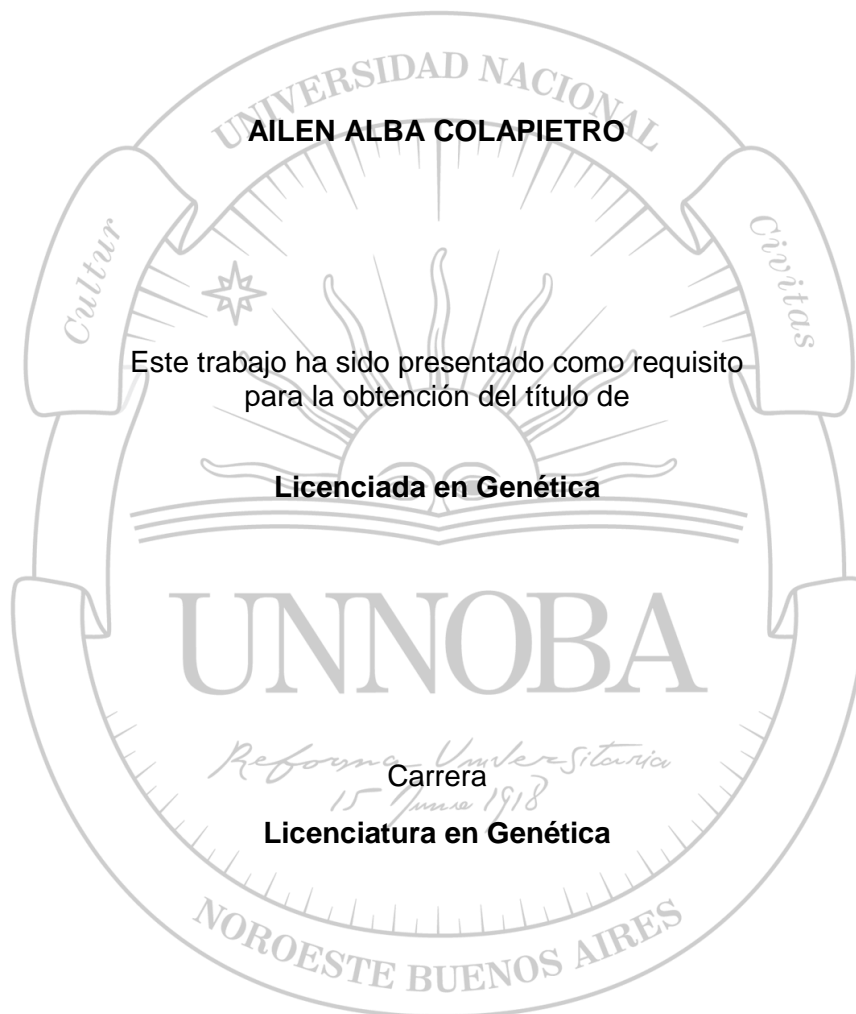


FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN CON MOTIVO BHLH-PAS EN *RHODNIUS PROLIXUS*. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA-FUNCIONAL DEL GEN *SIMILAR*

Trabajo Final de Grado
de la alumna



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 3 de julio de 2019

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN CON MOTIVO BHLH-PAS EN *RHODNIUS PROLIXUS*. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA-FUNCIONAL DEL GEN *SIMILAR*

Trabajo Final de Grado
de la alumna

AILEN ALBA COLAPIETRO

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Agustina Pascual
Evaluador

Gabriela Fernández
Evaluador

Lucía Elena Pagola
Evaluador

Andrés Lavore
Director

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 3 de julio de 2019

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	4
bHLH-PAS <i>family</i> como reguladores del desarrollo.....	4
Miembros de la bHLH-PAS <i>family</i>	5
<i>Single-minded</i>	5
<i>Neuronal PAS Domain - Trachealess</i>	6
<i>Hipoxia-inducible factor-α - Similar</i>	7
<i>Aryl hydrocarbon receptors - Spineless</i>	8
<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator - Tango</i>	8
Traqueogénesis y Angiogénesis.....	9
<i>Rhodnius prolixus</i> como modelo de estudio.....	11
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS.....	15
Objetivos generales.....	15
Objetivos específicos.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Colonia de <i>Rhodnius prolixus</i>	16
Análisis bioinformático.....	16
Amplificación por PCR.....	17
Transcripción <i>in vitro</i>	18
ARN de interferencia en ninfas V y hembras adultas.....	19
Manipulación de embriones interferidos. Análisis fenotípico.....	21
RESULTADOS.....	23
Análisis genómico-filogenético de proteínas bHLH-PAS.....	23
<i>Single-minded</i>	24
<i>Similar</i>	27
<i>Spineless</i>	30
<i>Tango</i>	33
RNAi de <i>Rp-sima</i> en ninfas V.....	36
Interferencia parental del gen <i>similar</i> en <i>R. prolixus</i>	38
DISCUSIÓN.....	44
Factores de transcripción con motivos bHLH-PAS.....	44
<i>sima</i> como regulador del crecimiento traqueal.....	46
Rol de <i>sima</i> en el desarrollo embrionario.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	51

INTRODUCCIÓN

bHLH-PAS family como reguladores del desarrollo

La familia de proteínas bHLH-PAS comprende una clase de reguladores transcripcionales que participan en una amplia variedad de procesos biológicos, involucrados en desarrollo embrionario, neurogénesis y formación de estructuras ramificadas como tráqueas y conductos salivales, así como también en mecanismos fisiológicos como receptores de hormonas, respuesta a hipoxia y ritmo circadiano (Crews, 1998). En dichos procesos, estas proteínas, se desempeñan principalmente como sensores del estado fisiológico interno del organismo, así como también de señales de su entorno. La ausencia o defectos en la mayoría de las proteínas bHLH-PAS están ligadas a una amplia variedad de enfermedades humanas, desde diversos desórdenes metabólicos y psiquiátricos hasta cáncer (Li *et al.*, 2015; Michaelson *et al.*, 2017).

A nivel estructural, las proteínas bHLH-PAS contienen tres dominios bien definidos: un dominio hélice-bucle-hélice básica (bHLH), un dominio PAS y una región variable en el extremo c-terminal que representa un dominio de transrepresión (TRD) (Wu & Rastinejad, 2017). El dominio PAS recibe su nombre gracias a las primeras tres proteínas identificadas con este motivo: *Period* de *Drosophila* (Per), *Aromatic hydrocarbon nuclear translocator* (Arnt) de mamíferos y *single-minded* (sim) de *Drosophila* (Nambu *et al.*, 1991). Dicho dominio, presente en la familia bHLH-PAS, posee una longitud entre 260 y 310 aminoácidos y está claramente subdividido en 2 regiones bien conservadas, PAS-A y PAS-B, separadas por una región con baja conservación a nivel de secuencia. Estas regiones de baja conservación entre los miembros de la familia, podrían estar relacionadas con la diversidad de procesos en los que participan las proteínas bHLH-PAS. Por otro lado, la región *basic* del motivo bHLH es el sitio de unión a ADN, mientras que la región HLH promueve la dimerización de las proteínas junto con el dominio PAS (Crews, 1998; Wu & Rastinejad, 2017).

Normalmente estas proteínas forman heterodímeros funcionales con otros miembros de la familia y así adquieren su capacidad de unirse con alta afinidad a elementos del ADN para la regulación de genes diana (Crews & Fan, 1999; Wu

& Rastinejad, 2017). De esta forma, una de las proteínas del heterodímero se expresa constitutivamente, mientras que la otra tiene expresión o función variable temporal-espacialmente, o depende de la presencia de inductores (Crews, 1998). Los principales miembros de esta familia se pueden agrupar en *hypoxia-inducible factors* (HIFs), *aryl hydrocarbon receptors* (Ahr), *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (Arnt), *neuronal PAS proteins* (Npas), *Single-minded* (Sim) y reguladores del ritmo circadiano (CLOCK). Todas estas proteínas son reconocidas por participar en una amplia variedad de procesos fisiológicos y del desarrollo, funcionando como reguladores transcripcionales en forma dimerizada, y por estar altamente conservadas desde insectos a vertebrados (Wu & Rastinejad, 2017).

Miembros de *bHLH-PAS family*

Single-minded

El gen *single-minded* en *Drosophila melanogaster* (*Dm-sim*) es un factor de transcripción que controla la transcripción y el desarrollo de la línea media del sistema nervioso central (SNC) (Nambu *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 1988). En mamíferos, su ortólogo *single-minded homolog 1* (*sim1*) está involucrado en la diferenciación de linajes celulares específicos del hipotálamo, denominados núcleos paraventriculares (PVN), núcleos paraventriculares anteriores (aPV) y núcleos supraópticos (SON) (Crews & Fan, 1999; Michaud *et al.*, 1998). Durante la embriogénesis de *Drosophila*, *sim* comienza a expresarse en el estadio de blastodermo en una región denominada mesoectodermo, ubicada entre el mesodermo presuntivo y el neuroectodermo lateral. Allí *Sim* forma heterodímeros con *Tango* (*Tgo*) y activa la transcripción de numerosos genes *target*, a través de su unión a sitios *CNS midline enhancer* (CME) que contienen una secuencia núcleo ACGTG repetida en múltiples copias (Crews, 1998). En los embriones mutantes para *Dm-sim*, las células mesoectodérmicas no originan células precursoras de la línea media del SNC (Nambu *et al.*, 1990) sino que adoptan características del neuroectodermo lateral (Crews, 1998; Xiao *et al.*, 1996), de esta forma los embriones mutantes para este gen se caracterizan por la ausencia de dicha línea media. Por otra parte, en mamíferos, los ratones

mutantes *sim1*^{-/-} no terminan de diferenciar completamente los linajes correspondientes a PVN, aPV y SON del hipotálamo murino (Michaud *et al.*, 1998). En conclusión, *sim1/sim* es un regulador transcripcional linaje-específico de gran importancia en la neurogénesis embrionaria y su función ha sido conservada en gran parte a lo largo de la evolución.

Neuronal PAS Domain - Tracheiless

Las proteínas *Neuronal PAS Domain (Npas)* de mamíferos son importantes reguladores transcripcionales bHLH-PAS con funciones variables. *Npas1* y *Npas4* están involucrados principalmente en la correcta actividad neuronal en humanos, por ende la ausencia o falla de alguno de estos genes lleva normalmente al desarrollo de enfermedades psiquiátricas y pérdida de memoria (Fahim *et al.*, 2018; Michaelson *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017). Por otro lado, *Npas3* ha sido identificado como homólogo del gen *tracheiless (trh)* de *D. melanogaster* no solo debido a la alta similitud a nivel estructural, sino que también los mutantes *Npas3*^{-/-} son los únicos ortólogos de *trh* que presentan defectos en el desarrollo de estructuras ramificadas, como es el caso del pulmón (Zhou *et al.*, 2009). *trh* codifica un factor de transcripción clave para la formación del sistema traqueal, conductos salivales y el *filzkörper* en el embrión de *Drosophila*. Al comienzo de la embriogénesis, se expresa específicamente en las células de las placodas traqueales y salivales; avanzado el desarrollo, se observa expresión en todas las células traqueales y en los conductos salivales hasta alcanzar el estado larval inclusive (Wilk *et al.*, 1996). La proteína que codifica el gen *trh* forma heterodímeros con *Tgo* y se une a sitios CME en sus genes diana, de igual manera que *Sim*. En mutantes *trh*, las células que normalmente forman dichos túbulos fallan en la invaginación y permanecen agrupadas en su sitio de origen (Isaac & Andrew, 1996). Más allá de que ambos genes, *trh* y *sim*, forman heterodímeros con *tgo* y muestran gran similitud de secuencia, requieren factores adicionales para poder regular la transcripción de genes específicos en cada linaje celular a lo largo del desarrollo embrionario de la mosca de la fruta, lo cual hace que tengan funciones completamente diferentes durante el proceso de diferenciación celular y morfogénesis (Crews, 1998).

