



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y
NEUROCIENCIAS

“Robustez y precisión en la formación de patrones y origen
de la asimetría Anterior-Posterior en el desarrollo del ala de
la mosca *Drosophila melanogaster*”

TESIS

Que presenta:

M. en C. ROSALÍO ALEJANDRO REYES REYES

Para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias

en la especialidad de Fisiología Celular y Molecular

Director de Tesis:
Dr. Marcos Nahmad Bensusan

Ciudad de México

Diciembre 2024

Índice general

Agradecimientos	VII
Resumen	VIII
Abstract	x
1. Introducción	1
1.1. Desarrollo y diferenciación de patrones en <i>Drosophila melanogaster</i> . . .	3
1.2. La vía de señalización de Hh en el disco de ala	6
1.2.1. Robustez de los genes blanco de Hh	7
1.2.2. Determinación de las posiciones de las venas en el eje AP del disco alar de <i>Drosophila</i>	10
1.3. Señalización Dorsal-Ventral	12
1.4. El reclutamiento celular y la expansión de <i>vestigial</i> en el disco alar . .	14
2. Justificación	16
3. Hipótesis	18
4. Objetivos particulares	19
4.1. Análisis de la robustez y precisión diferencial de la señalización de la vía de Hh	19
4.2. El reclutamiento celular y el origen de la asimetría AP del ala de <i>Drosophila</i>	19

5. Materiales y Métodos	21
5.1. Cepas y cruzas	21
5.2. Disección e inmunohistoquímica del disco imagal del ala	22
5.3. Análisis de imágenes	23
5.3.1. Análisis de la robustez y precisión diferencial de la señalización de la vía de Hh	23
5.3.2. El reclutamiento celular y el origen de la asimetría AP del ala de <i>Drosophila</i>	24
5.4. Montaje de las alas y áreas de las alas	24
5.5. Análisis de Procrustes	25
5.6. Simulaciones numéricas	27
6. Resultados	29
6.1. Análisis de la robustez y precisión diferencial de la señalización de la vía de Hh	29
6.1.1. La interpretación estacionaria del gradiente del morfógeno predice la misma robustez para todos los genes blancos	29
6.1.2. La interpretación dinámica del gradiente de Hh predice robustez diferencial	33
6.1.3. La robustez del estado estacionario depende de la regulación de Ptc por Hh	37
6.1.4. La expresión de Col es más robusta que la expresión de Dpp en el disco de ala de la mosca	38
6.1.5. El modelo del overshoot predice mayor precisión en el establecimiento del borde de <i>dpp</i> que lo predicho por el modelo clásico en el estado estacionario	39
6.2. El reclutamiento celular y el origen de la asimetría AP del ala de <i>Drosophila</i>	42

6.2.1.	La atenuación del reclutamiento celular afecta principalmente el compartimento L5-M y el borde del ala, mientras que el patrón de venas se mantiene intacto	42
6.2.2.	Las alas con reclutamiento atenuado son más simétricas con respecto al eje AP en comparación con las alas silvestres . . .	47
6.2.3.	El patrón <i>vg</i> de los discos con reclutamiento atenuado celular mantiene las proporciones entre sus secciones intervenas . . .	48
6.2.4.	El patrón de <i>vg</i> es más circular en discos de alas con reclutamiento atenuado	49
7.	Discusión	53
7.1.	Análisis de la robustez y precisión diferencial de la señalización de la vía de Hh	53
7.2.	El reclutamiento celular y el origen de la asimetría AP del ala de <i>Drosophila</i>	56
8.	Conclusiones	60
9.	Perspectivas	61

Índice de figuras

1.1. Ejes y patrón de venas del ala de <i>Drosophila</i>	4
1.2. El disco de ala es un tejido epitelial pseudo-estratificado que da origen al ala adulta.	5
1.3. Dinámica del gradiente de Hh.	8
1.4. Formación de patrones en el eje AP en el disco imagal de <i>Drosophila</i>	11
5.1. Análisis de Procrustes para la comparación de formas	26
6.1. El modelo estacionario predice robustez uniforme ante variaciones en la fuente del morfógeno, mientras que el modelo dinámico predice robustez diferencial.	31
6.2. Análisis de la robustez de diferentes genes blanco en un modelo completo de Hh, confirmando la robustez diferencial.	37
6.3. La robustez del estado estacionario depende de la regulación de <i>ptc</i>	39
6.4. Robustez diferencial de los genes blanco de Hh.	40
6.5. El área de la bolsa de los discos de ala no cambia en los discos mutantes.	40
6.6. Diferencias en el ancho de los patrones de <i>col</i> y <i>dppLacZ</i> en discos <i>hh(+/+)</i> a diferentes valores de umbral.	41
6.7. El modelo de overshoot predice mayor precisión en el borde anterior de <i>dpp</i> que el modelo de estado estacionario.	43
6.8. La atenuación del reclutamiento celular afecta el área de la región L5-M y la forma del ala.	45

6.9. El efecto diferencial del reclutamiento celular también se observa en hembras.	46
6.10. La reducción de la región L5-M induce la simetrización del ala de <i>Drosophila</i>	48
6.11. El efecto de simetrización en alas con reclutamiento atenuado se acentúa al considerar un marco de referencia más representativo, compuesto de un mayor número de puntos sobre el ala.	49
6.12. La reducción del área L5-M en las alas adultas con reclutamiento atenuado no se observa durante el desarrollo larval.	50
6.13. La elipse que pasa por los pliegues HP y delimita la bolsa alar no puede recapitular la reducción de la región L5-M en animales sin reclutamiento.	51
6.14. El patrón de <i>vgQELacZ</i> en discos con reclutamiento atenuado es más circular que en los controles.	52
7.1. La interpretación dinámica del gradiente de Hh intercambia robustez por una mayor precisión de manera específica para cada gen blanco.	55
7.2. Las tensiones en el disco podrían explicar el cambio de excentricidad de la bolsa del disco ante una reducción del área L5-M.	59

Agradecimientos

- Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por la beca de doctorado 755168.
- Al Dr. Marcos Nahmad.
- Al Dr. Rafael Rodríguez Muñoz y al Sr. José Luis Fernández y a todos los alumnos del laboratorio del Dr. Marcos Nahmad.
- Al Dr. Rubén Contreras.
- A los Drs. Fanis Missirlis, José Antonio Arias, Matías Alvarado y Rafael Barrio.
- A los profesores del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- A todos los que apoyaron la culminación de este trabajo.

Resumen

En esta tesis abordo el estudio de dos problemas importantes en la biología del desarrollo: el establecimiento de patrones de expresión genética robustos y, a la vez, flexibles; y el problema del origen de las asimetrías en el desarrollo de un órgano.

En el desarrollo del ala de *Drosophila*, la señalización de Hedgehog (Hh) determina los patrones de expresión genética de *collier* (*col*) y *decapentaplegic* (*dpp*) utilizando las propiedades dinámicas del gradiente de Hh. En particular, el patrón de *col* se establece mediante un gradiente de Hh en el estado estacionario, mientras que el patrón de *dpp* se establece mediante un gradiente transitorio de Hh conocido como el *overshoot*. A partir de modelos matemáticos muestro que como consecuencia de esta interpretación dinámica de la información posicional, el sistema modula las propiedades de robustez y precisión de los patrones que define. Por ejemplo, la ubicación del borde anterior de *col* es más robusta que la de *dpp* frente a cambios en la dosis del morfógeno y proporciono evidencia experimental que respalda esta predicción. Sin embargo, el borde anterior del patrón de expresión de *dpp* que se establece por el overshoot, es mucho más preciso de lo que se esperaría si fuera definido por el gradiente estacionario. Por lo tanto, la interpretación dinámica de la señalización de Hh ofrece una compensación entre robustez y precisión, estableciendo propiedades específicas para cada gen blanco.

El ala de *Drosophila* es asimétrica a lo largo del eje Anterior-Posterior (AP), pero los orígenes del desarrollo de esta asimetría no habían sido explorados aún. En la segunda parte de esta tesis se estudia la contribución del reclutamiento celular, un proceso que induce la diferenciación del destino celular en el disco imagal del ala, a la

forma y patrón asimétricos del ala adulta. En condiciones experimentales que inhiben el reclutamiento celular en el disco imagal alar, se observa una ganancia significativa de simetría AP, resultado de una reducción de la región entre la vena longitudinal 5 y el margen del ala adulta (L5-M). Un análisis morfométrico confirma que la inhibición del reclutamiento celular resulta en un ala más simétrica en comparación con alas control, sugiriendo una contribución del reclutamiento celular al establecimiento de la asimetría AP. Para verificar si este fenotipo se origina durante el desarrollo larval, examino la expresión de un reportero para el gen selector de ala *vestigial* (*vg*) en las regiones pro-vena correspondientes del disco imagal; sin embargo, mis resultados no pudieron explicar el fenotipo observado en las alas adultas. No obstante, la circularidad del patrón de Vg aumenta significativamente en discos imagales con reclutamiento inhibido, sugiriendo que el reclutamiento celular puede contribuir a las asimetrías AP en el ala del adulto al alterar la redondez del patrón de Vg. De este estudio se concluye que el reclutamiento celular, un mecanismo generalizado que participa en el crecimiento y la formación de patrones en diversos sistemas en desarrollo, también tendría una participación al menos parcialmente, a la forma asimétrica del ala de *Drosophila*.

Abstract

In this thesis, I address two important problems in developmental biology: the establishment of robust yet flexible gene expression patterns and the origins of asymmetries in organ development.

During development of the *Drosophila* wing, Hedgehog (Hh) signaling establishes the gene expression patterns of *collier* (*col*) and *decapentaplegic* (*dpp*) using the dynamic properties of the Hh gradient. Specifically, the *col* pattern is established through a steady-state Hh gradient, while the *dpp* pattern is established via a transient Hh gradient known as the overshoot. Through mathematical modeling, I show that the dynamic interpretation of positional information allows the system to modulate the robustness and precision properties of the target patterns. For instance, the anterior boundary location of *col* is more robust than that of *dpp* in response to changes in morphogen dose, and I provide experimental evidence supporting this prediction. However, the anterior boundary of the *dpp* expression pattern, established by the overshoot, is significantly more precise than if it were defined by the steady-state gradient. Therefore, the dynamic interpretation of Hh signaling offers a trade-off between robustness and precision, establishing target-specific properties for each target gene.

The *Drosophila* wing is asymmetrical along the Anterior-Posterior (AP) axis, but the developmental origins of this asymmetry have not yet been explored. In the second part of this thesis, I study the contribution of cell recruitment—a process that induces cell fate differentiation in the wing imaginal disc—to the asymmetric shape and pattern of the adult wing. Under experimental conditions that inhibit

cell recruitment in the wing imaginal disc, a significant gain in AP symmetry is observed, resulting from a reduction of the region between the fifth longitudinal vein and the margin of the adult wing (L5-M). Morphometric analysis confirms that inhibiting cell recruitment results in a more symmetrical wing compared to control wings, suggesting a contribution of cell recruitment to AP asymmetry. To determine whether this phenotype originates during larval development, I examine the expression of a reporter for the selector gene *vestigial* (*vg*) in the corresponding pro-vein regions of the imaginal disc; however, my results could not explain the phenotype observed in adults wing. Nonetheless, the circularity of the Vg pattern significantly increases in imaginal discs with inhibited recruitment, suggesting that cell recruitment may contribute to AP asymmetry in the adult wing by altering the roundness of the Vg pattern. From this study, it is concluded that cell recruitment, a widespread mechanism involved in growth and pattern formation in various developmental systems, also likely contributes, at least partially, to the asymmetric shape of the *Drosophila* wing.

1. Introducción

El estudio de la formación de patrones de expresión genética en la biología del desarrollo puede rastrearse desde los trabajos de Spemann y Mangold sobre inducción embriónica (Spemann & Mangold, 2003). Estos trabajos revelaron que un pequeño grupo de células específicas puede orquestar el plan de desarrollo del embrión a través de una sustancia organizadora, conocida como el ‘organizador’, que emana de dichas células. Este hallazgo fue fundamental para comprender los procesos de señalización que rigen el desarrollo de los organismos, permitiendo una primera aproximación a los mecanismos que coordinarían el destino celular en los distintos tejidos. Pocos años después, aún sin conocerse los mecanismos que guiaban la inducción, *Drosophila melanogaster* surge como organismo modelo de la naciente genética moderna, impulsada por Thomas Hunt Morgan, y comienzan a vislumbrarse las primeras relaciones entre la genética y el desarrollo embrionario (Morgan, 1934).

Dado que experimentalmente aún no se contaban con las herramientas moleculares para identificar la naturaleza y los mecanismos de acción de las sustancias organizadoras, el problema encontró cabida en la biología teórica con los trabajos de Turing y Wolpert. Turing acuñó el concepto de morfógeno como una sustancia ‘generadora de formas’ capaz de establecer patrones periódicos de expresión y estudió las condiciones para las cuales podrían generarse patrones a partir de la reacción y difusión de estas sustancias utilizando modelos matemáticos (Turing, 1952). Por su parte, Wolpert retoma esta idea en su teoría de la información posicional y sugiere que el morfógeno, al alejarse de la fuente, forma un gradiente de concentración con el cual las células

podrían determinar su posición dentro del tejido y tomar el destino celular adecuado (Wolpert, 1969).

Estas teorías abrieron el camino para estudiar los mecanismos moleculares que regulan la morfogénesis en distintos organismos, desde invertebrados hasta vertebrados. En los vertebrados, estos modelos han permitido investigar aspectos fundamentales del desarrollo como la formación del tubo neural y la regionalización del sistema nervioso, mientras que en invertebrados como *Drosophila melanogaster*, se han utilizado para comprender la segmentación y la generación de órganos en diferentes ejes corporales.

Las ideas de Turing y Wolpert encontraron apoyo experimental en 1988, cuando se demostró que el producto del gen *bicoid* en *Drosophila*, establece posiciones y destinos celulares mediante un gradiente de concentración en el eje anteroposterior del embrión (Driever & Nüsslein-Volhard, 1988). Este hallazgo abrió una nueva era en la biología del desarrollo, que hizo posible en el descubrimiento de diversas familias de morfógenos, como Hedgehog, Wnt y TGF- β (Gilbert, 2016). La diversidad de morfógenos y sistemas también condujo al descubrimiento de mecanismos de propagación e interpretación de la información posicional.

La idea clásica de señalización por morfógenos asume que existe una fuente de donde emana un ligando intra o extracelular que forma un gradiente de concentración, y la información se establece una vez que el sistema llega al estado estacionario por medio de diferentes umbrales de concentración. Sin embargo, los sistemas vivos son muy dinámicos. Una vez recibida la señal del morfógeno, activan ríos abajo señales positivas o negativas que vuelven el proceso de diferenciación genética mucho más complejo que la simple lectura de un gradiente estacionario. Ese comportamiento dinámico se ha ejemplificado en muchos casos donde el gradiente del morfógeno no solo depende de su concentración en el estado estacionario, sino que también depende de la historia de exposición, como ocurre en el desarrollo del tubo neural del pollo, cuya formación de patrones es establecida por el morfógeno Sonic Hedgehog (Shh). Este morfógeno determina la expresión de genes blancos, como PAX6 y OLIG2,

NKX2.2, y PATCH1. La fuente de Shh, ubicada en la notocorda, crea un gradiente que va desde la región ventral hacia la dorsal del tubo neural (Danesin & Soula, 2017). Antes de la activación de Shh, el tejido expresa Pax6. Una vez activada la señal, Pax6 es inhibido y se expresa Olig2. Finalmente, en una subregión más cercana a la fuente de Shh, se activa NKX2.2. En un principio, se consideró que Shh actuaba como un morfógeno clásico (Ericson et al., 1997), pero en 2007 Dessaud y cols. mostraron que no basta con un gradiente estacionario para definir la secuencia de activación de genes de especificación neural tanto en el pollo como en el ratón (Dessaud et al., 2007). Estos estudios resaltan la interpretación temporal de señales como Shh, que requiere una acumulación de la señal en el tiempo para inducir la activación de genes clave en una secuencia ordenada.

1.1. Desarrollo y diferenciación de patrones en *Drosophila melanogaster*

D. melanogaster es un insecto holometábolo, lo que significa que atraviesa una etapa larval y adquiere sus características finales o adultas a través de una transformación completa llamada metamorfosis. Durante la etapa larvaria se desarrollan los primordios de cada órgano del adulto, denominados discos imagales. El tamaño final de los órganos adultos y sus proporciones están directamente relacionados con el tamaño alcanzado por estos discos justo antes de la pupación, que marca el inicio de la metamorfosis y se caracteriza por la formación de una carcasa que envuelve a la larva, llamada pupa.

En *Drosophila*, los ejes Anterior-Posterior (AP) y Dorsal-Ventral (DV) se establecen en las primeras etapas embrionarias, donde se activa el programa de desarrollo de los genes homeóticos que determinan los distintos segmentos del organismo (Carroll, 1995; Gehring & Hiromi, 1986; Gilbert, 2016). La segmentación del embrión transforma un embrión sin identidad en un embrión segmentado por la expresión de genes como *engrailed* (*en*) y *wingless* (*wg*), en bandas específicas (Perrimon, 1994). En la frontera

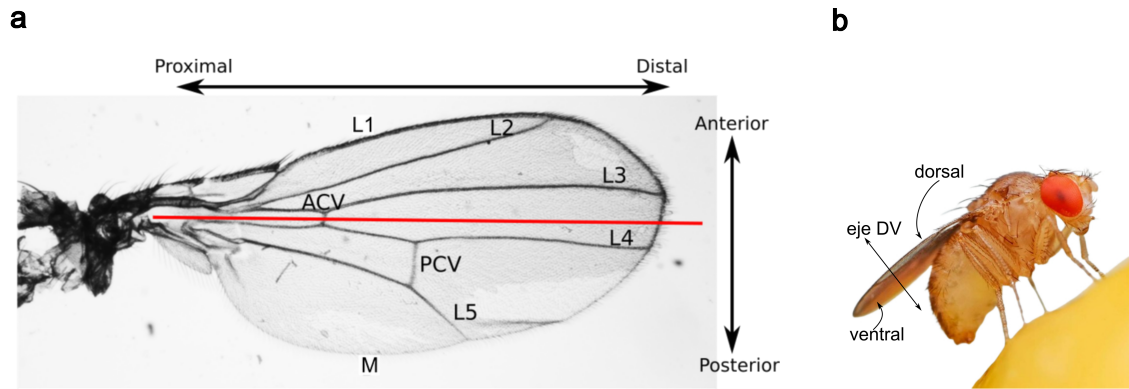


Figura 1.1: **Ejes y patrón de venas del ala de *Drosophila***. En el ala de la *Drosophila* se distinguen tres ejes anatómicos principales: Anterior-Posterior, Proximal-Distal (a) y Dorsal-Ventral (b). Además, en la figura a, se observa el patrón característico de venas longitudinales (L1-L5), que contribuyen a la estructura y función del ala. Las venas transversales, conocidas como vena cruzada anterior (ACV) y vena cruzada posterior (PCV), refuerzan el ala y delimitan regiones funcionales. Por último, el margen del ala (M) actúa como un borde estructural que brinda soporte adicional. La figura b fue adaptada a partir de la imagen obtenida de <https://seviplagas.com/mosca-del-vinagre-o-de-la-fruta-drosophila-melanogaster/>

de los patrones de expresión de *en* y *wg* se activa la expresión de *vestigial* (*vg*), cuya actividad es esencial para inducir la identidad de tipo ala. Además, *en* sigue activo hasta las etapas finales de la formación del ala (Blair, 1992; Held, 2002), definiendo el territorio posterior del disco imagal y del ala adulta. En esta tesis se estudiará el ala de la *Drosophila* como modelos para investigar los mecanismos involucrados en la formación de patrones genéticos (figura 1.1).

Al iniciar la etapa larvaria, el disco imagal alar se comporta como un tejido autónomo que, incluso si es trasplantado, es capaz de activar su plan de desarrollo (Sohr et al., 2019).

La etapa larvaria de *Drosophila* se subdivide en tres estadios, separados por dos mudas intermedias. En el primer estadio, el disco imagal del ala es un primordio de entre 20 y 50 células (Lawrence & Morata, 1977). El programa de desarrollo del ala es activado por *en* (Zecca et al., 1995), que induce la expresión de Hedgehog (Hh) en el compartimento posterior del disco. Este morfógeno difunde hacia el territorio anterior, donde induce la expresión de varios genes, incluyendo *decapentaplegic* (*dpp*) (Zecca et al., 1995). La proteína resultante de este gen, Dpp, no solo contribuye a establecer diferentes territorios, sino que también actúa como factor de crecimiento.

