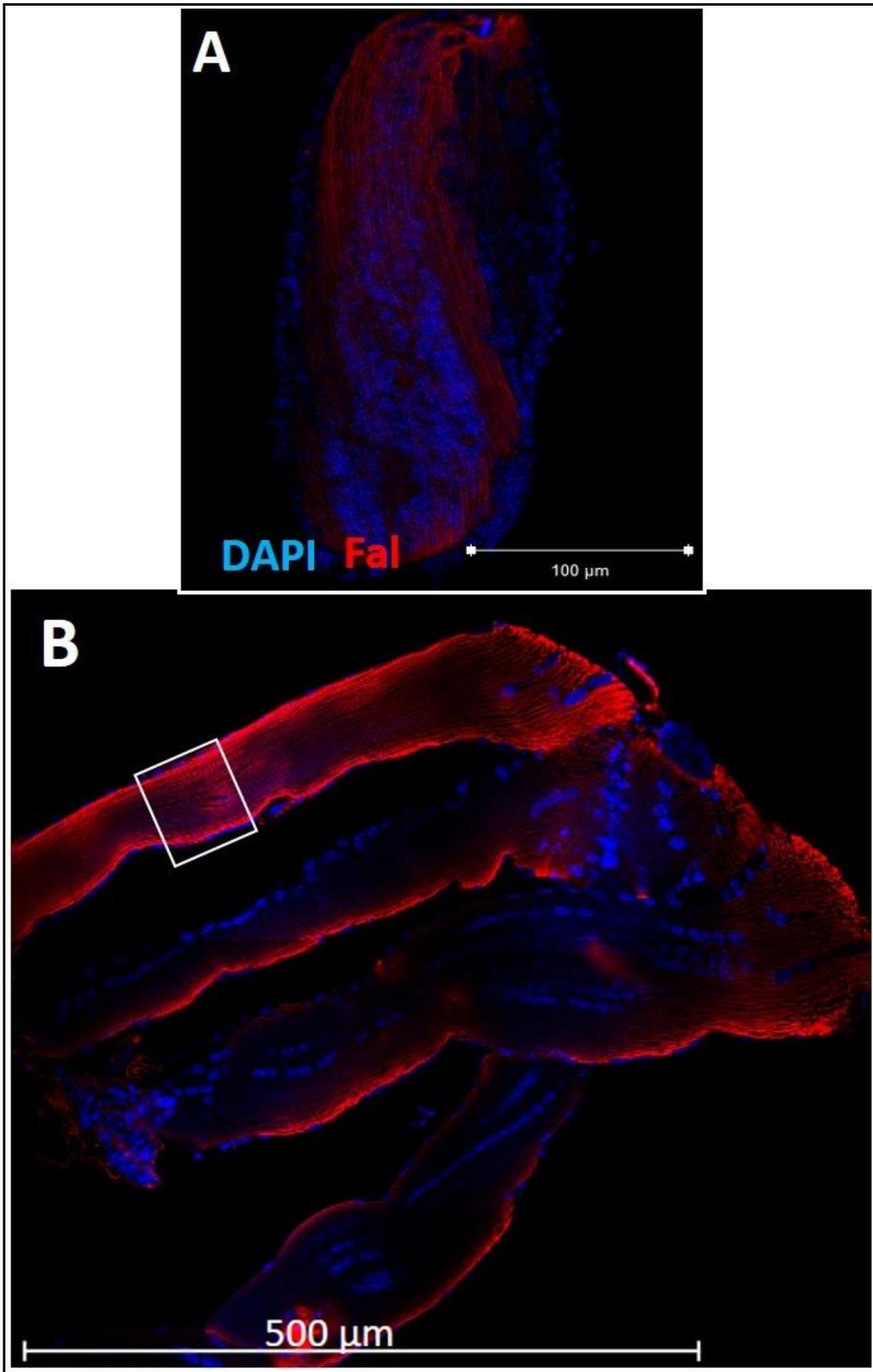


Figura 20. Proyección 3D de la distribución y organización de actina F en un precursor de IFMsDV de L4. Miofibrillas de actina en rojo que conforman cuatro fibras musculares (1-4, claramente separadas entre ellas). En este estadio los IFMsDV tienen un tamaño aproximado de 300 μm tanto de ancho como de alto.

11.4 Análisis del desarrollo de los precursores de los IFMs en los estadios de L4, pupa y mosquito adulto

Cuando la larva se encuentra en el estadio L4, los precursores musculares son fácilmente manipulables, tienen un tamaño aproximado de 200 μm , su morfología es cilíndrica, la actina se empieza a organizar en largas fibras (Figura 21 A). Durante el estadio de pupa, los precursores comienzan a perder su morfología cilíndrica (Figura 21 B) y cuando la pupa alcanza su estadio tardío de desarrollo los precursores pierden por completo la morfología cilíndrica y ya se aprecian los sarcómeros que integran a los cientos de miofibrillas (Figura 21 C), los núcleos forman largas filas entre las miofibrillas. En el mosquito adulto ya se pueden observar claramente los sarcómeros que conforman a los miles de miofibrillas, que a su vez integran las fibras de los IFMs. De igual manera hay una gran presencia de núcleos entre las miofibrillas (Figura 22 A y B). A un mayor aumento se aprecian claramente las líneas Z y las bandas H de un sarcómero (Figura 22 C).

Para conocer la ultraestructura de los músculos, éstos fueron disecados de pupas y moscos adultos y observados por MET. En pupas las miofibrillas ya están casi completamente estructuradas, los sarcómeros tienen un promedio de 1.95 μm de longitud, hay una cantidad abundante de mitocondrias que miden en promedio 1 μm de largo. Las líneas Z se observan ya formadas, en cambio las bandas H no son muy visibles en esta etapa de maduración (Figura 23 A). Hay cambios notables en las miofibrillas del mosquito adulto, los sarcómeros son más largos, miden en promedio 2.90 μm , las mitocondrias son de mayor tamaño, alcanzando los 3 μm en algunos casos, se les denomina mitocondrias gigantes, y su tamaño se debe principalmente a la alta actividad metabólica del músculo del mosquito adulto. En este estadio las líneas Z y Bandas H ya se observan bien definidas (Figura 23 B). Las miofibrillas muestran el patrón característico del músculo, una horganización exagonal que es fácilmente perceptible (Figura 23 C).



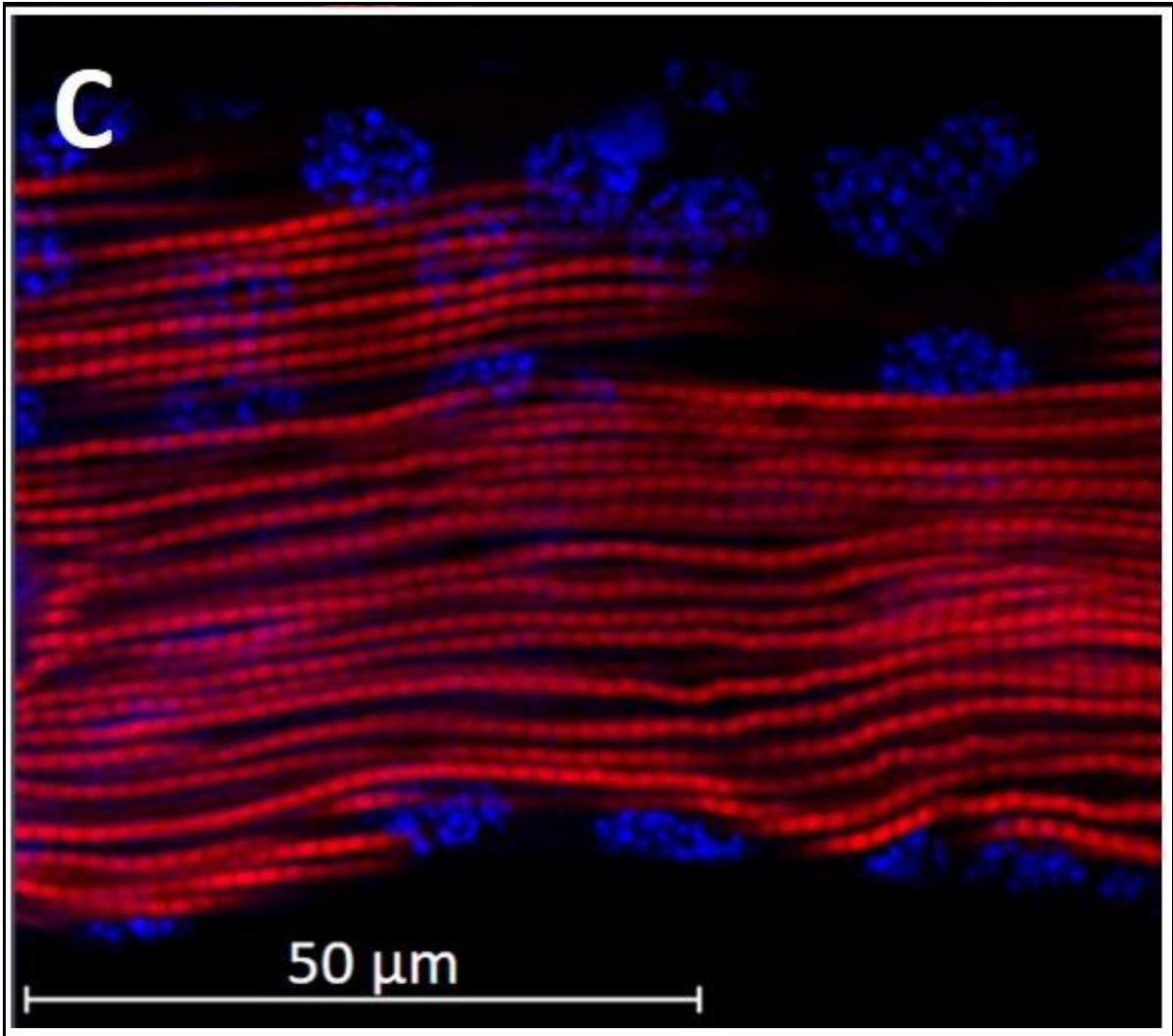
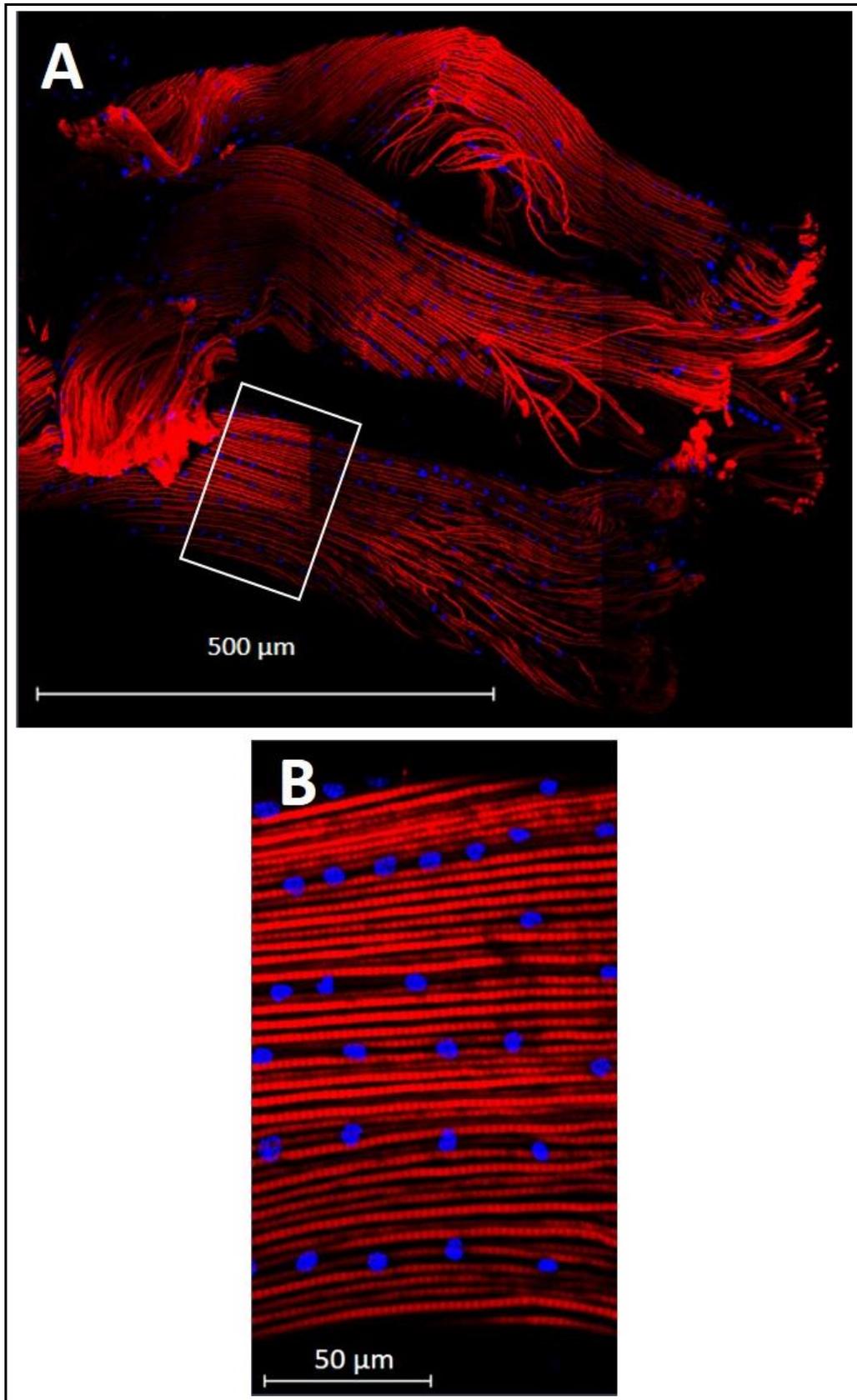


Figura 21. Formación de los IFMs en pupa y mosquito adulto. A) En L4 los precursores musculares adquieren una forma cilíndrica y se inicia la estructuración de las fibras musculares. B) Se observan cuatro miofibras musculares de pupa marcadas con faloidina rodaminada (color rojo). C) Muestra una zona de la miofibra muscular (recuadro blanco), se aprecian con mayor detalle los sarcómeros, ya estructurados, que son las unidades estructurales y funcionales de una miofibrilla. Los núcleos están marcados con DAPI (en azul) formando surcos entre las miofibrillas. El tamaño se indica en cada imagen. Barra= 100 μm.



