

Informe final publicable de proyecto

Nuevo mecanismo de percepción del oxígeno en el cerebro en desarrollo.

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_156160

Fecha de cierre de proyecto: 01/10/2023

CANTERA CARLOMAGNO, Rafael (Responsable Técnico - Científico)

ROSAS AIDA, Mariel (Investigador)

ROSAS AIDA, Mariel (Investigador)

PRIETO MENA, Daniel (Investigador)

ABREU, Cecilia (Investigador)

BACCINO CALACE, Martín (Investigador)

COMINI OLMEDO, Marcelo Alberto (Investigador)

EGGER, Boris (Investigador)

GONZÁLEZ, Ana Clara (Becario)

GONZÁLEZ, Ana Clara (Becario)

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE"
(Institución Proponente) \\ DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, UNIVERSIDAD DE FRIBURGO. \\
INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO \\ FUNDACIÓN DE APOYO AL INSTITUTO CLEMENTE ESTABLE

Resumen del proyecto

Nuestro proyecto pertenece al campo de estudios que busca comprender cómo la hipoxia (un nivel de oxígeno relativamente bajo) influye el desarrollo del cerebro. Se sabía que normalmente la hipoxia participa en el control de las células madre. Propusimos que sería ventajoso incorporar a estos estudios la mosca *Drosophila*. Previamente habíamos demostrado que en *Drosophila*, como en otros organismos, la zona del cerebro donde reside la mayoría de las células madre está en condiciones de hipoxia, pero nuestros datos indicaban que esto no activaba la respuesta "tradicional" a la hipoxia, mediada por el factor HIF. Esto nos sugirió que aquí existiría un mecanismo alternativo de percepción del oxígeno y el estudio de la literatura científica nos llevó a postular que la proteína guanilato ciclasa soluble atípica (asGC) podría actuar como sensor del oxígeno en las células madre. Para investigar esta hipótesis, nuestro abordaje combinó métodos bien probados con otros muy nuevos y ambiciosos, lo cual impuso riesgos relativamente altos. Usaríamos hibridación in situ para investigar la expresión de la asGC en el cerebro, investigaríamos si la falta de función de la asGC interfería con el desarrollo normal del cerebro, construiríamos moscas transgénicas para expresar en el cerebro un biosensor fluorescente de cGMP (molécula utilizada como señal por la asGC), estudiaríamos la actividad del sensor usando microscopía multifotónica e hiperespectral y análisis de fasores y registraríamos la actividad del sensor en animales expuestos a distintos niveles de oxígeno. Los resultados indican que la asGC es necesaria para el desarrollo normal del cerebro. El producto más innovativo del proyecto es quizás una cepa de *Drosophila* transgénica que por primera vez permite expresar en organismos multicelulares un biosensor de cGMP bajo el control de un elemento UAS. Esta nueva herramienta queda a disposición de la comunidad científica mundial.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Biología del Desarrollo / Proliferación y diferenciación de células madre

Palabras clave: Desarrollo neural / Hipoxia / Células madre /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

El tema central en nuestro proyecto es el estudio de cómo la hipoxia (niveles de oxígeno relativamente bajos en relación al resto del cerebro) influye sobre el desarrollo normal del cerebro. Ya se sabía que durante el desarrollo del cerebro la hipoxia es importante para la proliferación de las células madre (Panchision, 2009; Lange et al., 2016) pero consideramos que la investigación de este tema en la mosca *Drosophila melanogaster* facilitará su estudio. Algunas de las ventajas experimentales de *Drosophila* son su ciclo de vida corto, su bajo costo de mantenimiento, su magnífica genética y la existencia de bancos de datos y métodos experimentales que permiten avanzar mucho más rápido e incluso hacer experimentos que por razones éticas, económicas o técnicas no se pueden hacer con seres humanos o con ratones u otros animales de laboratorio.