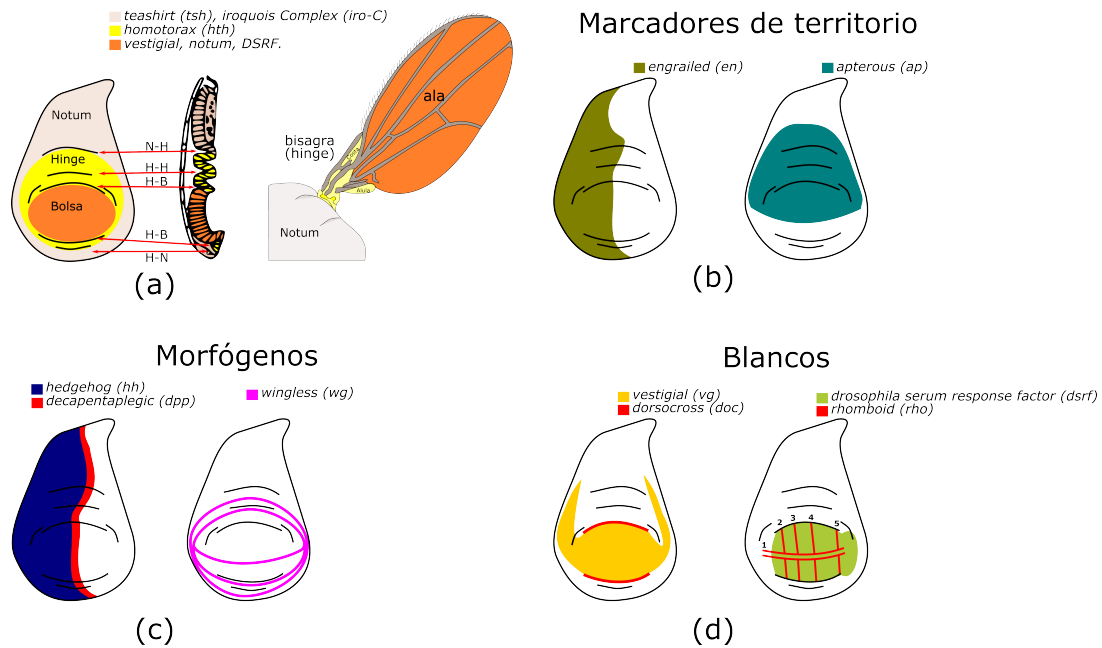


Figura 1.2: **El disco de ala es un tejido epitelial pseudo-estratificado que da origen al ala adulta.** El conocimiento detallado de la formación del ala requiere entender la dinámica de expresión genética de las células que lo componen. **a.** Los tres principales territorios del disco de ala son el notum, que se integra al tórax del adulto; el hinge o axila, que conecta el ala con el cuerpo; y la bolsa (o pouch), que representa el conjunto de células destinadas a formar el ala adulta. En líneas negras se indican los pliegues que separan los tres territorios: Notum-Hinge (NH), Hinge-Hinge (HH) y Hinge-Pouch (HP). **b.** Los territorios posteriores están definidos por la expresión de *engrailed* y el territorio dorsal por la expresión de *apterous*. **c.** Respecto a genes que codifican para morfógenos, *hedgehog* se expresa en todo el territorio posterior, *decapentaplegic* en una banda anterior en la frontera AP, y *wingless* en una banda en la frontera DV y dos bandas circulares. **d.** *vestigial* se expresa entre los pliegues HP, extendiéndose hacia el notum fuera de los pliegues. El gen *Drosophila Serum Response Factor* define los territorios inter-vena, y su expresión es complementaria al patrón de *rhomboid*, que define los territorios pre-vena.

Durante el segundo estadio larvario, el programa de crecimiento del disco de ala se activa completamente con la expresión del gen *apterous* (*ap*) (Blair et al., 1994), que a su vez induce la expresión del morfógeno Wingless (*Wg*) en la frontera de las células que expresan *ap*. En esta región se establece el eje DV del disco de ala. Durante el tercer estadio (ver figura 1.2), con las fuentes de *Wg* y *Dpp* activas, el disco experimenta un crecimiento acelerado que cesa justo antes de la pupación, alcanzando aproximadamente 50 mil células (Martín & Morata, 2006).

Los patrones de expresión a lo largo del eje AP determinan las posiciones de las venas en el ala, generando regiones inter-vena que se nombran en función de las venas que las delimitan, por ejemplo, la región L2-L3 ubicada entre las venas L2 y L3 (ver figura 1.1b). El eje AP organiza los compartimentos de manera casi simétrica, aunque el tamaño de estos compartimentos presenta asimetrías que aún no están completamente comprendidas.

1.2. La vía de señalización de Hh en el disco de ala

El gen *hh* fue descubierto por primera vez en mutantes embrionarios de *Drosophila* (Nüsslein-Volhard & Wieschaus, 1980), e induce una cascada de señalización conservada en diversas especies. En ausencia de Hh, su receptor Patched (*Ptc*) mantiene la cascada de señalización inactiva al reprimir la acción de Smoothed (*Smo*), otra proteína de membrana. En estas condiciones, el factor de transcripción *cubitus interruptus* (*ci*) se mantiene unido a los microtúbulos mediante una red de proteínas como *Cos2* y *Fused*, lo que facilita su ruptura por PKA y Slimb. Sin embargo, cuando Hh se une a *Ptc*, el complejo Hh-*Ptc* no puede inactivar a *Smo*, permitiendo que *cubitus interruptus* en su forma activa (*ciA*) induzca la expresión de los genes blanco de la vía. En vertebrados, esta vía se conserva en su totalidad, aunque existen tres miembros de la familia: Sonic Hedgehog (*Shh*), Desert Hedgehog (*Dhh*) e Indian Hedgehog (Choy & Cheng, 2012).

La fuente de Hh se localiza en todo el compartimento posterior del disco y su señal se expande en forma de gradiente hacia el compartimento anterior (figura 1.2c). Se han propuesto dos interpretaciones para explicar este gradiente de Hh:

1. Interpretación del estado estacionario: El gradiente de Hh se propaga desde su fuente en el compartimento posterior, y la activación de los genes blanco ocurre una vez que el gradiente alcanza el estado estacionario. En este modelo, dos genes blanco que se expresen en distintos territorios se activan a diferentes umbrales de concentración de Hh (Eldar et al., 2003) (figura 1.3).
2. Interpretación dinámica del gradiente: Debido a la retroalimentación entre Hh y su receptor Ptc, el gradiente de Hh establece una distribución dinámica en la cual, en una fase previa al estado estacionario, el gradiente tiene un alcance mayor que en el estado estacionario. Este gradiente transitorio de mayor alcance se conoce como *overshoot* (Nahmad & Stathopoulos, 2009). Según esta interpretación dinámica, dos genes blanco que se expresan en distintos territorios responden al mismo umbral de Hh pero en tiempos diferentes. Los resultados de Nahmad y Stathopoulos, 2009 indican que Dpp es inducido antes de que el gradiente alcance el estado estacionario, activado por el overshoot de Hh, mientras que Col se define en etapas tardías, una vez que el gradiente ha alcanzado el estado estacionario.

1.2.1. Robustez de los genes blanco de Hh

La robustez de un gen blanco definido por un morfógeno se refiere al cambio que experimenta el territorio de expresión genética ante perturbaciones en los parámetros del morfógeno. Por ejemplo, se ha demostrado que en la mosca heterocigota *hh+/-*, que ha perdido la función de un alelo de *hh*, el territorio del gen blanco *collier (col)* se mantiene intacto (Irons et al., 2010). Esto muestra que algunos genes blanco de Hh son robustos frente a perturbaciones en la tasa de producción del morfógeno.

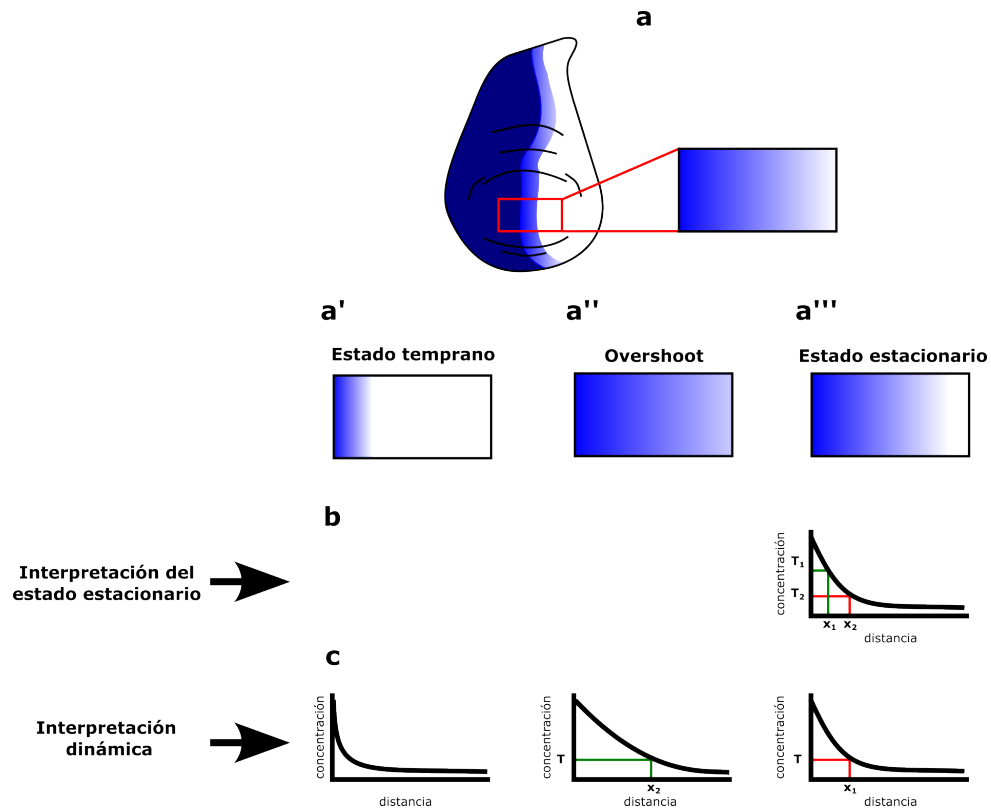


Figura 1.3: **Dinámica del gradiente de Hh.** **a.** La fuente de (Hh) se localiza en el compartimento posterior (indicado en azul), mientras que su gradiente se extiende hacia el compartimento anterior (representado con un degradado azul). Inicialmente, cuando comienza la producción del ligando Hh, el patrón de difusión tiene un alcance corto (a'). Con el tiempo, el gradiente del ligando se expande progresivamente, hasta alcanzar el overshoot (a''). En este punto, la señal de Hh se activa y el receptor Ptc promueve la degradación del ligando, lo que provoca una retracción del gradiente hasta que alcanza un estado estacionario (a'''). **b.** En el estado estacionario, el gradiente establece dos territorios distintos, definidos por diferentes umbrales de concentración. **c.** En la interpretación dinámica, estos dos territorios se delimitan mediante un mismo umbral de concentración, pero se forman en diferentes momentos, durante el overshoot, y hasta alcanzar el estado estacionario.

Hasta la fecha, no existen estudios que demuestren que otros de los genes blanco activados por Hh presenten la misma robustez.

Caja 2. La vía de Dpp Decapentaplegic (o Decapentapléjico, Dpp) fue descrito por primera vez en 1982 (Spencer et al., 1982) como un gen cuyas mutaciones afectan al menos a 15 de los 19 discos imagales de la mosca, de ahí su nombre^a.

Poco tiempo después se determinó que Dpp es un miembro de la gran familia de las proteínas TGF- β (Padgett et al., 1987); hoy sabemos con mayor precisión que es homóloga a la proteína BMP2/4 y, por lo tanto, se incluye en la familia de proteínas BMP (Bone Morphogenetic Proteins) (Gilbert, 2016). Fue hasta 1992 que se demostró que Dpp actúa como morfógeno (Ferguson & Anderson, 1992), siendo un morfógeno diferente a los conocidos hasta la fecha, ya que, a diferencia de bicoid y hunchback, Dpp se secreta hacia el exterior celular, a partir del blastodermo celular.

Dpp tiene dos receptores: el receptor tipo I Thickveins (Tkv) y el receptor tipo II Saxophone (Sax), aunque presenta mayor preferencia por Tkv (Matsuda et al., 2016). Tkv forma un complejo con el receptor tipo II Punt, y cuando Dpp se une a este complejo, Punt fosforila a Tkv, que a su vez fosforila a Mother Against *dpp* (Mad)^b. Mad fosforilada (pMad) se une a Medea (Med) (homóloga de Smad4) y juntas entran al núcleo para activar los genes blancos de la vía.

Dpp es un morfógeno de largo alcance, de aproximadamente 40 células, en comparación con Hh, que tiene un alcance de 15 células (Nahmad & Stathopoulos, 2009). En vertebrados, Dpp induce la formación de hueso y otros tejidos exclusivos de la epidermis, además de provocar proliferación y muerte celular (Gilbert, 2016).

^aDecapenta = 15, plegico = paralizado.

^bMutaciones de Mad en la madre afectan la vía de señalización de Dpp en el hijo, de ahí su nombre [https://www.thenakedscientists.com/articles/interviews/gene-month-mothers-against-decapentaplegic].

1.2.2. Determinación de las posiciones de las venas en el eje AP del disco alar de *Drosophila*

Hh establece el territorio de las venas L3 y L4, mientras que Dpp establece los territorios de las venas L2 y L5 (ver figura 1.1). Esto se basa en que, al dañar la difusión de Hh, solo se alteran las posiciones de las venas L3 y L4 (Strigini & Cohen, 1997), mientras que al afectar la señalización de Dpp, se modifica la posición de todas las venas (De Celis, 2002). La vena L4 se distingue de la L3, ya que la primera requiere la difusión de *vein* (*vn*) (García-Bellido et al., 1994) para activar la vía del EGF, mientras que la L3 depende del traslape de Sal e Iro (Crozatier et al., 2002). El posicionamiento de la vena L2 está determinado por la expresión de *knirps* en una banda de células anteriores (de Celis & Barrio, 2000; Lunde et al., 1998; Sturtevant et al., 1997). Además, la posición del territorio de *knirps* está finamente regulada por varios genes blanco de Dpp, que se regulan mutuamente. Mientras Dpp activa todos estos genes, las proteínas Sal inhiben *optix* y *knirps* a diferentes distancias de la frontera AP. De esta manera, existe una franja en la que ningún represor de *knirps* bloquea su expresión, lo que permite la activación de la vía del EGF que da lugar a la vena L2 (Martín et al., 2017).

La posición de la vena L5 está determinada por una banda de células que expresan *abruptus* (*ab*), una proteína exclusiva del compartimento posterior. El territorio de *ab* está determinado por genes blanco de Dpp, específicamente *omb*, *brk* y *pent*. En la frontera Omb-Brk, se activa *ab*, que a su vez activa *rho* (Cook et al., 2004). Sin embargo, en mutantes con pérdida de función de *pent*, desaparece la expresión de Delta (otro marcador de vena), resultando en un fenotipo similar al del mutante de *ab* (Vuilleumier et al., 2010).

Los territorios pre-vena en el disco de ala se distinguen por la expresión del gen *rhomboïd* (*rho*)¹, que codifica una proteasa de membrana involucrada en la

¹El gen *rhomboïd* fue inicialmente denominado *veinlet*. Garcia-Bellido lo reportó bajo el nombre de *veinlet*, pero posteriormente se demostró que era una mutación del gen *rhomboïd* (Montagne et al., 1996).

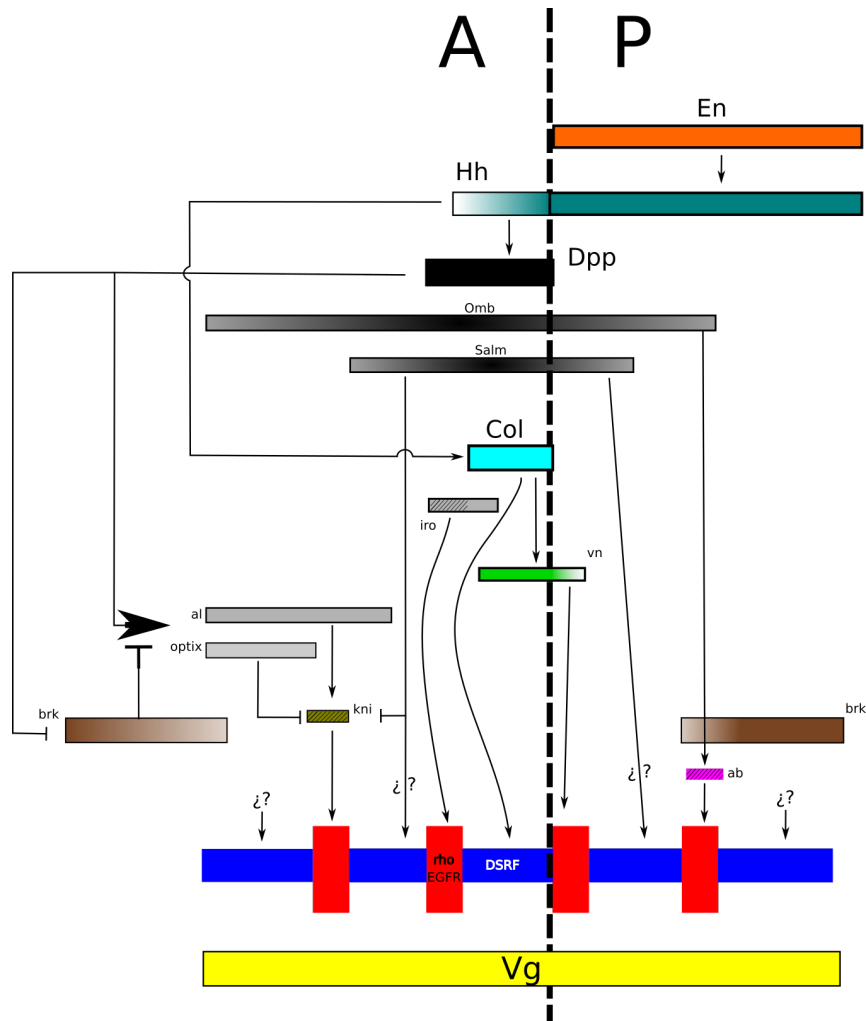


Figura 1.4: **Formación de patrones en el eje anteroposterior (AP) en el disco imagal de *Drosophila*.** La organización de los patrones a lo largo del eje AP depende de las señales de Hh y Dpp, las cuales establecen diferentes territorios en el disco imagal. La vía de señalización comienza en el compartimento posterior, donde Engrailed (En) activa la expresión de Hh. Este gradiente de Hh se extiende hacia el compartimento anterior, activando allí la expresión de Dpp y Col. A su vez, Dpp forma un gradiente que se extiende hacia ambas direcciones, anterior y posterior, activando genes como Optomotor-blind (Omb) y Spalt mayor (Salm). El factor Dpp también activa la expresión de *Drosophila* Serum Response Factor (DSRF) en los compartimentos intervenales L2-L3 y L4-L5, y reprime la expresión de Brinker (Bkr) y Aristaless (Al). En la frontera entre estos territorios, se forma la vena 2. Por otro lado, Col activa la expresión de DSRF en el compartimento entre las venas 3 y 4 y también activa Vein (Vn), que determina la formación de la vena 4. Los mecanismos que regulan la activación de DSRF en los compartimentos laterales, fuera de las venas L2 y L5, no se conocen aún con precisión. Además, Dpp, junto a Wingless (Wg), activa la expresión de Vestigial, un factor esencial en el desarrollo del ala.

vía de señalización del EGFR, la cual participa activamente en la formación de venas (Crozatier et al., 2004; Sturtevant et al., 1993). Por otro lado, los territorios inter-venas expresan el factor de transcripción *Drosophila* Serum Response Factor (DSRF) (Fristrom et al., 1994), conocido también como Blistered (Bs)². De esta manera, los territorios que expresan DSRF y Rho son complementarios.