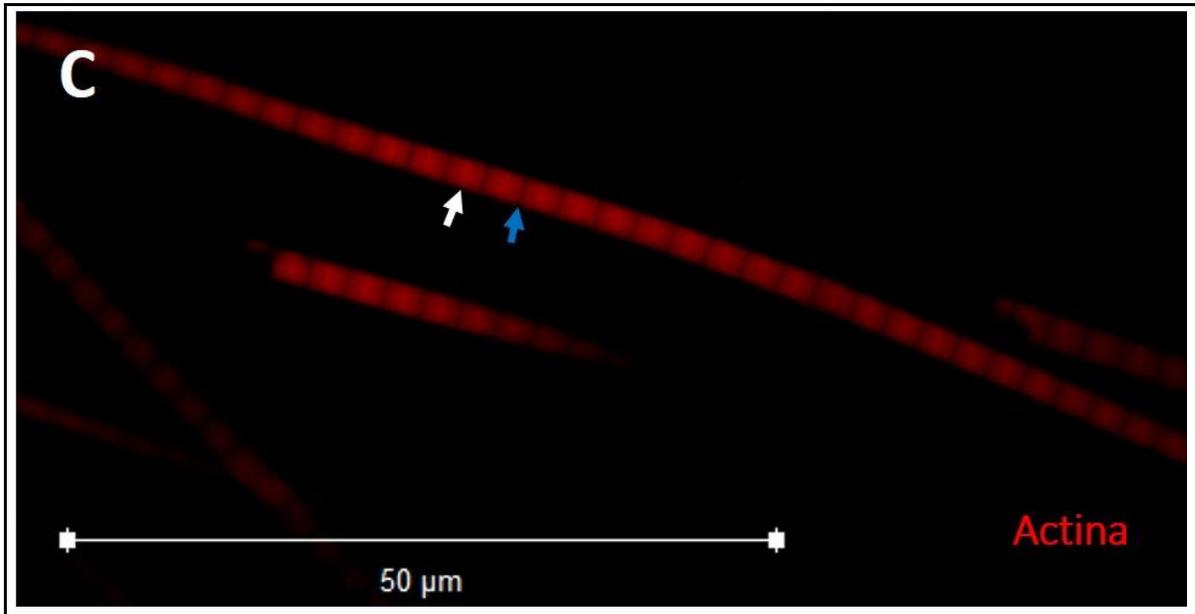
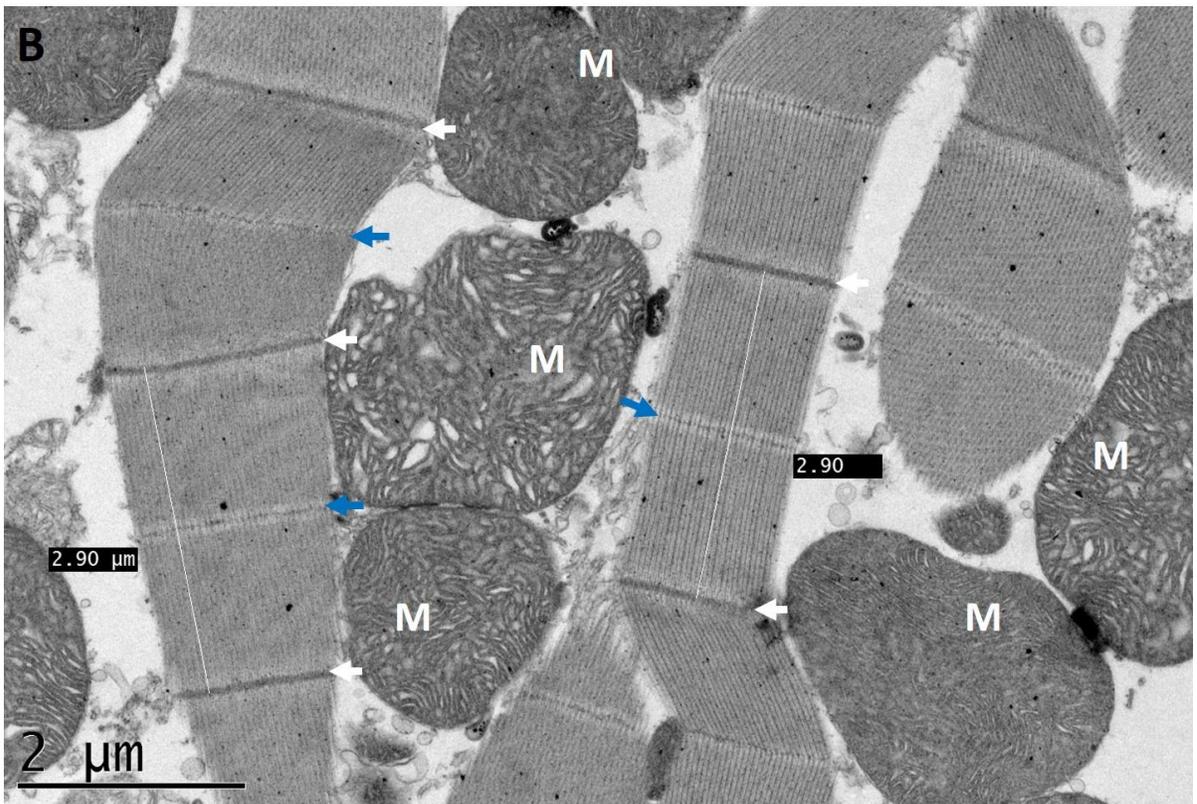
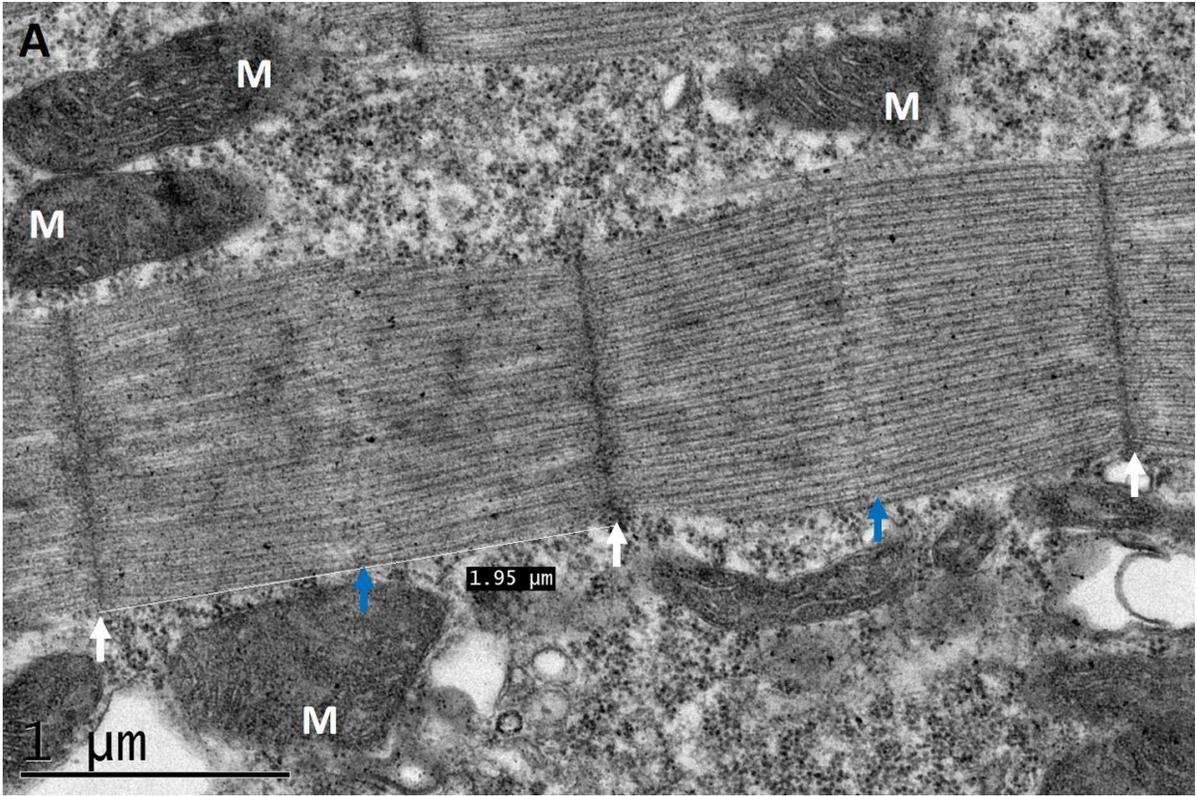


Figura 22. Músculos y miofibrillas de un IFMs disecadas de un mosquito adulto.

A) Se observan tres miofibras musculares conformadas por cientos de miofibrillas marcadas con faloidina rodaminada (color rojo). B) Muestra una zona de la miofibra muscular (recuadro blanco), se aprecian con mayor detalle los sarcómeros que conforman a las miofibrillas, así como los núcleos marcados con DAPI (en azul) formando surcos entre las miofibrillas. C) Acercamiento a una miofibrilla donde se observan las líneas Z (más coloreadas en rojo brillante, flecha blanca) y las bandas H (líneas oscuras, flecha azul). El tamaño se indica en cada imagen.



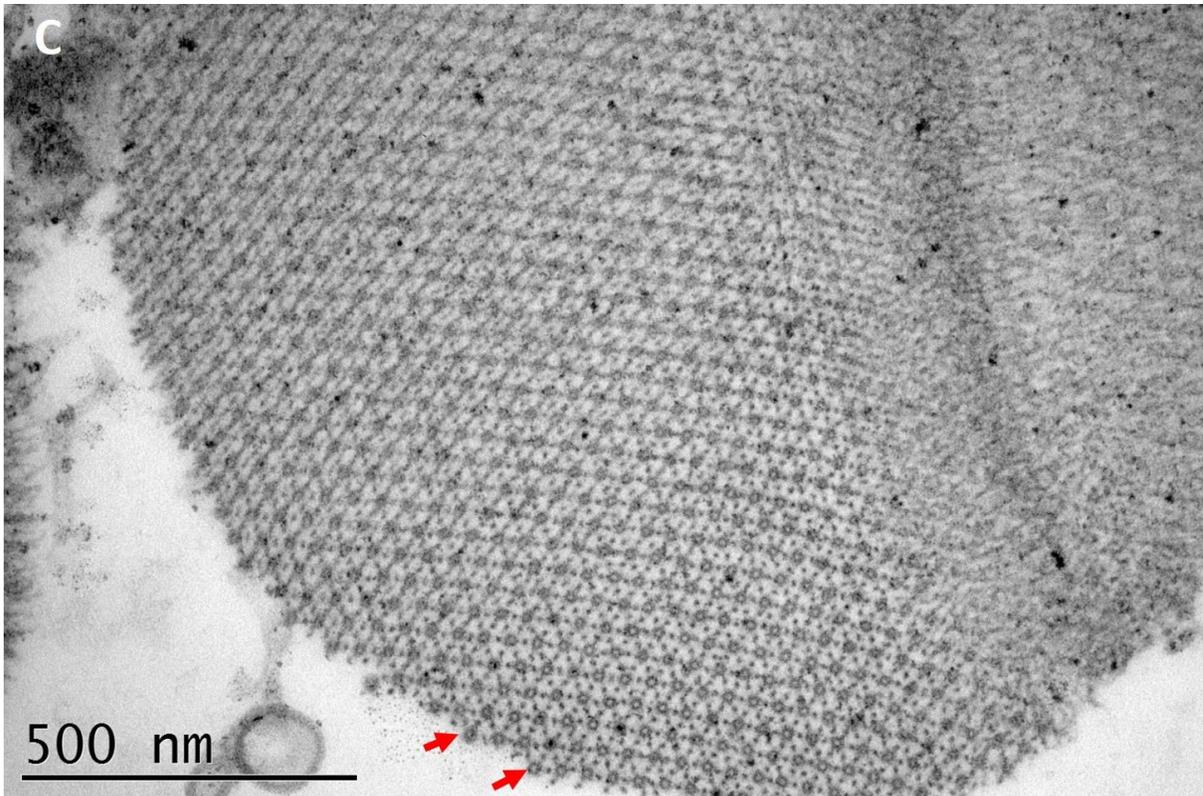


Figura 23. Miofibrillas de IFMs de pupas y mosquito adulto. Miofibrillas de los IFMs disecados de pupa y mosquito adulto observadas por MET. A) Miofibrilla de pupa que muestra dos sarcómeros con líneas Z definidas (flechas blancas) y bandas H (flechas azules) aún no completamente formada. B) Dos miofibrillas de IFMs de adulto que muestran varios sarcómeros con líneas Z (flechas blancas) y bandas H (flechas azules) bien definidas. C) Corte transversal de una miofibrilla se observa el arreglo hexagonal (flechas rojas). M=mitocondrias. Los tamaños se muestran en cada imagen.

11.5 Análisis ultraestructural de los IFMs en formación en L4

Con los resultados previos obtenidos tanto por histología, microscopía confocal y MEB, conocemos la morfología, así como el número de fibras musculares que integrarán a cada IFMs en formación. Ahora, queríamos conocer la conformación ultraestructural de los IFMs en L4, y cómo inicia la formación de los IFMs. En general, el desarrollo de los músculos de vuelo tanto en organismos vertebrados como en invertebrados ocurre de manera similar, siendo una diferencia principal la complejidad del músculo que se formará. Para este fin se disecaron IFMs de L4 y se analizaron por MET. Observamos que el desarrollo de los mioblastos, las células precursoras de los músculos, es asincrónico. Tienen un tamaño promedio de 5 μm , su núcleo es ovalado o esférico, este abarca gran parte del citoplasma, y mayormente el DNA forma bandas claramente definidas (Figuras 24 A, C). Los mioblastos están separados entre ellos por una membrana celular individual (flechas blancas) y presentan prolongaciones membranales, posiblemente filopodios (Figura 24 C, flechas rojas). Los mioblastos jóvenes no presentan miofilamentos sintetizados en su citoplasma. En cambio, los mioblastos maduros ya presentan miofilamentos en su citoplasma (Figura 25 A, flechas blancas), éstos recorren aproximadamente una cuarta parte de la circunferencia, cercanos a la membrana celular del mioblasto. El núcleo sigue siendo esférico, pero la organización del DNA es mayormente en estructuras circulares (Figura 25 B, cabezas de flechas blancas) y no en banda como en los mioblastos jóvenes. Una vez que los mioblastos son maduros, tanto las Células Fundadoras (FC), como los Mioblastos Competentes de Fusión (FCM) son capaces de fusionarse y con ello iniciar la formación de la fibra. Como resultado del proceso de fusión, los núcleos comparten un citoplasma en común (sarcoplasma), en forma de *sincitio*, en donde hay una gran cantidad de organelos, principalmente vesículas y mitocondrias en división, sugiriendo que existe una alta actividad metabólica (Figura 26 A). Los núcleos fusionados forman largos surcos que recorren la fibra muscular en crecimiento (Figura 26 B). Una vez fusionados los mioblastos, es posible que parte de su membrana citoplasmática sea degradada, similar a lo que ocurre en *D. melanogaster* (Figura 26 A y C, flechas blancas).

Una vez iniciada la fusión de los mioblastos FCM con las FC, comienza la síntesis de los miofilamentos en diferentes puntos del sarcoplasma de la fibra muscular (Figura 27 A, flechas blancas). Conforme avanza el desarrollo de la fibra muscular, hay un incremento del número de miofilamentos y se empiezan a observar las bandas Z del sarcómero (Figura 27 B). En etapas más avanzadas del desarrollo muscular los miofilamentos comienzan a organizarse y se nota el incremento de los cuerpos Z sobre los filamentos sintetizados (Figura 27 C, flechas blancas y rojas, respectivamente).

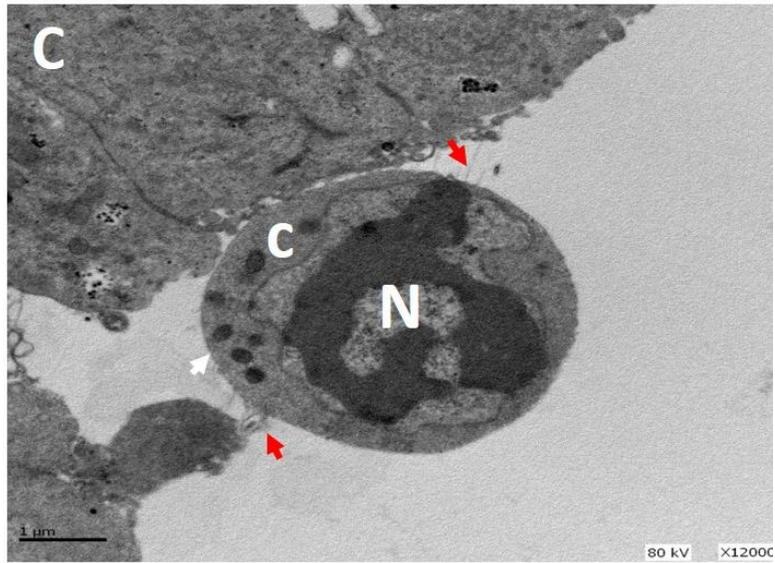
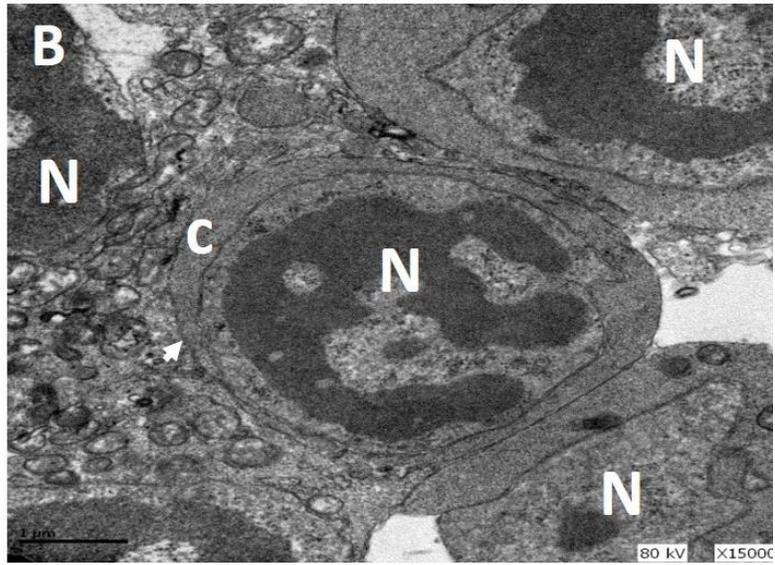
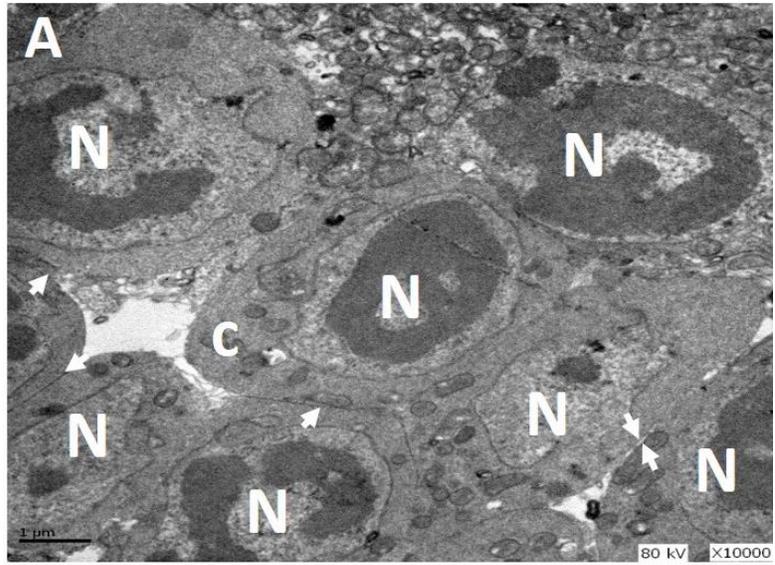


Figura 24. Mioblastos jóvenes de L4. A) Los mioblastos están separados entre ellos por su propia membrana celular, aún no muestran miofilamentos en su citoplasma. Adquieren diferentes morfologías, mayormente son esféricos u ovalados, tienen un núcleo de gran tamaño que abarca más del 80% de su citoplasma, en la mayoría de los casos en banda (B). C) Mioblasto de forma esférica que muestra pequeñas prolongaciones membranales, probablemente filopodios (flechas color rojo). Flechas blancas indican la membrana celular; N=Núcleo; c=citoplasma. Barra=1 μ m.

