



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional**
Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**“La regulación del gen selector *vestigial* y su papel en la
evolución del tamaño de las alas en especies de *Drosophila*”**

PROYECTO QUE PRESENTA

M. en C. Keity Johanna Farfán Pira

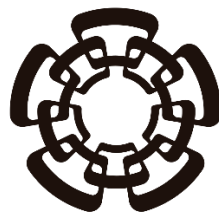
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS

En la Especialidad de Fisiología Celular y Molecular

DIRECTOR DE TESIS

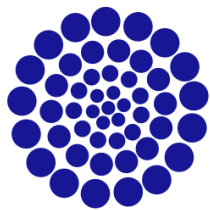
Dr. Marcos Nahmad Bensusan

Ciudad de México, mayo 2023



Cinvestav

Este estudio se realizó en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del doctor Marcos Nahmad Bensusan.



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Durante el desarrollo de este proyecto la alumna fue becada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Beca No. 487729.

A mis padres, Cristina y René

A Alberto 

A Conchita, Claudia, Benito y

Emilia.

Siempre estarán en mi corazón

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Marcos Nahmad, director de este trabajo de investigación, por ser un gran apoyo, un muy buen consejero y por enseñarme muchas cosas a lo largo de este proceso.

Al Dr. Fanis Missirlis por motivarme siempre a seguir con ánimo y dedicación en los momentos difíciles de mi doctorado.

Al Dr. Cesar Poot por siempre apoyarme con mis dudas de lenguajes de programación, bioinformática y estrategias para alcanzar efectivamente un resultado.

Al Dr. Alberto Antonio-Campos, por enseñarme a vivir la vida como debe ser, a ser una persona dedicada, a pensar estratégica y sistemáticamente para conseguir mis objetivos de la manera más eficiente. Gracias por el tiempo dedicado, por los buenos y malos momentos, pero que al final contribuyeron para lograr una meta más en este punto de mi vida. Gracias por ser mi compañero de aventuras.

A mi amiga Helena por siempre estar en los momentos más difíciles, pero también en los más bonitos; por sus acertados consejos, por nuestras largas pláticas y por enseñarme a ser una mejor mujer. Te quiero mucho prima amiga.

A la Dra. Diana Milena Torres, por sus consejos, enseñanzas y vivencias que nos hicieron crecer a ambas como personas. Mil gracias por estar siempre ahí.

A la Dra. Teresa Itandehui Martínez, por siempre ser un apoyo incondicional, por enseñarme tanto académica como personalmente y por los grandiosos momentos que pasamos juntas.

A mis padres porque siempre fueron la principal motivación para seguir creciendo académica y personalmente. Gracias por los ánimos y por siempre estar conmigo, aunque sea a la distancia.

A mi hermana por darme fortaleza, motivación e inspiración para mejorar cada día.

A los abuelos Claudia y Emilio, por recibirme y por convertirme en parte de su familia, es un gran honor conocerlos.

A la Dra. Rosaura Hernández Rivas por darme la oportunidad de iniciar este proceso en mi vida, y por creer en mí.

Al Dr. Timothy A. Evans, por su apoyo en la parte más compleja del desarrollo de este trabajo y por enseñarme que las cosas se pueden solucionar de una forma sencilla y eficiente.

A los miembros de mi comité y sinodales por todos sus comentarios y sugerencias para la mejora de este trabajo.

A mis compañeros y auxiliar del laboratorio, Luis, Mary, Felipe, Elizabeth, Erik, Rosalío y Jahir.

A José Luis Fernández por su apoyo técnico, por las pláticas, consejos, el café y buenos momentos.

A Rafael Rodríguez Muñoz, por su apoyo y aportes para contribuir al avance de este proyecto. Gracias por la disposición para siempre ayudarme.

A Paola Briseño Díaz, Remberto Conde Campos, Raúl González Pantoja y Josselyn Chávez por el apoyo técnico, académico y computacional para el desarrollo de este proyecto.

Gracias a todos los que hicieron posible el desarrollo de este trabajo, por su esfuerzo, colaboración y discusiones que hicieron de esto, una experiencia enriquecedora.



INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes históricos del surgimiento de los estudios de evo-devo.	1
1.2. <i>Drosophila</i> como modelo de estudio de biología del desarrollo y referencia en estudios de evo-devo	3
1.3. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	4
1.4. Discos imagales de <i>D. melanogaster</i>	5
1.4.1. Disco imagal del ala de <i>D. melanogaster</i>	5
1.5. Desarrollo de las alas en <i>D. melanogaster</i>	7
1.5.1. El gen selector de ala <i>vestigial</i> y su influencia en el desarrollo de las alas	7
1.5.2. Regulación del gen selector <i>vg</i>	8_Toc125991725
1.6. Posible papel de <i>vg</i> en la diversidad alar de insectos	11
1.6.1. Alometría	11
1.7. CRISPR/Cas9	15
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVOS	18
4.1. Objetivo general	18
4.2. Objetivos específicos	18
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	18
6. METODOLOGÍA	20
6.1. Materiales y métodos	20
6.1.1. Análisis de la variación alométrica en especies del género <i>Drosophila</i>	20
6.1.3. Metodología empleada para el uso del sistema CRISPR/Cas9	25
6.1.4. Genética	30
6.1.5. Transformación isométrica alar	30
7. RESULTADOS	31
7.1. Selección de las especies del género <i>Drosophila</i>	31
7.2. Morfología de las especies seleccionadas	32
7.3. Determinación de la tibia como referencia de la medida del cuerpo	33
7.4. Evaluación de la variación alométrica en especies del género <i>Drosophila</i>	35
7.5. Análisis bioinformático para la búsqueda del <i>Quadrant Enhancer</i> (<i>vg</i>^{QE})	44

7.6. Evaluación de la influencia de la regulación mediada por el vg^{QE} en el desarrollo del ala a través del sistema de reparación Non Homologous End Joining (NHEJ)	49
7.7. Evaluación de la influencia de la regulación mediada por el QE en el desarrollo del ala a través del sistema de reparación Homologous Directed Repair (HDR)	57
8. DISCUSIÓN.....	65
9. RESUMEN DE RESULTADOS.....	73
10. PERSPECTIVAS	74
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
12. APÉNDICE	87
12.1. Materiales y métodos.....	87
12.1.1. Análisis de la expresión de vg durante el desarrollo larvario a nivel de ARN y proteína.....	87
12.2. Resultados.....	95
12.3. Discusión.....	109
12.4. Resumen de resultados.....	114
12.5. Perspectivas	114
13. APÉNDICE II.....	115
Description.....	117
gRNA design	119
Construction of gRNA plasmid	119
Identification of CRISPR-modified alleles	119
Fly stocks and wing imaginal disc immunostaining.....	119
Confocal microscopy and image capture.....	120
Isometric transformation.....	120
Wing/tibia measures.....	120
Statistical analysis	121
Reagents.....	121
References	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Thomas Hunt Morgan.....	3
Figura 2. Ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i>	4
Figura 3. Estructura de los discos imagales alares de <i>Drosophila</i>	6
Figura 4. Árbol filogenético que representa las relaciones evolutivas de la proteína Vestigial..	7
Figura 5. Estructura génica, localización y efecto de los <i>enhancers</i> en la expresión del gen selector <i>vg</i> ..	9
Figura 6. Alineamiento de las secuencias del sitio de interacción de Vg con Sd.	10
Figura 7. Diversidad en las formas alares en diferentes grupos de insectos..	11
Figura 8. Relación isométrica cabeza-cuerpo en un organismo.	12
Figura 9. Representación gráfica de una relación alométrica.	12
Figura 10. Tipos de alometría de acuerdo con las relaciones de escala..	14
Figura 11. Componentes del sistema CRISPR/Cas9.	16
Figura 12. Estrategia experimental seguida durante el desarrollo del proyecto.	19
Figura 13. Montaje de alas y patas anteriores de las especies del género <i>Drosophila</i> .	21
Figura 14. Metodología y pasos correspondientes para el análisis de alometría.	21
Figura 15. Regiones medidas de las alas y las patas de las especies del género <i>Drosophila</i> .	22
Figura 16. Metodología para la búsqueda de las secuencias del <i>Quadrant Enhancer</i> en especies del género <i>Drosophila</i> .	24
Figura 17. Diseño del vector base utilizado para la elaboración del plásmido donador.	28
Figura 18. Filogenia de las especies seleccionadas del género <i>Drosophila</i> para el presente estudio.	32
Figura 19. Análisis de discos imagales de ala y pata en <i>D. melanogaster</i> .	33
Figura 20. Fenotipos de alas y patas de cruza control y experimental de las cruza de ARN interferente de <i>vg</i> y <i>nubbin</i> .	34
Figura 21. Cuantificación de las longitudes de alas y tibias de cruza experimentales y control de <i>D. melanogaster</i> .	35
Figura 22. Gráficas de correlación de alas y tibias en las especies seleccionadas.	36
Figura 23. Estructuras representativas para el análisis de alometría.	37
Figura 24. Valores promedios de alas y tibias y el dimorfismo sexual en especies del género <i>Drosophila</i> .	38
Figura 25. Medidas proximo-distales: comparativa en las cuatro especies analizadas.	39

Figura 26. Medidas próximo-distales: comparativa de alas, tibias y tórax en las cuatro especies de <i>Drosophila</i> analizadas.	41
Figura 27. Alometrías estáticas en hembras y machos de las cuatro especies de <i>Drosophila</i> seleccionadas.	42
Figura 28. Alometrías estáticas en hembras y machos de las cuatro especies de <i>Drosophila</i> seleccionadas.	43
Figura 29. Sintenia de los exones en el gen de <i>vg</i> para las especies seleccionadas. ...	45
Figura 30. Alineamiento de las secuencias del <i>vg</i> ^{QE} para las especies seleccionadas. 47	
Figura 31. Motivos TEA-SID identificados en las secuencias alineadas del <i>vg</i> ^{QE}	48
Figura 32. Esquema representativo de la ubicación o localización de los motivos TEA-SID de unión de <i>Scalloped</i> al ADN con respecto al QE.	49
Figura 33. Diseño experimental de las eliminaciones realizadas por NHEJ para evaluar la influencia del <i>vg</i> ^{QE} en el desarrollo de las alas.	50
Figura 34. Estrategia experimental empleada para la identificación de los alelos modificados en individuos de las líneas estables.	51
Figura 35. PCR para la identificación de alelos modificados en las eliminaciones inducidas con CRISPR/Cas9.	53
Figura 36. Secuenciación de los alelos modificados de las líneas estables homocigotas.	53
Figura 37. Efectos de las eliminaciones generadas por el sistema NHEJ con CRISPR/Cas9.	54
Figura 38. Identificación de la reducción del tamaño de las alas de la deleción <i>vg</i> Δ QE+SID. .55	
Figura 39. Medidas de las tibias anteriores de machos y hembras de las líneas deletadas con CRISPR/Cas9.	56
Figura 40. Cocientes y normalización de las medidas de las alas respecto a la longitud de las tibias anteriores de machos y hembras de las líneas deletadas con CRISPR/Cas9. .	56
Figura 41. Estrategia experimental empleada en los reemplazos del QE mediante HDR. .	57
PCR para la identificación de alelos modificados en los reemplazos inducidos con CRISPR/Cas9-HDR.	59
Figura 42. Estrategia experimental empleada para la identificación de los alelos modificados y generación de líneas homocigotas utilizando la técnica de HDR.	60
Figura 43. Medidas proximo-distales: comparativa de medidas P/D en las diferentes especies analizadas.	61

Figura 44.	Medidas proximo-distales: comparativa II de medidas P/D en las diferentes especies analizadas.....	62
Figura 45.	Relaciones de escala ala/tibia en reemplazos de CRISPR/Cas9 HDR..	63
Figura 46.	Comparativa de las relaciones de escala ala/tibia en reemplazos de CRISPR/Cas9 HDR y en las especies de <i>Drosophila</i> usadas en este estudio.	65
Figura 47.	Metodología empleada para la identificación de Vg a nivel de ARN y proteína.	94
Figura 48.	Imagen representativa de los individuos utilizados para el análisis de la identificación de Vg a nivel de mRNA y proteína.....	95
Figura 49.	Estandarización de las condiciones de amplificación del CDS de <i>vg</i> con los oligonucleótidos de la Tabla 3.....	98
Figura 50.	Estandarización de las condiciones de amplificación del CDS de Tubulina- α .	99
Figura 51.	Estandarización de las condiciones de amplificación del exón 2 del gen de <i>vg</i> .	101
Figura 52.	Evaluación de la calidad del ARN extraído de <i>D. melanogaster</i> , <i>D. simulans</i> y <i>D. ananassae</i>	103
Figura 53.	Evaluación de contaminación por ADN en el ARN obtenido de los tiempos de desarrollo larvario.	104
Figura 54.	RT-PCR de los mensajeros de <i>vg</i> y Tubulina- α en cada uno de los tiempos de desarrollo de la larva en <i>D. melanogaster</i> y <i>D. simulans</i>	105
Figura 55.	Análisis de expresión del mRNA de <i>vg</i> por RT-PCR.....	106
Figura 56.	Proteínas totales extraídas y solubilizadas de <i>D. melanogaster</i>	107
Figura 57.	Expresión de la proteína Vg en un curso temporal de desarrollo de <i>D. melanogaster</i>	108
Figura 58.	Inmunomarcaje de Vg en discos imaginales alares de <i>Drosophila</i> ..	109

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para el uso del sistema CRISPR/Cas9.....	26
Tabla 2. Resultados de los alineamientos pareados para vg^{QE}	45
.....	45
Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para el CDS del gen de vg en cada una de las especies seleccionadas	96
.....	96
Tabla 4. Oligonucleótidos Forward (F) y Reverse (R) diseñados para el CDS del exón 2 del gen de vg en cada una de las especies seleccionadas	100

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEL	After egg laying
ARN	Ácido ribonucleico
A/P	Anteroposterior
<i>ap</i>	<i>apterous</i>
<i>brk</i>	<i>brinker</i>
CDS	<i>Coding Sequence</i> - Secuencia codificante
CO ₂	Dióxido de Carbono
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
<i>D. ananassae</i>	<i>Drosophila ananassae</i>
DFR	<i>Drosophila</i> Drifter
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Dpp	Decantaplegic
<i>D. simulans</i>	<i>Drosophila simulans</i>
DsRed	Proteína roja fluorescente
D/V	Dorsoventral
<i>D. virilis</i>	<i>Drosophila virilis</i>
<i>en</i>	<i>Engrailed</i>
Evo-devo	Biología evolutiva del desarrollo
F	Oligonucleótido “ <i>forward</i> ” o sentido
F1	Generación 1

F2	Generación 2
F3	Generación 3
gARN	ARN guía
gRNA	Guide RNA
HDR	<i>Homologous Directed Repair</i>
IgG	Inmunoglobulina G
indel	Inserciones y/o eliminaciones
Kb	Kilobase
LHA2	Brazo homólogo izquierdo 2
MAD	<i>Mothers Against Dpp</i>
NHEJ	<i>Non Homologous End Joining</i>
b	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> /reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
P/D	Próximo-distal
QE	<i>Quadrant Enhancer</i>
R	Oligonucleótido “reverse” o antisentido
RHA1	Brazo homólogo derecho 1
RT	Retrotranscripción
Sd	<i>Scalloped</i>
SDS	Dodecyl sulfato de Sodio
SID-TEA	<i>Scalloped Interaction Domain</i>
<i>shh</i>	<i>Sonic hedgehog</i>
USA	Estados Unidos de América

vg^{BE}	<i>vestigial Boundary Enhancer</i>
vg^{QE}	<i>vestigial Quadrant Enhancer</i>
vg^{QEDmel}	Moscas de reemplazo del QE de <i>D. melanogaster</i> en <i>D. melanogaster</i> con HDR
$vg^{QEDmel/+}$	Moscas heterocigotas del reemplazo del QE de <i>D. melanogaster</i> en <i>D. melanogaster</i> con HDR
vg^{QEDvir}	Moscas del reemplazo del QE de <i>D. virilis</i> en <i>D. melanogaster</i> con HDR
vg^{QEDvir}/vg^{QEDvir}	Moscas homocigotas del reemplazo del QE de <i>D. virilis</i> en <i>D. melanogaster</i>
vg	<i>vestigial</i> (gen)
Vg	Vestigial (proteína)
WB	Western Blot
Wg	<i>Wingless</i>
WT	<i>Wild type</i>

RESUMEN

Cómo evolucionan las formas de ciertos órganos en los seres vivos para generar diversidad fenotípica ha sido por años un problema de gran interés científico. La evaluación de las relaciones de escala y crecimiento proporcional entre características del cuerpo han permitido cuantificar la diversidad de formas y estudiar su evolución. La gran diversidad alar exhibida por insectos ofrece un modelo útil para abordar este problema, tanto desde el punto de vista alométrico, como genético y molecular. En esta tesis se obtuvieron las alometrías de longitudes alares respecto a un segmento de un apéndice de referencia, la tibia de las patas delanteras, en cuatro especies de *Drosophila*: *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. ananassae* y *D. virilis*. Estos datos mostraron que mientras que las tres primeras especies siguen una relación alométrica evolutiva en común, *D. virilis* muestra una alometría ala/tibia divergente debido a una notable reducción en el tamaño de sus alas, respecto al tamaño de su cuerpo. Para tratar de entender los orígenes genéticos de esta divergencia, me pregunté si este cambio evolutivo podría ser explicado por cambios en una secuencia regulatoria del gen selector *vestigial* (*vg*), cuya función es ampliamente conservada en insectos y su patrón de expresión determina el tamaño final del ala en *D. melanogaster*.

El patrón de *vg* se establece por medio de dos regiones potenciadoras principales, el llamado *Boundary Enhancer* que dirige la expresión de *vg* a lo largo del eje dorso/ventral; y el *Quadrant Enhancer* (*vg^{QE}*) que expande el patrón de *vg* en el resto de la bolsa del disco. Dado que el *vg^{QE}* controla la mayor parte de la expresión de *vg*, utilizamos esta región como plataforma para estudiar el papel que podría tener en la evolución de las alometrías en las especies de estudio.

Utilizando la herramienta de edición genética CRISPR/Cas9, se eliminaron fragmentos de ADN de la secuencia del *vg^{QE}* reportada y se encontró que tanto el patrón de *Vg* como las alas adultas no se alteran de forma significativa, sugiriendo que existen *enhancers* adicionales que actúan de forma redundante para establecer y recuperar el patrón de *vg* y el desarrollo del ala. Sin embargo, se usó este mismo sistema de edición genética para reemplazar la secuencia correspondiente de *vg^{QE}* en el genoma de *D. melanogaster* por la secuencia putativa del *vg^{QE}* de *D. virilis* por la secuencia. Las moscas de *D. melanogaster* que tienen la secuencia del *vg^{QE}* de *D. virilis* tienen alas que son más pequeñas, comparadas con los controles y rescatan parcialmente la relación de crecimiento ala/tibia observada en *D. virilis*. Estos resultados muestran que este elemento *cis*-regulatorio de *D.*

virilis contribuyen a la reducción en el tamaño de las alas en estas especies y pone en evidencia, por primera vez, que las relaciones de escala evolucionan a través de variaciones genéticas en elementos cis-regulatorios.

ABSTRACT

How the forms of organs in living beings evolve to generate phenotypic diversity has been a long-standing problem, attracting considerable scientific interest. The analysis of scaling relationships and proportional growth between specific traits has made possible quantifications of form diversity and studies of their evolution. The great wing diversity shown by insects offers a useful model to study the evolution of form diversity problem, through the use of allometric, genetic and molecular methods. In this thesis, we obtained the allometries of wing length with respect to the reference body part, the tibia of the front legs in four *Drosophila* species (*D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. ananassae* and *D. virilis*). These data indicate that the three first species share a common allometric relationship, while *D. virilis* shows a wing/tibia allometry divergent as a consequence of wings size reduction to body size. To understand the genetic origins of this divergence, I asked if this evolutive change can be explained for changes in regulatory sequence of selector gene *vestigial* (*vg*), whose function is broadly conserved in insects and the pattern expression determines the final wing size in *D. melanogaster*.

The *vg* expression pattern is established through two main enhancer regions, one of which is the Boundary Enhancer, that directs *vg* expression along the dorso/ventral boundary; the other being the Quadrant Enhancer (*vg*^{QE}) that expand the *vg* pattern in the rest of the wing pouch. Due to the fact that *vg*^{QE} controls the greater part of *vg* expression, we used this region as a platform to study the possible role of this regulatory element in allometry evolution in the four fly species.

Using the genome edition tool CRISPR/Cas9, we deleted DNA fragments of the *vg*^{QE} sequence and found that the *vg* pattern and the adult wing size do not change significantly, suggesting that additional enhancers exist acting redundantly to establish and recover the *vg* pattern and wing development. Additionally, the putative *vg*^{QE} sequence of *D. virilis* was inserted in the *D. melanogaster* genome, replacing the corresponding endogenous *vg*^{QE} sequence. I found that the *D. melanogaster* flies carrying the *D. virilis* *vg*^{QE} sequence, had smaller wings than control flies, partially resembling the growth relationship between wing/tibia observed in *D. virilis*. These results show that the *D. virilis* *vg*^{QE} cis-regulatory element can contribute to wing size reduction and provides evidence, that scaling relationships evolve through genetic variations in cis-regulatory elements.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes históricos del surgimiento de los estudios de evo-devo.

Una de las premisas más importantes en la biología del desarrollo es comprender cómo se genera la amplia diversidad de organismos pluricelulares a partir de una sola célula, creando así una gran variedad de formas en la naturaleza. Esta pregunta también surgió durante el siglo XIX, época en la cual Charles Darwin decidió emprender una travesía como naturalista cuando tenía 22 años en un viaje a través de Sur América a bordo del “HMS Beagle”. En su travesía que duró cerca de 5 años, notó la importancia de conocer cómo surgían los cambios en las formas de los paisajes, y por supuesto, el cambio en las formas durante el desarrollo de las plantas y los animales. A su regreso, dichas observaciones le permitieron ejecutar sus trabajos iniciales acerca de la teoría de la formación de las especies y, junto con Alfred Russel Wallace en el año de 1858, presentaron sus trabajos que posteriormente serían publicados como trabajos independientes (Darwin & Wallace, 1858), producto de sus investigaciones donde concluían que las especies sufrían procesos de cambio y en donde la selección natural jugaba un papel importante como la fuerza impulsora. Las conclusiones resultantes de este trabajo le permitieron en el año 1859 publicar su libro monumental “El origen de las especies” (Carroll, 2005). Las ideas de Darwin y Wallace sembraron las primeras hipótesis en el campo de la evolución, pero la premisa de cómo se generaban las diversas formas de los animales seguía sin poderse responder, debido a que aún no se sabía cómo integrar dos procesos fundamentales: 1) el desarrollo embrionario de un organismo a partir de un huevo y 2) la transmisión de la información a partir de sus ancestros.

Posteriormente, Julian Huxley planteó que existía una fuerte conexión entre el proceso de desarrollo y la evolución y propuso que pequeños cambios durante el desarrollo daban lugar a diferentes formas que podían llegar a adaptarse a circunstancias y ambientes específicos. Sin embargo, existía un gran vacío en el establecimiento de un enfoque multidisciplinario para el entendimiento de dichos aspectos ya que la embriología, la herencia y la evolución eran ciencias estudiadas de forma independiente.

En 1942, Huxley publicó una monografía donde exponía la teoría de la Síntesis Moderna de la Evolución donde se integró la teoría evolutiva de Darwin, los aspectos genéticos establecidos por Gregor Mendel, la genética poblacional y la generación de las variaciones a partir de mutaciones aleatorias y recombinaciones (Sarkar, 2017). A partir del trabajo monumental de Julian Huxley “*Evolution: the modern synthesis*”, se pueden extraer dos maneras mediante las cuales las formas evolucionarían. La primera es la evolución gradual, la cual puede ser definida como el surgimiento de cambios genéticos pequeños que producen las variaciones como resultado de selección natural, y la segunda los procesos evolutivos de gran magnitud que pueden ser explicados debido a que se mantienen durante largos periodos de tiempo (Carroll, 2005). Sin embargo, la Síntesis Moderna de Huxley, carecía de una base molecular que no llegaría hasta la demostración de que el DNA es la molécula de la herencia y el descubrimiento de su estructura.

La influencia genética en el desarrollo y la evolución llegó hasta la década de 1980s, con el descubrimiento de los genes que dictaban fenotipos en el desarrollo y adulto de la mosca de la fruta (*D. melanogaster*), lo que abrió una ventana a entender la lógica de las formas de los animales. Posteriormente se encontró que dichos genes también estaban conservados en otros grupos de animales, dando lugar a una nueva disciplina que integra a la biología del desarrollo y a la biología evolutiva, con la finalidad de comparar cómo trabajan los genes en las diferentes especies para dar lugar a la diversidad de formas: la biología evolutiva del desarrollo o evo-devo (Carroll, 2005; Cheattle Jarvela & Pick, 2016; Hall, 2003).

La biología evolutiva del desarrollo ha surgido recientemente como una ciencia que ve la evolución reflejada en los cambios ocurridos durante el desarrollo, para explicar la diversidad existente de las formas de animales y plantas y cómo la selección natural ejerce su acción sobre estos procesos. Los cambios en el desarrollo explican las bases de la variación morfológica que se requieren para el proceso evolutivo influenciado a su vez por cambios ocurridos en la expresión génica, aparición aleatoria de mutaciones en el genoma, y por tanto el surgimiento de nuevos fenotipos (Gilbert & Barresi, 2016).

1.2. *Drosophila* como modelo de estudio de biología del desarrollo y referencia en estudios de evo-devo

A principios del siglo XX, Thomas Hunt Morgan (**Figura 1**), por medio del estudio de mutaciones, estableció a *D. melanogaster* como modelo de estudio de la genética del desarrollo. Gracias al impulso que dio Morgan y sus estudiantes al modelo de *Drosophila* se identificaron las bases genéticas de cientos de fenotipos durante el desarrollo y el comportamiento. Pero una de las razones por las que *Drosophila* continúa siendo un excelente modelo experimental es la homología existente entre genes relacionados con el desarrollo y diversas patologías humanas como el cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Mirzoyan et al., 2019). Particularmente, *Drosophila* también ha sido un modelo ampliamente utilizado en estudios de control de crecimiento de tejido, debido a su alto nivel de conservación de las principales hormonas y vías de señalización que controlan el crecimiento y la homeostasis metabólica (Boulan et al., 2015).

D. melanogaster es un organismo de la clase Insecta, familia Drosophilidae, que se caracteriza por tener un par de alas posteriores modificadas en halterios o balancines (ITIS, 2022) y es uno de los organismos modelo más utilizados debido a su pequeño tamaño, su número reducido de cromosomas (4) y un tipo de desarrollo holometábolo caracterizado por presentar tres etapas de desarrollo (embrión, larva y pupa) hasta generar el insecto adulto (Allocca et al., 2018).

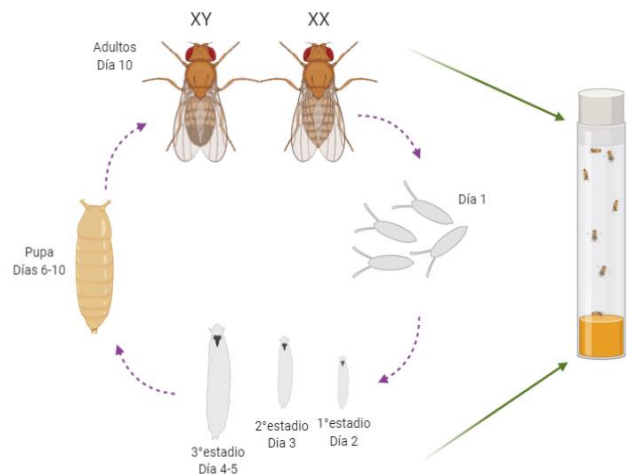


Figura 1. Thomas Hunt Morgan. Pionero en los estudios realizados en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. Debido a sus investigaciones fue galardonado con el premio Nobel de Fisiología y Medicina en el año 1933. (Imagen tomada de la página web The Nobel Prize www.nobelprize.org).

1.3. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

El ciclo de vida de *D. melanogaster* en condiciones de laboratorio tiene una duración de 10 días a 25 °C desde que el huevo es fertilizado hasta que eclosiona en un individuo adulto. El periodo larvario se divide en tres etapas (también llamados estadios) separados por un proceso de muda entre cada una de estas. Posteriormente, estos insectos entran en una etapa pupal, donde ocurre el proceso de metamorfosis y finalmente emerge la mosca adulta (**Figura 2**). Las hembras de *D. melanogaster* depositan alrededor de 100 huevos al día y 24 horas después de ser fertilizados, emerge el primer estadio larval que inicia su desarrollo inmerso en el alimento. Luego de dos mudas, emerge el segundo estadio larvario, que continúa con el proceso de crecimiento y se caracteriza por tener una mayor movilidad en el alimento. Finalmente, la larva madura hasta alcanzar el tercer estadio larvario, en el cual abandona el alimento con el propósito de establecerse en un lugar apropiado para pupar en un intervalo de tiempo de 24 a 48 horas. Posterior a esto se desencadena una metamorfosis completa de la larva para dar lugar a las estructuras del insecto adulto a partir de estructuras celulares epiteliales desarrolladas en los estadios larvarios previos (Fernández-Moreno et al., 2007).

Figura 2. Ciclo de vida de *D. melanogaster*. En el laboratorio, hembras y machos crecen en viales con alimento a base de levadura y azúcares, donde las hembras depositan sus embriones que posteriormente darán lugar a los tres estadios larvarios con sus respectivas mudas cuticulares. Estos tres estadios larvarios se caracterizan por tener una alta movilidad y por alimentarse de manera constante mientras están inmersos en el alimento. Cuando la larva de tercer estadio escala las paredes del tubo (*wandering stage*) para establecerse fuera de los límites del alimento, formará una pupa en la que ocurrirá el proceso de metamorfosis, para finalmente dar lugar a un nuevo individuo adulto.



1.4. Discos imagales de *D. melanogaster*

Las estructuras del cuerpo adulto de *Drosophila* se desarrollan a partir de tejidos larvarios conocidos como discos imagales, los cuales tienen su origen en el embrión, crecen durante la etapa larvaria y posteriormente se transforman en el proceso de metamorfosis para dar lugar a estructuras en el adulto, como los ojos, las alas, patas y genitales. Los discos se forman a partir de una agrupación de células epiteliales que durante el desarrollo crecen y proliferan hasta alcanzar un determinado número de células debido a la contribución nutricional aportada desde que la larva inicia su proceso de alimentación para inducir el crecimiento y la proliferación. Por ejemplo, durante el primer estadio larval los discos más grandes (ala, pata y antena) contienen aproximadamente entre 20 y 70 células, hasta que en el tercer estadio cada disco puede llegar a contener de 10,000 a 50,000 células. En total, en la larva de *Drosophila* hay 19 discos que se localizan en pares de forma bilateral en la tráquea del animal. Gracias a la fácil manipulación y acceso a estos tejidos, los discos imagales se han establecido como modelos para estudiar interacciones celulares, vías genéticas complejas y mecanismos que influyen en el crecimiento tumoral (Beira & Paro, 2016; Mirzoyan et al., 2019).

1.4.1. Disco imagal del ala de *D. melanogaster*

El disco del ala de *Drosophila* inicialmente se compone de un grupo de 50 células, y posteriormente crece y prolifera hasta alcanzar 50.000 células; dichas células tienen una morfología de tipo columnar (Neto-Silva et al., 2009). El disco se subdivide en tres territorios: bolsa del disco, axila o *hinge* y *notum*, además de estar dividido en dos ejes, anterior-posterior y dorsal-ventral (**Figura 3**). Este disco es ampliamente utilizado en diversos estudios para el análisis y descripción de procesos de desarrollo, el uso de la información posicional y la expresión de factores de transcripción específicos en los compartimentos que componen el disco. (Aldaz et al., 2010; Beira & Paro, 2016).

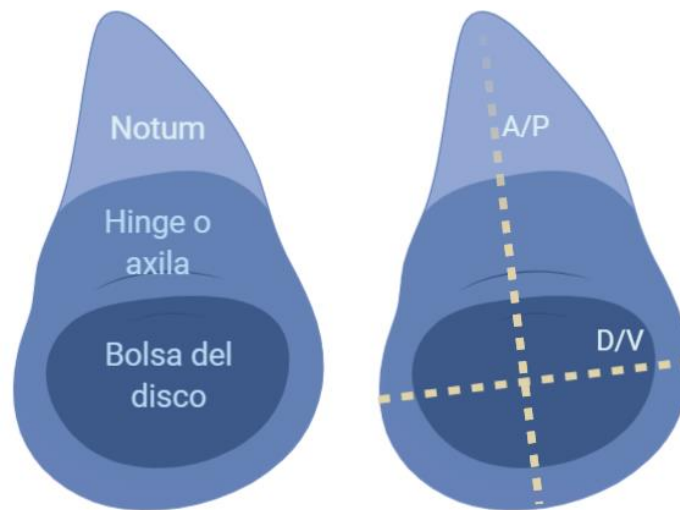


Figura 3. Estructura de los discos imagales alares de *Drosophila*. El disco de ala es uno de los discos más grandes que se encuentra en la larva, está dividido en tres regiones específicas: la bolsa del disco que dará origen al ala, el hinge o axila que será la conexión entre el ala y el tórax del animal y el notum que formará el tórax. El disco se encuentra dividido en dos ejes, el eje anterior-posterior (A/P) y el eje dorsal-ventral (D/V), lo que divide el disco en diferentes compartimientos definidos por moléculas (morfógenos) que definen los territorios en el disco.

El establecimiento de las regiones y/o compartimientos de los discos imagales alares está dado por la influencia de moléculas señalizadoras que actúan como morfógenos y que son secretadas con la finalidad de generar gradientes que determinan y dictan la información posicional a cada una de las células que componen el disco (Gurdon & Bourillot, 2001). Para establecer el eje antero/posterior (A/P) del disco, es necesario que las células anteriores a este compartimiento establezcan una zona organizadora de patrones marcada por la expresión de *Decantaplegic (Dpp)*, en una banda que comprende el eje A/P (Tanimoto et al., 2000). Para establecer el eje dorso/ventral (D/V), otra molécula señalizadora, *Wingless (Wg)* especifica el margen del ala y contribuye a la organización de dicho eje junto con *Notch: serrate y fringe*, los cuales establecen la formación del margen del ala (Swarup & Verheyen, 2012).

1.5. Desarrollo de las alas en *D. melanogaster*

1.5.1. El gen selector de ala *vestigial* y su influencia en el desarrollo de las alas

El destino alar en el disco imagal del ala se da mediante la expresión de un gen selector (o gen maestro) llamado *vestigial* (*vg*), que tiene la capacidad de inducir el desarrollo específico del tejido alar incluso cuando este se expresa de forma ectópica (Kim et al., 1996), promoviendo el desarrollo de tejidos alares. Se ha visto que este gen se encuentra ampliamente conservado en otros grupos de insectos (**Figura 4**) en los cuales también tiene influencia sobre la formación de alas, como se ha reportado en *Tribolium castaneum*, donde *vestigial* tiene un papel esencial en la formación del tejido alar (Clark-Hachtel et al., 2013b). Así mismo se ha descrito la influencia de este gen en el establecimiento de la morfología de los diferentes sistemas de castas en hormigas de acuerdo con la presencia de discos alares rudimentarios (Rajakumar et al., 2018).

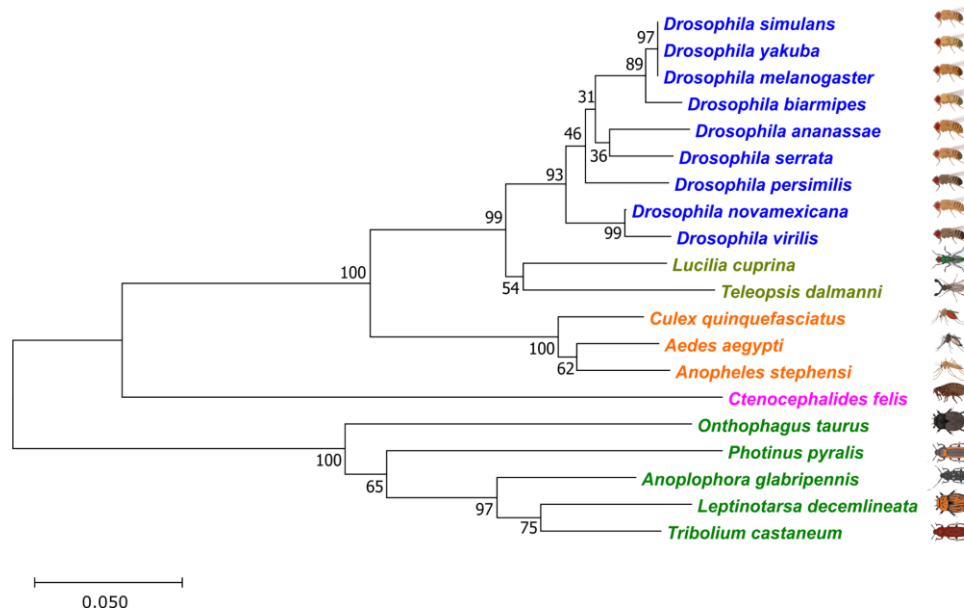


Figura 4. **Árbol filogenético que representa las relaciones evolutivas de la proteína Vestigial.** Árbol filogenético que refleja la conservación de la proteína Vestigial en 20 insectos. Las secuencias fueron extraídas de la base de datos RefSeq (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) y alineadas en MEGA-X, para generar el árbol usando el método de Neighbor Joining con 1000 réplicas de bootstrap.

En *D. melanogaster*, el gen *vg*, de acuerdo con lo anotado y reportado en las bases de datos del NCBI, está compuesto por 8 exones y 7 intrones (**Figura 5A**). Al ser procesado, este gen genera una proteína de 453 aminoácidos con un peso molecular de 46 kD que se expresa durante el periodo embrionario en los primordios del disco de ala y del disco de halterio (Williams et al., 1991). Además de esto, *vg* es un gen que participa en el proceso de identidad de los músculos relacionados con el vuelo durante el desarrollo pupal, y es vital para la diferenciación muscular en etapas tardías del desarrollo embrionario (Deng et al., 2010).

1.5.2. Regulación del gen selector *vg*

La transcripción del gen *vg* se encuentra regulada por dos potenciadores o *enhancers*:

1. El *Boundary Enhancer* (vg^{BE}) localizado en el segundo intrón del gen, determina y establece la expresión inicial de *vg* a lo largo del eje dorso/ventral en el primer estadio larval tardío y en el segundo estadio temprano del desarrollo (Klein & Arias, 1999). Esta expresión inicial es desencadenada por la señalización de *Notch* y de *wingless* a lo largo del eje dorso/ventral (Swarup & Verheyen, 2012).
2. El *Quadrant Enhancer* (vg^{QE}) localizado en el cuarto intrón del gen, expande el patrón de *vg* durante el segundo estadio larval tardío e inicios del tercero. Este *enhancer* promueve la transcripción del gen *vg* por elementos de las vías de *Wingless* y *Decapentaplegic*, además del proceso de reclutamiento que expande el gradiente de *vg* en la bolsa del disco imagal alar (Muñoz-Nava et al., 2020; Zecca & Struhl, 2007b).

La expresión de *Vg* mediada por estos dos *enhancers*, permiten que el patrón de la proteína se expanda a lo largo de toda la bolsa del disco (**Figura 5A**) y que finalmente el ala alcance la forma y el tamaño adecuado durante el proceso de metamorfosis del insecto.

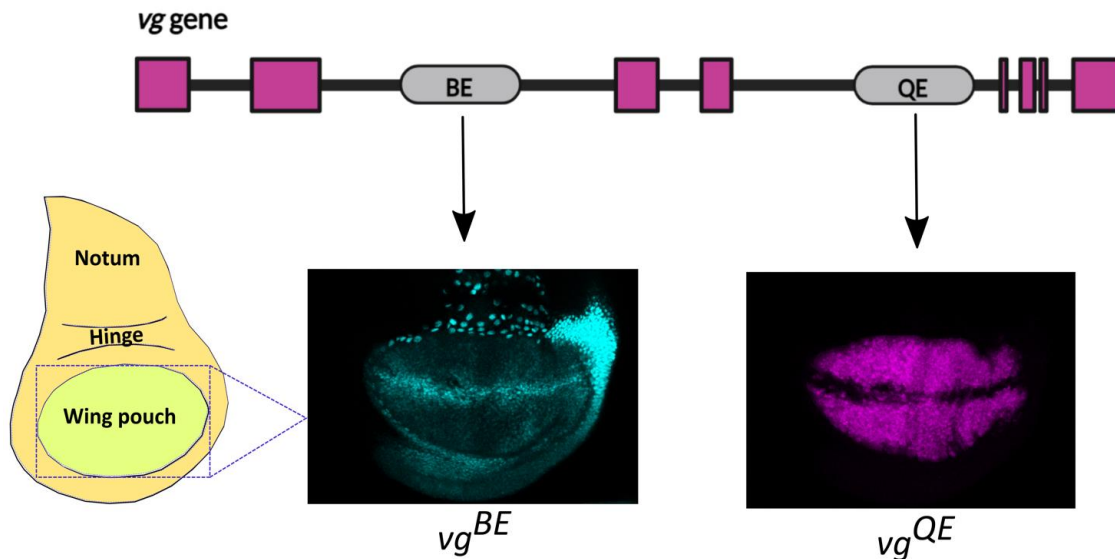


Figura 5. Estructura génica, localización y efecto de los *enhancers* en la expresión del gen selector *vg*. El gen *vg* está compuesto por 8 exones y 7 intrones. En el intrón 2 se localiza el *Boundary Enhancer* vg^{BE} , encargado de la expresión inicial de *vg* y en el 4 intrón se localiza el *Quadrant Enhancer* vg^{QE} , que se encargará de expandir el patrón de *vg* a lo largo de la bolsa del disco. Se muestran imágenes (tomadas en el laboratorio) de inmunofluorescencia que representan la expresión de *vg* promovida por los *enhancers* reguladores. La expresión del vg^{BE} se limita a la región dorso/ventral y, la expresión del vg^{QE} está en los 4 compartimentos que componen la bolsa del disco. Genotipo: $vg^{BE}LacZ$; $vg^{QE}Gal4$, UAS-GFP.

El funcionamiento de *vg* como gen selector requiere de la participación de un factor de transcripción llamado *Scalloped* (Sd), el cual se une a la proteína Vg para formar un complejo de unión a la región regulatoria del vg^{QE} a través del motivo de unión a ADN (*TEA Domain*) (Simon et al., 2016). Además de esta interacción con Vg, Sd también se une a Yorkie (Yki), un factor de transcripción río debajo de la vía de Hippo, implicado en la proliferación de las células del disco imagal alar. Ambas interacciones desencadenan la transcripción del gen para dirigir el desarrollo del ala (Halder & Carroll, 2001; MacKay et al., 2003). Por tanto, si se altera la unión del complejo Vg-Sd, se altera la función de *vg* como gen selector para determinar el destino celular alar (MacKay et al., 2003). En la **Figura 6A** se muestra un alineamiento representativo de la secuencia de la interacción de Vg con el factor de transcripción Sd en diferentes especies de organismos, así como un *Weblogo* representativo del sitio y la estructura tridimensional de la proteína Vg, donde se señala el sitio específico de dicha interacción (**Figura 6B, C**). La importancia del complejo Vg-Sd y la función de *vg* como gen selector de ala ha sido evaluado en organismos del orden

Coleóptera. Ohde y colaboradores en el año 2009 evaluaron la expresión ectópica del gen *vg* de la catarina, *Harmonia vigintioctopunctata* en los discos imagales de pata de *D. melanogaster* y evidenciaron la inducción de la formación de estructuras ectópicas similares a alas, así como la función de Sd sobre la formación de las alas y la necesidad de este factor de transcripción en la adecuada formación de otros órganos de *H. vigintioctopunctata* (Ohde et al., 2009).