Finalmente, se sabe poco sobre los mecanismos que activan DSRF en los compartimentos inter-venas laterales. Sin embargo, se sabe que Sal y Net controlan las regiones centrales del territorio del ala, coincidiendo en territorio con DSRF en estas áreas (De Celis, 2002). La diferencia entre los compartimentos L3-L4 y L4-L5 radica en que el primero no requiere la difusión de Dpp, mientras que el segundo sí (Matsuda et al., 2020). Esto podría atribuirse simplemente al hecho de que la fuente de Dpp es exclusivamente anterior y a que la compartimentalización en el borde AP desconecta a las células posteriores de la fuente de Dpp en lo que respecta al linaje celular. Además, los mecanismos que señalizan los territorios inter-venas B-L2 y B-L5 podrían no coincidir con los mecanismos de los compartimentos intermedios, ya que distintos genes se expresan en esas regiones. Esto se evidencia en que el territorio B-L2 difiere en su expresión genética del territorio B-L5, lo que sugiere que dos territorios equivalentes en cuanto a su posición en la frontera AP se definen mediante mecanismos diferentes.

1.3. Señalización Dorsal-Ventral

A diferencia de En, el patrón de expresión de Wg cambia drásticamente en la etapa larvaria. Durante el primer estadio, Wg se expresa en una cuña inferior difusa (Widmann & Dahmann, 2009). En el segundo estadio, cuando *ap* divide los territorios en dorsales y ventrales, se activa la vía de señalización DSL-Notch en la frontera DV (Blair et al., 1994), lo que induce la expresión de Wg. Así, la fuente de Wg se convierte en una banda sobre la frontera DV, ortogonal a la

²Existen mutaciones que alteran el patrón de venas, como *blistered*¹ y *pruned*¹. En 1996, Montagne et al. demostraron que estas eran mutaciones en el gen que codifica DSRF (Montagne et al., 1996).

banda de Dpp. Además de esta banda, se expresan dos fuentes circulares de Wg en el disco, denominadas anillo interno y externo de Wg, respectivamente. Dado que estas fuentes se localizan fuera del territorio presuntivo del ala, a menudo se ignoran como fuentes organizadoras del crecimiento del territorio del ala. Sin embargo, su eliminación conlleva una reducción de hasta un 75 % del tamaño final del ala adulta (Barrio & Milán, 2020).

La disposición ortogonal de las fuentes de Dpp y Wg recuerda a los ejes del sistema cartesiano y ha contribuido a establecer la idea de un sistema ortogonal que guía el desarrollo del ala. Además, existe evidencia de que la vía de Dpp contribuye principalmente al crecimiento Anterior-Posterior, mientras que la vía de Wg se asocia principalmente con el crecimiento Dorsal-Ventral (Barrio & Milán, 2020).

Caja 3. La vía de Wg.

Wingless (o Wnt1), descubierta por Nüsslein-Volhard y Wieschaus en 1980, es el principal morfógeno de la familia Wnt en *Drosophila*. Por su nombre, es evidente que es fundamental en la formación del ala de la mosca; la mutación *wg*¹ genera una mosca sin alas y parte del tórax (Bejsovec, 2018). La vía canónica de Wg involucra al receptor Frizzled (Fz) y el efector Armadillo (Arm, o β -catenina). En ausencia de Wg, APC, Axina y GSK3 forman un complejo, y esta última fosforila a Armadillo, que posteriormente es degradado por proteosomas (Gilbert, 2016). En esas condiciones, Pangolin (Pan, o T Cell Factor, TCF) reprime los genes blancos de la vía.

Por otro lado, cuando Wg está presente, Fz forma un complejo con Lgr y LRP5/6 que recluta a Axina y GSK3. En estas condiciones, Dishevelled se une al complejo e impide que GSK3 fosforile a Arm. El Arm libre puede entrar al núcleo, unirse con Pan y activar los genes blancos de la vía (Gilbert, 2016). Existen dos vías no canónicas de Wg que no involucran a Armadillo: una asociada con la polaridad celular planar, que involucra no solo a Fz, sino también a Rik y Ror como co-receptores para activar a Dishevelled, que a su vez activa una Rho GTPasa que coordina cambios en la organización del citoesqueleto y regula la expresión genética a través de la Cinasa

Janus (JNK). En la otra vía no canónica, Fz y Ryc activan la vía de Diacilglicerol, que libera calcio del retículo endoplásmico (Gilbert, 2016).

La vía Wnt en *Drosophila* es bastante intrincada. En experimentos que reemplazan Wg en la frontera DV del disco de ala por su versión 'atada a la membrana', NRT-Wg, se obtienen alas casi inalteradas en el adulto (Alexandre et al., 2014; Joyce et al., 2020). Sin embargo, experimentos más recientes, como los reportados por Wang et al. (2021), concluyen que sí es necesaria la difusión de Wg, al menos en células del germario, para promover la proliferación de células troncales foliculares (Wang et al., 2021). Así, no queda claro cuándo se requiere la difusión de Wg y cuándo no.

Además, existe evidencia de que Wg se secreta apicalmente, pero difunde y señala en la parte basal, lo que implica que requiere transporte intracelular para señalar (Yamazaki et al., 2016); la razón de esta ruta, a primera vista innecesariamente larga, no está clara. En el disco de ala, se secretan cinco ligandos más de la familia Wnt, a saber, Wnt-2, Wnt-4, Wnt-5, Wnt-6 (no en el disco), Wnt-8 (o Wnt-D) y Wnt-10 (Swarup & Verheyen, 2012). Además, se conocen al menos dos receptores Frizzled (Joyce et al., 2020).

1.4. El reclutamiento celular y la expansión de *vestigial* en el disco alar

En la región que corresponderá al segundo segmento torácico (en la frontera Wg-En), se activa *dll* (el gen selector de pata), y posteriormente un subconjunto de las células que expresan *dll* comienza a expresar *vg*. Así se origina el disco de ala, a través de una porción de lo que sería la pata (Held, 2002). La función de *vg* va más allá de determinar el territorio del disco de ala; induce toda la batería de genes involucrados en los procesos de desarrollo de esta estructura. De hecho, si se expresa de manera ectópica en otros discos imagales, *vg* induce la transformación del tejido correspondiente en el tejido alar.

Durante el segundo estadio larvario, la expresión de *vg* se restringe únicamente a las células del territorio de la bolsa y el margen, a través de dos potenciadores. La activación de la vía DSL-Notch refuerza la expresión de *vg* mediante su potenciador llamado Boundary (*vgBE*) (Kim et al., 1996). Al mismo tiempo, Wg y Dpp guían el crecimiento del patrón a través de otro potenciador de *vg* conocido como Quadrant (*vgQE*) (Zecca & Struhl, 2007a, 2007b).

El mecanismo mediante el cual ambos morfógenos instruyen la activación de *vg* parece ser más complejo que la activación directa por *armadillo* y/o *pmad* (efectores de las vías de Wg y Dpp, respectivamente) ya que depende de un proceso de retroalimentación positiva conocido como reclutamiento celular. En este proceso, las señales de ambos morfógenos actúan de manera permisiva para la activación de *vg* por *yorkie* (*yki*) (Zecca & Struhl, 2010), el gen efector transcripcional de la vía Hippo. El término ‘reclutamiento’ se debe a que la entrada de Yki al núcleo está regulada por un proceso yuxtácrino mediado por las protocadherinas Fat (Ft) y Dachshous (Ds) (Zecca & Struhl, 2010), que hace expandir el patrón de *vg* a expensas de reducir el patrón de *ds*, que conforma el conjunto de células reclutables.

Una vez que los niveles de *vg* se han reforzado, *vg* actúa como su propio factor de transcripción (Zecca & Struhl, 2010) para mantenerse activo hasta las etapas finales de la formación del ala. La activación del *vgQE* por Yki y por Vg requiere la presencia del cofactor Scalloped (Sd) en niveles adecuados (Simmonds et al., 1998). Finalmente, *vg* induce la diferenciación hacia el destino alar dentro del disco de ala, por lo cual se le conoce como el gen selector de ala.

2. Justificación

Resultados previos sobre la señalización de Hh sugieren que: i) La regulación de Ptc por Hh provee robustez a los genes blancos de la vía de señalización (Eldar et al., 2003), ii) existen por lo menos dos genes blancos que se definen a tiempos diferentes, uno a través del overshoot del gradiente de Hh y otro a través del estado estacionario de Hh (Nahmad & Stathopoulos, 2009). Dado que la regulación de Ptc no puede llevarse a cabo de manera instantánea, Nahmad y Stathopoulos, 2009 demuestran que cuando se rompe el circuito de retroalimentación negativa de Ptc, Dpp y Col coinciden en su patrón de expresión genética lo que sugiere que el overshoot se ha perdido. Estos resultados respaldan la hipótesis que los genes blancos activados por el overshoot de Hh muestran menor robustez que los genes blancos activados por el estado estacionario, ya que los blancos activados por el overshoot se definen cuando el circuito de retroalimentación de Ptc aún no se encuentra activo. Esto sugiere que la señalización de Hh establecería diferentes patrones de expresión con robustez diferencial, pero aún no se han hecho estudios que demuestren esta aseveración. Pero por qué el sistema estaría diseñado para proveer menor robustez a un patrón ¿existe alguna compensación con alguna otra propiedad?

Por otra parte, el trabajo de Muñoz-Nava et al. 2020 mostró que la atenuación del reclutamiento celular en el disco de ala conduce a una reducción del tamaño total del ala en aproximadamente 20 %, pero no se investigó el efecto del reclutamiento en la forma del órgano del adulto. Ese mismo año, Matsuda et al. encontraron que ante el bloqueo de la difusión del gradiente de Dpp, el compartimento más allá de la vena L5 no se ve afectado, lo que sugiere que esta región del ala crece independientemente

de las señales de crecimiento clásicas del AP. Finalmente, el trabajo de Flores-Flores et al., 2023 mostró que la señal de reclutamiento puede expandirse varias células en forma independiente de Vg. En conjunto, estos trabajos revelan que se desconoce si el reclutamiento celular contribuye a definir la forma y crecimiento asimétrico a lo largo del eje AP del ala de *Drosophila*.

3. Hipótesis

1. La interpretación dinámica del gradiente de Hh participa en el balance entre distintos patrones de expresión génica en el disco de ala de *Drosophila melanogaster*.
2. El reclutamiento celular contribuye a la asimetría AP del ala de *Drosophila melanogaster*.

4. Objetivos particulares

4.1. Análisis de la robustez y precisión diferencial de la señalización de la vía de Hh

1. Analizar mediante modelos matemáticos bajo qué condiciones sería posible establecer patrones de expresión con robustez diferencial ante perturbaciones de la fuente del morfógeno.
2. Investigar si la robustez diferencial depende de la regulación del receptor Ptc por la misma vía de señalización de Hh.
3. Determinar experimentalmente si los genes blanco de Hh, *col* y *dpp*, presentan robustez diferencial ante variaciones en la dosis de Hh.
4. Investigar el papel de la interpretación dinámica en la precisión de la frontera de *dpp*.

4.2. El reclutamiento celular y el origen de la asimetría AP del ala de *Drosophila*

1. Determinar el efecto del reclutamiento celular en cada uno de los compartimentos inter-venas del ala de *Drosophila*.
2. Determinar si la atenuación del reclutamiento celular resulta en alas más simétricas.

3. Investigar si los cambios en la forma y asimetría atribuidos al reclutamiento celular en el ala adulta pueden trazarse a la formación del patrón de *vg* en el disco alar.
4. Investigar si la atenuación del reclutamiento celular afecta la forma del patrón de *vg* en el disco alar.

5. Materiales y Métodos

5.1. Cepas y cruzas

A continuación se reportan las cepas de moscas *Drosophila* que se usaron en esta tesis. Las cruzas de moscas se realizaron a 25 °C, excepto cuando se indique lo contrario.

No.	Cepa	Procedencia
1	<i>ry</i> [506] <i>hh</i> [AC]/TM3, Sb[1]	BDSC ¹ # 1749
2	<i>dpp</i> 10638/CyO	BDSC # 12379

Tabla 5.1: Cepas usadas en el problema de la robustez y precisión diferencial de la señalización de Hh. ¹BDSC: Bloomington Drosophila Stock Center

No.	Cepa	Experimento
1	<i>dpp</i> 10638; <i>ry</i> [506] <i>hh</i> [AC]	<i>hh</i> (+/-)
2	<i>dpp</i> 10638; +	<i>hh</i> (+/+)

Tabla 5.2: Cepas derivadas de la cruce de las cepas en la Tabla 5.1.

No.	Cepa	Procedencia
1	<i>y, w</i>	Laboratorio de Fanis Missirlis (Cinvestav, México)
2	UAS- <i>vg</i> RNAi	VDRC ¹ # 16896
3	<i>ds</i> -Gal4,UAS-GFP/CyO; <i>vg</i> QELacZ/[TM6B,Tb]	Laboratorio de Gary Struhl (Columbia University, Nueva York, Estados Unidos)
4	<i>vg</i> QE-Gal4	BDSC # 8229
5	<i>y, w, hs</i> -FLP; Act>CD2>Gal4, UAS-RFP	BDSC # 51308

Tabla 5.3: Cepas usadas en el problema de la asimetría AP del ala de la *Drosophila*. ¹VDRC: Vienna Drosophila Resource Center.

No.	Cepa	Experimento
1	<i>y,w</i> , hs-FLP; Act>CD2>Gal4, UAS-RFP/ UAS-VgRNAi	Prueba de la eficiencia del ARN de interferencia de <i>vg</i>
2	<i>ds</i> -Gal4, UAS-GFP/ UAS- <i>vg</i> RNAi ; MKRS/ <i>vg</i> QELacZ.	atenuación del reclutamiento celular
3	<i>vg</i> RNAi/+; <i>vg</i> QELacZ/+	control

Tabla 5.4: Cepas derivadas a partir cruzas de las cepas en el la Tabla 5.3.

5.2. Disección e inmunohistoquímica del disco imagal del ala

Se disecaron larvas del tercer estadio de ambos sexos en un microscopio estereoscópico. Los discos se fijaron en PEM-T (PEM con 0,1 % de Triton X-100) con paraformaldehído al 4 %, se lavaron 3 veces y se bloquearon en PEM-T con BSA al 0,5 % (albúmina sérica bovina) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron con anticuerpos primarios a 4 °C durante la noche a las diluciones mostradas en la Tabla 5.5.

No.	Anticuerpo	Procedencia	Concentración	Experimento
1	anti-Col, ratón	Cedido por M. Crozatier	1:250	robustez diferencial
2	anti- β -Galactosidasa, conejo	Biomedicals, cat. # 55976	1:250	robustez diferencial y asimetría del ala
3	anti-DSRF	cedido por S. Blair	1:250	asimetría del ala
4	Alexa Fluor 480 anti-ratón	Thermo Fisher Scientific	1:1000	robustez diferencial y asimetría del ala
5	Alexa Fluor 555 anti-conejo	Thermo Fisher Scientific	1:1000	robustez diferencial
6	Alexa Fluor 647 anti-conejo	Thermo Fisher Scientific	1:1000	asimetría del ala

Tabla 5.5: **Anticuerpos empleados en esta tesis.**

En ambos casos, las imágenes se tomaron con un microscopio confocal utilizando un objetivo de inmersión en aceite de 40X.

5.3. Análisis de imágenes

5.3.1. Análisis de la robustez y precisión diferencial de la señalización de la vía de Hh

Se obtuvo la proyección Z de las imágenes obtenidas del microscopio confocal utilizando el software ImageJ con una resolución de 16 bits. Las imágenes se guardaron en formato TIF para luego medir el ancho de los patrones utilizando la biblioteca OpenCv de Python. Normalizamos los valores de intensidad dividiendo los píxeles de la región seleccionada por la intensidad máxima, luego medimos el ancho del patrón al 0.2 (para la figura 6.4, y del 0.1 al 0.6 para la figura 6.6) de la intensidad relativa. Estos pasos fueron codificados en Python. Los gráficos se realizaron con las

bibliotecas matplotlib y seaborn de Python. Las mismas figuras se utilizaron para la medición de la precisión.

5.3.2. El reclutamiento celular y el origen de la asimetría AP del ala de *Drosophila*

Las pilas de imágenes obtenidas con el microscopio confocal se cargaron en Python utilizando la biblioteca readlif (Negretti, 2021). Para el análisis de patrones de *vg*, tomamos la proyección Z y eliminamos el ruido usando la función de morphology de Scikit-image. Luego binarizamos la imagen usando la función de threshold de OpenCV. Binarizamos al 20 % del valor máximo de los píxeles en el patrón. Para obtener el patrón de las pre-venas en el disco del ala, tomamos la proyección Z de las imágenes inmuno-teñidas para DSRF. Luego, hicimos una binarización inversa usando la función de threshold de OpenCV. Marcamos manualmente los puntos sobre el patrón de venas y guardamos las coordenadas xy en un arreglo de numpy. Para medir el área de la sección inter-vena primero superpusimos el patrón de vena con el patrón de *vg* y luego medimos el área entre las venas usando la función contourArea de OpenCV. Para medir la excentricidad del patrón *vg* tomamos el patrón *vg* binarizado y calculamos la envolvente convexa del patrón usando la función ConvexHull de la biblioteca scipy.spatial en Python.

5.4. Montaje de las alas y áreas de las alas

Separamos las moscas adultas por sexo y luego las deshidratamos durante la noche en etanol al 70 %. Las alas se disecaron en etanol al 50 %. Luego, se montaron las alas aisladas sobre un porta-objetos. La obtención de imágenes de las alas de un adulto se realizó mediante un microscopio de campo claro con un objetivo de 4X. Las áreas de las alas se cuantificaron utilizando la herramienta de selección de polígonos de ImageJ. Determinamos el límite entre el ala y la bisagra a través de la

línea que une el borde proximal de la costa con el borde proximal de la álula.

5.5. Análisis de Procrustes

El análisis de Procrustes es un método para alinear y comparar dos formas (Gower, 1975; Klingenberg & Zaklan, 2000). El método consiste en primero seleccionar un conjunto de puntos representativos de dos formas a comparar y luego aplicar una serie de transformaciones rígidas (traslación, rotación, escalado y reflexión) al conjunto de puntos de una de las formas hasta minimizar la diferencia entre la distancia con el otro conjunto (figura 5.1). Para comparar las formas en el problema de la asimetría del ala, las imágenes de las alas se cargaron en Python usando la biblioteca OpenCV. Luego, seleccionamos de manera semi-automática cada uno de los marcos de referencia, con la ayuda de un código en Python. Usamos la biblioteca `scipy.procrustes` para el análisis de Procrustes. Los puntos de referencia sobre el margen del ala fueron 10, de los cuales 6 son estándar en el análisis de Procrustes del ala de *Drosophila* (Breuker et al., 2006; Klingenberg & Zaklan, 2000); 2 puntos más se obtienen prolongando la línea que pasa por la vena anterior cruzada y los últimos 2 puntos intersectando esta recta (en la región anterior y posterior) con el margen del ala. Se realizó un procedimiento equivalente extendiendo la línea que pasa por la vena posterior para obtener los dos últimos puntos. Los 10 puntos de referencia del patrón de venas son estándar en el análisis de Procrustes del ala de *Drosophila* (Breuker et al., 2006; Klingenberg & Zaklan, 2000).