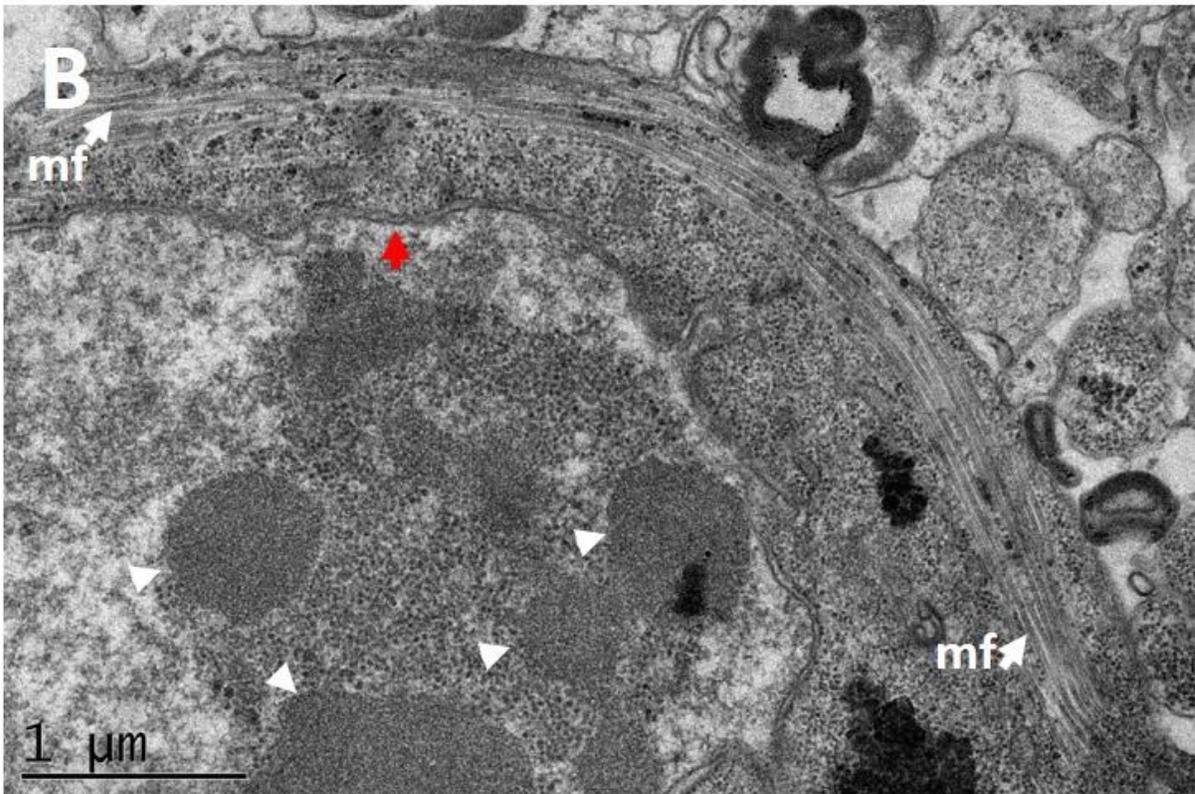
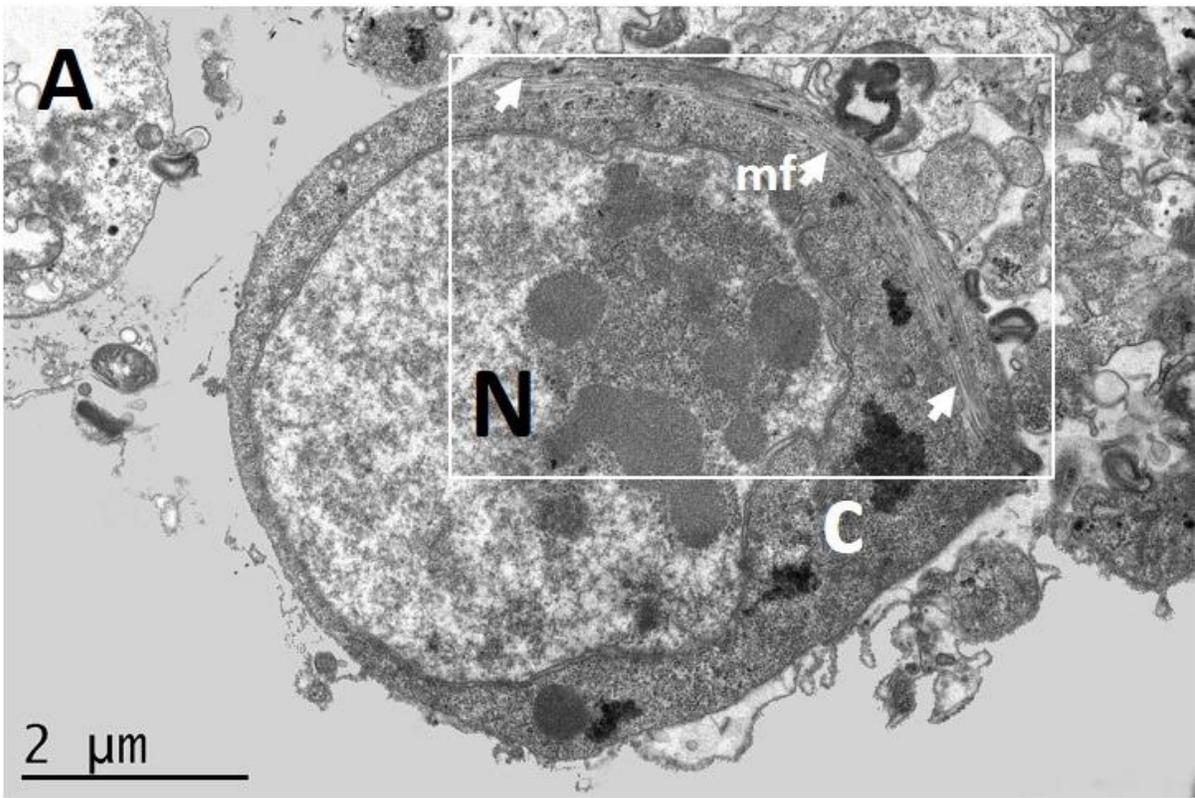


Figura 25. Mioblastos maduros de L4. A) Mioblasto maduro con una gran cantidad de miofilamentos (mf) cercanos a la membrana celular (flechas color blanco). B) Acercamiento de la zona de la imagen A (rectángulo), se observa con mayor detalle los miofilamentos cercanos a la membrana celular del mioblasto maduro. La flecha en color rojo señala la membrana nuclear. Las cabezas de flecha en blanco señalan la organización del DNA en el núcleo; N=Núcleo; c= Citoplasma. Barra en A=2 μm , B=1 μm .

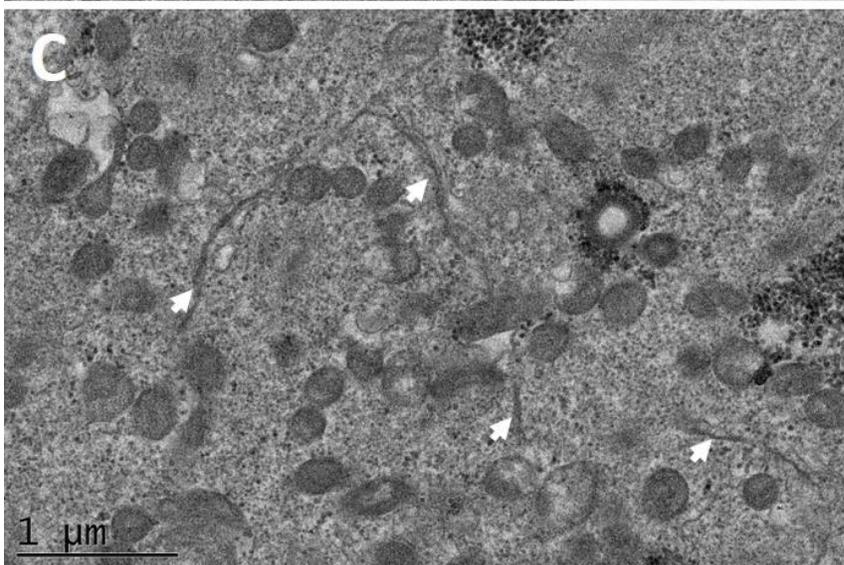
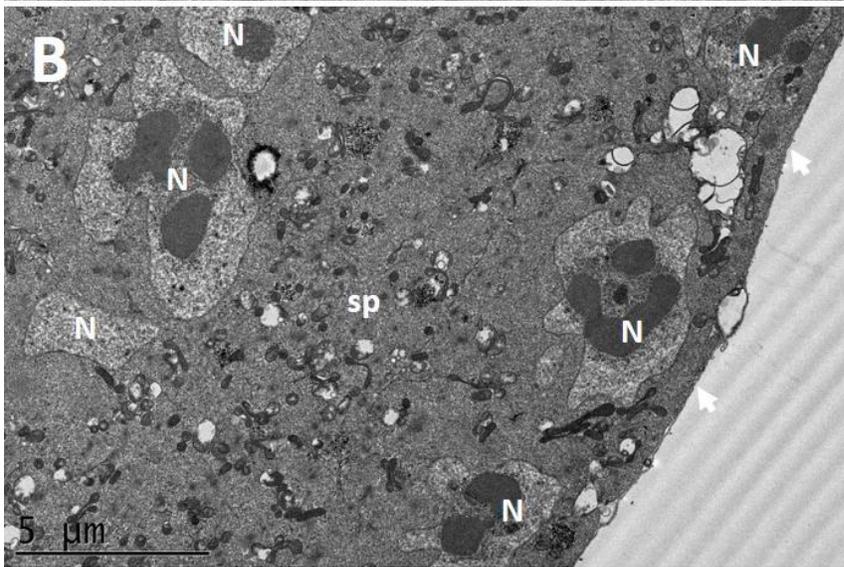
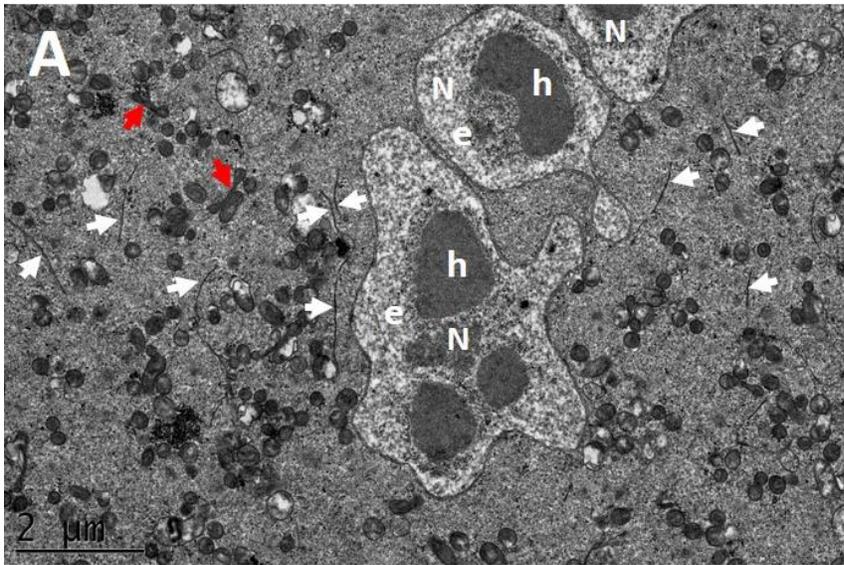


Figura 26. Núcleos de mioblastos fusionados en L4. Los núcleos, organelos y material citoplasmático de los mioblastos individuales comparten el citoplasma de la fibra muscular en formación. A) Núcleos de mioblastos fusionados a una FC. Se indican con flechas blancas los restos de membranas celulares de los mioblastos fusionados. Hay una gran cantidad de mitocondrias (flechas color rojo) en la fibra muscular en formación. B) Seis núcleos fusionados formando filas. Se indica con flechas blancas el borde de la fibra muscular en formación. C) Desintegración de la membrana celular de mioblastos fusionados (flechas blancas). N=Núcleo; h=heterocromatina; e=eucromatina; sp=sarcoplasma de la fibra en crecimiento. Barra en A y B= 2 μm ; C=1 μm .

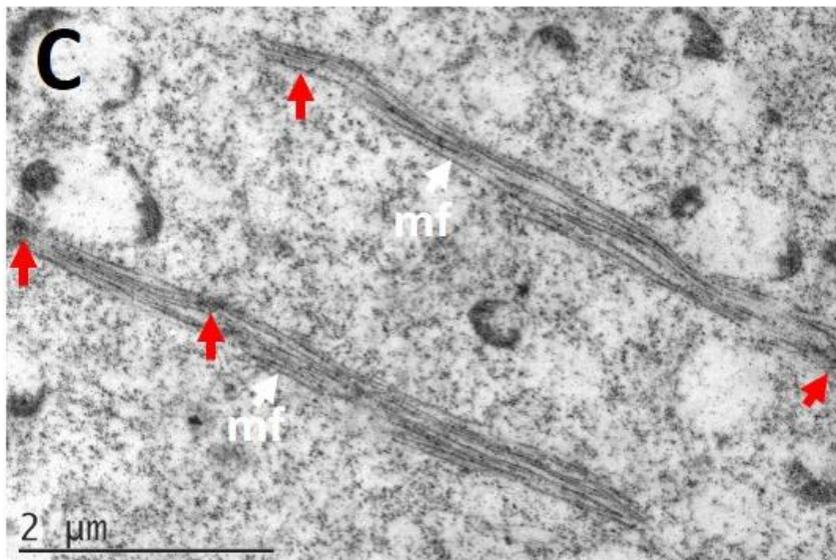
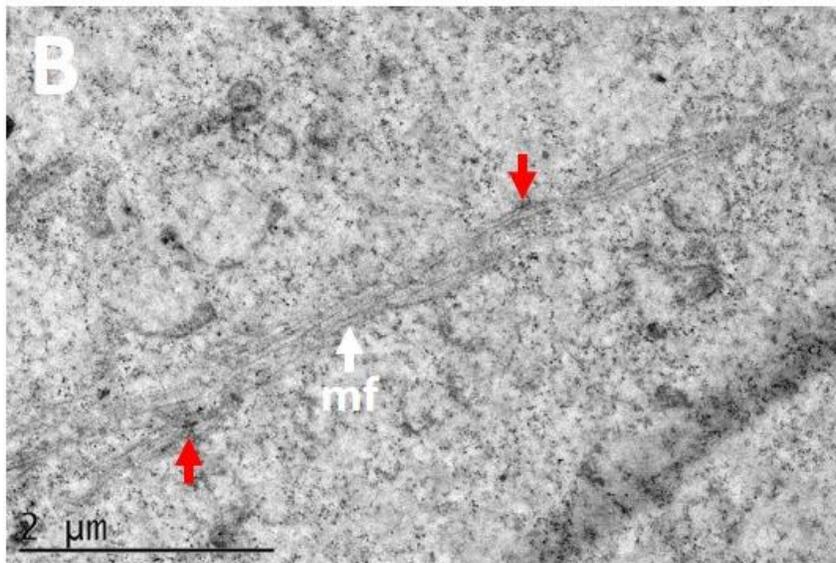
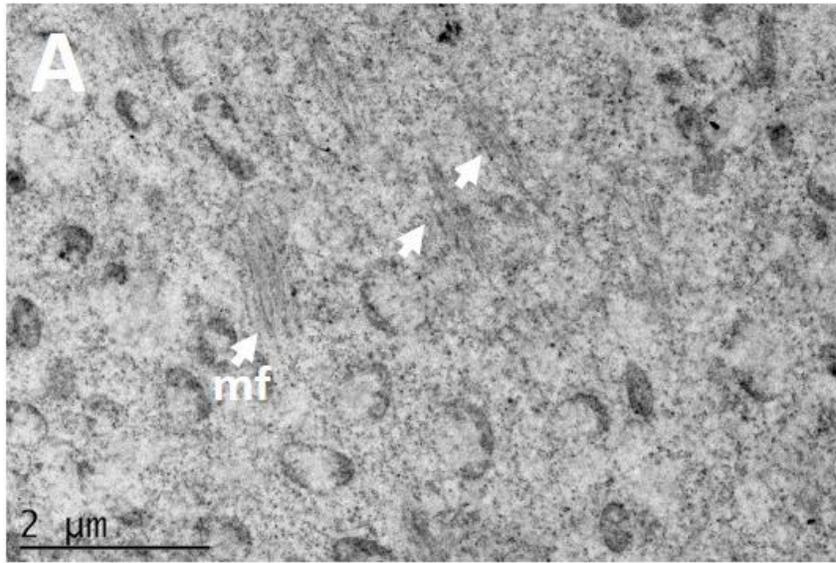


Figura 27. Formación de los miofilamentos en la fibra muscular. A) Pequeños fragmentos de miofilamentos (mf) en diferentes zonas del sarcoplasma (flechas blancas). B) Incremento del número de miofilamentos y la asociación de los "cuerpos Z" (flechas rojas). C) Los miofilamentos se comienzan a organizar para formar dos miofibrillas. Hay un incremento del número de "cuerpos Z" (flechas rojas). Barra=2 μ m.