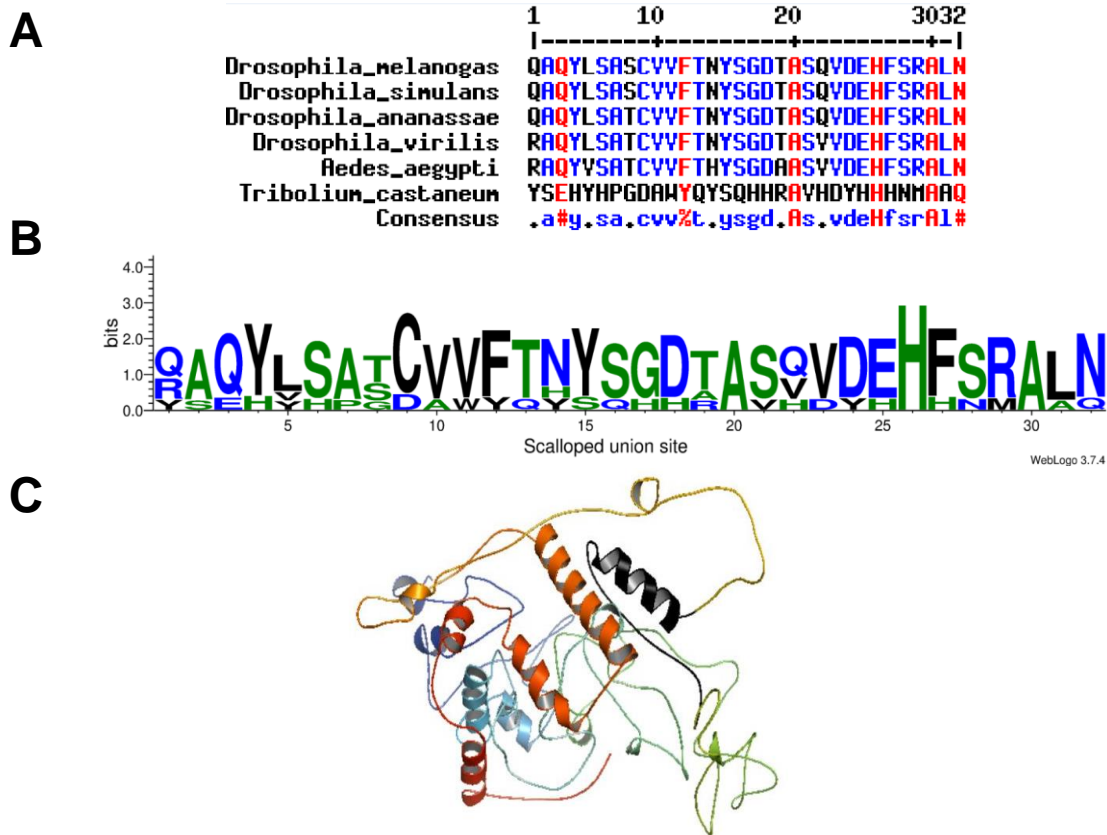


Figura 6. Alineamiento de las secuencias del sitio de interacción de Vg con Sd. A. Alineamiento múltiple de las secuencias del sitio de interacción de Vg con Sd en *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. ananassae*, *Dvirilis*, *A. aegypti*, and *T. castaneum*, donde se observa una evidente conservación de la secuencia de interacción en el grupo de los Dípteros, mientras que en *T. castaneum* este sitio es poco conservado. Símbolos: % aminoácidos F o Y, # aminoácidos NDQEBZ. Rojo, secuencias con alto consenso (>90%), azul, bajo consenso (>50%), negro (*), consenso neutro. **B.** Weblogo que muestra la conservación de la secuencia de aminoácidos en el sitio de unión con Sd de las especies usadas en el alineamiento múltiple. Valor de 4.0 en el eje Y, representa un 100% de conservación, eje X, muestra la posición de los aminoácidos del sitio de unión de Vg con Sd. **C.** Modelo estructural de la proteína Vg generado en ROSETTA (<https://rosetta.bakerlab.org/>). El sitio de interacción con Sd es mostrado en negro.

1.6. Posible papel de *vg* en la diversidad alar de insectos

A pesar de la conservación de *vg* como gen selector de ala en diferentes grupos de insectos, se desconocen las contribuciones genéticas y ambientales que dan lugar a la gran diversidad alar presente en la naturaleza (**Figura 7**). Para abordar el estudio de la diversidad, es necesaria la aplicación de enfoques cuantitativos que nos permitan medir dicha diversidad. Para tal efecto, las relaciones de escala y las alometrías son útiles para el análisis de la diversidad (Nijhout & McKenna, 2019; Shingleton, 2010).



Figura 7. Diversidad en las formas alares en diferentes grupos de insectos. A lo largo del tiempo, las formas alares han evolucionado de forma divergente, lo cual ha generado la diversidad que conocemos actualmente en la naturaleza. Imagen tomada de (Mirth et al., 2016).

1.6.1. Alometría

Las alometrías son relaciones de escala entre un órgano o parte específica respecto al tamaño del cuerpo o una medida representativa del tamaño del cuerpo. (Mirth et al., 2016).

Cuando la proporcionalidad en esta relación se conserva, la relación se denomina isométrica. Por ejemplo, en la **Figura 8** se muestra cómo el tamaño de la cabeza de un organismo crece de manera proporcional al resto de su cuerpo, y por lo tanto tenemos una relación isométrica.

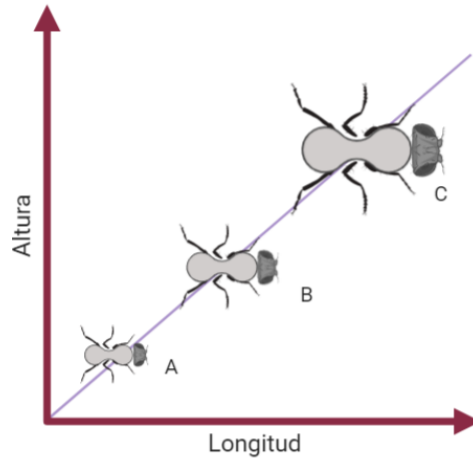


Figura 8. Relación isométrica cabeza-cuerpo en un organismo. En la imagen se muestra la relación entre el tamaño del organismo y un órgano (patas, tórax, abdomen, cabeza, etc.) del individuo A respecto a C, y en donde la proporción del tamaño de sus partes se conserva.

Por lo tanto, la alometría se puede definir como la desviación en la proporcionalidad de crecimiento de dos medidas en un individuo (**Figura 9**). Durante el desarrollo, las alometrías pueden surgir en respuesta al crecimiento desproporcionado de diferentes partes de un organismo, o bien a otros procesos de ajuste de tamaño como la muerte celular.

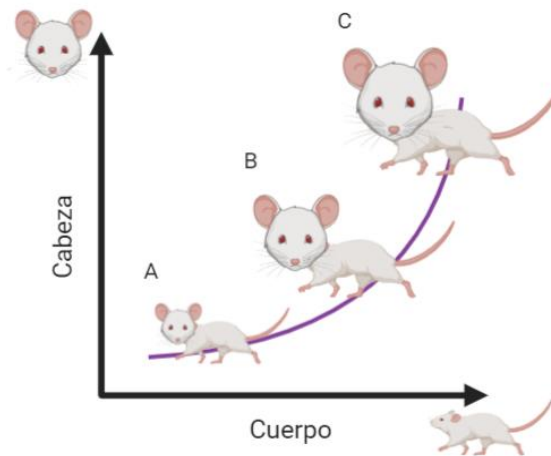


Figura 9. Representación gráfica de una relación alométrica. En el esquema se representa que la proporción de crecimiento no es comparable entre el ratón A y el ratón C, ya que su cabeza es mucho más grande que el resto de su cuerpo.

El estudio de las alometrías fue iniciado al menos desde 1897 por Frédéric Cuvier, donde hizo observaciones y análisis de la proporcionalidad de los tamaños de los mamíferos, respecto al tamaño de su cerebro. Con esto, logró determinar que, si el animal era grande en tamaño, su cerebro era muy pequeño respecto al tamaño de su cuerpo. Sin embargo, Cuvier no estableció un marco teórico general para los estudios de la proporcionalidad entre partes del cuerpo. A finales de este mismo año (1897) Eugène Dubois, desarrolló una herramienta cuantitativa para determinar el “grado de cefalización” de acuerdo con el mismo tipo de observaciones realizadas por Cuvier. A partir de este esfuerzo, el entendimiento de estas relaciones de escala se estableció hasta el año 1936, cuando Julian Huxley y Georges Teissier acuñaron el término alometría (Gayon, 2000). Estos últimos científicos utilizaron como prueba de principio al cangrejo violinista *Uca pugnax*, donde el tamaño de la tenaza crecía considerablemente más respecto al tamaño total del cuerpo (Shingleton, 2010). Posterior a estos estudios y teniendo en cuenta la variedad de leyes propuestas para cuantificar dichas relaciones, se estableció una relación matemática que engloba de forma general fenómenos alométricos e isométricos y así estudiar cuantitativamente los cambios en las relaciones de escala:

$$y = bx^a$$

donde **x** y **y**, representan medidas de dos partes de un individuo, y **a** y **b** son parámetros que se ajustan a la curva de datos experimentales. Esta ecuación es lineal solo para cuando **a=1**, sin embargo, para el caso general de **a≠1**, es conveniente transformar esta ecuación a escala logarítmica:

$$\log(y) = \log(b) + a\log(x)$$

Esta ecuación es ahora lineal para las variables $\log(y)$ y $\log(x)$, donde **a** (denominada como el coeficiente alométrico) y $\log(b)$ es el intercepto.

El valor de la pendiente o coeficiente alométrico definen el comportamiento alométrico del fenómeno. Cuando el valor de la pendiente **a=1**, como vimos desde la ecuación original, tenemos crecimiento isométrico proporcional. Si **a>1** el tipo de crecimiento que se representa es denominado **hiperalometría** o alometría positiva, en el cual un órgano o parte del cuerpo crece a una tasa mayor, respecto a otra, como el caso analizado por Huxley en

la tenaza del cangrejo violinista. Por otro lado, cuando $a < 1$ tenemos el caso de **hipoalometría** o alometría negativa, es decir, el órgano o parte del cuerpo crece a una tasa más baja respecto a la tasa de crecimiento del resto de su cuerpo (**Figura 10**). Por ejemplo, este fenómeno se puede observar durante el desarrollo humano, donde la cabeza del feto crece a una menor tasa respecto al crecimiento de su cuerpo en general (Shingleton, 2010).

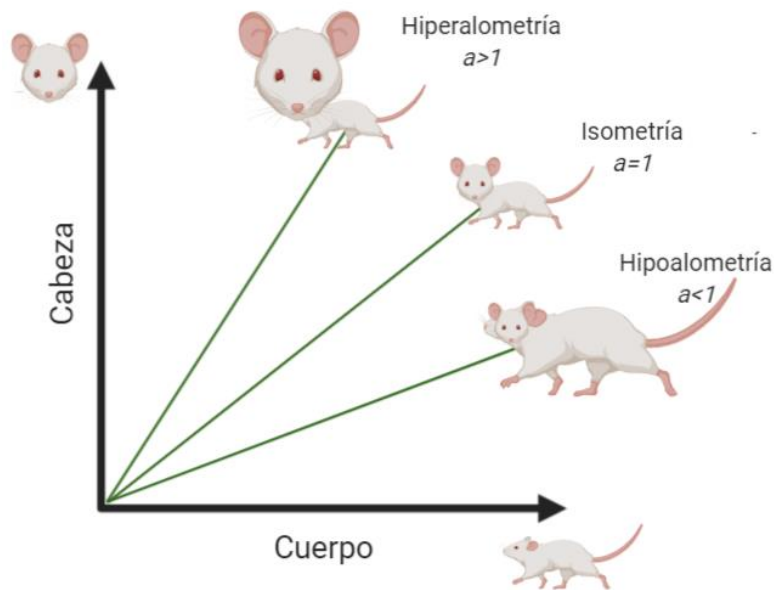


Figura 10. Tipos de alometría de acuerdo con las relaciones de escala. Se ilustran los diferentes ejemplos de relaciones de escala posibles al analizar el tamaño específico de la cabeza (y), respecto al tamaño del cuerpo (x), donde la cabeza crece a una mayor tasa respecto al tamaño del cuerpo (Hiperálometría o alometría positiva), o donde tanto la cabeza como el cuerpo crecen a una misma tasa y se mantienen las proporciones de escala (Isometría), o el tercer caso donde el cuerpo crece a una tasa mucho mayor que la parte del cuerpo específica analizada (Hipoálometría o alometría negativa).

El estudio de las alometrías puede ser clasificada en tres categorías como: A) **Alometría ontogenética**, si la comparación es durante el desarrollo en un mismo individuo (como mencionamos en ejemplos anteriores); B) **Alometría estática**, si la comparación es en *diferentes* individuos de la misma especie que están en la misma etapa del desarrollo; C) **Alometría evolutiva**, si la comparación es sobre partes del cuerpo u órganos homólogos en diferentes especies (Nijhout & McKenna, 2019).

En insectos holometábolos, las alometrías estáticas pueden ser estudiadas en el estado adulto donde ya no hay cambios en los tamaños de los órganos individuales. En esta tesis, estudiaremos la evolución de las alometrías alares en especies del género *Drosophila* utilizando las herramientas conceptuales descritas anteriormente, con el fin de encontrar una explicación a los cambios en las alometrías de una especie en particular (*D. virilis*). Usando herramientas de edición génica (CRISPR/Cas9; ver próxima sección), evaluamos si el papel de una región regulatoria definida como el *Quadrant Enhancer* del gen de *vg*, está asociado a estos cambios alométricos.

1.7. CRISPR/Cas9

Una de las técnicas que está revolucionando la investigación biomédica es la edición genómica a través del método CRISPR/Cas9. CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Esta herramienta se basa en repetidos de ADN propios del “sistema inmune” de las bacterias, que les permite “recordar” y destruir infecciones causadas por fagos u otro material genético externo. Estas “tijeras moleculares” que permiten el corte de la doble cadena de ADN genómico y desencadenan mecanismos de reparación propios de la célula, han permitido modificar y analizar la función de genes específicos en diferentes grupos de organismos (Herrera-Carrillo et al., 2020; Marsh et al., 2020; Xing et al., 2014). En este sistema la endonucleasa Cas9 realiza un corte de doble cadena de la secuencia génica de interés, orientada por un ARN guía (gARN) que la dirige hacia el sitio específico por complementariedad de secuencia (**Figura 11**). Al realizarse el corte, se inicia el sistema de reparación de la célula, el cual se puede desarrollar a través de dos mecanismos: 1) a través de NHEJ (*Non Homologous End Joining*), donde se introducen indels (inserciones y eliminaciones) de manera aleatoria, afectando así la secuencia nativa del gen; o 2) a través de la reparación mediada por HDR (*Homologous Directed Repair*), donde un templado guía dicho proceso de reparación con modificaciones precisas en el sitio de corte (Pop-Bica et al., 2022).

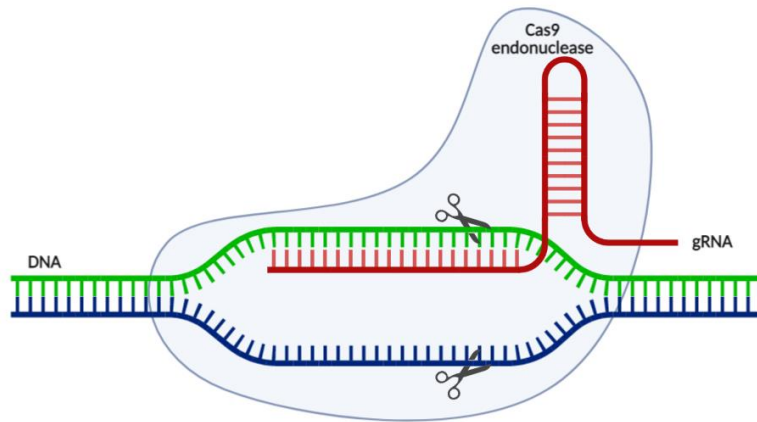


Figura 11. Componentes del sistema CRISPR/Cas9. En este sistema, la endonucleasa Cas9, dirigida por un ARN guía (gARN) hibrida en el sitio de interés debido a su complementariedad de secuencia, para realizar el corte en el ADN.

La implementación de este sistema de edición genómica en *D. melanogaster* (Evans, 2017; Gratz et al., 2015; Howard et al., 2021; Port et al., 2014), se facilita induciendo la expresión endógena de la endonucleasa Cas9 a través de un sistema Gal4 materno. Por tal motivo, utilizamos este sistema, para evaluar la relevancia de la región regulatoria (*Quadrant Enhancer*) del gen *vg*, en el establecimiento de las relaciones de escala ala/tibia en las siguientes especies del grupo *Drosophila*: *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. ananassae* y *D. virilis*.

2. JUSTIFICACIÓN

Una de las principales preguntas de la biología evolutiva del desarrollo es comprender cuáles son los cambios que generan el proceso evolutivo de determinados órganos durante el desarrollo en diferentes grupos de organismos. Para abordar este problema, utilizamos las alas de los insectos como modelo para investigar la evolución de las relaciones de escala.

La finalidad de este trabajo fue evaluar si la regulación del gen selector de ala, *vestigial (vg)* y su regulación, juega un papel determinante en la evolución del tamaño relativo de las alas

en distintas especies de *Drosophila*, aprovechando las herramientas genéticas y moleculares que se han desarrollado en este modelo de estudio.

3. HIPÓTESIS

La evolución del tamaño relativo de las alas en diferentes especies de *Drosophila* está mediada por cambios en la secuencia regulatoria del gen selector de ala *vestigial* (*vg*).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar si los cambios en la secuencia regulatoria del gen *vestigial* (vg^{OE}) participan en la determinación de las alometrías alares de *Drosophila*.

4.2. Objetivos específicos

1. Evaluar las alometrías estáticas y evolutivas en la longitud proximal/distal (P/D) de alas respecto a tibias (como órgano de referencia) en cuatro especies del género *Drosophila*.
2. Estudiar, mediante el uso de herramientas bioinformáticas la conservación y las diferencias del vg^{OE} en especies de *Drosophila*.
3. Evaluar la influencia del vg^{OE} sobre el desarrollo y diversidad de las formas alares en especies del género *Drosophila* empleando el sistema de edición génica CRISPR/Cas9.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados, se realizó la siguiente estrategia experimental (Figura 12).

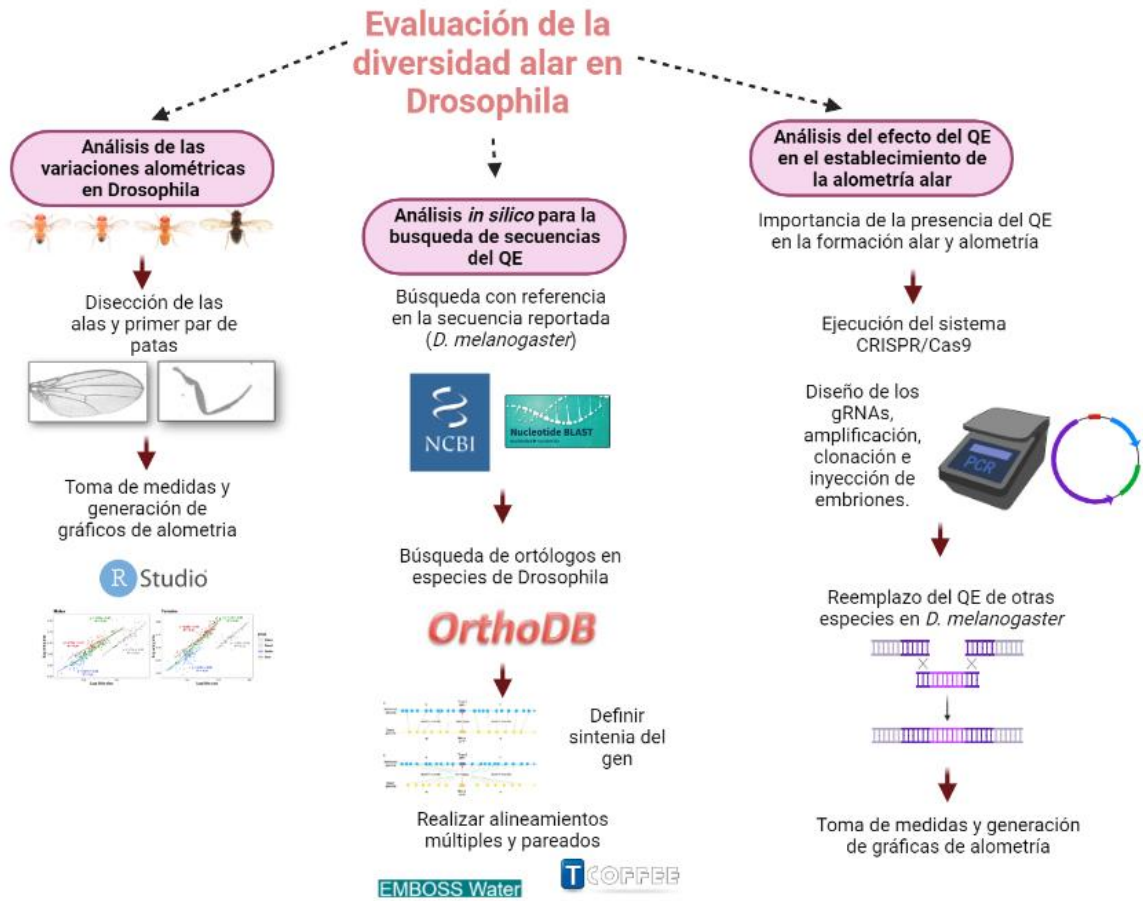


Figura 12. Estrategia experimental seguida durante el desarrollo del proyecto.

6. METODOLOGÍA

6.1. Materiales y métodos

6.1.1. Análisis de la variación alométrica en especies del género *Drosophila*

6.1.1.1. Colecta de adultos y análisis alométrico en individuos de las especies de *Drosophila*

El análisis alométrico se realizó en individuos de cepas de laboratorio de las especies *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. ananassae* y *D. virilis*, las cuales fueron mantenidas poniendo machos y hembras jóvenes en tubos con alimento estándar a una temperatura de 25°C.

Los individuos adultos se seleccionaron por sexo, usando un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ800) acoplado a una cámara de CO₂. Durante este proceso de selección, se descartaron las moscas que tuvieran sus alas dañadas o que no se desdoblaron de la manera adecuada. Se descartaron los adultos que no tenían ninguna de las dos alas. En dos tubos *eppendorf*, correspondientes para cada sexo, se adicionó 1 mL de etanol al 70°, y se colocaron los adultos seleccionados previamente. Estos se dejaron en agitación durante 12 horas para su deshidratación.

Posterior al tiempo de deshidratación, los adultos se colocaron en un plato Petri (Corning® 60 mm TC-treated Culture Dish # Ref. 430166) con 1mL de etanol a 50° para el montaje de estructuras. Cada adulto se puso en una lámina portaobjetos (Corning 2948-75X25, 75 x 25 mm) para realizar la disección de alas izquierda y derecha, así como su correspondiente par de patas delanteras en un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ800). El montaje de alas y patas se realizó como se muestra en la **Figura 14**.

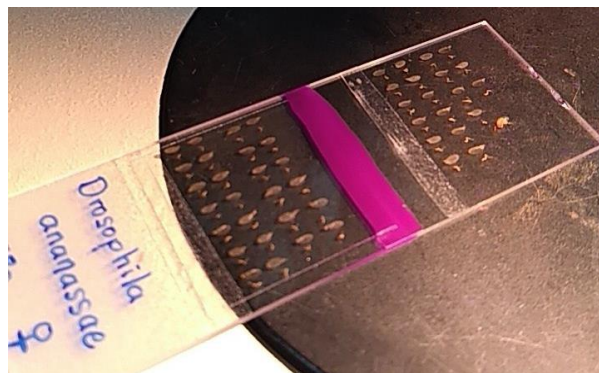


Figura 13. Montaje de alas y patas anteriores de las especies del género *Drosophila*. El montaje se realizó retirando cada par de alas y patas delanteras por individuo y localizadas en un portaobjetos para posteriormente ser fotografiadas y medidas.

Cada par de alas y par de patas fue ubicado de la manera adecuada y posteriormente la lámina portaobjetos fue cubierta con una lámina cubreobjetos (Corning, 22 x 22 mm) y sellada lateralmente con barniz para uñas.

La toma de las fotografías de las alas y las patas se realizó en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse Ci-S) acoplado a una cámara microscópica (Jenoptik ProgRes®), en el software ProgRes® Capture Pro-2.9 (**Figura 14**). Las medidas de referencia que se tuvieron en cuenta están representadas en la **Figura 15**. Estas medidas fueron utilizadas para los análisis de alometría correspondiente para machos y hembras de cada especie.



Figura 14. Metodología y pasos correspondientes para el análisis de alometría. A partir de individuos adultos a 25°C, se separaron por sexo y se deshidrataron en etanol a 70° para su posterior montaje de alas y patas. Las fotografías se tomaron en el software ProgRes® y finalmente la representación gráfica de la alometría se obtuvo por medio del programa RStudio.

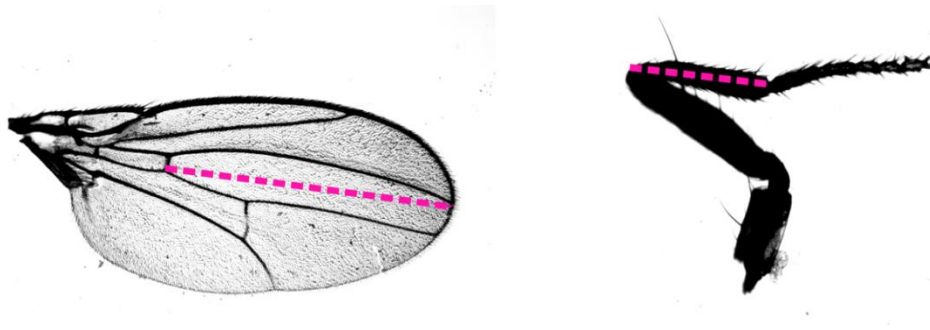


Figura 15. Regiones medidas de las alas y las patas de las especies del género *Drosophila*. Se montaron y fotografiaron el primer par de patas delanteras y su par de alas correspondientes a individuos adultos de *Drosophila*. Para las patas delanteras se tomó en cuenta la medida de la tibia (desde la base final del fémur hasta la base inicial de los tarsos) y en el ala la región del área anterior comprendida entre las venas L3 y L4.

Luego de obtener las medidas correspondientes por individuo y especie, se procedió a hacer el análisis cuantitativo y la representación gráfica de la alometría usando RStudio version 3.6.2 (The R Foundation for Statistical Computing) y los paquetes de análisis de datos Tidyverse versión 1.3.0 y paquete para gráficas Ggplot2 versión 3.2.1. Para ver el resumen de la metodología empleada ver **Figura 14**.

6.1.1.2. Establecimiento de medida de la tibia como referencia de la medida del cuerpo

Para realizar los análisis de alometría, fue necesario establecer una medida de referencia del cuerpo, por lo cual decidimos evaluar si las tibias de las patas delanteras eran adecuadas para tal fin. Inicialmente se realizó la cruce: $w, ms1096 - Gal4; ; X w, UAS - GFPnls$ con el fin de verificar la transcripción y expresión del *GFP* (Green Fluorescent Protein) en los discos imagales mediada por el controlador de *ms1096*. Bajo estas condiciones, esperábamos que *GFP* únicamente se sintetizara en discos de ala y no en los discos de pata. Posteriormente se realizaron cruces adicionales para verificar que, bajo mutaciones directas al ala, la tibia no se viera afectada por este proceso. Las cruces que se realizaron fueron las siguientes:

Cruza # 1:

- Control:

$$w, ms1096 - Gal4; ; X \ y, w, hs - Flp; Sco; \frac{vgQELacZ}{S-T}$$

- Experimental:

$$w, ms1096 - Gal4; ; X \ y, w, hs - Flp; UAS - vgRNAi; \frac{vgQELacZ}{[TM6B, Tb]}$$

Cruza # 2:

- Control:

$$w; nub - Gal4, UAS mcherry nsls; \frac{UASnslmb - vhhGFP}{TM3, Sb, Ser} X \ y, w, hs - Flp; Sco; \frac{vgQELacZ}{S - T}$$

- Experimental:

$$w; nub - Gal4, UAS mcherry nsls; \frac{UASnslmb - vhhGFP}{TM3, Sb, Ser} X \ y, w, hs - Flp; UAS \\ - vgRNAi; \frac{vgQELacZ}{[TM6B, Tb]}$$

Para realizar las cruzas fue necesario seleccionar hembras vírgenes de acuerdo con la especificidad genética de esta. Cuando fueron colectadas, se procedió a ponerlas con machos jóvenes para inducir el apareamiento y la puesta de embriones. Los adultos se retiraron posteriormente y se separaron las larvas y las pupas que tenían las características fenotípicas de selección.

A los adultos, producto de estas cruzas, se les realizó el protocolo de montaje de alas y patas delanteras y se tomaron las medidas adecuadas para hacer los análisis de longitudes y determinar si la afectación en las alas influía sobre la medida final de las tibias.

6.1.2. Análisis bioinformático para la búsqueda del vg^{QE}

La búsqueda del vg^{QE} se llevó a cabo usando las bases de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), teniendo como referencia la secuencia del gen reportada para la especie *Drosophila melanogaster*. Con esta referencia, se buscaron las secuencias génicas para las otras especies del género usando la base de datos OrthoDB (<https://www.orthodb.org/>). Con los datos obtenidos, se realizaron alineamientos pareados con la herramienta EMBOSS *Water* (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/) y se obtuvieron las secuencias correspondientes al *Quadrant Enhancer* de cada una de las especies. Finalmente, con un alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas, se determinó la conservación y las posibles regiones de importancia regulatoria para el gen de vg .

En la **Figura 16** se muestra el diagrama de flujo que se empleó para la búsqueda y localización del *Quadrant Enhancer* en *Drosophila simulans*, *Drosophila ananassae* y *Drosophila virilis*.

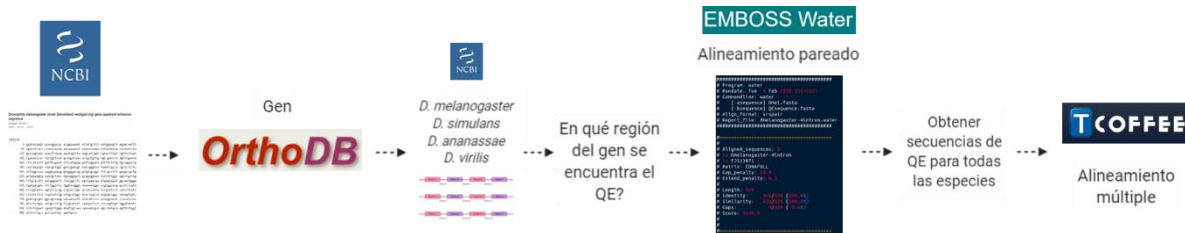


Figura 16. Metodología para la búsqueda de las secuencias del vg^{QE} en especies del género *Drosophila*. Se tuvo en cuenta la referencia de la secuencia génica reportada para *D. melanogaster* y a partir de esta se realizó la búsqueda específica en la base de datos OrthoDB. Al tener las secuencias de los genes de *vestigial* para las demás especies, se procedió a realizar alineamientos pareados con la secuencia de *D. melanogaster* como referencia y así poder determinar en qué región específica de la secuencia realizar la búsqueda. Finalmente, al obtener las potenciales secuencias del vg^{QE} , se realizó un alineamiento múltiple para poder visualizar las regiones de mayor conservación.

6.1.3. Metodología empleada para el uso del sistema CRISPR/Cas9

6.1.3.1. Diseño de los ARNs guías

De acuerdo con las secuencias determinadas para la región regulatoria del vg^{OE} de las especies que se seleccionaron, se diseñaron 4 ARNs guías para ser empleados en este estudio. Estos sitios blancos fueron diseñados usando la herramienta en línea que ofrece flyCRISPR (<https://flycrispr.org>).

6.1.3.2. Construcción de los plásmidos de ARNs guías

La clonación de los ARNs guías se llevó a cabo usando el vector pCFD4-U6:1_U63tandemgRNAs (Addgene plasmid # 49411; http://n2t.net/addgene:49411;RRID:Addgene_49411), que permitía la expresión en tándem de las secuencias de los ARNs guías (Port et al., 2014; Evans, 2017), por medio de la amplificación de productos de PCR usando la combinación de los primers 1 y 2, 2 y 3, 1 y 4 y 3 y 4 (Ver **Tabla 1**) usando 2X Phusion Flash PCR Master Mix (Thermo Scientific). Posteriormente el vector fue digerido usando la enzima BbsI-HF (New England Biolabs (#R3539)). Con los productos de la amplificación de PCR, y el vector digerido, se llevó a cabo el procedimiento de ensamblaje de fragmentos con Gibson Assembly (New England Biolabs E2611), adicionando 4 μ l del inserto, 1 μ l del vector y 5 μ l de la máster mix. Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 50 °C. Con 5 μ l del producto del ensamblaje, se transformaron 50 μ l de células competentes E-cloni® 10G Chemically Competent Cells (Lucigen). Las colonias de bacterias que crecieron fueron expandidas en cultivo líquido con medio LB y ampicilina (2X). Se purificó el ADN plasmídico (QIAGEN QIAprep Spin Miniprep Kit Cat. No. 27106) y finalmente se secuenció el plásmido purificado para confirmar todas las clonaciones previo al proceso de inyección de embriones.

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para el uso del sistema CRISPR/Cas9

1	QE5'	GGAAAGATATCCGGGTGAACTTCGAACCGAACCGCACCGAAAGGTTTTAGAGCTAG AAATAGCAAG
2	QE3'	GCTATTTCTAGCTCTAAAACCTATGTGTAATGGAGCTCCCGACGTTAAATTGAAAATA GGTC
3	TEA2	GGAAAGATATCCGGGTGAACTTCGCAGTATGGTGATTTCGATTCTTTTAGAGCTAGA AATAGCAAG
4	Neg	GCTATTTCTAGCTCTAAAACCTATCTACAAGCGTATCTTCCGACGTTAAATTGAAAATA GGTC
5	LHA1- F	ACATGCATGCATGTGGAAATGCCACCACTTTGTGCG
7	LHA2-F	ACATGCATGCATGTGCCACTCGCTTGTCTTTTGA
8	LHA2-R	TCCCCGCGGGGATCGAATCACCATACTGCATTTGGTG
9	RHA1-F	GAAGATCTTCTAATGGAGATGTCTTGCTCCCG
10	RHA1-R	CCGCTCGAGCGGCCTACAAGCAGATATCCGATTGG
12	RHA3-R	CCGCTCGAGGAAATCGCGCGACGCCGCC
13	LHA RecSp-F	CGCGGATCCCTAGTTGGAATGTGCTAT
14	LHA RecSp-R	TCCCCGCGGCTACGCGTTTATGAAATCG
17	colLHA1-F	GCAATGCCGAATGCCGCAT
18	colLHA2-F	GCTGCTCGAAAATAACTGGG
20	mCherry-R	CTTGGTCACCTTCAGCTTGG
21	colRHA1-R	GTCGCGCTGTTGTTTCAAGAT
22	colRHA3-R	GCATAGTGCGGTCCTGCACA
23	DsRed1C Forward	GGACATCACCTCCCACAACG
34	RHA1 seq F2	GCACCGAGAGGCAAAGCAT
41	RecDsp F	GCCGCATAGATTCCTCATTACG
44	QE sp R	CATCACTCACTCGCTCAGCTG
52	Outside_screening_F	GCCTCCAATCATTGTCAGCC
53	Outside_screening_R	CGATCGGGCGATCGACTCAC

	ning_R	
352	M13 Forward	TGTA AACGACGGCCAGT
596	pCFD4 upstream seq	TAGTCCCATCATTGGCATGGTAGGTACCCG
835	pBR322 fwd	CAGCTCGAGGCTCTTCCGTCAATCG
836	pBR322 rev	CTAGCATGCAAGAATTCCACCTGC
837	DsRed fwd	CGGCCGCGGACATATGCACACCTG
838	DsRed rev	TGGAGATCTTTACTAGTGCTCTTC
839	DmLHA2/pBR322 fwd	GTGGAATTCTTG CATGCTAGGCCACTCGCTTGTTCTTTTCGATTTTC
840	DmLHA2/DsRed rev	TGTGCATATGTCCGCGGCCGTGCAATCACCATACTGCATTTGGTG
841	DmRHA1/DsRed fwd	AGCACTAGTAAAGATCTCCATAATGGAGATGTCTTGCTCCCGGC
842	DmRHA1/pBR322 rev	GACGGAAGAGCCTCGAGCTGCCTACAAGCAGATATCCGATTGG
843	DmLHA2 rev	TCGAATCACCATACTGCATTTGGTG
844	Dmel/sim/ana/virQE fwd	AATGCAGTATGGTGATTTCGACTAGTTGGAATGTGCTAT
845	Dmel/sim/anaQE rev	TGTGCATATGTCCGCGGCCGTGTGTAATGGAGCTCCC
846	DvirQE rev	TGTGCATATGTCCGCGGCCGAGTGTGTAATGGAGCTCTG
847	DanaTEAadd fwd	AATGCAGTATGGTGATTTCGAGCGCCTGGAATGTGTGGA

6.1.3.3. Construcción de los plásmidos donadores

El plásmido donador fue ensamblado usando la técnica de *Overlapping PCR* u *overlap extension* (Heckman & Pease, 2007). Para este fin, se diseñó un vector base de trabajo (**Figura 17**) compuesto de cuatro fragmentos obtenidos por amplificación con PCR, dos de ellos derivados del esqueleto plasmídico del vector pH-DsRed-attP, usando los oligos 835 y 836, y la región codificante de la *DsRed* fluorescente usando los oligos 837 y 838, y los

dos fragmentos restantes derivados del ADN genómico de *D. melanogaster*, para amplificar el brazo homólogo izquierdo (LHA2, por sus siglas en inglés) usando los primers 839 y 840, y el brazo homólogo derecho (RHA1, por sus siglas en inglés), dirigidos al intrón 4 en regiones adyacentes al QE, usando los primers 841 y 842. Primero, los productos de amplificación de PCR de LHA2, DsRed y RHA1 fueron purificados usando el kit QIAquick PCR Purification Kit Cat. No. 28106. y amplificados usando los oligos 839 y 842 con la finalidad de obtener un solo fragmento. Posteriormente, se realizó una amplificación adicional para ensamblar el esqueleto del vector (pBR322) con el fragmento que contenía los brazos homólogos y DsRed, usando los oligos 842 y 835.

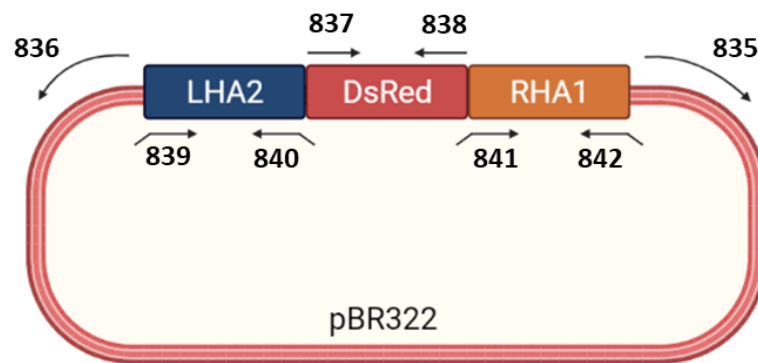


Figura 17. Diseño del vector base utilizado para la elaboración del plásmido donador. Se muestran los 4 componentes que incluyen el esqueleto del vector pBR322, LHA2, DsRed y RHA1 con los respectivos oligonucleótidos forward y reverse para amplificarlo. Los extremos de cada oligo, representan la región de “overlap” con la región contigua para ser ensamblados.

Con 5 µl de la construcción completa del vector base, se transformaron 50 µl de células competentes E-cloni® 10G Chemically Competent Cells (Lucigen). Las colonias de bacterias que crecieron fueron expandidas en cultivo líquido con medio LB y ampicilina (100X). Se purificó el ADN plasmídico (QIAGEN QIAprep Miniprep Kit Cat. No. 27106) y finalmente se secuenció el plásmido purificado para confirmar la presencia de cada uno de los componentes del vector base de trabajo.

Para insertar las secuencias específicas del vg^{QE} de las diferentes especies, la secuencia fue amplificada a partir las preparaciones de extracción de ADN genómico de única mosca de *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. ananassae* usando los oligos 844-845 y *D. virilis*

usando los oligos 844-846 y se ensamblaron con el vector base de trabajo, a través de la técnica de Overlapping PCR. Con 5 µl de la construcción completa del vector base + la secuencia del QE de cada una de las especies, se transformaron 50 µl de células competentes E-cloni® 10G Chemically Competent Cells (Lucigen). Las colonias de bacterias que crecieron fueron expandidas en cultivo líquido con medio LB y ampicilina (100X). Se purificó el ADN plasmídico (QIAGEN QIAprep Miniprep Kit Cat. No. 27106) y finalmente se secuenció el plásmido purificado para confirmar la presencia de cada uno de los componentes del vector que contenía el vg^{QE} especie específico.

6.1.3.4. Inyección de embriones de *D. melanogaster* para el uso de la metodología CRISPR/Cas9 a través de Non Homologous End Joining (NHEJ).

El plásmido diseñado pCFD4gRNAs fue enviado a la empresa Best Gene (Chino Hills, California. USA <https://www.thebestgene.com/>) en una concentración de 15 µg para inyectar embriones de *D. melanogaster* yw;;nos-Cas9(III-attP2).

6.1.3.5. Inyección de embriones de *D. melanogaster* para el uso de la metodología CRISPR/Cas9 a través de Homologous Directed Repair (HDR).

Los plásmidos donadores que contenían cada una de las secuencias del QE especie específico, con una concentración de 10 µg, y el plásmido pCFD4gRNAs en una concentración de 5 µg fueron enviado a la empresa Rainbow Transgenic Flies, Inc (Camarillo, California. USA <https://www.rainbowgene.com/>) para inyectar embriones de *D. melanogaster* y[1] M{w[+mC]=nos-Cas9.P}ZH-2A w[*].

6.1.4. Genética

6.1.4.1. Cepas de *Drosophila* empleadas

Las siguientes cepas de *Drosophila* fueron usadas: *D. simulans* (14021-0251.261 - *Drosophila* Species Stock Center); *D. ananassae* (14024-0371.00 - *Drosophila* Species Stock Center); *D. virilis* (15010-1051.87 - *Drosophila* Species Stock Center), donadas amablemente por el Dr. Fanis Missirlis; *D. melanogaster* Samarkand strain (RRID:BDSC_4270 - Bloomington *Drosophila* Stock Center); *w*; *Sco/CyO,RFP*; *yw*; *nos-Cas9(III-attP2)/TM6,Tb,Sb*; *y[1] M{w[+mC]=nos-Cas9.P}ZH-2A w[*]*. Todas las cruzas se desarrollaron a 25 °C.