Hypoxia-inducible factor- α - Similar

El *hypoxia-inducible factor (HIF)* juega un rol crucial en el mantenimiento de la homeostasis de oxígeno; posee la capacidad de responder frente a hipoxia induciendo procesos fisiológicos y morfogénicos que revierten el estrés, entre ellos angiogénesis, eritropoyesis, vasodilatación, glicólisis, metabolismos anaeróbicos y supervivencia celular (Pugh & Ratcliffe, 2003; Schipani *et al.*, 2001). Este factor está conformado por dos miembros de la familia bHLH-PAS, una subunidad α correspondiente a *HIF- α* en mamíferos y su ortólogo *Similar (sima)* en *D. melanogaster* (Bacon *et al.*, 1998; Lavista-Llanos *et al.*, 2002), y una subunidad β constitutiva también conocida como HIF- β en mamíferos o su ortólogo en *D. melanogaster Tango (Tgo)* respectivamente (Centanin *et al.*, 2008). Este dímero estable posee un sitio de unión *hypoxia response element (HRE)* en sus genes diana que, curiosamente, contienen una secuencia núcleo idéntica al sitio *CME* para los heterodímeros *Sim::Tgo* y *Trh::Tgo* (Crews, 1998). *Sima* posee una regulación post-traducciona oxígeno-dependiente: en condiciones de normoxia sufre hidroxilación en el dominio *oxygen-dependent degradation domain (ODDD)* por una enzima *prolyl hydroxylase* llamada *Fatiga (Fga)*, y luego es rápidamente degradada mediante la acción del complejo ubiquitin ligasa y el proteosoma (Arquier *et al.*, 2006; Irisarri *et al.*, 2009). Bajo condiciones de hipoxia no se produce la degradación de *Sima*, así se acumula en el núcleo y de esta forma activa la transcripción de diversos genes (Arquier *et al.*, 2006; Irisarri *et al.*, 2009; Lavista-Llanos *et al.*, 2002). Uno de ellos es *branchless (bnl)* que induce la formación de las ramificaciones traqueales terminales (Ghabrial *et al.*, 2003). En *D. melanogaster*, las larvas mutantes para *sima* desarrollan menor número de ramificaciones traqueales bajo condiciones de hipoxia, en comparación con larvas *wild-type (wt)*. Sin embargo, cuando dichas larvas crecen en condiciones de normoxia presentan un sistema traqueal invariable, indicando que el desarrollo normal de las ramificaciones terminales se da por un mecanismo independiente de *Sima*. Esta es una diferencia remarcable entre la traqueogénesis de *Drosophila* y el desarrollo del sistema vascular en mamíferos, en donde *HIF- α* juega un rol esencial durante el proceso de angiogénesis independientemente de las concentraciones de oxígeno del medio (Centanin *et al.*, 2008).

Aryl hydrocarbon receptors - Spineless

El gen *aryl hydrocarbon receptors (ahr)* en mamíferos codifica para una proteína con motivos bHLH-PAS que controla la respuesta fisiológica al metabolismo de toxinas. Actúa como receptor citoplasmático de hidrocarburos aromáticos y, luego de unirse a su ligando, *Ahr* se transloca al núcleo donde forma heterodímeros con *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt)*. Este complejo se une a sitios *Xenobiotic Response Elements (XRE)* de sus genes diana para activar su transcripción (Rowlands & Gustafsson, 1997). Aunque *Ahr* funciona principalmente en un rol netamente fisiológico, ratones *knockout* mostraron severos defectos en el crecimiento y desarrollo hepático (Schmidt *et al.*, 1996). El homólogo de *ahr* en *D. melanogaster* es el gen *spineless (ss)*, cuya proteína forma heterodímeros con *Tgo* y actúa en el desarrollo de las antenas y el tarso de los apéndices torácicos (porción distal de las patas). Los mutantes *ss* son viables y los insectos adultos muestran un fenotipo caracterizado por la transformación de la parte distal de las antenas en pata, reducción del tamaño de las cerdas sensoriales y ausencia del tarso en los apéndices torácicos (Duncan *et al.*, 1998). Si bien *ahr* y *ss* poseen funciones diferentes, ambos participan en procesos quimiosensitivos: *Ahr* en vertebrados es un sensor de toxinas, mientras que *ss* en *Drosophila* controla el desarrollo de la antena, un órgano capaz de detectar estímulos químicos en el ambiente (Crews & Fan, 1999; Hahn *et al.*, 1994).

Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator - Tango

Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) fue inicialmente identificada como parte del complejo *aryl hydrocarbon receptor complex (AHRC)* en vertebrados (Hankinson, 1995). Presenta una estructura altamente conservada, siendo el gen *tango (tgo)* su ortólogo en *D. melanogaster* (Sonnenfeld *et al.*, 1997). Además de asociarse con *Ahr*, la proteína *Arnt/Tgo* es capaz de formar heterodímeros funcionales con otras proteínas bHLH-PAS, como *Sim1/Sim*, *Npas/Trh* y *HIF- α /Sima* (Crews, 1998; Sonnenfeld *et al.*, 1997). Tanto *Arnt* como *Tgo* se localizan en el núcleo o en el citoplasma dependiendo

del tipo celular y el momento del desarrollo que se considere. En *D. melanogaster*, durante el estadio de blastodermo embrionario *Tgo* está distribuido uniformemente en el citoplasma de las células y, a medida que transcurre la embriogénesis, se localiza mayormente en los núcleos de las células precursoras traqueales y del SNC, debido a su dimerización con las proteínas *Sim* y *Trh* (Sonnenfeld *et al.*, 1997). Es por ello que los embriones mutantes *tgo* en *Drosophila* exhiben defectos tanto en la línea media del SNC como en el desarrollo del sistema traqueal (Sonnenfeld *et al.*, 1997).

Traqueogénesis y Angiogénesis

Estructuras tubulares ramificadas son encontradas en muchos animales, desde invertebrados a mamíferos, y su función es de vital importancia, ya que normalmente se encargan de transportar gases y líquidos a través del cuerpo. Los artrópodos terrestres contienen un sistema traqueal formado por una red de tubos epiteliales (tráqueas) capaz de intercambiar gases por difusión pasiva con los tejidos corporales (Kuhnlein & Schuh, 1996). Este sistema está conformado por un conjunto de ramificaciones traqueales que disminuyen su diámetro progresivamente, desde troncos principales hasta finas ramas terminales (traqueolas) en contacto directo con las células. Además cuenta con orificios superficiales denominados espiráculos por donde se produce el intercambio gaseoso con el exterior (Schottenfeld *et al.*, 2010). Por otro lado, en vertebrados, el transporte de gases a los diferentes tejidos se produce a través del sistema circulatorio. Tanto el desarrollo del sistema traqueal en artrópodos como la formación de vasos sanguíneos en vertebrados (angiogénesis) ocurren por mecanismos genéticos-moleculares altamente conservados evolutivamente. La angiogénesis está involucrada tanto en procesos fisiológicos como patológicos, entre los cuales podemos mencionar la formación de la placenta, el crecimiento del endometrio y la angiogénesis de tumores (Adelman *et al.*, 2000; Carmeliet, 2003).

En *Drosophila*, la traqueogénesis se inicia por la aparición de diez placodas traqueales formadas por células ectodérmicas precursoras, localizadas en la parte lateral de cada segmento del embrión. Las placodas traqueales se

invaginan en el mesodermo subyacente para formar sacos traqueales (Figura 1 A). A partir de ellos surgen seis brotes, creciendo en diferentes direcciones y con longitudes características, que darán lugar a las ramificaciones primarias (Figura 1 B). De las tráqueas principales emergen ramificaciones secundarias mediante el proceso de elongación e intercalación (Figura 1 E), teniendo ambos un patrón de ramificación estereotipado y controlado por una red génica jerárquica, donde el gen *trachealess* actúa como regulador maestro (Kuhnlein & Schuh, 1996). Algunas ramas no continúan ramificándose si no que crecen hacia tráqueas de hemisegmentos vecinos, a los cuales se fusionan para interconectar la red traqueal (Kuhnlein & Schuh, 1996; Rao *et al.*, 2015). Al final del proceso, se forman las ramificaciones terminales (traqueolas) por extensión citoplasmática de la célula traqueal terminal (Figura 1 F). Su patrón de ramificación, en contraste, es altamente variable y está regulado según las necesidades de oxígeno en los tejidos blanco (Ghabrial *et al.*, 2003; Samakovlis *et al.*, 1996). El factor de transcripción *Hypoxia inducible factor- α* (*HIF- α*), *Sima* en *D. melanogaster*, se acumula en la células con bajos niveles de oxígeno y estimula la expresión del gen *branchless* (*bnl*), el cual actúa como quimioatrayente de las células traqueales que expresan *breathless* (*btl*), activando de esta forma la traqueogénesis en los tejidos carentes de oxígeno (Ghabrial *et al.*, 2003). Cabe destacar que *HIF- α* es también un regulador transcripcional clave en la angiogénesis frente a hipoxia (Pugh & Ratcliffe, 2003), sumando evidencia a la alta homología que existe entre la traqueogénesis en artrópodos y la angiogénesis en vertebrados.

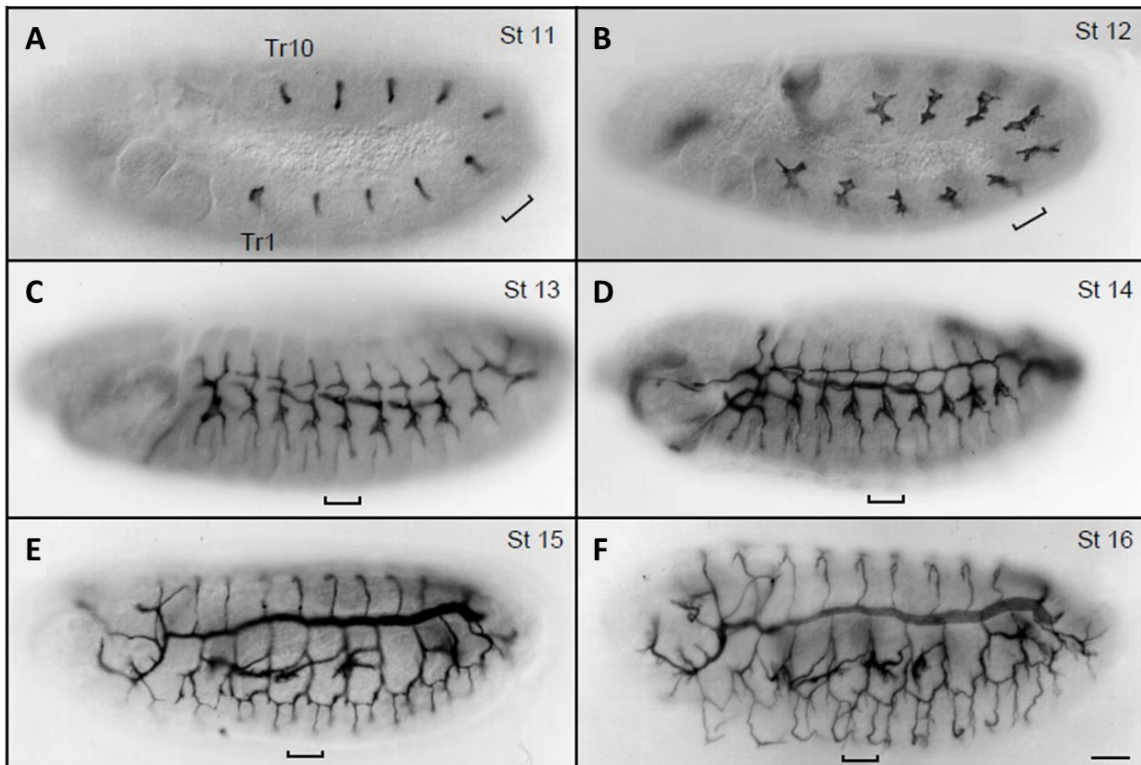


Figura 1. Desarrollo traqueal embrionario en *D. melanogaster*. (A-D) Visualizado por inmunotinción del lumen traqueal con anticuerpos que reconocen lumen de tráqueas TL-1 y (E-F) usando anticuerpos que reconocen lumen de tráqueas mAb2A12. Anterior izquierda, dorsal arriba; vista lateral. Se indica el estadio del embrión (St), así como el primer (Tr1) y el décimo (Tr10) hemisegmento traqueal. El corchete señala la posición del quinto hemisegmento traqueal (Tr5). (A) La traqueogénesis inicia mediante la aparición de diez placodas traqueales, que luego forman sacos alargados. (B) Seis brotes principales surgen de cada saco traqueal, (C) los cuales se continúan elongando (D) para posteriormente fusionarse y formar el tronco dorsal y lateral. (E) A partir las ramas primarias se originan las secundarias. (F) Las primeras ramificaciones terminales aparecen luego como continuación de las tráqueas secundarias. (Imágenes extraídas de Samakovlis *et al.*, 1996).

***Rhodnius prolixus* como modelo de estudio**

Rhodnius prolixus es un hemíptero hematófago nativo del norte de Sudamérica y pertenece a la familia *Reduviidae*, dentro de la cual los géneros *Rhodnius*, *Panstrongylus* y *Triatoma* representan los más importantes vectores de la enfermedad de Chagas en el continente Americano (Coura & Borges-pereira, 2012). En Argentina, esta enfermedad es transmitida por la vinchuca *Triatoma infestans* y se estima que existen aproximadamente 1.500.000 personas que padecen la enfermedad (Vazquez-Prokopec *et al.*, 2012).