11.6 Expresión de genes de proliferación celular en los precursores de los músculos indirectos de vuelo

Para caracterizar la diferenciación celular durante el desarrollo de los músculos de vuelo de *Ae. aegypti*, se eligieron genes descritos en *D. melanogaster* (<http://flybase.org/>) como representativos del proceso (tabla 1) y se analizó su expresión en el desarrollo del mosquito. Para realizar este análisis, se tomaron las secuencias de los genes de *D. melanogaster* y se buscaron los posibles ortólogos en la base de datos de *Ae. aegypti* (vectorbase), seleccionando los que presentaron el mayor porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos y se diseñaron los oligonucleótidos para analizar su expresión transcripcional mediante PCR punto final. Ya que el proceso de determinación-diferenciación de las células madres fundadoras de los músculos en el músculo de vuelo ocurre desde la etapa embrionaria del mosquito, se estudió la expresión de genes de diferenciación comparando embriones totales, con lo obtenido en los precursores de los IFMs de L4. Para este experimento se utilizó el gen de la proteína ribosomal S7 como control interno de expresión. Los genes Gcm-623 y 631 y el gen Notch presentaron un incremento evidente en sus niveles de expresión en los precursores musculares en L4 comparados con el embrión total, en cambio los transcritos de los genes L1-555, Loz-167, Pxn-342, Serp-222 tuvieron un nivel de expresión similar en embriones y precursores de los IFMs de L4. El gen S7 (control interno) mantuvo sus niveles de expresión transcripcional tanto en embriones como en los precursores musculares de L4 (Figura 28).

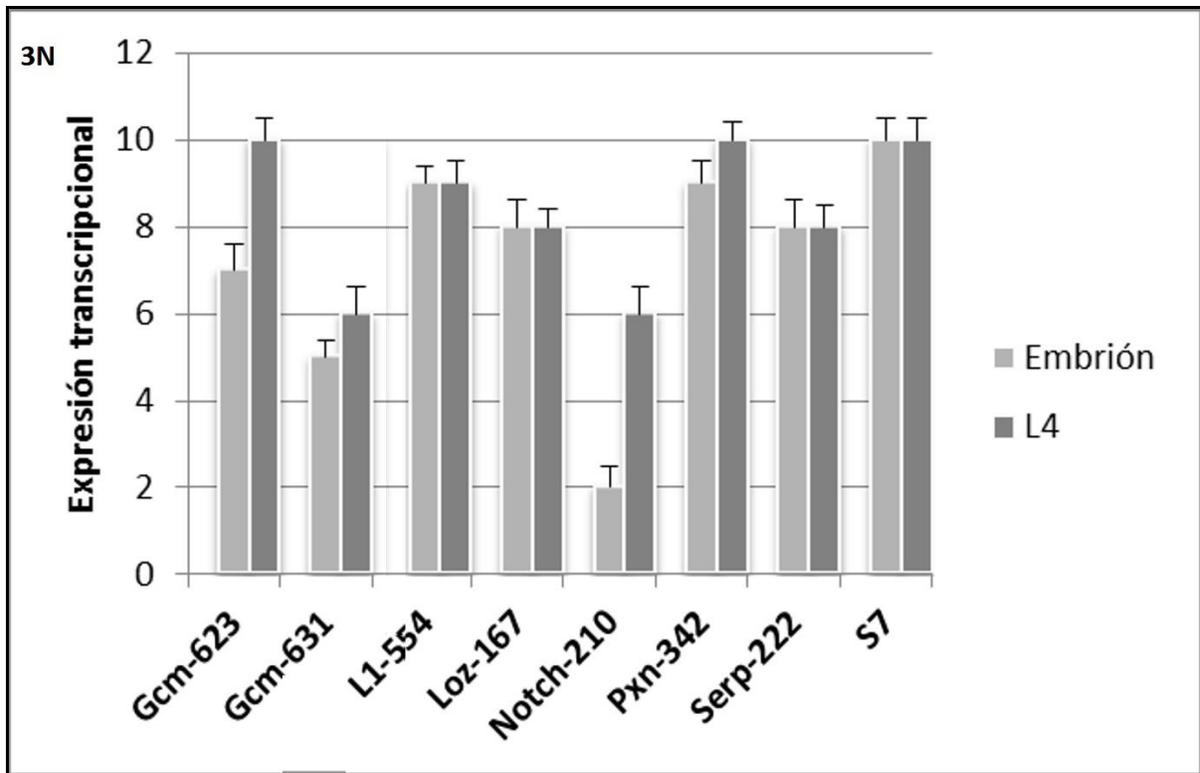


Figura 28. Expresión de genes de proliferación celular en embriones y precursores de IFMs en L4. Las barras claras representan los niveles de expresión transcripcional de los genes en embriones totales, y las barras oscuras representan el nivel de expresión transcripcional de los precursores de los IFMs aislados de L4. El gen ribosomal S7 se utilizó como control interno de expresión. Gcm: Glial Cell Missing; L1: marcador de membrana de lamelocitos; Loz: Lozange; Notch: Factor de Transcripción Notch; Pxn: Peroxidasina; Srp: Serpent; S7: gen de la proteína ribosomal S7.

11.7 Análisis de expresión transcripcional mediante FISH en precursores de los IFMs en L4

Para estudiar la expresión de los genes considerados marcadores de diferenciación y como se distribuyen estos transcritos en los precursores de los IFMs se usó la hibridación *in situ* acoplada a fluorocromos para su observación por microscopía de fluorescencia (Fluorescent *In Situ* Hibridization, FISH). Para este fin se disecaron precursores musculares de L4 temprana (sifones respiratorios aun no expuestos) y tardía (sifones respiratorios expuestos). El gen Gcm 623 en el análisis de expresión por RT-PCR se expresó más intensamente en los precursores de los IFMs de L4 que en embriones, también por este método se observó intensamente expresado a todo lo largo del precursor muscular (Figura 29). En los precursores de los IFMs de L4 temprana los genes Loz-167 y Srp-222 se expresaron más que los genes Gcm-623, L1-555, Notch y Pxn-342. En el estadio L4 tardío, en acuerdo a lo observado por PCR, se observó un incremento notable del nivel de expresión del gen Gcm-623 comparado con la etapa embrionaria y la marca se encontró distribuida de manera similar a los filamentos de actina (Figura 29). Para normalizar, se usó el gen de la *gapdh* cuya señal mantuvo un nivel de expresión transcripcional similar en los precursores musculares de ambos estadios de desarrollo de L4 analizados (Figura 29).

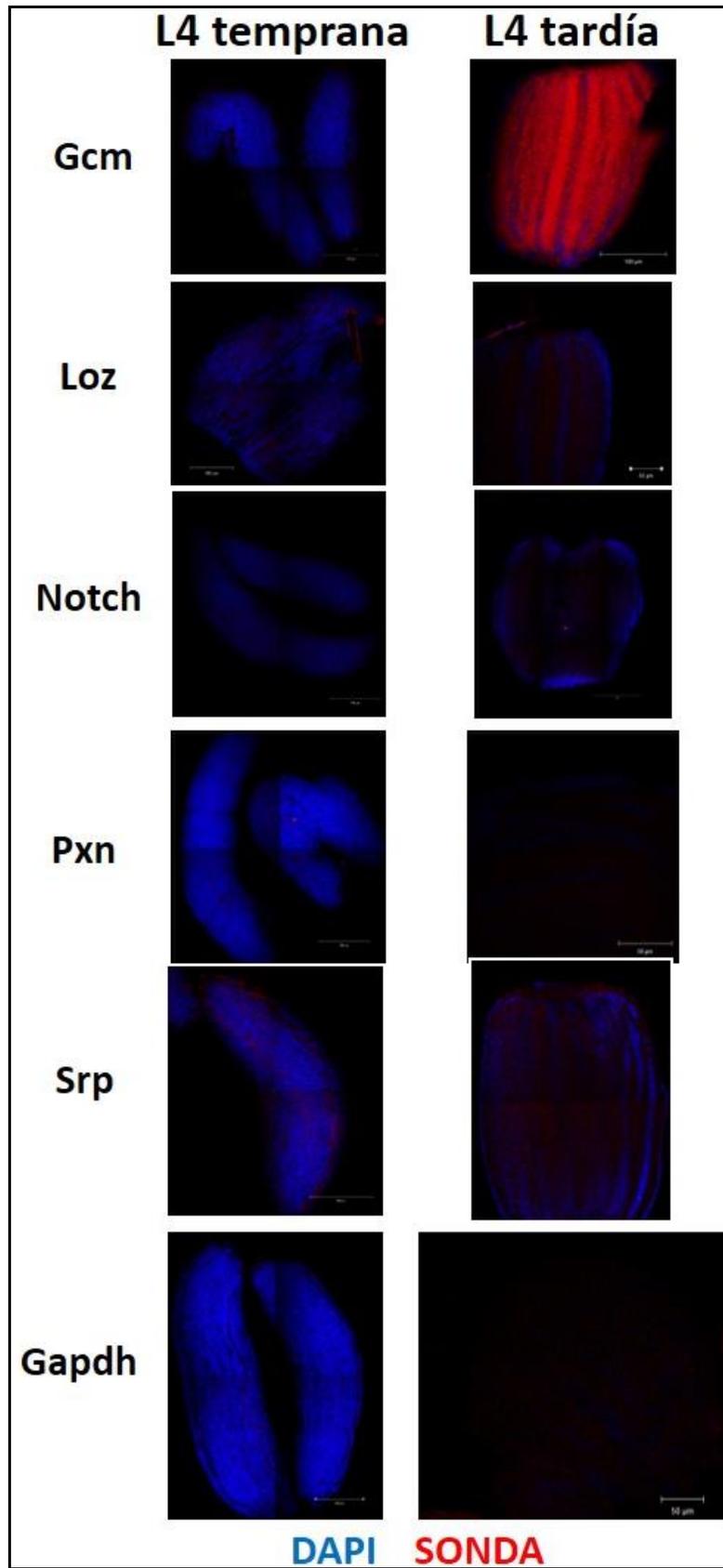


Figura 29. Análisis de la expresión de genes de diferenciación en precursores de los IFMs en L4. Precursores musculares de L4 temprana y tardía muestran expresión transcripcional de los mensajeros visualizada por FISH. Los núcleos están marcados con DAPI en azul y los mensajeros/sonda se observan en rojo Barra=50 μm . Gcm: Glial Cell Missing; Loz: Lozange; Notch: Factor de Transcripción Notch; Pxn: Peroxidasina; Srp: Serpent; gapdh: gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa.

11.8 Análisis de expresión transcripcional de los precursores de los IFMs retados con LPS

Se ha reportado que los músculos de vuelo pueden comportarse como órganos inmunes, produciendo péptidos antimicrobianos y algunos de estos genes se ha reportado que participan tanto en respuesta inmune como en el desarrollo de los músculos de vuelo (Chatterjee A *et al.* 2016), por lo que se esperaba que algunos se expresaran en los músculos en formación. Por esta razón analizamos la expresión de los mensajeros representativos de diferenciación, para ello se sometieron los precursores de los IFMs de L4 tardía a un estímulo con lipopolisacárido. A los 15 min post-reto se observó un incremento de los niveles de expresión de los mensajeros Gcm, Loz, Notch, Pxn y Srp y para los 30 min post-reto hay una disminución en los niveles de expresión transcripcional de los mensajeros Gcm, Loz y Notch, en tanto que los mensajeros Pxn y Srp mantuvieron sus niveles similares de expresión (Figura 30).

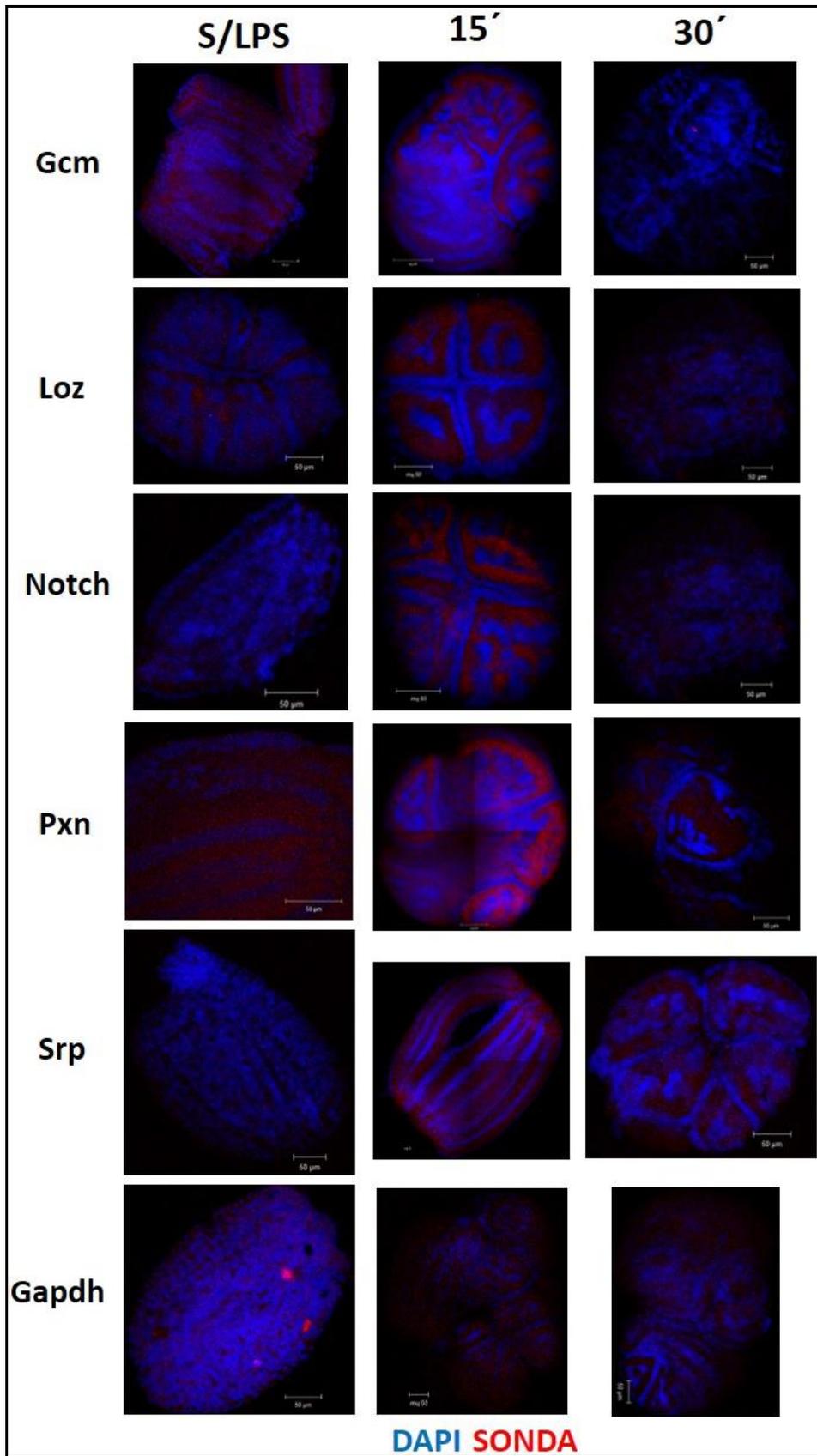


Figura 30. Expresión de los mensajeros en los precursores de los IFMs en L4 tardía retados con LPS. Los precursores musculares de L4 fueron retados con 1µg de LPS, y a los 15 y 30 min se procesaron para FISH. Se observó la señal de las sondas que se utilizaron en rojo. Como control se utilizaron precursores de los IFMs no retados. En azul están marcados los núcleos con DAPI. Gcm: Glial Cell Missing; Notch: Factor de Transcripción Notch; Pxn: Peroxidasina; Srp: Serpent; Gapdh: Gliceraldehido 3fosfato deshidrogenasa. Barra=50 µm.

11.9 Análisis proteómico de precursores de los IFMs en L4 tardía

Para conocer las proteínas que se expresan en los precursores musculares en desarrollo en L4, se realizó el análisis por espectrometría de masas de las proteínas totales, las cuales se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 12%, se tiñeron con Coomassie y se seleccionaron y cortaron las nueve bandas que mostraron mayor abundancia (Figura 31). Se identificaron en total 26 proteínas (Tabla 4) usando la base de datos de *Ae. aegypti* (<https://www.vectorbase.org>).