Nuestros estudios anteriores habían demostrado que en *Drosophila*, la zona del cerebro en desarrollo donde residen la mayoría de las células madre (llamada "lóbulo óptico"), está en condiciones de hipoxia relativamente al resto del cerebro (Misra et al., 2017; Baccino-Calace et al., 2020). Estos antecedentes nos llevaron a investigar la hipótesis de que en el lóbulo óptico la hipoxia podría activar, al igual que en otros tejidos, la respuesta a la hipoxia "tradicional", en la cual juega un rol preponderante una proteína sensible al oxígeno llamada Factor Inducido por la Hipoxia (HIF-1; Semenza, 2012; Schito y Semenza, 2016), que en *Drosophila* se llama Sima. Nuestros datos (Baccino-Calace et al., 2020 y datos no publicados) indicaban la ausencia de tres elementos fundamentales de la activación de Sima: acumulación nuclear de Sima en las células hipóxicas (Lavista-Llanos et al., 2002), acumulación de la enzima lactato deshidrogenasa (Lavista-Llanos et al., 2002) y activación del crecimiento de tubos respiratorios (Jarecki et al., 1999). Esto nos sugirió la presencia en el lóbulo óptico de un mecanismo de percepción del oxígeno alternativo, con un sensor de oxígeno distinto a Sima. Una revisión de la literatura (Langlais et al., 2004; Morton y Vermehren, 2007; Cho et al., 2017; Abergel et al., 2017) nos indicó que la guanilato ciclasa soluble podría ser esta alternativa. El proyecto se centra en esa hipótesis.

Propusimos un abordaje que combinaba métodos bien probados con otros muy nuevos y ambiciosos, lo cual impuso riesgos relativamente altos. Usaríamos hibridación in situ para investigar la expresión de las tres unidades de asGC en el cerebro, investigaríamos si la falta de función en asGC interfería con el desarrollo normal del cerebro, construiríamos una cepa de *Drosophila* transgénica para expresar en el cerebro, por medio del método de expresión controlada GAL4:UAS, un biosensor de cGMP basado en FRET construido por colegas del Instituto Pasteur (proyecto financiado por ANII FMV_1_2014_1_104000; Klein et al., 2021), caracterizaríamos la expresión y función del sensor tanto en tejidos in situ como in vitro en células disociadas de mosca transgénica y haríamos experimentos registrando la actividad del sensor en animales expuestos a distintos niveles de oxígeno, usando microscopía multifotónica y otras técnicas avanzadas de microscopía. Para desarrollar estas tareas

formamos un grupo de investigadores de varias instituciones de Uruguay y Suiza y accedimos a la colaboración de otros expertos.

A continuación se resumen los resultados esperados para cada uno de los siete objetivos específicos (OE) del proyecto.

OE1: Confirmar la expresión de subunidades de asGC en el lóbulo óptico. El antecedente es la detección de señal positiva para hibridación in situ (detección de ARNm) indicativa de expresión de asGC en el lóbulo óptico (Langlais et al., 2004; Fig.6). Los resultados esperados eran imágenes microscópicas de cerebros procesados para hibridación in situ, correspondientes a los ARNm de las subunidades de asGC, que indicaran claramente la expresión de una o más subunidades en el lóbulo óptico.

OE2: Determinar si la asGC contribuye al control de la proliferación de células madre del lóbulo óptico. Esperábamos que la falta de función de asGC reduciría la proliferación, causando una reducción en el número de células madre. Usamos combinaciones de marcador mitótico con marcadores específicos para cada uno de los tres tipos de células madre existentes en el lóbulo óptico (células neuroepiteliales, neuroblastos y células madre ganglionares; Egger et al., 2011).

OE3: Determinar si la asGC contribuye al control de la diferenciación de células madre del lóbulo óptico. Esperábamos que falta de función en asGC afectara la diferenciación de las células madres (que en el lóbulo óptico sigue la secuencia células neuroepiteliales>neuroblastos>células madre ganglionares; Egger et al., 2011) y que esto podría resultar en que los mutantes mostraran diferencias en las proporciones relativas de las distintos tipos de célula madre con respecto al control normal.

OE4: Investigar la hipótesis de que la asGC responde a cambios en la tensión de oxígeno elevando los niveles de cGMP. Se sabía que la asGC señala por medio de cGMP. Como resultados se esperaban imágenes de microscopía confocal y multifotónica de la señal emitida por el biosensor cGMP FRET en células en condiciones controladas de oxígeno con y sin tratamiento farmacológico agonista y antagonista de la actividad asGC cuyo análisis indicaría que el tratamiento con 5% oxígeno causará una elevación del cGMP en el lóbulo óptico.