En la mayoría de los insectos, la embriogénesis comienza con una serie de divisiones nucleares que dan lugar a un sincicio. Las divisiones iniciales ocurren en la región central del huevo y luego los núcleos migran hacia la superficie. Una vez culminada esta etapa, se produce la celularización dando lugar al estadio de

blastodermo celular, el cual consiste en una monocapa de células superficiales que rodean al vitelo del huevo. Luego, una parte de estas células se diferencia para formar el rudimento embrionario o banda germinal, y las células restantes pasarán a formar las membranas extraembrionarias. Pasado el estado de blastodermo, pueden desarrollarse distintos mecanismos que difieren especialmente respecto a cuándo y cómo se produce la segmentación de la banda germinal (Esponda-Behrens, 2013).

Existen distintos tipos de desarrollo de la banda germinal: corta, intermedia y larga. En los insectos de banda germinal corta, como es el caso de *R. prolixus*, sólo los segmentos corporales anteriores se especifican durante el estadio de blastodermo, mientras que los segmentos posteriores aparecen más tarde en el desarrollo, de forma secuencial y progresiva a partir de una zona de crecimiento posterior (Figura 2 A). En los insectos de banda germinal larga, todos los segmentos son especificados de manera temprana y simultánea en el estadio de blastodermo, y ocupan espacios proporcionalmente similares a los de la futura larva (Figura 2 B) (Pagola, 2012).

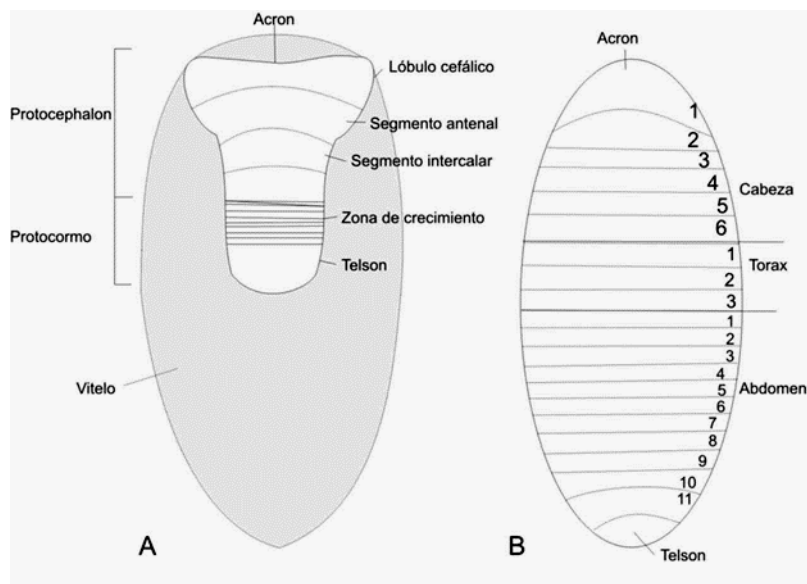


Figura 2. Desarrollo embrionario de banda germinal en insectos. (A) Banda germinal corta donde se encuentran especificados los primeros segmentos de la cabeza, la zona de crecimiento, acron y telson. **(B)** Banda germinal larga donde desde un principio se especifican todos los segmentos del cuerpo con las proporciones que posteriormente presentará la larva. (Figura extraída de Pagola, 2012).

Rhodnius prolixus tiene un ciclo de vida más corto que *T. infestans*, siendo de 3 y 6 meses respectivamente, convirtiéndolo en un modelo biológico de estudio más flexible y práctico para el trabajo en laboratorio. Además, al no pasar por un estado pupal se puede observar la formación de estructuras corporales en las larvas semejantes a las que estarán presentes en el adulto. En *D. melanogaster*, es imposible realizar este tipo de estudios directos, ya que el adulto se reconstruye a partir de unas pocas células provenientes de los discos imaginales larvales (Esponda-Behrens, 2013).

Actualmente *R. prolixus* cuenta con su genoma completamente secuenciado (www.vectorbase.org) (Mesquita *et al.*, 2015), lo cual representa una gran fuente de información e importante herramienta para llevar a cabo estudios genéticos-genómicos en triatominos. Además de su importancia como vector de Chagas, *R. prolixus* representa un modelo clásico para el estudio de la fisiología de insectos, resurgiendo recientemente como modelo de estudio en biología del desarrollo (Lavore *et al.*, 2012; 2014) y más precisamente en el estudio del desarrollo del sistema traqueal de insectos (Lavore *et al.*, 2015).

Como se mencionó anteriormente, hoy en día, una gran cantidad de genes fueron identificados y asignados a una determinada función durante el desarrollo traqueal en *D. melanogaster* (Ghabrial *et al.*, 2003), pero este no fue el modelo pionero para este tipo de estudios por su metamorfosis completa y por su dificultad en la experimentación embriológica clásica o en fisiología. Los primeros estudios del sistema traqueal de insectos fueron realizados por Wigglesworth y Lock (Wigglesworth, 1954; Locke, 1958). Wigglesworth llevó a cabo una exquisita caracterización del sistema traqueal en *R. prolixus*, en donde por un lado mostró que, a diferencia de la mayoría de los insectos (en los cuales entre los periodos intermudas se regenera completamente el sistema traqueal), la expansión del sistema traqueal se produce a partir de puntos de crecimiento en los extremos de la traqueolas ya existentes en la larva, y por otro lado descubrió la gran plasticidad que este sistema tiene frente a hipoxia. Puntualmente, fueron experimentos muy sencillos: si una rama del sistema traqueal era extirpada quirúrgicamente, la falta de oxígeno en los tejidos carentes de tráqueas era compensada con la migración de tráqueas desde los segmentos más cercanos. Posteriormente, se observó que esta respuesta de traqueogénesis frente a

hipoxia es conservada entre *R. prolixus* y las larvas de *D. melanogaster*. Aunque estos procesos fueron descritos con un alto grado de detalle para *D. melanogaster* (un insecto holometábolo en el cual el sistema traqueal es dramáticamente remodelado durante la metamorfosis) nada se conoce acerca de los eventos moleculares que regulan el desarrollo traqueal en otros insectos, en particular en hemimetábolos, como es el caso de *R. prolixus*.

Estudios filogenéticos de la familia de proteínas bHLH-PAS fueron llevados a cabo, detalladamente, en unos pocos organismos modelos, principalmente *D. melanogaster* y *Mus musculus*. Es por ello que utilizar otros modelos, como en este caso *R. prolixus*, es sumamente interesante para incorporar información estructural-funcional de las proteínas bHLH-PAS y de esta manera ampliar la mirada evolutiva. Con este fin llevamos a cabo un análisis genómico de 4 miembros de la familia bHLH-PAS en *R. prolixus*, focalizándonos en la función de *sima* como gen con potencial para sensor las concentraciones de oxígeno celulares y desencadenar mecanismos traqueogénicos.

HIPÓTESIS

Las proteínas bHLH-PAS se encuentran conservadas estructuralmente en insectos. El gen *similar* participa en la traqueogénesis y la remodelación traqueal en *Rhodnius prolixus*.

OBJETIVOS

Objetivos generales

Caracterizar los genes *single-minded*, *similar*, *spineless* y *tango* en *R. prolixus* a través de herramientas bioinformáticas. Examinar la función de *similar* en estadios ninfales avanzados y en el desarrollo embrionario de *R. prolixus*.

Objetivos específicos

- Identificar y anotar *in silico* los genes pertenecientes a la familia bHLH-PAS en *R. prolixus*.
- Caracterizar la función del gen *similar* en la remodelación del sistema traqueal de adultos previamente interferidos en un estadio ninfal.
- Examinar el rol de *similar* en la traqueogénesis durante el desarrollo embrionario de *R. prolixus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colonia de *Rhodnius prolixus*

Los ejemplares de *R. prolixus*, se obtuvieron a partir de la colonia establecida en el Centro de Bioinvestigaciones-UNNOBA. La misma se mantiene en estufa a 28°C en incubadora SEMEDIC I-501PFH, con una humedad relativa del 70% y un fotoperíodo de 12 horas luz/oscuridad, condiciones necesarias para que la embriogénesis se complete en 14±1 días (Pagola, 2012) y el ciclo de vida se desarrolle en 3 meses. Los insectos se encuentran separados por estadios ninfales en frascos plásticos, cubiertos con una malla de nylon que facilita el intercambio de aire y la alimentación. En su interior se colocan tiras de papel plegadas que simulan el ambiente natural de esta especie (pequeños recovecos en cortezas de árboles o construcciones) y facilita la recolección de los huevos. La alimentación se realiza una vez cada 15 días mediante la ingesta de sangre *ad libitum* utilizando aves de corral (gallinas).

Análisis bioinformático

A partir de secuencias de aminoácidos de los genes *single-minded* (NP_524340.2), *similar* (NP_524584.2), *spineless* (NP_476748.1) y *tango* (NP_731308.1) de *D. melanogaster*, extraídos de la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), se buscaron dichas secuencias ortólogas en *R. prolixus*. Para ello se realizó una búsqueda de similitud de secuencia usando BLASTx como motor de búsqueda, un e-value de 0.0001 de umbral de probabilidad y en el genoma de *R. prolixus* disponible en la base de datos VectorBase (<https://www.vectorbase.org/>).

Los modelos de transcritos disponibles para cada gen en *R. prolixus* se corrigieron manualmente utilizando el programa Artemis (<https://www.sanger.ac.uk/science/tools/artemis>) y, en el caso de que no hayan sido previamente identificados, se procedió a su anotación manual mediante el programa antes mencionado, en base a la secuencia de su ortólogo en *D. melanogaster*.

Se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias de *R. prolixus* identificadas junto con ortólogos de los genes analizados de diversas especies mediante el algoritmo *Clustal Omega* (<http://www.clustal.org/omega/>), utilizando los perfiles HMM *Helix-loop-helix DNA-binding domain* (PF00010), *PAS fold* (PF00989), *Single-minded protein C-terminus* (PF06621) y *Hypoxia-inducible factor-1* (PF11413) obtenidos de Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) para guiar el alineamiento. Los alineamientos se visualizaron y analizaron utilizando el paquete de programas Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Estos alineamientos fueron utilizados para construir árboles filogenéticos por inferencia Bayesiana utilizando el programa BEAST (<http://www.beast2.org/>). Los parámetros utilizados para el análisis fueron *Substitution Model: Blosum62, Site Heterogeneity Model: Gamma, Number of Gamma Categories: 4, Tree Prior: Speciation: Yule Process, Length of chain: 100000*. Los árboles generados fueron visualizados posteriormente con FigTree v1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la validación funcional del gen *sima* se aplicó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase chain reaction*). Para ello se utilizaron *primers forward* (Fw) y *reverse* (Rv) diseñados en nuestro laboratorio, los cuales cuentan en su extremo 5' parte del promotor del fago T7, para llevar a cabo posteriormente la transcripción *in vitro*. Dichos *primers* Fw y Rv presentan una longitud de 20 pares de bases y Tm de 60 °C y 59.2 °C, respectivamente.

SimaFw	TAGAGACCCCGCTTGGATCA
SimaFwT7	<u>CGACTCACTATAGGGT</u> TAGAGACCCCGCTTGGATCA
SimaRv	TCAGCAGTTCTGGGACCAA
SimaRvT7	<u>CGACTCACTATAGGGT</u> TCAGCAGTTCTGGGACCAA

Utilizando como molde ADNc, se llevó a cabo la amplificación de *Rp-sima* con la siguiente mezcla de reacción: Buffer de reacción 10x, MgCl₂ 25 mM,

dNTPs 10 μ M (INBIO), *primer* Fw 10 μ M, *primer* Rv 10 μ M, Taq ADN polimerasa 5 U (Highway, INBIO), 20-30 ng molde y agua ultrapura estéril hasta completar un volumen de 25 μ l. El programa de amplificación utilizado fue:

30seg 95°C → 35 x [30seg 95°C → 30seg 58°C → 30seg 74°C] → 5min 74°C

Posteriormente, se procedió a realizar la reamplificación de los fragmentos obtenidos con un *primer* que consiste en la secuencia completa del promotor del fago T7 (5'-ATAGAATTCTCTAGAAGCTTAATACGACTCACTATAGGG-3'), para de esta forma incorporar al amplicón la secuencia completa del promotor del fago T7. En este caso se utilizó el mismo programa de amplificación descrito anteriormente.