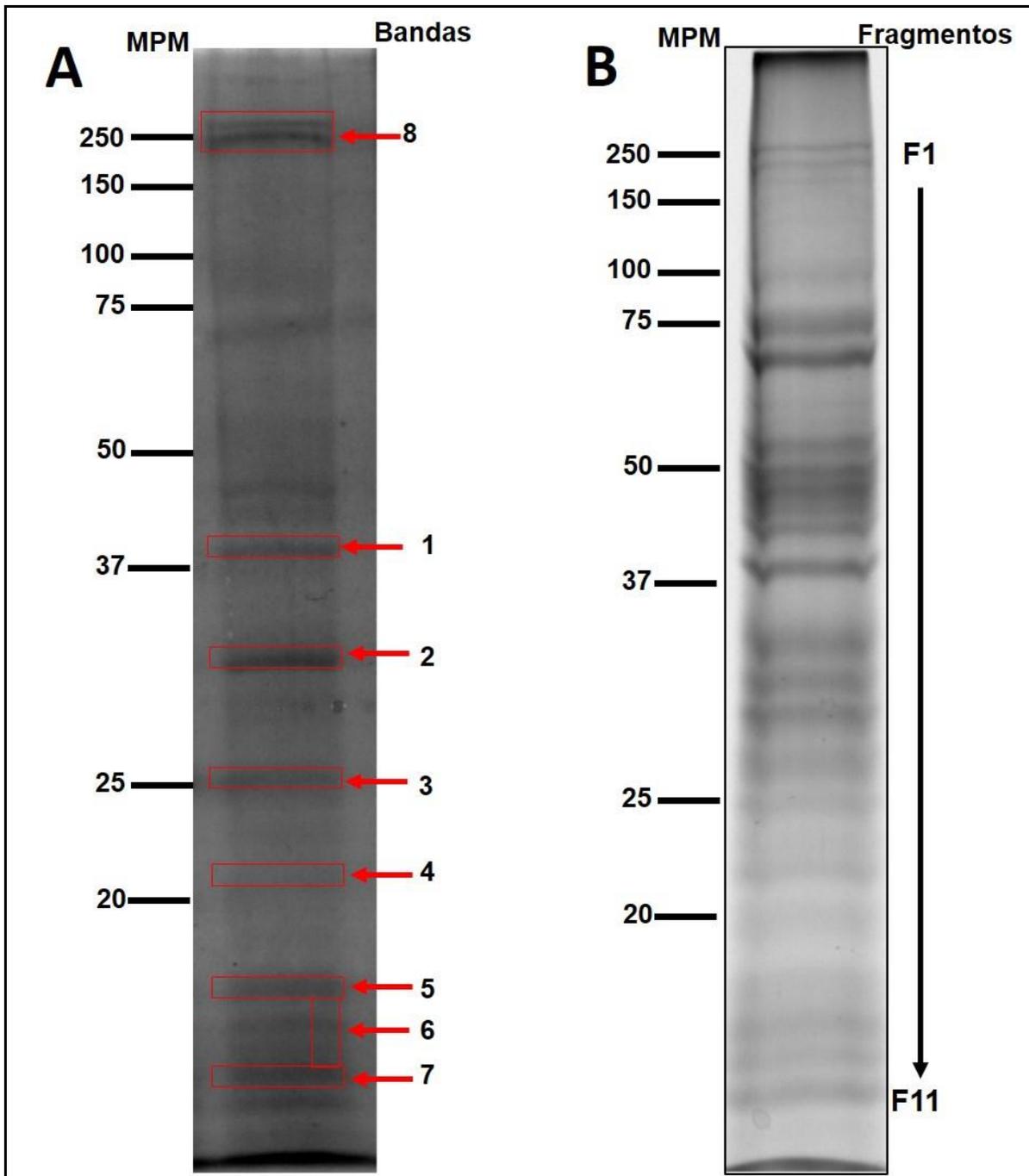


Figura 31. Geles de proteínas totales de precursores de los IFMs en L4 tardía. Las proteínas totales de los precursores de los IFMs en L4 tardía fueron resueltas en geles de poliacrilamida al 12%. A) Se señalan las bandas que muestran mayor abundancia (1-8). B) El carril proteico se analizó por completo, se dividió en 11 fragmentos (F1-F11) para su análisis.

Bandas	No. de Acceso ^a	Ms ^b	Mr (kDa) ^c	pI ^d	Descripción de la proteína
Banda 1					
	AAEL009185PA	141.86	39,874.26	6.3468	Creatina y arginina cinasa
	AAEL000270-PA	11.30	37,850.15	6.4226	Subunidad 7 reguladora del proteasoma 26S
	AAEL007555-PA	9.82	46,410.32	6.3553	Acil-CoA deshidrogenasa
	AAEL004347-PA	9.56	44,230.84	6.0963	Subunidad M del factor de iniciación de la traducción (eIF3m)
Banda 2					
	AAEL016984-PB	15.34	35,440.67	8.2305	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
	AAEL006386-PA	13.87	31,572.28	7.9975	Proteína ribosomal 39S
	AAEL017082-PA	10.19	27,138.83	12.1589	Factor de splicing rico en Arg/Ser
	AAEL004338-PA	11.29	38,508.37	6.8196	Piruvato deshidrogenasa
	AAEL009651-PA	26.75	17,240.62	5.9744	Subunidad alfa del complejo asociado al polipéptido naciente
	AAEL001872-PA	15.75	30,696.20	8.7901	Canal aniónico dependiente de voltaje
	AAEL009345-PA	10.24	29,903.26	5.1773	Prohibitina 2
Banda 3					
	AAEL002572-PA	45.98	22,833.33	4.3647	Cadena ligera reguladora de miosina 2 (mcl-2)
Banda 4					
	AAEL004423-PA	43.70	19,557.01	5.0502	Cadena D ATP sintasa mitocondrial F0

	AAEL012666-PA	20.23	23,125.03	7.3171	Proteína de unión a fosfatidiletanolamina
	AAEL004467-PA	19.40	20,635.08	6.9696	Homólogo de la proteína cromobox 1
	AAEL007699-PD	17.54	21,437.01	10.6070	Proteína L9 de la subunidad ribosomal 60S
Banda 5					
	AAEL017481-PA	44.54	18,678.88	8.0002	Queratina tipo II
	AAEL007771-PA	26.14	17,510.02	10.2875	Proteína L22 de la subunidad ribosomal 60S
	AAEL005179-PA	17.79	14,388.65	4.7494	Vitelogenina putativa 2
Banda 6					
	AAEL005179-PA	22.77	14,388.65	4.7494	Proteína rica en serina
	AAEL014583-PC	15.51	11,343.62	4.2449	Proteína P2 de la subunidad ribosomal ácida 60S
	AAEL006244	34.62	53,032.35	7.5686	Ciclofilina
	AAEL017481-PA	22.29	18,678.88	8.0002	RNA helicasa dependiente de ATP con caja DEAD
	AAEL015683-PA	17.79	13,627.87	10.9280	Histona H2B
	AAEL010756-PA	19.63	17,328.16	10.5888	Proteína S19 de la subunidad ribosomal 60S
Banda 7					
	AAEL014583-PC	29.69	11,343.62	4.2449	Proteína P2 de la subunidad ribosomal 60S
Banda 8					
		52.74	221.2	5.96	Cadena pesada de miosina

Tabla 4. Proteínas identificadas en los precursores de los IFMs de L4 por MS.

Las proteínas totales se obtuvieron de precursores musculares de L4 tardía y corridas en un gel SDS-PAGE al 12%. **a** Numero de acceso en VectorBase (www.vectorbase.org) **b** Mascot score **c** Masa teórica (Mr)

d Punto isoelectrico reportado en www.vectorbase.org

11.10 Análisis de expresión de miosinas en IFMs de L4

Para su función, las miosinas se asocian a los filamentos de actina y hacen una tracción que acorta el sarcómero mediante un mecanismo de deslizamiento. Es importante mencionar que no todas las miosinas son de tipo muscular, hay miosinas que son específicas de células hematopoyéticas, se localizan en la membrana y regulan la elasticidad celular, como la miosina 1G (Myo1G), la cual regula la plasticidad del citoesqueleto, la migración celular, la exocitosis y la endocitosis en los linfocitos B (Olety *et al.* 2009; Maravillas *et al.* 2014; López *et al.* 2015).

Para conocer el tipo de miosina que se expresaba en los precursores de los IFMs en L4, analizamos la expresión y localización de miosinas musculares y no musculares por inmunofluorescencia. Para tal fin, utilizamos el anticuerpo anti-miosina A4.1025 de Millipore (dirigido a la cadena pesada de miosina muscular), un anticuerpo dirigido para miosina no muscular Myo 1G (ab121657), y por último se probó el mAb A-140 (Generado en el grupo de la Dra. MC Rodríguez en el INSP) que por western blot reconoce lisados proteicos de intestino, torax y abdomen de *Drosophila*, así como en músculo esquelético de ratón con un peso molecular que corresponde a miosina.

Los precursores de IFMs donde se utilizó el anticuerpo Anti-Myo1G no observamos un reconocimiento, en cambio el anticuerpo dirigido contra la cadena pesada de miosina muscular mostró reconocimiento en todo el primordio, principalmente rodeando los núcleos y sobre los filamentos de actina que recorren el primordio. En el caso del anticuerpo A-140 observamos reconocimiento principalmente en los filamentos de actina del músculo de vuelo (Figura 32).

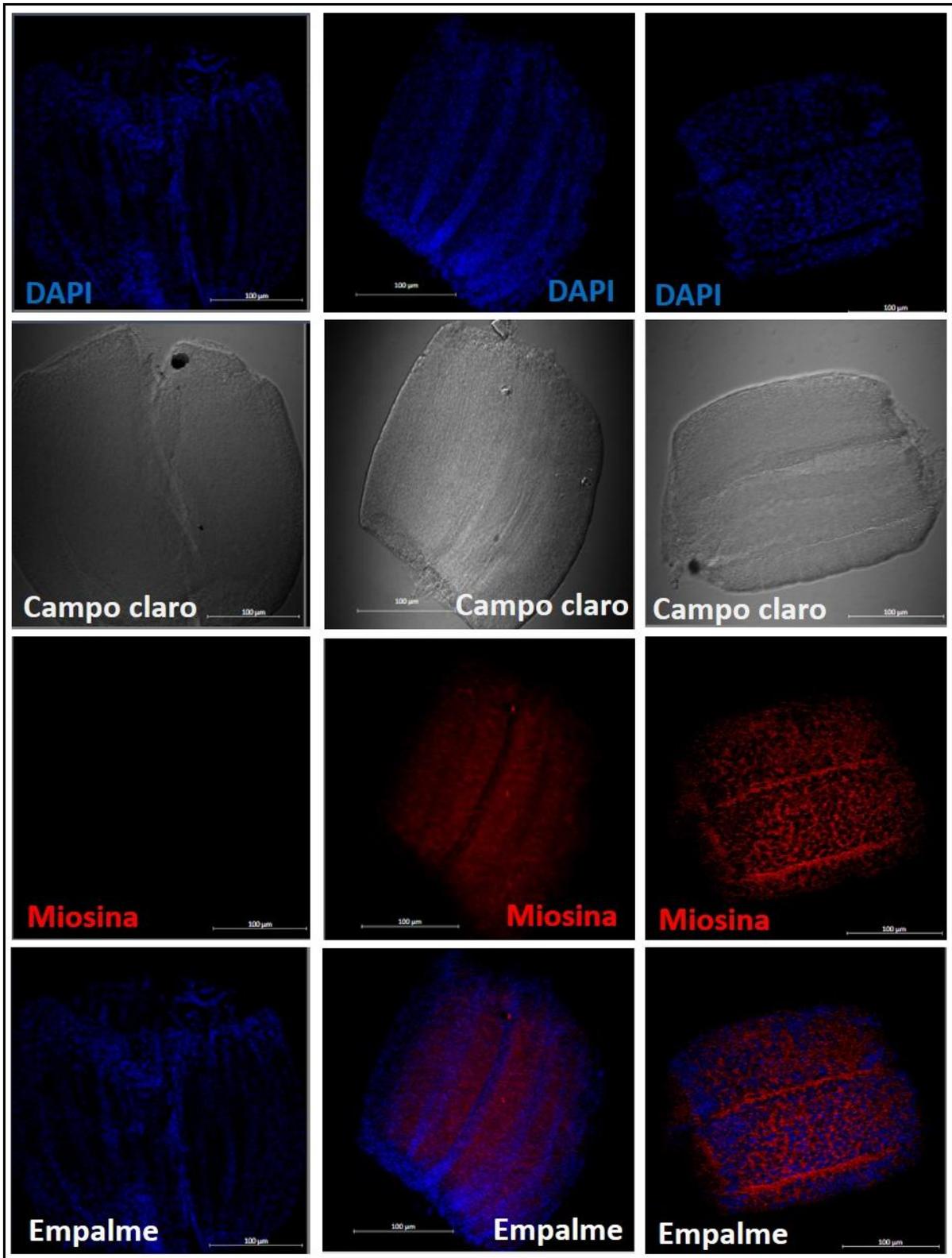


Figura 32. Expresión de miosinas en precursores de los IFMs de L4. Los precursores musculares se disecaron de L4 tardía, fueron fijados y teñidos con anticuerpos para la identificación de: miosina no muscular Myo1G (Cat. Núm. ab121657) (Izquierda). Cadena pesada de miosina muscular (A4. 1025) (Centro). El mAb A-140 reconoce miosina de células epiteliales de estómago del mosquito y músculo esquelético de ratón (Derecha). Los núcleos se colorearon con DAPI (azul). Barra=100 μ m.

Para conocer la distribución de miosina en los precursores del músculo de vuelo y su asociación con los IFMs, se realizó un inmunomarcaje en cortes, donde se utilizó el anticuerpo anti-miosina muscular y se observaron por MET. Se observó poco reconocimiento en los miofilamentos que se están sintetizando (Figura 33 A, B) y ninguna señal en el control negativo incubado únicamente con el anticuerpo secundario (Figura 33 C).

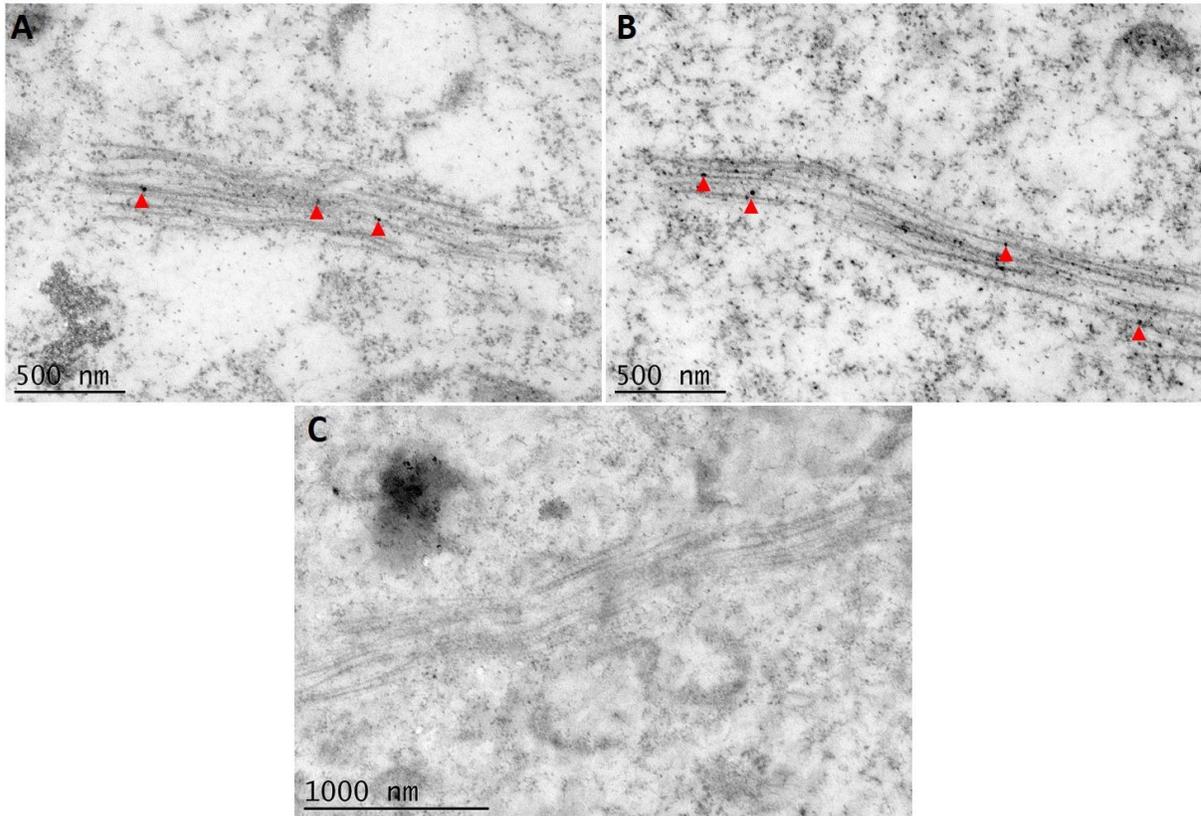


Figura 33. Detección de miosina en los precursores de los IFMs en L4 tardía. Inmunomarcaje de miosina muscular en los precursores musculares de larvas de cuarto estadio de desarrollo y observados por microscopía de transmisión. (A y B) Se observó el reconocimiento por el anticuerpo anti-miosina (cadena pesada) (cabezas de flecha). (C) Control negativo del anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario Anti-ratón IgG lleva acopladas partículas de oro de 20 nm. Las barras de escala se indican en cada imagen.

12. Discusión

12.1 La miogénesis de los músculos de vuelo

Los músculos de los metazoarios participan en varias funciones, desde caminar, correr y volar, hasta dar soporte y forma a la masa corporal de la mayoría de los animales (Roy *et al.* 1997; Sambasivan y Tajbakhsh 2007; Gunage *et al.* 2017). Los músculos se desarrollan del mesodermo, una capa germinal que, en conjunto con el ectodermo y el endodermo, dan origen a los diferentes tejidos y órganos que constituyen el cuerpo bilateral de un organismo (Gunage *et al.* 2017). En *D. melanogaster* se han realizado estudios sobre desarrollo muscular y, entre muchas otras cosas, se han encontrado vías de señalización conservadas en el proceso de miogénesis y se han identificado mecanismos celulares implicados en la maduración de los precursores mioblásticos mononucleados en células musculares multinucleadas maduras (Sambasivan y Tajbakhsh 2007; Abmayr y Pavlath 2012; Gunage *et al.* 2017).