OE5: Desarrollar y evaluar nuevas tecnologías y herramientas de investigación científica.

Se decidió construir una cepa de *Drosophila* transgénica que permitiera expresar un biosensor de cGMP específicamente en células madre u otros tipos celulares o tejidos (por medio de tecnología GAL4:UAS, Brand y Perrimon, 1993) y usar varias técnicas avanzadas de microscopía con el fin de desarrollar métodos innovativos para el estudio de nuestra hipótesis y aplicables a otras investigaciones que requieran el monitoreo de la señalización por cGMP. Se esperaba obtener imágenes de expresión del sensor específicamente en ciertos tipos de células madre, desarrollar un protocolo de adquisición de imágenes in vivo mediante microscopía multifotónica optimizado para el sensor, evaluar la dinámica del sensor en células de *Drosophila* (datos cuantitativos), determinar el rango dinámico de percepción de cGMP con el sensor en respuesta a variaciones en la presión parcial de oxígeno (datos cuantitativos) y desarrollar un protocolo de tratamiento de datos del sensor utilizando el tiempo de vida del donante de FRET y evaluación de análisis de fasores.

OE6: Consolidar y desarrollar una cooperación científica internacional multidisciplinaria para el estudio del desarrollo del cerebro en *Drosophila*. Para lograr este objetivo desarrollaríamos una comunicación fluida por medios digitales y decidimos que uno de los integrantes del proyecto (Prieto) trabajaría unos meses en Suiza recibiendo capacitación en la preparación de cultivos primarios de células disociadas de cerebro larvario y en microscopía "spinning disk", bajo la dirección del Dr. Egger, experto en ambas técnicas y harían juntos algunos de los experimentos.

OE7: Construir y reforzar capacidades localmente, formando jóvenes investigadores. Se esperaba una culminación exitosa del posdoctorado de Prieto, dirigir al menos una tesis de posgrado con beca ANII adjunta al proyecto y entrenar estudiantes de pregrado a través de trabajos de pasantía.

Metodología/Diseño del estudio

OE1: Otros colegas, que habían estudiado el patrón de expresión de distintas subunidades de asGC en el cerebro larval de *Drosophila* por medio de hibridación in situ, habían publicado imágenes (Langlais et al., 2004) que en nuestra opinión mostraban una señal de hibridación correspondiente a mensajeros de dos subunidades de asGC en el lóbulo óptico larvario (toda la zona lateral del hemisferio cerebral, oscura en la Fig. 6A y más aún en 6B). Decidimos usar la misma técnica para confirmar esa expresión. Complementariamente, decidimos examinar si los datos transcriptómicos publicados por otros colegas (Southall et al., 2013; Alyagor et al., 2018) informaban sobre la expresión de una o más subunidades en el lóbulo óptico.

OE2: Para determinar si la asGC contribuye al control de la proliferación de células madre del cerebro se decidió usar inmunohistoquímica con tinción doble, combinando dos marcadores en cada muestra. Uno de los marcadores sería un anticuerpo que marca las células mitóticas y el otro sería un anticuerpo específico para uno de los tres distintos tipos de células madre (neuroepiteliales, neuroblastos y células madre ganglionares). Por ejemplo, para marcar las células madre del tipo "neuroblastos", se usaría anticuerpos anti-Deadpan, que son específicos para células de este tipo. En este ejemplo, la combinación de ambos marcadores permitiría contar el número total de neuroblastos y cuantos de ellos eran mitóticos. Una vez marcadas las células en muestras de mutantes y control, se usaría microscopía laser confocal para contar el número de células madre mitóticas de cada uno de los tres tipos existentes en el lóbulo óptico en cerebros de larvas normales o mutantes con falta de función en asGC, para poder descubrir divergencias significativas en el número de células mitóticas de uno o más tipos al comparar los mutantes con el control normal. Además de investigar los efectos de la falta de función, se usaría el sistema GAL4-UAS para obtener expresión ectópica de una subunidad de asGC en tipos celulares específicos. Con este método (Brand y Perrimon, 1993) se consigue expresar un gen (por ejemplo, el que codifica para una de las tres subunidades de asGC estudiadas aquí) específicamente en un tipo de células (por ejemplo, neuroblastos) por medio de un cruzamiento de moscas de cepas transgénicas adecuadas.