6.1.4.2. Identificación de los alelos modificados con CRISPR/Cas9

Las moscas adultas (G0), producto de las inyecciones con los plásmidos, fueron cruzadas con adultos *w*; *Sco/CyO-RFP*. Los individuos G0 que produjeron una progenie F1 con alelos modificados de vg^{QE} ($vg\Delta QE+SID$, $vg\Delta QE$ y $vg\Delta CTRL$ para NHEJ y $vgQE^{mel}$, $vgQE^{vir}$ para HDR) se identificaron por medio de PCR (en el caso de NHEJ) evaluando pools de 3 hembras, y a través de la fluorescencia en los ojos (en el caso de HDR). Al observar individuos positivos, se tomaron 5-10 machos de cada uno de los viales de procedencia y se cruzaron con hembras vírgenes *w*; *Sco/CyO-RFP* con la finalidad de generar individuos F2. Los machos F1 fueron evaluados por medio de PCR usando los primers 52 y 53 (producto de amplificación de 5 Kb) para seleccionar la progenie que contenía de manera definitiva los alelos modificados. Finalmente, con la progenie resultante de la F2, se establecieron stocks estables homocigotos. Los alelos modificados fueron secuenciados para confirmar las eliminaciones/inserciones y/o el reemplazo en *D. melanogaster*.

6.1.5. Transformación isométrica alar

Este apartado se realizó para identificar diferencias en las formas de las alas de las mutantes generadas con CRISPR/Cas9-NHEJ. En términos generales, se utilizó la imagen

un ala control y fue empalmada con imágenes de alas de individuos mutados. Dicho empalme y contracción respecto al control, permitió identificar cambios en la forma de las alas de las mutantes. Usando Python (versión 3.7.6), se generó un código que proporciona dos matrices de la misma longitud:

1. Estandariza las dos matrices de tal manera que el centroide de cada matriz lleva al origen de coordenadas.
2. Devuelve el factor de transformación isométrica, que minimiza la suma:

$$\Sigma(x_{1i} - \gamma * x_{2i})^2 + (y_{1i} - \gamma * y_{2i})^2$$

Donde $(x_{1i}$ y y_{2i}) son las coordenadas del i-ésimo punto del arreglo estandarizado.

Estos puntos se seleccionaron para ser la intersección entre cada vena o intervena entre sí o con el margen del ala.

7. RESULTADOS

7.1. Selección de las especies del género *Drosophila*

Se seleccionaron tres especies de *Drosophila*, teniendo en cuenta su distancia filogenética respecto a *D. melanogaster*: *D. simulans*, del subgrupo de melanogaster siendo la especie más cercana y relacionada, *D. ananassae*, aún del grupo de melanogaster, como el grupo de distancia filogenética intermedia y finalmente *D. virilis* siendo la especie más lejana respecto a *D. melanogaster* (**Figura 18**).

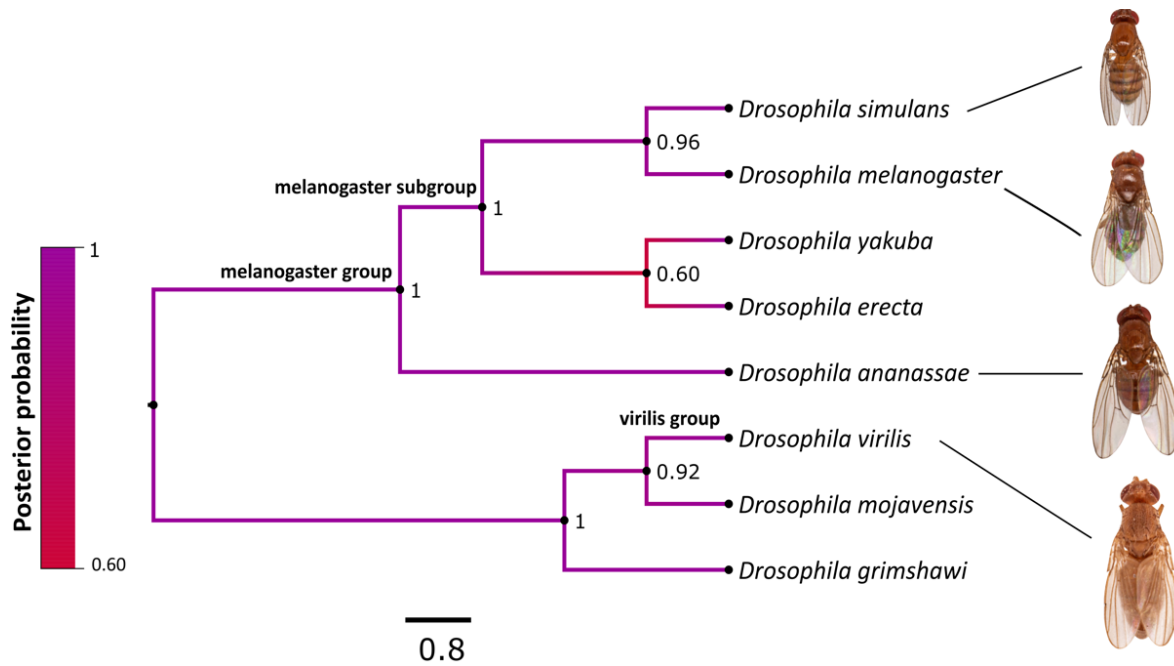


Figura 18. Filogenia de las especies seleccionadas del género *Drosophila* para el presente estudio. Árbol filogenético Bayesiano construido usando las secuencias de los CDS del gen de *vg*, donde se muestran las especies seleccionadas.

7.2. Morfología de las especies seleccionadas

Morfológicamente *D. melanogaster* y *D. simulans*, son especies muy similares; en ambas especies el ciclo de vida tiene una duración similar (10 días a 25°C) y coinciden en las características de su dimorfismo sexual; los machos son más pequeños que las hembras y poseen un par de peines sexuales en sus patas delanteras y una coloración oscura característica en la región posterior del abdomen.

Los individuos de *D. ananassae*, son más grandes que los de *D. melanogaster*, los machos no poseen peines sexuales en sus patas delanteras ni una coloración oscura en la parte posterior del abdomen. Sin embargo, al igual que en *D. melanogaster*, las hembras son más grandes que los machos. Su tiempo de desarrollo es de ~12 días a 25°C.

En el caso de *D. virilis*, observamos que sus individuos son más grandes que *D. ananassae*, los machos no poseen peines sexuales en sus patas delanteras, la coloración es oscura en

toda la parte dorsal de su cuerpo, pero en la parte ventral del abdomen de los machos se observa una coloración naranja-roja que corresponde a los testículos. Su tiempo de desarrollo es de ~15 días a 25°C.

7.3. Determinación de la tibia como referencia de la medida del cuerpo

Teniendo en cuenta reportes previos que se han realizado para el análisis de alometría, con medidas de la tibia y medidas del fémur (Shingleton et al., 2017; Zhou et al., 2016), se realizó un análisis para verificar el uso de la tibia como medida de referencia.

Primero, se realizó la cruce $w, ms1096 - Gal4; X w, UAS - GFPnls$, con el fin de evaluar los discos imagales alares y de pata, y así evidenciar que la expresión de *GFP* mediada por un controlador específico de la bolsa del disco imagal alar, se generaba únicamente en los discos alares de la generación F1, producto de esta cruce (**Figura 19**).

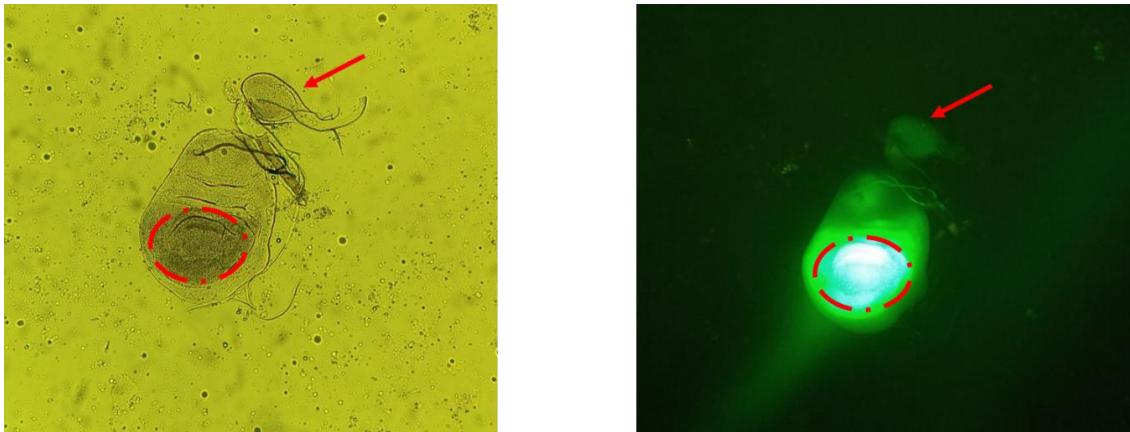


Figura 19. Análisis de discos imagales de ala y pata en *D. melanogaster*. Luego de realizar la cruce (ver texto), a las larvas resultantes (generación F1) se les realizó disección de discos imagales de ala y de pata, con la finalidad de observarlos en el microscopio de epifluorescencia y visualizar a la GFP expresada en la región de la bolsa del disco alar (mediado por el controlador *ms1096*) y la ausencia de expresión en el disco de pata. La bolsa del disco alar se señala con las líneas y puntos rojos, y con la flecha se señala el disco imagal de pata. Imagen tomada en aumento 20X.

Con lo anterior, se logró evidenciar que los controladores de genes propios de la bolsa del disco imagal alar son específicos de este tejido y no tienen una expresión evidente en los discos imagales de pata.

Siguiendo con la evaluación del establecimiento de la tibia como medida de referencia, se realizaron cruzas adicionales utilizando ARNs de interferencia para los ARN mensajeros de *vg* y *nubbin*, ambos genes encargados del desarrollo del ala en *Drosophila* y así poner en evidencia que la alteración y/o mutaciones en el desarrollo de las alas del individuo no afecta el desarrollo y formación de las tibias (ver sección de metodología).

La **Figura 20** muestra las imágenes representativas de los fenotipos de alas y ejemplares del primer par de patas delanteras producto de las cruzas control y experimental.

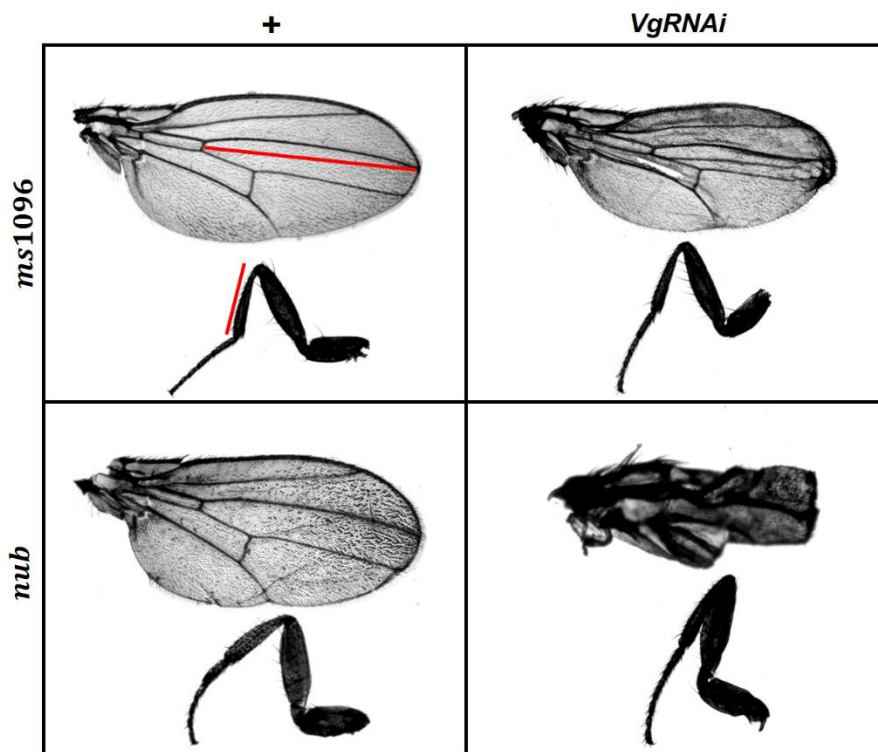


Figura 20. Fenotipos de alas y patas de cruzas control y experimental de las cruzas de ARN interferente de *vg* y *nubbin*. Alas y patas representativas de la F1 producto de las cruzas realizadas. Controles presentados en paneles de la izquierda y experimentales en los paneles de la derecha.

Como se puede evidenciar en la **Figura 20**, se ve una clara afectación del desarrollo de las alas con los ARNs interferentes para *vg* y *nubbin*. Para verificar que el tamaño de las tibias se mantenía, independientemente de dichas perturbaciones inducidas en las alas, se realizó la cuantificación de individuos control y experimentales en ambas cruzas. La gráfica

de cuantificación de longitudes de tibias y alas se muestra en la **Figura 21**. Con estos análisis se concluye que la interrupción del desarrollo del ala no afecta el desarrollo normal de la tibia en este sistema.

Complementario a lo anterior, en estudios previos se han reportado análisis en los que se emplea la tibia como medidas de referencia del cuerpo completo en insectos del grupo de los Dípteros (Krause et al., 2019; Reigada & Godoy, 2005; Rohner et al., 2018; Tran et al., 2020), pero además es considerado como una medida estándar del cuerpo en otros insectos, como las avispas parasitoides (Sagarra et al., 2001; Thorne et al., 2006).

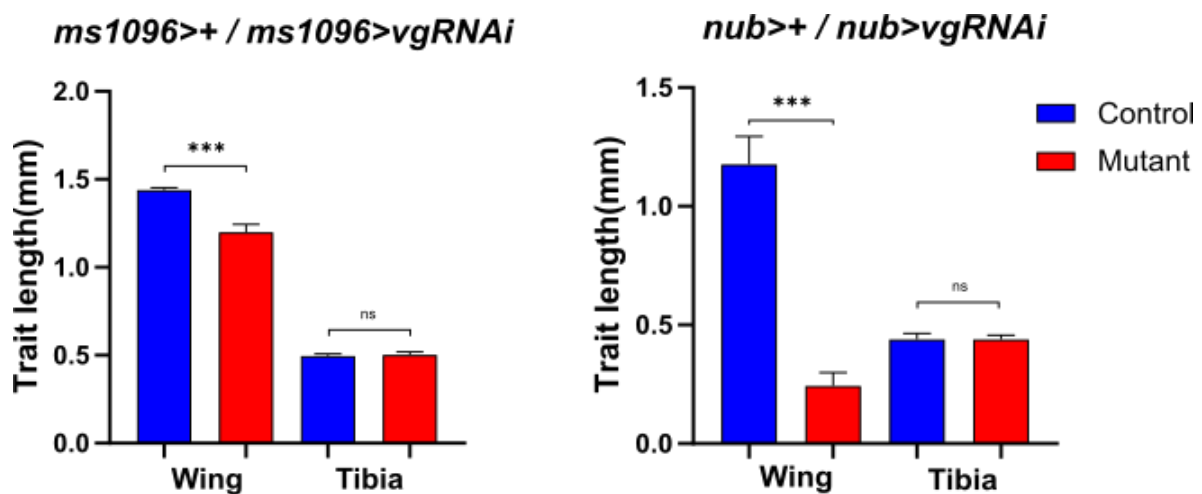


Figura 21. Cuantificación de las longitudes de alas y tibias de cruces experimentales y control de *D. melanogaster*. En las gráficas se representan las medidas de las alas control, representados por las barras azules y experimentales representados por las barras rojas, respectivamente. Análisis estadístico ANOVA de una vía, con comparaciones múltiples usando la prueba de Tukey. ***= p -value<0.001, ns = estadísticamente no significativo (p -value>0.05). *ms1096>vgRNAi*, $n=13$; *ms1096>+*, $n=10$; *nub>vgRNAi*, $n=9$; *nub>+*, $n=7$. Media + SD.

7.4. Evaluación de la variación alométrica en especies del género *Drosophila*

Para analizar cambios en las alometrías en adultos de las 4 especies seleccionadas: *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. ananassae* y *D. virilis*, se realizó un análisis de correlación entre los valores de longitud de ala izquierda y ala derecha, así como la correlación entre tibia izquierda y tibia derecha, con la finalidad de determinar si el uso del valor promedio de dichas estructuras era el adecuado para los análisis de alometría, y así tener en cuenta un

valor único en la evaluación. En la **Figura 22** se muestran las gráficas de correlación de las 4 especies, y los valores de significancia cercanos a 1 sugieren una correlación positiva y que efectivamente se puede tomar un valor promedio de los datos.

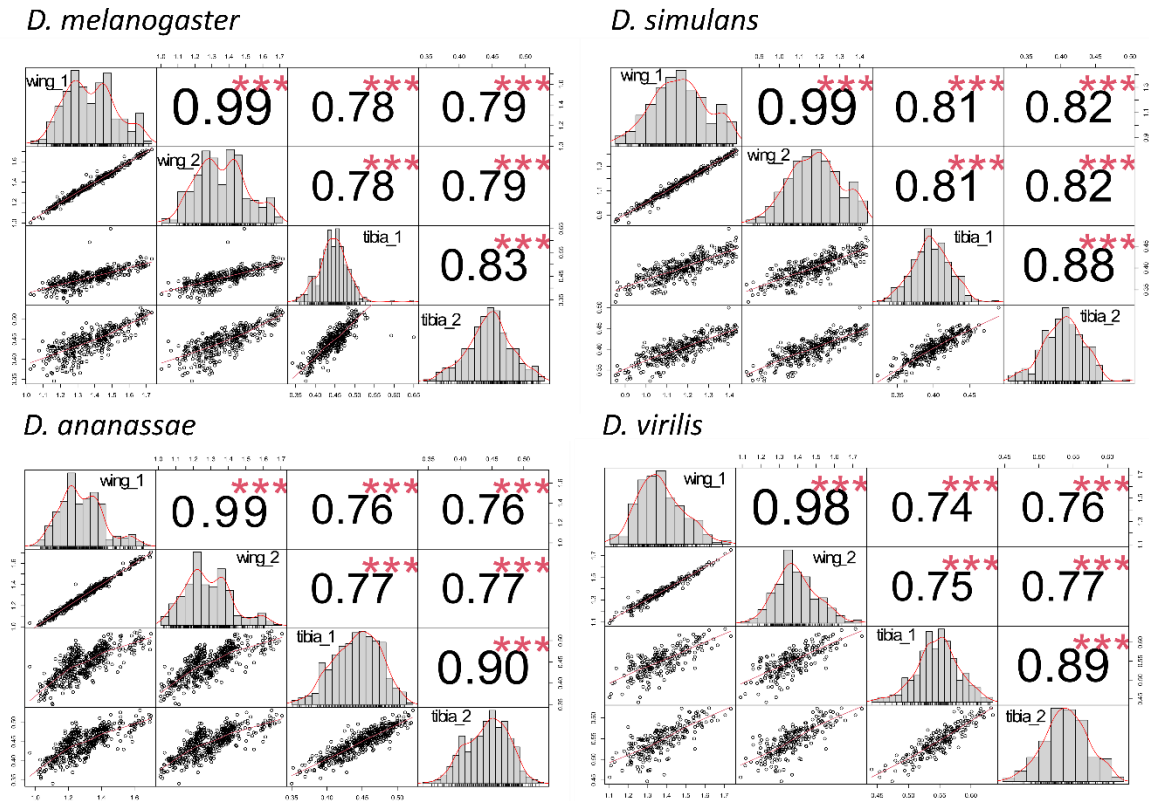


Figura 22. Gráficas de correlación de alas y tibias en las especies seleccionadas. En las gráficas se evalúa la correlación entre ala izquierda (wing_1) y ala derecha (wing_2) y entre tibia izquierda (tibia_1) y tibia derecha (tibia_2). En los cuadrantes inferiores se muestra un gráfico de puntos que representa la distribución de los datos, así como el histograma respectivo. En los cuadrantes superiores se muestra el valor de significancia de correlación de las variables evaluadas (alas y tibias), donde los valores cercanos a 1 representan una alta correlación. La correlación se evaluó en RStudio, utilizando las paqueterías de análisis de datos biológicos y PCA vegan, ade4 y PerformanceAnalytics. n=372. Datos de machos y hembras son representados en la misma gráfica.

La **Figura 23** muestra las estructuras y medidas representativas de machos y hembras de las 4 especies seleccionadas. Nótese la diferencia de tamaños de las alas entre los sexos.

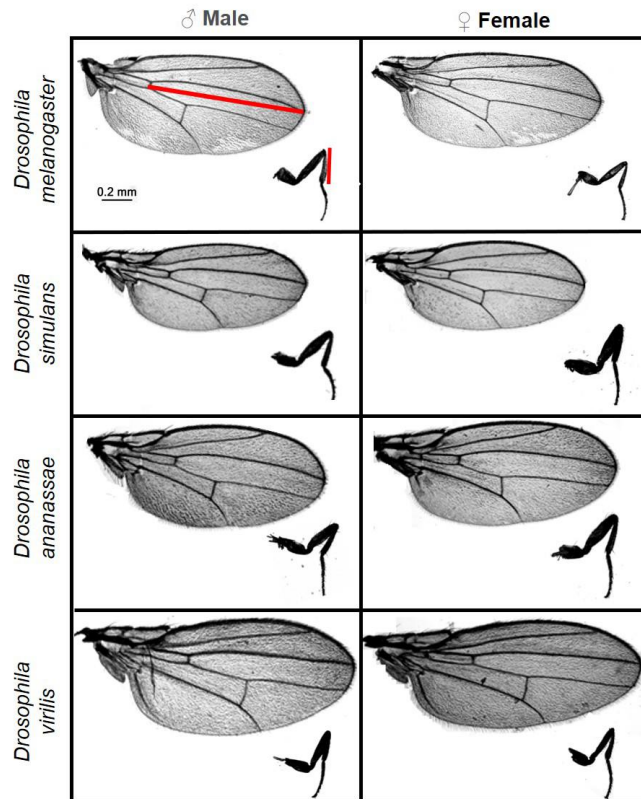


Figura 23. Estructuras representativas para el análisis de alometría. Se muestran las alas y las patas delanteras representativas para machos y hembras de las especies analizadas, así como también las diferencias en tamaños de las alas entre los sexos. En rojo se resaltan las medidas tenidas en cuenta para el análisis, utilizando el valor promedio de las alas y patas derecha e izquierda de cada individuo evaluado. Medida a escala para las alas 0.2 mm.

Con este análisis se confirmó la variación de tamaño en las estructuras corporales entre los sexos, dada por el dimorfismo sexual de los insectos (Kumar et al., 2022). Esta tendencia se mantiene en todas las especies de *Drosophila* evaluadas, en el caso de la longitud de las alas (**Figura 24A**), y en el caso de las tibias (**Figura 24B**). Finalmente, al hacer un análisis de cociente tomando en cuenta los valores de la longitud del ala/longitud de la tibia, se evidencia que el dimorfismo sexual se mantiene y es estadísticamente significativo (**Figura 24C**).

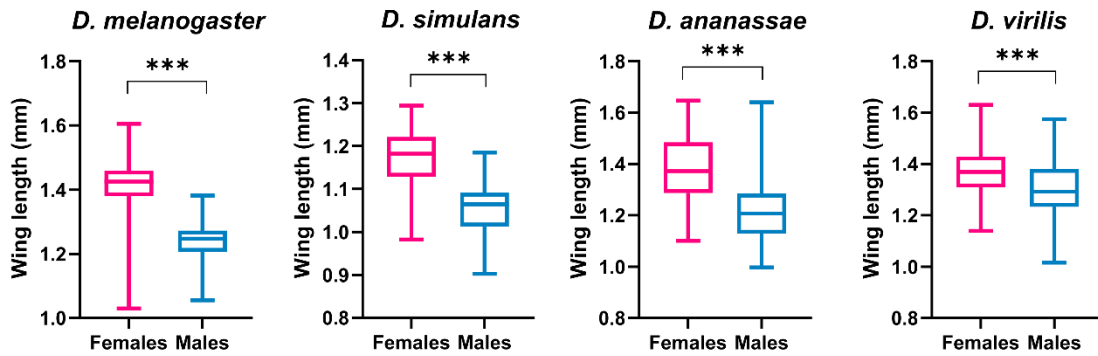
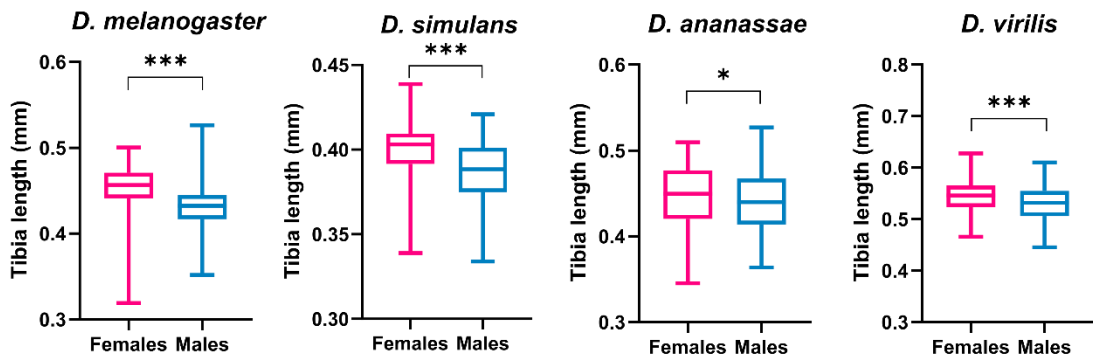
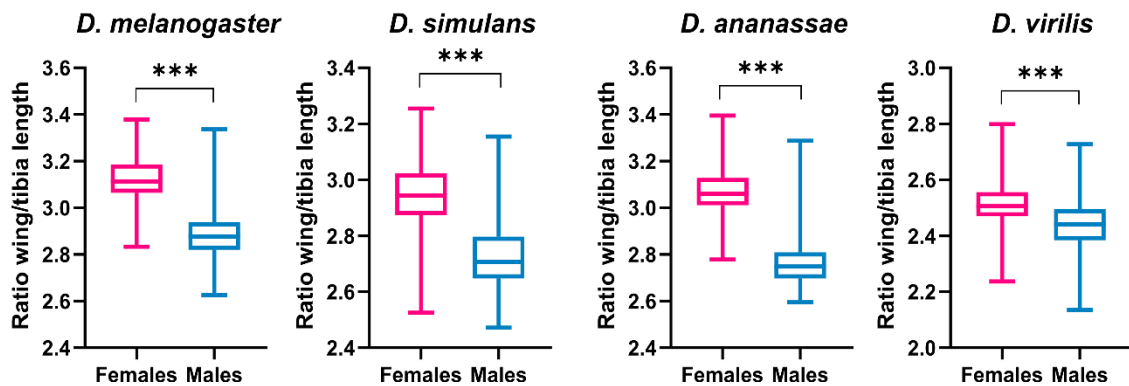
A**B****C**

Figura 24. Valores promedio de alas y tibias y el dimorfismo sexual en especies del género *Drosophila*. A) Gráficas que representan el valor medio de la longitud de las alas en machos y hembras de las 4 especies analizadas B) Representación de la medida de longitudes de las tibias en machos y hembras de las especies seleccionadas. C) Cociente entre medida promedio de las alas y de las tibias. Análisis estadístico usado, T de Student no pareado de dos colas. n= 372 hembras, 330 machos. ***= p -value<0.001, *= p -value=0.03. La media y distribución de los datos son mostrados en las gráficas.

Posteriormente, para analizar las relaciones de escala existente entre los diferentes organismos de las especies, se analizaron las medidas P/D de las tibias anteriores y las alas de los individuos de las diferentes especies (**Figura 25**).

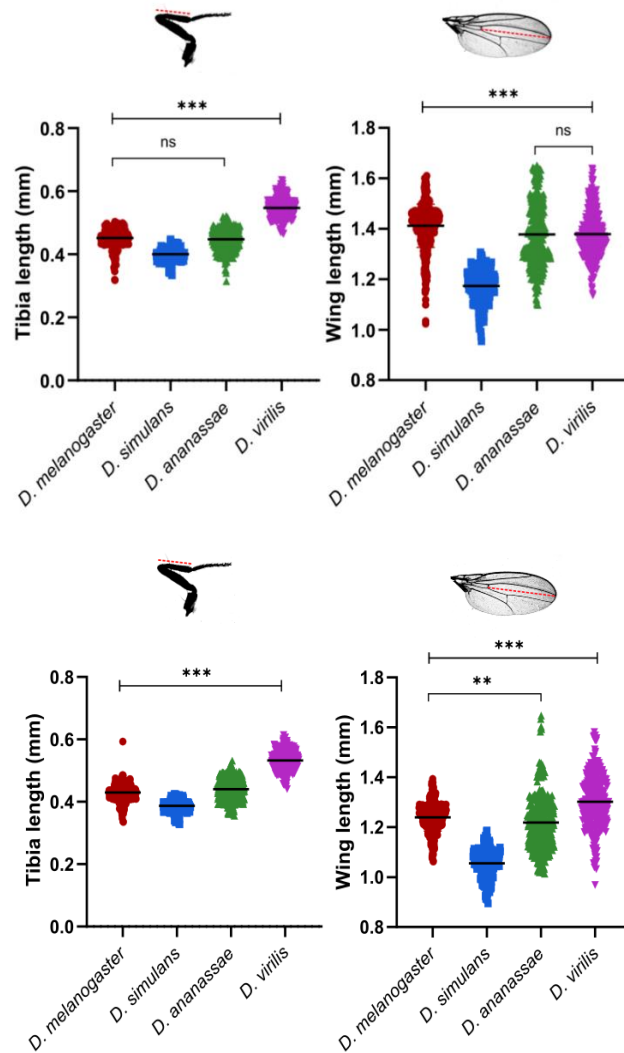
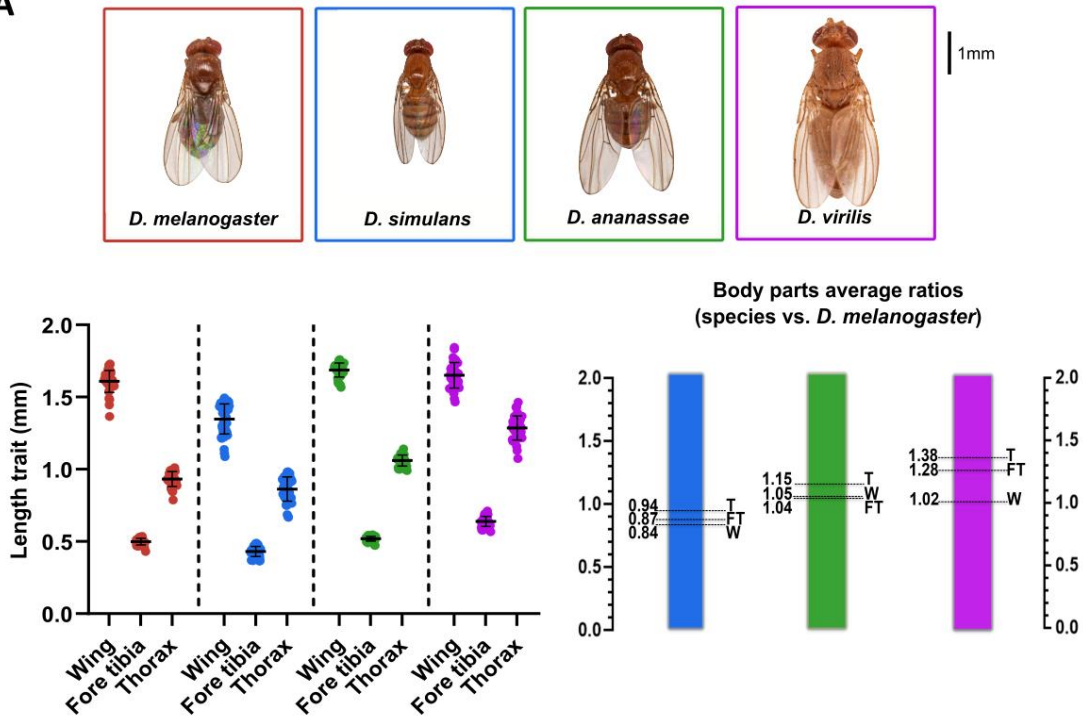


Figura 25. Medidas P/D: comparativa en las cuatro especies analizadas. Medidas de alas y tibias representativas; las líneas punteadas representan las medidas tomadas a lo largo del eje P/D. Se muestran, las comparativas de la longitud de tibias y alas con su correspondiente análisis estadístico para hembras (Panel superior) y machos (Panel inferior). Análisis de ANOVA de una sola vía fue empleado y comparado de forma múltiple con la prueba de Tukey, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.02$, ns = Estadísticamente no significativo ($p > 0.05$).

Con la finalidad de complementar y dar soporte de que *D. virilis* es una especie más grande pero además que las tibias son realmente comparables para ser usadas como referencia de tamaño corporal, se usaron las medidas próximo-distales tomadas incluyendo las

medidas de tórax, como se observa en las gráficas de la **Figura 26**, lo que permite concluir que los machos y las hembras de *D. virilis* son considerablemente grandes, comparadas con las demás especies analizadas en este proyecto.

A



B

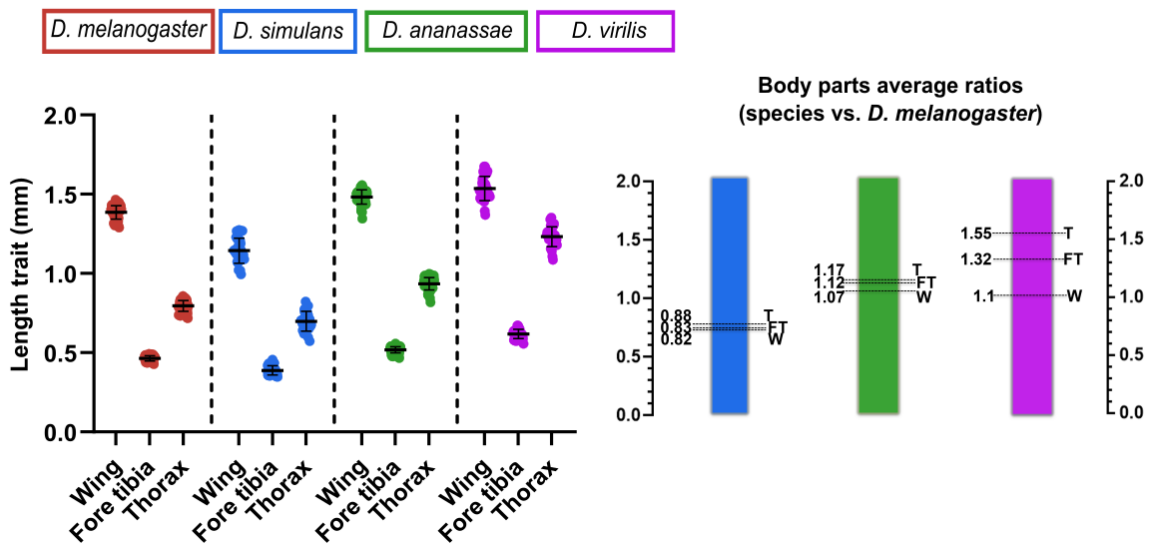


Figura 26. Medidas P/D: comparativa de alas, tibias y tórax en las cuatro especies de *Drosophila* analizadas. Comparación de la longitud promedio derecha/izquierda de alas, tibias y tórax en hembras y machos. Paneles de la derecha en A y B, muestran los cocientes de los promedios de las medidas P/D (especies vs. *D. melanogaster*) Análisis de hembras (A) *D. melanogaster* n= 36, *D. simulans* n=49, *D. ananassae* n=35, *D. virilis* n=35, y machos (B) *D. melanogaster*, n=215; *D. simulans*, n=112; *D. ananassae*, n=195; *D. virilis*, n=179. T= Torax, FT= Tibia delantera, W = Ala. Representación sigue el código de color de los recuadros de las imágenes de las diferentes especies.

Posterior a estos análisis, se evaluó la alometría estática en hembras y machos de las especies de *Drosophila*. Se tomaron los valores promedio de alas y patas (izquierda y derecha), además de la transformación logarítmica de cada uno de estos valores para obtener un análisis de alometría estática adecuado entre el tamaño del ala y el tamaño de la tibia obteniendo los valores de pendientes e interceptos a través del ajuste del modelo de SMA (Standardized Major Axis). Tanto en machos y en hembras, se observa un comportamiento característico que se agrupa de acuerdo con la filogenia de las especies (**Figura 27**) y el valor de la pendiente obtenida entre *D. melanogaster*, *D. simulans* y *D. ananassae*, que evidentemente son especies de diferentes tamaños, pero la tendencia de crecimiento de las alas respecto a las tibias se mantiene, donde las alas crecen más que lo que lo hacen las tibias y el cuerpo en general. Sin embargo, esto no es evidente en *D. virilis*, que muestra un desplazamiento en la gráfica de alometría, indicando que son animales mucho más grandes respecto a los de las especies anteriormente mencionadas. Además, la tendencia de crecimiento de ala/tibia observada en las otras especies, no se mantiene en estos individuos de *D. virilis*. Este comportamiento indica un cambio en la tendencia de crecimiento y ofrece una oportunidad para estudiar la evolución de este cambio alométrico. (**Figura 27**).

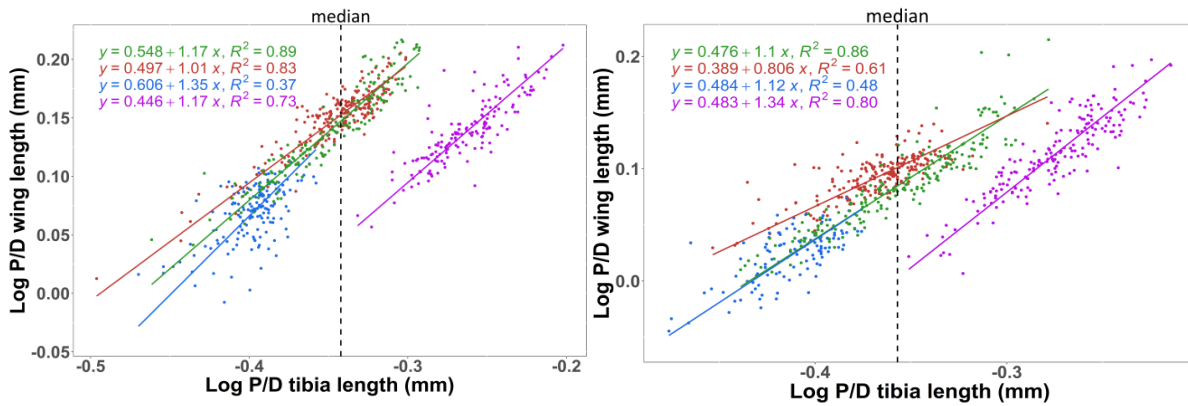


Figura 27. Alometrías estáticas en hembras y machos de las cuatro especies de *Drosophila* seleccionadas. Relaciones de escala en hembras (izquierda) y machos (derecha) de las cuatro especies, ajustadas usando el modelo II de regresión (SMA). Ecuaciones representan los valores de los interceptos, pendientes y R² en cada caso. La línea punteada representa la localización del valor de la mediana de todas las especies.

Para hacer una comparación entre las cuatro especies, se evaluó el 95% para calcular los intervalos de confianza para las pendientes y los interceptos de cada relación de escala evaluada (**Figura 28**).

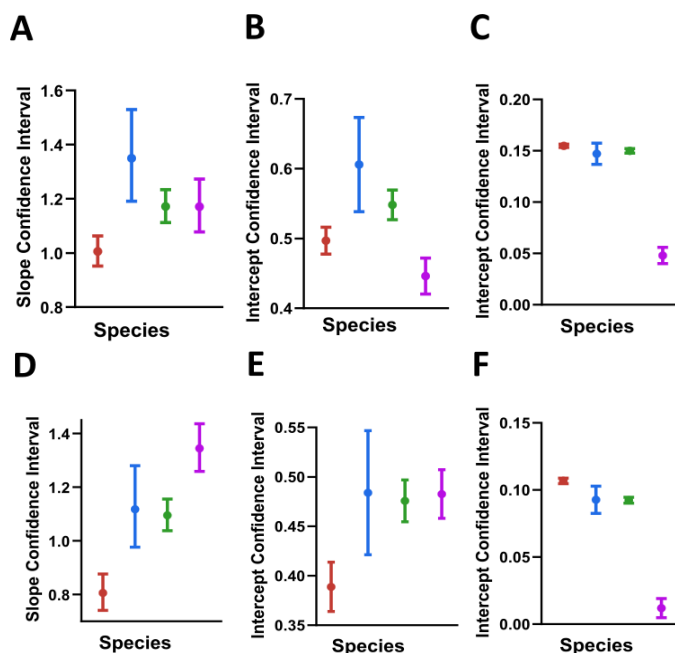


Figura 28. Intervalo de confianza de la pendiente e intercepto en hembras y machos de las cuatro especies de *Drosophila* seleccionadas. Barras de error que representan el 95% de los intervalos de confianza para cada una de las especies (A-C) Intervalos de confianza en hembras, (A) para la pendiente, (B) para el intercepto en un valor arbitrario definido en 0, (C) para el intercepto en un valor arbitrario definido en la mediana de todos los valores en conjunto de las especies evaluadas. (D-F) Intervalos de confianza en machos, (D) para la pendiente, (E) para el intercepto en un valor arbitrario definido en 0, (F) para el intercepto en un valor arbitrario definido en la mediana de todos los valores en conjunto de las especies evaluadas.

Evidentemente, la pendiente de las hembras de *D. melanogaster* (**Figura 28A**) muestra un comportamiento isométrico (pendiente de 1 contenido en el intervalo de confianza), pero *D. ananassae*, *D. simulans* y *D. obscura* presentan pendientes mayores a 1 (**Figura 28A**), lo cual es similar en el caso de los machos (**Figura 28D**). Los valores de los intervalos de confianza de los interceptos con valor 0 de cada especie, se muestran en las **Figuras 28B, E**. Sin embargo, se decidió analizar el intercepto con un valor de la mediana de los datos de las cuatro especies (**Figura 27**, línea punteada, **Figura 28C, F**). El 95% de los intervalos de los interceptos en la mediana, muestran la sorprendente diferencia en el tamaño relativo de las alas en hembras y en machos, que es evidente en las relaciones de escala estática mostradas anteriormente.

A partir de lo anterior, se consideró la posibilidad de que las diferencias mostradas en los interceptos de las especies evaluadas podrían estar controladas por elementos *cis*-regulatorios del gen de *vestigial*. Nos enfocamos en el *Quadrant Enhancer* (vg^{QE}), debido a

que este enhancer controla la expresión del gen en la mayor parte de la bolsa del disco imagal alar.

7.5. Análisis bioinformático para la búsqueda del vg^{QE}

Con base en la secuencia reportada para el vg^{QE} de *D. melanogaster*, se buscaron secuencias potenciales en el genoma de las otras especies. Para iniciar esto, con ayuda de la anotación del genoma de cada una de las especies y su disponibilidad en la base de datos del NCBI, se comparó la estructura de los genes para evaluar el número de exones e intrones (**Figura 29**). Como se puede ver en la figura, la sintenia de la mayoría de los exones se mantiene en todas las especies, exceptuando el segundo exón en *D. ananassae*. Una posible hipótesis es que el genoma de esta especie no está correctamente curado y por lo tanto su anotación en la base de datos es incompleta. Esta deducción fue realizada ya que si se analiza la estructura del gen de la especie filogenéticamente más distante (*D. virilis*), la estructura y la sintenia del gen se mantiene en todos los exones que componen al gen de *vg*.