Se evaluó la integridad de los amplicómeros generados por electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TBE (1X) a voltaje constante de 90 V, utilizando bromuro de etidio como agente intercalante para la visualización en el transiluminador con cámara integrada (InGenius, Syngene). Las imágenes se digitalizaron por medio del software GeneSys V1.4.6.0 (Syngene). La cuantificación de los fragmentos obtenidos se realizó tanto por comparación con el marcador de peso molecular (qLadder 100 pb, Productos Bio-Lógicos), a través del software ImageJ 1.48v, así como por fluorometría utilizando Qubit 2.0 (Thermo Scientific).

Transcripción *in vitro*

A partir de los amplicones acoplados a la secuencia del promotor T7, se sintetizó ARN doble cadena (ARNdc) mediante transcripción *in vitro*, utilizando la ARN polimerasa del fago T7 en presencia de ribonucleótidos. Para esto se empleó la T7 *RNA polymerase* (Thermo Scientific). La mezcla de reacción fue: Buffer de transcripción 5X, rNTP 2,5 μ M (Invitrogen), inhibidor de ARNasas 50 U (RiboLock, Thermo Scientific), molde de ADN 1 μ g, T7 ARN polimerasa 1 U y agua ultrapura estéril hasta completar un volumen de 50 μ l. La reacción se incubó durante 4 horas a 37°C. Una vez finalizada la incubación se procedió con la purificación para eliminar restos de proteínas y nucleótidos libres. En primer lugar se llevó a cabo una purificación con solventes orgánicos

(Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico en proporción 25:24:1 respectivamente) y luego una precipitación alcohólica del ARNdc, la cual consiste en la adición de 0,5 volúmenes de Acetato de amonio 7,5 M y 2,5 volúmenes de Alcohol absoluto 100% e incubación *overnight* a -20 °C. El precipitado obtenido se resuspendió en 11 µl de agua ultrapura estéril. 1 µl del producto de transcripción se utilizó para comprobar su integridad en gel de agarosa 1% en buffer TBE (1X) y para su cuantificación por medio de Qubit (Thermo Scientific).

ARN de interferencia en ninfas y hembras adultas

La técnica de interferencia por ARN (ARNi) es un método rápido y simple para inhibir la función de genes específicos, descrita por primera vez en *C. elegans* (Fire *et al.*, 1998). Esta, consiste en la incorporación, mediante inyección, electroporación, ingestión o expresión *in vivo*, de ARN doble cadena (ARNdc) de un gen en un determinado organismo. Los ARNdc o antisentido activan un proceso que conduce al silenciamiento del gen en el organismo interferido. El proceso de silenciamiento se inicia cuando largas cadenas de ARNdc son procesadas por la enzima *Dicer*, generando fragmentos de ARNdc de entre 19 y 21 nucleótidos, conocidos como ARN pequeños interferentes (ARNpi) (Elbashir *et al.*, 2001). Los ARNpi se asocian luego con el complejo proteico RISC, donde se separan sus hebras (Hammond *et al.*, 2000), así la hebra *sense* del ARNpi (aquella cuya secuencia es igual a la del ARN codificante) es degradada por nucleasas, mientras que la hebra *antisense*, unida a RISC, se aparea con el ARN blanco mediante la complementariedad de bases. De esta forma, el ARN codificante es degradado por las nucleasas residentes en el complejo RISC, suprimiendo o disminuyendo la expresión del gen (Martinez & Tuschl, 2004).

El ARNi es una de las técnicas de genética reversa más utilizada en el campo de la genética y biología molecular de insectos para el estudio de la función, regulación y expresión génica (Tomoyasu & Denell, 2004). Esta técnica ha permitido estudiar la función de los genes que intervienen en el desarrollo en diversos sistemas experimentales, particularmente en organismos “no modelo”, donde los métodos de análisis funcional son muy limitados. Con el uso de éstas

técnicas, se han logrado identificar en una amplia variedad de insectos, genes ortólogos que conforman la red génica de la segmentación en *Drosophila*, como por ejemplo en *Apis mellifera*, *Nasonia vitripennis*, *Tribolium castaneum*, *Grillus bimaculatus*, *Locusta migratoria*, *Oncopeltus fasciatus* y *Rhodnius prolixus*, entre otros (Bucher *et al.*, 2002; He *et al.*, 2006; Hughes & Kaufman, 2000; Lavore *et al.*, 2012; 2014; Lynch & Desplan, 2010; Mito *et al.*, 2005; Wilson & Dearden, 2011).

En este trabajo, el análisis fenotípico de falta de función para *sima* se realizó a dos diferentes niveles: por un lado se inyectó *sima*^{ARNdc} en ninfas de estadio V con el fin de observar de qué forma ocurre la remodelación del sistema traqueal en individuos adultos y, por otro lado, hembras adultas vírgenes fueron interferidas para analizar la traqueogénesis durante el desarrollo temprano. Todas las inyecciones se realizaron intracavitariamente, entre el segundo y tercer segmento abdominal, utilizando una jeringa Hamilton de 5 µl. El volumen introducido de ARNdc en las ninfas varió entre 0,3 y 1 µl, y en las hembras adultas fue de 2 µl. Luego de la inyección, se dejó que los ejemplares se recuperaran del estrés durante 48 horas. Posteriormente se los alimentó para estimular el proceso de muda en el caso de las ninfas V y para inducir ovogénesis y puesta de huevos en las hembras adultas. Las hembras interferidas fueron colocadas junto con machos *wt* para estimular la cópula, manteniendo las condiciones de cría *ex situ* previamente señaladas.

A diferencia de la mayoría de insectos, la red traqueal en *R. prolixus* no es eliminada completamente durante la muda de un estadio larval al siguiente, sino que nuevas ramas surgen a partir de las preexistentes. Es por ello que en este trabajo el análisis fenotípico de los insectos interferidos consistió en la observación de los adultos post-ecdisis y la visualización del patrón de ramificación traqueal de la epidermis del cuarto segmento abdominal, bajo lupa estereoscópica (Leica MZFLIII) y microscopio óptico (Primo Star- Zeiss). Se focalizó en estas ramas traqueales, debido a que este segmento presenta un patrón traqueal altamente conservado en todos los individuos y se puede contar fácilmente el número de ramificaciones traqueales presentes en los insectos interferidos en comparación con los insectos *wt* (Wigglesworth, 1954). Cabe resaltar que los adultos de *R. prolixus* presentan una cutícula dorsal semi-

traslúcida que permite visualizar la disposición de las tráqueas epidérmicas en el interior del abdomen *in vivo*.

Actualmente se cuenta con un protocolo de ARN de interferencia parental (ARNi) en *R. prolixus* que permite evidenciar la pérdida de función genética en la progenie de estos insectos (Lavore *et al.*, 2012). Para la obtención de embriones con fenotipos de falta de función para el gen *Rp-sima* se llevó a cabo dicho protocolo. Las hembras vírgenes de *R. prolixus* utilizadas fueron obtenidas a partir de la revisión y separación periódica de los insectos en estadio ninfal V que hayan mudado a adulto recientemente. De esta manera, se pudo asegurar la ausencia de fecundaciones previas (Schofield, 1979).

Manipulación de embriones interferidos. Análisis fenotípico

El análisis exhaustivo de la embriogénesis en la descendencia de las hembras interferidas implicó la revisión diaria de los recipientes que las contenían, con el fin de separar los huevos en función de la fecha de puesta. Una vez separados, se observó si lograban completar su desarrollo embrionario; en los casos donde se observó detención del mismo se decidió proceder a la apertura manual de los huevos bajo lupa binocular estereoscópica Leica MZFLIII. Fueron decorionados y devitelinizados mediante el uso de pinzas de disección N° 4 y 5 (Dumont). Las disecciones se realizaron en solución de paraformaldehído 4% en PBS (PFA 4%), el cual, como agente fijador, impide que las características de los embriones se modifiquen. Luego se procedió a la deshidratación seriada en metanol a concentraciones crecientes para su conservación a largo plazo. Parte de estos embriones se tiñeron con el colorante fluorescente Hoechst (1:1000) el cual, debido a su capacidad de unión al ADN, nos permitió distinguir y diferenciar las células embrionarias del vitelo en los huevos interferidos y así datar morfológicamente cada estadio del desarrollo. Para ello, se los rehidrató con sucesivos lavados de metanol a concentraciones decrecientes hasta obtenerlos finalmente en buffer PBT, con el cual se hicieron 4 lavados en agitación a temperatura ambiente. Luego se los incubó con Hoechst por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, luego de hacer 2 lavados con PBT, fue

posible realizar el análisis y la captura de imágenes por medio del ZEN2 (Zeiss), empleando el microscopio confocal Zeiss lsm 710.

Para facilitar la interpretación de los resultados, los fenotipos observados se agruparon en clases de acuerdo con características comunes.

RESULTADOS

Análisis genómico-filogenético de proteínas bHLH-PAS

Las proteínas con dominios bHLH-PAS comprenden un conjunto de aproximadamente 14 proteínas diferentes. En esta tesis se pudo identificar en *Rhodnius prolixus* a cuatro nuevos miembros de esta familia: *Single-minded*, *Similar*, *Spineless* y *Tango* (Tabla 1); mientras que el gen *tracheless* ya había sido previamente identificado en estudios anteriores (Lavore *et al.*, 2015).

Tabla 1. Miembros de la familia bHLH-PAS identificados en *R. prolixus*, con sus respectivos ID. Se detallan las métricas obtenidas luego de las búsquedas por similitud de secuencia de sus ortólogos en *D. melanogaster* en la base de datos de *R. prolixus* en VectorBase.

Genes identificados	Gen ID	% ID	Longitud hit	E-value
<i>single-minded</i>	RPRC001595	77.7	444	1,00E-170
<i>tracheless</i>	RPRC000129	85.4	144	6,00E-177
	RPRC008906	76	513	4,00E-142
<i>similar</i>	RPRC001157	73.3	45	6,00E-100
<i>spineless</i>	RPRC004232	79.8	816	6,00E-155
<i>tango</i>	RPRC004351	61.6	414	0,0

En la siguiente sección se describen sus secuencias a nivel genómico, así como también su comparación con secuencias ortólogas de otras especies mediante un análisis filogenético.

Single-minded

A través de la búsqueda por similitud de secuencia se pudo inferir la identidad del transcripto RPRC001595-RA en *R. prolixus*, el cual corresponde al gen *sim* (*Rp-sim*). Este gen se encuentra localizado entre las bases 602.075 y 621.233 de la hebra *reverse* del *scaffold* KQ034112. El transcripto para *Rp-sim* tiene una longitud de 1.509 pb, estando estructurado en nueve exones y codifica para una proteína de 503 aminoácidos (Figura 3).

A través del alineamiento múltiple entre las secuencias proteicas de *Sim* de *R. prolixus* con secuencias ortólogas de otras especies se identificaron las regiones correspondientes a sus dominios funcionales, bHLH, PAS-A y B, los cuales se encuentran conservados en *Rp-sim* (Figura 4 A).

El árbol obtenido mediante inferencia Bayesiana mostró tres grandes grupos filogenéticos (Figura 4 B). Por un lado, se encuentra el grupo de insectos dípteros, el cual está bien soportado. Por otro se agrupan los vertebrados junto con *Tribolium castaneum* y *Pediculus humanus*; mientras que en un tercer grupo encontramos a *R. prolixus*, *Ctenocephalides felis*, *Temnothorax curvispinosus* y *Apis cerana* formando un grupo monofilético que incluye especies de insectos no dípteros.



Figura 3. Representación gráfica del gen *Rp-sim*. **(A)** Esquema del gen. Los bloques azules representan exones y las líneas que los unen intrones. Se aclara además la longitud de cada uno en pares de bases (pb). **(B)** Secuencia completa del transcrito. **(C)** Secuencia proteica codificada por el gen.