Para hacer las alas simetrizadas respecto al eje AP, se obtuvo el punto intermedio entre los puntos 2A y 2P y el punto intermedio entre los puntos 5A y 5P. El eje AP se trazó al unir estos dos puntos. Los puntos de referencia para cuantificar la simetrización constan de 10 puntos estándar en el análisis de Procrustes del ala de *Drosophila* (Breuker et al., 2006; Klingenberg & Zaklan, 2000). Tomando como referencia el eje AP, la vena 2 se consideró equivalente simétrica a la vena 5, y la vena 3 equivalente simétrica a la vena 4. Para obtener el ala anteriorizada, los puntos

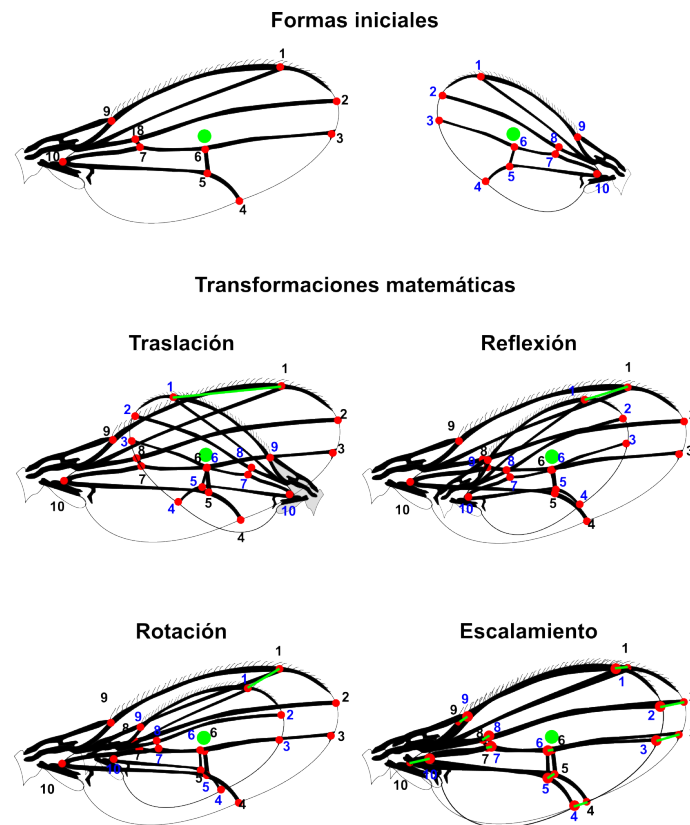


Figura 5.1: **Análisis de Procrustes para la comparación de formas.** Cada imagen inicial define un conjunto de puntos de referencia (en este caso, 10 puntos rojos numerados), aunque el número de puntos puede variar según el análisis. Primero, se aplica una traslación para alinear los centroides de las formas (marcados en verde). Luego, se realizan sucesivas transformaciones de reflexión, rotación y escalamiento para minimizar la distancia de Procrustes, que mide las diferencias entre las formas. Esta distancia corresponde a la raíz cuadrada de la suma de las distancias cuadradas entre los puntos equivalentes de cada conjunto, representadas aquí por líneas verdes. El objetivo es lograr una superposición óptima que permita una comparación precisa entre las formas.

1A-5A se reflejaron con respecto al eje AP. Para realizar la reflexión se obtuvo la recta ortogonal al eje AP que pasa por el punto de interés. Se midió la distancia de la línea al punto, y sobre la línea ortogonal, en la región posterior, a la misma distancia del punto de interés, se marcó el punto simétrico. Se realizó un proceso equivalente reflejando los puntos 1P-5P con respecto al eje AP. Estos procedimientos fueron codificados en Python.

5.6. Simulaciones numéricas

Para la solución numérica de ecuaciones diferenciales en las figuras 6.2 y 6.3, se implementó el método de diferencias finitas hacia adelante en el tiempo y centrado en el espacio (FTCS, de las siglas en inglés Forward-in-Time-Centered-in-Space) con un paso espacial de $\Delta x = 1 \mu m$ y un paso temporal de $\Delta t = 0,5 s$ para resolver las Ecuaciones (6.16)-(6.20) en Python, utilizando los parámetros reportados por Nahmad y Stathopoulos, 2009. La solución en estado estacionario de la ecuación (6.22) se resolvió utilizando `solve_bvp` y `solve_ivp` del paquete de Python `scipy.integrate`. Las gráficas se realizaron con las bibliotecas `matplotlib` y `seaborn` de Python.

Para las simulaciones de los patrones *col* y *dpp_{SS}* en la figura 6.7, consideramos un gradiente de decaimiento exponencial de Hh, similar al obtenido con el modelo simple en la figura 6.1, evaluado en una matriz de 80×50 . Luego, utilizamos la relación para el estado estacionario *Signal(x)* obtenida en la ecuación (6.23) para evaluar el gradiente de Hh en otra matriz del mismo tamaño. Los territorios se determinaron mediante la concentración umbral *T*, considerada como el 20% del valor máximo de *Signal* (con un ruido gaussiano con media *T* y desviación estándar determinada de manera que el ruido simulado del patrón *col* coincida con el ruido de fondo del patrón experimental *col*, es decir, $1.23 \mu m$). Para la simulación de *dpp_{over}*, utilizamos la solución numérica de *Signal* en el overshoot para ajustar una función de Hill, $A \frac{Hh^n}{k^n + Hh^n}$, análoga a la ecuación (6.23), utilizando la función `fit_curve` de `scipy.optimize`. Encontramos $A = 0,2372$, $k = 0,0483$ y $n = 4,6212$.

Luego, utilizamos esta función de aproximación de Signal overshoot para evaluar el gradiente exponencial de Hh overshoot y realizamos un análisis análogo al realizado en el estado estacionario. Medimos el ancho del patrón a 0.2 del máximo del perfil obtenido mediante una proyección vertical del patrón simulado.

6. Resultados

6.1. Análisis de la robustez y precisión diferencial de la señalización de la vía de Hh

6.1.1. La interpretación estacionaria del gradiente del morfógeno predice la misma robustez para todos los genes blancos

Estudios previos sobre la robustez de los morfógenos se han enfocado en cuantificar los cambios en la forma general del gradiente (Gurdon & Bourillot, 2001; Tabata & Takei, 2004) o en la posición establecida para un umbral específico de concentración (Eldar et al., 2003). Esto se debe a la suposición de que todos los genes blancos activados por un morfógeno presentan la misma robustez, pero no existe evidencia científica que respalde dicha suposición. Para explorar esta idea, definimos la robustez de un territorio, determinado por el umbral T , como el desplazamiento (Δx) de la frontera del patrón bajo una perturbación específica:

$$\Delta x = |x(T) - \tilde{x}(T)|, \quad (6.1)$$

donde $x(T)$ y $\tilde{x}(T)$ son las posiciones definidas por el morfógeno en ausencia y presencia de perturbación, respectivamente.

Comenzaremos analizando la robustez bajo perturbaciones en la fuente del morfógeno en un modelo clásico, donde los territorios son definidos por el estado estacionario del gradiente en distintos umbrales. Este problema fue estudiado por Eldar et al.,

2003, quienes consideraron un modelo con difusión libre, degradación lineal y una fuente puntual modelada como condición de frontera:

$$\begin{aligned} \frac{dM}{dx} - \frac{1}{\lambda^2}M &= 0, \\ M(0) &= M_0, \\ \lim_{x \rightarrow \infty} M(x) &= 0, \end{aligned} \tag{6.2}$$

donde $\lambda^2 = D/\beta$ es el cociente entre el coeficiente de difusión, D , y la tasa de degradación del ligando, β . La solución a la ecuación (6.2) es:

$$M(x) = M_0 e^{-x/\lambda}. \tag{6.3}$$

En este caso, una perturbación en la fuente del morfógeno implica un cambio en la condición de frontera del tipo: $M_0 \rightarrow \tilde{M}_0$, lo cual induce un desplazamiento en la frontera del territorio definido por el umbral T , en:

$$\Delta x = \lambda \ln \left(\frac{\tilde{M}_0}{M_0} \right). \tag{6.4}$$

Observamos que esta ecuación no depende del umbral T , sugiriendo, como fue reportado por (Eldar et al., 2003), que todos los patrones definidos por el gradiente del morfógeno responden de igual manera a una perturbación en la fuente M_0 , como se muestra en la figura 6.1a-c.

Para explorar si la robustez uniforme para diferentes blancos se debe a la fuente puntual, analizamos un modelo general donde la fuente del morfógeno se extiende en un dominio con producción de ligando constante:

$$D \frac{d^2 M}{dx^2} + \theta^-(x)\alpha - \beta M = 0 \tag{6.5}$$

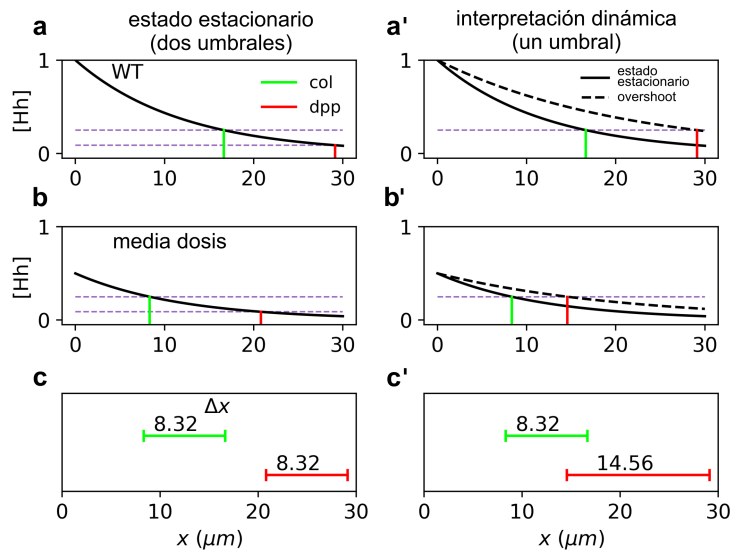


Figura 6.1: **El modelo estacionario predice robustez uniforme ante variaciones en la fuente del morfógeno, mientras que el modelo dinámico predice robustez diferencial.** **a, b.** Gráficas de la solución analítica para el modelo en a usando una dosis completa ($Hh(x = 0) = 1$; a, a') o media ($Hh(x = 0) = 0,5$; b, b') de Hh. **(c, c')** Desplazamientos tras la perturbación para el modelo en estado estacionario con dos umbrales (correspondientes a las posiciones de *col* y *dpp*, c, y para el modelo de interpretación dinámica con un único umbral que utiliza el overshoot, prediciendo desplazamientos diferentes, c'. Los valores de los parámetros utilizados en estas gráficas son: $\lambda_{over} = 21\mu m$, $\lambda_{est} = 12\mu m$, que corresponden aproximadamente a las posiciones del borde anterior de *col* y *dpp*. La codificación de colores de *dpp* en rojo y *col* en verde se usarán en el resto de la tesis. Figura modificada de Reyes et al., 2024a.

donde $\theta^-(x) = 1$ para $x < 0$ y 0 en otro caso, es decir, la fuente abarca todo el eje negativo. Considerando las condiciones de continuidad:

$$\begin{aligned} M^+(0) &= M^-(0), \\ \left. \frac{dM^+}{dx} \right|_{x=0} &= \left. \frac{dM^-}{dx} \right|_{x=0}, \end{aligned} \quad (6.6)$$

donde M^- es la solución para $x < 0$ y M^+ para $x > 0$, la solución al problema (6.5) es:

$$M(x) = \begin{cases} -\frac{\alpha}{2\beta}e^{x/\lambda} + \frac{\alpha}{\beta}, & x \leq 0, \\ \frac{\alpha}{2\beta}e^{-x/\lambda}, & x > 0. \end{cases} \quad (6.7)$$

Comparando (6.3) con (6.7) ($x > 0$) observamos que ambas soluciones coinciden si $M_0 = \alpha/(2\beta)$, indicando que, aunque el modelo no presupone una fuente puntual, la solución se comporta como si hubiera una fuente puntual de valor $\alpha/(2\beta)$. Así, los desplazamientos en los blancos ante perturbaciones en la fuente serán iguales.

Un modelo más realista para la difusión de Hh en el disco de ala considera una degradación dependiente de la posición, ya que Ptc participa activamente en la degradación del morfógeno:

$$D \frac{d^2 Hh}{dx^2} + \theta(x)^- \alpha - \beta_{\text{est}} Hh = 0, \quad (6.8)$$

con,

$$\beta_{\text{est}}(x) = \begin{cases} \beta^*, & 0 < x < b, \\ \beta, & \text{en otro caso,} \end{cases} \quad (6.9)$$

donde el subíndice est significa el estado estacionario de $\beta(x)$, b es la anchura de la banda de Ptc y $\theta(x)$ es una función escalón centrada en cero con $\beta^* > \beta$. La solución a (6.8) es:

$$Hh(x) = \begin{cases} Hh_{\text{bandaPtc}} = Ae^{x/\lambda_2} + Be^{-x/\lambda_2}, & 0 < x < b, \\ Hh_{\text{fuera}} = Ce^{-x/\lambda_1}, & x \geq b, \end{cases} \quad (6.10)$$

donde $\lambda_1^2 = D/\beta$ y $\lambda_2^2 = D/\beta^*$. Por lo tanto, para $x > b$, el gradiente estacionario del morfógeno se reduce al caso simple de (6.3). Por lo tanto, los blancos fuera de la banda Ptc presentarán la misma robustez ante perturbaciones en la producción del ligando.

En resumen, nuestros análisis muestran que en el estado estacionario los modelos clásicos predicen la misma robustez para todos los genes blancos activados por el morfógeno.

6.1.2. La interpretación dinámica del gradiente de Hh predice robustez diferencial

El trabajo de Nahmad y Stathopoulos (2009) sugiere que en el disco de ala de la mosca, el gradiente de Hh se interpreta de forma dinámica, es decir, utiliza un solo umbral para la activación de *dpp* y *col*, pero se determinan en diferentes tiempos. La difusión de Hh en el disco alar regula la expresión temporal de Ptc, generando un perfil dinámico del gradiente de Hh que, en un tiempo τ , puede extenderse más allá del gradiente estacionario. Siguiendo la terminología de Nahmad y Stathopoulos, denominamos *overshoot* al gradiente de Hh de mayor alcance. El modelo del *overshoot* propuesto por estos autores afirma que *dpp* se activa mediante el overshoot, mientras que *col* se define por el gradiente estacionario de Hh. Para modelar el gradiente dinámico de Hh, utilizamos la siguiente ecuación:

$$\frac{\partial Hh}{\partial t} = D \frac{\partial^2 Hh}{\partial x^2} - \beta(t)Hh,$$

$$\beta(t) = \begin{cases} \beta_{\text{temprano}}, & 0 < t < \tau, \\ \beta_{\text{tardío}}, & t \geq \tau \end{cases} \quad (6.11)$$

$$\beta_{\text{temprano}} < \beta_{\text{tardío}},$$

$$Hh(0, t) = Hh_0,$$

donde $\lambda_{\text{over}}^2 \approx D/\beta_{\text{temprano}}$ y $\lambda_{\text{est}}^2 = D/\beta_{\text{tardío}}$ (con β_{temprano} representando la tasa de degradación antes del overshoot y $\beta_{\text{tardío}}$ en el estado estacionario). La ecuación

(6.11) nos lleva a las siguientes soluciones:

$$Hh_{over}(x) \approx Hh_0 e^{-x/\lambda_{over}}, \quad (6.12)$$

$$Hh_{est}(x) = Hh_0 e^{-x/\lambda_{est}}. \quad (6.13)$$

Las ecuaciones (6.1), (6.12) y (6.13) permiten obtener la siguiente relación:

$$\Delta x_{est} = \frac{\lambda_{est}}{\lambda_{over}} \Delta x_{over}, \quad (6.14)$$

dado que $\lambda_{est} < \lambda_{over}$, el modelo dinámico sugiere que el estado estacionario es más robusto que el overshoot, lo cual predice que el patrón de *col* sería más estable que el patrón de *dpp* ante variaciones en la producción de Hh (ver figura 6.1a'-c'). La razón $\lambda_{est}/\lambda_{over}$ en la ecuación (6.14) puede expresarse en términos de los parámetros cinéticos de la señalización de Hh (ecuación 6.11):

$$\Delta x_{est} = \frac{\beta_{over}}{\beta_{est}} \Delta_{over} = \frac{\gamma_{HhPtc} Ptc_{est} + \beta_{Hh}}{\gamma_{HhPtc} Ptc_{over} + \beta_{Hh}} \Delta x_{over} \approx \frac{Ptc_{est}}{Ptc_{over}} \Delta x_{over}. \quad (6.15)$$

La aproximación en la ecuación anterior supone que la degradación de Hh dependiente de Ptc es mucho más rápida que otros mecanismos de degradación de Hh y proporciona una estimación de la diferencia en robustez entre los objetivos en el overshoot y el estado estacionario como función de los niveles de Ptc. Cabe destacar que en la ecuación (6.15), la diferencia en Δx entre el modelo de estado estacionario y el overshoot es independiente del umbral específico en el que el gradiente de Hh establece información posicional. Así, esta ecuación permite relacionar experimentalmente la robustez del patrón con información que podría obtenerse experimentalmente, como los niveles de expresión de Ptc.

El resultado de la ecuación (6.15) podría atribuirse a la simplificación del gradiente de Hh en el modelo de la ecuación (6.11). Para investigar esto, analizamos un modelo más detallado de la señalización de Hh, tal como fue estudiado previamente en Nahmad y Stathopoulos, 2009. Este modelo incorpora de forma más explícita

algunas de las interacciones moleculares en la vía de señalización de Hh:

$$\frac{\partial Hh}{\partial t} = D \frac{\partial^2 Hh}{\partial x^2} + S^+(x)\alpha_{Hh} - \gamma_{Hh_Ptc}Hh \times Ptc - \beta_{Hh}Hh, \quad (6.16)$$

$$\frac{\partial ptc}{\partial t} = S^-(x)\alpha_{ptc0} + \frac{\alpha_{ptc}Signal^m}{k_{ptc}^m + Signal^m} - \beta_{ptc}ptc, \quad (6.17)$$

$$\frac{\partial Ptc}{\partial t} = \mu_{Ptc}ptc - \gamma_{Hh_Ptc}Hh \times Ptc - \beta_{Ptc}Ptc, \quad (6.18)$$

$$\frac{\partial Hh_Ptc}{\partial t} = \gamma_{Hh_Ptc}Hh \times Ptc - \beta_{Hh_Ptc}Hh_Ptc, \quad (6.19)$$

$$\frac{\partial Signal}{\partial t} = \frac{S^-(x)\alpha_{Signal} \left(\frac{Hh_Ptc}{Ptc} \right)^n}{k_{Signal}^n + \left(\frac{Hh_Ptc}{Ptc} \right)^n} - \beta_{Signal}Signal \quad (6.20)$$

donde Hh , ptc , Ptc , y Hh_Ptc representan las concentraciones de Hh, ptc (ARN mensajero), Ptc (proteína) y el complejo Hh-Ptc, respectivamente. Los coeficientes α , β , γ , y μ representan las tasas de síntesis, degradación, formación de complejos y traducción, respectivamente. Para resolver las ecuaciones (6.16)-(6.20), utilizaremos un sistema de coordenadas centrado en la frontera AP del disco de ala, donde el compartimento anterior está en el eje negativo. $S^+(x)$ (o $S^-(x)$) es una función escalón donde $S^+(x) = 1$ si $x > 0$ (o $S^-(x) = 1$ si $x < 0$) y es cero en caso contrario. $Signal$ denota la concentración de la señal que Hh induce en el interior de la célula que ha activado la vía de señalización de Hh.

Las condiciones iniciales y de frontera de las ecuaciones (6.16)-(6.20) son:

$$\begin{aligned} \text{C. I. 1} \quad ptc(x, 0) &= S^-(x) \frac{\alpha_{ptc0}}{\beta_{ptc}}, \\ \text{C. I. 2} \quad Ptc(x, 0) &= \frac{\mu_{Ptc}}{\beta_{Ptc}} ptc(x, 0) = S^-(x) \frac{\alpha_{ptc0} \mu_{Ptc}}{\beta_{ptc} \beta_{Ptc}}, \\ \text{C. F.} \quad \frac{\partial Hh}{\partial x} \Big|_{x=-100} &= \frac{\partial Hh}{\partial x} \Big|_{x=100} = 0. \end{aligned} \quad (6.21)$$

En el estado estacionario, las ecuaciones (6.16)-(6.20) pueden reducirse a una sola expresión (Nahmad & Stathopoulos, 2009):

$$D \frac{d^2 Hh_{est}}{dx^2} + S^+(x) \alpha_{Hh} - \frac{\chi S^-(x) Hh_{est}}{\gamma_{Hh_Ptc} Hh + \beta_{Ptc}} \left[\alpha_{ptc0} + \frac{\alpha_{ptc} Hh_{est}^{nm}}{\eta^m (k^n + Hh_{est}^n)^m + S^-(x) Hh_{est}^{nm}} \right] - \beta_{Hh} Hh_{est} = 0, \quad (6.22)$$

donde,

$$k = \frac{k_{Signal} \beta_{Hh_Ptc}}{\gamma_{Hh_Ptc}},$$

$$\eta = \frac{k_{ptc} \beta_{Signal}}{\alpha_{Signal}},$$

$$\chi = \frac{\mu_{Ptc} \gamma_{Hh_Ptc}}{\beta_{ptc}}.$$

En el estado estacionario es posible obtener una solución para $Signal(x)$ en función de Hh :

$$Signal(x) = \begin{cases} 0, & x < 0, \\ \frac{\alpha_{Signal}}{\beta_{Signal}} \frac{Hh^n(x)}{k^n + Hh^n(x)}, & x \geq 0, \end{cases} \quad (6.23)$$

donde $k = \frac{k_{Signal} \beta_{Hh_Ptc}}{\gamma_{Hh_Ptc}}$.