Debido a esta conservación mayoritaria de exones e intrones, se decidió analizar la región del cuarto intrón, donde previamente se reportó la localización del vg^{QE} en *D. melanogaster*. Tomando en cuenta las secuencias específicas del gen *vg* en cada especie, se usaron programas para el análisis bioinformático como Uniprot UGENE y SnapGene® Viewer para delimitar los exones e intrones correspondientes a cada especie (**Figura 29**, flecha verde).

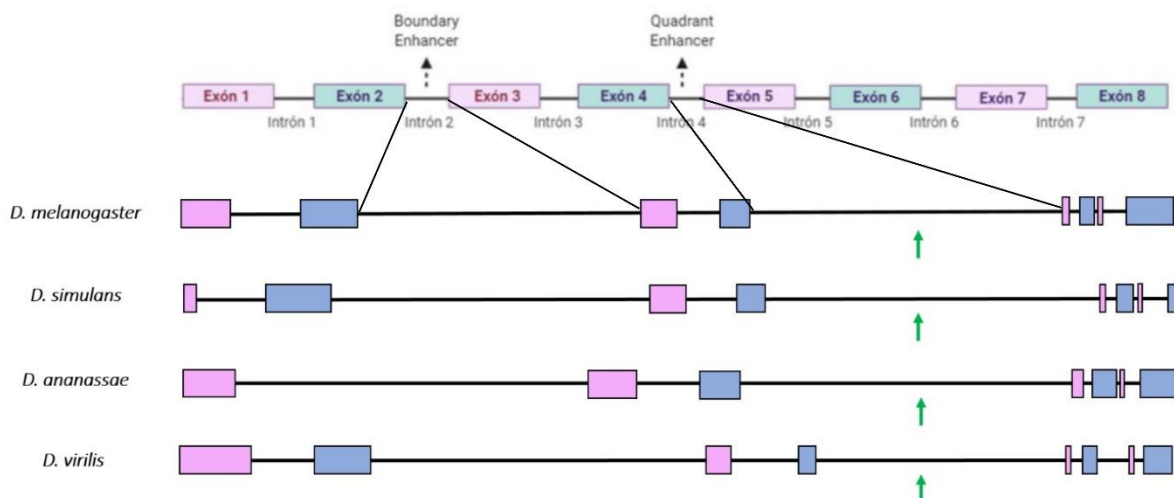


Figura 29. Sintenia de los exones en el gen de vg para las especies seleccionadas.

Usando la base de datos del NCBI se obtuvo la estructura de cada gen de acuerdo con la disponibilidad de los genomas. Todas las especies, exceptuando *D. ananassae* conservan la estructura del gen de referencia de *D. melanogaster*. Debido a esto se empleó la secuencia del cuarto intrón (señalado con flechas verdes) para realizar los alineamientos y la búsqueda del QE.

Al tener las secuencias del cuarto intrón en cada especie, se realizaron alineamientos de tipo pareado entre la secuencia del vg^{QE} de la cepa Samarkand de *D. melanogaster* y las secuencias de los intrones de las demás especies. Para esto, se empleó la herramienta de alineamiento Water de EMBOSS (**Tabla 2**).

Tabla 2. Resultados de los alineamientos pareados para vg^{QE}

	Longitud de la secuencia	Similitud	Número de gaps
<i>D. melanogaster</i>	928	928/928 100%	0/928 0%
<i>D. simulans</i>	950	848/950 89.3%	59/950 6.1%
<i>D. ananassae</i>	1375	691/1375 50.3%	555/1375 40.4%
<i>D. virilis</i>	1382	637/1382 46.1%	617/1382 44.6%

Uso de la herramienta water de EMBOSS y como secuencia de referencia el vg^{QE} de la cepa Samarkand de *D. melanogaster* para alinear con los intrones de cada una de las especies con respecto a la secuencia reportada para *D. melanogaster*.

Finalmente, con base en estos alineamientos pareados se obtuvieron las secuencias de los *enhancers* para cada especie, teniendo en cuenta la variación de la longitud de estas de acuerdo con su apareamiento de bases de la secuencia Samarkand de referencia. Al tener las secuencias disponibles, se realizó un alineamiento múltiple con la herramienta T-COFFEE que realiza una mezcla de alineamientos globales y locales para el alineamiento resultante (Notredame et al., 2000), y como formato de salida se usó la plataforma ESPript 3.0, para visualizar las bases y regiones de las secuencias con un alto grado de similitud (**Figura 30**).

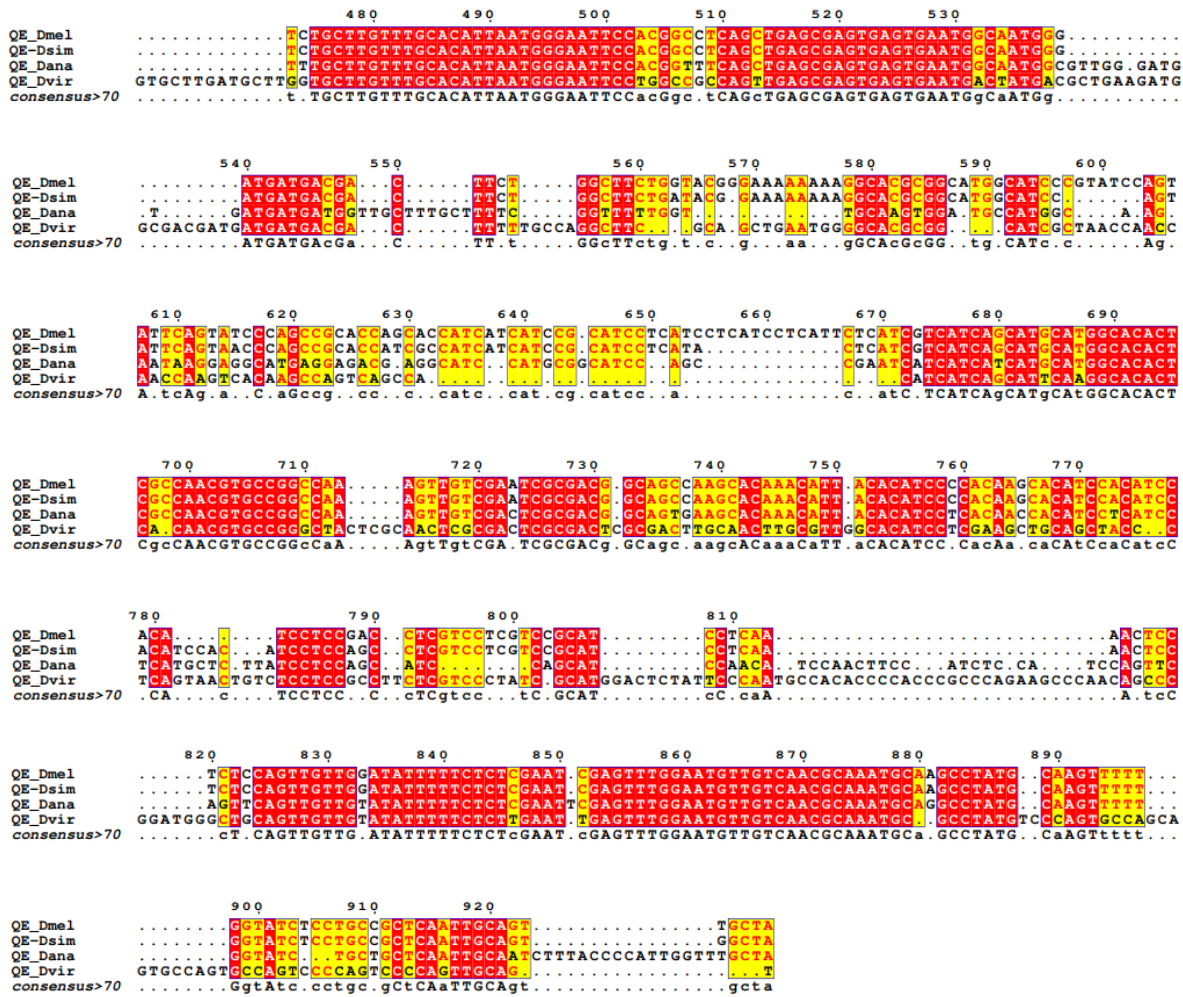


Figura 30. Alineamiento de las secuencias del vg^{QE} para las especies seleccionadas. Con las secuencias obtenidas se realizó el alineamiento en T-COFFEE para posteriormente visualizarlas en el formato de salida de ESPrpt. El color rojo representa la similitud en un 100% de la base en las 4 especies, y el color amarillo representa la similitud número a un 70% de las bases entre las especies. En la parte superior del alineamiento se ve el número de referencia de longitud de la secuencia. QE_Dmel (vg^{QE} de *D. melanogaster*), QE_Dsim (vg^{QE} de *D. simulans*), QE_Dana (vg^{QE} de *D. ananassae*) y QE_Dvir (vg^{QE} de *D. virilis*).

El alineamiento muestra regiones similares entre las cuatro especies, lo cual sugiere que son regiones conservadas que probablemente tengan una influencia en la regulación del gen de vg , es decir, regiones potenciales con presencia de motivos de unión a factores de transcripción específicos.

Se ha reportado que, para activar la transcripción de vg , es necesario el factor de transcripción *Scalloped* (*Sd*), el cual tiene una secuencia de reconocimiento a un motivo de

unión al ADN característico TGG AATGT (SID- *Scalloped Interaction Domain*), también conocido como motivo TEA, el cual es ampliamente conservado en muchos grupos de organismos. (Halder et al., 1998).

Así que nos preguntamos si los motivos TEA-SID de unión a Sd están presentes en las secuencias del alineamiento del QE en las especies analizadas y encontramos dos posibles motivos en cada especie, más uno adicional en *D. ananassae*, los cuales están en las regiones mejor conservadas de las especies (**Figura 31**).

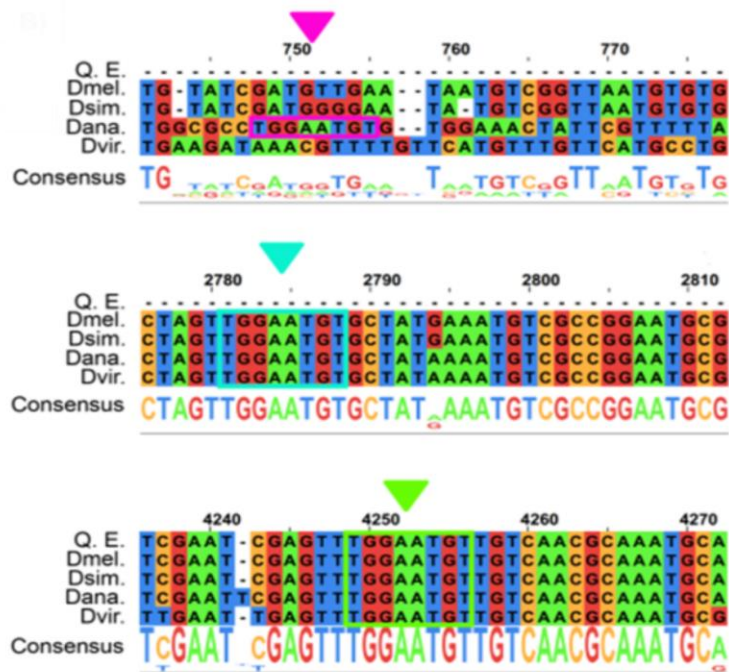


Figura 31. Motivos TEA-SID identificados en las secuencias alineadas del vg^{QE} . Se muestra en la imagen con las cabezas de flechas, la localización de dos motivos de unión de *Scalloped* al ADN. El motivo señalado con la cabeza de flecha rosa se identificó únicamente en *D. ananassae*. El método empleado para identificar los motivos fue de texto plano.

Sorprendentemente, en *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. ananassae* y *D. virilis* encontramos un motivo TEA de unión al ADN en común río arriba del sitio de inicio del QE (localizado 544 pares de bases río arriba del inicio del QE en *D. melanogaster*, 522 pares de bases para *D. simulans*, 501 pares de bases para *D. ananassae* y 230 pares de bases para *D. virilis*). Además de esto, se encontró un sitio adicional para *D. ananassae*, que se

localiza 2218 pares de bases río arriba del inicio del vg^{QE} . En la **Figura 32** se muestra un esquema de los motivos TEA encontrados en las secuencias del gen de vg .

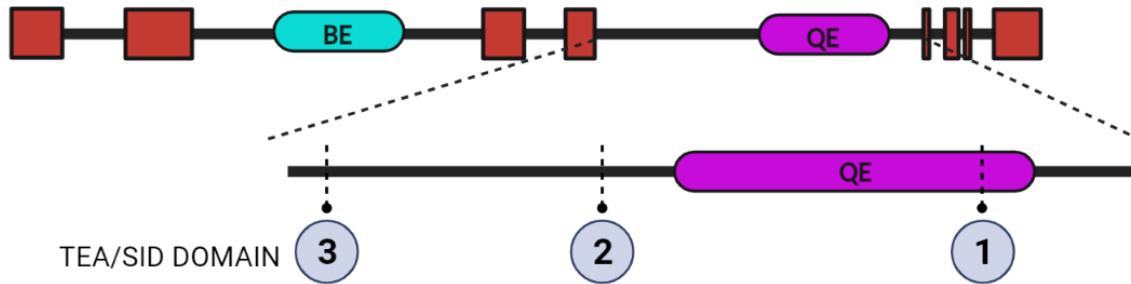


Figura 32. Esquema representativo de la ubicación o localización de los motivos TEA-SID de unión de *Scalloped* al ADN con respecto al QE. Usando alineamientos múltiples en T-COFFEE de los intrones #4 del gen vg para las 4 especies, se realizó la búsqueda de motivos, donde se encontró que dos motivos son comunes para las 4 especies, uno de ellos localizado dentro de la secuencia reportada del QE (1) y el otro (2) localizado río arriba del inicio del *enhancer*. Además, se encontró un motivo adicional (3), presente únicamente en *D. ananassae*.

Posterior a la localización de una secuencia regulatoria correspondiente al vg^{QE} y motivos de interacción con *Scalloped* en cada una de las cuatro especies, se procedió al análisis de la influencia de dicha región regulatoria en el desarrollo del ala y el establecimiento de la diversidad en las alas de las especies de *Drosophila* analizadas a través de la herramienta de edición genética CRISPR/Cas9.

7.6. Evaluación de la influencia de la regulación mediada por el vg^{QE} en el desarrollo del ala a través del sistema CRISPR/Cas9 y reparación Non Homologous End Joining (NHEJ)

Con el fin de mostrar la influencia del QE en el desarrollo del ala en *D. melanogaster*, se diseñaron ARNs guías específicos para eliminar regiones propias de la región regulatoria del vg^{QE} (**Figura 33**), para eliminar la secuencia reportada del QE y su correspondiente motivo de interacción con Sd ($vg^{\Delta QE}$, usando los ARNs guía 1 y 2), la secuencia reportada

del vg^{QE} con el motivo localizado río arriba de la secuencia del inicio del vg^{QE} (544 pares de bases) ($vg\Delta QE+SID$, usando los ARNs guía 3 y 2) y como control, la delección de una pequeña región que no se localiza dentro de la secuencia del vg^{QE} reportada, ni tampoco incluye motivos de interacción con Sd ($vg\Delta CTRL$, usando los ARNs guías 1 y 4).

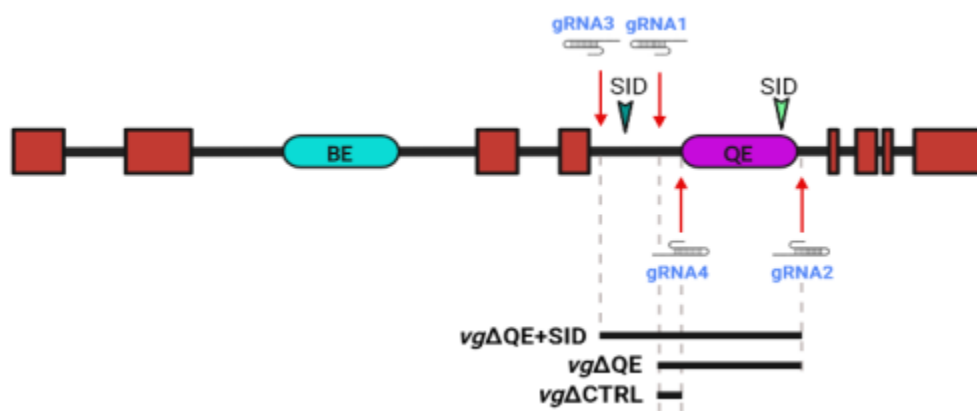


Figura 33. Diseño experimental de las eliminaciones realizadas por NHEJ para evaluar la influencia del vg^{QE} en el desarrollo de las alas. Esquema representativo del gen *vg* que muestra la localización de los gARNs (marcados en flechas rojas) que fueron empleados para eliminar diferentes fragmentos (en barras negras) en el cuarto intrón: $vg\Delta QE+SID$ (gARN3 y gARN2 que contienen el motivo SID adicional localizado río arriba del inicio de la secuencia reportada del vg^{QE} , $vg\Delta QE$ (gARN1 y gARN2) y $vg\Delta CTRL$ (gARN1 y gARN4).

Los individuos de las líneas de las eliminaciones anteriormente descritas fueron monitoreados por medio de PCR para identificar la presencia de alelos modificados y finalmente establecer las líneas estables homocigotas. Con este fin, se desarrolló una estrategia de identificación de alelos modificados (screening) que se muestra en la **Figura 34**. (Los pasos de validación de cada etapa fueron verificados por PCR como se muestra en la **Figura 35**). Con los individuos generados en las líneas estables, se procedió a hacer la secuenciación para confirmar las inserciones o eliminaciones generadas por el sistema de CRISPR/Cas9 (**Figura 36**).

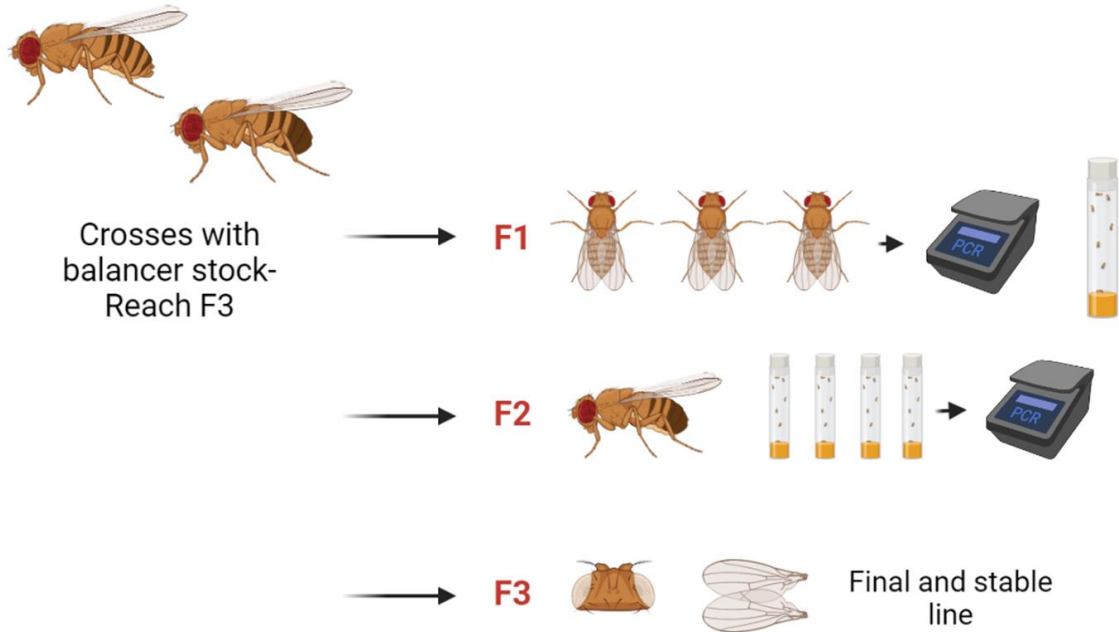
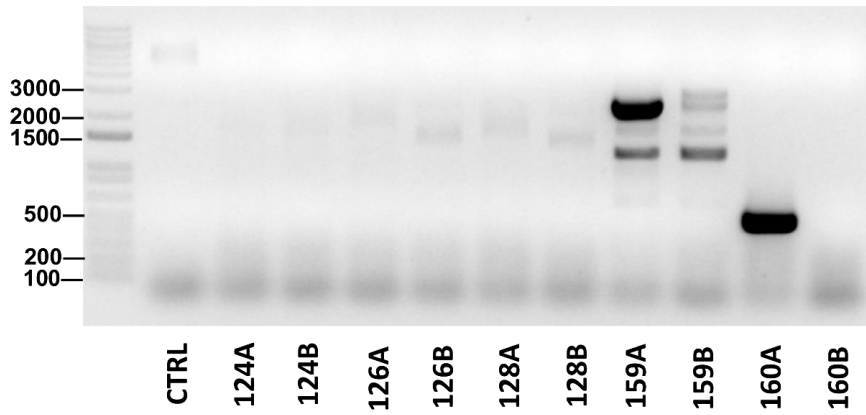
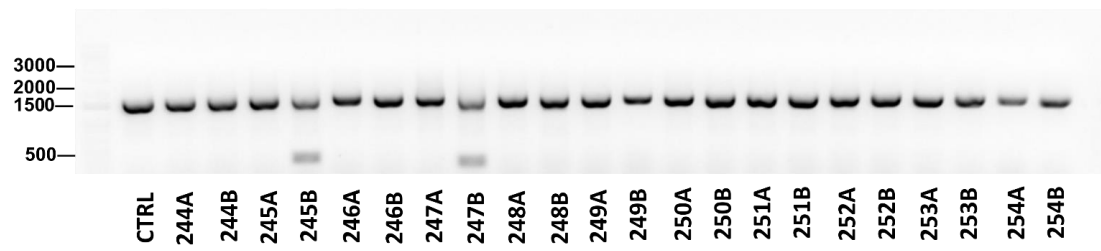


Figura 34. Estrategia experimental empleada para la identificación de los alelos modificados en individuos de las líneas estables. Para cada una de las eliminaciones realizadas $vg\Delta QE+SID$, $vg\Delta QE$ y $vg\Delta CTRL$, se realizaron cruces de los individuos G0 con individuos del stock balanceador $Sco/CyO-RFP$, con la finalidad de generar líneas estables y homocigotas. En los pasos intermedios se realizaron PCRs para identificar los alelos modificados y así asegurar la presencia de estos en la siguiente generación. En la generación F1 se analizaron agrupaciones de 3 hembras, usando los oligonucleótidos 5 y 12 (Ver Tabla 1). De las positivas, se tomaron machos de sus respectivos stocks de proveniencia y estos se cruzaron individualmente con hembras del stock balanceador $Sco/CyO-RFP$. Posteriormente, a estos machos se les realizó nuevamente una PCR para identificar los positivos para la modificación de los alelos, usando el mismo conjunto de oligonucleótidos (5 y 12). Finalmente, en la generación F3 se obtuvieron individuos con ojos blancos, alas planas y cerdas (bristles) normales, fenotipo característico de los individuos homocigotos en cada una de las líneas.

A *vg*ΔQE+SID: 160



B *vg*ΔQE: 247



C *vg*ΔCTRL: 358

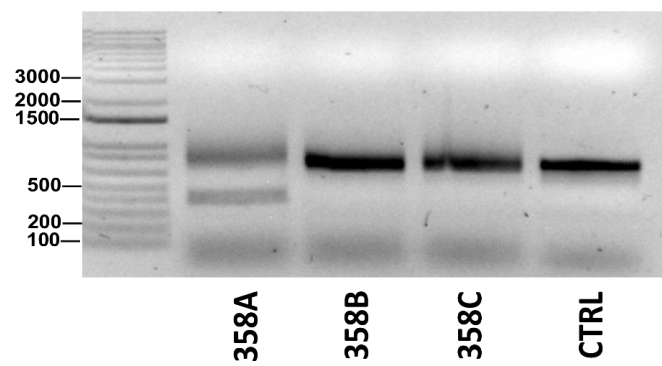


Figura 35. PCR para la identificación de alelos modificados en las eliminaciones inducidas con CRISPR/Cas9. Análisis de alelos modificados por medio de amplificación por PCR usando diferentes combinaciones de oligonucleótidos en las diferentes eliminaciones. **A.** Amplificación de la delección *vgΔQE+SID* con tamaño esperado de un amplicón de ~0.5Kb. Tamaño esperado del amplicón en WT: ~2.4Kb. Oligonucleótidos usados 5 y 21 (ver Tabla 1), donde la línea positiva fue 160A. **B.** Amplificación de la delección *vgΔQE* con tamaño esperado del amplicón ~0.3Kb. Tamaño esperado en WT: ~1.5Kb. Oligonucleótidos usados 13 y 12 (ver Tabla 1), donde las líneas positivas fueron 245B y 247B. **C.** Amplificación de la delección *vgΔCTRL* con tamaño esperado del amplicón de ~0.4Kb. Tamaño del amplicón esperado en WT: ~0.7Kb. Oligonucleótidos usados 17 y 22 (ver Tabla 1), obteniendo la línea positiva 358A.

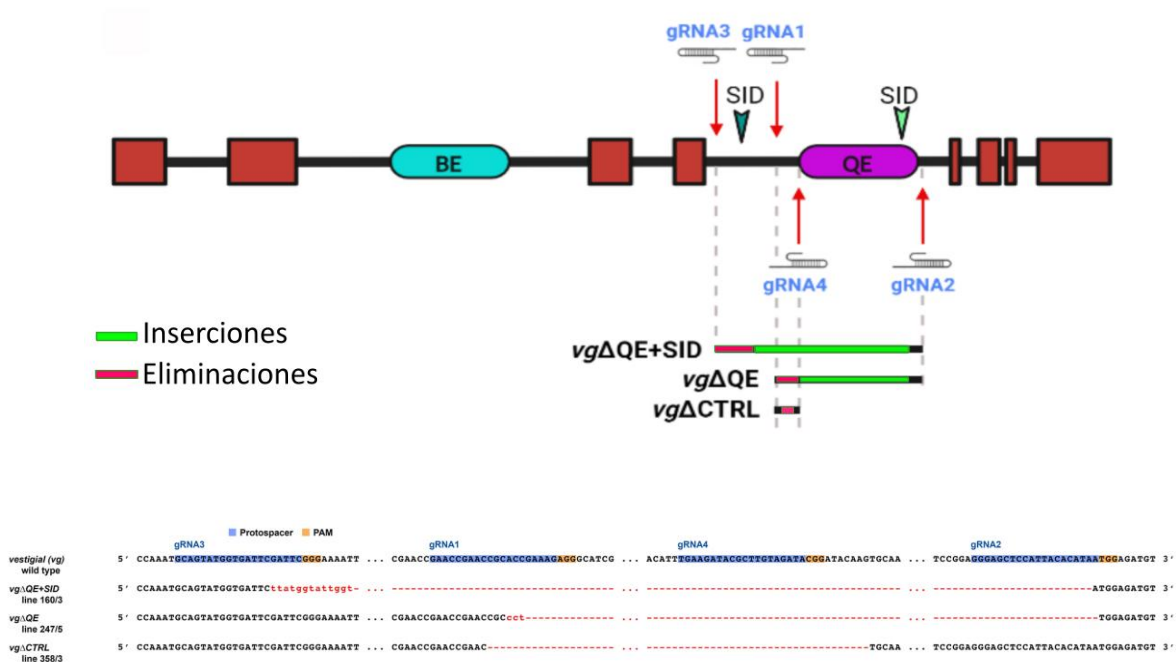


Figura 36. Secuenciación de los alelos modificados de las líneas estables homocigotas. La secuenciación confirma que cada uno de los elementos modificados usando el sistema de NHEJ con CRISPR/Cas9 fueron modificados por inserciones y/o eliminaciones. Los gARNs se muestran en azul y los sitios PAM se muestran en naranja. Las inserciones se muestran en letras rojas, y las eliminaciones se representan con guiones.

Contrario a lo que esperábamos, en las líneas estables homocigotas, las eliminaciones muestran que no hay un efecto marcado en el patrón de la proteína Vg en discos imagales alares del tercer estadio tardío de desarrollo, donde se observa el patrón característico de la proteína cubriendo toda la bolsa del disco. Además, el efecto tampoco se ve evidenciado en la forma y el patrón del ala adulta, como se muestra en la **Figura 37**.

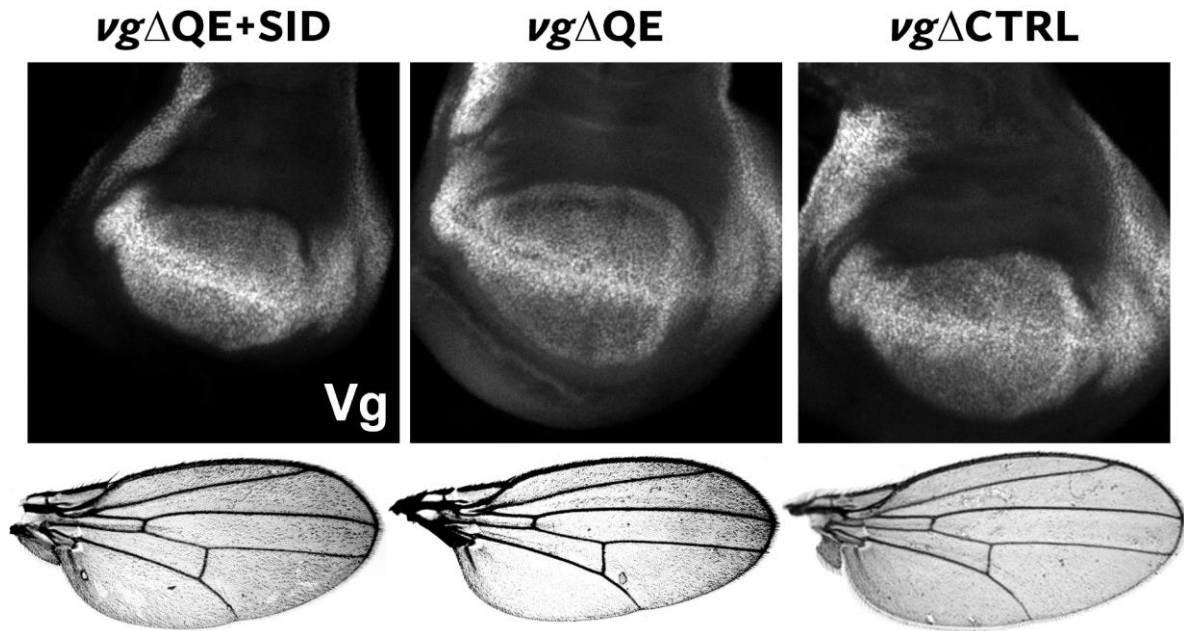


Figura 37. Efectos de las eliminaciones generadas por el sistema NHEJ con **CRISPR/Cas9**. Imágenes representativas de los discos imagales alares (en el tercer estadio del desarrollo larvario) inmuno marcadas con Vg. Se muestran también las alas adultas de hembras para cada una de las líneas de las eliminaciones.

Al analizar el tamaño de las alas en machos y hembras, se identificó una pequeña pero significativa reducción en el tamaño del ala de la deleción *vgΔQE+SID* respecto a las otras eliminaciones, como se observa en la **Figura 38**. Sin embargo, que esta reducción no era específica de las alas, ya que las mediciones de las tibias del par anterior de patas también son significativamente más pequeñas en los animales con la deleción *vgΔQE+SID* respecto a las otras líneas, especialmente en machos (**Figura 39**). Sin embargo, cuando cada ala es normalizada a la longitud de la medida de la tibia correspondiente (cociente ala/tibia), se encontró que la diferencia de los tamaños solo persiste en hembras (**Figura 40**), lo cual sugiere, que los machos de la deleción *vgΔQE+SID* tienen una reducción proporcional. Estos resultados sugieren que el *enhancer* tiene un efecto en el control del tamaño final. En términos generales, nuestros datos sugieren que el QE no es requerido para la especificación del patrón de Vg en el ala ni para la determinación del patrón de las alas adultas, exceptuando los sutiles efectos sexo-específicos del tamaño del animal, que ocurren únicamente con la eliminación del SID adicional. Esto sugiere que otros

potenciadores podrían estar rescatando la formación del patrón de Vg, aún en la ausencia del vg^{QE} (Ver Discusión).

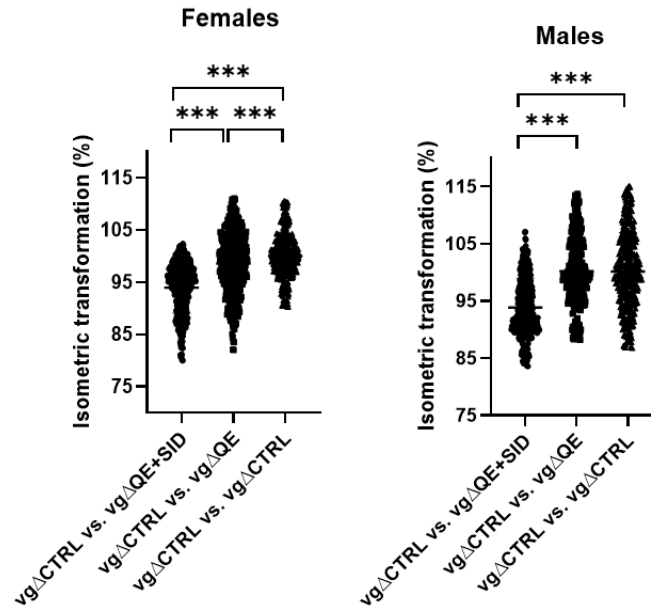


Figura 38. Identificación de la reducción del tamaño de las alas de la delección $vg\Delta QE+SID$. Se muestran las gráficas representativas para machos y hembras que muestran la comparación por pares del control respecto a las eliminaciones del QE realizadas. Se realizó una transformación isométrica en cada ala control para que coincida con un ala experimental y se representa gráficamente el factor de transformación isométrica (en %). La significancia estadística mostrada, se determinó por medio de un análisis de ANOVA de una vía, con comparaciones múltiples usando la prueba de Tukey ($p < 0.0005$).

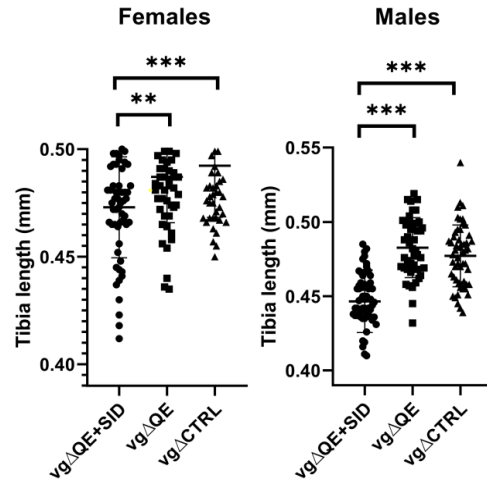


Figura 39. Medidas de las tibias anteriores de machos y hembras de las líneas deletadas con CRISPR/Cas9. Las gráficas muestran que al tomar en cuenta una medida representativa del tamaño del cuerpo, que la reducción no solo se limita al ala, sino una reducción general en el tamaño del animal. Los machos y las hembras fueron independientemente comparados. La significancia estadística se obtuvo luego de realizar el análisis de ANOVA de una vía, con comparaciones múltiples usando la prueba de Tukey (**: $p < 0.005$, ***: $p < 0.0005$). $n =$ hembras 58 (vgΔQE+SID), 57 (vgΔQE), 58 (vgΔCTRL); machos 60 (vgΔQE+SID), 44 (vgΔQE) y 54 (vgΔCTRL).

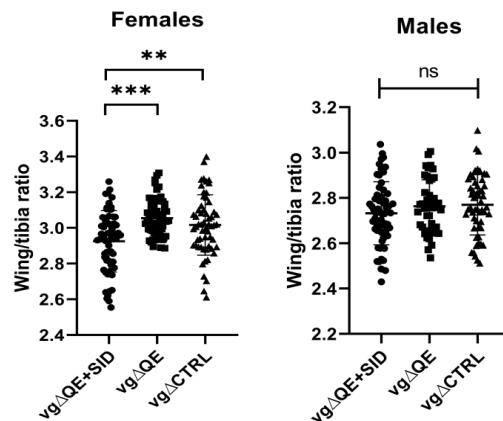


Figura 40. Cocientes y normalización de las medidas de las alas respecto a la longitud de las tibias anteriores de machos y hembras de las líneas deletadas con CRISPR/Cas9. El cociente realizado sugiere que la reducción del tamaño de los machos es proporcional, lo cual no ocurre con las hembras, donde la diferencia de las alas, respecto al tamaño del cuerpo, persiste de una forma estadísticamente significativa. Esta significancia estadística se obtuvo luego de realizar el análisis de ANOVA de una vía, con comparaciones múltiples usando la prueba de Tukey (**: $p < 0.005$, ***: $p < 0.0005$, ns: no significativo). $n =$ hembras 58 (vgΔQE+SID), 57 (vgΔQE), 58 (vgΔCTRL); machos 60 (vgΔQE+SID), 44 (vgΔQE) y 54 (vgΔCTRL).

7.7. Evaluación de la influencia de la regulación mediada por el QE en el desarrollo del ala a través del sistema CRISPR/Cas9 y de reparación Homologous Directed Repair (HDR)

A pesar de que la eliminación del vg^{QE} en *D. melanogaster* no tuvo el efecto deletéreo que se predecía (una disminución notoria en el tamaño del ala), se emplearon los gARNs anteriormente diseñados en NHEJ, para la eliminación de la secuencia reportada del QE con el motivo localizado río arriba de la secuencia del inicio del QE (544 pares de bases) ($vg\Delta QE+SID$, usando los ARNs guía 3 y 2) (Figura 33). Como se describió en la sección de Materiales y Métodos, el plásmido (pCFD4) que contiene los gARNs fue co-inyectado con el plásmido donador (pH-DsRed) (Figura 17) que contiene las secuencias de reemplazo del vg^{QE} de *D. virilis* o de *D. melanogaster* (Figura 41) en embriones de *D. melanogaster* que expresaban de manera endógena y en línea materna la endonucleasa Cas9.

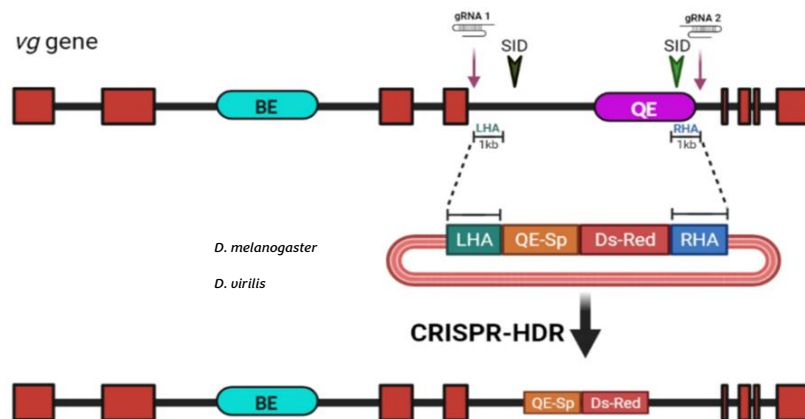


Figura 41. Estrategia experimental empleada en los reemplazos del QE mediante HDR.

Para los reemplazos de $vg^{QED_{mel}}$ y $vg^{QED_{vir}}$, se muestra el esquema base del reemplazo del QE de *D. melanogaster* o de *D. virilis*, así como la representación del gen de *vg* final con los componentes insertados, incluyendo el QE y el marcador DsRed. El QE-Sp, representa la secuencia del QE de *D. melanogaster* o de *D. virilis*.

La inserción del cassette de DsRed del plásmido donador permitió identificar visualmente individuos potencialmente positivos para la modificación de los alelos y llevar a cabo el protocolo de genotipificación.

Para confirmar la presencia de todos los componentes insertados por el plásmido donador, es decir, la presencia de los brazos homólogos izquierdo (LHA) y derecho (RHA) correspondientes a *D. melanogaster*, además de la secuencia del vg^{QE} de cada especie (*D. melanogaster* o *D. virilis*) y la secuencia de la proteína roja fluorescente DsRed (**Figura 42**), se analizaron los individuos por PCR usando las combinaciones de oligonucleótidos 52-20 y 23-53 (ver **Tabla 1**). La **Figura 43** muestra un resumen del proceso de screening que se llevó a cabo para esta parte del análisis.

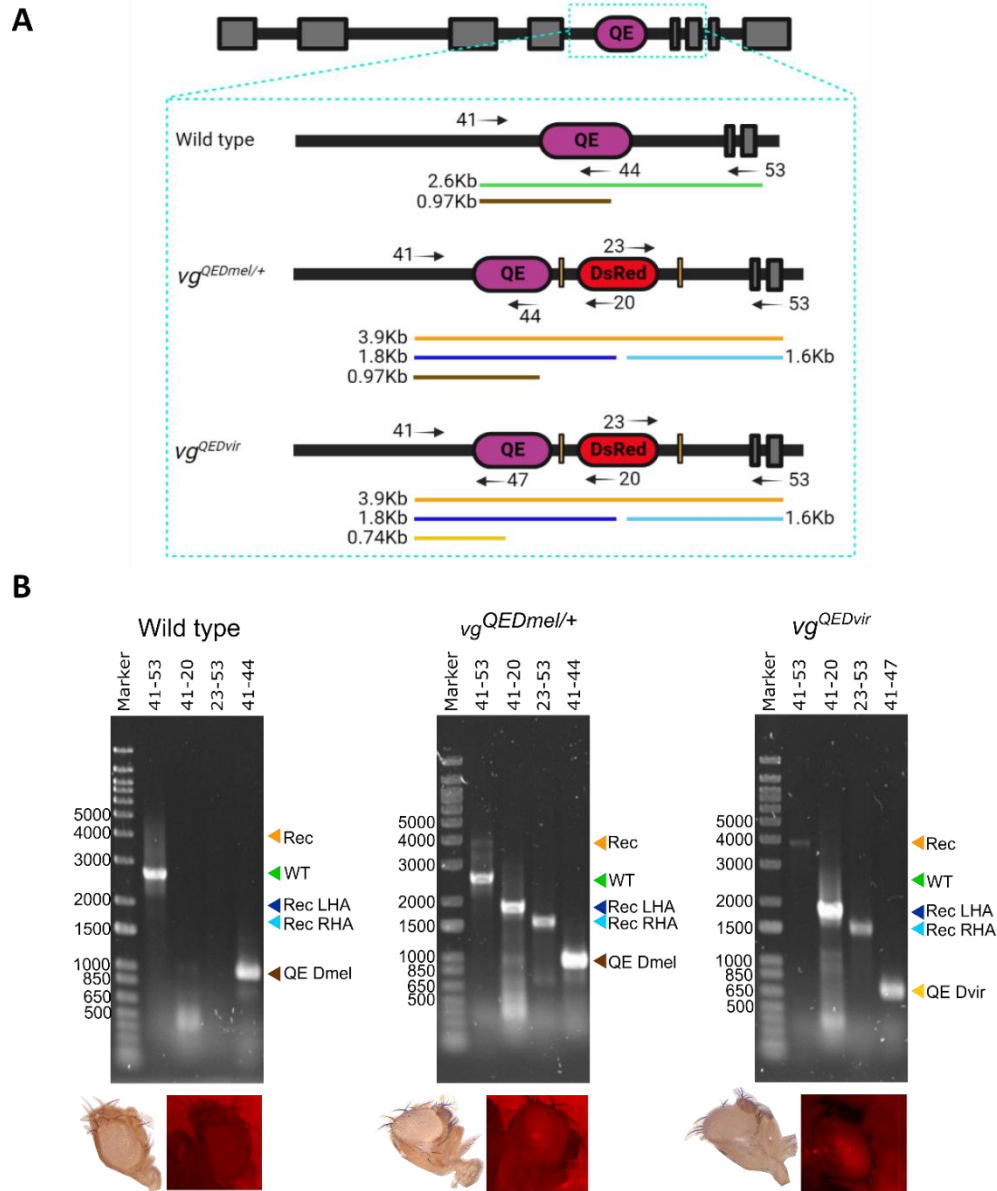


Figura 42. PCR para la identificación de los alelos modificados en los reemplazos inducidos con CRISPR/Cas9-HDR. A. Se representan los tamaños de los productos de amplificación usados para la identificación de los reemplazos *vg^{QE}* en líneas de color, los motivos de interacción con Sd (SIDs) y en flechas negras, el sentido de los oligonucleótidos empleados. **B.** Productos de amplificación en individuos wild type (+/+), individuos heterocigotos (*vg^{QEDmel/+}*) e individuos homocigotos (*vg^{QEDvir/vg^{QEDvir}}*). Se usó la combinación de oligonucleótidos 41 y 53 para la evaluación de la Recombinante (Rec) y/o el producto wild type (WT). Los oligonucleótidos 41 y 20 se usaron para la identificación del brazo homólogo recombinante izquierdo (Rec-LHA). Los oligonucleótidos 23 y 53 fueron usados para la amplificación del brazo homólogo recombinante derecho (RecRHA); la secuencia del QE de *D. melanogaster* (QE Dmel) o del QE de *D. virilis* (QE Dvir), fueron evaluadas con los oligonucleótidos 41 y 44/47 respectivamente.