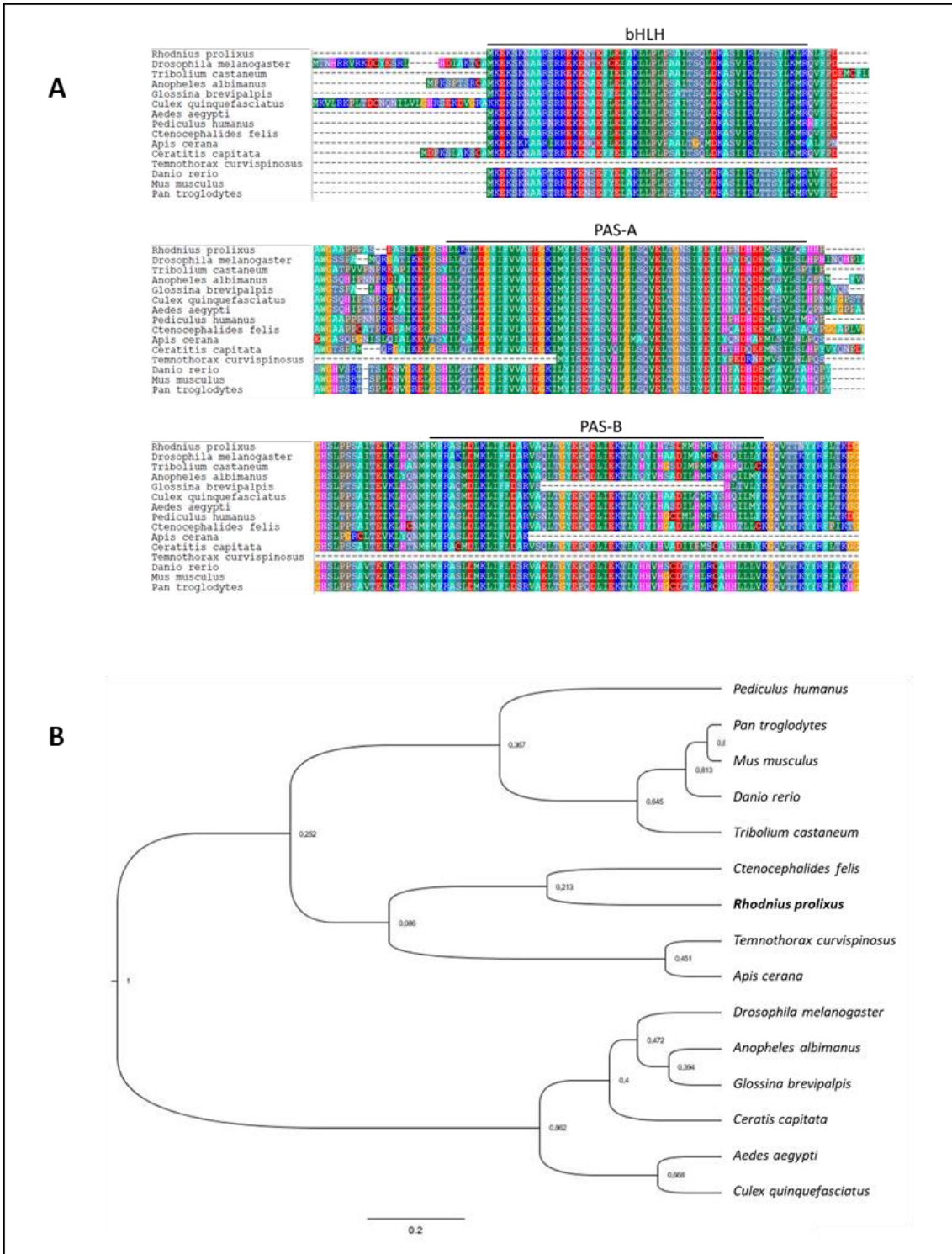


Figura 4. (A) Alineamiento múltiple de la secuencia proteica de *Rp-sim* con secuencias ortólogas de otras especies. Se indican los dominios conservados bHLH (posición 1-53 aa), PAS-A (posición 82-140 aa) y PAS-B (posición 233-288 aa). **(B)** Análisis filogenético de *single-minded* en función del alineamiento de secuencias proteicas de *Rp-sim* y secuencias ortólogas de otras especies. El árbol fue generado por medio de inferencia Bayesiana; los valores de los nodos representan los valores de probabilidad posterior de cada clado.

Similar

Mediante la búsqueda por similitud de secuencia para el gen *similar* se pudo inferir la identidad del transcripto RPRC001157-RA, el cual contiene cuatro exones correspondientes a *sima* en *R. prolixus* (*Rp-sima*) situados desde las bases 316.762 a 320.023 de la hebra *reverse* dentro del *scaffold* KQ034324. Como este transcripto sólo contiene una parte de la secuencia total del gen de interés, se llevó a cabo la anotación manual del mismo. Así, se logró localizar la porción faltante del *Rp-sima*, entre 364.837 y 367.544 pb, encontrándose separada del transcripto RPRC001157-RA por una gran región de baja calidad de secuenciación. De esta forma la reconstrucción del transcripto completo para *Rp-sima* consta de ocho exones y una longitud de 1575 pb, se encuentra codificado por un gen situado desde las bases 316.762 a 367.544 dentro del mismo *scaffold* previamente mencionado, codificando para una proteína de 525 aminoácidos (Figura 5).

En el alineamiento múltiple de la secuencia proteica de *Rp-Sima* junto con secuencias ortólogas de otras especies, se pudo observar que las secuencias de los dominios bHLH, PAS-A y B en *Rp-sima* se encuentran conservadas pero difieren levemente con respecto a otras especies (Figura 6 A).

El análisis filogenético mostró que la secuencia de *Rp-sima* se asocia con especies de insectos no-dípteros y crustáceos. Dentro de otro grupo encontramos a insectos dípteros, mientras que los vertebrados se agrupan dentro de un tercer clado. De esta forma podemos ver claramente que las secuencias de insectos forman un grupo monofilético, del mismo modo que las secuencias de vertebrados, con altos valores de probabilidad posterior (Figura 6 B).

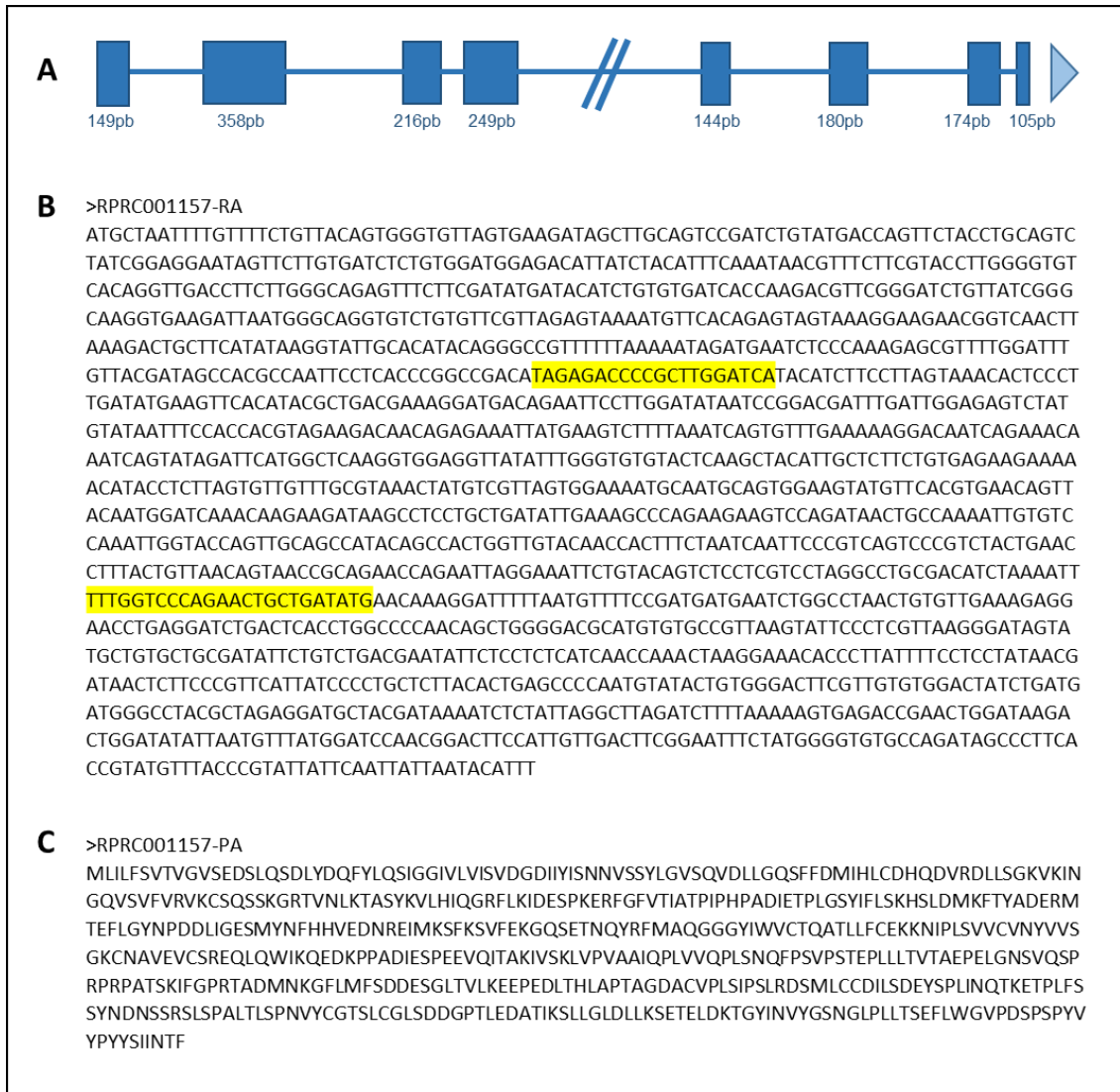


Figura 5. Representación gráfica del gen *Rp-sima*. **(A)** Esquema del gen. Los bloques azules representan exones y las líneas que los unen intrones. Se aclara además la longitud de cada uno en pares de bases (pb). **(B)** Secuencia completa del transcrito. En amarillo se resaltan las secuencias correspondientes a los primers. **(C)** Secuencia proteica codificada por el gen.

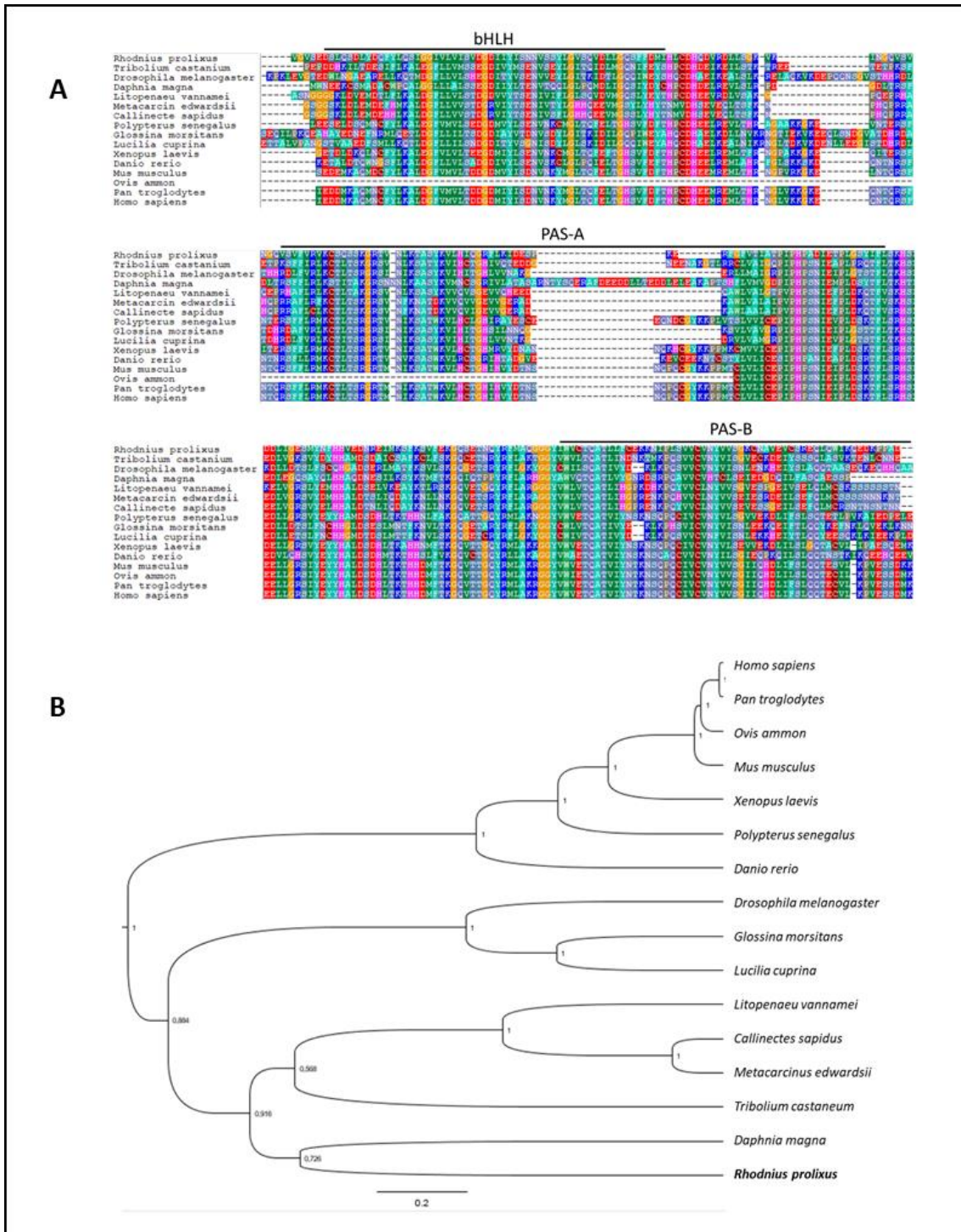


Figura 6. (A) Alineamiento de la secuencia proteica de *Rp-sima* con secuencias ortólogas de otras especies. Se indican los dominios conservados bHLH (posición 11-65 aa), PAS-A (posición 91-160 aa) y PAS-B (posición 233-294 aa). **(B)** Análisis filogenético de *similar* en función del alineamiento de secuencias proteicas de *Rp-sima* y secuencias ortólogas de otras especies. El árbol fue generado por medio de inferencia Bayesiana; los valores de los nodos representan los valores de probabilidad posterior de cada clado.