Para analizar la robustez en el modelo completo, resolvemos numéricamente las ecuaciones (6.16-6.20) y calculamos Δx (6.1), considerando el caso en que la tasa de producción de Hh se reduce a la mitad (*i. e.*, $\alpha_{Hh} \rightarrow \alpha_{Hh}/2$). El cálculo se realiza tanto para el overshoot como para el estado estacionario. En la figura 6.2a se observa que en todos los casos, Δx para el estado estacionario (verde) es menor que para el overshoot (rojo).

Dado que este resultado se obtuvo con un conjunto específico de parámetros, surge la pregunta de si el resultado depende de los parámetros seleccionados o es una propiedad inherente de la cascada de señalización de Hh. Para abordar esta cuestión, variamos aleatoriamente todos los parámetros que aparecen en las ecuaciones (6.16)-(6.20), excepto α_{Hh} , y luego calculamos Δx . En la figura 6.2a', se muestra que, en todos los casos, Δx para el estado estacionario es menor que para

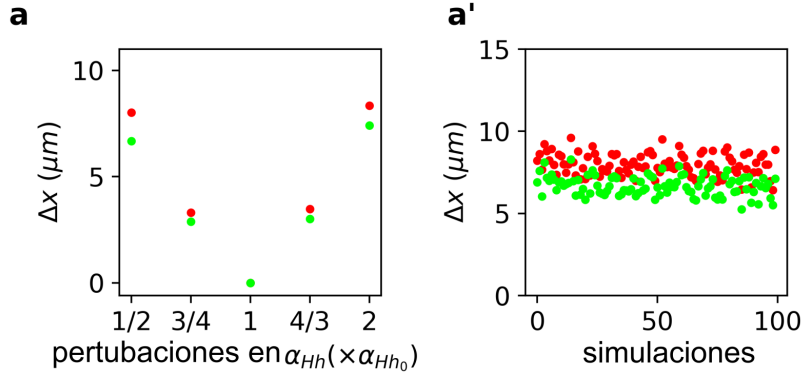


Figura 6.2: **Análisis de la robustez de diferentes genes blanco en un modelo completo de Hh, confirmando la robustez diferencial.** **a.** Δx según se define en la ecuación (6.1), evaluado para el establecimiento del borde mediante el overshoot (rojo) y el estado estacionario (verde), ante diferentes perturbaciones en la tasa de producción de Hh (representada por α_{Hh} en la ecuación (6.16)). Las perturbaciones se basan en el valor reportado por (Nahmad & Stathopoulos, 2009). **a'.** Δx bajo una reducción a la mitad de α_{Hh} y con ruido en los demás parámetros de las ecuaciones (6.16)-(6.20), generado mediante una distribución normal con media igual al valor reportado para cada parámetro por Nahmad y Stathopoulos, 2009 y desviación estándar del 10 % de dichos valores. Figura modificada de Reyes et al., 2024a.

el overshoot. Por lo tanto, el modelo completo confirma la predicción del modelo simple: *col* es más robusto que *dpp*.

6.1.3. La robustez del estado estacionario depende de la regulación de Ptc por Hh

El trabajo de Chen y Struhl (1996) sugiere que la autorregulación de *ptc* determina el rango de extensión de la señal inducida por Hh. Esto plantea la idea de que la regulación de *ptc* influye en la robustez de los genes blancos inducidos por Hh. Para comprobar esta hipótesis, resolvimos el modelo completo, ecuaciones (6.16)-(6.20), modulando la regulación de *ptc*. Luego calculamos Δx bajo la perturbación que reduce la tasa de producción de Hh a la mitad. Los resultados de este análisis muestran que Δx en el estado estacionario disminuye conforme la regulación de *ptc* aumenta, mientras que el valor de Δx en el caso del overshoot se ve menos afectado. Esto indica que la robustez del estado estacionario depende de la regulación de *ptc* (figura 6.3a).

Asimismo, realizamos el análisis perturbando todos los parámetros del modelo para evaluar si la propiedad observada depende de la selección de parámetros. La figura 6.3b muestra que en todos los casos, Δx es mayor cuando la regulación de *ptc* está desactivada (es decir, cuando $\alpha_{ptc} = 0$) que cuando la regulación está activa, en el estado estacionario. Esto confirma que el efecto de la regulación de *ptc* en la robustez del estado estacionario no depende de la elección de parámetros. Así, proponemos que la regulación de *ptc* por Hh explica la robustez diferencial en el disco de ala de la mosca, ya que aumenta la robustez de los blancos activados por el estado estacionario, mientras que los blancos definidos por el overshoot presentan menor robustez.

Por otro lado, el trabajo de Bergmann et al., 2007 que sugiere que la información posicional establecida antes del estado estacionario aumenta la robustez de los genes blancos, lo que parece contradecir nuestro hallazgo de que el overshoot (establecido antes del estado estacionario) es menos robusto que el estado estacionario. Para entender esta aparente contradicción, evaluamos Δx como función del tiempo. Encontramos que los estados transitorios tempranos exhiben el menor valor de Δx y, por lo tanto, son los más robustos entre todos los estados (en concordancia con (Bergmann et al., 2007)). Sin embargo, Δx incrementa a medida que se aproxima al overshoot, alcanzando su valor máximo en este punto, para luego comenzar a disminuir hasta alcanzar el valor correspondiente al estado estacionario (figura 6.3c).

6.1.4. La expresión de Col es más robusta que la expresión de Dpp en el disco de ala de la mosca

A partir de nuestros resultados teóricos, procedimos a evaluar experimentalmente si los genes blancos activados por Hh muestran robustez diferencial. Estudios previos han indicado que la anchura de la banda de *col* en el disco de ala no se ve afectada en insectos heterocigotos (Hatori et al., 2021; Irons et al., 2010). Para determinar si esta propiedad también se mantiene para *dpp*, que se establece mediante overshoot (Nahmad & Stathopoulos, 2009), analizamos los patrones de *col* y *dpp* (este último

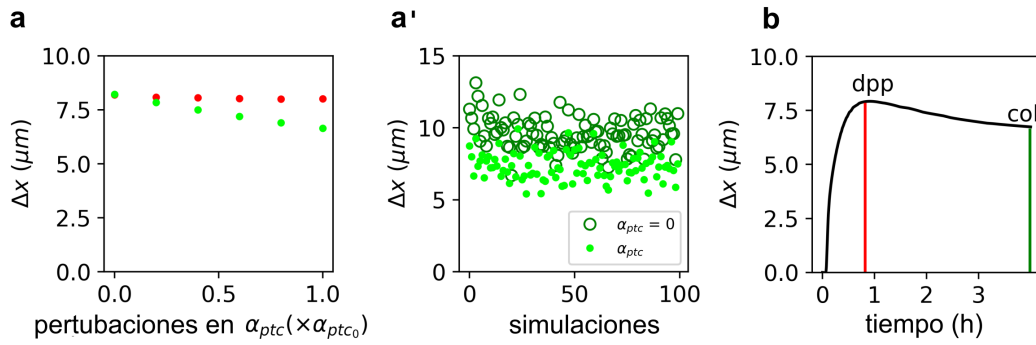


Figura 6.3: **La robustez del estado estacionario depende de la regulación de *ptc*.** **a.** Δx frente a perturbaciones de α_{Hh} a la mitad, bajo diferentes condiciones de regulación de *ptc*. **a'** Comparaciones de Δx para *col* con regulación (α_{ptc}) y sin regulación de *ptc* ($\alpha_{ptc} = 0$). **b.** Δx calculado en diferentes estados de la difusión de Hh. Las líneas verticales representan los tiempos en que se definen *dpp* (roja) y *col* (verde). Figura modificada de Reyes et al., 2024a.

utilizando un reportero lacZ) en discos con 1 o 2 copias de *hh* (denotados como *hh*(+/-) y *hh*(+/+), respectivamente). Encontramos que el ancho de *col* en discos *hh*(+/-) se reduce en 1,66 μm (menor que el diámetro promedio de una célula, 2,5 μm) en comparación con el ancho del patrón en los discos *hh*(+/-) (figura 6.4a,b,e). Sin embargo, el patrón de *dpp* en el heterocigoto se reduce en 4,44 μm en relación con el homocigoto (figura 6.4c,d,e). Este resultado no se debe al umbral de intensidad al que se mide el ancho del patrón, como se puede ver en la figura 6.6, ni a un cambio en el tamaño del disco por la pérdida del alelo de *hh*, ya que el área de la bolsa del disco en ambos casos no muestra diferencias significativas (figura 6.5). Concluimos, por lo tanto, que el patrón de *col* es más robusto que el patrón de *dpp* ante variaciones en la dosis de *hh*,

6.1.5. El modelo del overshoot predice mayor precisión en el establecimiento del borde de *dpp* que lo predicho por el modelo clásico en el estado estacionario

El hecho de que los genes blanco definidos por el overshoot sean menos robustos que aquellos definidos en el estado estacionario podría parecer una desventaja del modelo del overshoot, ya que en general se espera que los sistemas biológicos estén

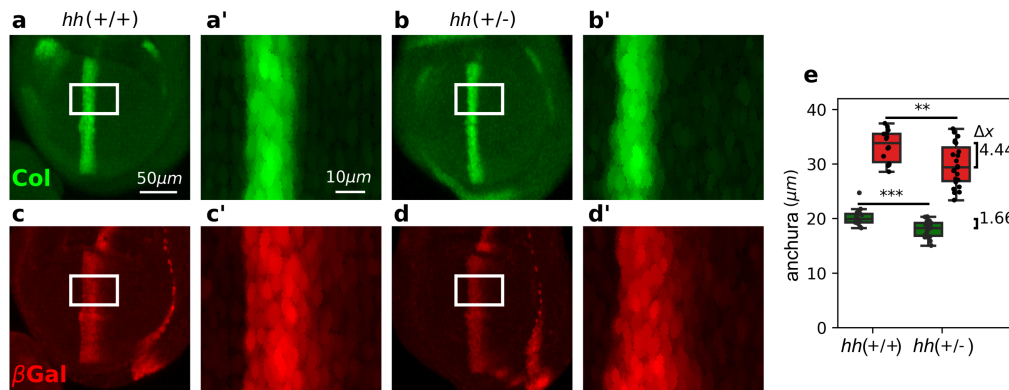


Figura 6.4: **Robustez diferencial de los genes blanco de Hh.** a-d. Discos de ala de larvas en el tercer estadio larval de tipo silvestre (b,d) y heterocigoto (*hh+/-*, a,c) inmunoteñidos con anticuerpos para Col (a-b) y β -galactosidasa (c-d). Tanto los discos de tipo silvestre como los heterocigotos expresan un transgen con una trampa de *dpp*LacZ, donde la β -galactosidasa marca el patrón de expresión de *dpp*. a'-d'. Área ampliada de la caja blanca para el caso de Col(*hh(+/+)*) (a'), Col(*hh(+/-)*) (b'), *dpp*(*hh(+/+)*) (c'), y *dpp*(*hh(+/-)*) (d'). Las barras de escala son las mismas para todos los casos. e. Anchos de los patrones de los genes medidos en la región indicada con el rectángulo blanco. Los corchetes a la derecha muestran la diferencia entre medianas de ambos grupos. Número de discos analizados: *hh(+/+)*, $n = 23$, *hh(+/-)*, $n = 14$. Se realizaron pruebas de Mann-Whitney U en ambos casos, obteniendo valores de $p = 0,0003$ para Col y $p = 0,006$ para *dpp*LacZ. Figura modificada de Reyes et al., 2024a.

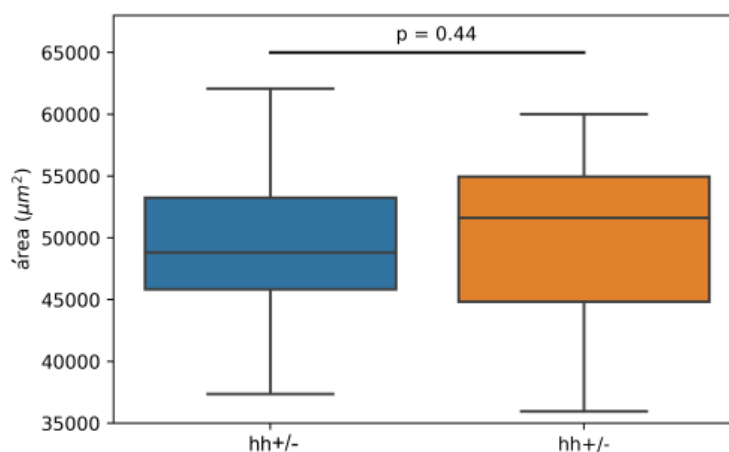


Figura 6.5: **El área de la bolsa de los discos de ala no cambia en los discos mutantes.** En azul, discos de tipo silvestre; en naranja, discos heterocigotos. Figura modificada de Reyes et al., 2024a.

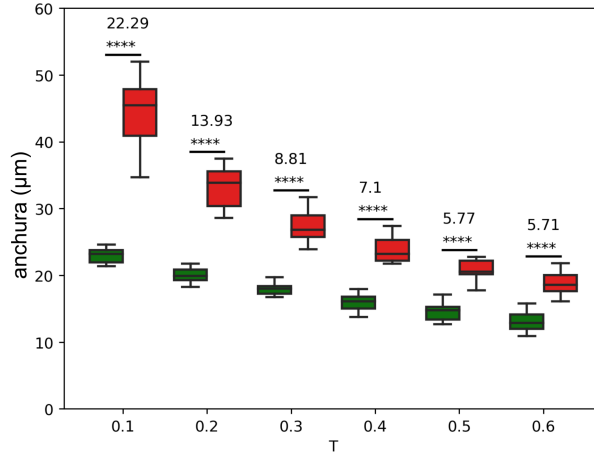


Figura 6.6: **Diferencias en el ancho de los patrones de *col* y *dppLacZ* en discos *hh(+/+)* a diferentes valores de umbral.** Ancho de los patrones génicos medido a diferentes concentraciones de umbral, tal como se muestra en la figura 6.4e (la codificación de color es la misma que en la figura 6.4). Los números en la parte superior representan las diferencias entre las medianas de ambos grupos. Figura modificada de Reyes et al., 2024a. Los discos analizados son los mismos que los de la figura 6.4.

diseñados para ser lo más robustos posible. Sin embargo, la robustez es solo una de las propiedades en el establecimiento de patrones. Las concentraciones de morfógenos son naturalmente ruidosas, lo que causa que los territorios se definan con un borde difuso (Lander et al., 2009). Para explorar si el modelo del overshoot compensa la pérdida de robustez con la precisión con la que se define el borde de *dpp*, definimos la precisión, σ_x , de un blanco activado por un morfógeno como la desviación estándar de diferentes mediciones a lo largo del eje vertical:

$$\sigma_x^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}, \quad (6.24)$$

donde x_i es una de las mediciones de la anchura del patrón a lo largo de la vertical, \bar{x} es el promedio de todas las mediciones y n es el número de medidas tomadas (ver figura 6.7a). Una precisión perfecta se alcanza cuando $\sigma_x = 0$; conforme se pierde precisión, σ_x incrementa.

Medimos entonces la precisión para *col* y *dpp* en el disco de ala de la mosca, y encontramos que *col* es dos veces más preciso que *dpp* (figura 6.7b,c,d). Para comparar los experimentos con nuestras predicciones teóricas, simulamos la señal de Hh introduciendo ruido en T de tal forma que la precisión de *col* definida en

el estado estacionario coincidiera con la precisión del patrón experimental de *col* ($\sigma_x = 1,23 \mu m$ para *col* experimental), ya que el mecanismo que define el patrón de *col* es el mismo tanto para el modelo estacionario como para el modelo del overshoot (figura 6.7b',d). A este nivel de ruido en T , comparamos los patrones establecidos por el overshoot (dpp_{over} , modelo dinámico, figura 6.7c') con la precisión de dpp establecida por el modelo estacionario (dpp_{est} , figura 6.7c'').

Encontramos que el modelo del overshoot predice que el borde de dpp es mucho más preciso que el borde definido por el modelo estacionario. De hecho, las simulaciones predicen un borde más nítido que el observado experimentalmente, aunque probablemente no sea biológicamente significativo porque σ_x es menor que el ancho de una célula. No obstante, la mediana de σ_x en patrones de dpp simulados bajo el modelo estacionario es de $4,36 \mu m$ (figura 6.7d), lo cual sugiere que, si el borde de dpp fuera establecido por el gradiente en el estado estacionario, la imprecisión sería mayor al diámetro de dos células a lo largo del eje AP, lo que podría afectar el ala del adulto.

6.2. El reclutamiento celular y el origen de la asimetría AP del ala de *Drosophila*

6.2.1. La atenuación del reclutamiento celular afecta principalmente el compartimento L5-M y el borde del ala, mientras que el patrón de venas se mantiene intacto

Para investigar cómo el reclutamiento celular afecta la forma del ala, empleamos moscas en las que la expresión de Vg estaba reducida en el patrón de ds , que es complementario al patrón de vg y, por lo tanto, bloquea que Vg se expanda al resto de la bolsa del ala (ds -Gal4, UAS- vg RNAi; Munoz-Nava et al., 2020), llamamos a las alas obtenidas bajo estas condiciones experimentales alas con reclutamiento atenuado. En particular, comparamos el área de las secciones intervenas del ala (L1-L2, L2-L3, L3-L4 y L5-M; figura 6.8a) en moscas de control y ds -Gal4,UAS- vg RNAi.

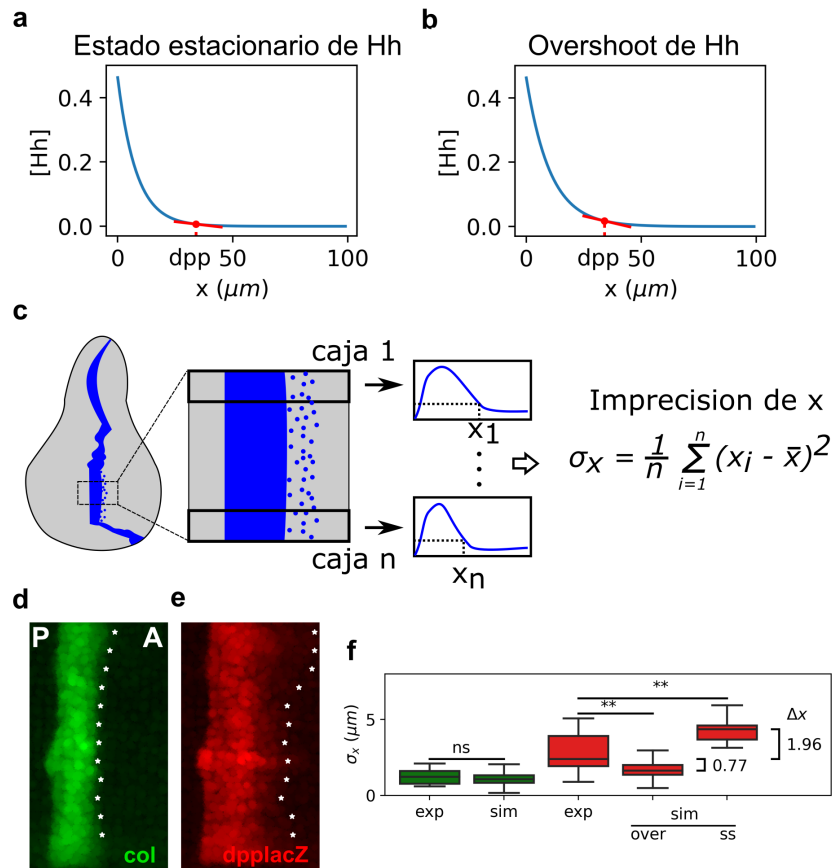


Figura 6.7: El modelo de overshoot predice mayor precisión en el borde anterior de *dpp* que el modelo de estado estacionario. Representación de los gradientes de Hh en estado estacionario (a) y overshoot (b). En la ubicación del borde anterior de *dpp*, la pendiente del gradiente es más pronunciada en el gradiente de overshoot que en el gradiente de estado estacionario. **c**. Representación esquemática de cómo definimos nuestra medida de precisión para un borde de patrón (tanto en patrones experimentales como simulados). Primero, una caja define la región de interés (ROI) en el patrón. Luego, esta ROI se subdivide en n cajas, cada una de las cuales define una posición x_i . La medida de precisión es la desviación estándar de todos los valores de x_i . **d**, **e**. Patrones representativos de Col (d) y *dpplacZ* (e), en los cuales se mide cada x_i para cada ROI, tal como se define en c, y se marca con un asterisco a lo largo del borde anterior. **f**. Cuantificación de σ_x en varios patrones experimentales (exp) y simulados (sim) de *col* (verde) y *dpp* (rojo). En los patrones simulados, los niveles de ruido se ajustan al patrón experimental de *col* y se usan para calcular el σ_x simulado de *dpp* según los modelos de estado estacionario (est) o overshoot (over). Los tamaños de muestra exp son como en la figura 6.4. Los tamaños de muestra en las simulaciones fueron $n = 50$ en todos los casos. Para la comparación estadística, se aplicaron pruebas de Mann-Whitney U en todos los casos. El valor p estadístico para *col* fue $p = 0,42$. Para *dpp* experimental vs. overshoot: $p = 1,0 \times 10^{-3}$, y para *dpp* experimental vs. estado estacionario simulado: $p = 9,0 \times 10^{-3}$. Figura modificada de Reyes et al., 2024a.