En *Drosophila*, la miogénesis ocurre en dos etapas: durante la embriogénesis se generan los músculos del estadio larvario y estos son en su mayoría destruidos en el estadio pupal durante la metamorfosis, posteriormente, los músculos de la etapa adulta son generados *de novo* durante las etapas larvaria y pupal (Dobi *et al.* 2015). La miogénesis de la etapa adulta comienza bastante temprano, de hecho, es posible rastrear el embrión y saber dónde se generaron los AMPs, estos son precursores miogénicos quiescentes mitóticamente que son arrestados hasta después de ocurrir la eclosión larval y están situados anatómicamente cercanos a los sitios de desarrollo de los músculos para la etapa adulta (Gunage *et al.* 2017). Los músculos de vuelo se clasifican en dos subgrupos, los IFMs, los cuales impulsan el movimiento de las alas durante el vuelo y los DFMs, que se encargan de controlar el ángulo de los movimientos de las alas (Ghazi *et al.* 2003).

Durante la etapa larvaria los precursores musculares que dan origen a los IFMs tanto DV como DL comienzan a ser visibles en L4, e incrementan de tamaño a medida que avanza el estadio de desarrollo (Fig. 21), caso contrario a lo que ocurre en *Drosophila*, en donde los músculos de la etapa adulta se forman durante la metamorfosis en el estadio pupal (Fernandes *et al.* 1991; Roy y VijayRaghavan 1998;

Sudarsan *et al.* 2001; Kozopas y Nusse 2002; Weitkunat *et al.* 2014; Dobi *et al.* 2015; Lemke y Schnorrer 2016; Gunage *et al.* 2017). En *D. melanogaster* los IFMsDL son los músculos más grandes, están integrados por seis fibras por hemitórax, estos se generan haciendo uso de un conjunto de músculos larvarios como andamios, los DOMs 1, 2 y 3, los cuales persisten a la histólisis durante la metamorfosis, para después transformarse en músculos maduros funcionales mediante numerosas rondas de fusión de mioblastos derivados de los AMPs (Fernandes *et al.* 1991; Fernandes y Keshishian 1996; Roy y VijayRaghavan 1998; Ghazi y Vijayraghavan 2003; Mukherjee *et al.* 2011; Schonbauer *et al.* 2011; Gunage *et al.* 2017). En el caso de los IFMsDV están integrados por tres grupos de fibras (I, II y III), estos grupos a su vez están conformados por cinco, seis y cuatro fibras, mientras que en *Drosophila* los grupos I, II y III están constituidos por tres, dos y dos fibras, respectivamente (Atreya y Fernandes 2008). Ambos subgrupos de precursores musculares, por MEB se observan integrados por estructuras parecidas a *gajos* (Figuras 16 y 17), los cuales corresponden a cada una de las fibras musculares.

12.2 Desarrollo de los IFMs y el evento de fusión de los mioblastos

Como se ha descrito con anterioridad, hay dos eventos de desarrollo muscular, uno ocurre durante la etapa embrionaria y otro durante la etapa larvaria. En el primer evento, la fusión de los mioblastos comienza con el reconocimiento y adhesión entre las FC y las FCMs. En la unión participa la superfamilia de inmunoglobulinas célula específica (IgSF), por ejemplo, las proteínas transmembranales Dumbfounded (Duf) y Roughest (Rst) que se expresan en las FC que funcionan de manera redundante mediando el reconocimiento y la adhesión (StrünkelInberg *et al.* 2001), siendo las proteínas Sticks y Stones (Sns) e Hibris (Hbs) sus contrapartes en las FCMs (Bour *et al.* 2000). Otra de las funciones entre Duf/Rst-Sns/Hbs (conocido como módulo de adhesión) es en el crecimiento del axón y el desarrollo del ojo (Ramos *et al.* 1993; Bao *et al.* 2010). El contacto directo entre las FC/miotubo y las FCM es necesaria para que ocurra la adhesión, en caso contrario la célula migrará para acercar los dos tipos de células a la proximidad (Richardson *et al.* 2010; Rochlin *et al.* 2010). La

proteína de adhesión N-cadherina participa durante el proceso de fusión, posiblemente formando uniones celulares en el sitio de fusión, por otro lado, se ha observado que para que la fusión de las membranas ocurra es necesario que N-cadherina sea removida del sitio de fusión (Dottermusch *et al.* 2012; Hamp *et al.* 2016). Sin embargo, la pérdida de su función por delección no evita la fusión en el embrión de *Drosophila* (Charlton *et al.* 1997; Dottermusch *et al.* 2012), lo que sugiere funciones redundantes potenciales con otros miembros de la familia de cadherinas.

De igual manera que en la etapa embrionaria, para que ocurra la miogénesis en la etapa larvaria se necesita la especificación de las FC y los FCMs. La fusión de estos dos tipos celulares origina un miotubo multinucleado o *fibra sincitial* (Baylies *et al.* 1998; Frasch 1999; Taylor 2002; Chen y Olson 2004), esta se alarga y se fija establemente de sus extremos a las células del tendón (en la lámina torácica), en donde sólo después de su unión se ensamblan sus miofibrillas hasta formar una fibra muscular madura (Dobi *et al.* 2015). Aproximadamente 8h después de la formación de la pupa (After Pupae Formation, APF), los mioblastos migran de los discos imagales para rodear los tres músculos larvales oblicuos (LOMs) e iniciar la fusión entre ellos y entre las 12 y 20h APF los mioblastos se fusionan con los LOMs y éstos se vacuolizan y se dividen en seis DLMs y hacia las 30 h APF la mayoría de los mioblastos se han fusionado con los DLMs recién formados. La fusión completa entre los DLMs en desarrollo y los mioblastos se logra hasta las 36 h APF. Las miofibras generadas se diferencian y se agrandan para completar la formación del músculo adulto (Fernandes *et al.* 1991). Una vez que finaliza el proceso de fusión, los tres músculos se dividen para formar un total de seis fibras musculares DL por hemitórax. El número final de fibras musculares DL maduras depende del número de plantillas iniciales, así como de la división de las plantillas, que se rigen directamente por la fusión de estos, por lo tanto, cualquier perturbación ya sea en el componente o en el proceso (plantillas y fusión de mioblastos, respectivamente) pueden afectar la biogénesis de los IFMsDL (Fernandes y Keshishian 1996; Roy y VijayRaghavan 1998; Gunage *et al.* 2017). Inicialmente, los IFMs son gruesos y delgados, de 1.6 μm en la etapa de pupas tempranas, estos aumentan de longitud hasta alcanzar un milímetro aproximadamente en el adulto, tienen un diámetro entre 100 y 200 μm y

cuando se observan en sección transversal presentan una forma ovalada (Reedy y Beall 1993; Josephson 2005).

Para que ocurra la fusión de los mioblastos, se lleva a cabo la formación de poros de fusión entre las FCs y FCMs, los cuales van a permitir la mezcla del material citoplasmático entre las células fusionadas (Sapir *et al.* 2008). En el nemátodo *C. elegans* se han identificado fusogenes que participan en la formación de los poros (Mohler *et al.* 2002). Un fusogen codifica para una proteína transmembranal que se localiza en el sitio de fusión y cuya presencia es esencial y suficiente para activar la fusión membranal entre ambos tipos de mioblastos (Sapir *et al.* 2008). A pesar de que se requieren muchos genes para la fusión de los mioblastos tanto en *Drosophila* como en vertebrados, hasta la fecha no se han identificado fusogenes en ambos sistemas, por lo que los mecanismos que participan en el acercamiento de las membranas para formar los poros durante la fusión de las membranas de los mioblastos hasta el momento se desconocen (Deng *et al.* 2017).

Durante la fusión de los mioblastos ocurren un sin número de eventos celulares como es el rearrreglo de la actina en los sitios de fusión. Una vez que los FCs y FCMs están fusionados, señales tanto del reconocimiento transmembranal como de las moléculas de adhesión causan que el citoesqueleto en ambos tipos de mioblastos sea sometido a remodelación, formando estructuras de focos de filamentos de actina (F-actina) en las FCMs, así como una delgada capa de F-actina en la membrana interna opuesta de las FCs. Los focos de actina en las FCMs participan en la formación de protuberancias invasivas de membranas similares a dedos (Sens *et al.* 2010). Se piensa que esta estructura de actina en los FCMs da la fuerza necesaria para empujar las bicapas lipídicas de las células a una gran proximidad. En respuesta a las fuerzas mecánicas generadas por las protuberancias invasivas de los FCMs, se recluta la miosina II no muscular (MyoII) en el sitio de fusión entre el FC y el miotubo. La acumulación de MyoII genera tensión cortical que facilita la yuxtaposición de la membrana celular y promueve la formación del poro de fusión (Kim *et al.* 2015). Se ha sugerido que el citoesqueleto de actina juega un papel central al forzar la yuxtaposición de las membranas de las FCs y FCMs, lo que conduce a la formación y expansión de los poros de fusión (Onel y Renkawitz 2009;

Schejter 2016; Schulman *et al.* 2015). Durante la fusión de los mioblastos embrionarios de *Drosophila* los focos de F-actina en los FCMs forman estructuras tipo podosomas en el sitio de fusión, la cual proporciona una fuerza invasiva sobre el FC y empujan las membranas celulares de los FCMs y FCs a una proximidad más cercana.

En cuanto a las vías que regulan la fusión de los mioblastos para la etapa adulta de *Drosophila* aún no se conocen por completo, aunque de manera general son similares a los mecanismos que regulan la miogénesis embrionaria (Deng *et al.* 2017). Para el desarrollo de los IFMs, los AMPs asociados con los discos imagales de las alas cursan por dos fases de amplificación para el desarrollo muscular adulto (Fernandes *et al.* 1991). Durante la fase inicial del desarrollo de los precursores musculares ocurre una división simétrica, la cual es regulada por la señalización de Notch logrando un incremento de los AMPs y durante la segunda fase ocurre una división asimétrica que de igual manera es regulada por Notch, así como Wnt cuyo resultado es la autorenovación de los AMPs y la regeneración de la progenie de mioblastos necesarios para los eventos posteriores de fusión (Gunage *et al.* 2014). Existen diferencias y similitudes entre la miogénesis de la etapa embrionaria de *Drosophila* y la etapa adulta, como por ejemplo se ha observado la participación de las mismas proteínas transmembranales Duf, Rst, Sns y Hbs en el reconocimiento y adhesión de los mioblastos (Gildor *et al.* 2012). En el caso de la actina, esta se acumula principalmente en el lado del sitio de fusión, después de recibir señales de la membrana celular, y forma una estructura similar a un foco. Al igual que con la miogénesis embrionaria, los reordenamientos de la actina durante la miogénesis en adultos requieren la función de las proteínas Arp2/3, así como los factores promotores de la nucleación de actina (NPF) WASp y SCAR, siendo WASp vital para la formación del poro de fusión (Mukherjee *et al.* 2011).

A diferencia de la etapa embrionaria en donde las FCMs y FCs están relativamente cercanos previo a la fusión (Beckett y Baylies 2007; Richardson *et al.* 2008), durante la miogénesis adulta, los mioblastos migran desde los discos imagales hasta la plantilla muscular/miotubos, manteniendo un estado semi-diferenciado durante su migración utilizando la vía Notch, en donde cada mioblasto expresa el ligando de

Notch Delta y reprime la diferenciación de sus células vecinas. La señalización de Notch decae cuando los mioblastos alcanzan la vecindad de los miotubos, permitiendo la diferenciación de los mioblastos y la expresión de marcadores como Sns (Gildor *et al.* 2012). Hasta el momento se han descrito más de 20 genes involucrados en el evento de fusión en organismos invertebrados y cerca de 30 genes en vertebrados (Revisado en Deng *et al.* 2017). Otro gen involucrado en el desarrollo muscular es *serpent*, donde se ha observado que su inhibición afecta la diferenciación de las células musculares en *Drosophila*, conduciendo a una pérdida de la mayoría de las fibras musculares de la pared del cuerpo (Hayes *et al.* 2001). Hasta el momento no hay estudios sobre su participación en el desarrollo de los músculos de vuelo de *Aedes sp.*

Otro proceso que ocurre en la maduración de los IFMs es la unión miotendinosa entre las miofibras multinucleadas y las células del tendón aparentemente ocurre a la par de la fusión de los mioblastos para formar las miofibras multinucleadas (Fig. 11 A), caso contrario se ha descrito en *Drosophila*, donde la unión miotendinosa ocurre una vez que las miofibras multinucleadas ya están formadas (Weitkunat *et al.* 2014). La conexión física real entre la célula del tendón epidérmico y las células musculares en la unión miotendinosa está mediada por las interacciones entre moléculas de adhesión de integrina compartidas y de tipo celular específicas durante los estadios pupales (Gunage *et al.* 2017).

12.3 Participación de las proteínas actina y miosina en la formación de los músculos de vuelo

Las dos proteínas más abundantes en el tejido muscular son la miosina y la actina, las cuales se asocian para conformar la unidad contráctil del músculo, el sarcómero, el cual se acorta mediante un mecanismo de deslizamiento, en donde los filamentos gruesos de miosina bipolar se introducen entre los filamentos delgados de actina reticulada (Huxley y Niedergerke 1954). El tamaño del sarcómero de los músculos de vuelo de *Drosophila* es similar al del de los músculos esqueléticos del humano (Vigoreaux 2006; Ehler y Gautel 2008; Llewellyn *et al.* 2008; Regev *et al.* 2011). La mayoría de los músculos relajados están bajo tensión, llamada pasiva, en ausencia de fuerzas contráctiles activas. La fuente de esta tensión pasiva son las miofibrillas

mismas (Magid y Law, 1985), con una importante contribución de la proteína elástica titina o conectina, que en los vertebrados se extiende a través de la mitad de un sarcómero desde el disco Z a la línea M y que se conecta de forma estable con filamentos delgados, por lo que se les acuñó el término de "*filamentos de conexión*" (Maruyama *et al.* 1976; Fürst *et al.* 1988; Gautel y Goulding 1996; Linke *et al.* 1996; Tskhovrebova y Trinick 2003; Gautel 2011a). Los filamentos de actina polares (también llamados filamentos delgados) están anclados en el disco Z por la proteína α -actinina. Los filamentos gruesos constituidos por haces de miosina están centrados en la línea M e interactúan con la actina a través de sus cabezas de miosina. La titina, es una proteína que forma los filamentos de conexión, se ancla en el disco Z y se extiende a través de la banda I hasta la línea M (Maruyama *et al.* 1977; Maruyama 2002).

En artrópodos, las actinas se clasifican en tres grupos funcionales: actinas del citoesqueleto, actinas del músculo adulto y actinas musculares larval-adultas (Salazar *et al.* 1994).

El genoma de *Ae. aegypti* contiene cinco genes que codifican para actinas (*AeAct-1-5*). La *AeAct-1* tiene una alta similitud en su secuencia de aminoácidos con las actinas musculares de *B. mori* y *D. melanogaster* (Ibrahim *et al.* 1996). *AeAct-2* se expresa principalmente en los tejidos de la cabeza y la pared del cuerpo (Hayes *et al.* 2001). El gen *AeAct-3* no se detecta en estadios larvarios tempranos, sino hasta L4 tardías y su nivel de expresión incrementa en pupas machos y en el tejido torácico de mosquitos machos tenerales, por tanto, es específico de mosquitos machos (Vyazunova y Lan 2004). El gen *Act-4* es el único que se expresa de manera abundante en los IFMs dorsoventrales y dorsolongitudinales de pupas hembras y en menor abundancia en las patas en desarrollo (Fig. 23) (Muñoz *et al.* 2004; Labbé *et al.* 2012).

En el caso de *D. melanogaster*, su genoma contiene seis genes de actina (Fyrberg *et al.* 1980; Tobin *et al.* 1980). Dos genes, *ACT5C* y *ACT42A* forman parte del citoesqueleto, se expresan en todas partes durante la embriogénesis (Burn *et al.* 1989; Tobin *et al.* 1990). Otros cuatro genes: *ACT57B*, *ACT87E*, *ACT79B* y *ACT88F* son predominantemente isoformas específicas de músculo, pero cada uno es único

en sus patrones de expresión temporal y espacial (Fyrberg *et al.* 1983; Tobin *et al.* 1990; Keller *et al.* 1997; Hiromi y Hotta 1985; Ball *et al.* 1987; Courchesne y Tobin 1989). Los transcritos de *ACT57B* y *ACT87E* son más abundantes durante la embriogénesis tardía y están presentes a niveles reducidos durante el crecimiento larval y durante el desarrollo pupal tardío. *ACT88F* y *ACT79B* son abundantes solo cuando se desarrolla la musculatura adulta y probablemente codifican las actinas encontradas en los músculos fibrilares y tubulares del adulto que se diferencian *de novo* de los mioblastos imagales (Fyrberg *et al.* 1983; Vyazunova y Lan 2004).