OE3: La diferenciación de las células madre en el lóbulo óptico sigue la serie células neuroepiteliales>neuroblastos>células madre ganglionares (Egger et al., 2011). Para determinar si la asGC contribuye al control de la diferenciación de células madre se usaría el mismo método aplicado al OE2, pero en este caso se calcularía las proporciones relativas de cada tipo celular para inferir posibles cambios en la secuencia de diferenciación. Además de investigar los efectos de la falta de función (comparando mutantes con control), se usaría el sistema GAL4-UAS para investigar el efecto de la expresión ectópica de una subunidad de asGC en tipos celulares específicos.

OE4: Para investigar la hipótesis de que la guanilato ciclasa soluble atípica responde a cambios en la tensión de oxígeno elevando los niveles de cGMP se analizaría la respuesta del sensor (por medio del análisis de FRET) expresado en células o tejidos de la cepa transgénica, expuestas a una atmósfera con 5% oxígeno, comparando con el FRET correspondiente a muestras mantenidas en atmósfera normal. Se esperaba que este tratamiento cause una elevación del cGMP en el OL y que este resultado sea específico.

OE5: Para desarrollar y evaluar nuevas tecnologías y herramientas de investigación científica se había elegido un ambicioso plan experimental basado en la construcción de una cepa de *Drosophila* transgénica que permitiera expresar un sensor de cGMP específicamente en el tipo celular o tejido elegido (por medio de tecnología GAL4:UAS, Brand y Perrimon, 1993) y usar varias técnicas avanzadas de microscopía con el fin de desarrollar métodos innovativos para el estudio de nuestra hipótesis y aplicables a otras investigaciones que requieran el monitoreo de la señalización por cGMP. El sensor había sido construido por colegas del Instituto Pasteur (Klein et al., 2021) y se basa en una proteína que contiene un sitio unión del ligando cGMP y un par de fluorocromos que permiten detectar la unión del ligando al sensor por medio de la tecnología FRET. Se esperaba obtener imágenes de expresión del sensor en cerebro de mosca transgénica expresando el sensor en el cerebro con ayuda del sistema GAL4-UAS (Brand y Perrimon, 1993), desarrollar un protocolo de adquisición de imágenes in vivo mediante microscopía multifotónica optimizado para el sensor, evaluar la dinámica del sensor en células de *Drosophila* (datos cuantitativos), determinar el rango dinámico de percepción de cGMP con el sensor en respuesta a variaciones en la presión parcial de oxígeno (datos cuantitativos) y desarrollar un protocolo de tratamiento de datos del sensor utilizando el tiempo de vida del donante de FRET y evaluación de análisis de fasores.

OE6: Para consolidar y desarrollar una cooperación científica internacional multidisciplinaria para el estudio del desarrollo del cerebro en *Drosophila* se consideraba importante que un investigador del proyecto (Prieto) hiciera una pasantía en Suiza, donde trabajaría bajo la dirección de otro integrante del proyecto (Egger) y recibiría capacitación en varias técnicas a la vez que realizaban experimentos para OE4 y OE5. Esto se combinaría con un intercambio fluido en base a medios digitales de comunicación.

OE7: Para construir y reforzar capacidades localmente, formando jóvenes investigadores, se planificó el proyecto de tal modo que permitiera y promoviera la culminación exitosa de un posdoctorado, desarrollar una tesis de maestría financiada con beca ANII adjunta al proyecto y pasantías de estudiantes de pregrado que quisieran hacer su tesina de grado. Todos estos jóvenes integrantes del proyecto recibirían capacitación y entrenamiento en distintos métodos y equipos de investigación y participarían en seminarios y cursos. Se decidió diseñar el plan de trabajo de tal modo que los investigadores más jóvenes tuvieran oportunidad de trabajar en laboratorios de dos instituciones (IIBCE e Instituto Pasteur) para que pudiesen interactuar

con varios investigadores más consolidados y mejorar las oportunidades de capacitación en el uso de varios equipos y métodos de investigación.