Descubrimos que la mayoría de estas regiones (L1-L2, L2-L3, L3-L4) aumentaron significativamente su tamaño relativo en alas con reclutamiento atenuado con respecto a los controles (figura 6.8b). En cambio, la región L5-M disminuyó su tamaño relativo en un 15 % (figura 6.8b). Este efecto no depende del sexo, ya que se obtiene un resultado similar para individuos masculinos y femeninos (figura 6.9). Estos resultados sugieren que el reclutamiento celular contribuye al tamaño de la región L5-M.

Para medir cuantitativamente diferencias en la forma del ala, utilizamos el análisis de Procrustes (una métrica de cambios de forma que es invariante en escala, rotación y traslación Gower, 1975; Krzanowski, 2000, ver Materiales y Métodos) utilizando dos conjuntos diferentes de puntos de referencia definidos en el ala. El primero, en adelante denominado Puntos de Referencia del Margen (ML, figura 6.8c), está compuesto por puntos en el margen del ala y refleja la forma general del ala. El segundo, en adelante denominado Puntos de Referencia de las Venas (VL, figura 6.8d), está compuesto por puntos en las venas del ala y refleja el patrón de venas. Como comparación basal, calculamos la distancia de Procrustes entre cada par de alas de control (barras azules en la figura 6.8c,d) y entre cada par de alas de control *vs.* alas con reclutamiento atenuado (barras naranjas en la figura 6.8c,d). Encontramos diferencias significativas en la distancia de Procrustes entre las comparaciones de control *vs.* alas con reclutamiento atenuado y las comparaciones de control *vs.* control, ambas utilizando ML (figura 6.8c) y VL (figura 6.8d), pero la diferencia en la distancia de Procrustes es 2.5 veces mayor en las comparaciones ML que en las VL (figura 6.8c,d).

Para determinar qué puntos de referencia son los más afectados, comparamos las coordenadas de cada punto de referencia en alas con reclutamiento atenuado tanto para el margen como para el conjunto de puntos de referencia de la venación (figura 6.8e,f). Encontramos que la mayoría de los puntos de referencia están desplazados de manera similar a lo largo del margen y del patrón de venación. Sin embargo, dos puntos de referencia ubicados en la parte proximal del margen se desplazaron dos

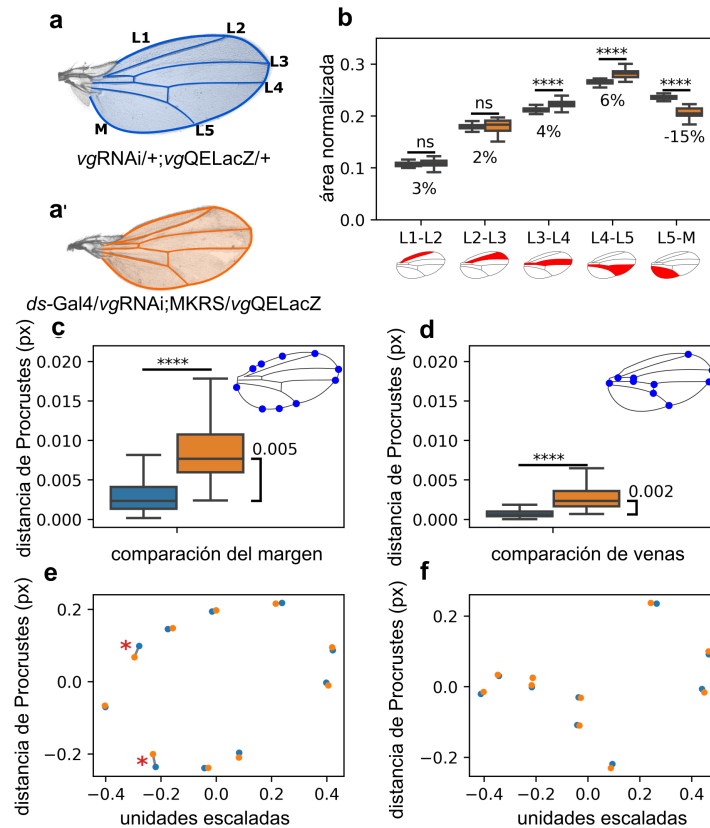


Figura 6.8: **La atenuación del reclutamiento celular afecta el área de la región L5-M y la forma del ala.** **a,a'**. Ala representativa de control (a) y ala con reclutamiento atenuado (a') que muestra las venas (L1-L5) y el margen (M). En sombreado azul mostramos el ala, mientras que las líneas azules resaltan el patrón de venas. **b.** Área normalizada de cada región intervena con respecto al área total del ala. La codificación de colores es como en a. Los números debajo del diagrama de caja representan el porcentaje de aumento en las medianas entre los grupos. **c,d.** Comparación de Procrustes de los puntos de referencia del margen (c) y los puntos de referencia de las venas (d). Azul: Control vs. Control. Naranja: Control vs. con reclutamiento atenuado. En la esquina superior izquierda de ambos gráficos, se muestran imágenes representativas de ML (c) y VL (d). **e,f.** Desplazamiento promedio de los puntos de referencia de control (puntos azules) y los puntos de referencia con reclutamiento atenuado (puntos naranjas) después del análisis de Procrustes para ML (e) y para VL (f). Los asteriscos indican los puntos de referencia que muestran un mayor desplazamiento entre las condiciones de control y las condiciones con reclutamiento atenuado. Tamaños de muestra: alas de control ($n = 52$); alas con reclutamiento atenuado ($n = 20$). Todas las alas en esta figura fueron disecadas de moscas macho. Una prueba de Shapiro muestra que las distribuciones son no paramétricas. Por lo tanto, se realizó una prueba U de Mann-Whitney. * indica $p < 0,05$ y **** indica $p < 5 \times 10^{-5}$. Figura modificada de Reyes et al., 2024b.

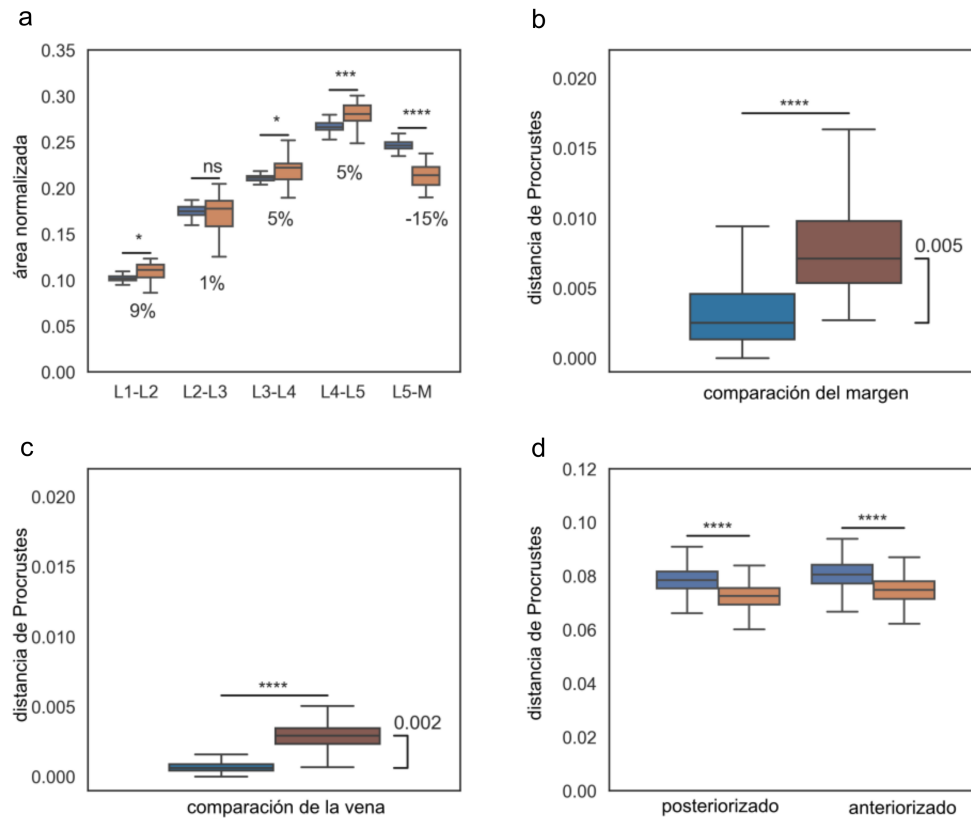


Figura 6.9: **El efecto diferencial del reclutamiento celular también se observa en hembras.** **a.** Área normalizada con respecto al área total del ala en hembras. **b-c.** Comparación de Procrustes de los marcos de referencia de margen (b) y de venas (c). **d.** Comparación de procrustes del ala CTRL versus el ala posteriorizada y anteriorizada CTRL (azul), y lo mismo para las alas EXP (naranja). Usamos 58 alas de hembras CTRL y 21 EXP. Se realizó una prueba de Shapiro seguida de una prueba de Mann-Whitney. Figura modificada de Reyes et al., 2024b.

veces más que el promedio (asteriscos en la figura 6.8e). En particular, el que está ubicado en el margen anterior parece estar desplazado a lo largo del margen y tiene poco efecto en la forma del ala; sin embargo, el que está ubicado en el margen posterior está desplazado en una dirección ortogonal al margen y probablemente explica la reducción del área L5-M en alas con reclutamiento atenuado. Concluimos que la atenuación del reclutamiento cambia notablemente la forma del ala pero tiene poco impacto en el patrón de venas.

6.2.2. Las alas con reclutamiento atenuado son más simétricas con respecto al eje AP en comparación con las alas silvestres

Dado que el reclutamiento celular en el ala de *Drosophila* es asimétrico, con mayores efectos en la región posterior del ala, surge la pregunta de si esto influye en la asimetría AP del ala. En primer lugar, el ala de *Drosophila* no es simétrica respecto al eje AP, ya que el compartimento anterior no es un reflejo del compartimento posterior. Sin embargo, definimos el ala anteriorizada (figura 6.10a) como el ala obtenida al reflejar el compartimento anterior respecto al eje AP. De manera similar, el ala posteriorizada (figura 6.10a) se define como el ala obtenida al reflejar el compartimento posterior respecto al eje AP. Comparar estas versiones mediante la distancia de Procrustes nos permite evaluar los cambios en la simetría del ala.

Entonces, comparamos tanto las alas controles como las alas con reclutamiento atenuado con sus respectivas versiones anteriorizadas y posteriorizadas. Observamos que, en ambos casos (anteriorización y posteriorización), las alas con reclutamiento atenuado presentan una menor distancia de Procrustes en comparación con las alas controles (figura 6.10b). De hecho, al considerar puntos de referencia más representativos del ala (compuestos de un mayor número de puntos, ver figura 6.11), se evidencia una diferencia más pronunciada entre las alas controles y las alas con reclutamiento atenuado. Nuevamente, este efecto es independiente del sexo (figura

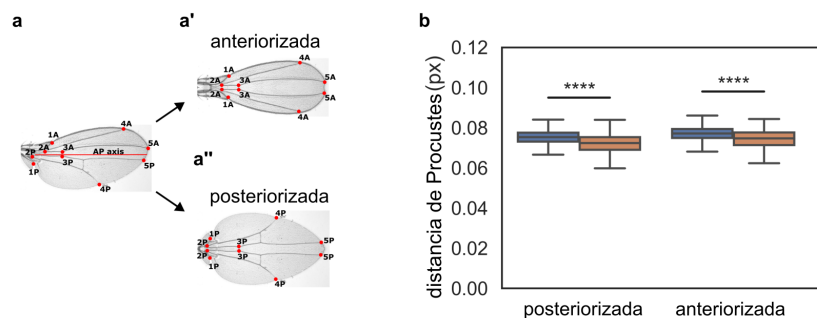


Figura 6.10: **La reducción de la región L5-M induce la simetrización del ala de *Drosophila*.** **a.** A partir de un ala, tomamos 10 puntos para construir un ala anteriorizada (a') y un ala posteriorizada (a''). Ambas alas son completamente simétricas respecto al eje AP (ver Métodos). **b.** Comparación de Procrustes entre las alas CTRL y sus versiones posteriorizadas y anteriorizadas (azul), así como entre las alas EXP y sus versiones correspondientes (naranja). Usamos 52 alas CTRL y 20 alas EXP. Se realizó una prueba de U de Mann-Whitney después de la prueba de Shapiro. Figura modificada de Reyes et al., 2024b.

6.9d). Por lo tanto, concluimos que las alas con reclutamiento atenuado son más simétricas respecto al eje AP.

6.2.3. El patrón *vg* de los discos con reclutamiento atenuado celular mantiene las proporciones entre sus secciones intervenas

Con el fin de comprobar si el reclutamiento celular contribuye a romper la asimetría AP del ala de *Drosophila* mediante el reclutamiento de un mayor número de células en el dominio pro-vena que dará lugar a la región L5-M del ala adulta, examinamos las consecuencias de la atenuación del reclutamiento en el desarrollo larvario. Analizamos un reportero de *vg*QE (*vg*QELacZ) en el tercer estadio del disco del ala de *Drosophila* (figura 6.12a', b'). Teñimos estos discos con anticuerpo de DSRF (figura 6.12a, b), un marcador específico para las regiones intervenas (Blair, 2007), para medir cada área intervena (figura 6.12a'', b''). Contrariamente a nuestras expectativas, no encontramos diferencias significativas entre las áreas relativas de las regiones intervenas en los controles y los discos con reclutamiento atenuado (figura 6.12c). Debido a la dificultad de determinar los márgenes laterales de la bolsa del ala, también analizamos la elipse que pasa a través de los pliegues de la bolsa

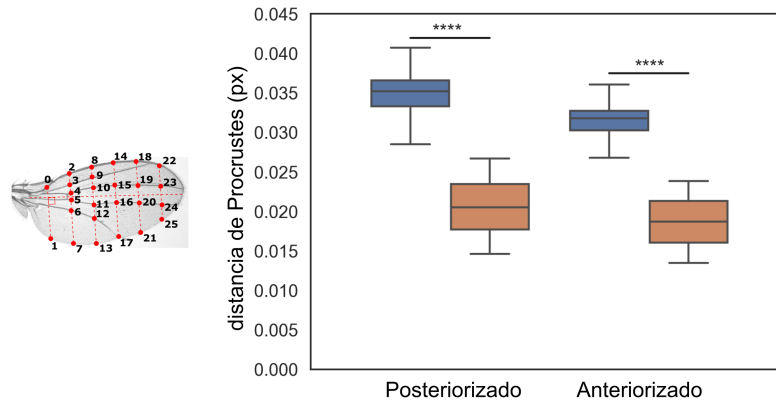


Figura 6.11: **El efecto de simetrización en alas con reclutamiento atenuado se acentúa al considerar un marco de referencia más representativo, compuesto de un mayor número de puntos sobre el ala.** Izquierda: un marco de referencia más detallado del ala, compuesto de 26 puntos. Derecha: Comparación de Procrustes entre las alas CTRL y sus versiones posteriorizadas y anteriorizadas (azul), y lo mismo para las alas EXP (naranja) utilizando los puntos de referencia mostrados a la izquierda. Se utilizaron las mismas alas analizadas en la figura 6.10. Figura modificada de Reyes et al., 2024b.

(dobles HP), otro marcador típico de la bolsa del ala, para cuantificar las secciones intervenas. Sin embargo, nuevamente, no encontramos diferencias significativas en el tamaño relativo de la región L5-M al comparar entre los discos de alas de control y con reclutamiento atenuado (figura 6.13).

6.2.4. El patrón de *vg* es más circular en discos de alas con reclutamiento atenuado

También investigamos si la atenuación del reclutamiento celular tiene un efecto sobre la forma general de la bolsa del ala. Para comprobarlo, ajustamos una elipse que pasa por el contorno del patrón *vg*QELacZ (Materiales y Métodos, figura 6.14). Medimos la excentricidad de las elipses ajustadas y descubrimos que en los discos con reclutamiento atenuado, la bolsa del ala es más circular en comparación con el control (es decir, la excentricidad de la elipse ajustada es menor, figura 6.14b). En conjunto, nuestros datos y análisis sugieren que el reclutamiento celular contribuye a la forma general de la bolsa del ala, pero no pueden explicar por qué la región L5-M es más pequeña en las alas adultas.

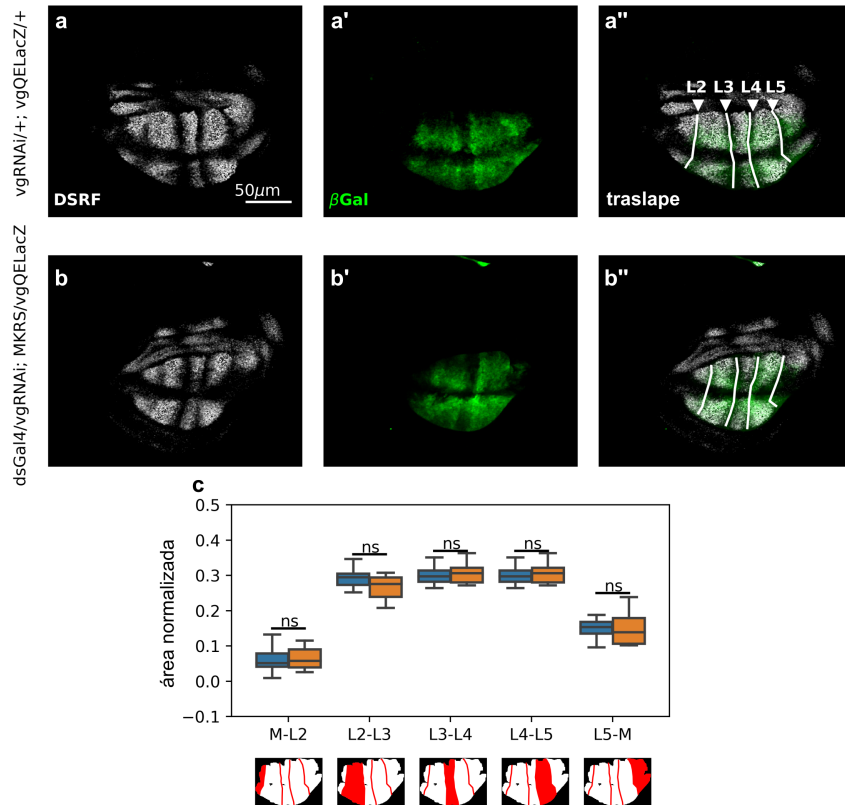


Figura 6.12: **La reducción del área L5-M en las alas adultas con reclutamiento atenuado no se observa durante el desarrollo larval.** a-b'. Discos imagales de ala del tercer estadio larvario representativos de control (a, a') y con reclutamiento atenuado (b, b'), inmunoteñidos con anticuerpos para DSRF (a, b, blanco) y β -galactosidasa (a', b', verde). Las flechas en a'' indican la posición de las venas. a'' y b'' muestran la combinación de estos patrones. Todos los discos expresan el reportero *vgQELacZ*. c. Área normalizada con respecto al área total del patrón *vgQELacZ* de cada región intervena (ver Materiales y Métodos). Los diagramas debajo de este gráfico ilustran las regiones intervena en el disco alar. Tamaños de muestra: alas de control ($n = 36$); alas con reclutamiento atenuado ($n = 16$). Una prueba de Shapiro muestra que las distribuciones son no paramétricas. Por lo tanto, se realizó una prueba U de Mann-Whitney. ns indica que $p > 0,05$. Figura modificada de Reyes et al., 2024b.