13. Conclusiones

En este proyecto analizamos el desarrollo de los IFMs del mosquito adulto durante la etapa larvaria de *Aedes aegypti*. De acuerdo con su ubicación y posición anatómica observada durante la disección y análisis histológico, corresponden a los músculos indirectos de vuelo: Dorsoventrales y Dorsolongitudinales. Los dos tipos de precursores musculares comienzan a ser visibles y fácilmente manipulables a partir del cuarto estadio larvario, adquieren una forma cilíndrica y están divididos en *gajos*, cada una de estas unidades, mediante la fusión de los mioblastos, dará origen a una fibra muscular que integrará los músculos de vuelo ya sean Dorsoventrales o Dorsolongitudinales. Ambos tipos de músculos difieren en el número de fibras que lo conforman, así como en el tamaño, siendo los IFMsDL son más largos en comparación a los IFMsDV. Por otro lado, se detectó la expresión de las dos proteínas de mayor abundancia en los IFMs, miosina y actina.

Los resultados obtenidos en este proyecto contribuyen al conocimiento del desarrollo de los IFMs del mosquito vector *Aedes aegypti* y poder hacer uso de estos hallazgos para

14. Perspectivas

- 1.- Buscar mediante histología los precursores de los IFMs en L3.
- 2.- Estudiar el evento de fusión de los mioblastos en L4 y el estadio de pupa.
- 3.- Analizar el desarrollo de los IFMs durante el estadio pupal tardío.
- 4.- Analizar el mecanismo de unión entre los tendones y los precursores de los IFMs durante la metamorfosis.
- 5.- Analizar el transcriptoma de los precursores de IFMs en L4 y Pupa.
- 6.- Comparar el perfil proteico de los precursores musculares de IFMs de machos y hembras L4.

15. Referencias

1. Andrej Shevchenko, Henrik Tomas, Jan V Olsen, & Matthias Mann (2007). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*, vol 1, num 6, pp 2856-2860.
2. Bennett, S. N., E. C. Holmes, M. Chirivella, D. M. Rodriguez, M. Beltran, V. Vorndam, D. J. Gubler and W. O. McMillan (2006). "Molecular evolution of dengue 2 virus in Puerto Rico: positive selection in the viral envelope accompanies clade reintroduction." *J Gen Virol* 87(Pt 4): 885-893.
3. Cabezas C. 2005. Dengue en el Perú: Aportes para su diagnóstico y Control. *Perú. Med. Exp. y Salud Pública*. 22:212-228.
4. Chico-Aldama P. *et al.* (2001). Ciclo de vida de *Aedes aegypti* y manifestaciones clínicas del dengue. *Acta Pediatr Méx.* 22:114-117.
5. Clements AN. 1992. The Biology of mosquitoes. Volume 1: Development, Nutrition and Reproduction. *Chapman & Hall*. Inglaterra.
6. Couso, J. P., M. Bate and A. Martinez-Arias (1993). "A wingless-dependent polar coordinate system in *Drosophila* imaginal discs." *Science* 259(5094): 484-489.
7. Dudley, R. (2000). "The evolutionary physiology of animal flight: paleobiological and present perspectives." *Annu Rev Physiol* 62: 135-155.
8. Foe, V. E. and B. M. Alberts (1983). "Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis." *J Cell Sci* 61: 31-70.
9. Fristrom D y Fristrom J. 1993. The Development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Press; *Cold Spring Harbor*. The Metamorphic Development of the Adult Epidermis.
10. Gleason, J. M. and J. R. Powell (1997). "Interspecific and intraspecific comparisons of the period locus in the *Drosophila willistoni* sibling species." *Mol Biol Evol* 14(7): 741-753.
11. Kotadia S, *et al.* (2010). Blastoderm Formation and Cellularisation in *Drosophila melanogaster*. In: *Encyclopedia of Life Sciences* (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
12. Lenhart, A. E., M. Walle, H. Cedillo and A. Kroeger (2005). "Building a better ovitrap for detecting *Aedes aegypti* oviposition." *Acta Trop* 96(1): 56-59.

13. Linke, W. A., M. Ivemeyer, N. Olivieri, B. Kolmerer, J. C. Ruegg and S. Labeit (1996). "Towards a molecular understanding of the elasticity of titin." *J Mol Biol* 261(1): 62-71.
14. Michel, K. and F. C. Kafatos (2005). "Mosquito immunity against Plasmodium." *Insect Biochem Mol Biol* 35(7): 677-689.
15. Nelson, F. R., D. Holloway and A. K. Mohamed (1986). "A laboratory study of cyromazine on *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* and its activity on selected predators of mosquito larvae." *J Am Mosq Control Assoc* 2(3): 296-299.
16. Nene, V., J. R. Wortman, D. Lawson, B. Haas, C. Kodira, Z. J. Tu, B. Loftus, Z. Xi, K. Megy, M. Grabherr, Q. Ren, E. M. Zdobnov, N. F. Lobo, K. S. Campbell, S. E. Brown, M. F. Bonaldo, J. Zhu, S. P. Sinkins, D. G. Hogenkamp, P. Amedeo, P. Arensburger, P. W. Atkinson, S. Bidwell, J. Biedler, E. Birney, R. V. Bruggner, J. Costas, M. R. Coy, J. Crabtree, M. Crawford, B. Debruyne, D. Decaprio, K. Eiglmeier, E. Eisenstadt, H. El-Dorry, W. M. Gelbart, S. L. Gomes, M. Hammond, L. I. Hannick, J. R. Hogan, M. H. Holmes, D. Jaffe, J. S. Johnston, R. C. Kennedy, H. Koo, S. Kravitz, E. V. Kriventseva, D. Kulp, K. Labutti, E. Lee, S. Li, D. D. Lovin, C. Mao, E. Mauceli, C. F. Menck, J. R. Miller, P. Montgomery, A. Mori, A. L. Nascimento, H. F. Naveira, C. Nusbaum, S. O'Leary, J. Orvis, M. Pertea, H. Quesneville, K. R. Reidenbach, Y. H. Rogers, C. W. Roth, J. R. Schneider, M. Schatz, M. Shumway, M. Stanke, E. O. Stinson, J. M. Tubio, J. P. Vanzee, S. Verjovski-Almeida, D. Werner, O. White, S. Wyder, Q. Zeng, Q. Zhao, Y. Zhao, C. A. Hill, A. S. Raikhel, M. B. Soares, D. L. Knudson, N. H. Lee, J. Galagan, S. L. Salzberg, I. T. Paulsen, G. Dimopoulos, F. H. Collins, B. Birren, C. M. Fraser-Liggett and D. W. Severson (2007). "Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector." *Science* 316(5832): 1718-1723.
17. Rainford, J. L., M. Hofreiter, D. B. Nicholson and P. J. Mayhew (2014). "Phylogenetic distribution of extant richness suggests metamorphosis is a key innovation driving diversification in insects." *PLoS One* 9(9): e109085.
18. Rakitov, R. and S. V. Triapitsyn (2013). "Egg parasitoids (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) of the gall-making leafhopper *Scenergates viridis* (Hemiptera: Cicadellidae) from Uzbekistan, with taxonomic notes on the Palaearctic species of Aphelinoidea." *Zootaxa* 3683: 538-548.
19. Salazar, M. I., J. H. Richardson, I. Sanchez-Vargas, K. E. Olson and B. J. Beaty (2007). "Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes." *BMC Microbiol* 7: 9.
20. Sane, S. P. (2003). "The aerodynamics of insect flight." *J Exp Biol* 206(Pt 23): 4191-4208.

21. Sane, S. P. (2016). "Neurobiology and biomechanics of flight in miniature insects." *Curr Opin Neurobiol* 41: 158-166.
22. Schoepp, R. J., B. J. Beaty and K. H. Eckels (1990). "Dengue 3 virus infection of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*: comparison of parent and progeny candidate vaccine viruses." *Am J Trop Med Hyg* 42(1): 89-96.
23. Severson, D. W., B. DeBruyn, D. D. Lovin, S. E. Brown, D. L. Knudson and I. Morlais (2004). "Comparative genome analysis of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* with *Drosophila melanogaster* and the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*." *J Hered* 95(2): 103-113.
24. Spielman, A. (1964). "Two Mechanical Aspirators for the Manipulation of Mosquitoes." *J Parasitol* 50: 585.
25. Wang, S. and M. Jacobs-Lorena (2013). "Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes." *Trends Biotechnol* 31(3): 185-193.
26. Wilder-Smith, A., A. Earnest, S. B. Tan, E. E. Ooi and D. J. Gubler (2010). "Lack of association of dengue activity with haze." *Epidemiol Infect* 138(7): 962-967.
27. Zalokar, M. (1976). "Autoradiographic study of protein and RNA formation during early development of *Drosophila* eggs." *Dev Biol* 49(2): 425-437.
28. Hadorn, E. (1965). "[Loss of Potency for Bristle Formation as a "Hereditary Feature" of a Cell Culture of *Drosophila Melanogaster*]." *Z Naturforsch B* 20: 290-292.
29. Simcox, A. A. and J. H. Sang (1983). "When does determination occur in *Drosophila* embryos?" *Dev Biol* 97(1): 212-221.
30. Schubiger, G. (1968). "["Anlageplan", determination and capacity for transdetermination of the male foreleg disc of *Drosophila melanogaster*]." *Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org* 160(1): 9-40.
31. Bergantinos, C., X. Vilana, M. Corominas and F. Serras (2010). "Imaginal discs: Renaissance of a model for regenerative biology." *Bioessays* 32(3): 207-217.
32. Pastor-Pareja JC, Grawe F, Martin-Blanco E, Gracia-Bellido A. 2004. Invasive cell behavior during *Drosophila* imaginal disc eversion is mediated by the JNK signaling cascade. *Dev. Cell.* 7:387-99.
33. Guha, A., L. Lin and T. B. Kornberg (2009). "Regulation of *Drosophila* matrix metalloprotease Mmp2 is essential for wing imaginal disc: trachea association and air sac tubulogenesis." *Dev Biol* 335(2): 317-326.

34. Worley, M. I., L. Setiawan and I. K. Hariharan (2012). "Regeneration and transdetermination in *Drosophila* imaginal discs." *Annu Rev Genet* 46: 289-310.
35. Lehmann, F. O. and M. H. Dickinson (1997). "The changes in power requirements and muscle efficiency during elevated force production in the fruit fly *Drosophila melanogaster*." *J Exp Biol* 200(Pt 7): 1133-1143.
36. Huxley, A. F. and R. Niedergerke (1954). "Measurement of muscle striations in stretch and contraction." *J Physiol* 124(2): 46-47P.
37. Vigoreaux, J. O. (2001). "Genetics of the *Drosophila* flight muscle myofibril: a window into the biology of complex systems." *Bioessays* 23(11): 1047-1063.
38. Ehler, E. and M. Gautel (2008). "The sarcomere and sarcomerogenesis." *Adv Exp Med Biol* 642: 1-14.
39. Lemke, S. B. and F. Schnorrer (2017). "Mechanical forces during muscle development." *Mech Dev* 144(Pt A): 92-101.
40. Llewellyn, M. E., R. P. Barretto, S. L. Delp and M. J. Schnitzer (2008). "Minimally invasive high-speed imaging of sarcomere contractile dynamics in mice and humans." *Nature* 454(7205): 784-788.
41. Regev, G. J., C. W. Kim, A. Tomiya, Y. P. Lee, H. Ghofrani, S. R. Garfin, R. L. Lieber and S. R. Ward (2011). "Psoas muscle architectural design, in vivo sarcomere length range, and passive tensile properties support its role as a lumbar spine stabilizer." *Spine (Phila Pa 1976)* 36(26): E1666-1674.
42. Magid, A. and D. J. Law (1985). "Myofibrils bear most of the resting tension in frog skeletal muscle." *Science* 230(4731): 1280-1282.
43. Maruyama, K., R. Natori and Y. Nonomura (1976). "New elastic protein from muscle." *Nature* 262(5563): 58-60.
44. Furst, D. O., M. Osborn, R. Nave and K. Weber (1988). "The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line." *J Cell Biol* 106(5): 1563-1572.
45. Gautel, M., D. Goulding, B. Bullard, K. Weber and D. O. Furst (1996). "The central Z-disk region of titin is assembled from a novel repeat invariable copy numbers." *J Cell Sci* 109 (Pt 11): 2747-2754.
46. Tskhovrebova, L. and J. Trinick (2003). "Titin: properties and family relationships." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(9): 679-689.

47. Gautel, M. (2011). "Cytoskeletal protein kinases: titin and its relations in mechanosensing." *Pflugers Arch* 462(1): 119-134.
48. Maruyama, K., S. Matsubara, R. Natori, Y. Nonomura and S. Kimura (1977). "Connectin, an elastic protein of muscle. Characterization and Function." *J Biochem* 82(2): 317-337.
49. Maruyama, K. (2002). "beta-Actinin, Cap Z, connectin and titin: what's in a name?" *Trends Biochem Sci* 27(5): 264-266.
50. Schnorrer, F. and B. J. Dickson (2004). "Muscle building; mechanisms of myotube guidance and attachment site selection." *Dev Cell* 7(1): 9-20.
51. Schweitzer, R., E. Zelzer and T. Volk (2010). "Connecting muscles to tendons: tendons and musculoskeletal development in flies and vertebrates." *Development* 137(17): 2807-2817.
52. Schnorrer, F., I. Kalchauer and B. J. Dickson (2007). "The transmembrane protein Kon-tiki couples to Dgrip to mediate myotube targeting in *Drosophila*." *Dev Cell* 12(5): 751-766.
53. Weitkunat, M., A. Kaya-Copur, S. W. Grill and F. Schnorrer (2014). "Tension and force-resistant attachment are essential for myofibrillogenesis in *Drosophila* flight muscle." *Curr Biol* 24(7): 705-716.
54. Weitkunat, M. and F. Schnorrer (2014). "A guide to study *Drosophila* muscle biology." *Methods* 68(1): 2-14.
55. Spletter, M. L., C. Barz, A. Yeroslaviz, C. Schonbauer, I. R. Ferreira, M. Sarov, D. Gerlach, A. Stark, B. H. Habermann and F. Schnorrer (2015). "The RNA-binding protein Arrest (Bruno) regulates alternative splicing to enable myofibril maturation in *Drosophila* flight muscle." *EMBO Rep* 16(2): 178-191.
56. Schiaffino, S. and C. Reggiani (2011). "Fiber types in mammalian skeletal muscles." *Physiol Rev* 91(4): 1447-1531.
57. Spletter, M. L. and F. Schnorrer (2014). "Transcriptional regulation and alternative splicing cooperate in muscle fiber-type specification in flies and mammals." *Exp Cell Res* 321(1): 90-98.
58. Bate, M., E. Rushton and D. A. Currie (1991). "Cells with persistent twist expression are the embryonic precursors of adult muscles in *Drosophila*." *Development* 113(1): 79-89.
59. Fernandes, J., M. Bate and K. Vijayraghavan (1991). "Development of the indirect flight muscles of *Drosophila*." *Development* 113(1): 67-77.

60. Roy, S. and K. VijayRaghavan (1998). "Patterning muscles using organizers: larval muscle templates and adult myoblasts actively interact to pattern the dorsal longitudinal flight muscles of *Drosophila*." *J Cell Biol* 141(5): 1135-1145.
61. Sudarsan, V., S. Anant, P. Guptan, K. VijayRaghavan and H. Skaer (2001). "Myoblast diversification and ectodermal signaling in *Drosophila*." *Dev Cell* 1(6): 829-839.
62. Gunage, R. D., H. Reichert and K. VijayRaghavan (2014). "Identification of a new stem cell population that generates *Drosophila* flight muscles." *Elife* 3.
63. Sato, M. and T. B. Kornberg (2002). "FGF is an essential mitogen and chemoattractant for the air sacs of the *drosophila* tracheal system." *Dev Cell* 3(2): 195-207.
64. Merkey, A. B., C. K. Wong, D. K. Hoshizaki and A. G. Gibbs (2011). "Energetics of metamorphosis in *Drosophila melanogaster*." *J Insect Physiol* 57(10): 1437-1445.
65. Zeng, X. and S. X. Hou (2012). "Broad relays hormone signals to regulate stem cell differentiation in *Drosophila* midgut during metamorphosis." *Development* 139(21): 3917-3925.
66. Kuleesha, Y., W. C. Pua and M. Wasser (2016). "Live imaging of muscle histolysis in *Drosophila* metamorphosis." *BMC Dev Biol* 16: 12.
67. Fernandes, J. J. and H. Keshishian (1996). "Patterning the dorsal longitudinal flight muscles (DLM) of *Drosophila*: insights from the ablation of larval scaffolds." *Development* 122(12): 3755-3763.
68. Roy, S. and K. VijayRaghavan (1999). "Muscle pattern diversification in *Drosophila*: the story of imaginal myogenesis." *Bioessays* 21(6): 486-498.
69. Dutta, D., Anant, S., Ruiz-Gomez, M., Bate, M., and Vijayraghavan, K. (2004). Founder myoblasts and fibre number during adult myogenesis in *Drosophila*. *Development* 131, 3761–3772.
70. Truman, J. W. (1990). "Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila*." *J Neurobiol* 21(7): 1072-1084.
71. Marin, E. C., R. J. Watts, N. K. Tanaka, K. Ito and L. Luo (2005). "Developmentally programmed remodeling of the *Drosophila* olfactory circuit." *Development* 132(4): 725-737.
72. Weaver, M. and M. A. Krasnow (2008). "Dual origin of tissue-specific progenitor cells in *Drosophila* tracheal remodeling." *Science* 321(5895): 1496-1499.