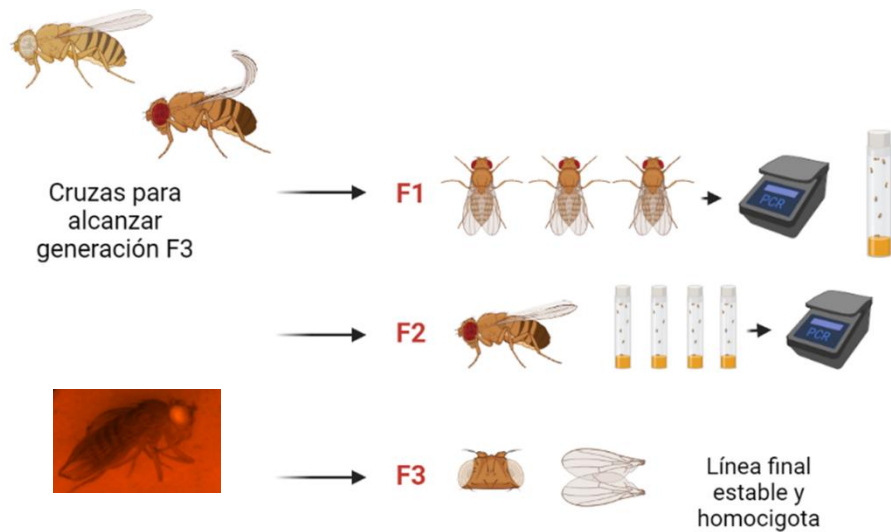


Figura 43. Estrategia experimental empleada para la identificación de los alelos modificados y generación de líneas homocigotas utilizando la técnica de HDR. Para cada uno de los reemplazos realizados de $vg^{QED^{mel}}$ y $vg^{QED^{vir}}$, se realizaron cruces de los individuos G0 con individuos del stock balanceador $w, Sco/CyO-RFP$, con la finalidad de generar líneas estables y homocigotas. En los pasos intermedios se realizaron PCRs para identificar los alelos modificados y así asegurar la presencia de estos en la siguiente generación. En la generación F1 se analizaron agrupaciones de 3 hembras. De las positivas, se tomaron machos de sus respectivos stocks de procedencia y estos se cruzaron individualmente con hembras del stock balanceador $w, Sco/CyO-RFP$. Posteriormente, a estos machos se les realizó nuevamente una PCR para identificar nuevamente los positivos para la modificación de los alelos. Finalmente, en la generación F3 se obtuvieron individuos con ojos blancos, alas planas y cerdas (bristles) normales, fenotipo característico de los individuos homocigotos en cada una de las líneas. En este caso, la selección de individuos con ojos rojos fluorescentes fue fundamental para determinar la presencia de los alelos modificados. En el panel inferior, se muestra los ojos fluorescentes de las moscas recombinantes como producto del marcador DsRed.

Al confirmar las inserciones por secuenciación, se establecieron cepas estables con el reemplazo del QE de *D. virilis* en *D. melanogaster* ($vg^{QED^{vir}}$) y del reemplazo del QE de *D. melanogaster* en *D. melanogaster* ($vg^{QED^{mel}}$). Sorpresivamente, de la cepa $vg^{QED^{mel}}$ no logramos obtener individuos homocigotos, por lo que tuvimos que cruzar con una cepa silvestre para hacer el análisis de tamaños de alas y tibias correspondiente (**Figura 44**).

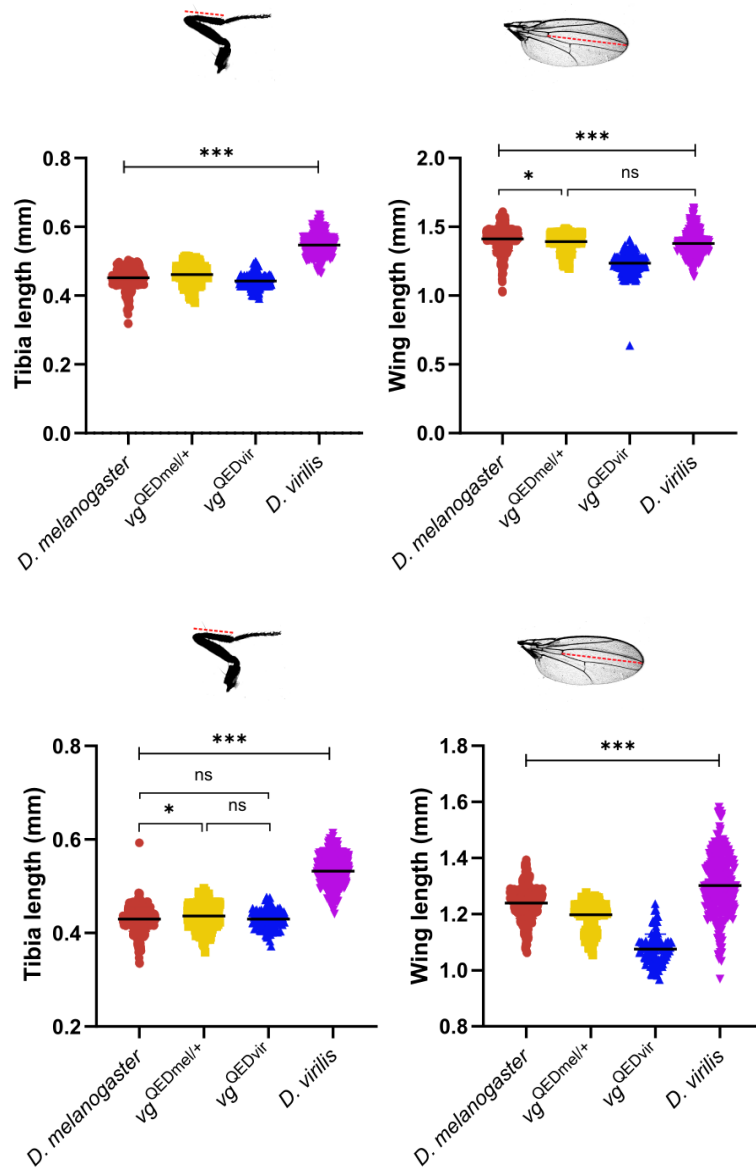


Figura 44. Medidas P/D: comparativa de medidas en las diferentes especies analizadas. Medidas tomadas en tibias anteriores de los animales y alas. Se muestran las longitudes ala-tibia de las medidas previamente descritas y su correspondiente análisis estadístico para hembras (panel superior) y machos (panel inferior). Se muestran los valores de la media. Análisis de ANOVA de una sola vía fue empleado y comparado de forma múltiple con la prueba de Tukey, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.02$, ns = no significativo ($p > 0.05$). *D. melanogaster* $n = 224$, *vg^{QEDmel}* $n = 120$, *vg^{QEDvir}* $n = 128$, *D. virilis* $n = 156$ (hembras), *D. melanogaster*, $n = 215$; *D. simulans*, $n = 112$; *D. ananassae*, $n = 195$; *D. virilis*, $n = 179$ (machos).

Posteriormente, al igual que se realizó para los animales WT, un análisis de medidas de alas y tibias de individual (Figura 45) fue desarrollado, donde se puede ver que hay una

reducción en el tamaño relativo de las alas en los individuos de *D. melanogaster* que contienen el vg^{QEDvir} , respecto a los individuos control de vg^{QEDmel} y *D. virilis*.

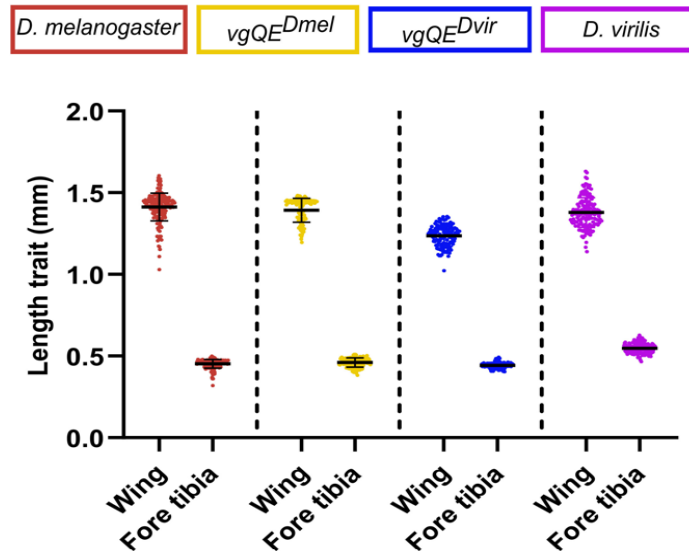


Figura 45. Medidas próximo-distales: comparativa II de medidas P/D en las diferentes especies analizadas. Medidas tomadas en tibias anteriores de los animales y alas. Se muestran las longitudes ala-tibia para las mutantes desarrolladas con CRISPR/Cas9-HDR.

Luego de esto, se procedió a realizar el análisis de alometría de las mutantes, usando el modelo II de regresión (SMA) (**Figura 46**), en el cual se observa una marcada reducción del tamaño relativo de las alas en individuos mutantes que contienen el *enhancer* de *D. virilis* (vg^{QEDvir}).

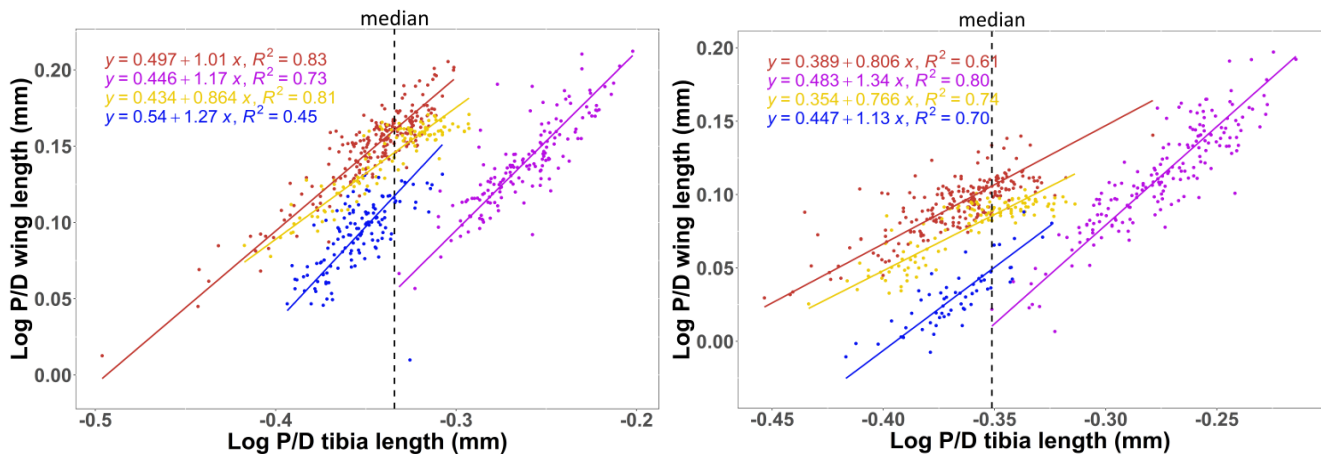


Figura 46. Relaciones de escala ala/tibia en reemplazos de CRISPR/Cas9 HDR. Líneas y puntos amarillos y azules corresponden a los reemplazos de HDR usando vg^{QEDmel} y vg^{QEDvir} respectivamente. Líneas y puntos rojos y púrpura muestran las relaciones alométricas en *D. melanogaster* y *D. virilis* animales WT, respectivamente. Hembras son representadas en la gráfica de la izquierda, y los machos, en la derecha.

Al igual que con los animales WT, el 95% para los intervalos de confianza fue calculado para la pendiente, el intercepto con un valor de 0 y el intercepto con el valor de la mediana para todos los datos (**Figura 47**). Nuestros análisis muestran que, en las relaciones de escala estáticas, los animales mutantes muestran una reducción en la longitud alar respecto a los controles vg^{QEDmel} , este efecto es igualmente visible al comparar las relaciones de escala de los individuos mutantes, con las especies de *Drosophila* evaluadas en el presente estudio (**Figura 48**). Estos resultados sugieren que este elemento *cis*-regulatorio tiene el potencial de modular las relaciones de escala en *Drosophila*.

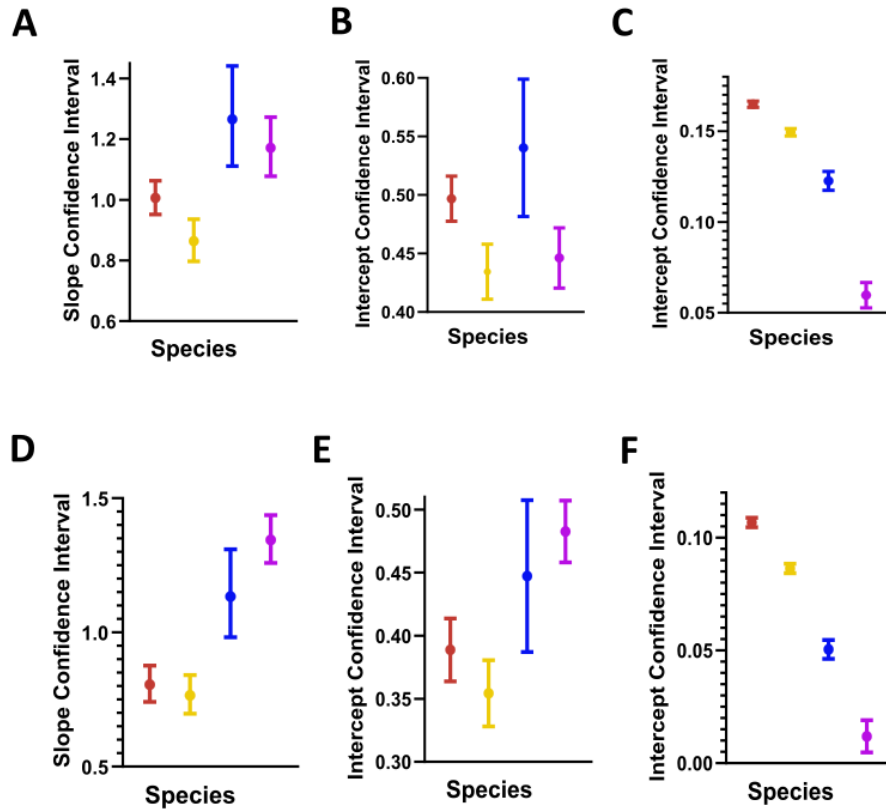


Figura 47. Intervalo de confianza de la pendiente e intercepto en hembras y machos de los mutantes de CRISPR/Cas9-HDR. Barras de error que representan el 95% de los intervalos de confianza para las especies WT y las mutantes de CRISPR (A-C) Intervalos de confianza en hembras, (A) para la pendiente, (B) para el intercepto en un valor arbitrario definido en 0, (C) para el intercepto en un valor arbitrario definido en la mediana de todos los valores en conjunto de las especies evaluadas. (D-F) Intervalos de confianza en machos, (D) para la pendiente, (E) para el intercepto en un valor arbitrario definido en 0, (F) para el intercepto en un valor arbitrario definido en la mediana de todos los valores en conjunto de las especies evaluadas.

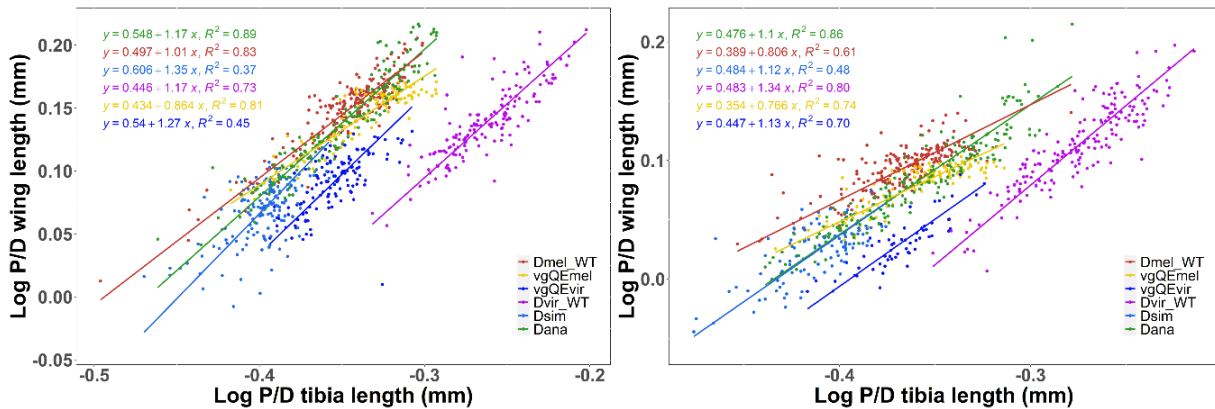


Figura 48. Comparativa de las relaciones de escala ala/tibia en reemplazos de CRISPR/Cas9 HDR y en las especies de *Drosophila* usadas en este estudio. Esta imagen muestra la evidente influencia del reemplazo de la mutante de *vg*^{QEDvir} respecto a las demás especies evaluadas. Hembras son representadas en la gráfica de la izquierda, y los machos, en la derecha.

8. DISCUSIÓN

La evolución de las formas de los seres vivos depende de los procesos de desarrollo de estructuras específicas, por lo que el estudio de los mecanismos moleculares que establecen estos procesos de desarrollo son una ventana al estudio de la diversidad morfológica en los organismos. Uno de los ejemplos más fascinantes de diversidad de estructuras homólogas es el de las alas en los insectos. Para abordar este problema general es necesario definir modelos experimentales que nos permitan manipular genes específicos y evaluar cuantitativamente los fenotipos resultantes.

La identificación de genes, secuencias y su interacción para la formación de estructuras alares, han sido ampliamente abordados en *D. melanogaster*. Gracias a estudios previos en este modelo experimental, se conocen los mecanismos que influyen en el desarrollo del ala, incluyendo la identificación del gen selector de ala *vg* y su regulación transcripcional (MacKay et al., 2003; Muñoz-Nava et al., 2020; Williams et al., 1991; Zecca & Struhl, 2007b). En esta tesis evalué por medio de métodos moleculares, de alometría y mediante la edición

genética a través de CRISPR/Cas9, si la evolución de la secuencia regulatoria de *vg* es responsable de los cambios de tamaño relativo de las alas en cuatro especies de *Drosophila*.

Para determinar la variación relativa de las formas alares, se buscó una medida de referencia del cuerpo del animal que pudiera ser empleada como representante de la medida total del cuerpo. La elección de esta referencia no es única, pero en este estudio, se seleccionó la tibia del primer par de patas de la mosca adulta con base en los siguientes argumentos. Primero, estudios previos de alometrías estáticas usando la tibia o el fémur han sido previamente utilizadas (Shingleton et al., 2017; Zhou et al., 2016) y escalan con otras partes del cuerpo en dípteros (Krause et al., 2019; Reigada & Godoy, 2005; Rohner et al., 2018; Tran et al., 2020) y otros insectos como avispas parasitoides (Sagarra et al., 2001; Thorne et al., 2006). Segundo, la medida de la tibia se obtiene fácilmente; las patas son fáciles de disectar, montar y no tienen el inconveniente de que su medida depende de un ángulo de visualización, como es el caso del tórax; además, la medida P/D de las tibias es directamente comparable con la medida del eje P/D en las alas. Tercero, *vg* no se expresa en el disco de la pata, y la sub-expresión de *Vg* en el disco alar no tiene ningún efecto en el tamaño de las tibias (**Figuras 20 y 21**).

Al analizar comparativamente las medidas de alas y tibias, además de los cocientes vs. *D. melanogaster*, (**Figuras 25 y 26**) se ve una clara diferencia entre los tamaños de las tibias y el tórax, siendo las más grandes (para hembras y machos) en *D. virilis*. Sin embargo, aunque *D. virilis* es la especie con individuos más grandes, la proporcionalidad de crecimiento de las alas respecto a su tamaño corporal es evidentemente reducido. Esto se puede ver ya que no hay una diferencia significativa en el tamaño alar de dicha especie, respecto a *D. ananassae* (ver **Figura 25**, caso de las hembras). Posterior a esto, el análisis de alometrías estáticas fue desarrollado con la finalidad de revelar como los apéndices crecen para generar la diversidad característica de cada especie. Los resultados de este análisis muestran como *D. virilis* presenta una proporcionalidad de crecimiento diferente a las otras especies analizadas. De acuerdo con la disposición de los tipos de crecimiento y relaciones de escala, se evidencia que *D. melanogaster*, *D. simulans* y *D. ananassae* mantienen una tendencia similar de crecimiento mostradas por las alometrías individuales (Shingleton, 2010), donde las alas tienen un tamaño similar respecto al resto del cuerpo, como se puede ver incluso en las fotografías de los individuos, las alas sobresalen más allá de la extensión total del abdomen (**Figura 26**), lo cual no ocurre con *D. virilis*. En efecto, las

relaciones de escala mostradas en machos y hembras de *D. virilis*, con un evidente desplazamiento hacia la derecha de las gráficas, sugiere que los individuos de *D. virilis* son es mucho más grandes comparado con las otras especies (**Figuras 18, 25, 26**).

Algunos estudios revelan la influencia de factores ambientales como la temperatura, el fondo genético, la nutrición y el nivel de oxígeno que permite que se desencadene un fenómeno de plasticidad al que se encuentra expuesto (Shingleton et al., 2009). De esta forma, posiblemente la variación en los tipos de crecimiento en las diferentes especies viene dada por la influencia de la temperatura (25° C) a la cual crecieron durante su desarrollo, de tal manera que se puede sugerir que las especies de una distancia filogenética cercana puede tener las mismas características de plasticidad respecto a las más distantes, como lo refleja el caso de los machos de las especies evaluadas. Además de lo anterior, dicha plasticidad mantiene las características morfológicas de crecimiento en machos y hembras para determinar diferencias dependientes del sexo o dimorfismos sexuales. Los dimorfismos sexuales en insectos y en otros grupos de animales son esenciales evolutivamente para la diferenciación de machos y hembras, donde generalmente las hembras tienen tamaños y características corporales que sobresalen y son de gran proporción y tamaño, comparado con los machos, lo cual les favorece en sus estrategias de apareamiento, comportamiento, ecología y evolución (Mesnick & Ralls, 2018). Este dimorfismo sexual se mantiene en las especies de *Drosophila* analizadas (**Figura 24**).

Por lo anterior, en este trabajo nos enfocamos principalmente en estudiar los cambios relativos de tamaño alar entre *D. melanogaster* y *D. virilis*. Dado que *vg* es un gen selector conservado evolutivamente en insectos (Abouheif & Wray, 2002; C. Clark-Hachtel et al., 2021; C. M. Clark-Hachtel et al., 2013), estos cambios pudieron evolucionar a nivel de las redes de regulación genética donde participa *vg*, a nivel de cambios en la proteína producto de *Vg* o en la secuencia de regulación transcripcional de *vg*. Dado que el *vg^{QE}* integra muchos de estos factores, decidimos evaluar si la evolución de esta secuencia podría ser la responsable de cambios relativos en el tamaño alar entre estas especies.

La búsqueda del *vg^{QE}* en otras especies permitió evaluar la sintenia de cada uno de los genes y por tanto localizar el intrón blanco para la búsqueda de la localización de la secuencia. De acuerdo con esto se sugiere que la ubicación del *enhancer* se ha mantenido en las diferentes especies del género *Drosophila*, de acuerdo con la secuencia del *vg^{QE}* de referencia de la cepa Samarkand que fue utilizada para este estudio. Sin embargo, la secuencia ha variado de forma considerable en las especies evaluadas, de acuerdo con los

alineamientos realizados y a los valores en los porcentajes de similitud de las secuencias (**Tabla 4, Figura 29**).

No obstante, pudimos identificar regiones que posiblemente son de importancia para la transcripción del gen *vg*, debido a su mantenimiento y conservación en especies filogenéticamente distantes, como el caso del motivo de interacción del factor de transcripción *Scalloped* SID (TGGAATGT) al ADN. A saber, la importancia de este motivo radica en su rol relevante al ser el motivo al que se une *Scalloped* al actuar en forma de complejo interactuando con Vg (Halder et al., 1998). Al evaluar el cuarto intrón en cada una de las especies, se identificó la presencia de dos motivos de interacción muy bien conservados (**Figura 30**), uno de ellos localizado en la secuencia reportada del QE (Klein & Arias, 1999; Williams et al., 1994) y otro localizado 544 pares de bases río arriba de la secuencia de inicio del QE. De forma interesante, se identificó un motivo adicional presente exclusivamente en la secuencia del QE de *D. ananassae* (**Figura 30**), lo cual posiblemente influye sobre los efectos de la formación de las alas y sobre las relaciones de escala en esta especie.

Además, la región intrónica de la secuencia del vg^{QE} se conserva en las especies evaluadas, donde existe un motivo SID ampliamente conservado donde el complejo Vg-Sd (**Figura 31**) se puede unir (aunque no se demostró en esta tesis que dicha unión ocurre) y esta unión determina la adecuada auto-regulación del gen *vg* y por tanto la formación apropiada del ala, no solo en el grupo de los Drosophilidos, sino también en grupos de animales como los coleópteros (C. M. Clark-Hachtel et al., 2013; Ohde et al., 2009). Sin embargo, es posible que existan otros motivos de unión en la secuencia regulatoria que podrían ser necesarios para el establecimiento del fenómeno estudiado, lo cual sería necesario analizar con mayor detalle en investigaciones futuras.

Para evaluar la importancia del vg^{QE} se utilizó el sistema Non Homologous End Joining (NHEJ) de CRISPR/Cas9 para eliminar la secuencia reportada del QE ($vg\Delta QE$), junto con el motivo de interacción con Sd localizado 544 pares de bases río arriba del QE ($vg\Delta QE+SID$), además de una delección control del experimento ($vg\Delta CTRL$) (**Figura 33**); Sorpresivamente estas eliminaciones permitieron evidenciar que ninguna de estas afectaciones inhiben el patrón característico de la proteína Vg en los discos imagales alares (cubriendo toda la bolsa o *pouch*), o la morfología del ala adulta de *D. melanogaster* (**Figura 37**). Una probable explicación de este resultado es la presencia de otros elementos regulatorios que podrían compensar y asegurar que estos animales desarrollen alas

completamente funcionales, que mantienen sus características fenotípicas como respuesta a las mutaciones genotípicas inducidas sobre la secuencia regulatoria del QE. Esto apoya la existencia de los conocidos “*Shadow Enhancers*” o elementos cis-regulatorios que establecen una funcionalidad complementaria de expresión génica para conferir patrones de expresión génicos robustos en condiciones de perturbación génica o ambiental (Hong et al., 2008; Kvon et al., 2021). Por consiguiente, se sugiere entonces la existencia de *Shadow Enhancers* en el genoma de *Drosophila* que rescatan el patrón de Vg en ausencia del QE. Estos *Shadow enhancers*, podrían estar respondiendo a las mismas vías de señalización, debido a que el patrón de Vg no puede expandirse sin estas señales específicas (Zecca & Struhl, 2007a). La anterior explicación, es altamente viable, ya que se ha reportado la presencia de *Shadow Enhancers*, su control y la dinámica de acción sobre la eliminación del gen *short gastrulation (sog)* durante el proceso embrionario de *D. melanogaster* (Whitney et al., 2022), lo cual abre la posibilidad de acción de dichos potenciadores en otros procesos de desarrollo de este organismo.

La única diferencia reportada en individuos con la delección *vgΔQE+SID* fue una reducción estadísticamente significativa de las alas (**Figura 38**), respecto a las otras líneas deletadas evaluadas. Sin embargo, esta reducción no es específica de las alas, ya que, al analizar la longitud de las tibias anteriores, muestran ser significativamente más pequeñas en la delección *vgΔQE+SID*, especialmente en machos (**Figura 39**). No obstante, al normalizar el tamaño del ala a la longitud de su tibia correspondiente, la diferencia únicamente persiste en hembras, sugiriendo así que los machos tienen una reducción proporcional de todas las partes de su cuerpo (**Figura 40**). Estos datos podrían estar proponiendo un gran impacto de los SIDs, además de otros sitios de unión a factores de transcripción en el *enhancer* en el establecimiento del tamaño animal.

Una explicación a esto es la influencia de los motivos SID en la interacción previamente reportada de *Sd* con *Yorkie (Yki)*, la cual es bien conocida para promover el crecimiento celular y proliferación en una gran cantidad de sistemas (Goulev et al., 2008; Hariharan, 2015; Wu et al., 2008). Alternativamente, la eliminación *vgΔQE+SID* afecta el tamaño en una manera específica del ala, donde una coordinación inter-órgano se establece a través de señales de tipo sistémico (Boulan et al., 2019; Colombani et al., 2012; Mesquita et al., 2010).

Finalmente, es importante resaltar que debido a que el gen de *Sd* se localiza en el primer cromosoma (X), es probable que machos y hembras respondan de una manera diferente a

las eliminaciones de los motivos de interacción con *Sd* inducidas con las eliminaciones del presente estudio.

Esta tesis demuestra el impacto de herramientas de edición genética como CRISPR/Cas9 para el entendimiento de la contribución de elementos regulatorios en la diversidad de formas y tamaños (Linz & Tomoyasu, 2018; Medved et al., 2015).

Por medio de los reemplazos usando la técnica de CRISPR/Cas9 HDR, se evidenciaron los cambios en el tamaño alar (**Figura 44**) bajo la influencia del QE de *D. virilis* ($vg^{QE_{Dvir}}$) y el cambio evidente en las alometrías de estos mismos individuos (**Figura 46 y Figura 47**). Una pregunta importante que surge a partir de este resultado es ¿cómo el reemplazo de un elemento *cis*-regulatorio afecta la habilidad de un órgano para ajustarse respecto al tamaño de otro órgano de referencia en el animal? Probablemente, bajo las condiciones experimentales evaluadas, el $vg^{QE_{Dvir}}$ ajusta su respuesta a *Decaplegic* (*Dpp*) and *Wingless* (*Wg*), morfógenos que afectan directamente el desarrollo del ala en *D. melanogaster* (Parker & Struhl, 2020). El crecimiento reducido de las alas en las mutantes de $vg^{QE_{Dvir}}$ puede estar dado por una determinación diferente o por el establecimiento de un patrón de distribución de los morfógenos en *D. virilis*, que de acuerdo con su distancia filogenética relativa a *D. melanogaster*, puede tener una expansión menor. Como consecuencia, la capacidad de *vg* y de las células que serán inducidas a expresar *vg* a través del proceso autorregulatorio y del reclutamiento celular a través del vg^{QE} es diferente. Estudios futuros en la dinámica de morfógenos y sus mecanismos que gobiernan el desarrollo del ala en *D. virilis* son necesarios para determinar los mecanismos evolutivos que determinan la diversidad en las especies de *Drosophila*.

Se propone que en la secuencia del vg^{QE} existan componentes adicionales o sitios de unión a factores de transcripción no reportados que puedan estar regulando las funciones en el establecimiento de las relaciones de escala. Esto debido a la descripción muy bien documentada de elementos que son esenciales para la regulación del gen de *vg*, como lo son los motivos de interacción con *Sd* (factor que interactúa con el ADN, para activar la transcripción del gen) SID por medio de la secuencia consenso TGG AATGT (Halder et al., 1998; Klein & Arias, 1999; Simmonds et al., 1998), que, de acuerdo a los análisis bioinformáticos realizados, se encuentran muy bien conservados en las secuencias del QE de *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. ananassae* y *D. virilis*. Debido a esta conservación, se sugiere que, en estas especies, el rol de *Sd* en la formación de un complejo con *Vg* es un mecanismo conservado para inducir la transcripción y la auto-regulación de *vg* en el género

Drosophila. Además de este motivo, se han descrito sitios adicionales que al igual que SID, se localizan dentro de la secuencia reportada del QE e influyen en la transcripción del gen de *vg*, como MAD (Mothers Against Dpp) que tiene una región N-terminal que interactúa con la secuencia del QE a través de la secuencia consenso GCCGnCGC, con un rol esencial en la expresión de Vg en la bolsa del disco y en la formación del ala. La mutación de esta secuencia consenso y la inhibición entre MAD y el QE, produce animales con alas reducidas en tamaño (Certel et al., 2000; Kim et al., 1997).

De acuerdo con otros reportes, en *D. virilis* el sitio de unión de MAD se encuentra presente en la secuencia regulatoria del gen *dad*, actuando como un elemento para inducir la actividad de Dpp en tejidos embrionarios (Weiss et al., 2010). Basados en estos reportes, sugerimos que *D. virilis* puede tener mecanismos similares de regulación de *vg* determinados por la interacción de MAD con el QE, pero estudios posteriores son necesarios para confirmar o refutar esta hipótesis.

Otro aspecto muy importante sobre la regulación de *vg* en *D. melanogaster*, es la participación de Wg y Dpp en el proceso de la actividad transcripcional del QE, donde ambos tienen roles positivos en la transcripción del gen (Parker & Struhl, 2020). Estudios previos en ambos genes muestran que en *D. melanogaster* y en *D. virilis* Dpp tiene un rol positivo y Wg un rol negativo en la regulación del *enhancer bap* (que es evolutivamente conservado en estas especies) para promover la inducción del mesodermo visceral (Lee & Frasch, 2005). En adición a estos componentes, el factor de transcripción DFR (*Drosophila* Drifter) y su motivo POU ha sido descrito en *D. virilis* y en *D. melanogaster*, que se une a un sitio adyacente a la secuencia consenso de MAD que es esencial para la actividad transcripcional del QE en la bolsa del disco, a través de un complejo MAD y DFR (Certel et al., 2000).

Este sitio MAD tiene un rol adicional como competidor con *brinker* (*brk*), donde este último actúa como represor de la actividad transcripcional del QE, estableciendo así la regulación de la transcripción de *vg* (Kirkpatrick et al., 2001). La conservación de algunos de estos mecanismos regulatorios de los *enhancers* en otros genes, y debido al tiempo de divergencia entre estas especies, sugieren que en *D. virilis*, muchos de estos mecanismos pueden llegar a conservarse.

Estos componentes descritos, se han encontrado en la última parte del alineamiento del QE entre las especies en las regiones mejor conservadas. Sin embargo, la secuencia inicial y

su participación en la regulación del gen de *vg* no han sido descritas, además de su baja conservación de esta entre las diferentes especies. Es posible que factores de transcripción específicos de *D. virilis* puedan estar interactuando con la secuencia inicial del QE y desarrollar un efecto en el establecimiento de las alometrías.

Finalmente, es muy relevante destacar que la presencia del vg^{QE} , también se ha descrito en el cuarto intrón de *Apis mellifera* (el último ancestro común de *Apis mellifera* y *D. melanogaster* es de hace 300 millones de años), muestra un patrón de expresión similar en los discos imagales alares, donde la expresión se limita al borde D/V y al borde A/P (Prasad et al., 2016). De acuerdo con esto, la conservación evolutiva del vg^{QE} en grupos distantes de animales requiere un análisis funcional para identificar sitios adicionales o factores de transcripción usando herramientas como CRISPR/Cas9, ChIP-seq, o STARR-Seq, para determinar la funcionalidad de regiones específicas en el establecimiento de las alometrías o para identificar funciones de *enhancer* en las secuencias del ADN.

A manera de conclusión, el estudio de la regulación transcripcional ha sido de gran interés evolutivo, debido a su capacidad de ser modificados a través de mecanismos moleculares como transposones, mutaciones en secuencias no funcionales o la evolución de *enhancers de novo*, además de su capacidad de adquirir nuevas funciones y establecer cambios morfológicos y fenotípicos en diversos grupos de organismos (Rebeiz & Tsiantis, 2017). Los organismos en la naturaleza, sus formas y los tamaños de sus estructuras se ajustan a un crecimiento proporcional o no-proporcional. Muchos insectos han sido buenos modelos de estudio para el análisis de relaciones de escala no proporcionales o alométricos, elucidando genes candidatos o condiciones ambientales que desencadenan dicho crecimiento desproporcionado. En este trabajo, usando a *Drosophila* como modelo, se evaluó la presencia y conservación del vg^{QE} y su influencia en el establecimiento de las relaciones de escala o alometrías. Sorpresivamente, las relaciones de escala en la especie más distante evaluada (*D. virilis*) presenta alas más pequeñas respecto al tamaño de su cuerpo, comparado con las otras especies evaluadas.

La evaluación de la región regulatoria de *vg*, a través de CRISPR/Cas9 – HDR reemplazando la secuencia del QE de *D. virilis* en *D. melanogaster*, permitió dilucidar un posible rol evolutivo en el establecimiento de las relaciones de escala en *Drosophila* sentando las bases para utilizar este tipo de herramientas en otros estudios de diversidad morfológica.

9. RESUMEN DE RESULTADOS

- ∴ Se obtuvieron las relaciones de escala de machos y hembras de las especies analizadas obteniendo diferentes tipos de crecimiento alométrico, destacando las diferencias marcadas por la distancia filogenética en *D. virilis*.
- ∴ Se identificó la región de localización del *Quadrant Enhancer* (vg^{QE}) en las especies analizadas, siendo esta la región del intrón 4 del gen *vg*.
- ∴ Se obtuvo la secuencia de la región regulatoria del vg^{QE} para las cuatro especies de *Drosophila* analizadas.
- ∴ Se identificó la conservación de los motivos de interacción con Sd (SID), en la secuencia del vg^{QE} y en la secuencia intrónica del gen de *vg*, donde se identificaron 2 (*D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. virilis*) o 3 (*D. ananassae*) sitios de unión a Sd.
- ∴ Se realizaron los reemplazos de las secuencias del vg^{QE} de *D. melanogaster* y *D. virilis* en *D. melanogaster*, con lo cual se pudo hipotetizar que existe un componente y/o mecanismo propio de la secuencia del QE de *D. virilis* y que genera un cambio en las alometrías de *D. melanogaster*.

10. CONCLUSIÓN

En la naturaleza, la forma de los organismos y el tamaño de sus estructuras, se ajustan a un tipo de crecimiento proporcional o no proporcional. Muchos insectos han sido muy buenos modelos de estudio para analizar el crecimiento no proporcional o alométrico, elucidando genes candidatos o condiciones ambientales que desencadenan un crecimiento no-proporcional. En este trabajo, usando especies de *Drosophila* (*Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans*, *Drosophila ananassae* y *Drosophila virilis*) como modelo de estudio, se evaluaron las relaciones de escala de ala/tibia para cada una, donde se encontró de forma inesperada, que las relaciones de escala en la especie más distante (*D. virilis*) presentaba un tamaño alar más pequeño, relativo al tamaño de su cuerpo, comparado con las otras especies. Por lo anterior, se evaluó una región *cis*-regulatoria del gen selector, *vestigial* utilizando la herramienta de edición genómica CRISPR/Cas9-HDR para reemplazar la región regulatoria de dicho gen de *D.*

virilis en el genoma de *D. melanogaster*. Este análisis permitió concluir que existe una posible evolución de los procesos de establecimiento de las relaciones de escala en *Drosophila* mediada por elementos *cis*-regulatorios.

11. PERSPECTIVAS

1. Realizar los experimentos de alometría y relaciones de escala en condiciones ambientales variables para determinar si existe un cambio en el coeficiente alométrico y por tanto determinar si la respuesta de plasticidad cambia.
2. Usar herramientas bioinformáticas especializadas basadas en principios estadísticos para la búsqueda de posibles sitios de unión a factores de transcripción del QE.
3. Evaluar experimentalmente la participación de posibles *Shadow enhancers* y como rescatan la funcionalidad del gen de *vg*.
4. Evaluar experimentalmente la alometría en *D. virilis* haciendo reemplazos con *enhancers* de otras especies, para confirmar que la información y el mecanismo de establecimiento de alometría se encuentra en esta secuencia regulatoria.
5. Evaluar qué componentes o por medio de qué mecanismo actúa el *vg*^{QE} de *D. virilis* para establecer la alometría.
6. Evaluar la dinámica de los morfógenos y sus mecanismos necesarios para el desarrollo de las alas en *D. virilis*.
7. Medir la expresión de *vg* (ARNm y proteínas) en las mutantes con la delección del QE para entender mejor el cambio de regulación en ausencia del *enhancer*.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abouheif, E., & Wray, G. A. (2002). Evolution of the gene network underlying wing polyphenism in ants. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5579), 249–252.
<https://doi.org/10.1126/science.1071468>
- Addgene. (2018). *How to Design a Primer*.
<https://www.addgene.org/protocols/primer-design/>
- Aldaz, S., Escudero, L. M., & Freeman, M. (2010). Live imaging of *Drosophila* imaginal disc development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14217–14222. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008623107>
- Allocca, M., Zola, S., & Bellosta, P. (2018). The Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*: The Making of a Model (Part I). In *Drosophila melanogaster - Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics*. InTech.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.72832>
- Aranda, P. S., LaJoie, D. M., & Jorcyk, C. L. (2012). Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *ELECTROPHORESIS*, 33(2), 366–369.
<https://doi.org/10.1002/elps.201100335>
- Beira, J. V., & Paro, R. (2016). The legacy of *Drosophila* imaginal discs. *Chromosoma*, 125(4), 573–592. <https://doi.org/10.1007/s00412-016-0595-4>
- Bernard, F., Lalouette, A., Gullaud, M., Jeantet, A. Y., Cossard, R., Zider, A., Ferveur, J. F., & Silber, J. (2003). Control of apterous by vestigial drives indirect flight muscle development in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 260(2), 391–403. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00255-0](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00255-0)
- Boulan, L., Andersen, D., Colombani, J., Boone, E., & Léopold, P. (2019). Inter-Organ Growth Coordination Is Mediated by the Xrp1-Dilp8 Axis in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 49(5), 811-818.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.03.016>

- Boulan, L., Milán, M., & Léopold, P. (2015). The Systemic Control of Growth. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, a019117.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019117>
- Brody, T. . (1996). *Vestigial gene*. The Interactive Fly ©.
<https://www.sdbonline.org/sites/fly/newgene/vestigl1.htm>
- Buccitelli, C., & Selbach, M. (2020). mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nature Reviews. Genetics*, 21(10), 630–644.
<https://doi.org/10.1038/s41576-020-0258-4>
- Butler, J. M. (2012). DNA Extraction Methods. In *Advanced Topics in Forensic DNA Typing* (pp. 29–47). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374513-2.00002-6>
- Carroll, S. B. (2005). *Endless Forms Most Beautiful: The New Science of Evo Devo and the Making of the Animal Kingdom*.
- Certel, K., Hudson, A., Carroll, S. B., & Johnson, W. A. (2000). Restricted patterning of vestigial expression in *Drosophila* wing imaginal discs requires synergistic activation by both Mad and the drifter POU domain transcription factor. *Development (Cambridge, England)*, 127(14), 3173–3183.
<https://doi.org/10.1242/dev.127.14.3173>
- Cheatle Jarvela, A. M., & Pick, L. (2016). *Evo-Devo: Discovery of Diverse Mechanisms Regulating Development* (pp. 253–274).
<https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.11.014>
- Clark-Hachtel, C., Fernandez-Nicolas, A., Belles, X., & Tomoyasu, Y. (2021). Tergal and pleural wing-related tissues in the German cockroach and their implication to the evolutionary origin of insect wings. *Evolution & Development*, 23(2), 100–116. <https://doi.org/10.1111/ede.12372>
- Clark-Hachtel, C. M., Linz, D. M., & Tomoyasu, Y. (2013). Insights into insect wing origin provided by functional analysis of vestigial in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America, 110(42), 16951–16956.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1304332110>

Colombani, J., Andersen, D. S., & Léopold, P. (2012). Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science (New York, N. Y.)*, 336(6081), 582–585.