Spineless

En el genoma de *R. prolixus* se infirió la identidad del transcripto RPRC004232-RA con alta similitud de secuencia para el gen *spineless*. Este transcripto se localiza entre las bases 1.012.829 a 1.025.142 de la hebra *forward* dentro del *scaffold* KQ034122 del genoma de *R. prolixus*. El transcripto RPRC004232-RA depositado en la base de datos VectorBase consta de siete exones correspondientes a la región 3' del gen, y por anotación manual se procedió a eliminar un exón e incorporar otros cuatro exones en su extremo 5' encontrados dentro del mismo *scaffold* en las posiciones 722.040-722.096, 858.014-858.204, 930.217-930.312 y 960.617-960.709 respectivamente. Por lo tanto, el transcripto completo para *Rp-ss* quedó conformado por diez exones, con una longitud total de 2.246 pb y codificando para una proteína que contiene 747 aminoácidos en su secuencia (Figura 7).

Para el alineamiento múltiple se buscaron secuencias proteicas de *Spineless* en invertebrados, así como de secuencias ortólogas de *Ahr* en vertebrados. Se identificaron los dominios bHLH, PAS-A y B, los cuales son altamente conservados para *Rp-ss* (Figura 8 A).

El análisis filogenético divide dos grandes grupos, uno de ellos conformado por vertebrados y otro por insectos. Este último a su vez se encuentra subdividido en especies de insectos dípteros e insectos no-dípteros donde se localiza *R. prolixus* junto con *Tribolium castaneum*, *Apis mellifera* y *Pediculus humanus*. Por lo tanto, podemos concluir que el árbol generado se encuentra bien conformado y con altos valores de probabilidad posterior que le dan soporte a la inferencia obtenida (Figura 8 B).



Figura 7. Representación gráfica del gen *Rp-ss*. **(A)** Esquema del gen. Los bloques azules representan exones y las líneas que los unen intrones. Se aclara además la longitud de cada uno en pares de bases (pb). **(B)** Secuencia completa del transcrito. **(C)** Secuencia proteica codificada por el gen.

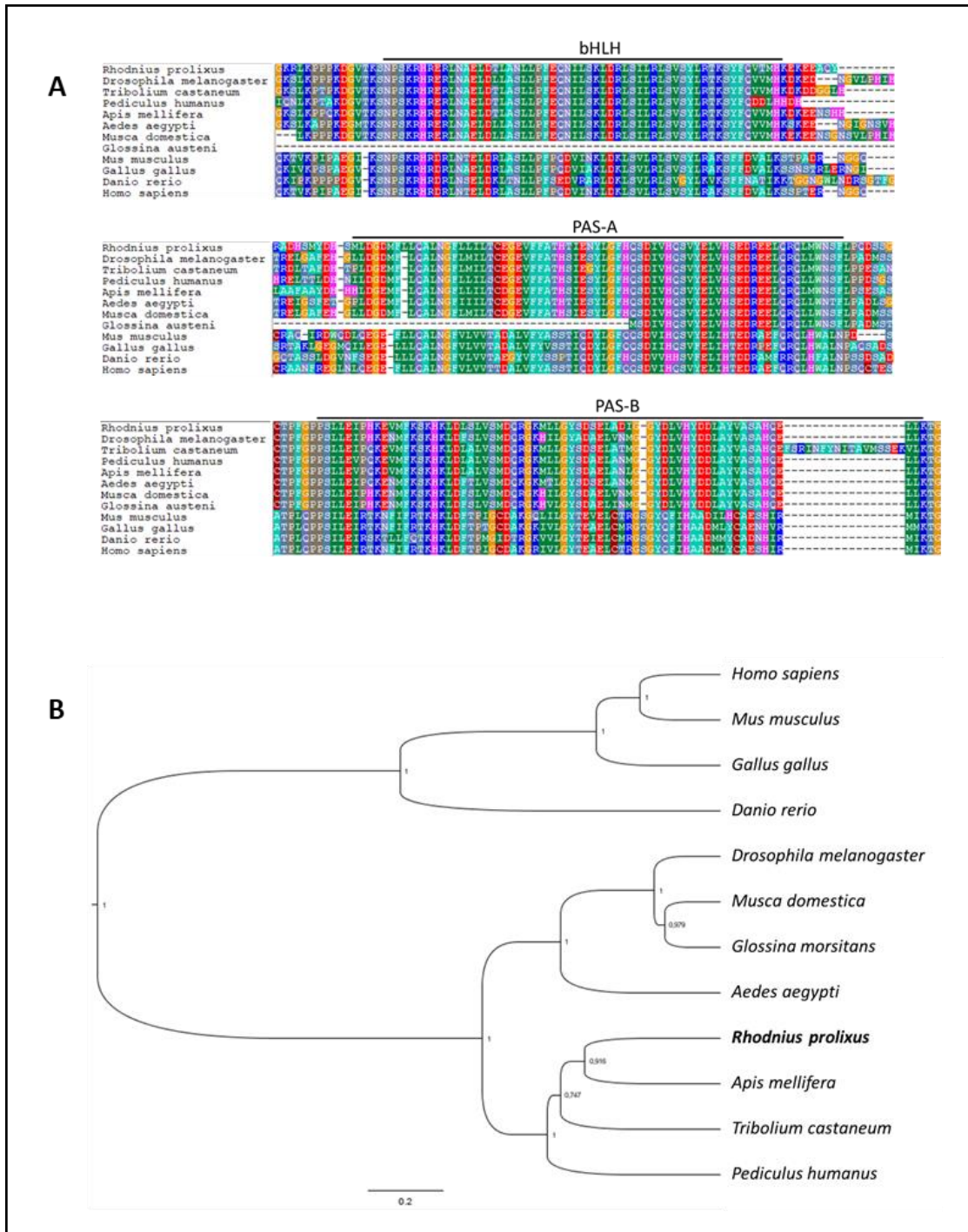


Figura 8. (A) Alineamiento de la secuencia proteica de *Rp-ss* con secuencias ortólogas de otras especies. Se indican los dominios conservados bHLH (posición 32-86 aa), PAS-A (posición 108-175 aa) y PAS-B (posición 251-317 aa). **(B)** Análisis filogenético de *spineless* en función del alineamiento de secuencias proteicas de *Rp-ss* y secuencias ortólogas de otras especies. El árbol fue generado por medio de inferencia Bayesiana; los valores de los nodos corresponden a los valores de probabilidad posterior para cada clado.

Tango

Mediante la búsqueda por similitud de secuencia se infirió la identidad del transcripto RPRC004351-RA correspondiente a *Rp-tgo*. Este gen está situado desde las bases 130.409 a 148.143 de la hebra *forward* dentro del *scaffold* KQ034546. Mediante anotación manual solamente fue necesario agregar una secuencia corta de 13 pb en el extremo 5' del transcripto RPRC004351-RA, para incorporar una secuencia altamente conservada en insectos. El transcripto *Rp-tgo* tiene una longitud de 1.782 pb, distribuidos en 13 exones y su secuencia proteica correspondiente posee 594 aminoácidos (Figura 9).

En el alineamiento múltiple de las secuencias proteicas de *Tgo* y de su ortólogo *Arnt* en vertebrados, se pudo observar que *Rp-tgo* presenta sus dominios funcionales, bHLH, PAS-A y B, altamente conservados (Figura 10 A).

El árbol filogenético generado mostró dos grandes grupos. Por un lado, se asociaron las especies de vertebrados y por otro las especies de insectos. Dentro de este último grupo se encontró *R. prolixus*, localizándose más basal dentro del clado, del mismo modo que una especie de ácaro (*Sarcoptes scabiei*). Los valores de probabilidad posterior son muy elevados, reconstruyendo correctamente la evolución natural del grupo de especies analizadas (Figura 10 B).

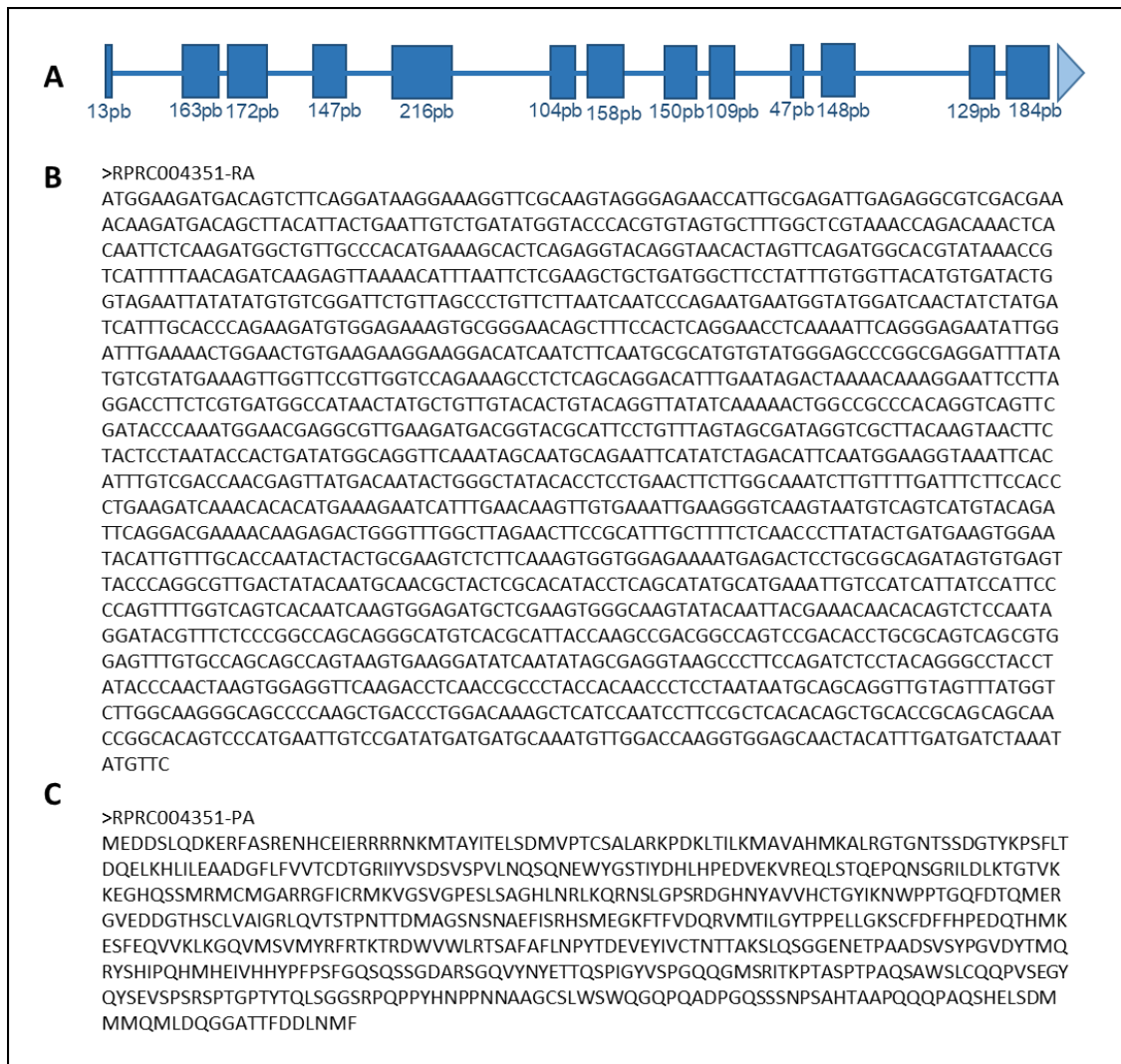


Figura 9. Representación gráfica del gen *Rp-tgo*. **(A)** Esquema del gen. Los bloques azules representan exones y las líneas que los unen intrones. Se aclara además la longitud de cada uno en pares de bases (pb). **(B)** Secuencia completa del transcrito. **(C)** Secuencia proteica codificada por el gen.