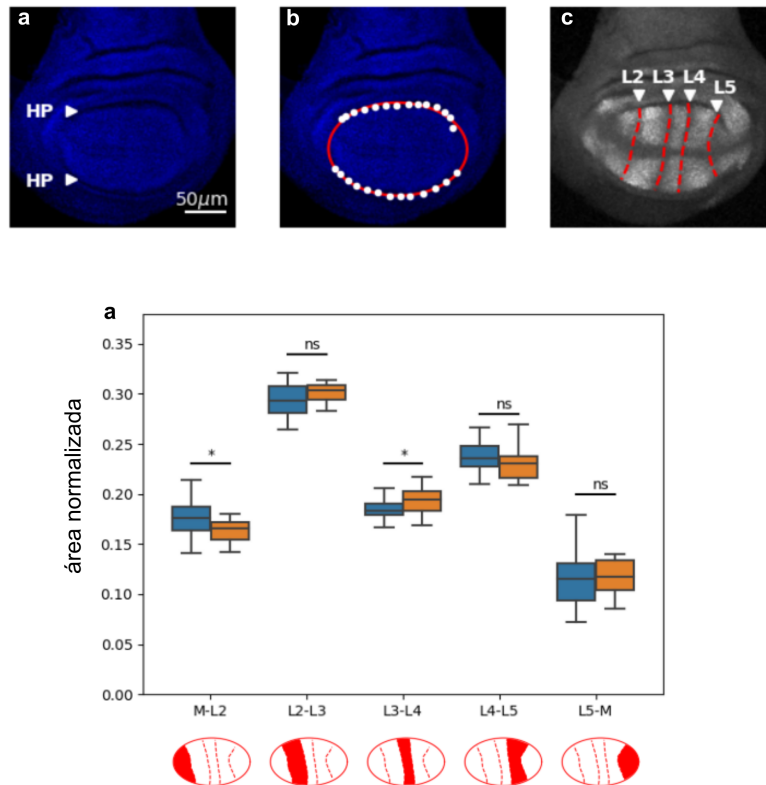


Figura 6.13: La elipse que pasa por los pliegues HP y delimita la bolsa alar no puede recapitular la reducción de la región L5-M en animales con reclutamiento atenuado. **a-c.** Disco alar control representativo inmunoteñido con DAPI (a,b) y DSRF (c). En a, marcamos la posición de los pliegues HP con puntas de flecha. En b, marcamos algunos puntos, que pasan por el pliegue HP y se utilizaron para ajustar, por mínimos cuadrados, la elipse mostrada en rojo. En c, las venas están marcadas con líneas discontinuas rojas y las puntas de flecha indican la posición de las venas L2-L5. **d.** Superposición de la elipse ajustada con las venas para cuantificar las áreas de las secciones intervena. Los diagramas debajo de este gráfico ilustran la región intervena analizada en el disco alar. Tamaños de muestra: disco alar control ($n = 30$); disco alar con reclutamiento atenuado ($n = 16$). ns indica $p > 0,05$. Figura modificada de Reyes et al., 2024b. Una prueba de Shapiro mostró que las distribuciones son no paramétricas, por lo tanto se realizó una prueba U de Mann-Whitney.

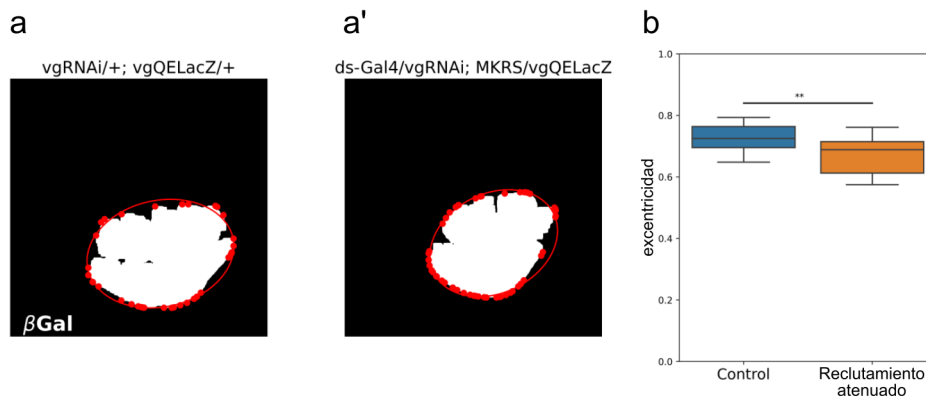


Figura 6.14: **El patrón de *vgQELacZ* en discos con reclutamiento atenuado es más circular que en los controles. a-a'** Discos alares representativos de control (a) y con reclutamiento atenuado (a') que muestran sus patrones binarizados de *vgQELacZ*. **b.** Excentricidad de la elipse ajustada al patrón de *vgQELacZ* a través de su envoltura convexa (ver Materiales y Métodos). Una prueba de Shapiro muestra que las distribuciones son no paramétricas. Por lo tanto, se realizó una prueba U de Mann-Whitney. ** indica $p < 0,01$. Figura modificada de Reyes et al., 2024b.

7. Discusión

7.1. Análisis de la robustez y precisión diferencial de la señalización de la vía de Hh

La arquitectura robusta de los planes corporales frente a perturbaciones genéticas y ambientales es una característica general de los sistemas de desarrollo (Csete & Doyle, 2002; Kitano, 2004; Waddington, 1942). Al mismo tiempo, este diseño robusto también debería admitir cierta flexibilidad para permitir que el sistema evolucione y se adapte a ciertos desafíos genéticos o ambientales (Barkai & Shilo, 2007). Si bien se ha dedicado mucho trabajo a la comprensión de las características de la red que confieren robustez a los patrones de desarrollo, no está claro cómo se podría codificar una arquitectura robusta, pero flexible, en la interpretación de los gradientes de morfógenos (Lander et al., 2009; Lo et al., 2015). En particular, a pesar de mucho trabajo teórico previo, no se ha estudiado en detalle la capacidad de un solo morfógeno para producir diferentes resultados de patrones de expresión con propiedades específicas.

En relación con la visión clásica de la interpretación de los morfógenos, en la que diferentes umbrales de concentración de morfógenos en el estado estacionario definen diferentes límites de los patrones de expresión génica, se han propuesto dos estrategias para aumentar la robustez ante cambios en las tasas de producción de morfógenos: En primer lugar, los gradientes de morfógenos que promueven su propia degradación y decaen bruscamente cerca de la fuente de producción de ligandos (Eldar et al., 2003). Y en segundo lugar, los gradientes que especifican

patrones antes del estado estacionario (Bergmann et al., 2007). Al implementar cualquiera de estas estrategias, se logra una mayor robustez para todos los patrones de expresión genética, independientemente de los umbrales de concentración en los que se establecen. Sin embargo, ambas estrategias tienen un claro inconveniente; estrechan significativamente el dominio de los patrones y, por lo tanto, la lectura de los morfógenos se produce donde el gradiente es esencialmente plano (Adelmann et al., 2023), o tienen buen desempeño cuando el patrón establecido es muy estrecho. Por lo tanto, estas estrategias proporcionan robustez a expensas de un gradiente que define patrones más estrechos. De acuerdo con esta idea, Adelmann et al., 2023 mostraron recientemente que un gradiente de decaimiento lineal establece límites de patrones más precisos con respecto a un gradiente establecido por un mecanismo de auto degradación de ligando cuando se interpreta a varias células de distancia de la fuente de morfógeno. La interpretación dinámica del patrón de Hh en el disco del ala de *Drosophila* (Nahmad & Stathopoulos, 2009) ofrece una implementación mecanicista de esta idea. Primero, un gradiente de Hh previo al estado estacionario (el gradiente del overshoot) establece el borde anterior de *dpp* antes de la regulación positiva del receptor de Hh, Ptc; una vez que Ptc se regula positivamente, la degradación de ligando estrecha el gradiente y se establece el borde anterior de *col* (figura 6.1). Según este modelo, se esperaría que el borde anterior de *col* exhiba una mayor robustez que el borde anterior de *dpp* con respecto a la dosis *hh* (figura 6.1) y nuestros datos experimentales respaldan esta predicción (figura 6.4). Esta robustez reducida en la formación del patrón de *dpp* se produce como compensación por una mayor precisión, en relación con lo que se esperaría del modelo de interpretación de estado estacionario. Por lo tanto, la interpretación dinámica de la señalización Hh ofrece una arquitectura de formación de patrones específica para el gen blanco, robusta pero flexible en este sistema (figura 7.1).

El hallazgo de que el desplazamiento de los bordes anteriores de los objetivos Hh es más del doble para *dpp* que para *col* (figura 6.4) proporciona una predicción interesante sobre el gradiente del overshoot. De la ecuación 6.15, se puede inferir

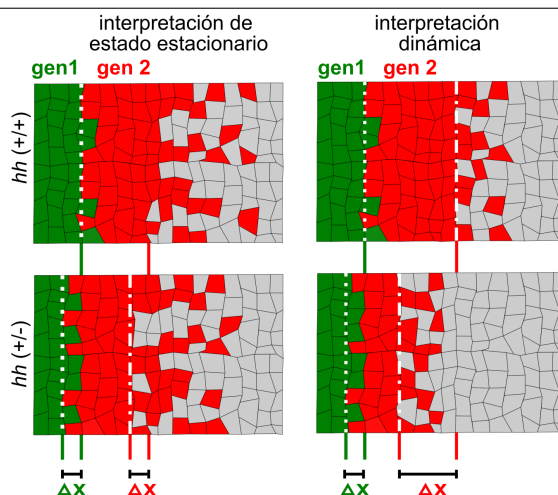


Figura 7.1: **La interpretación dinámica del gradiente de Hh intercambia robustez por una mayor precisión de manera específica para cada gen blanco.** En la interpretación del estado estacionario todos los genes blanco se establecen con la misma robustez (Δx) ante perturbaciones en la cantidad de ligando. En la interpretación del modelo del overshoot, uno de los genes blanco (rojo) se establece con menos robustez que el otro (verde). Sin embargo, permite que el gen menos robusto se defina con mayor precisión de lo que lo haría en el estado estacionario (comparar la nitidez de los límites de estos patrones). Figura modificada de Reyes et al., 2024a.

que el overshoot ocurre cuando los niveles de Ptc son aproximadamente el doble de sus niveles basales en el compartimento anterior, pero las estimaciones sugieren que Ptc alcanza aproximadamente 7 veces sus niveles basales en la franja de Ptc (Casali & Struhl, 2004). Esto sugiere que el overshoot ocurre significativamente antes de que Ptc alcance sus niveles de estado estacionario y que Ptc se produce en cantidades mucho mayores que las que realmente se necesitan para controlar el rango del gradiente de Hh. Pero dado que Ptc no ligado a Hh reprime la señalización de Hh, tal vez el propósito de generar niveles muy altos de Ptc es desensibilizar la señalización de Hh con el tiempo como se ha propuesto para el tubo neural de vertebrados (Dessaud et al., 2008).

¿Por qué este sistema de formación de patrones está diseñado para garantizar la robustez de *col*, pero favorece la precisión sobre la robustez para *dpp*? En el ala de *Drosophila*, la expresión de *col* define directamente una característica específica en el ala adulta, el área intervena L3-L4 (Vervoort et al., 1999), que corresponde al área más central del ala, mientras que el patrón de *dpp* no tiene un papel posicional directo en el ala adulta, pero actúa como fuente de otro morfógeno. Como lo sugiere

un trabajo teórico previo, la fuente donde se produce un morfógeno no tiene un impacto significativo en la formación de patrones (Mizutani et al., 2006), por lo que la robustez del patrón *dpp* puede no estar sujeta a una fuerte presión de selección durante la evolución, o existen otros mecanismos posteriores a la señalización Hh para proporcionar robustez a nivel de la señalización Dpp (Aguilar-Hidalgo et al., 2018; Romanova-Michaelides et al., 2022). Por el contrario, en el ala adulta de *Drosophila*, la precisión podría tener un papel directo en la nitidez del patrón de las venas. Por lo tanto, la robustez asegura el posicionamiento correcto de las venas, mientras que la precisión puede estar relacionada con asegurar venas más rectas. Si bien no está claro si un patrón de *dpp* más impreciso afectaría la rectitud de las venas 2 y 5 que están posicionadas por la señalización de Dpp, sugiere que, en general, el modelo del overshoot asegura un posicionamiento robusto cerca de la fuente del morfógeno, pero prioriza la rectitud de los patrones sobre el posicionamiento en ubicaciones más distantes. Dado que la degradación de Hh dependiente de Ptc se conserva evolutivamente (Chen y Struhl, 1996), nuestros hallazgos también podrían tener implicaciones para la formación de patrones robustos y precisos en otros sistemas.

7.2. El reclutamiento celular y el origen de la asimetría AP del ala de *Drosophila*

Los mecanismos de desarrollo que subyacen a la forma de los órganos han sido de interés fundamental en biología desde la publicación de la obra seminal de D'Arcy Thompson 'On Growth and Form' hace más de 100 años (Thompson, 1917). Esto dio origen al campo de la morfometría, el análisis cuantitativo de las formas, que ha hecho avanzar varias disciplinas, desde la ecología, la evolución y el desarrollo (eco-evo-devo) hasta la evolución humana (Klingenberg, 2016; Klingenberg et al., 2004; Mitteroecker et al., 2004; Monteiro, 1999; Oxnard, 1978; Rohlf, 1990). Sin embargo, los procesos que orquestan el establecimiento de la forma final de un órgano

siguen siendo desconocidos. En la búsqueda de los mecanismos del desarrollo que subyacen a la forma del tejido, la investigación anterior se ha centrado en dos rutas: 1. Examinar las fuerzas locales y globales que actúan sobre los tejidos (de la Loza & Thompson, 2017; Ray et al., 2015). 2. Examinar las vías de señalización que influyen en el desarrollo temprano, que se han vinculado a la información posicional que confiere identidad a los órganos o segmentos (Lander et al., 2002; Wolpert, 1971). A pesar de estos esfuerzos, persisten importantes lagunas en la integración de la señalización temprana, el crecimiento, la adhesión celular y los procesos mecánicos que subyacen a la base del desarrollo de la forma de los órganos. Un aspecto particular que permanece poco claro es descubrir los orígenes de las asimetrías en las formas de los órganos.

El ala de *Drosophila* sirve como un excelente modelo para estudiar la base genética del crecimiento y la forma de los órganos (Tripathi et al., 2022). Los primeros estudios en el disco del ala de *Drosophila* han revelado el papel de *engrailed/invected* y *apterous* en el establecimiento de la distinción de los compartimentos AP y DV, respectivamente (Blair, 2003; Diaz-Benjumea & Cohen, 1993; Tabata et al., 1995). Sorprendentemente, mientras que el patrón DV en el ala en desarrollo requiere ser simétrico para asegurar que las caras dorsal y ventral de las alas adultas coincidan, el patrón AP es inherentemente asimétrico, como lo revelan las diferencias en las posiciones de las venas y las áreas intervenas (figura 6.8). Muñoz-Muñoz et al. (2016) demostraron previamente que en respuesta a perturbaciones ambientales, variaciones genéticas (entre líneas isogenéticas) y fluctuaciones derecha-izquierda, el ala de *Drosophila* exhibe una compartimentalización Proximal-Distal (PD) pero no exhibe una compartimentalización AP (Muñoz-Muñoz et al., 2016). Se puede pensar que de las asimetrías AP en el ala de *Drosophila* se originan por la señalización Dpp, que de hecho es asimétrica debido a la actividad de su receptor, Tkv, lo que conduce a la expresión asimétrica de pMad (Teleman & Cohen, 2000). Sin embargo, esta asimetría no explica por qué las áreas intervenas L1-L2 y L5-M son notablemente diferentes. Además, Matsuda *et al.*, han revelado que el rango de la señal AP está

confinado al territorio comprendido entre L2 y L5 (Matsuda et al., 2021). Por lo tanto, es poco probable que la señalización Dpp pueda explicar la asimetría de estas áreas (Matsuda et al., 2021).

En este trabajo, inhibimos el reclutamiento celular, un mecanismo que impulsa la expansión de *vg* a través de la activación del *vgQE*. Nuestros hallazgos indican que en las alas con reclutamiento deficiente, el área intervena L5-M se reduce significativamente (figura 6.8b). Esta reducción no es comparable con el tamaño relativo del área intervena L1-L2 (figura 6.8b), lo que sugiere que, si bien el reclutamiento celular podría contribuir a esta asimetría, no puede explicarla por completo y otros mecanismos deben actuar para establecer de manera redundante asimetrías de AP en el ala.

A la luz del trabajo de Matsuda *et al.*, (2020), donde se ha demostrado que el rango de la señal Dpp no es necesario para el crecimiento del compartimento más allá de L5, nos sorprendió encontrar que la inhibición del reclutamiento no resultó en una reducción significativa del dominio L5-M en el disco del ala (figura 6.12). Sin embargo, notamos que si bien el margen del ala adulta tiene un borde definido, no existe un borde tan definido del patrón de *vgQE* en las regiones laterales del disco. Además, el patrón que determina los dominios intervenas, marcado por DSRF, se superpone exactamente en los territorios dentro de las venas L2-L5, pero difiere en las regiones laterales, lo que sugiere que la expresión de *vgQE* y DSRF podría establecer diferentes territorios en los bordes de la bolsa (figura 6.12). De hecho, la expresión de *vg* también podría contribuir al establecimiento de los apéndices del ala, llamados costa y álula (Barrio & Milán, 2020), por lo que no es obvio trazar un límite claro entre el ala y estos apéndices en el disco de ala.

Otro aspecto que merece discusión es el papel potencial del reclutamiento celular en la mecánica tisular. Dado que el disco alar es un tejido pseudoestratificado (Liu et al., 2000), las tensiones generadas por el anclaje célula-célula dependen en gran medida del número de células que componen el tejido (Tozluoğlu et al., 2019). Por lo tanto, reducir el número de células en un dominio específico del disco alar puede

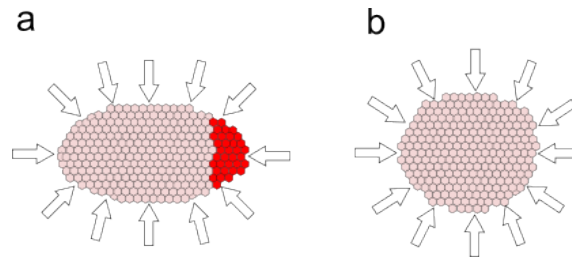


Figura 7.2: **Las tensiones en el disco podrían explicar el cambio de excentricidad de la bolsa del disco ante una reducción del área L5-M.** Diagrama esquemático para ejemplificar cómo la reducción de una región lateral de la bolsa del disco de ala (región roja) puede reorganizar el tejido completo en uno más circular.

generar una regresión de todo el tejido durante las etapas de pupa. No fue posible examinar los cambios en estas regiones durante las etapas de pupa. Sin embargo, el cambio en la circularidad del patrón *vgQE*, al afectar el reclutamiento celular, podría explicar geoméricamente la reducción del área L5-M y un ligero aumento de las áreas más centrales (figura 6.14b). Podemos imaginar dos escenarios: 1. hacer un patrón elíptico más redondeado reduce la diferencia entre sus ejes mayor y menor, lo que resulta en hacer que las áreas en los bordes más curvos sean más pequeñas a expensas de hacer que las regiones centrales sean más grandes, 2. Si las células que forman parte de la bolsa del disco están experimentando fuerzas debido al resto del tejido, cuando una porción del tejido se pierde, posiblemente, la configuración que reduce la energía del sistema sea aquella cuya forma sea más redondeada (figura 7.2).

Nuestro trabajo revela por primera vez que el reclutamiento celular en el ala de *Drosophila* podría tener un impacto en la forma asimétrica general de las alas adultas. Por lo tanto, además de su papel previamente caracterizado en la formación de patrones y el control del crecimiento, (Diaz-Torres et al., 2022; Munoz-Nava et al., 2020; Zecca & Struhl, 2007a), el reclutamiento celular también puede contribuir a establecer cambios de forma asimétrica durante el desarrollo.