<https://doi.org/10.1126/science.1216689>

Darwin, C., & Wallace, A. (1858). On the Tendency of Species to form Varieties; and on the Perpetuation of Varieties and Species by Natural Means of Selection. *Journal of the Proceedings of the Linnean Society of London. Zoology*, 3(9), 45–62. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1858.tb02500.x>

Deng, H., Bell, J. B., & Simmonds, A. J. (2010). Vestigial Is Required during Late-Stage Muscle Differentiation in *Drosophila melanogaster* Embryos. *Molecular Biology of the Cell*, 21(19), 3304–3316. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-04-0364>

Deng, H., Hughes, S. C., Bell, J. B., & Simmonds, A. J. (2009). Alternative Requirements for Vestigial, Scalloped, and Dmef2 during Muscle Differentiation in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology of the Cell*, 20(1), 256–269. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-03-0288>

Evans, T. A. (2017). CRISPR-based gene replacement reveals evolutionarily conserved axon guidance functions of *Drosophila* Robo3 and *Tribolium* Robo2/3. *EvoDevo*, 8, 10. <https://doi.org/10.1186/s13227-017-0073-y>

Fernández-Moreno, M. A., Farr, C. L., Kaguni, L. S., & Garesse, R. (2007). *Drosophila melanogaster* as a Model System to Study Mitochondrial Biology (pp. 33–49). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3_3

Gayon, J. (2000). History of the Concept of Allometry. *American Zoologist*, 40(5), 748–758. <https://doi.org/10.1093/icb/40.5.748>

Gilbert, S. F., & Barresi, M. J. . (2016). Development and Evolution: Developmental Mechanisms of Evolutionary Change. In *Developmental Biology* (Eleventh E,

pp. 785–810). Sinauer Associates, Inc. All rights reserved.

- Goulev, Y., Fauny, J. D., Gonzalez-Marti, B., Flagiello, D., Silber, J., & Zider, A. (2008). SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *Drosophila*. *Current Biology : CB*, *18*(6), 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.02.034>
- Gratz, S. J., Rubinstein, C. D., Harrison, M. M., Wildonger, J., & O'Connor-Giles, K. M. (2015). CRISPR-Cas9 Genome Editing in *Drosophila*. *Current Protocols in Molecular Biology*, *111*(1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3102s111>
- Gurdon, J. B., & Bourillot, P.-Y. (2001). Morphogen gradient interpretation. *Nature*, *413*(6858), 797–803. <https://doi.org/10.1038/35101500>
- Halder, G., & Carroll, S. B. (2001). Binding of the Vestigial co-factor switches the DNA-target selectivity of the Scalloped selector protein. *Development*, *128*(17), 3295–3305. <https://doi.org/10.1242/dev.128.17.3295>
- Halder, G., Polaczyk, P., Kraus, M. E., Hudson, A., Kim, J., Laughon, A., & Carroll, S. (1998). The Vestigial and Scalloped proteins act together to directly regulate wing-specific gene expression in *Drosophila*. *Genes & Development*, *12*(24), 3900–3909. <https://doi.org/10.1101/gad.12.24.3900>
- Hall, B. K. (2003). Evo-Devo: evolutionary developmental mechanisms. *The International Journal of Developmental Biology*, *47*(7–8), 491–495. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14756324>
- Hariharan, I. K. (2015). Organ Size Control: Lessons from *Drosophila*. *Developmental Cell*, *34*(3), 255–265. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.07.012>
- Heckman, K. L., & Pease, L. R. (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols*, *2*(4), 924–932. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.132>
- Hendling, M., & Barišić, I. (2019). In-silico Design of DNA Oligonucleotides: Challenges and Approaches. *Computational and Structural Biotechnology*

Journal, 17, 1056–1065. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.07.008>

Herrera-Carrillo, E., Gao, Z., & Berkhout, B. (2020). CRISPR therapy towards an HIV cure. *Briefings in Functional Genomics*, 19(3), 201–208.

<https://doi.org/10.1093/bfgp/elz021>

Hong, J.-W., Hendrix, D. A., & Levine, M. S. (2008). Shadow enhancers as a source of evolutionary novelty. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5894), 1314.

<https://doi.org/10.1126/science.1160631>

Howard, L. J., Reichert, M. C., & Evans, T. A. (2021). The Slit-binding Ig1 domain is required for multiple axon guidance activities of *Drosophila* Robo2. *Genesis*, 59(9). <https://doi.org/10.1002/dvg.23443>

ITIS. (2022). *ITIS Integrated Taxonomic Information System*.

<https://doi.org/10.5066/F7KH0KBK>

Kim, J., Johnson, K., Chen, H. J., Carroll, S., & Laughon, A. (1997). *Drosophila* Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature*, 388(6639), 304–308. <https://doi.org/10.1038/40906>

Kim, J., Sebring, A., Esch, J. J., Kraus, M. E., Vorwerk, K., Magee, J., & Carroll, S. B. (1996). Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila* vestigial gene. *Nature*, 382(6587), 133–138.

<https://doi.org/10.1038/382133a0>

Kirkpatrick, H., Johnson, K., & Laughon, A. (2001). Repression of dpp targets by binding of brinker to mad sites. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 18216–18222. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101365200>

Klein, T., & Arias, A. M. (1999). The vestigial gene product provides a molecular context for the interpretation of signals during the development of the wing in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 126(5), 913–925.

<https://doi.org/10.1242/dev.126.5.913>

Krause, T., Spindler, L., Poeck, B., & Strauss, R. (2019). *Drosophila* Acquires a Long-Lasting Body-Size Memory from Visual Feedback. *Current Biology : CB*,

29(11), 1833-1841.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.037>

Kumar, N., Huizar, F. J., Farfán-Pira, K. J., Brodskiy, P. A., Soundarrajan, D. K., Nahmad, M., & Zartman, J. J. (2022). MAPPER: An Open-Source, High-Dimensional Image Analysis Pipeline Unmasks Differential Regulation of *Drosophila* Wing Features. *Frontiers in Genetics*, *13*, 869719.

<https://doi.org/10.3389/fgene.2022.869719>

Kvon, E. Z., Waymack, R., Gad, M., & Wunderlich, Z. (2021). Enhancer redundancy in development and disease. *Nature Reviews. Genetics*, *22*(5), 324–336. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00311-x>

Lee, H.-H., & Frasch, M. (2005). Nuclear integration of positive Dpp signals, antagonistic Wg inputs and mesodermal competence factors during *Drosophila* visceral mesoderm induction. *Development (Cambridge, England)*, *132*(6), 1429–1442. <https://doi.org/10.1242/dev.01687>

Linz, D. M., & Tomoyasu, Y. (2018). Dual evolutionary origin of insect wings supported by an investigation of the abdominal wing serial homologs in *Tribolium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(4), E658–E667.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1711128115>

MacKay, J. O., Soanes, K. H., Srivastava, A., Simmonds, A., Brook, W. J., & Bell, J. B. (2003). An in Vivo Analysis of the vestigial Gene in *Drosophila melanogaster* Defines the Domains Required for Vg Function. *Genetics*, *163*(4), 1365–1373. <https://doi.org/10.1093/genetics/163.4.1365>

Malila, Y., Srimarut, Y., U-chupaj, J., Strasburg, G., & Visessanguan, W. (2015). Monitoring of Chicken RNA Integrity as a Function of Prolonged Postmortem Duration. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *28*(11), 1649–1656. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0167>

Marsh, S., Hanson, B., Wood, M. J. A., Varela, M. A., & Roberts, T. C. (2020). Application of CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing for the Treatment of Myotonic Dystrophy Type 1. *Molecular Therapy*, *28*(12), 2527–2539.

<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.10.005>

- McKiernan, H. E., & Danielson, P. B. (2017). Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. In *Molecular Diagnostics* (pp. 371–394). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802971-8.00021-3>
- Medved, V., Marden, J. H., Fescemyer, H. W., Der, J. P., Liu, J., Mahfooz, N., & Popadić, A. (2015). Origin and diversification of wings: Insights from a neopteran insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(52), 15946–15951.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1509517112>
- Mesnick, S., & Ralls, K. (2018). Sexual Dimorphism. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 848–853). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804327-1.00226-0>
- Mesquita, D., Dekanty, A., & Milán, M. (2010). A dp53-dependent mechanism involved in coordinating tissue growth in *Drosophila*. *PLoS Biology*, *8*(12), e1000566. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000566>
- Mirth, C. K., Anthony Frankino, W., & Shingleton, A. W. (2016). Allometry and size control: what can studies of body size regulation teach us about the evolution of morphological scaling relationships? *Current Opinion in Insect Science*, *13*, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.02.010>
- Mirzoyan, Z., Sollazzo, M., Allocca, M., Valenza, A. M., Grifoni, D., & Bellosta, P. (2019). *Drosophila melanogaster*: A Model Organism to Study Cancer. *Frontiers in Genetics*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00051>
- Muñoz-Nava, L. M., Alvarez, H. A., Flores-Flores, M., Chara, O., & Nahmad, M. (2020). A dynamic cell recruitment process drives growth of the *Drosophila* wing by overscaling the vestigial expression pattern. *Developmental Biology*, *462*(2), 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.03.009>
- Nagel, A. C., Wech, I., & Preiss, A. (2001). scalloped and strawberry notch are target genes of Notch signaling in the context of wing margin formation in

Drosophila. Mechanisms of Development, 109(2), 241–251.

[https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00539-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00539-1)

Neto-Silva, R. M., Wells, B. S., & Johnston, L. A. (2009). Mechanisms of Growth and Homeostasis in the *Drosophila* Wing. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25(1), 197–220.

<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175242>

Nijhout, H. F., & McKenna, K. Z. (2019). Allometry, Scaling, and Ontogeny of Form—An Introduction to the Symposium. *Integrative and Comparative Biology*, 59(5), 1275–1280. <https://doi.org/10.1093/icb/icz143>

Nikhil, K. L., Ratna, K., & Sharma, V. K. (2016). Life-history traits of *Drosophila melanogaster* populations exhibiting early and late eclosion chronotypes. *BMC Evolutionary Biology*, 16(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0622-3>

Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J. (2000). T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment 1 Edited by J. Thornton. *Journal of Molecular Biology*, 302(1), 205–217.

<https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>

Ohde, T., Masumoto, M., Morita-Miwa, M., Matsuura, H., Yoshioka, H., Yaginuma, T., & Niimi, T. (2009). Vestigial and scalloped in the ladybird beetle: a conserved function in wing development and a novel function in pupal ecdysis. *Insect Molecular Biology*, 18(5), 571–581. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00898.x>

Paranjpe, D. A., Anitha, D., Chandrashekar, M. K., Joshi, A., & Sharma, V. K. (2005). Possible role of eclosion rhythm in mediating the effects of light-dark environments on pre-adult development in *Drosophila melanogaster*. *BMC Developmental Biology*, 5, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-5-5>

Parker, J., & Struhl, G. (2020). Control of *Drosophila* wing size by morphogen range and hormonal gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(50), 31935–31944.

<https://doi.org/10.1073/pnas.2018196117>

- Pimmett, V. L., Deng, H., Haskins, J. A., Mercier, R. J., LaPointe, P., & Simmonds, A. J. (2017). The activity of the *Drosophila* Vestigial protein is modified by Scalloped-dependent phosphorylation. *Developmental Biology*, *425*(1), 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.03.013>
- Pop-Bica, C., Nutu, A., Cojocneanu, R., Chira, S., & Berindan-Neagoe, I. (2022). The CRISPR/Cas9 Genome-editing System: Principles and Applications. In *CRISPR-/Cas9 Based Genome Editing for Treating Genetic Disorders and Diseases* (pp. 1–22).
- Port, F., Chen, H.-M., Lee, T., & Bullock, S. L. (2014). Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(29). <https://doi.org/10.1073/pnas.1405500111>
- Prasad, N., Tarikere, S., Khanale, D., Habib, F., & Shashidhara, L. S. (2016). A comparative genomic analysis of targets of Hox protein Ultrabithorax amongst distant insect species. *Scientific Reports*, *6*, 27885. <https://doi.org/10.1038/srep27885>
- Rajakumar, R., Koch, S., Couture, M., Favé, M.-J., Lillico-Ouachour, A., Chen, T., De Blasis, G., Rajakumar, A., Ouellette, D., & Abouheif, E. (2018). Social regulation of a rudimentary organ generates complex worker-caste systems in ants. *Nature*, *562*(7728), 574–577. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0613-1>
- Rebeiz, M., & Tsiantis, M. (2017). Enhancer evolution and the origins of morphological novelty. *Current Opinion in Genetics & Development*, *45*, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.04.006>
- Reigada, C., & Godoy, W. A. C. (2005). Seasonal fecundity and body size in *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). *Neotropical Entomology*, *34*(2). <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2005000200003>
- Rohner, P. T., Teder, T., Esperk, T., Lüpold, S., & Blanckenhorn, W. U. (2018). The evolution of male-biased sexual size dimorphism is associated with increased body size plasticity in males. *Functional Ecology*, *32*(2), 581–591.

<https://doi.org/10.1111/1365-2435.13004>

- Sagarra, L. A., Vincent, C., & Stewart, R. K. (2001). Body size as an indicator of parasitoid quality in male and female *Anagyrus kamali* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Bulletin of Entomological Research*, 91(5), 363–368.
<https://doi.org/10.1079/ber2001121>
- Sarkar, S. (2017). Haldane's The causes of evolution and the Modern Synthesis in evolutionary biology. *Journal of Genetics*, 96(5), 753–763.
<https://doi.org/10.1007/s12041-017-0840-5>
- Sauer, F., Rivera-Pomar, R., Hoch, M., & Jäckle, H. (1996). Gene regulation in the *Drosophila* embryo. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 351(1339), 579–587.
<https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0057>
- Shingleton, A. W. (2010). *Allometry: The Study of Biological Scaling*. Nature Education Knowledge.
<https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/allometry-the-study-of-biological-scaling-13228439/>
- Shingleton, A. W., Estep, C. M., Driscoll, M. V., & Dworkin, I. (2009). Many ways to be small: different environmental regulators of size generate distinct scaling relationships in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings. Biological Sciences*, 276(1667), 2625–2633. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1796>
- Shingleton, A. W., Masandika, J. R., Thorsen, L. S., Zhu, Y., & Mirth, C. K. (2017). The sex-specific effects of diet quality versus quantity on morphology in *Drosophila melanogaster*. *Royal Society Open Science*, 4(9), 170375.
<https://doi.org/10.1098/rsos.170375>
- Simmonds, A. J., Liu, X., Soanes, K. H., Krause, H. M., Irvine, K. D., & Bell, J. B. (1998). Molecular interactions between Vestigial and Scalloped promote wing formation in *Drosophila*. *Genes & Development*, 12(24), 3815–3820.
<https://doi.org/10.1101/gad.12.24.3815>

- Simon, E., Faucheux, C., Zider, A., Thézé, N., & Thiébaud, P. (2016). From vestigial to vestigial-like: the *Drosophila* gene that has taken wing. *Development Genes and Evolution*, 226(4), 297–315.
<https://doi.org/10.1007/s00427-016-0546-3>
- Swarup, S., & Verheyen, E. M. (2012). Wnt/Wingless Signaling in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), a007930–a007930.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007930>
- Takanaka, Y., & Courey, A. J. (2005). SUMO enhances Vestigial function during wing morphogenesis. *Mechanisms of Development*, 122(10), 1130–1137.
<https://doi.org/10.1016/j.mod.2005.05.004>
- Tanimoto, H., Itoh, S., ten Dijke, P., & Tabata, T. (2000). Hedgehog Creates a Gradient of DPP Activity in *Drosophila* Wing Imaginal Discs. *Molecular Cell*, 5(1), 59–71. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80403-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80403-7)
- Thorne, A. D., Pexton, J. J., Dytham, C., & Mayhew, P. J. (2006). Small body size in an insect shifts development, prior to adult eclosion, towards early reproduction. *Proceedings. Biological Sciences*, 273(1590), 1099–1103.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3416>
- Torres Cifuentes, D. M. (2020). *Caracterización biológica de la proteína tirosina fosfatasa de bajo peso molecular (EhLMW-PTP2) de Entamoeba histolyticay su participación en la patogenicidad.*
<https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/2617>
- Tran, A. K., Hutchison, W. D., & Asplen, M. K. (2020). Morphometric criteria to differentiate *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) seasonal morphs. *PloS One*, 15(2), e0228780. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228780>
- Weiss, A., Charbonnier, E., Ellertsdóttir, E., Tsirigos, A., Wolf, C., Schuh, R., Pyrowolakis, G., & Affolter, M. (2010). A conserved activation element in BMP signaling during *Drosophila* development. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(1), 69–76. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1715>

- Whitney, P. H., Shrestha, B., Xiong, J., Zhang, T., & Rushlow, C. A. (2022). Shadow enhancers modulate distinct transcriptional parameters that differentially effect downstream patterning events. *Development (Cambridge, England)*, 149(21). <https://doi.org/10.1242/dev.200940>
- Williams, J. A., Bell, J. B., & Carroll, S. B. (1991). Control of Drosophila wing and haltere development by the nuclear vestigial gene product. *Genes & Development*, 5(12B), 2481–2495. <https://doi.org/10.1101/gad.5.12b.2481>
- Williams, J. A., Paddock, S. W., Vorwerk, K., & Carroll, S. B. (1994). Organization of wing formation and induction of a wing-patterning gene at the dorsal/ventral compartment boundary. *Nature*, 368(6469), 299–305. <https://doi.org/10.1038/368299a0>
- Wu, S., Liu, Y., Zheng, Y., Dong, J., & Pan, D. (2008). The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Developmental Cell*, 14(3), 388–398. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.01.007>
- Xing, H.-L., Dong, L., Wang, Z.-P., Zhang, H.-Y., Han, C.-Y., Liu, B., Wang, X.-C., & Chen, Q.-J. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology*, 14(1), 327. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0327-y>
- Zecca, M., & Struhl, G. (2007a). Control of Drosophila wing growth by the vestigial quadrant enhancer. *Development (Cambridge, England)*, 134(16), 3011–3020. <https://doi.org/10.1242/dev.006445>
- Zecca, M., & Struhl, G. (2007b). Recruitment of cells into the Drosophila wing primordium by a feed-forward circuit of vestigial autoregulation. *Development (Cambridge, England)*, 134(16), 3001–3010. <https://doi.org/10.1242/dev.006411>
- Zhou, P., Yang, H., Jin, D. C., He, X. Z., & Wang, Q. (2016). Sex-Specific Allometry of Morphometric and Reproductive Traits in Oriental Fruit Flies (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 109(3), 1249–1253.

13. APÉNDICE

Paralelo al desarrollo del anterior proyecto, implementé una investigación orientada a saber más acerca de la dinámica de Vg durante el desarrollo larvario de *D. melanogaster*, en donde analicé, por medio de un curso temporal de desarrollo, el ARN mensajero, la proteína extraída de extractos larvarios, y además la proteína detectada por inmunofluorescencia; lo cual describo a más detalle, a continuación:

13.1. Materiales y métodos

13.1.1. Análisis de la expresión de *vg* durante el desarrollo larvario a nivel de ARN y proteína

13.1.1.1. Colecta de embriones de especies de *Drosophila*

Se realizaron colectas de embriones para obtener tiempos de desarrollo de 59, 84, 92, 100, 108 y 116 horas. El análisis molecular se realizó a partir de la selección de larvas de las especies *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. ananassae* y *D. virilis*, las cuales fueron obtenidas por medio de colección de embriones, en donde adultos jóvenes (machos y hembras) se colocaron en envases de plástico con pequeñas perforaciones y se cubrió con una tapa con agar y jugo de manzana durante 4 horas para que las hembras procedieran con la puesta de huevos. Posteriormente se tomó el agar con los respectivos embriones y estos continuaron su proceso de desarrollo en frascos con alimento y levadura hasta la hora de desarrollo correspondiente para el análisis molecular. Todas las larvas fueron disectadas por la mitad del cuerpo y la parte anterior fue invertida para facilitar la exposición de las estructuras imagales. Finalmente, a las larvas disectadas se les adicionó 800 µl de TRIzol.

13.1.1.2. Extracción de ADN

Las larvas de *Drosophila melanogaster* (partes anteriores previamente invertidas) se enfriaron en nitrógeno líquido por 2 min y se maceraron; el polvo fue transferido a un tubo cónico de 15 ml con 3 ml de amortiguador de lisis (200 mM Tris-HCl pH 8.5, 200 mM de NaCl, 0.5% de SDS, 25 mM EDTA y 1 mg/ml de Proteinasa K), seguidamente fue incubado a 65°C por 30 min. Después del calentamiento se dividió en tres alícuotas en tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron a 5,000 rpm por 5 min en centrífuga Eppendorf 5415C rotor 11 mm para descartar fragmentos celulares.

El sobrenadante libre de debris fue cuidadosamente aspirado y transferido a un nuevo tubo eppendorf y se mezcló con 500 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1). Se centrifugó a 8,000 rpm por 10 min en centrífuga Eppendorf 5415C rotor 11 mm y la fase acuosa se recuperó y se trató con 500 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1); se centrifugó nuevamente. La fase acuosa fue recuperada y se mezcló con 45 µl de acetato de amonio 5 M y 900 µl de Etanol frío y se incubó a -20°C durante 2 horas.

El ADN fue precipitado por centrifugación a 12,000 por 15 minutos a 4°C, se lavó con 500 µl de etanol al 70% y se dejó secar la pastilla durante 1 hora. El ADN fue re-suspendido en 25 µl de H₂O Mili Q y se trató con 50 µg de Rnasa T1 Gibco BRL a 37 °C por 30 min. Este ADN fue usado como templado para las reacciones de estandarización de la temperatura de hibridación de los iniciadores en las reacciones de PCR.

13.1.1.3. Extracción de ARN

El ARN total fue extraído a partir de larvas de *Drosophila melanogaster* y *Drosophila simulans* de 59, 84, 92, 100, 108 y 116 horas. Las partes anteriores de las larvas fueron centrifugadas por 10 min a 8000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5415C rotor 11 mm. El PBS sobrenadante fue eliminado y la pastilla de larvas fue re-suspendida cuidadosamente con 800-1000 µl de TRIzol (Invitrogen, Cat. # 15596-018). La mezcla fue transferida a tubos eppendorf de 1.5 ml, los cuales se incubaron durante 5 min y se les agregó 160 µl de mezcla cloroformo: isoamílico (25:1), se agitaron fuertemente en vórtex, y se dejaron en nitrógeno líquido por 2 min y se dejaron a 37°C hasta descongelar y fueron maceradas con puntas hasta pulverización. Se repitió el proceso de congelación 3 veces, luego los tubos se

dejaron a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 11,000 rpm en centrífuga Eppendorf 5415C rotor 11 mm por 15 min a 4°C y la fase superior acuosa (ARN) fue transferida a tubos nuevos a los cuales se les agregó 400 µl de isopropanol frío y se dejaron en reposo 10 min a temperatura ambiente. Se repitió la centrifugación a 11,000 rpm por 5 min a 4°C y el sobrenadante se descartó para adicionar 800 µl de etanol al 70% (en H₂O libre de ARNsas) a cada uno. Se centrifugó nuevamente a 9000 rpm por 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y la pastilla de ARN se dejó secar por 10 min. Finalmente, el gránulo se resuspendió en 50 µl de H₂O 0.1% v/v Dietil-pirocarbonato (DEPC), reactivo para inactivar las enzimas ARNsas y se incubó a 55-60 °C para inactivar ARNsas. El ARN fue tratado con DNAsa I libre de RNAsas (Invitrogen 18068-015) de ser necesario.

La integridad del ARN fue monitoreada en geles de agarosa al 2% en TAE libre de RNAsas (DEPC). Para garantizar los resultados a partir de ARN libre de ADN, éste fue analizado por PCR punto final y tratado según protocolo de DNAsa RQ1 (PROMEGA Cat. # M6101) de ser necesario. Finalmente, fue cuantificado en un espectrofotómetro BioSpectromer eppendorf AG 22331 previa lectura con blanco (Torres Cifuentes, 2020).

13.1.1.4. RT-PCR

Todas las reacciones de retro-transcripción (RT) se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl con 3.0 µg de ARN libre de ADN. Se usó el kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase #18064-014 Invitrogen, para lo cual se adicionó 0,5 µl de oligo dT a un tubo eppendorf de 600 µl con 1.5 µg de ARN total aislado con TRIzol y se completó a un volumen de 6 µl con agua-DEPC estéril. Se calentó a 70 °C por 10 min y se colocó en hielo rápidamente durante 2 min. Se adicionaron 2 µl de amortiguador de primera cadena 5X, 1 µl de 0.1 M DTT y 0,5 µl de mezcla de dNTPs (10 mM). Se incubó 2 min a 42 °C y se adicionaron 0,5 µl de enzima SuperScript II para un volumen final de 10 µl, la mezcla fue incubada a 42 °C por 50 min. Finalmente, la enzima se inactivó a 70 °C por 15 min y 1 µl del cADN obtenido se usó como molde para las reacciones de PCR para la amplificación del CDS de Tubulina-α (35 ciclos, 94°C/30'', 64 °C/45'', 72 °C/1'20'') y del exón 2 de vestigial (35 ciclos, 94°C/30'', 59 °C/30'', 72 °C/1'), estas condiciones de amplificación para cada par de iniciadores de cada gen fueron estandarizadas con 0.2 µM de dNTPs y 2 µM Mg²⁺ (Torres Cifuentes, 2020).

13.1.1.5. Determinación de la concentración de proteína y ensayos de Western Blot

Los extractos de proteína total se obtuvieron previa extracción con el reactivo TRIzol (Invitrogen, Cat. # 15596-018) siguiendo las recomendaciones del proveedor. En breve, a la fracción de proteína libre de ADN (fracción color rosa) se le agregó 1.5 µl de Isopropanol por 1 ml de reactivo, se incubó 10 min y se centrifugó a 1,232 x g en una centrifuga Eppendorf 5415C rotor 11 mm para sedimentar las proteínas. Luego, se descartó el sobrenadante y la pastilla de proteínas fue restaurada con 2 ml por 1 ml de TRIzol de solución de lavado (Hidrocloruro de guanidina 0.3 M en etanol 95%). Las extracciones fueron incubadas durante 20 min y centrifugadas a 12000 rpm. Los lavados se repitieron 3 veces. La pastilla de proteínas fue tratada con 2 ml de etanol 100% por 20 min y nuevamente centrifugada. Se descartó el sobrenadante y el gránulo se secó por corriente de aire. La solubilización se realizó resuspendiendo la pastilla en 100 µl de SDS al 1% Urea 0.5 M a 50°C. Las fracciones fueron monitoreadas en gel de acrilamida/bis 10% y visualizadas por tinción con plata.

Para la electroforesis a 60 µg de proteína, se adicionó amortiguador de carga a una concentración final de 1x y se hirvieron por 5 min. Las muestras para analizar fueron cargadas en geles de poli-acrilamida al 10% (Gel separador: 1.67 ml de acrilamida 30%, 0.68 ml de bis-acrilamida 2%, 1.25 ml de amortiguador Tris 4X/SDS 10% pH 8.8, 1.39 ml de H₂O mQ, 0.05 ml de persulfato de amonio 10% y 0.01 ml de TEMED. Gel concentrador: 0.320 ml de acrilamida 30%, 0.130 ml bis-acrilamida 2%, 0.5 ml de amortiguador Tris 4X/SDS 10% pH 6.8, 1.040 µl de H₂O mQ, 0.05 ml de persulfato de amonio 10% y 0.01 ml de TEMED) y se corrieron en una cámara electroforética con amortiguador de corrida para proteínas 1X (Tris-base 30 g/L, Glicina 144 g/L y SDS 10%) a 120 V, y 150 mA 1 h 20 min aproximadamente.

Posteriormente se realizó la transferencia en cámara húmeda a 86 V, 350 mA y 100 W por 1 hora con amortiguador de transferencia (Glicina 0.18 M y Tris-base 25 mM) en una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN 0.2 µm No. catálogo NBA085C001EA). Las proteínas transferidas fueron monitoreadas por tinción con rojo de Ponceau. Se lavó la membrana con PBS/Tween-20 0.5%. (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10.1 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM y 0.05% Tween) y se bloqueó con leche Svelty baja en grasa al 5% en PBS/Tween-20 0.5% por 1 h a T.A. Posteriormente, se lavó nuevamente la membrana con

PBS-Tween-20 0.5% y se incubó por toda la noche con anticuerpo primario anti-Vestigial (dilución 1:800, amablemente donado por S.B. Carroll & K. Guss) y anti-actina (1:2000, no comercial) todos en PBS.

Los anticuerpos fueron recuperados y la membrana se lavó tres veces durante 10 min con TBS-Tween-20 0.5%. La membrana de Vestigial se incubó durante 1½ h con el anticuerpo secundario (1:2000) de cabra anti-IgG anti-conejo acoplado a HRP (Thermo Fisher Scientific 65-6120), y para Actina con el anticuerpo secundario (1:2000) de cabra anti-IgG de ratón acoplado a HRP (Invitrogen 626520), se recuperaron nuevamente los anticuerpos y las membranas se lavaron tres veces con TBS Tween-20. Las membranas fueron mantenidas en PBS 1X. El revelado se realizó por reacción enzimática con el kit SuperSignal™ West Femto (Thermo Scientific 34095). Las imágenes fueron tomadas en el equipo Blot Scanner C-Digit LI-COR con el Software Imagen Studio y las imágenes se analizaron en el programa ImageJ en donde se obtuvieron los valores de fluorescencia por píxel de cada una de las bandas correspondientes a las proteínas. Estos valores se normalizaron dividiéndolos con el valor del control de carga (actina) de los tres experimentos (Torres Cifuentes, 2020).

13.1.1.6. Inmunofluorescencia en discos imagales de *Drosophila*

Luego de incubar los huevos depositados durante el tiempo requerido, se seleccionaron las larvas y se colocaron en un portaobjetos con solución PEM. Con pinzas de disección o agujas de insulina se procedió a iniciar la disección cortando la mitad del animal, donde solo se preservó sólo la porción anterior de este, ya que es la región del animal en la que se encuentran los discos imagales. Luego de esto, se invirtió la parte anterior de la larva con ayuda de las agujas o pinzas de disección, de tal manera que el tejido interno de la larva quedó expuesto para facilitar el proceso de inmunofluorescencia. Se repitió este procedimiento con la cantidad de larvas deseadas para cada tiempo. Para evitar la pérdida de los discos imagales durante el proceso de inmunofluorescencia, el protocolo se realizó en las larvas invertidas que tenían los discos adheridos a su superficie.

Las partes anteriores invertidas de las larvas se colocaron en un tubo eppendorf con solución de fijación que contenía solución acuosa de paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences, 8%) y PEM-T (que contiene Tritón X-100 para facilitar la adecuada permeabilización del tejido) v/v durante 40 minutos sin agitación a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo se procedió a realizar los lavados con la finalidad de retirar el exceso de solución de fijación. Se realizaron 3 lavados con PEM-T, cada uno en agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Luego de los lavados se inició el protocolo para reducir la unión inespecífica del anticuerpo mediante la adición e incubación de la muestra con solución de bloqueo que contenía PEM-T y suero fetal bovino (Sigma-Aldrich, 0.1g), durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente.

Posterior a esto, se retiró la solución de bloqueo para adicionar el anticuerpo primario a la muestra, y posteriormente se adicionó la solución de tinción con el anticuerpo primario vestigial a una dilución 1:200 (vg anti-rabbit, S.B. Carroll & K. Guss, o vg anti-guinea pig, G. Struhl). Este anticuerpo primario se incubó a 4°C durante toda la noche. Posterior a este tiempo se retiró dicho anticuerpo y se procedió a realizar 3 lavados con PEM-T en agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos, con el fin de retirar el exceso de anticuerpo inespecífico en la muestra. Posterior a esto, la muestra se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo específico para cada anticuerpo primario como correspondía:

- Anticuerpo primario Vg: Alexa 647 anti-rabbit o Alexa 594 anti-guinea pig.

Cada anticuerpo secundario que se agregó a la muestra estaba en dilución 1:1000 en solución de tinción, este se incubó durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente cubierto de la luz. Luego de este tiempo se realizaron 4 lavados para retirar el exceso de anticuerpo: 3 lavados con PEM-T y el último con PEM en agitación, a temperatura ambiente, durante 10 minutos, cubierto de la luz.

Usando las larvas invertidas que culminaron el protocolo de inmunofluorescencia, se tomó una lámina portaobjetos (Corning 2948-75X25, 75 x 25 mm) que previamente estaba adecuada para el montaje de los discos (puentes para evitar presionar el tejido) y se colocó la larva invertida en 15 µl de mowiol. Con ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ800), y de las agujas y pinzas de disección, se separaron los discos imagales alares del resto del tejido larval, buscando siempre retirar la mayor cantidad de tejido traqueal. Posterior a esto se desechó el exceso de tejido larval, dejando únicamente los discos. Estos quedaron ubicados con la parte predominante del pouch o bolsa orientada hacia arriba. Finalmente se cubrieron los discos con una laminilla cubreobjetos (Corning, 22 x 22 mm) y se adicionó el mowiol necesario para que la muestra quedara completamente cubierta y se

sellaron los bordes de la laminilla cubreobjetos con barniz de uñas. Este mismo procedimiento se repitió con cada una de las larvas de los tiempos establecidos en las especies deseadas y de esta manera quedaron listos para ser observados por microscopía confocal.

13.1.1.7. Microscopía confocal y captura de imágenes

Las imágenes de los discos imagales alares de las especies de *Drosophila* se capturaron en un microscopio confocal espectral (Leica TCS-SP8) usando un objetivo de 63x (PL APO CS2, 63x, Ap. Num. 1.4 de inmersión en aceite) y las siguientes especificaciones en el software LAS X: Formato 1024 x 1024, velocidad 600, Frame average 4, Phase X -33.48, Zoom factor 1.00, Z-step size 1.50. Fue necesario establecer el inicio y el final de la toma de los stacks en Z, de acuerdo con el grosor de cada uno de los discos que se capturaron.

13.1.1.8. Análisis de imágenes

Al finalizar la captura de imágenes en el microscopio confocal, se almacenaron en formato .lif y se analizaron con el software Image J 1.51j8 (National Institutes of Health, USA). La imagen se abrió y se seleccionó la opción de proyección en Z con el fin de sacar la proyección máxima de todos los planos capturados en microscopía confocal.

La proyección total de la imagen se guardó en formato .png para posteriormente ser analizada en el programa Zen Imaging Software con la finalidad de delimitar el área de los discos y obtener el valor medio de intensidad y ser normalizado y cuantificado. De tal forma se obtuvieron las gráficas de intensidad de vestigial en los tiempos que se tuvieron en cuenta para complementar el análisis molecular que se realizó previamente.

A continuación, se muestra un resumen de la metodología (**Figura 48**) que se empleó para desarrollar la parte del proyecto para identificar a vestigial a nivel de mRNA y proteína.

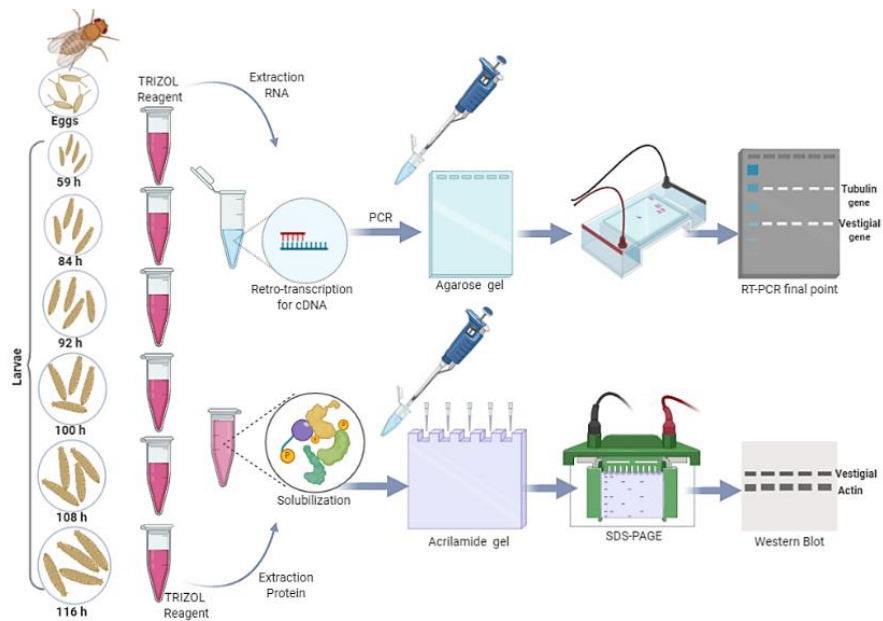


Figura 49. Metodología empleada para la identificación de Vg a nivel de ARN y proteína.

Se realizó la colecta de embriones correspondiente a cada tiempo a analizar (59, 84, 92, 100, 108 y 116h) cuando las larvas alcanzaron el tiempo indicado de desarrollo, se realizó la disección de las larvas y solo se conservó la parte anterior donde se encontraban los discos imagales alares. Luego fueron agregadas a un tubo eppendorf con TRIzol. Aprovechando la formación de fases y la separación de moléculas que permite este reactivo, se empleó la fase acuosa para la extracción de ARN y la fase orgánica o fracción rosa para obtener las proteínas de interés. Utilizando la fase acuosa, se extrajo el ARN y posteriormente se realizó el protocolo de retro-transcripción para obtener el cADN, para posteriormente hacer una amplificación por PCR y visualizar el producto por medio de una electroforesis en gel de agarosa. Como control se amplificó tubulina, con la finalidad de observar un cambio real en la expresión de Vg respecto a tubulina. Con la fase orgánica, se realizó la extracción y solubilización de las proteínas, para posteriormente visualizarlas con un Western Blot. En este caso se utilizó como control de carga a actina.

13.2. Resultados

13.2.1. Análisis de la expresión de *vg* durante el desarrollo de *Drosophila* a nivel de ARN y proteína

Adultos y larvas de moscas *y,w* (cepa de *D. melanogaster*) en diferentes tiempos del desarrollo (59, 84, 92, 100, 108 y 116 horas después de la puesta de huevos (*After egg laying* AEL) fueron disectadas para llevar a cabo el protocolo de extracción de mARN y proteína (**Figura 49**).

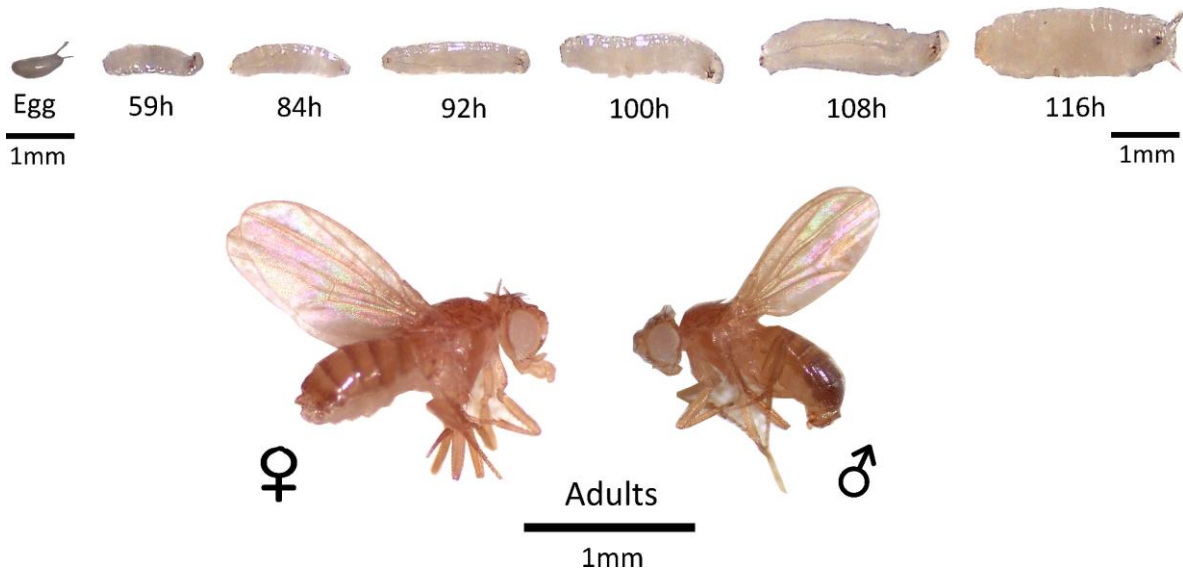


Figura 50. Imagen representativa de los individuos utilizados para el análisis de la identificación de *Vg* a nivel de mARN y proteína. Tiempos del desarrollo de *D. melanogaster* (*y,w*) huevos, larvas y adultos usados para este análisis. Imágenes de huevos y larvas fueron capturadas en magnificación de 16X, y moscas adultas fueron tomadas en magnificación 25X.

13.2.2. Estandarización de las condiciones de amplificación de los oligonucleótidos.

Inicialmente, con el fin de hacer la estandarización de las condiciones de amplificación de *vg*, se diseñaron oligonucleótidos especie-específicos para identificar toda la región del CDS del gen de *vg*, con la finalidad de amplificar la región codificante del gen. En la **Tabla 3** se muestran los oligonucleótidos diseñados para cada una de las especies dirigidos a la región anteriormente descrita. Teniendo en cuenta la separación de fases que genera el reactivo TRIzol, se utilizó la interfase para extraer ADN y evaluar la funcionalidad de dichos oligonucleótidos.