Resultados, análisis y discusión

OE1: Lamentablemente el método de hibridación in situ, elegido por ser el más adecuado para confirmar los resultados obtenidos anteriormente por otros colegas (Langlais et al., 2004), no nos permitió confirmar la expresión de ninguna de las tres subunidades en el lóbulo óptico y nos vimos obligados a buscar una alternativa. Una examinación cuidadosa de datos transcriptómicos publicados por otros colegas (Southall et al. 2013; Alyagor et al., 2018) confirmó que las subunidades *gyc89Da* y *gyc89Db*, pero no la *gyc88E*, se expresan en neuroblastos (es decir, dos de las tres subunidades se expresan en una importante población de células madre pero no en todas ellas). Estimamos que los datos disponibles (Langlais et al., 2004; Southall et al. 2013; Alyagor et al., 2018), si bien no son conclusivos, permiten considerar como muy probable la expresión de dos de las subunidades en al menos un tipo de células madre. Es interesante señalar que son justamente las células madre de este tipo (neuroblastos) las que muestran los mayores niveles de hipoxia en el lóbulo óptico (Baccino-Calace et al., 2020).

OE2: Al contrario de lo esperado, observamos que la falta de función de la subunidad *gyc88E* causaba un aumento en el volumen del lóbulo óptico pero ni este mutante, ni el doble mutante *gyc89Da/gyc89Db* presentaron diferencias con los controles en el número total de células madre o en el número de neuroblastos mitóticos. Si bien la mutación con falta de función en las subunidades *gyc89Da* y la *gyc89Db* no causó un efecto detectable por nuestro método de análisis, su expresión en neuroblastos (Alyagor et al., 2017; Southall et al., 2013) indica que podrían tener una función, que no era detectable por nuestro método. Para investigar esta posibilidad, expresamos ectópicamente *gyc89Da* y *gyc89D*, usando el sistema GAL4-UAS bajo el control de "drivers" específicos para cada tipo celular estudiado. Estos experimentos causaron un incremento en el número total de neuroblastos, el número total de células proliferantes, la fracción de neuroblastos proliferantes y el número de células proliferantes no-neuroblastos, al expresar ectópicamente *gyc89Db* en células neuroepiteliales o en neuroblastos y al expresar *gyc89Da* en neuroblastos. Es interesante notar que también en estos experimentos los neuroblastos, las células que exhiben mayor hipoxia (Baccino-Calace et al., 2020), fueron las células que exhibieron mayores diferencias con respecto al control.

OE3: La pérdida de función en el mutante doble *gyc89Da/gyc89Db* no afectó el volumen del cerebro, el número de neuroblastos o su proliferación. La pérdida de función en la subunidad *gyc88E*, en cambio, causó un aumento del volumen del lóbulo óptico. Adicionalmente, se cuantificó el número de células madre de cada tipo en cerebros con expresión ectópica de la subunidad *gyc89Db* (por medio de un cruzamiento entre la cepa transgénica GAL4-c855, "driver" específico para lóbulo óptico y la cepa UAS-*gyc89Db*, que resulta en la expresión de *gyc89Db*). No se observó efecto alguno en el número de células neuroepiteliales, pero sí un aumento en el número total de neuroblastos, el número de neuroblastos mitóticos y el volumen del lóbulo óptico. Estos experimentos indican una vez más que los neuroblastos, las células más hipóxicas del lóbulo óptico, serían las más afectadas por los cambios en la expresión de asGC y que efecto es un intensificación de la división celular y un aumento del tamaño del cerebro. Esto refuerza nuestra hipótesis de que la asGC participa del control del desarrollo del cerebro, probablemente a través del control de la proliferación de neuroblastos.

OE3: No observamos diferencias entre mutantes con falta de función de asGC y control en las proporciones relativas de las tres poblaciones de células madre. Sin embargo, encontramos que la expresión ectópica de *gyc89Da*, tanto en el neuroepitelio como en los neuroblastos, produce un aumento en el número total de células madre ganglionares, así como en su fracción proliferante. Otro hallazgo interesante fue que la expresión ectópica tanto de *gyc89Da* como de *gyc89D*, produjo un aumento del número de células mitóticas entre las células "no-madre ganglionares". Este resultado es difícil de interpretar pero sugiere que la asGC normalmente podría ser parte de los mecanismos que controlan la diferenciación de células madre.

