Universidad de Valparaíso CHILE | Doctorado en Ciencias Mención Neurociencia

ROLE OF ECLOSION HORMONE DURING ECDYSIS BEHAVIOR IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Tesis entregada a

LA UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO

en Cumplimiento Parcial de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención en Neurociencia

Facultad De Ciencias

Por

Valeria Andrea Silva Moeller

Septiembre, 2023

Dirigida por: John Ewer

FINANCIAMIENTO

Esta investigación ha sido financiada por los siguientes proyectos:

- FONDECYT nº1180403 a John Ewer
- FONDECYT nº1221270 a John Ewer
- ICM P09-022-F Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso a John Ewer
- Beca ANID nº21191720 a Valeria Silva Moeller
- Beca pasantías doctorales en el extranjero, segundo llamado 2020 a Valeria Silva Moeller
- Beca gastos operacionales, primer llamado 2021 a Valeria Silva Moeller
- Beca apoyo para asistencia a cursos y congresos DNUV a Valeria Silva Moeller

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES

CHAPTER I

APPENDIX

Scientific paper 1

LIST OF FIGURES

Scientific paper 2

Los insectos son el grupo más exitoso y diverso del reino animal. Una característica que podría contribuir a su éxito es su exoesqueleto (también conocido como cutícula), que los protege y evita su desecación. Sin embargo, su estructura rígida limita su crecimiento y, para crecer, el insecto debe mudar periódicamente. Durante este proceso, el insecto secreta una nueva cutícula y desecha la del estadío anterior mediante el comportamiento innato y vital llamado **ecdisis**. Este comportamiento está controlado a través de la acción secuencial y compleja de varias hormonas y neuropéptidos, incluyendo la *Ecdysis Triggering Hormone* (ETH) y la *Eclosion Hormone* (EH), que actúan sobre sistema nervioso central (CNS).

En este estudio, nos centramos en el papel de EH en la ecdisis, identificando los blancos de EH y determinando su función en el control de la ecdisis. Se cree que el receptor de EH (EHR) está codificado por el gen CG10738 de la mosca del vinagre, *Drosophila*. Aquí mostramos que las células epitraqueales (que expresan ETH y son blancos directos de EH) también expresan CG10738. Además, los mutantes de CG10738 no liberan ETH en respuesta a estímulo *in vitro* con EH sintético, lo que demuestra que este gen codifica para el receptor de EH.

Utilizando inmunocitoquímica en combinación con EHR-GAL4 y los *hemidrivers* "split"-GAL4, encontramos que EHR y ETHR (receptor de ETH) se co-expresan en neuronas que también expresan los neuropeptidos EH, CCAP (péptido cardíaco crustáceo), kinina, FMRFamidas, MIPs (péptidos mioinhibidores) y bursicon, que se sabe que participan en el control de la ecdisis. Además, EHR también se expresa en motoneuronas y en muchas otras neuronas cuya identidad y función en la ecdisis son desconocidas.

Para elucidar el papel de las células que expresan EHR, analizamos las consecuencias de su ablación o silenciamiento en diferentes etapas de desarrollo utilizando UAS-*reaper* y UAS-*2xKir2.1*, respectivamente. Encontramos que ambas manipulaciones provocaron fallos en la ecdisis larval, similares al fenotipo de los mutantes de *Eh* y *ehr*. También observamos fallos en la ecdisis en la etapa de pupa y en la eclosión. Curiosamente, la activación de todas las células EHR en la eclosión utilizando UAS-*TrpA1* también provocó fallos en la ecdisis, quedando las moscas atrapadas dentro del pupario. Luego, interrumpimos la expresión del gen CG10738 en subconjuntos de células que expresan EHR utilizando un RNAi específico y encontramos que la expresión de EHR en células que también expresan la proteína *dimmed*, *sinaptobrevina* neuronal, *breathless*, *eth* o *amontillado* es necesaria para el éxito del comportamiento de la ecdisis las diferentes etapas. Además observamos que algunas neuronas sensoriales requerían la expresión de EHR exclusivamente para la ecdisis pupal pero no así para otras ecdisis.

Finalmente, evaluamos el patrón de actividad neuronal de los blancos de EH utilizando el sensor de calcio GCaMP. Al estimular exógenamente la ecdisis en preparaciones *ex vivo* del sistema nervioso central utilizando ETH sintético, pudimos observar que, aunque todas las neuronas fueron expuestas a este neuropéptido simultáneamente, diferentes subgrupos de células que expresan EHR respondieron en momentos diferentes con patrones de actividad específicos, lo que demuestra la complejidad de este comportamiento.

Estos resultados sugieren en conjunto que las células blanco de EH son necesarias y desempeñan un rol crítico durante este complejo comportamiento de la ecdisis en *Drosophila*. Además, esta investigación contribuye a la comprensión de cómo los neuropéptidos actúan y controlan los comportamientos animales.