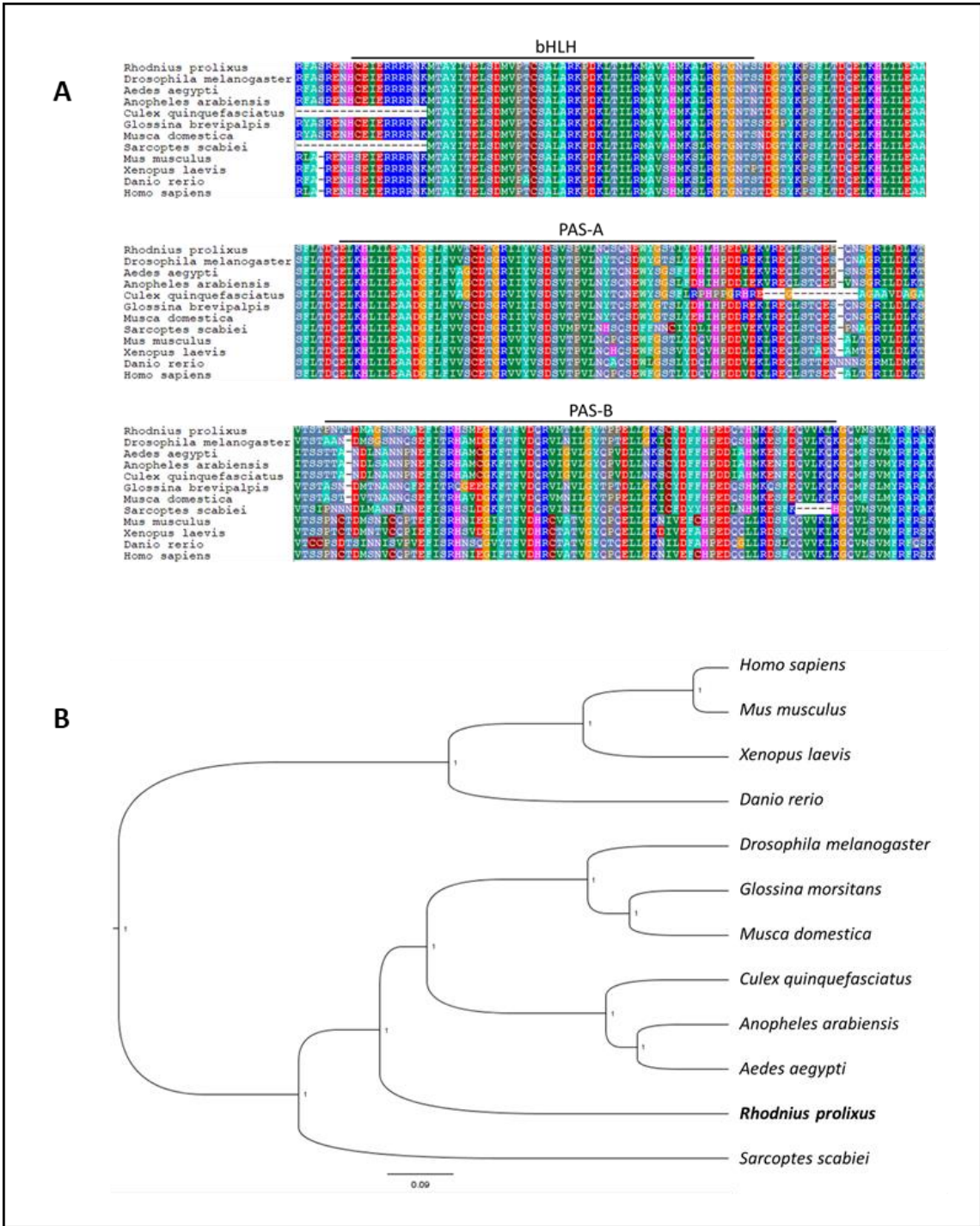


Figura 10. (A) Alineamiento múltiple de la secuencia proteica de *Rp-tgo* con secuencias ortólogas de otras especies. Se indican los dominios conservados bHLH (posición 19-72 aa), PAS-A (posición 87-154 aa) y PAS-B (posición 272-339 aa). **(B)** Análisis filogenético de *tango* en función del alineamiento de secuencias proteicas de *Rp-tgo* y secuencias ortólogas de otras especies. El árbol fue generado por medio de inferencia Bayesiana; los valores de los nodos corresponden a los valores de probabilidad posterior de cada clado.

ARNi de *Rp-sima* en ninfas V

Para determinar la influencia de *sima* en el crecimiento del sistema traqueal en insectos de estadio adulto, se llevó a cabo la inyección de ARNdc específico para *sima* (*sima*^{ARNdc}) en 15 ninfas V, en concentración entre 0.3 a 1.0 µg. De estas ninfas, cinco (33.33%) murieron luego de la inyección, las cuales no pudieron recuperarse del estrés. Ocho de las ninfas interferidas (53.33%) no lograron nunca mudar a adulto y al cabo de 15 - 20 días murieron, rechazando muchas de ellas la oferta de alimento, a pesar de ser expuestas varias veces a su fuente. Únicamente dos ninfas inyectadas (13.33%) pudieron mudar a adulto, y fueron usadas para describir los fenotipos resultantes de esta interferencia.

Tabla 2. Interferencia *sima*^{ARNdc} en ninfas V. Esta tabla indica la cantidad (µg) de *sima*^{ARNdc} inyectado en cada ejemplar, el número y porcentaje total de ninfas interferidas que murieron post-inyección, las que no lograron mudar a un estadio adulto y las que sí lograron alcanzar el estado de adulto.

<i>sima</i> ^{ARNdc}	Ninfas inyectadas (n°)	Murieron	No mudaron	Mudaron a adulto
0.4 µg	3	1	1	1
0.6 µg	1	-	-	1
1.0 µg	11	4	7	-
TOTAL	15	5 (33.33%)	8 (53.33%)	2 (13.33%)

El sistema traqueal abdominal en un ejemplar *wt* de *R. prolixus* está conformado por dos troncos principales laterales que se extienden a lo largo del abdomen y desprenden ramificaciones hacia la cutícula dorsal y ventral, así como también a los órganos internos. La disposición de las tráqueas en la cutícula dorsal y ventral está altamente caracterizada. En la epicutícula ventral de cada segmento corporal, una ramificación traqueal surge desde la tráquea lateral y recorre la epidermis del segmento para unirse con su contralateral en la línea media del cuerpo (Wigglesworth, 1954). Algo similar ocurre en la epidermis dorsal, pero en este caso la rama traqueal derecha e izquierda se mantienen independientes, siendo su límite la línea media dorsal. La mayoría de las observaciones y experimentos se han realizado en las tráqueas sub-epidérmicas dorsales del cuarto segmento del abdomen. Allí la tráquea principal se divide repetidamente hasta reducir su calibre a 5 µ (Figura 11 A). La tráquea terminal

suele medir 1.5 - 2 μ de diámetro, luego se divide abruptamente en dos o tres traqueolas con un diámetro de 0.7 - 0.8 μ (Wigglesworth, 1954).

En los ejemplares adultos provenientes de ninfas interferidas se evaluó el patrón de ramificación de las tráqueas sub-epidérmicas dorsales del cuarto segmento abdominal, comparado con insectos salvajes. En el ejemplar inyectado con 0,6 μ g de *sima*^{ARNdc} se observaron 27 ramificaciones terminales emergentes de las tráqueas mayores en comparación con el adulto *wild-type*, el cual poseía 40 ramificaciones terminales (Figura 11). En el segundo adulto interferido analizado no se observaron diferencias apreciables en sus ramificaciones traqueales con respecto a las mismas en un adulto *wt* (imágenes no mostradas).

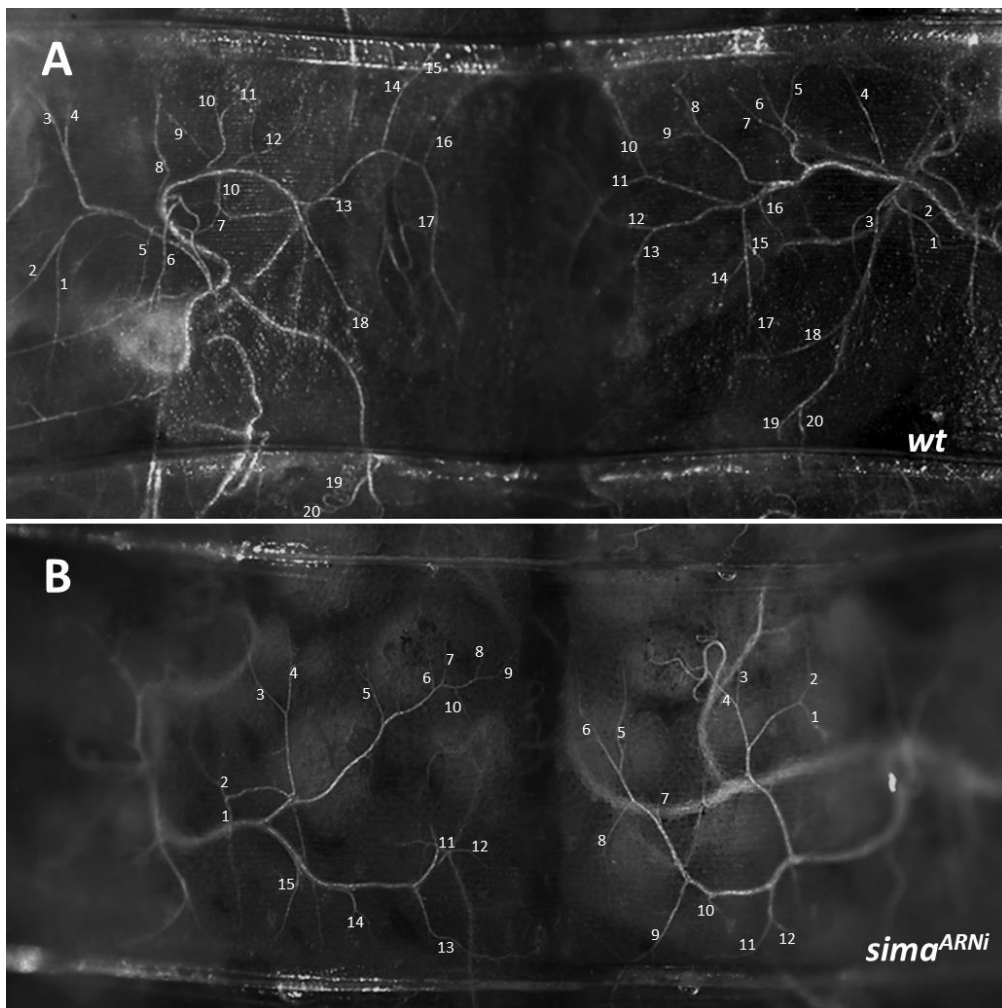


Figura 11. Patrón de ramificaciones traqueales de la epidermis del cuarto segmento abdominal en adulto *wt* (A) y en adulto interferido con *sima*^{ARNi} (B).

Interferencia parental del gen *similar* en *Rhodnius prolixus*

Con el objetivo de determinar el rol de *sima* durante el desarrollo temprano de *R. prolixus*, se llevó a cabo ARNi parental sobre 5 hembras, inyectadas con una cantidad de 2 µg de *sima*^{ARNdc}. De esta manera, se consiguió silenciar la expresión de *Rp-sima* y evaluar la función del gen durante el desarrollo embrionario.

En la mayoría de los embriones obtenidos de la interferencia realizada se observó un desarrollo embrionario anormal, mostrando severos defectos en el patrón corporal y altas tasas de letalidad embrionaria. Los fenotipos observados se pudieron agrupar en 3 clases fenotípicas en función del grado de penetrancia de la técnica, ordenados desde fenotipos severos a leves (Tabla 3).

Tabla 3. Interferencia parental de *sima*^{ARNi}. Esta tabla indica el número y porcentaje de huevos con fenotipos severos, medianos y leves.