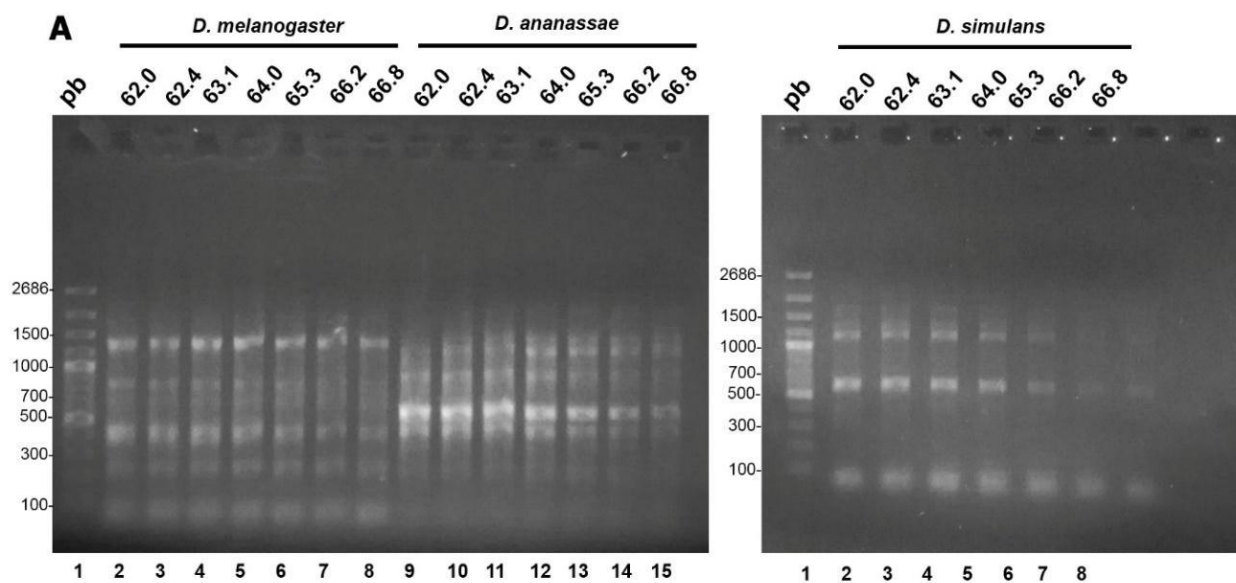
Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para el CDS del gen de *vg* en cada una de las especies seleccionadas

Tubulin	F	5' ...ATGCGTGAATGTATCTCTATCCATG... 3'
	R	5' ...TTAGTACTCCTCAGCGCCC... 3'
D. melanogaster	F	5' ...CGCGGATCCATGGCAGTGTC...3'
	R	5' ...CCGGAATTCTTAGAACCAGTAAAGATCCTT...3'
D. simulans	F	5' ...CGCGGATCCATGGCAGTGTC... 3'
	R	5' ...CCGGAATTCTTAGAACCAGTAAAGATCCTT... 3'
D. ananassae	F	5' ...CGCGGATCCATGGCAGTGTC... 3'
	R	5' ...CCGGAATTCCTAGAACCAGTACAGATCC... 3'
D. virilis	F	5' ...CGCGGATCCATGGCAGTGTC...3'
	R	5' ...CCGGAATTCCTAGAACCAGTACAGATCC...3'

Se muestran los oligonucleótidos forward (F) y reverse (R) usados para estandarizar las condiciones de amplificación del templado en PCR.

Para la estandarización de las condiciones de amplificación del producto de CDS de *vg*, se usaron cantidades iguales de muestra al tiempo de 84 horas. Sin embargo, se observaron un gran número de bandas inespecíficas de los productos de PCR con las condiciones de amplificación que se especifican (**Figura 50**), sugiriendo, que el diseño de los oligonucleótidos para la región del CDS de *vg* es erróneo debido a la alta inespecificidad de unión y amplificación de estos en diferentes regiones de la secuencia.

Esta inespecificidad pudo deberse a la longitud de los oligonucleótidos, ya que 19 nucleótidos puede ser una secuencia corta y por lo tanto inespecífica para una secuencia blanco-determinada. Aunque se ha establecido en algunos protocolos de diseño de oligonucleótidos que la longitud debe ser de entre 18 a 30 nucleótidos (Addgene, 2018), Se optó por diseñar un nuevo conjunto de oligonucleótidos de mayor longitud, para ser utilizados en la estandarización de las condiciones de amplificación. Para esto, se estableció como producto de amplificación el exón 2 del gen de *vg*. De esta forma, los nuevos oligonucleótidos que fueron diseñados se muestran en la **Tabla 4**.



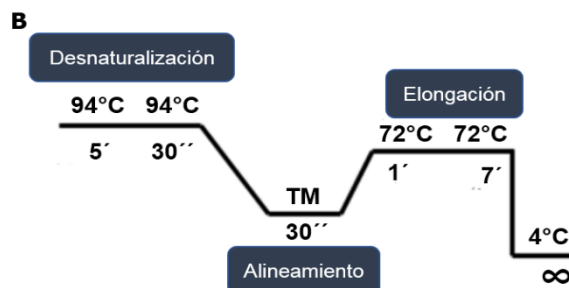


Figura 51. Estandarización de las condiciones de amplificación del CDS de *vg* con los oligonucleótidos de la Tabla 3. A. El ADN extraído de las larvas de las especies *D. melanogaster*, *D. simulans* y *D. ananassae* fue amplificado por PCR utilizando oligonucleótidos especie-específicos que amplifican la secuencia del CDS del gen. En este gel representativo se observa un bandeo inespecífico en todos los carriles independientemente de la temperatura de amplificación que se utilizó. El marcador de peso molecular (DNA Marker 14 Fragments Marker MBS657654) se muestra en el carril 1. **B.** Condiciones de amplificación utilizadas en la PCR punto final.

De forma paralela, como control, se realizó la estandarización de las condiciones de amplificación para los oligonucleótidos específicos para el CDS de tubulina- α , usando muestras de larvas de *D. melanogaster* de 84h (**Figura 51**). Este resultado muestra que las condiciones y la longitud de los oligonucleótidos que se diseñaron para el CDS de tubulina fue el adecuado para el uso de ésta como control de carga en los experimentos de retro-transcripción, en los cuales se determinó el uso de una temperatura de alineamiento de 64 °C.

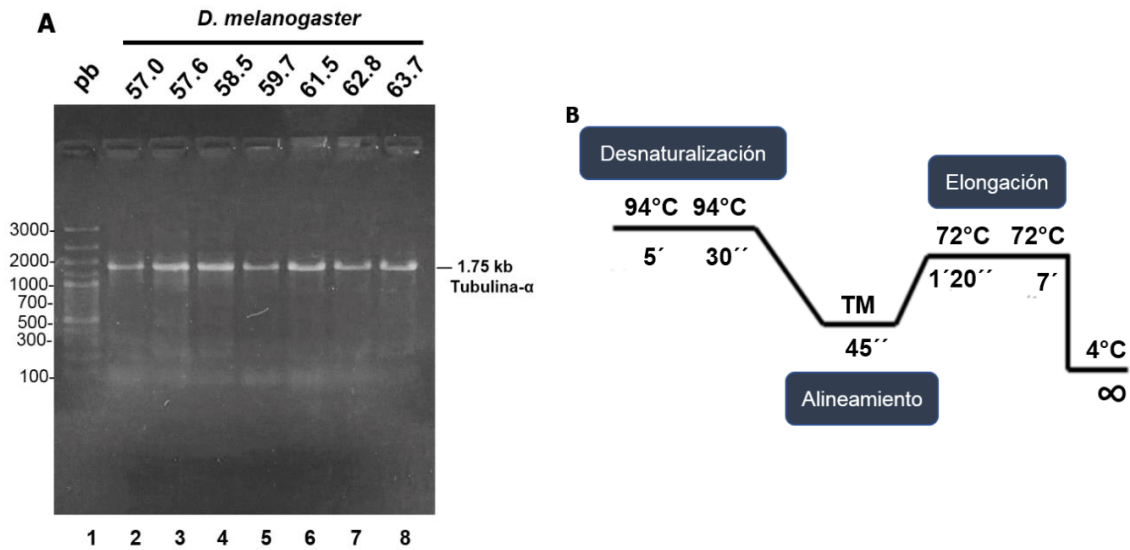
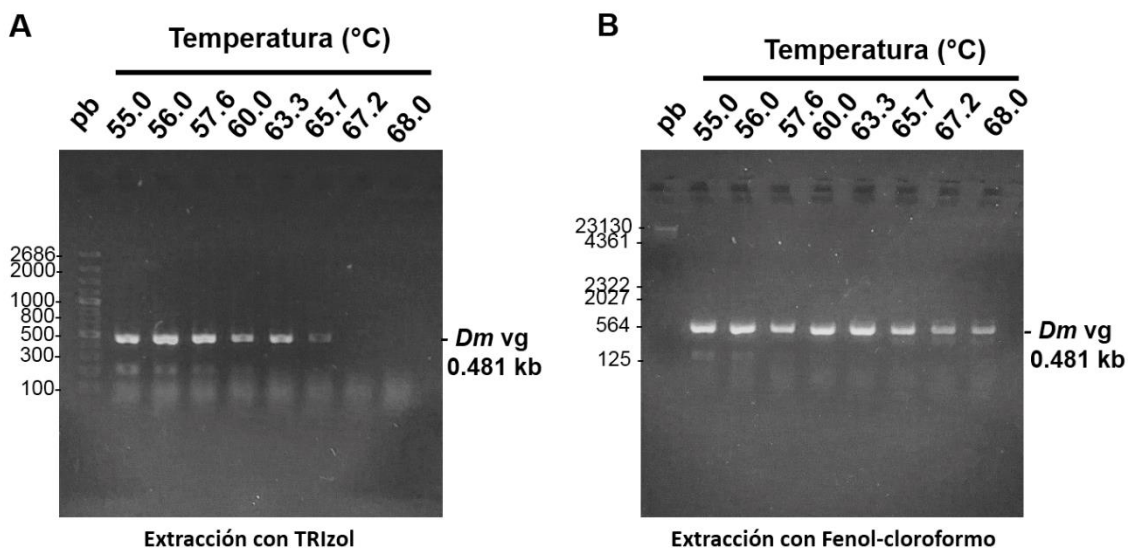


Figura 52. Estandarización de las condiciones de amplificación del CDS de Tubulina- α .
A. ADN extraído de larvas de *D. melanogaster* que fue amplificado por PCR utilizando oligonucleótidos especie-específicos que amplifican una secuencia de Tubulina- α de 1750 pares de bases (señalado en el gel). En este gel representativo se observan bandas del tamaño esperado a la amplificación de la tubulina con los oligonucleótidos diseñados. El marcador de peso molecular (DNALand Scientific Marker 100 pb) se muestra en el carril 1. **B.** Condiciones de amplificación que fueron empleadas para la estandarización de los primers de Tubulina- α .

Los productos de PCR utilizando el nuevo diseño de oligonucleótidos se muestran en la **Figura 52** con sus respectivas condiciones de amplificación. En este caso se muestra la implementación y comparación en la estandarización de los oligonucleótidos usando el ADN obtenido por medio de la obtención con TRIzol y el ADN obtenido por medio de la técnica de extracción de fenol-cloroformo, lo cual sugiere que la técnica de fenol-cloroformo es mucho más efectiva en la extracción de ADN larvario.

Tabla 4. Oligonucleótidos Forward (F) y Reverse (R) diseñados para el CDS del exón 2 del gen de *vg* en cada una de las especies seleccionadas

<i>D. melanogaster</i>	F	5'... TTCAACCAGGATTGTACTCCTCCT...3'
	R	5' ... CTCAGCTTCGCTGCGCGGCACGAT...3'
<i>D. simulans</i>	F	5'... TTCAACCAGGATTGTACTCCTCCT...3'
	R	5' ... CTCAGCTTCGCTGCGCGGCACGAT...3'
<i>D. ananassae</i>	F	5'... TTCAACCAGGATTGTACTCCTCCT...3'
	R	5' ... CTCAGCTTCGCTGCGCGGCACGAT...3'
<i>D. virilis</i>	F	5'... TTCAACCAGGATTGTACTCCTCCT...3'
	R	5' ... CTCAGCTTCGCTGCGCGGCACGAT...3'



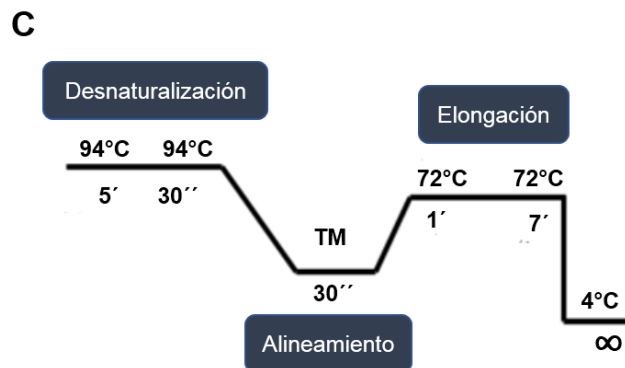


Figura 53. Estandarización de las condiciones de amplificación del exón 2 del gen de *vg*.
A. El ADN extraído de las larvas de *D. melanogaster* fue amplificado por PCR utilizando oligonucleótidos especie-específicos que amplifican la secuencia del exón 2 del gen. En este gel representativo se observa un bandeo del tamaño esperado en todos los carriles favoreciendo las temperaturas de ~60 °C de amplificación que se utilizaron bajo esta técnica de extracción de ADN. El marcador de peso molecular (DNA Marker 14 Fragments Marker MBS657654) se muestra en el primer carril. **B.** Amplificación de ADN extraído de larvas de *D. melanogaster* usando oligonucleótidos para el exón 2 del gen de *vg*. En el gel se muestra una banda del tamaño esperado de amplificación del exón, donde se ve una mayor efectividad en temperaturas cercanas a los ~60 °C con la técnica de extracción de fenol-cloroformo. Se muestra el marcador de peso molecular en el primer carril (DNA Marker, Lambda DNA/HindIII Marker L0020-S). **C.** Condiciones de amplificación utilizadas en la PCR punto final.

13.2.3. Identificación de la expresión del mRNA de *vg* durante el desarrollo larvario

Mediante el uso del ARN obtenido de la fase acuosa con el reactivo TRIzol (ver materiales y métodos) se procedió a evaluar la integridad del ARN por medio de electroforesis en gel de agarosa en cada una de las muestras de los tiempos de desarrollo de *D. melanogaster*, *D. simulans* y *D. ananassae* (59, 84, 92, 100, 108 y 116 h) en dos ensayos independientes (Ensayo 1 y Ensayo 2), con la finalidad de evaluar su calidad y así evaluar correctamente la expresión del ARN mensajero en las muestras correspondientes.

Es necesario realizar este control de calidad de la muestra, ya que se ha reportado la presencia de ribonucleasas (RNAsas), que podrían afectar dicha integridad del ARN alterando y contaminando la muestra, lo que hace necesario preparar las muestras para inhibir la degradación del ARN (Aranda et al., 2012). De acuerdo con esto, en la **Figura 53** se muestra un gel de agarosa que señala la integridad del ARN extraído en diferentes

tiempos de desarrollo larvario de *D. melanogaster*, *D. simulans* y *D. ananassae*, donde se observan dos bandas correspondientes al ARN ribosomal 18S y 28S, indicando que el ARN se encuentra en buenas condiciones.

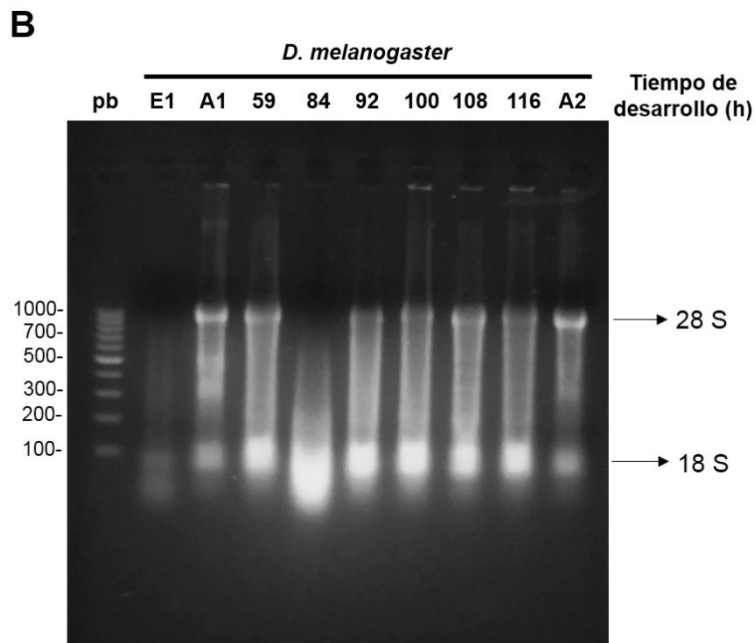
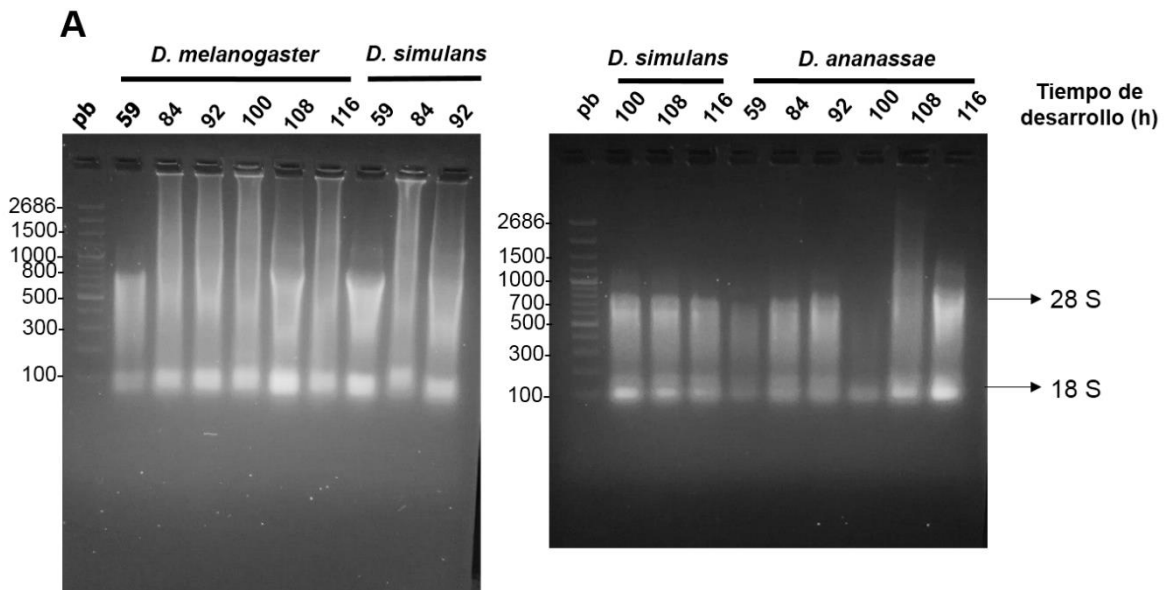


Figura 54. Evaluación de la calidad del ARN extraído de *D. melanogaster*, *D. simulans* y *D. ananassae*. **A.** El ARN extraído en un primer ensayo de cada uno de los tiempos de desarrollo (59, 84, 92, 100, 108 y 116 h) se muestran en un gel representativo donde se observa ARN íntegro, debido a la presencia de ARN de las subunidades 28 S y 18 S del rARN para *D. melanogaster*, *D. simulans* y *D. ananassae*. El marcador de peso molecular (DNA Marker, 14 Fragments Marker MBS657654) se muestra en el primer carril de cada gel. **B.** El ARN extraído de embrión (E1), adulto (A1 y A2), y tiempos larvarios de desarrollo (59, 84, 92, 100, 108 y 116 h) del Ensayo 2 se muestran en este gel representativo, donde se observa que la calidad del ARN es buena, de acuerdo con la presencia de las subunidades 28 S y 18 S del rARN para *D. melanogaster*. El marcador de peso molecular (DNA Marker, Marcador de ADN 100-1000bp GM343) se muestra en el primer carril.

Posterior a la evaluación de la integridad del ARN, mediante una PCR se evaluaron las muestras de ARN de los ensayos 1 y 2 para corroborar que cada una de las muestras no presentaba contaminación debido a la presencia de ADN. Por esta razón, utilizando los oligonucleótidos especie-específicos para *D. melanogaster*, se evaluó si la Tubulina- α amplificaba en cada uno de los tiempos de desarrollo de tal manera que esto sugiriera o no la presencia de ADN en la muestra de ARN. En la **Figura 54**, se muestran los gels con el producto de amplificación para los ensayos 1 y 2, donde se muestra el ARN de cada uno de los tiempos de desarrollo larvario y como control positivo (+) se muestra el ADN amplificado para Tubulina- α en una muestra que contenía ADN y ARN. Con esta PCR control, se aseguró que el ARN obtenido de las muestras fue de buena calidad y por tanto de esta forma se evitaría la presencia de falsos positivos en los experimentos de retro-transcripción.

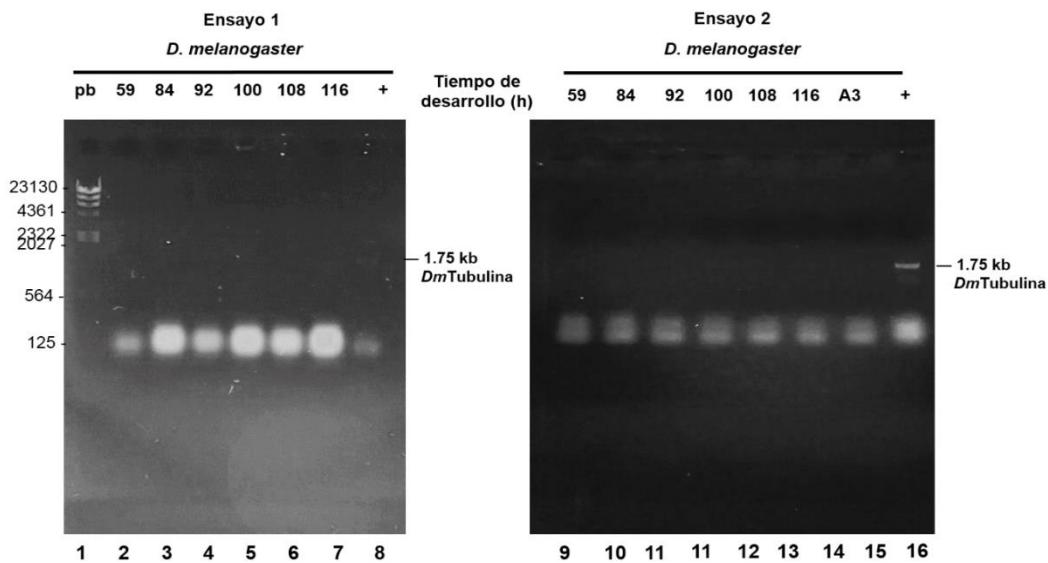


Figura 55. Evaluación de contaminación por ADN en el ARN obtenido de los tiempos de desarrollo larvario. El ARN extraído de cada uno de los tiempos de desarrollo se evaluó mediante PCR punto final para verificar la presencia de ADN que pudiera contaminar la muestra. Como control positivo de amplificación (+) se usó una muestra de ADN de Tubulina- α de 1750pb. Dicho control se muestra en los carriles 8 del Ensayo 1 y el carril 16 del Ensayo 2. El marcador de peso molecular (DNA Marker, Lambda DNA/HindIII Marker L0020-S) se muestra en el carril 1.

A partir de la verificación de calidad del ARN, se realizaron los experimentos de retro-transcripción para obtener el ADN complementario (cADN) a partir del ARN mensajero total de cada uno de los tiempos de desarrollo. Posterior a la reacción de la transcriptasa reversa se realizaron las reacciones de PCR con los oligonucleótidos especie-específicos para la amplificación del CDS de Tubulina- α y del exón 2 de *vg* en cada tiempo correspondiente.

En la **Figura 55** se muestran los geles con los productos de PCR representativos para los niveles de ARN mensajero de *vg* en cada uno de los tiempos, así como Tubulina- α como control de carga. Este resultado indica que los niveles de expresión del ARN mensajero son muy variables durante el tiempo de desarrollo de la mosca y por lo tanto hay mayor expresión del mensajero en unos tiempos comparado con otros. Esto sugiere que el método de colecta de los embriones y el tiempo de colecta durante el día o la noche afecta la sincronización del desarrollo de todas las larvas evaluadas. Con respecto a esto último se ha demostrado que el protocolo de colecta y el horario en que se realiza, así como las horas de luz/oscuridad afectan el desarrollo asincrónico de las larvas (Nikhil et al., 2016). Para reducir esta variabilidad, se decidió modificar el tiempo de colecta de embriones de 4 horas, a solamente 1 hora, de tal manera que los embriones depositados fueran aproximadamente del mismo tiempo de desarrollo.

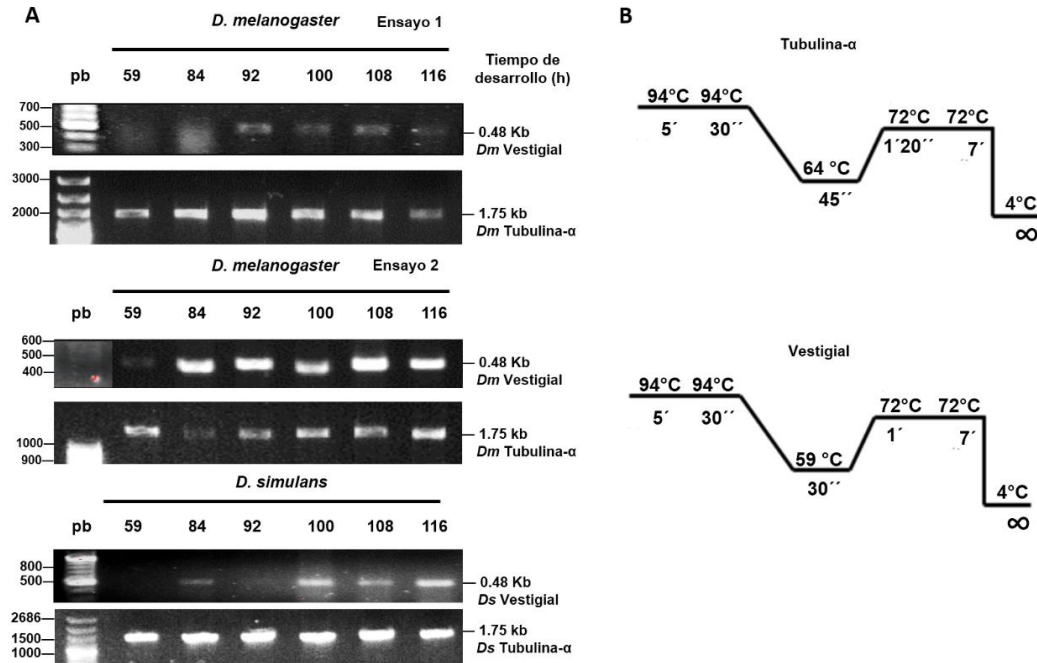


Figura 56. RT-PCR de los mensajeros de *vg* y Tubulina- α en cada uno de los tiempos de desarrollo de la larva en *D. melanogaster* y *D. simulans*. A. Se muestra la RT-PCR y los geles representativos de los ensayos 1 y 2 de *D. melanogaster* y de un ensayo de *D. simulans* con la expresión del mensajero en cada tiempo. La expresión correspondiente a vestigial se ve en los carriles superiores y en los inferiores Tubulina- α como control de carga. B. Condiciones de amplificación de la PCR usando oligonucleótidos especie-específicos para *D. melanogaster* y *D. simulans* para el CDS de Tubulina- α y para el exón 2 del gen *vg*.

Los niveles de expresión génica de *vg* a partir del ARN mensajero fueron cuantificados a través del desarrollo larvario en los tiempos de 59, 84, 92, 100, 108 y 116h de *D. melanogaster*. El ARN total fue purificado para evaluar la expresión del mensajero de *vg*. Estos resultados de RT-PCR muestran que las cantidades del mensajero incrementan significativamente entre las 59 y 84 horas de desarrollo ($p < 0.05$). En efecto, a las 84 horas de desarrollo, estos niveles parecen alcanzar su máximo, donde posteriormente descienden de nuevo (**Figura 56A**). También se examinaron los niveles de mRNA en *D. simulans* (**Figura 56B**) y se observó un incremento similar entre las 59 y 84 horas, pero sorprendentemente, en contraste con *D. melanogaster*, no decae la expresión en los tiempos posteriores. Estos resultados sugieren que la expresión del mRNA es altamente dinámica a través del desarrollo larvario de *D. melanogaster* y *D. simulans*.

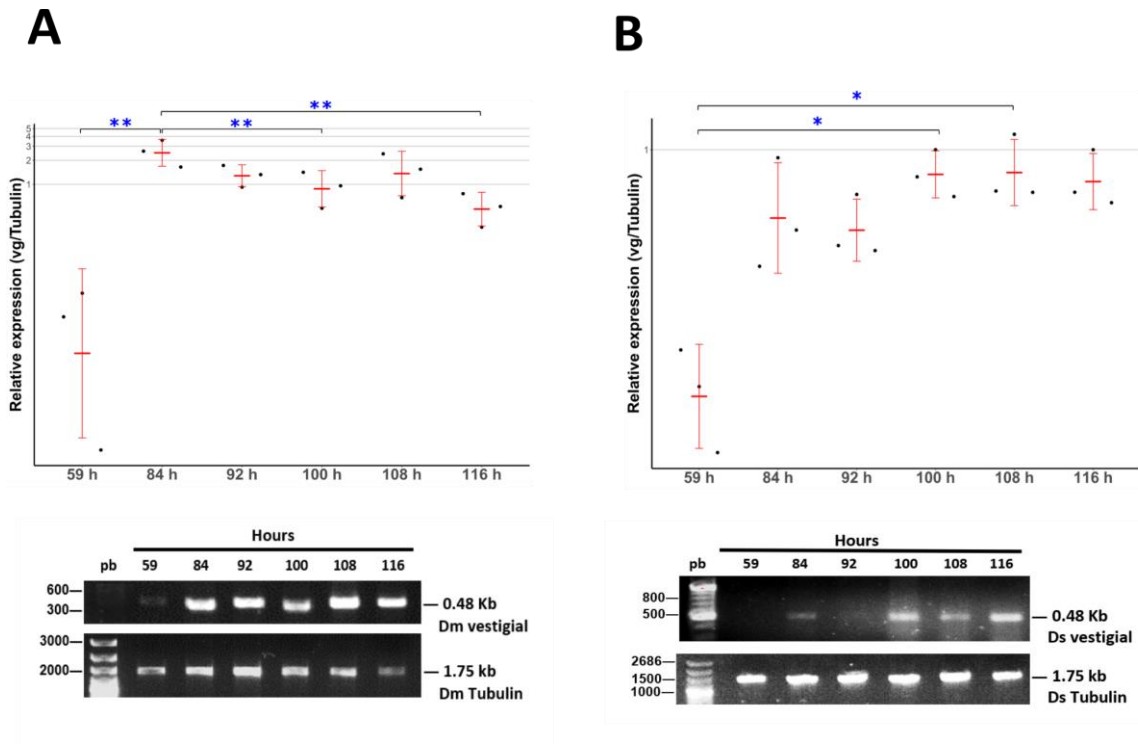


Figura 57. Análisis de expresión del mRNA de *vg* por RT-PCR. La expresión del mensajero de *vg* fue evaluado en diferentes tiempos del desarrollo. Cuantificación semicuantitativa de *vg*. Tubulina- α fue usado para normalizar la expresión. Escala mostrada en Log10. **A.** Cuantificación para *D. melanogaster*. **B.** Cuantificación para *D. simulans*. Barras indican la desviación estándar. Comparaciones estadísticas: ANOVA de una vía $p < 0.05$. Datos densitométricos.

13.2.4. Identificación de la expresión de la proteína *vg* durante el desarrollo larvario

También se comparó la cantidad total de proteína en los diferentes tiempos del desarrollo. A partir de la fase orgánica resultado de la extracción previa con el reactivo TRIzol, se solubilizaron y se monitorearon en un gel de acrilamida para posteriormente visualizarlas por medio de tinción con plata. Este procedimiento se realizó para 3 experimentos independientes utilizando embriones, larvas y adultos de *D. melanogaster*. Las imágenes representativas de la monitorización de las proteínas en cada ensayo se muestran en la **Figura 57**. Esta monitorización en cada uno de los ensayos permite de manera general ver que las proteínas presentes en los lisados totales varían en peso molecular desde los 10kDa hasta los 200 kDa.

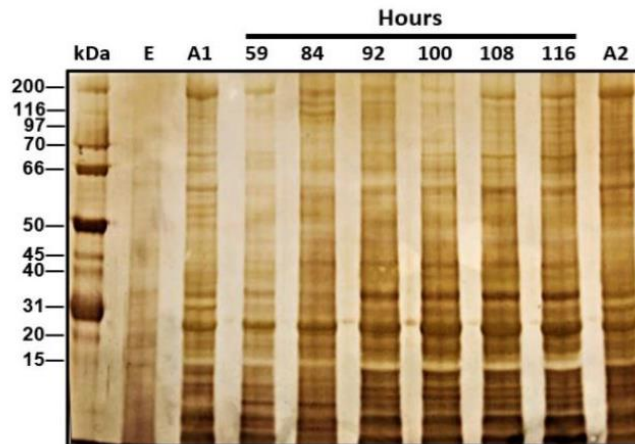


Figura 58. Proteínas totales extraídas y solubilizadas de *D. melanogaster*. Lisados totales de proteína en un gel de acrilamida al 10% teñido con plata. (E: embriones, A1-2: adultos).

Posterior al monitoreo de las proteínas, se realizó el procedimiento de electroforesis y transferencia de las proteínas en una membrana de nitrocelulosa, la cual fue incubada con los anticuerpos primarios anti-vestigial y anti-actina con sus respectivos anticuerpos secundarios. Los resultados de western blot para un ensayo representativo mostrado en la **Figura 58A**, revelan una banda de vg con un aparente peso molecular de 57 kDa. Consistente con los resultados del mRNA de *vg*, observamos un incremento en la expresión de la proteína entre 59 y 84 horas de desarrollo y posteriormente una disminución, similar a lo observado en las cuantificaciones del mRNA (**Figura 56**). Así mismo, se analizó por medio de Western blot, la presencia de la proteína Vg en individuos adultos de *D. melanogaster*, donde no se presentó una señal evidente de la síntesis de esta proteína en este estadio de la mosca (**Figura 58 B**).

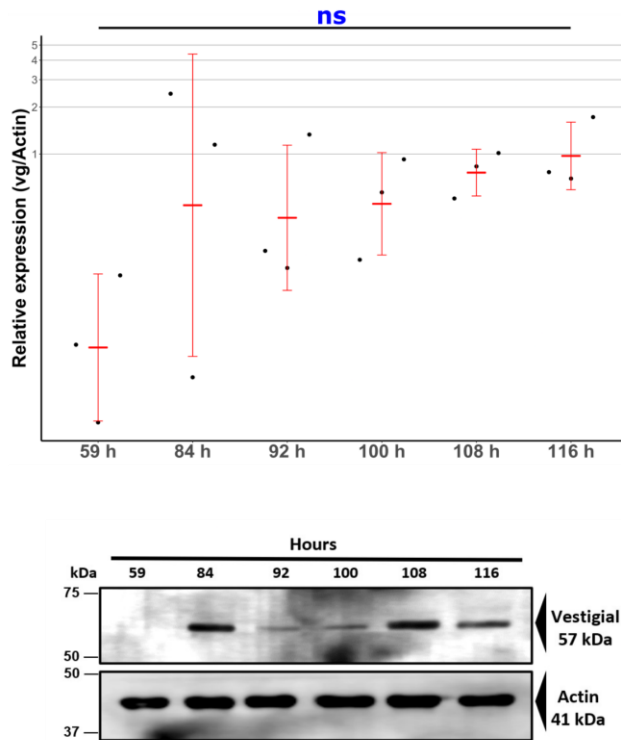
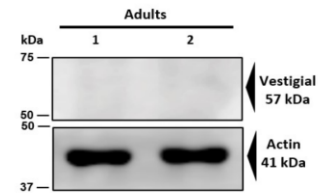
A**B**

Figura 59. Expresión de la proteína Vg en un curso temporal de desarrollo de *D. melanogaster*. **A.** Expresión relativa de la proteína Vg en la larva (análisis densitométrico). Escala que se muestra: Log10. Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos independientes. Comparaciones estadísticas: ANOVA de una vía, $p > 0.05$ (ns). En la parte inferior se muestra un Western blot usado con anticuerpos anti-Vg y anti-Actina, que muestran la expresión de la proteína Vg en la larva. **B.** La proteína Vg no se detectó por Western Blot en individuos adultos de *D. melanogaster*.

Finalmente, para confirmar la dinámica de la proteína Vg, se evaluó su presencia por medio de inmunofluorescencia en los tiempos de 84, 92, 100, 108 y 116 h en los discos imagales alares. Como se muestra en estudios previos (Muñoz-Nava et al., 2020), Vg se expresa en la región del disco conocida como bolsa o pouch, así como en el margen. En concordancia con este estudio previo, se observa un incremento en la expresión de la proteína a través del tercer estadio larval (**Figura 59A**). Un patrón similar se observa en *D. simulans* (**Figura 59C**). Estos resultados y la influencia del gen de *vg*, parecen ser cruciales para la formación del ala, ya que las moscas que subexpresan Vg muestran un fenotipo deletéreo con alas más pequeñas que las moscas silvestres (**Figura 59D**).

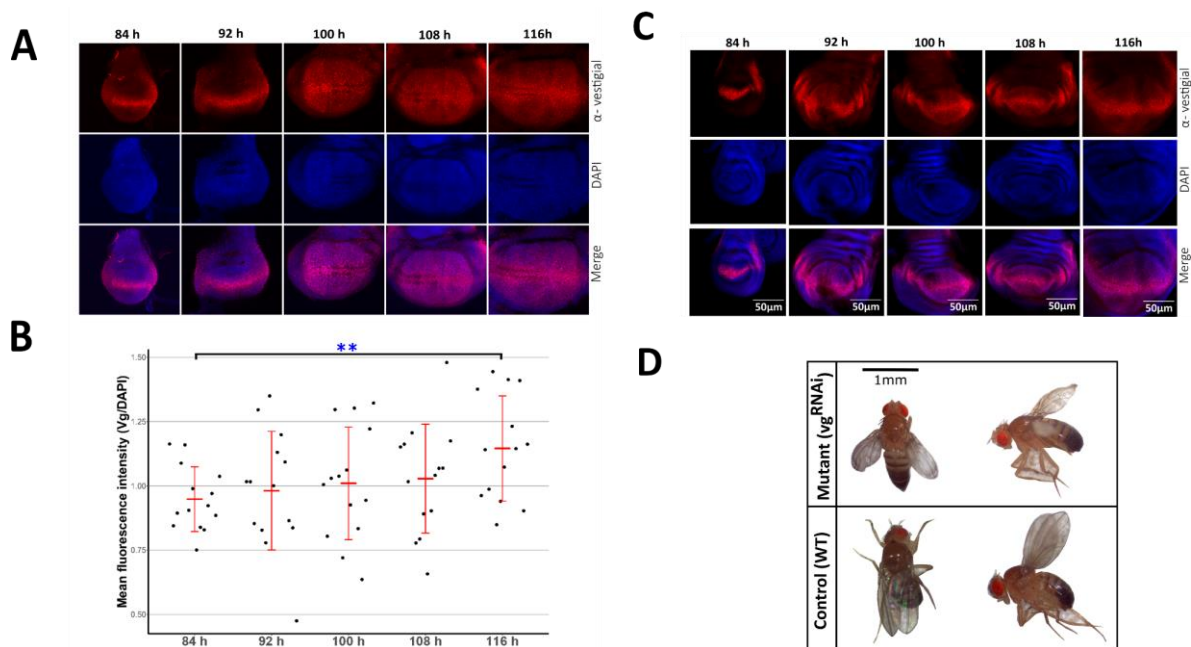


Figura 60. Inmunomarcaje de Vg en discos imagales alares de *Drosophila*. **A.** Inmunofluorescencia de los discos imagales alares de *D. melanogaster* en diferentes tiempos del desarrollo, marcados con anticuerpo de Vg y DAPI. **B.** Cuantificación de la expresión de Vg realizado usando el cociente del área del disco Vg/DAPI. Escala mostrada en Log10. Comparaciones estadísticas corresponden a ANOVA de una vía $**p < 0.05$. **C.** Inmunofluorescencia de los discos imagales alares de *D. simulans* en diferentes tiempos del desarrollo, marcados con anticuerpo de Vg y DAPI. **D.** Adultos machos representativos mutantes de Vg. Animales silvestres (WT o cruce control w, ms1096-Gal4;; x y,w, hs-Flp; sco; vgQELacZ/S-T) y vg^{RNAi} (mutante o cruce experimental w,ms1096-Gal4;; x y,w, hs-Flp;UAS- vg^{RNAi} ;vgQELacZ/[TM6B, Tb]).

13.3. Discusión

Con la finalidad de evaluar diferencias en expresión del ARN mensajero y proteína de *vg*, se estableció como primer paso la selección y el diseño de una estrategia que permitiera la evaluación e identificación de *vg* a nivel molecular, en donde las especies seleccionadas para el estudio, de acuerdo con sus relaciones filogenéticas, permitieron evaluar las principales diferencias en cuanto a la expresión y síntesis de Vg. A partir de esto, se debe

tener en cuenta un diseño efectivo de oligonucleótidos especie-específicos, que permitan una amplificación de la secuencia blanco-específica deseada. En este caso, el diseño inicial de oligonucleótidos cortos, como lo fue para el CDS completo del gen *vg*, mostraba una alta inespecificidad en el bandeo de la estandarización de las condiciones de amplificación (**Figura 50**), por lo que se hizo necesario diseñar nuevos oligonucleótidos de una longitud mayor, dirigidas al exón 2 del gen *vg* como secuencia blanco para la amplificación, ya que este exón se conserva muy bien en las cuatro especies que fueron seleccionadas, de acuerdo a la información de los genomas anotados en las bases de datos del NCBI.

En estudios previos, se reportó que la longitud de los oligonucleótidos facilita la unión específica a la secuencia de interés, pero una longitud mayor a 30 nucleótidos puede generar la formación de estructuras secundarias o el establecimiento de dímeros de oligonucleótidos, por lo que el diseño de oligonucleótidos de longitud de 18 a 24 nucleótidos, tienden a ser mucho más específicos teniendo en cuenta el ajuste adecuado de las condiciones de estandarización (Temperatura de alineamiento (T_a) y la temperatura de fusión (T_m o melting temperature)) (Addgene, 2018; Hendling & Barišić, 2019). De esta forma, aumentando la longitud de los oligonucleótidos especie-específicos y estableciendo las condiciones de amplificación adecuadas, además del establecimiento de las condiciones de amplificación de Tubulina- α como control de carga, permitiría desarrollar los experimentos de retro-transcripción posteriores.