8. Conclusiones

Nuestros resultados indican que la señalización de Hh regula el patrón de expresión de Col con mayor robustez que el patrón de expresión de Dpp. Esto solo puede explicarse mediante un modelo de señalización dinámica de Hh, en el que Dpp se establece en un momento anterior al de Col, específicamente a través del gradiente del overshoot. En contraste, Col se define una vez que el gradiente de Hh ha alcanzado el estado estacionario. La disminución en la robustez de Dpp se compensa con un aumento en la precisión del límite del patrón genético, una precisión superior a la que se obtendría si se estableciera únicamente a partir del estado estacionario. Estos hallazgos fueron ya publicadas en un artículo de investigación (Reyes et al., 2024a).

Por otro lado, encontramos que el reclutamiento celular contribuye de manera diferencial al crecimiento del compartimento entre la vena L5 y el borde del ala, lo cual influye en el establecimiento de la asimetría AP del ala en el adulto. Aunque no se encontró evidencia de esta diferencia en etapas larvarias, el reclutamiento celular sí parece tener un papel clave en la ruptura de la circularidad del patrón de Vg. Estos hallazgos también están reportados en un artículo de investigación (en el momento de la entrega de esta tesis aún en prensa; (Reyes et al., 2024b)).

9. Perspectivas

- Analizar la precisión del patrón de Dpp en condiciones donde se rompa el circuito de retroalimentación Hh-Ptc.
- Analizar los efectos de la reducción de la ritmo de producción de Hh en el ala del adulto.
- Diseñar una condición experimental en la que pueda modificarse el umbral de activación de los genes blancos de Hh.
- Evaluar el efecto de bloquear el reclutamiento celular únicamente en el compartimento posterior, o únicamente en el compartimento anterior del disco de ala.
- Desarrollar una simulación en 2D del disco de ala, que permita evaluar el efecto en la forma del patrón de Vg, cuando se reduce específicamente el compartimento más allá de la vena L5.
- Analizar experimentalmente si la región más allá de la vena L5 del disco de ala crece en condiciones donde se inhibe la difusión de Dpp al mismo tiempo que se inhibe el reclutamiento celular.
- Determinar con precisión los bordes laterales en la dirección AP del conjunto de células del disco de ala cuyo destino final será el ala del adulto.

Bibliografía

- Adelmann, J. A., Vetter, R., & Iber, D. (2023). Patterning precision under non-linear morphogen decay and molecular noise. *Elife*, *12*, e84757.
- Aguilar-Hidalgo, D., Werner, S., Wartlick, O., González-Gaitán, M., Friedrich, B. M., & Jülicher, F. (2018). Critical point in self-organized tissue growth. *Physical Review Letters*, *120*(19), 198102.
- Alexandre, C., Baena-Lopez, A., & Vincent, J.-P. (2014). Patterning and growth control by membrane-tethered Wingless. *Nature*, *505*(7482), 180-185.
- Barkai, N., & Shilo, B.-Z. (2007). Variability and robustness in biomolecular systems. *Molecular cell*, *28*(5), 755-760.
- Barrio, L., & Milán, M. (2020). Regulation of anisotropic tissue growth by two orthogonal signaling centers. *Developmental cell*, *52*(5), 659-672.
- Bejsovec, A. (2018). Wingless signaling: a genetic journey from morphogenesis to metastasis. *Genetics*, *208*(4), 1311-1336.
- Bergmann, S., Sandler, O., Sberro, H., Shnider, S., Schejter, E., Shilo, B.-Z., & Barkai, N. (2007). Pre-steady-state decoding of the Bicoid morphogen gradient. *PLoS biology*, *5*(2), e46.
- Blair, S. S. (1992). Engrailed expression in the anterior lineage compartment of the developing wing blade of *Drosophila*. *Development*, *115*(1), 21-33.
- Blair, S. S. (2003). Lineage compartments in *Drosophila*. *Current Biology*, *13*(14), R548-R551.
- Blair, S. S., Brower, D. L., Thomas, J. B., & Zavortink, M. (1994). The role of apterous in the control of dorsoventral compartmentalization and PS integrin

- gene expression in the developing wing of *Drosophila*. *Development*, *120*(7), 1805-1815.
- Breuker, C. J., Patterson, J. S., & Klingenberg, C. P. (2006). A single basis for developmental buffering of *Drosophila* wing shape. *PLoS one*, *1*(1), e7.
- Carroll, S. B. (1995). Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature*, *376*(6540), 479-485.
- Casali, A., & Struhl, G. (2004). Reading the Hedgehog morphogen gradient by measuring the ratio of bound to unbound Patched protein. *Nature*, *431*(7004), 76-80.
- Choy, S. W., & Cheng, S. H. (2012). Hedgehog signaling. *Vitamins & Hormones*, *88*, 1-23.
- Cook, O., Biehs, B., & Bier, E. (2004). *brinker* and *optomotor-blind* act coordinately to initiate development of the L5 wing vein primordium in *Drosophila*. *Development*.
- Crozatier, M., Glise, B., & Vincent, A. (2002). Connecting Hh, Dpp and EGF signalling in patterning of the *Drosophila* wing; the pivotal role of *collier/knot* in the AP organiser. *Development*.
- Crozatier, M., Glise, B., & Vincent, A. (2004). Patterns in evolution: veins of the *Drosophila* wing. *TRENDS in Genetics*, *20*(10), 498-505.
- Csete, M. E., & Doyle, J. C. (2002). Reverse engineering of biological complexity. *science*, *295*(5560), 1664-1669.
- Danesin, C., & Soula, C. (2017). Moving the Shh source over time: what impact on neural cell diversification in the developing spinal cord? *Journal of Developmental Biology*, *5*(2), 4.
- de Celis, J. F., & Barrio, R. (2000). Function of the *spalt/spalt-related* gene complex in positioning the veins in the *Drosophila* wing. *Mechanisms of development*, *91*(1-2), 31-41.
- De Celis, J. F. (2002). Positioning and differentiation of veins in the *Drosophila* wing. *International Journal of Developmental Biology*, *42*(3), 335-343.

- de la Loza, M. D., & Thompson, B. (2017). Forces shaping the *Drosophila* wing. *Mechanisms of Development*, *144*, 23-32.
- Dessaud, E., McMahon, A. P., & Briscoe, J. (2008). Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Molecular cell*.
- Dessaud, E., Yang, L. L., Hill, K., Cox, B., Ulloa, F., Ribeiro, A., Mynett, A., Novitsch, B. G., & Briscoe, J. (2007). Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature*, *450*(7170), 717-720.
- Diaz-Benjumea, F. J., & Cohen, S. M. (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell*, *75*(4), 741-752.
- Diaz-Torres, E., Muñoz-Nava, L. M., & Nahmad, M. (2022). Coupling cell proliferation rates to the duration of recruitment controls final size of the *Drosophila* wing. *Proceedings of the Royal Society B*, *289*(1984), 20221167.
- Driever, W., & Nüsslein-Volhard, C. (1988). The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. *Cell*, *54*(1), 95-104.
- Eldar, A., Rosin, D., Shilo, B.-Z., & Barkai, N. (2003). Self-enhanced ligand degradation underlies robustness of morphogen gradients. *Developmental cell*, *5*(4), 635-646.
- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., Van Heyningen, V., Jessell, T., & Briscoe, J. (1997). Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell*, *90*(1), 169-180.
- Ferguson, E. L., & Anderson, K. V. (1992). Decapentaplegic acts as a morphogen to organize dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell*, *71*(3), 451-461.
- Flores-Flores, M., Muñoz-Nava, L. M., Rodríguez-Muñoz, R., Zartman, J., & Nahmad, M. (2023). Vestigial-dependent induction contributes to robust patterning

- but is not essential for wing-fate recruitment in *Drosophila*. *Biology Open*, *12*(5).
- Fristrom, D., Gotwals, P., Eaton, S., Kornberg, T. B., Sturtevant, M., Bier, E., & Fristrom, J. W. (1994). Blistered: a gene required for vein/intervein formation in wings of *Drosophila*. *Development*, *120*(9), 2661-2671.
- García-Bellido, A., Cortés, F., & Milán, M. (1994). Cell interactions in the control of size in *Drosophila* wings. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(21), 10222-10226.
- Gehring, W. J., & Hiromi, Y. (1986). Homeotic genes and the homeobox. *Annual review of genetics*, *20*(1), 147-173.
- Gilbert, S. (2016). *Developmental Biology*. Sinauer. <https://books.google.com.mx/books?id=qkZujwEACAAJ>
- Gower, J. C. (1975). Generalized procrustes analysis. *Psychometrika*, *40*, 33-51.
- Gurdon, J., & Bourillot, P.-Y. (2001). Morphogen gradient interpretation. *Nature*, *413*(6858), 797-803.
- Hatori, R., Wood, B. M., Barbosa, G. O., & Kornberg, T. B. (2021). Regulated delivery controls *Drosophila* Hedgehog, wingless, and decapentaplegic signaling. *Elife*, *10*.
- Held, L. I. (2002). *Imaginal discs: the genetic and cellular logic of pattern formation* (Vol. 39). Cambridge University Press Cambridge.
- Irons, D. J., Wojcinski, A., Glise, B., & Monk, N. A. (2010). Robustness of positional specification by the Hedgehog morphogen gradient. *Developmental biology*, *342*(2), 180-193.
- Joyce, J., Maugarny-Cales, A., Pelletier, S., Alexandre, C., Bellaiche, Y., Vincent, J.-P., & McGough, I. J. (2020). Frizzled-dependent planar cell polarity without secreted Wnt ligands. *Developmental cell*, *54*(5), 583-592.
- 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.

- Kitano, H. (2004). Biological robustness. *Nature Reviews Genetics*, 5(11), 826-837.
- Klingenberg, C. P. (2016). Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. *Development genes and evolution*, 226(3), 113-137.
- Klingenberg, C. P., Leamy, L. J., & Cheverud, J. M. (2004). Integration and modularity of quantitative trait locus effects on geometric shape in the mouse mandible. *Genetics*, 166(4), 1909-1921.
- Klingenberg, C. P., & Zaklan, S. D. (2000). Morphological integration between developmental compartments in the Drosophila wing. *Evolution*, 54(4), 1273-1285.
- Krzanowski, W. J. (2000). *Principles of multivariate analysis*. Oxford University Press.
- Lander, A. D., Lo, W.-C., Nie, Q., & Wan, F. Y. (2009). The measure of success: constraints, objectives, and tradeoffs in morphogen-mediated patterning. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(1), a002022.
- Lander, A. D., Nie, Q., & Wan, F. Y. (2002). Do morphogen gradients arise by diffusion? *Developmental cell*, 2(6), 785-796.
- Lawrence, P. A., & Morata, G. (1977). The early development of mesothoracic compartments in Drosophila: An analysis of cell lineage and fate mapping and an assessment of methods. *Developmental biology*, 56(1), 40-51.
- Liu, X., Grammont, M., & Irvine, K. D. (2000). Roles for scalloped and vestigial in regulating cell affinity and interactions between the wing blade and the wing hinge. *Developmental biology*, 228(2), 287-303.
- Lo, W.-C., Zhou, S., Wan, F. Y.-M., Lander, A. D., & Nie, Q. (2015). Robust and precise morphogen-mediated patterning: trade-offs, constraints and mechanisms. *Journal of The Royal Society Interface*, 12(102), 20141041.
- Lunde, K., Biehs, B., Nauber, U., & Bier, E. (1998). The knirps and knirps-related genes organize development of the second wing vein in Drosophila. *Development*, 125(21), 4145-4154.
- Martín, F. A., & Morata, G. (2006). Compartments and the control of growth in the Drosophila wing imaginal disc. *Development*.

- Martín, M., Ostalé, C. M., & de Celis, J. F. (2017). Patterning of the *Drosophila* L2 vein is driven by regulatory interactions between region-specific transcription factors expressed in response to Dpp signalling. *Development*, *144*(17), 3168-3176.
- Matsuda, S., Harmansa, S., & Affolter, M. (2016). BMP morphogen gradients in flies. *Cytokine & growth factor reviews*, *27*, 119-127.
- Matsuda, S., Schaefer, J. V., Mii, Y., Hori, Y., Bieli, D., Taira, M., Plückthun, A., & Affolter, M. (2020). Asymmetric requirement of Dpp/BMP morphogen dispersal in the *Drosophila* wing disc. *Nature communications*.
- Matsuda, S., Schaefer, J. V., Mii, Y., Hori, Y., Bieli, D., Taira, M., Plückthun, A., & Affolter, M. (2021). Asymmetric requirement of Dpp/BMP morphogen dispersal in the *Drosophila* wing disc. *Nature Communications*, *12*(1), 6435.
- Mitteroecker, P., Gunz, P., Bernhard, M., Schaefer, K., & Bookstein, F. L. (2004). Comparison of cranial ontogenetic trajectories among great apes and humans. *Journal of human evolution*, *46*(6), 679-698.
- Mizutani, C. M., Meyer, N., Roelink, H., & Bier, E. (2006). Threshold-dependent BMP-mediated repression: a model for a conserved mechanism that patterns the neuroectoderm. *PLoS biology*, *4*(10), e313.
- Montagne, J., Groppe, J., Guillemin, K., Krasnow, M. A., Gehring, W. J., & Affolter, M. (1996). The *Drosophila* Serum Response Factor gene is required for the formation of intervein tissue of the wing and is allelic to blistered. *Development*, *122*(9), 2589-2597.
- Monteiro, L. R. (1999). Multivariate regression models and geometric morphometrics: the search for causal factors in the analysis of shape. *Systematic Biology*, *48*(1), 192-199.
- Morgan, T. H. (1934). *Embryology and genetics*. Columbia University Press.
- Muñoz-Muñoz, F., Carreira, V. P., Martínez-Abadías, N., Ortiz, V., González-José, R., & Soto, I. M. (2016). *Drosophila* wing modularity revisited through a quantitative genetic approach. *Evolution*, *70*(7), 1530-1541.

- Munoz-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.
- Nahmad, M., & Stathopoulos, A. (2009). Dynamic interpretation of hedgehog signaling in the *Drosophila* wing disc. *PLoS biology*, *7*(9), e1000202.
- Negretti, N. (2021). readlif: Fast Leica LIF file reader written in python.
- Nüsslein-Volhard, C., & Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, *287*(5785), 795-801.
- Oxnard, C. E. (1978). One biologist's view of morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *9*(1), 219-241.
- Padgett, R. W., Johnston, R. D. S., & Gelbart, W. M. (1987). A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor- β family. *Nature*, *325*(6099), 81-84.
- Perrimon, N. (1994). The genetic basis of patterned baldness in *Drosophila*. *Cell*, *76*(5), 781-784.
- Ray, R. P., Matamoro-Vidal, A., Ribeiro, P. S., Tapon, N., Houle, D., Thompson, B. J., et al. (2015). Patterned anchorage to the apical extracellular matrix defines tissue shape in the developing appendages of *Drosophila*. *Developmental cell*, *34*(3), 310-322.
- Reyes, R., Lander, A. D., & Nahmad, M. (2024a). Dynamic readout of the Hh gradient in the *Drosophila* wing disc reveals pattern-specific tradeoffs between robustness and precision. *eLife*. <https://elifesciences.org/articles/85755>
- Reyes, R., Rodriguez-Muñoz, R., & Nahmad, M. (2024b). Cell Recruitment and the Origin of Anterior-Posterior Asymmetry in the *Drosophila* Wing. *PLoS one*.
- Rohlf, F. J. (1990). Morphometrics. *Annual Review of ecology and Systematics*, *21*(1), 299-316.

- Romanova-Michaelides, M., Hadjivasiliou, Z., Aguilar-Hidalgo, D., Basagiannis, D., Seum, C., Dubois, M., Jülicher, F., & Gonzalez-Gaitan, M. (2022). Morphogen gradient scaling by recycling of intracellular Dpp. *Nature*, *602*(7896), 287-293.
- 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.
- Sohr, A., Du, L., & Roy, S. (2019). Ex vivo *Drosophila* Wing Imaginal Disc Culture and Furin Inhibitor Assay. *Bio-protocol*, *9*(16).
- Spemann, H., & Mangold, H. (2003). Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. 1923. *International Journal of Developmental Biology*, *45*(1), 13-38.
- Spencer, F. A., Hoffmann, F. M., & Gelbart, W. M. (1982). Decapentaplegic: a gene complex affecting morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Cell*, *28*(3), 451-461.
- Strigini, M., & Cohen, S. M. (1997). A Hedgehog activity gradient contributes to AP axial patterning of the *Drosophila* wing. *Development*, *124*(22), 4697-4705.
- Sturtevant, M., Roark, M, & Bier, E. (1993). The *Drosophila* rhomboid gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGF-R signaling pathway. *Genes & development*, *7*(6), 961-973.
- Sturtevant, M. A., Biehs, B., Marin, E., & Bier, E. (1997). The spalt gene links the A/P compartment boundary to a linear adult structure in the *Drosophila* wing. *Development*, *124*(1), 21-32.
- Swarup, S., & Verheyen, E. M. (2012). Wnt/wingless signaling in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *4*(6), a007930.
- Tabata, T., Schwartz, C., Gustavson, E., Ali, Z., & Kornberg, T. B. (1995). Creating a *Drosophila* wing de novo, the role of engrailed, and the compartment border hypothesis. *Development*, *121*(10), 3359-3369.
- Tabata, T., & Takei, Y. (2004). Morphogens, their identification and regulation. *Development*.

- Teleman, A. A., & Cohen, S. M. (2000). Dpp gradient formation in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Cell*, *103*(6), 971-980.
- Thompson, J. A. (1917). On growth and form.
- Tozluoğlu, M., Duda, M., Kirkland, N. J., Barrientos, R., Burden, J. J., Munoz, J. J., & Mao, Y. (2019). Planar differential growth rates initiate precise fold positions in complex epithelia. *Developmental cell*, *51*(3), 299-312.
- Tripathi, P., Firouzbakht, A., Gruebele, M., & Wanunu, M. (2022). Threading single proteins through pores to compare their energy landscapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(39), e2202779119.
- Turing, A. (1952). The chemical basis of morphogenesis (1952). *B Jack Copeland*, *519*.
- Vervoort, M., Crozatier, M., Valle, D., & Vincent, A. (1999). The COE transcription factor Collier is a mediator of short-range Hedgehog-induced patterning of the *Drosophila* wing. *Current Biology*, *9*(12), 632-639.
- Vuilleumier, R., Springhorn, A., Patterson, L., Koidl, S., Hammerschmidt, M., Affolter, M., & Pyrowolakis, G. (2010). Control of Dpp morphogen signalling by a secreted feedback regulator. *Nature cell biology*, *12*(6), 611-617.
- Waddington, C. H. (1942). Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*, *150*(3811), 563-565.
- Wang, X., LaFever, K. S., Waghmare, I., & Page-McCaw, A. (2021). Extracellular spreading of Wingless is required for *Drosophila* oogenesis. *PLoS genetics*, *17*(4), e1009469.
- Widmann, T. J., & Dahmann, C. (2009). Wingless signaling and the control of cell shape in *Drosophila* wing imaginal discs. *Developmental biology*, *334*(1), 161-173.
- Wolpert, L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *Journal of theoretical biology*, *25*(1), 1-47.
- Wolpert, L. (1971). Positional information and pattern formation. *Current topics in developmental biology*, *6*, 183-224.

- Yamazaki, Y., Palmer, L., Alexandre, C., Kakugawa, S., Beckett, K., Gaugue, I., Palmer, R. H., & Vincent, J.-P. (2016). Godzilla-dependent transcytosis promotes Wingless signalling in *Drosophila* wing imaginal discs. *Nature cell biology*, *18*(4), 451-457.
- Zecca, M., Basler, K., & Struhl, G. (1995). Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Development*, *121*(8), 2265-2278.
- Zecca, M., & Struhl, G. (2007a). Control of *Drosophila* wing growth by the vestigial quadrant enhancer. *Development*.
- Zecca, M., & Struhl, G. (2007b). Recruitment of cells into the *Drosophila* wing primordium by a feed-forward circuit of vestigial autoregulation. *Development*.
- Zecca, M., & Struhl, G. (2010). A feed-forward circuit linking wingless, fat-dachsous signaling, and the warts-hippo pathway to *Drosophila* wing growth. *PLoS biology*, *8*(6), e1000386.