OE4: Se avanzó en la puesta a punto de equipos y reactivos pero no se alcanzaron las condiciones necesarias para hacer los experimentos. Usando nuestra mosca transgénica y microscopía hiperespectral con análisis de fasores logramos identificar el FRET como un rango de estados intermedios entre los componentes fluorescentes del sensor. La necesidad de que las células se encuentren vivas pero separadas de sistema respiratorio, al momento de realizar la microscopía hiperespectral, agregó una capa de complejidad, por lo que decidimos limitarnos a la aproximación farmacológica. El bloqueo farmacológico de la producción de GMPc redujo la señal de FRET, mientras que el agregado del agonista 8-Br-GMPc la incrementó, confirmando que el sensor reacciona del modo previsto a los cambios en los niveles de GMPc en el cerebro de la mosca ex vivo.

OE5: El biosensor elegido (sensor cGMP FRET Cutie2) había sido construido por colegas del Instituto Pasteur (Klein et al., 2021) y se basa en una proteína que contiene un sitio unión del ligando cGMP y un par de fluorocromos que permiten detectar la unión

del ligando al sensor por medio de la tecnología FRET. Se construyó un plásmido con la secuencia codificante para el sensor (Cutie2) y la secuencia UAS, que permitiría dirigir la expresión del sensor a tejidos o células específicas por medio del sistema GAL4:UAS. Se usó el plásmido para construir la cepa de mosca transgénica. Se consiguió un muy buen resultado en la construcción de la cepa transgénica y se confirmó que se puede expresar el sensor específicamente en distintas células o tejidos gracias al control genético ejercido por medio de la tecnología GAL4:UAS. Se obtuvieron varios resultados esperados: Imágenes de la fluorescencia demostrando la expresión del biosensor en mosca transgénica bajo el control del sistema GAL4-UAS, evaluación de la dinámica del sensor en células de *Drosophila* (datos cuantitativos), desarrollo de un protocolo de tratamiento de datos del sensor utilizando el tiempo de vida del donante de FRET y evaluación de análisis de fasores. En cambio, no se obtuvieron resultados en otros aspectos: no se pudo usar la microscopía multifotónica debido a que la construcción del equipo, único en Uruguay, fue demorada por la pandemia y no se pudo determinar con el sensor el rango dinámico de percepción de cGMP en respuesta a variaciones en la presión parcial de oxígeno (datos cuantitativos).

OE6: Este objetivo fue alcanzado parcialmente gracias al uso de medios digitales que permitió una colaboración fluida con los dos investigadores del proyecto en Suiza (Baccino-Calace y Egger). El principal resultado de esa actividad fue la publicación del artículo con resultados obtenidos con un sensor de oxígeno ODD-GFP a partir de estudios comenzados anteriormente en colaboración con los colegas suizos y completados durante el proyecto (Baccino-Calace et al., 2020). También se cumplió con la preparación de un artículo científico con resultados del proyecto, para lo cual preparamos un manuscrito que ya ha pasado la primera revisión. En cambio, la pasantía postdoctoral que permitiría una profundización de nuestra colaboración con los colegas suizos y era indispensable para algunos experimentos de los objetivos 4 y 5 no pudo realizarse.

OE7: Los resultados esperados para este objetivo fueron alcanzados exitosamente. Prieto completó su formación postdoctoral con financiación del IIBCE y otros fondos, dirigió la pasantía de una estudiante de veterinaria (Mariel Rosas), que defendió su tesis de grado titulada "Evaluación de un sensor de hipoxia en el control de la proliferación del neuroepitelio durante el desarrollo post embrionario de *Drosophila melanogaster*" y dirigió exitosamente una estudiante de maestría PEDECIBA (Ana González), que defendió su tesis en 2022 ("Rol de la guanilato ciclasa soluble atípica (asGC) en la percepción del oxígeno durante el desarrollo del cerebro larvario de *Drosophila melanogaster*. Caracterización de un biosensor de GMPc"). Tal como se había previsto, recibieron capacitación y entrenamiento en distintos métodos y equipos de investigación, trabajaron en más de un laboratorio en dos instituciones (IIBCE y Pasteur) y participaron en seminarios y cursos.