Además, estos resultados también evidenciaron que, de las técnicas de extracción de ADN empleadas en el protocolo, la técnica de extracción de fenol-cloroformo fue mucho más eficiente que la técnica de extracción de ADN con el reactivo TRIzol, como se ha reportado en estudios de técnicas y metodologías de extracción de ADN, siendo la extracción orgánica o técnica de Fenol-cloroformo, uno de los métodos más eficientes para la obtención de ADN, pero cuenta con ciertas desventajas que van desde su alto consumo de tiempo, el uso de productos químicos que pueden representar algún peligro, además de las múltiples transferencias de tubos involucradas que pueden generar contaminación durante el proceso de la extracción (Butler, 2012; McKiernan & Danielson, 2017).

Al evaluar el ARN mensajero total de los tiempos larvarios analizados, se verificó la integridad adecuada de acuerdo con la presencia de las subunidades ribosomales 28S y 18S (**Figura 53**). Se ha reportado que la determinación de la intensidad de las bandas de las subunidades ribosomales en un gel de agarosa mediante electroforesis es uno de los métodos primarios más empleados para determinar la integridad del ARN (Malila et al.,

2015) además de su calidad al no estar contaminado con ARN (**Figura 54**), lo cual favoreció su uso para ser empleado en los experimentos de síntesis de cADN y qPCR del mensajero de *vg*.

Al analizar los cADNs sintetizados de *vg* en los diferentes tiempos de desarrollo (59, 84, 92, 100, 108 y 116 h) (**Figuras 55 y 56**) se vió una gran variabilidad en la expresión del mensajero en cada uno de los tiempos para *D. melanogaster* y *D. simulans*, lo cual se asoció con los métodos y protocolos de colecta de los embriones. De acuerdo a reportes previos, en donde se realizan tiempos de colecta de 1 hora, además de realizarlo en tiempos y horarios específicos del día, es decir, colectas únicamente en horas de la mañana o en horas de la tarde, permite tener una mayor sincronía en el tiempo de desarrollo de los mismos, debido a que la variación en los horarios de colecta se ve influenciado por el tiempo de luz/oscuridad y a los efectos del ciclo circadiano de los individuos que se están desarrollando (Nikhil et al., 2016; Paranjpe et al., 2005). En uno de estos estudios se evalúa que los individuos que se desarrollan en horas de la tarde bajo un régimen de luz/oscuridad hay un mayor tiempo de desarrollo de huevo a pupa con 6.5 horas de diferencia, respecto a la población de embriones que se desarrolló en horarios de la mañana (Nikhil et al., 2016). Estos factores y el tiempo de colecta de 4 horas que se tienen establecidas en los protocolos del laboratorio, además de los horarios de colecta que se realizaron para los tiempos específicos analizados, en los cuales se colectan embriones en horas de la mañana y de la tarde (59h: 6:00-10:00, 84h: 6:00-10:00, 92h: 11:00-15:00, 100h: 10:00-14:00, 108h: 16:30-20:30 y 116h: 14:00-18:00), posiblemente están generando esta variabilidad en el tiempo de desarrollo de las larvas que se tomaron en cuenta para esta investigación, lo cual dificulta hacer un análisis preciso de la expresión del mensajero de *vg* en los tiempos evaluados. Por tanto, se sugiere emplear en los protocolos del laboratorio un tiempo de colecta más corto, además de establecer horarios de colecta en la mañana o en la tarde de acuerdo con las necesidades. Con la implementación de estos procesos, se reduciría en gran medida la asincronía de desarrollo de las larvas y, por tanto, se obtendría un resultado más veraz acerca de la identificación y cómo varía la cantidad de mensajero durante el tiempo de desarrollo de las larvas.

Otra alternativa que puede explicar esta variabilidad del mensajero de *vg* es el hecho de que los niveles de mensajero no necesariamente deben coincidir exactamente con la proteína que codifican en organismos eucariotas, de acuerdo con la presencia de diferentes niveles de regulación. Particularmente, en *D. melanogaster* dicha regulación opera

principalmente a través de interacciones con otras proteínas y factores de transcripción específicos (Sauer et al., 1996). Además, los ARNm son generalmente menos estables que sus productos proteicos, lo que hace que la correlación entre ARNm/proteína sea mayor en proteínas que responden de manera eficaz a los cambios en su mensajero (Buccitelli & Selbach, 2020).

De acuerdo con la evaluación de las proteínas larvianas obtenidas a partir TRizol y su correspondiente monitorización en embriones, larvas y adultos se evidencia cómo la cantidad de proteína y su presencia a lo largo de los tiempos evaluados de desarrollo puede variar en el transcurso del desarrollo de la larva (**Figura 57**). De esta manera, al evaluar *vg* en los ensayos independientes de western blot, dicha proteína fue identificada con un peso molecular de 56 kDa. De acuerdo con esto, en investigaciones realizadas con anterioridad, describen a *Vg* como una proteína de 453 aminoácidos de longitud y un peso molecular de 46 kDa, y en otros estudios donde realizan ensayos de inmunoprecipitación, muestran a *Vg* con un peso molecular aparente de 50 kDa, peso que asumen los autores como un valor muy cercano al peso molecular predicho de 46 kDa (Nagel et al., 2001; Williams et al., 1991).

Respecto al incremento de peso que se evidenció en el estudio, posiblemente puede estar asociado con procesos de modificaciones post-traduccionales de la proteína *Vg*, ya que se ha descrito que ésta debe estar fosforilada en la serina 215 en la región carboxi-terminal de la proteína, proceso que es vital para el transporte de *Vg* al núcleo con la presencia de *Scalloped* (Pimmett et al., 2017), lo cual puede estar incrementando el peso final de la proteína observada durante los experimentos desarrollados.

Además de lo anterior, otra modificación post-traducciona que se ha descrito para la proteína *Vg* es la sumoilación, o la adición de una pequeña proteína llamada SUMO de peso molecular de 11 kDa, que estimula a *Vg* para su adecuado funcionamiento durante el proceso de morfogénesis del ala (Takanaka & Courey, 2005). De esta forma, dichas modificaciones post-traduccionales pueden estar incrementando el peso de la proteína de acuerdo con lo predicho en 1991 por el grupo de Williams y cols, y esta versión de la proteína es la que se identificó en los experimentos de identificación de *Vg* en los tiempos de desarrollo analizados.

En cuanto al análisis densitométrico de *Vg* respecto al control de carga actina, se evidenció que la síntesis de la proteína en los tiempos evaluados (59, 84, 92, 100, 108 y 116h) (**Figura**

58) varía de forma considerable en cada uno de estos tiempos, lo cual permite sugerir de nuevo que el proceso de colecta de embriones y el asincronismo en el tiempo de desarrollo de las larvas también influye a nivel de proteína para poder visualizar una dinámica real de Vg durante los tiempos evaluados. Al analizar la proteína Vg en el estadio adulto de la mosca, esta proteína no fue identificada, lo cual está en concordancia con estudios en los que se afirma que esta proteína es requerida para el proceso proliferativo y de diferenciación del ala y para la diferenciación del músculo en la larva de *D. melanogaster* (Deng et al., 2010). Por tanto, en el estadio adulto han culminado los procesos que están directamente involucrados en el desarrollo larvario y la proteína no se sintetiza en la mosca adulta (Brody, 1996).

Los resultados de la expresión de Vg en los discos imagales alares refuerza el rol fundamental de esta proteína en la formación de estas estructuras durante el desarrollo larvario. Además, las diferencias observadas entre Vg total en la larva, comparado con la proteína observada en los discos imagales puede ser explicado por el hecho de que se ha descrito que Vg participa en otros procesos durante el desarrollo larvario (Bernard et al., 2003; Deng et al., 2009, 2010).

Como se observa en las moscas mutantes de *vg*, el ARNi para *vg* genera individuos con alas de tamaño reducido (**Figura 59D**), como muchos autores reportaron previamente expresando un elemento de *vg*ARNi en *D. melanogaster* (C. M. Clark-Hachtel et al., 2013; Muñoz-Nava et al., 2020).

De acuerdo con lo anterior, se reportó un curso temporal del ARNm y proteína Vg durante el desarrollo larvario de *D. melanogaster* y *D. simulans*. Los resultados sugieren que el ARNm de *vg* no necesariamente es equivalente con la producción de la proteína que codifica, sugiriendo la existencia de un mecanismo post-transcripcional que puede asegurar una expresión y función apropiada de esta proteína conservada evolutivamente.

13.4. Resumen de resultados

- ∴ Se obtuvieron las condiciones adecuadas para la extracción de ADN para la estandarización de los oligonucleótidos especie-específicos y la extracción de ARN mensajero y proteína para la identificación de *vg* en el desarrollo de *D. melanogaster* y *D. simulans*.
- ∴ Se determinó que los niveles del mensajero de *vg* en las diferentes especies y sus tiempos de desarrollo puede variar ampliamente de acuerdo con los procedimientos y protocolos de colecta de embriones, además de las correlaciones indirectas entre ARNm y proteína en estos sistemas eucariotas de acuerdo con los niveles de regulación post-transcripcionales.

13.5. Perspectivas

- ∴ Realizar una mejora en los protocolos de colecta de embriones para obtener individuos con un tiempo de desarrollo sincrónico.
- ∴ Evaluar mediante un curso temporal la expresión del mensajero y de síntesis de *Vg* a nivel molecular para correlacionar con la dinámica de *Vg* descrita por otros autores y en otras especies del grupo *Drosophila*.

APÉNDICE II

Artículos publicados

The *vestigial* Quadrant Enhancer is dispensable for pattern formation and development of the *Drosophila* wing

Keity J Farfán-Pira¹, Teresa I Martínez-Cuevas¹, Rosalio Reyes¹, Timothy A Evans², Marcos Nahmad^{1§}

¹Department of Physiology, Biophysics, and Neurosciences, Centre for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (Cinvestav-IPN)

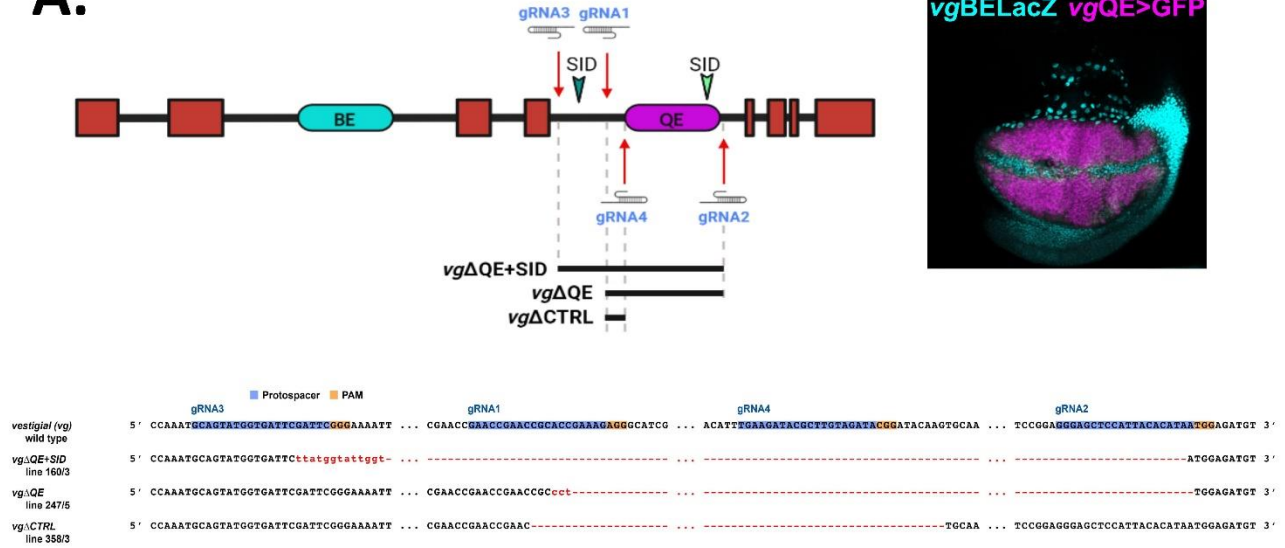
²Department of Biological Sciences, University of Arkansas

[§]To whom correspondence should be addressed: mnahmad@fisio.cinvestav.mx

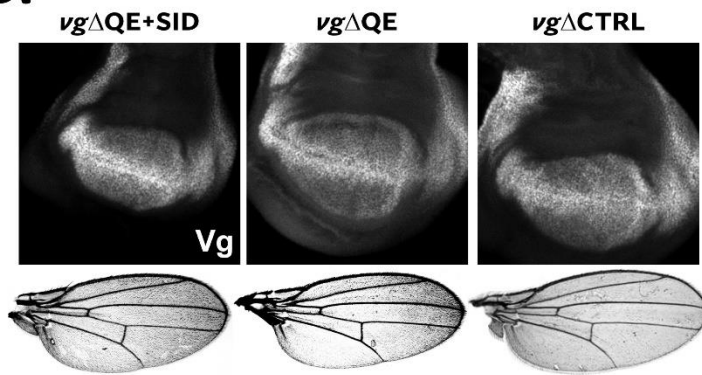
Abstract

In *Drosophila*, the pattern of the wing selector gene, *vestigial* (*vg*), is established by at least two enhancers: the Boundary Enhancer, which drives expression along the disc's Dorsal-Ventral boundary; and the Quadrant Enhancer (QE) that patterns the rest of the wing pouch. Using CRISPR/Cas9 editing, we deleted DNA fragments around the reported QE sequence and found that the full Vg pattern is formed. Furthermore, adult wings arising from these gene-edited animals are normal in shape and pattern, but slightly smaller in size, although this reduction is not wing-specific in males. We suggest that other enhancers act redundantly to establish the *vg* pattern and rescue wing development.

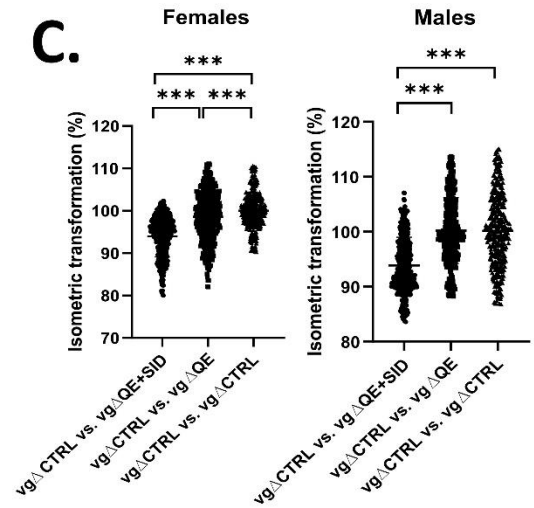
A.



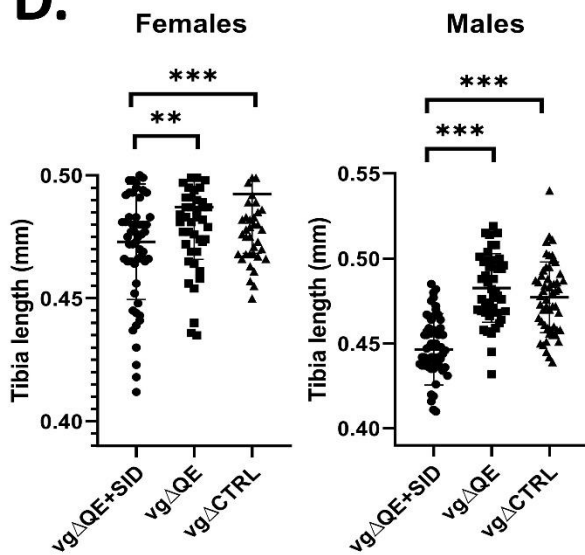
B.



C.



D.



E.

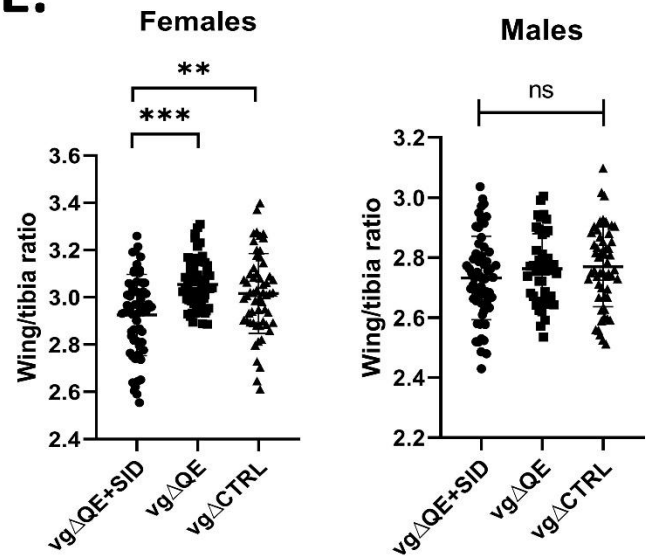


Figure 1. Vg patterning and adult wing development is largely unaffected in CRISPR-edited animals that lack the QE sequence.

(A) Scheme of the *vg* gene showing the two intronic enhancers (BE, Boundary Enhancer; QE, Quadrant Enhancer) that account for the full Vg pattern in the third-instar wing imaginal disc (photo in the right: *vgBELacZ*=reporter of the BE marked by β Gal immunostaining; *vgQE>GFP*=reporter of the QE marked by GFP expression under the Gal4-UAS system). The location of gRNAs (marked by red arrows) that were used to delete different fragments (black bars) within the fourth intron that contains the QE are shown: *vg* Δ QE+SID (gRNA3 and gRNA2, that contains an additional SID (green arrowhead) outside of the reported QE element), *vg* Δ QE (gRNA1 and gRNA2), or *vg* Δ CTRL. The sequencing results confirming each of the CRISPR/Cas9 deleted elements are shown; gRNAs protospacers (highlighted in blue) and PAM sites (highlighted in orange) are illustrated; sequence mismatches are displayed in red font. **(B)** Photos of representative wing imaginal discs displaying late third-instar larvae immunostained with Vg and female adult wings for each of the CRISPR/Cas9 edited lines. **(C)** Pairwise comparison of control vs. QE-deleted wings. An isometric transformation is applied to each control wing to match an experimental wing and the isometric transformation factor (in %) is plotted. Female and male wings are independently compared. Groups that are statistically significant after a one-way ANOVA analysis are shown. **(D, E)** Comparison of anterior tibia lengths (D) and wing to tibia length ratios (E) in each of the CRISPR/Cas9 edited lines. Female and male animals are independently compared. Groups that are statistically significant after a one-way ANOVA analysis are shown. (**:p-value<0.005; ***:p-value<0.0005; ns: not statistically-significant).

Description

Activation of gene expression during development is controlled by enhancers, which are DNA sequences that contain transcription factor binding sites and drive the recruitment of the transcriptional machinery in a context-specific manner (Field & Adelman, 2020; Furlong & Levine, 2018; Long et al., 2016). Complex developmental patterns often require the action of one or multiple enhancers, which are precisely coordinated in space and time. Sometimes, two or more *cis*-regulatory elements establish an overlapping pattern of gene expression and they are referred as shadow enhancers (Hong et al., 2008). Shadow enhancers appear to be widespread in metazoan genomes suggesting that their role may be evolutionary conserved to confer robust gene expression patterns under genetic or environmental perturbations (Kvon et al., 2021).

In *Drosophila*, wing fate is determined by the expression of the selector gene, *vestigial* (*vg*), which is confined to an area within the wing imaginal disc referred as the wing pouch (Kim et al., 1996; Williams et al., 1991; Williams et al., 1993). The *vg* pattern is established by two intronic enhancers: the Margin or Boundary Enhancer (BE), and the Quadrant Enhancer (QE; Fig. 1A). Early in wing disc development, the BE drives *vg* expression in cells abutting the Dorsal-Ventral (DV) boundary (cyan staining, Fig. 1A) in response to a short-range Delta/Serrate-Notch and Wingless (Wg) signaling (Couso et al., 1995; de Celis et al., 1996; Doherty et al., 1996; Irvine & Vogt, 1997; Kim et al., 1995; Williams et al., 1994). As these Vg-expressing cells proliferate, they leave the DV

signaling center, but maintain *vg* expression presumably through Polycomb/Trithorax Responsive Elements (PRE) and *Vg* autoregulation (Ahmad & Spens, 2019; Halder et al., 1998; Klein & Arias, 1999; Pérez et al., 2011; Simmonds et al., 1998). In addition, the QE drives *vg* expression in the rest of the wing pouch through the integration of several signaling networks including the long-range action of the *Wg* and Decapentaplegic (*Dpp*) morphogens (Kim et al., 1996; Klein & Arias, 1998; Lecuit & Cohen, 1998; Nellen et al., 1996; Neumann & Cohen, 1996; Zecca et al., 1996) and a *Fat/Dachsous* polarization signal that results in the recruitment of *Vg* in neighboring cells (Zecca & Struhl, 2007a; Zecca & Struhl, 2007b; Zecca & Struhl, 2010). At the transcriptional level, the recruitment signal depends on the nuclear translocation of Yorkie (*Yki*), the effector of the Warts-Hippo tumor suppressor pathway, which binds the TEAD-transcription factor Scalloped (*Sd*) and activate *vg* expression through Scalloped-Interaction Domains (SIDs) (Simmonds et al., 1998; Zecca & Struhl, 2010). A bioinformatic analysis reveals two SIDs within the fourth intron of the *vg* gene; one within the reported QE sequence (Klein & Arias, 1999; Williams et al., 1994; Zecca & Struhl, 2007a) and another one located 544 base pairs upstream of it (Fig. 1A).

Transgenic reporters show that the QE can drive *vg* expression in most of the wing pouch (magenta staining, Fig. 1A), but it is unknown whether or not the QE is necessary for *vg* expression and wing development. In order to investigate this, we designed guide RNAs (gRNAs) to delete the reported QE (*vg* Δ QE; using gRNA1 and gRNA2, Fig. 1A) or the reported QE plus the additional SID (*vg* Δ QE+SID; using gRNA3 and gRNA2, Fig. 1A) using CRISPR/Cas9 Non-Homologous EndJoining (NHEJ) technology (see Methods; Evans, 2017; Port et al., 2014). As a control, we deleted a small piece of DNA that does not overlap with the reported QE sequence nor contains a SID (*vg* Δ CTL; using gRNA1 and gRNA4; Fig. 1A). However, none of these deletions have an effect in the *Vg* pattern of late third-larval wing discs, which appears to cover all the wing pouch, nor in the shape and pattern of the adult wing (Fig. 1B). We did notice a minor, albeit significant reduction in wing size of the *vg* Δ QE+SID line in both males and females with respect to the other deletions (Fig. 1C). Strikingly however, this reduction is not specific to the wing, as measurements of anterior legs' tibiae are also significantly smaller in *vg* Δ QE+SID animals with respect to the other lines, especially in males (Fig. 1D). In fact, when each wing measurement is normalized to the length of the corresponding tibia (wing to tibia ratio), we found that the size difference only persists in females (Fig. 1E), suggesting that *vg* Δ QE+SID males are proportionally smaller. These results highlight the potential impact of the additional SID on size control. Taken together, our data suggest that the QE is not required for *Vg* nor wing patterning, except for small sex-specific effects in animal size that occur only with an additional SID is deleted. However, we cannot rule out that *Vg* expression levels or its dynamics may be affected by the deletions.

Given the importance of *Vg* expression for wing differentiation, other regulatory elements may ensure that animals develop fully functional wings upon genetic mutations in the QE. This suggests the existence of shadow enhancers within the *Drosophila* genome that rescue the *Vg* pattern in the absence of the QE. These shadow enhancers likely respond to the same signaling pathways since the *Vg* pattern does not expand without these signals (Zecca & Struhl, 2007b). In addition, our data reveal the potential impact of SIDs on animal size. How could a regulatory sequence within the wing selector gene have an effect in the overall size of an animal? One possibility is that SIDs affect overall size

through Yki-Sd binding, which is known to promote cell growth and/or proliferation in a plethora of systems (Goulev et al., 2008; Hariharan, 2015; Huang et al., 2005; Wu et al., 2008). Alternatively, perhaps the *vg* Δ QE+SID deletion affects size in a wing-specific manner and inter-organ coordination of size is established through systemic signals (Boulan et al., 2019; Colombani et al., 2012; Mesquita et al., 2010). Another interesting finding to explore in future work is the sex-specific wing vs. overall size difference (Fig. 1D,E). Since the *sd* gene is located in the first chromosome (Dmel\sd, FlyBase ID FBgn0003345), it is plausible that males and females respond differently to SID deletions. Finally, since *vg* is an evolutionary-conserved wing selector gene in insects (Abouheif & Wray, 2002; Clark-Hachtel et al., 2013; Clark-Hachtel et al., 2021; Zhang et al., 2021), our work highlights the impact of CRISPR/Cas9 editing to understand the contribution of regulatory elements to wing diversity (Medved et al., 2015; Linz & Tomoyasu, 2018).

gRNA design

Target sites were designed using flyCRISPR online tool CRISPR Optimal Target Finder (<https://flycrispr.org>) (Iseli et al., 2007; Gratz et al., 2014).

Construction of gRNA plasmid

Cloning was performed using pCFD4-U6:1_U6:3tandemgRNAs vector, that allows in-tandem expression of gRNA sequences (Port et al., 2014; Evans, 2017), through PCR products using pair of primers 1 and 2, 2 and 3, 1 and 4, and 3 and 4 (see Reagents), amplified with 2X Phusion Flash PCR Master Mix. Gibson Assembly was performed with PCR products and pCFD4 *Bbs*I digested vector. Clonings was confirmed by Sanger sequencing by Eurofins Genomics prior to injection.

Identification of CRISPR-modified alleles

The *vg*^{QE} gRNA plasmid was injected into *nos*-Cas9 embryos by Best Gene (Chino Hills, CA). Injected individuals (G0) were crossed as adults to *Sco/CyORFP*. Founders (G0 flies producing F1 progeny carrying modified QE alleles) were identified using pools of three females derived from each G0 cross by PCR with primers 5 and 12 (for *vg* Δ QE+SID) or 12 and 13 (for *vg* Δ QE and *vg* Δ CTRL) which produce 0.5-kb or 1.5-kb respectively when the respective NHEJ (Non-Homologous End Joining) are present. From each identified founder, 5-10 F1 males were then crossed individually to *Sco/CyORFP* virgin females. After 3 days, F1 males were removed from the crosses and tested by PCR with the same set of primers to verify if they carried the modified allele. F2 flies from F1 crosses were used to generate balanced stocks, and the modified alleles were sequenced from genomic DNA using primers 12, 18 and 13 (see Reagents).

Fly stocks and wing imaginal disc immunostaining

The disc shown in Fig. 1A was obtained by crossing flies carrying a transgenic reporter of the *vg* BE in the second chromosome (*vg*BELacZ [obtained from Marco Milán]) with flies expressing nuclear GFP under the Gal4-UAS system (*vg*MQGal4 / SM6; UAS-GFPnls / TM6B, Tb). For the immunostaining, wandering third-instar larvae were dissected in PEM (Na-Pipes 80mM + EGTA 5mM) solution. The internal tissue of anterior part was exposed with independent needles and larvae were fixed in 4%

paraformaldehyde solution during 40 minutes at room temperature. Dissected larvae were then washed three times in PEM-T solution (PEM + Triton X100) in agitation for 10 minutes. Subsequently, samples were incubated with a blocking solution that contains PEM-T and 0.5% Bovine Serum Albumin (BSA), for two hours in agitation at room temperature. Blocking solution was discarded and primary antibodies were added (mouse anti- β Galactosidase at 1:1000 in Fig. 1A [no antibody was needed to detect GFP]; and Guinea-pig anti-Vg [kindly provided by Gary Struhl] at 1:200 in Fig. 1B) in staining solution (blocking solution + 1% Normal Goat Serum) and incubated overnight at 4 °C.

Primary antibodies were recovered, and the sample was washed three times with PEM-T solution at room temperature for 10 minutes. Incubations with secondary antibodies were performed with Alexa Fluor 647 anti-mouse (Fig. 1A) and Alexa Fluor 594 anti-Guinea Pig (Fig. 1B) at a concentration of 1:1000 each for two hours at room temperature in the dark. The sample was washed once again three times with PEM-T solution and one time with PEM solution for 10 minutes at room temperature in the dark. Discs were dissected and mounted using a stereoscopic microscope (Nikon SMZ800) in 15 μ l of Mowiol solution.

Confocal microscopy and image capture

Imaginal wing disc micrographs were taken using a Spectral confocal microscope (Leica TCS-SP8) using a 63x objective (PL APO CS2, 63x, App. Num. 1.4 oil immersion) and the following specifications in LAS X software: Format 1024 x 1024, speed 600, Frame average 4, Phase X -33.48, Zoom factor 1.00, Z-step size 0.50, Smart gain 776.8 V, Smart offset -3.0% and Pinhole 1 AV. The images were stored in ".lif" format and subsequently analyzed with ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) (Schneider et al., 2012). Values and statistical analysis were plotted in GraphPad Prism version 8.0.1.

Isometric transformation

Using Python (3.7.6), we developed a code that given two numpy arrays of the same length (referred with the sub-index 1 and 2):

1. Standardizes the two arrays in such a way the centroid of each array is brought to the origin of coordinates.
2. Returns the isometric transformation factor (Fig. 1C), that minimizes the sum:

$$\sum (x1i - \mu x2i)^2 + (y1i - \mu y2i)^2$$

where $(x1i, y1i)$ are the coordinates of the i -th point of the standardized array 1 and μ is the contraction factor. These points are selected to be the intersection between each vein or intervein with each other or with the wing margin.

Wing/tibia measures

Adult flies of $vg\Delta QE+SID$, $vg\Delta QE$, and $vg\Delta CTRL$ lines were separated by sex, using a stereoscopic microscope (Nikon SMZ800) and preserved in 1ml 70% ethanol for

dehydration for 12 hours. Each specimen was dissected in 15µl of 50% ethanol to obtain each pair of wings the corresponding pair of front legs mounted in microscope slides.

Wings and legs were photographed in a binocular microscope (Nikon Eclipse Ci) attached to a camera (ProgRes® CT5, Jenoptik) to allow measures (in wings, length of area between veins L3 and L4; in legs, length of tibia), using the ProgRes® Capture Pro-2.9 software. Measurements were performed using ImageJ software 1.53c (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) using corresponding calibration for 4X objective (Distance in pixels: 100.501; known distance: 0.1; pixel aspect ratio: 1.0, unit of length: mm). Ratio of each wing to tibia proximal distal length were plotted using GraphPad Prism version 8.0.1.

Statistical analysis

A one-way ANOVA was performed to compare the wing to tibia ratios of each of the fly lines generated through CRISPR, with $\alpha = 0.05$. Subsequently, to establish the significant differences between groups, Tukey's range test was performed with $\alpha = 0.05$.

Reagents

REAGENT	SOURCE	IDENTIFIER
PIPES sodium salt	Sigma-Aldrich	Sigma Prod. No. P2949
EGTA Ethylene glycol-bis(2-amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid	Sigma-Aldrich	Sigma Prod. No. E3889
Triton X-100	Sigma-Aldrich	Sigma Prod. No. T9284

8% paraformaldehyde	Electron Microscopy Science	Cat. # 157-8
Bovine Serum Albumin BSA	Sigma-Aldrich	Sigma Prod. No. A2058
Normal Goat Serum	Invitrogen	Catalog # 31872
GENOTYPE	AVAILABLE FROM	
vgBElacZ (II)	Marco Milán	
vgMQGal4;UAS-GFPnls	Bloomington Drosophila Stock Center, Stocks #8230 and #4776	
vgΔQE+SID	This study	

vgΔQE		This study	
vgΔCTRL		This study	
yw;nos-Cas9(III-attP2)/TM6,Tb,Sb		NIG-FLY # CAS-0012	
w; Sco/CyO-RFP		Generated in Evans laboratory	
PLASMID	GENOTYPE	DESCRIPTION	
pCFD4	pCFD4-U6:1_U6:3tandemgRNAs	Addgene plasmid # 49411; http://n2t.net/addgene:49411 ; Addgene_49411	RRID:
ANTIBODY		ANIMAL AND CLONALITY SOURCE	DESCRIPTION
Anti-Vestigial		Guinea pig polyclonal	Kindly provided by Gary Struhl (Columbia University)
Anti-β-Galactosidase		Mouse polyclonal, Promega	Catalog #Z378A
Alexa Fluor 594 goat anti-Guinea Pig IgG (H+L)		Thermo Scientific Fisher	Catalog # A-11076
Alexa Fluor 647 goat anti-Mouse IgG (H+L)		Thermo Scientific Fisher	Catalog #A-21236
OLIGO 5'-3'	NAME	SEQUENCE	
1	QE5'	GGAAAGATATCCGGGTGAACTTCGAACCGAACCGCACCGA AAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	
2	QE3'	GCTATTTCTAGCTCTAAACTTATGTGTAATGGAGCTCCC GACGTTAAATTGAAAATAGGTC	
3	TEA2	GGAAAGATATCCGGGTGAACTTCGCAGTATGGTGATTCTCGA TTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	
4	Neg	GCTATTTCTAGCTCTAAACTATCTACAAGCGTATCTTCC GACGTTAAATTGAAAATAGGTC	
5	LHA1- F	ACATGCATGCATGTGGAATGCCACCACTTTGTGCG	
12	RHA3-R	CCGCTCGAGGAAATCGCGCGACGCCGCC	

13	LHA RecSp-F	CGCGGATCCCTAGTTGGAATGTGCTAT
18	coILHA2-F	GCTGCTCGAAAATAACTGGG

Acknowledgments: We thank to The Company of Biologists for Travelling Fellowship grant DEVTF2105555 (<https://www.biologists.com/travelling-fellowships/>) awarded to Keity J. Farfán-Pira; to José Luis Fernández-López and Rafael Rodríguez-Muñoz for technical assistance and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of Mexico (CONACyT) for PhD fellowship (487729) awarded to Keity J. Farfán-Pira. We also thank members of the Nahmad and Evans laboratories for discussions.

References

- Abouheif E, Wray GA. 2002. Evolution of the gene network underlying wing polyphenism in ants. *Science* 297: 249-52. PubMed ID: [12114626](#)
- Ahmad K, Spens AE. 2019. Separate Polycomb Response Elements control chromatin state and activation of the vestigial gene. *PLoS Genet* 15: e1007877. PubMed ID: [31425502](#)
- Boulan L, Andersen D, Colombani J, Boone E, Léopold P. 2019. Inter-Organ Growth Coordination Is Mediated by the Xrp1Dilp8 Axis in *Drosophila*. *Dev Cell* 49: 811-818.e4. PubMed ID: [31006647](#)
- Clark-Hachtel C, Fernandez-Nicolas A, Belles X, Tomoyasu Y. 2021. Tergal and pleural wing-related tissues in the German cockroach and their implication to the evolutionary origin of insect wings. *Evol Dev* 23: 100-116. PubMed ID: [33503322](#)
- Clark-Hachtel CM, Linz DM, Tomoyasu Y. 2013. Insights into insect wing origin provided by functional analysis of vestigial in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 16951-6. PubMed ID: [24085843](#)
- Colombani J, Andersen DS, Léopold P. 2012. Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science* 336: 582-5. PubMed ID: [22556251](#)
- Couso JP, Knust E, Martinez Arias A. 1995. Serrate and wingless cooperate to induce vestigial gene expression and wing formation in *Drosophila*. *Curr Biol* 5: 1437-48. PubMed ID: [8749396](#)
- de Celis JF, Garcia-Bellido A, Bray SJ. 1996. Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Development* 122: 359-69. PubMed ID: [8565848](#)
- Doherty D, Feger G, Younger-Shepherd S, Jan LY, Jan YN. 1996. Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes Dev* 10: 421-34. PubMed ID: [8600026](#)

Evans TA. 2017. CRISPR-based gene replacement reveals evolutionarily conserved axon guidance functions of *Drosophila* Robo3 and *Tribolium* Robo2/3. *Evodevo* 8: 10. PubMed ID: [28588759](#)

Field A, Adelman K. 2020. Evaluating Enhancer Function and Transcription. *Annu Rev Biochem* 89: 213-234. PubMed ID: [32197056](#)

Furlong EEM, Levine M. 2018. Developmental enhancers and chromosome topology. *Science* 361: 1341-1345. PubMed ID: [30262496](#)

Goulev Y, Fauny JD, Gonzalez-Marti B, Flagiello D, Silber J, Zider A. 2008. SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *Drosophila*. *Curr Biol* 18: 435-41. PubMed ID: [18313299](#)

Gratz SJ, Ukken FP, Rubinstein CD, Thiede G, Donohue LK, Cummings AM, O'Connor-Giles KM. 2014. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics* 196: 961-71. PubMed ID: [24478335](#)

Halder G, Polaczyk P, Kraus ME, Hudson A, Kim J, Laughon A, Carroll S. 1998. The Vestigial and Scalloped proteins act together to directly regulate wing-specific gene expression in *Drosophila*. *Genes Dev* 12: 3900-9. PubMed ID: [9869643](#)

Hariharan IK. 2015. Organ Size Control: Lessons from *Drosophila*. *Dev Cell* 34: 255-65. PubMed ID: [26267393](#)

Hong JW, Hendrix DA, Levine MS. 2008. Shadow enhancers as a source of evolutionary novelty. *Science* 321: 1314. PubMed ID: [18772429](#)

Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D. 2005. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* 122: 421-34. PubMed ID: [16096061](#)

Irvine KD, Vogt TF. 1997. Dorsal-ventral signaling in limb development. *Curr Opin Cell Biol* 9: 867-76. PubMed ID: [9425353](#)

Iseli C, Ambrosini G, Bucher P, Jongeneel CV. 2007. Indexing strategies for rapid searches of short words in genome sequences. *PLoS One* 2: e579. PubMed ID: [17593978](#)

Kim J, Irvine KD, Carroll SB. 1995. Cell recognition, signal induction, and symmetrical gene activation at the dorsal-ventral boundary of the developing *Drosophila* wing. *Cell* 82: 795-802. PubMed ID: [7671307](#)

Kim J, Sebring A, Esch JJ, Kraus ME, Vorwerk K, Magee J, Carroll SB. 1996. Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila* vestigial gene. *Nature* 382: 133-8. PubMed ID: [8700202](#)

Klein T, Arias AM. 1998. Interactions among Delta, Serrate and Fringe modulate Notch activity during *Drosophila* wing development. *Development* 125: 2951-62. PubMed ID: [9655817](#)

Klein T, Arias AM. 1999. The vestigial gene product provides a molecular context for the interpretation of signals during the development of the wing in *Drosophila*. *Development* 126: 913-25. PubMed ID: [9927593](#)

Kvon EZ, Waymack R, Gad M, Wunderlich Z. 2021. Enhancer redundancy in development and disease. *Nat Rev Genet* 22: 324-336. PubMed ID: [33442000](#)

Lecuit T, Cohen SM. 1998. Dpp receptor levels contribute to shaping the Dpp morphogen gradient in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* 125: 4901-7. PubMed ID: [9811574](#)

Linz DM, Tomoyasu Y. 2018. Dual evolutionary origin of insect wings supported by an investigation of the abdominal wing serial homologs in *Tribolium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: E658-E667. PubMed ID: [29317537](#)

Long HK, Prescott SL, Wysocka J. 2016. Ever-Changing Landscapes: Transcriptional Enhancers in Development and Evolution. *Cell* 167: 1170-1187. PubMed ID: [27863239](#)

Medved V, Marden JH, Fescemyer HW, Der JP, Liu J, Mahfooz N, Popadić A. 2015. Origin and diversification of wings: Insights from a neopteran insect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 15946-51. PubMed ID: [26668365](#)

Mesquita D, Dekanty A, Milán M. 2010. A dp53-dependent mechanism involved in coordinating tissue growth in *Drosophila*. *PLoS Biol* 8: e1000566. PubMed ID: [21179433](#)

Nellen D, Burke R, Struhl G, Basler K. 1996. Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* 85: 357-68. PubMed ID: [8616891](#)

Neumann CJ, Cohen SM. 1996. A hierarchy of cross-regulation involving Notch, wingless, vestigial and cut organizes the dorsal/ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* 122: 3477-85. PubMed ID: [8951063](#)

Pérez L, Barrio L, Cano D, Fiuza UM, Muzzopappa M, Milán M. 2011. Enhancer-PRE communication contributes to the expansion of gene expression domains in proliferating primordia. *Development* 138: 3125-34. PubMed ID: [21715425](#)

Port F, Chen HM, Lee T, Bullock SL. 2014. Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E2967-76. PubMed ID: [25002478](#)

Simmonds AJ, Liu X, Soanes KH, Krause HM, Irvine KD, Bell JB. 1998. Molecular interactions between Vestigial and Scalloped promote wing formation in *Drosophila*. *Genes Dev* 12: 3815-20. PubMed ID: [9869635](#)

Williams JA, Bell JB, Carroll SB. 1991. Control of *Drosophila* wing and haltere development by the nuclear vestigial gene product. *Genes Dev* 5: 2481-95. PubMed ID: [1752439](#)

Williams JA, Paddock SW, Carroll SB. 1993. Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing *Drosophila* wing disc into discrete subregions. *Development* 117: 571-84. PubMed ID: [8330528](#)

Williams JA, Paddock SW, Vorwerk K, Carroll SB. 1994. Organization of wing formation and induction of a wing-patterning gene at the dorsal/ventral compartment boundary. *Nature* 368: 299-305. PubMed ID: [8127364](#)

Wu S, Liu Y, Zheng Y, Dong J, Pan D. 2008. The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Dev Cell* 14: 388-98. PubMed ID: [18258486](#)

Zecca M, Basler K, Struhl G. 1996. Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* 87: 833-44. PubMed ID: [8945511](#)

Zecca M, Struhl G. 2007a. Control of *Drosophila* wing growth by the vestigial quadrant enhancer. *Development* 134: 3011-20. PubMed ID: [17634191](#)

Zecca M, Struhl G. 2007b. Recruitment of cells into the *Drosophila* wing primordium by a feed-forward circuit of vestigial autoregulation. *Development* 134: 3001-10. PubMed ID: [17634192](#)

Zecca M, Struhl G. 2010. A feed-forward circuit linking wingless, fat-dachsous signaling, and the warts-hippo pathway to *Drosophila* wing growth. *PLoS Biol* 8: e1000386. PubMed ID: [20532238](#)

Zhang JL, Fu SJ, Chen SJ, Chen HH, Liu YL, Liu XY, Xu HJ. 2021. Vestigial mediates the effect of insulin signaling pathway on wing-morph switching in planthoppers. *PLoS Genet* 17: e1009312. PubMed ID: [33561165](#)

Funding: This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of Mexico (Conacyt), [grant number CB-2014-01-236685] to Marcos Nahmad.

Author Contributions: Keity J Farfán-Pira: data curation, formal analysis, investigation, methodology, writing - original draft, visualization. Teresa I Martínez-Cuevas: conceptualization, methodology. Rosalio Reyes: data curation, formal analysis. Timothy A Evans: conceptualization, formal analysis, methodology, resources, supervision, validation, writing - original draft, visualization. Marcos Nahmad: conceptualization, funding acquisition, project, supervision, writing - review editing.

Reviewed By: [Anonymous](#)

History: Received April 2, 2022 **Revision Received** June 7, 2022 **Accepted** June 9, 2022 **false Published online** June 13, 2022 **Indexed** June 13, 2022

Copyright: © 2022 by the authors. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Citation: Farfán-Pira, KJ; Martínez-Cuevas, TI; Reyes, R; Evans, TA; Nahmad, M (2022). The *vestigial* Quadrant Enhancer is dispensable for pattern formation and development of the *Drosophila* wing. *microPublication Biology*.

[10.17912/micropub.biology.000585](https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000585)