73. Borkowski, O. M., N. H. Brown and M. Bate (1995). "Anterior-posterior subdivision and the diversification of the mesoderm in *Drosophila*." *Development* 121(12): 4183-4193.
74. Baylies, M. K. and M. Bate (1996). "twist: a myogenic switch in *Drosophila*." *Science* 272(5267): 1481-1484.
75. Baylies, M. K., M. Bate and M. Ruiz Gomez (1998). "Myogenesis: a view from *Drosophila*." *Cell* 93(6): 921-927.
76. Currie, D. A. and M. Bate (1991). "The development of adult abdominal muscles in *Drosophila*: myoblasts express twist and are associated with nerves." *Development* 113(1): 91-102.
77. Fernandes, J., S. E. Celniker, E. B. Lewis and K. VijayRaghavan (1994). "Muscle development in the four-winged *Drosophila* and the role of the Ultrabithorax gene." *Curr Biol* 4(11): 957-964.
78. Roy, S., L. S. Shashidhara and K. VijayRaghavan (1997). "Muscles in the *Drosophila* second thoracic segment are patterned independently of autonomous homeotic gene function." *Curr Biol* 7(4): 222-227.
79. Kimura, K. I. and J. W. Truman (1990). "Postmetamorphic cell death in the nervous and muscular systems of *Drosophila melanogaster*." *J Neurosci* 10(2): 403-401.
80. Wasser, M., Z. Bte Osman and W. Chia (2007). "EAST and Chromator control the destruction and remodeling of muscles during *Drosophila* metamorphosis." *Dev Biol* 307(2): 380-393.
81. Fernandes, J. J. and H. Keshishian (1996). "Patterning the dorsal longitudinal flight muscles (DLM) of *Drosophila*: insights from the ablation of larval scaffolds." *Development* 122(12): 3755-3763.
82. Bate, M. and A. M. Arias (1991). "The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*." *Development* 112(3): 755-761.
83. Soler, C. and M. V. Taylor (2009). "The Him gene inhibits the development of *Drosophila* flight muscles during metamorphosis." *Mech Dev* 126(7): 595-603.
84. Dobi, K. C., V. K. Schulman and M. K. Baylies (2015). "Specification of the somatic musculature in *Drosophila*." *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4(4): 357-375.
85. Frasch, M. (1999). "Controls in patterning and diversification of somatic muscles during *Drosophila* embryogenesis." *Curr Opin Genet Dev* 9(5): 522-529.

86. Reedy, M. C. and C. Beall (1993). "Ultrastructure of developing flight muscle in *Drosophila*. I. Assembly of myofibrils." *Dev Biol* 160(2): 443-465.
87. Rhee, D. Y., D. Y. Cho, B. Zhai, M. Slattery, L. Ma, J. Mintseris, C. Y. Wong, K. P. White, S. E. Celniker, T. M. Przytycka, S. P. Gygi, R. A. Obar and S. Artavanis-Tsakonas (2014). "Transcription factor networks in *Drosophila melanogaster*." *Cell Rep* 8(6): 2031-2043.
88. Hosoya, T., K. Takizawa, K. Nitta and Y. Hotta (1995). "glial cells missing: a binary switch between neuronal and glial determination in *Drosophila*." *Cell* 82(6): 1025-1036.
89. Jones, B. W., R. D. Fetter, G. Tear and C. S. Goodman (1995). "glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate." *Cell* 82(6): 1013-1023.
90. Jones, B. W. (2001). "Glial cell development in the *Drosophila* embryo." *Bioessays* 23(10): 877-887.
91. Van De Bor, V. and A. Giangrande (2001). "Notch signaling represses the glial fate in fly PNS." *Development* 128(8): 1381-1390.
92. Akiyama, H., C. Schwab, H. Kondo, H. Mori, F. Kametani, K. Ikeda and P. L. McGeer (1996). "Granules in glial cells of patients with Alzheimer's disease are immunopositive for C-terminal sequences of beta-amyloid protein." *Neurosci Lett* 206(2-3): 169-172.
93. Schreiber, J., E. Sock and M. Wegner (1997). "The regulator of early gliogenesis glial cells missing is a transcription factor with a novel type of DNA-binding domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9): 4739-4744.
94. Schreiber, J., J. Enderich and M. Wegner (1998). "Structural requirements for DNA binding of GCM proteins." *Nucleic Acids Res* 26(10): 2337-2343.
95. Cohen, S. X., M. Moulin, O. Schilling, W. Meyer-Klaucke, J. Schreiber, M. Wegner and C. W. Muller (2002). "The GCM domain is a Zn-coordinating DNA-binding domain." *FEBS Lett* 528(1-3): 95-100.
96. Cohen, S. X., M. Moulin, S. Hashemolhosseini, K. Kilian, M. Wegner and C. W. Muller (2003). "Structure of the GCM domain-DNA complex: a DNA-binding domain with a novel fold and mode of target site recognition." *EMBO J* 22(8): 1835-1845.
97. Vincent, S., J. L. Vonesch and A. Giangrande (1996). "Glide directs glial fate commitment and cell fate switch between neurones and glia." *Development* 122(1): 131-139.

98. Van De Bor, V. and A. Giangrande (2002). "glide/gcm: at the crossroads between neurons and glia." *Curr Opin Genet Dev* 12(4): 465-472.
99. Soustelle, L., C. Jacques, B. Altenhein, G. M. Technau, T. Volk and A. Giangrande (2004). "Terminal tendon cell differentiation requires the glide/gcm complex." *Development* 131(18): 4521-4532.
100. Cattenoz, P. B., A. Popkova, T. D. Southall, G. Aiello, A. H. Brand and A. Giangrande (2016). "Functional Conservation of the Glide/Gcm Regulatory Network Controlling Glia, Hemocyte, and Tendon Cell Differentiation in *Drosophila*." *Genetics* 202(1): 191-219.
101. Cattenoz, P. B. and A. Giangrande (2016). "Revisiting the role of the Gcm transcription factor, from master regulator to Swiss army knife." *Fly (Austin)* 10(4): 210-218.
102. Kim, J., B. W. Jones, C. Zock, Z. Chen, H. Wang, C. S. Goodman and D. J. Anderson (1998). "Isolation and characterization of mammalian homologs of the *Drosophila* gene glial cells missing." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(21): 12364-12369.
103. Schreiber, J., J. Enderich and M. Wegner (1998). "Structural requirements for DNA binding of GCM proteins." *Nucleic Acids Res* 26(10): 2337-2343.
104. Kagoshima, H., K. Shigesada, M. Satake, Y. Ito, H. Miyoshi, M. Ohki, M. Pepling and P. Gergen (1993). "The Runt domain identifies a new family of heteromeric transcriptional regulators." *Trends Genet* 9(10): 338-341.
105. Coffman, J. A., C. V. Kirchhamer, M. G. Harrington and E. H. Davidson (1996). "SpRunt-1, a new member of the runt domain family of transcription factors, is a positive regulator of the aboral ectoderm-specific *Cy11A* gene in sea urchin embryos." *Dev Biol* 174(1): 43-54.
106. Daga, A., C. A. Karlovich, K. Dumstrei and U. Banerjee (1996). "Patterning of cells in the *Drosophila* eye by Lozenge, which shares homologous domains with AML1." *Genes Dev* 10(10): 1194-1205.
107. Tracey, W. D., Jr., M. E. Pepling, M. E. Horb, G. H. Thomsen and J. P. Gergen (1998). "A *Xenopus* homologue of aml-1 reveals unexpected patterning mechanisms leading to the formation of embryonic blood." *Development* 125(8): 1371-1380.
108. Damen, W. G., M. Weller and D. Tautz (2000). "Expression patterns of hairy, even-skipped, and runt in the spider *Cupiennius salei* imply that these genes were segmentation genes in a basal arthropod." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9): 4515-4519.

109. Ogawa, E., M. Maruyama, H. Kagoshima, M. Inuzuka, J. Lu, M. Satake, K. Shigesada and Y. Ito (1993). "PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila* runt gene and the human AML1 gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(14): 6859-6863.
110. Golling, G., L. Li, M. Pepling, M. Stebbins and J. P. Gergen (1996). "*Drosophila* homologs of the proto-oncogene product PEBP2/CBF beta regulate the DNA-binding properties of Runt." *Mol Cell Biol* 16(3): 932-942.
111. Stifani, S., C. M. Blaumueller, N. J. Redhead, R. E. Hill and S. Artavanis-Tsakonas (1992). "Human homologs of a *Drosophila* Enhancer of split gene product define a novel family of nuclear proteins." *Nat Genet* 2(2): 119-127.
112. Evans, T. and G. Felsenfeld (1989). "The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein." *Cell* 58(5): 877-885.
113. Tsai, H. M., R. L. Nagel, V. B. Hatcher and Sussman, II (1989). "Multimeric composition of endothelial cell-derived von Willebrand factor." *Blood* 73(8): 2074-2076.
114. Orkin, S. H. (1992). "GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells." *Blood* 80(3): 575-581.
115. Lowry, J. A. and W. R. Atchley (2000). "Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain." *J Mol Evol* 50(2): 103-115.
116. Patient, R. K. and J. D. McGhee (2002). "The GATA family (vertebrates and invertebrates)." *Curr Opin Genet Dev* 12(4): 416-422.
117. Arceci, R. J., A. A. King, M. C. Simon, S. H. Orkin and D. B. Wilson (1993). "Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart." *Mol Cell Biol* 13(4): 2235-2246.
118. Bossard, P. and K. S. Zaret (1998). "GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation." *Development* 125(24): 4909-4917.
119. Maduro, M. F. and J. H. Rothman (2002). "Making worm guts: the gene regulatory network of the *Caenorhabditis elegans* endoderm." *Dev Biol* 246(1): 68-85.
120. Murakami, A., J. Thurlow and C. Dickson (1999). "Retinoic acid-regulated expression of fibroblast growth factor 3 requires the interaction

- between a novel transcription factor and GATA-4." *J Biol Chem* 274(24): 17242-17248.
121. Wharton, K. A., K. M. Johansen, T. Xu and S. Artavanis-Tsakonas (1985). "Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats." *Cell* 43(3 Pt 2): 567-581.
 122. Yochem, J., K. Weston and I. Greenwald (1988). "The *Caenorhabditis elegans* lin-12 gene encodes a transmembrane protein with overall similarity to *Drosophila* Notch." *Nature* 335(6190): 547-550.
 123. Metz, C. W. and C. B. Bridges (1917). "Incompatibility of Mutant Races in *Drosophila*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 3(12): 673-678.
 124. Maine, E. M., J. L. Lissemore and W. T. Starmer (1995). "A phylogenetic analysis of vertebrate and invertebrate Notch-related genes." *Mol Phylogenet Evol* 4(2): 139-149.
 125. Lissemore, J. L. and W. T. Starmer (1999). "Phylogenetic analysis of vertebrate and invertebrate Delta/Serrate/LAG-2 (DSL) proteins." *Mol Phylogenet Evol* 11(2): 308-319.
 126. Zamocky, M., C. Jakopitsch, P. G. Furtmuller, C. Dunand and C. Obinger (2008). "The peroxidase-cyclooxygenase superfamily: Reconstructed evolution of critical enzymes of the innate immune system." *Proteins* 72(2): 589-605.
 127. Souidi, M., M. Zamocky, C. Jakopitsch, P. G. Furtmuller and C. Obinger (2012). "Molecular evolution, structure, and function of peroxidasins." *Chem Biodivers* 9(9): 1776-1793.
 128. M. Zamocky, C. Jakopitsch, P. G. Furtmuller, C. Dunand, C. Obinger, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* 2008, 72, 589.
 129. G. Cheng, J. C. Salerno, Z. Cao, P. J. Pagano, J. Lambeth, *Free Radical Biol. Med.* 2008, 45, 1682.
 130. Gotenstein, J. R., R. E. Swale, T. Fukuda, Z. Wu, C. A. Giurumescu, A. Goncharov, Y. Jin and A. D. Chisholm (2010). "The *C. elegans* peroxidasin PXN-2 is essential for embryonic morphogenesis and inhibits adult axon regeneration." *Development* 137(21): 3603-3613.
 131. Lee, J., J. Bandyopadhyay, J. I. Lee, I. Cho, D. Park and J. H. Cho (2015). "A role for peroxidasin PXN-1 in aspects of *C. elegans* development." *Mol Cells* 38(1): 51-57.

132. Apidianakis, Y., M. N. Mindrinos, W. Xiao, G. W. Lau, R. L. Baldini, R. W. Davis and L. G. Rahme (2005). "Profiling early infection responses: *Pseudomonas aeruginosa* eludes host defenses by suppressing antimicrobial peptide gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(7): 2573-2578.
133. Chatterjee, A., D. Roy, E. Patnaik and U. Nongthomba (2016). "Muscles provide protection during microbial infection by activating innate immune response pathways in *Drosophila* and zebrafish." *Dis Model Mech* 9(6): 697-705.
134. Ibrahim, M. S., S. W. Eisinger and A. L. Scott (1996). "Muscle actin gene from *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae)." *J Med Entomol* 33(6): 955-962.
135. Vyazunova, I. and Q. Lan (2004). "Stage-specific expression of two actin genes in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*." *Insect Mol Biol* 13(3): 241-249.
136. Munoz, D., A. Jimenez, O. Marinotti and A. A. James (2004). "The AeAct-4 gene is expressed in the developing flight muscles of female *Aedes aegypti*." *Insect Mol Biol* 13(5): 563-568.
137. Espinosa-Cantellano M, González-Robles A, Chávez B, Castañón G, Argüello C, Lázaro-Haller A, et al. Entamoeba dispar: ultrastructure, surface properties and cytopathic effect. *J Eukaryot Microbiol* 1998;45:265–72.
138. Chávez B, Martínez-Palomo A. Giardia lamblia: freeze-fracture ultrastructure of the ventral disc plasma membrane. *J Eukaryot Microbiol* 1995;42:136–41.
139. Raj, A. and S. Tyagi (2010). "Detection of individual endogenous RNA transcripts in situ using multiple singly labeled probes." *Methods Enzymol* 472: 365-386.
140. Shih, J. D., Z. Waks, N. Kedersha and P. A. Silver (2011). "Visualization of single mRNAs reveals temporal association of proteins with microRNA-regulated mRNA." *Nucleic Acids Res* 39(17): 7740-7749.
141. Abbaszadeh, E. K. and E. R. Gavis (2016). "Fixed and live visualization of RNAs in *Drosophila* oocytes and embryos." *Methods* 98: 34-41.
142. Sambasivan, R. and S. Tajbakhsh (2007). "Skeletal muscle stem cell birth and properties." *Semin Cell Dev Biol* 18(6): 870-882.
143. Gunage, R. D., N. Dhanyasi, H. Reichert and K. VijayRaghavan (2017). "*Drosophila* adult muscle development and regeneration." *Semin Cell Dev Biol* 72: 56-66.

144. Abmayr, S. M. and G. K. Pavlath (2012). "Myoblast fusion: lessons from flies and mice." *Development* 139(4): 641-656.
145. Dobi, K. C., V. K. Schulman and M. K. Baylies (2015). "Specification of the somatic musculature in *Drosophila*." *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4(4): 357-375.
146. Ghazi, A., L. Paul and K. VijayRaghavan (2003). "Prepattern genes and signaling molecules regulate stripe expression to specify *Drosophila* flight muscle attachment sites." *Mech Dev* 120(5): 519-528.
147. Kozopas, K. M. and R. Nusse (2002). "Direct flight muscles in *Drosophila* develop from cells with characteristics of founders and depend on DWnt-2 for their correct patterning." *Dev Biol* 243(2): 312-325.
148. Mukherjee, P., B. Gildor, B. Z. Shilo, K. VijayRaghavan and E. D. Schejter (2011). "The actin nucleator WASp is required for myoblast fusion during adult *Drosophila* myogenesis." *Development* 138(11): 2347-2357.
149. Schonbauer, C., J. Distler, N. Jahrling, M. Radolf, H. U. Dodt, M. Frasch and F. Schnorrer (2011). "Spalt mediates an evolutionarily conserved switch to fibrillar muscle fate in insects." *Nature* 479(7373): 406-409.
150. Atreya, K. B. and J. J. Fernandes (2008). "Founder cells regulate fiber number but not fiber formation during adult myogenesis in *Drosophila*." *Dev Biol* 321(1): 123-140.
151. Strunkelberg, M., B. Bonengel, L. M. Moda, A. Hertenstein, H. G. de Couet, R. G. Ramos and K. F. Fischbach (2001). "rst and its paralogue kirre act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*." *Development* 128(21): 4229-4239.
152. Bour, B. A., M. Chakravarti, J. M. West and S. M. Abmayr (2000). "*Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion." *Genes Dev* 14(12): 1498-1511.
153. Rochlin, K., S. Yu, S. Roy and M. K. Baylies (2010). "Myoblast fusion: when it takes more to make one." *Dev Biol* 341(1): 66-83.
154. Hamp, J., A. Lower, C. Dottermusch-Heidel, L. Beck, B. Moussian, M. Flotenmeyer and S. F. Onel (2016). "*Drosophila* Kette coordinates myoblast junction dissolution and the ratio of Scar-to-WASp during myoblast fusion." *J Cell Sci* 129(18): 3426-3436.