Conclusiones y recomendaciones

Una de las mayores contribuciones del proyecto fue el avance modesto pero potencialmente importante en nuestro conocimiento científico sobre el desarrollo del cerebro en *Drosophila*, principalmente por los datos experimentales que le asignan a la asCG una función en el control de la proliferación de células madre neurales. La altísima probabilidad de que conocimientos adquiridos con experimentos en *Drosophila* resulten aplicables a otras especies animales y seres humanos, está avalada por una inmensa literatura científica y por la otorgación de 6 premios Nobel en Medicina y Fisiología a científicos que descubrieron principios fundamentales usando a *Drosophila* como modelo experimental.

Si se analizan los resultados de los objetivos 1, 2 y 3 más en detalle, se puede concluir que nuestro proyecto aporta datos a favor de la hipótesis estudiada, porque permiten afirmar que muy probablemente dos subunidades de asGC se expresan en un tipo de células madre (neuroblastos) durante el desarrollo del cerebro y que fueron justamente estas células las que exhibieron cambios más destacados tanto frente a la falta de función como al exceso (expresión ectópica) de una o más subunidades de asGC. Como varios tipos de experimentos causaron un aumento de la proliferación de los neuroblastos, de su número total y a veces un aumento del tamaño del cerebro, se puede afirmar que los datos coinciden muy bien con nuestra hipótesis de que la asGC contribuye al control de procesos biológicos importantes para el desarrollo normal del cerebro.

Otra contribución importante fue la construcción exitosa de una herramienta transgénica basada en la expresión de un biosensor en células o tejidos específicos, que permite monitorear los niveles de cGMP in vivo con técnicas de microscopía basadas en fluorescencia con la tecnología FRET. Es de esperar que futuras investigaciones usen esta nueva herramienta y el conocimiento generado por el proyecto para profundizar la investigación sobre la función de la hipoxia durante el desarrollo del cerebro y la existencia de un nuevo mecanismo de percepción del oxígeno en la zona proliferativa del cerebro de *Drosophila*, basado en la expresión de asGC y su señalización por medio de cGMP frente a situaciones de hipoxia.

Otra contribución importante fue la formación de recursos humanos que indudablemente podrán ser útiles para

investigaciones en proyectos que requieren formación académica sólida, curiosidad científica, capacidad de adaptación y actitud innovadora, en particular la capacitación postdoctoral de Prieto y el posgrado de González. Es de resaltar que ambos investigadores han sido incorporados exitosamente a otros laboratorios, donde actualmente están contribuyendo a la investigación de otros temas (la resistencia del tomate a un hongo patógeno que afecta su cultivo en Uruguay y el estudio de la cicatriz glial en lesiones de la médula espinal).

El proyecto comenzó en abril de 2020, casi simultáneamente a la pandemia de Covid-19, por lo cual sufrió gravemente las restricciones impuestas sobre viajes, uso de equipos y trabajo presencial en el laboratorio. Entre otras dificultades graves, las restricciones impidieron la realización de la pasantía en Suiza, que habría permitido hacer experimentos con cultivos primarios de neuronas y microscopía FLIM y "spinning disk". Más allá de las consecuencias negativas de este imprevisto sobre el cumplimiento de varios aspectos del proyecto, se considera que su viabilidad también fue afectada por la decisión inicial de usar varias (quizás demasiadas?) tecnologías de punta, aún no establecidas firmemente en Uruguay, como un biosensor de cGMP que se probaría por primera vez in vivo en un organismo multicelular, el análisis de fasores sobre datos de FRET obtenidos con microscopía hiperespectral y un equipo de muy sofisticada tecnología (microscopio multifotónico, primero en Uruguay) cuya construcción no estaba completa al inicio del proyecto.

Estos riesgos, inherentes a la innovación tecnológica, habían sido previstos inicialmente y consideramos que eran aceptables porque contábamos con expertos altamente especializados. Se contó en todo momento con la asesoría del investigador responsable de la construcción del biosensor (Pantano) y un integrante del proyecto (Comini) había liderado la evaluación del biosensor in vitro, de modo que contábamos con los mejores expertos en esa materia. La implementación de cultivos primarios de células neurales a partir de cerebro larvario sería supervisada en Suiza directamente por el inventor de este método (Egger). Para desarrollar un método de registro FLIM a partir de fluorescencia emitida por el sensor, usando microscopía multifotónica, contábamos con la ayuda del experto que estaba introduciendo esa tecnología en Uruguay (Malacrida). Consideramos que un buen proyecto de investigación puede y debe asumir riesgos de este tipo, pero recomendamos no excederse, ser más prudentes en la planificación y tener en cuenta que, frente a riesgos múltiples es conveniente no diseñar planes de trabajo demasiado ambiciosos.

Referencias bibliográficas

Abergel, R., Livshits, L., Shaked, M., Chatterjee, A. K. y Gross, E. (2017). Synergism between soluble guanylate cyclase signaling and neuropeptides extends lifespan in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 16, 401-413.

Alyagor I, Berkun V, Keren-Shaul H, Marmor-Kollet N, David E, Maysel O, Issman-Zecharya N, Amit I, Schuldiner O (2018) Combining Developmental and Perturbation-Seq Uncovers Transcriptional Modules Orchestrating Neuronal Remodeling. *Dev Cell* 47(1):38-52.e6.
doi: 10.1016/j.devcel.2018.09.013.

Baccino-Calace M, Prieto D, Cantera R, Egger B. 2020. Compartment and cell-type specific hypoxia responses in the developing *Drosophila* brain. *Biology Open* 2020 9: bio053629. doi: 10.1242/bio.053629.

Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415.

Cho, B., Spratford, C. M., Yoon, S., Cha, N., Banerjee, U. y Shim, J. (2018). Systemic control of immune cell development by integrated carbon dioxide and hypoxia chemosensation in *Drosophila*. *Nat. Commun.* 9, 1-12.

Egger B, Gold KS, Brand AH (2011) Regulating the balance between symmetric and asymmetric stem cell division in the developing brain. *Fly* 5:237-241.

Jarecki J, Johnson E, Krasnow MA (1999) Oxygen regulation of airway branching in *Drosophila* is mediated by branchless FGF. *Cell* 99:211-220

Klein F, Sardi F, Machado MR, Ortega C, Comini MA, Pantano S (2021) CUTie2: The Attack of the Cyclic Nucleotide Sensor Clones. *Front Mol Biosci* 11;8:629773
doi: 10.3389/fmolb.2021.629773. eCollection 2021

Lange C, Turrero Garcia M, Decimo I, Bifari F, Eelen G, Quaegebeur A, Boon R, Zhao H, Boeck B, Chang J, et al. (2016) Relief of hypoxia by angiogenesis promotes neural stem cell differentiation by targeting glycolysis. *EMBO J* 35, 924-941.

Langlais KK, Stewart JA, Morton DB (2004) Preliminary characterization of two atypical soluble guanylyl cyclases in the central and peripheral nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 207:2323-38.

Lavista-Llanos S, Centanin L, Irisarri M, Russo DM, Gleadle JM, Bocca SN, Muzzopappa M, Ratcliffe PJ, Wappner P (2002). Control of the hypoxic response in *Drosophila melanogaster* by the basic helix-loop-helix PAS protein Similar. *Mol Cell Biol* 22:6842-6853.

Misra T, Baccino-Calace M, Meyenhofer F, Rodriguez-Crespo D, Akarsu H, Armenta-Calderón R, Gorr TA, Frei C, Cantera R, Egger B, Luschnig S (2017). A genetically encoded biosensor for visualising hypoxia responses in vivo. *Biol Open* 6:296-304.

Morton DB, Vermehren A (2007) Soluble cyclases in invertebrates: Targets for NO and O(2). *Adv Exp Biol* 1:65-82.

Panchision DM (2009) The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *J Cell Physiol* 220:562-568.

Schito L and Semenza GL (2016) Hypoxia-inducible factors: Master regulators of cancer progression. *Trends Cancer* 2:758-770.

Semenza GL (2012) Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 148:399-408.

Southall TD, Gold KS, Egger B, Davidson CM, Caygill EE, Marshall OJ, Brand AH. 2013. Cell-Type-Specific Profiling of Gene Expression and Chromatin Binding without Cell Isolation: Assaying RNA Pol II Occupancy in Neural Stem Cells. *Developmental Cell*. 26(1):101–112. doi:10.1016/j.devcel.2013.05.020.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional. (CC BY-NC)