Puesta	N° de huevos	Fenotipos severos	Fenotipos medianos	Fenotipos leves	WT	Deshidratados
1	13	5	3		3	2
2	13	11	-	-	-	2
3	22	16	2	2	2	-
4	22	21	-	-	1	-
5	88	68	3	2	12	3
6	6	5	1	-	-	-
7	3	3	-	-	-	-
8	5	5	-	-	-	-
9	7	7	-	-	-	-
10	16	15	-	-	-	1
11	13	13	-	-	-	-
12	10	10	-	-	-	-
13	3	1	1	1	-	-
14	33	28	2	1	-	2
TOTAL	254	208 (81.9%)	12 (4.72%)	6 (2.36%)	18 (7.09%)	10 (3.94%)

De los 254 huevos interferidos, el 81.9% se clasificaron como fenotipo severo siendo embriones letales que detuvieron su desarrollo tempranamente. En ellos se pudo observar numerosos defectos de desarrollo que serán explicados a continuación. Por un lado, bajo la observación por lupa y microscopio óptico fue posible distinguir huevos en los que tanto el vitelo como el embrión se concentraban hacia el extremo anterior (Figura 12, E y F) o posterior del mismo (Figura 12, C y D). Muchos de los embriones que se agruparon dentro de ésta clase fenotípica, se caracterizaron por ser masas celulares, en las cuales no fue posible distinguir ninguna estructura embrionaria característica (Figura 12, E y F). Sin embargo, en una gran fracción de huevos clasificados como fenotipo severo, exactamente en 128 (el 50,4% del total de huevos interferidos), no fue posible visualizar ninguna estructura ni tejido embrionario. Estos poseían un color rosado homogéneo, al igual que los huevos de 0-24 horas post oviposición (hpo) en embriones salvajes. Para examinarlos con mayor detalle y determinar la presencia de embriones en estos huevos, se procedió a su fijación y posterior tinción con el colorante Hoechst para su observación bajo microscopio de fluorescencia. En estos, se pudo observar que el desarrollo se vio detenido en estadio de blastodermo. El blastodermo de estos embriones no mostró un patrón celular normal, presentando una distribución heterogénea de las células embrionarias en toda la superficie del huevo en comparación con el patrón conocido para los embriones *wt* (Figura 13, E y F). En otros casos las células embrionarias migraron de forma anormal y desorganizada, tanto hacia el extremo anterior (Figura 13, C y D) como hacia el extremo posterior (Figura 13, K y L). De esta forma, fue habitual observar masas celulares indiferenciables y no coincidentes con la distribución normal del embrión dentro del huevo (Figura 13, F-L). Así, probablemente en estos fenotipos severos las células hayan comenzado a migrar, pudiéndose agrupar en algunos casos formando acúmulos celulares, pero fallando tempranamente durante la gastrulación, lo cual impidió el correcto desarrollo del embrión.

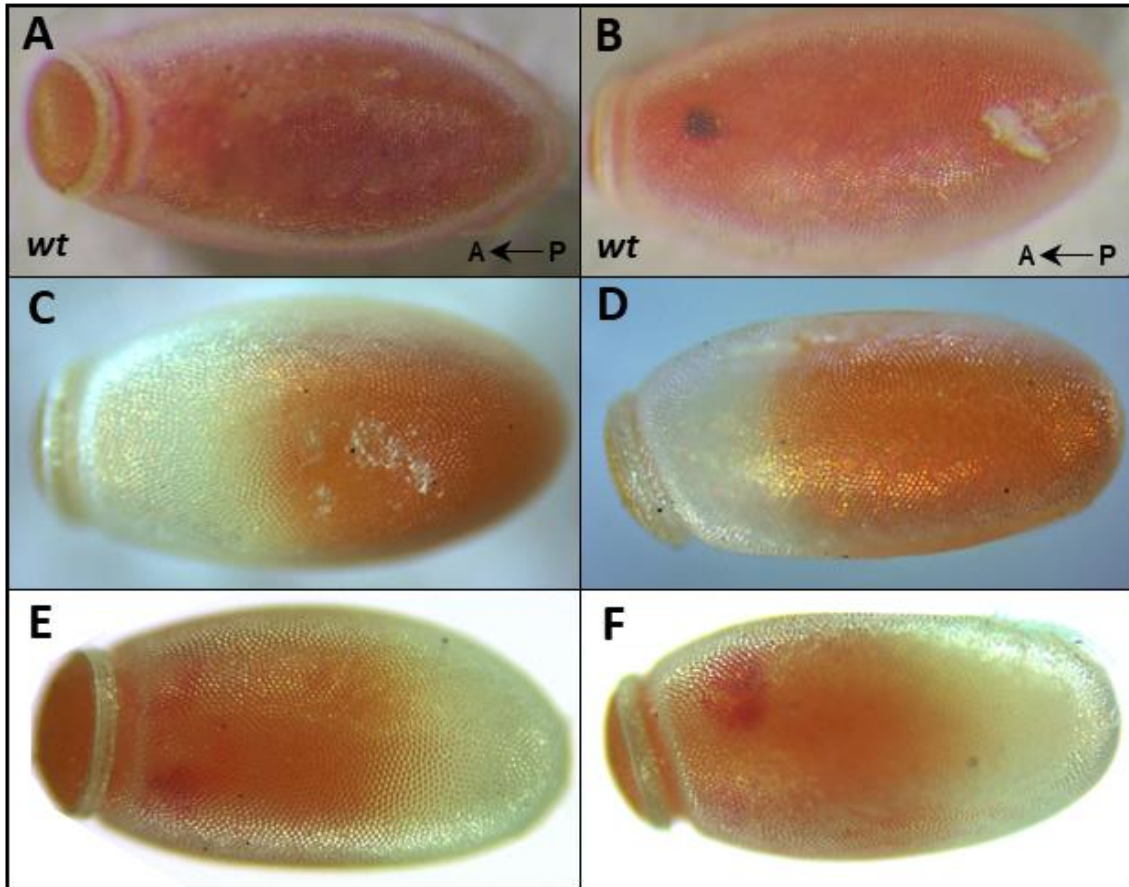


Figura 12. Fenotipos severos con embrión y vitelo concentrado hacia un extremo. Izquierda-anterior del huevo y derecha-posterior del huevo. **(A-B)** Huevos *wt* de 14 días post-oviposición en vista dorsal (A) y ventral (B) (Imágenes extraídas de Nazar, 2016). **(C-F)** Huevos interferidos para *sima^{ARNi}* de 14 días post-oviposición, en vista ventral (C), dorsal (E) y lateral (D, F). Mientras que en los huevos provenientes de parentales salvajes es posible visualizar segmentos y estructuras específicas como los ojos, en los huevos interferidos con *sima^{ARNdc}* las células embrionarias se condensan hacia el extremo posterior (C, D) o anterior (E, F). En algunos huevos además se visualizan masas celulares más pigmentadas (E, F).

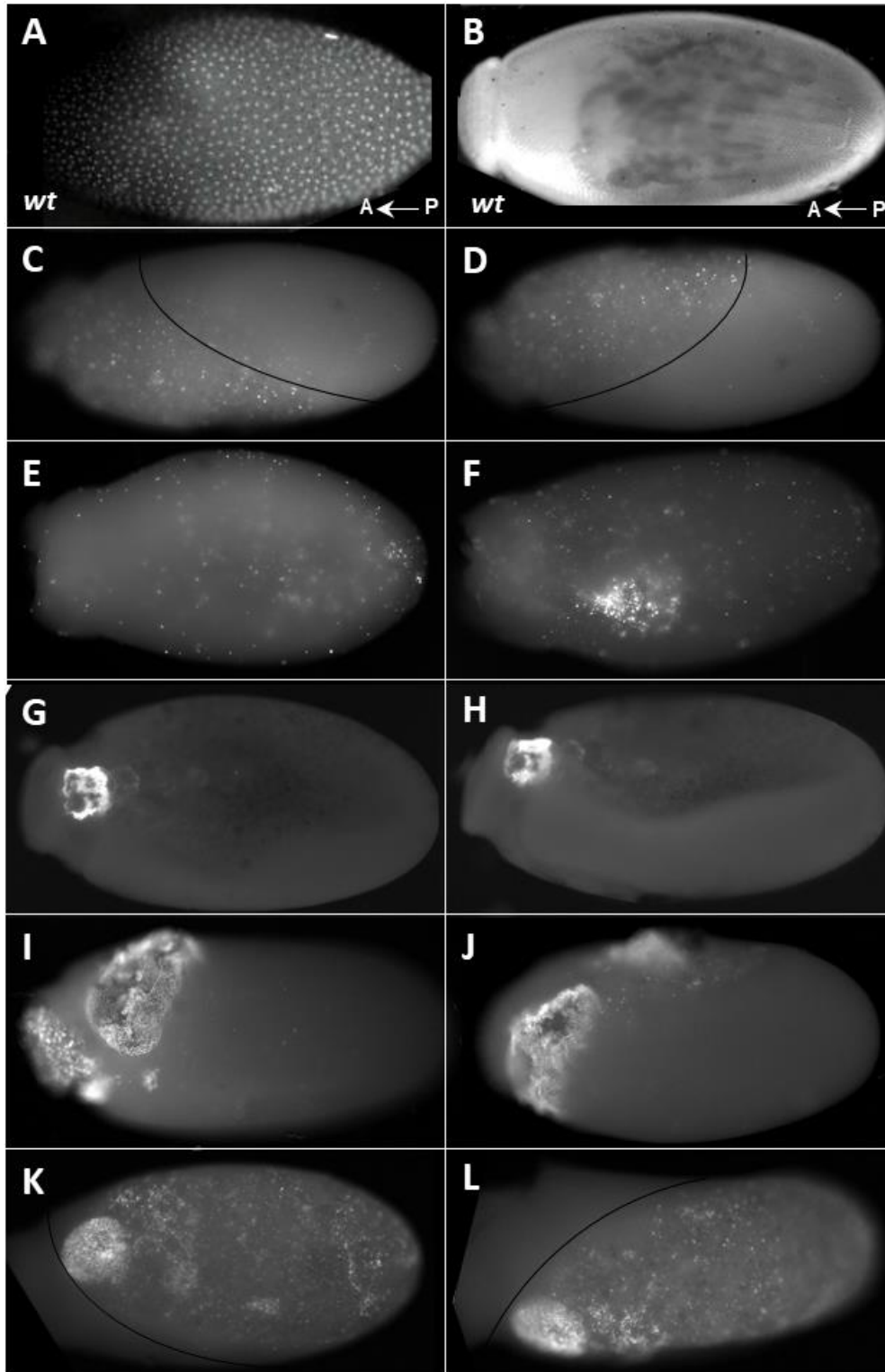


Figura 13. Fenotipos severos con distribución heterogénea de células embrionarias y formación de masas celulares. Tinción nuclear fluorescente con Hoechst. Izquierda-anterior del huevo y derecha-posterior del huevo. **(A)** Huevo *wt* de 12-24 horas post-oviposición (hpo) en estadio de blastodermo. **(B)** Embrión *wt* de 144 hpo (día 6) al final de la katatrepsis (Imágenes A y B extraídas de Esponda-Behrens, 2013). **(C-L)** Huevos *sima^{ARNi}* de 10 días post-oviposición en vista dorsal (E, G, K) y lateral (C, D, F, H, I, J, L). Mientras que en los huevos provenientes de parentales salvajes es posible visualizar el embrión, en los huevos interferidos con *sima^{ARNdc}* las células embrionarias se condensan hacia el extremo anterior (C, D) o posterior (K, L). En algunos huevos además se visualizan masas celulares hacia la región anterior del huevo (F-L).

Los embriones con fenotipo intermedio (4.72%) se caracterizaron por ser también letales embrionarios, pero con un grado de desarrollo más avanzado que los anteriores. Presentaron estructuras corporales distinguibles, como cabeza, tórax y abdomen, pero mostraron algunas fallas de desarrollo considerables. A nivel cefálico en la mayoría de ellos se pudo distinguir claramente una cabeza con sus dos ojos y antenas, al igual que el clipeo, pero, a diferencia de los embriones *wt*, en ninguno de los embriones con fenotipo intermedio se pudo observar desarrollo de labio, mandíbulas y maxilas (Figura 14, A-G). A nivel del tórax, los embriones mostraron cambios variables, en algunos casos perdieron el primer o los primeros dos segmentos y siempre desarrollaron patas (Figura 14, D-G). En los ejemplares más aberrantes, los apéndices no se formaron correctamente y solo se desarrollaron esbozos de los mismos (Figura 14, B y C). A nivel abdominal, varios embriones mostraron fallas muy importantes en su estructura, perdiendo muchos de sus segmentos y en algunos casos manteniendo sólo cinco de ellos (Figura 14, B y C). Muchos de los embriones en esta clase fenotípica no cerraron dorsalmente de forma correcta (Figura 14, D-G) y en muchos de ellos este cierre no fue dorsal, sino dorso-lateral. Otra característica llamativa en algunos de los embriones es la falta de segmentación o de delimitación segmentaria en la cara ventral de los mismos, lo cual consideramos como un error grave en el establecimiento de ejes corporales (Figura 14, D y E).

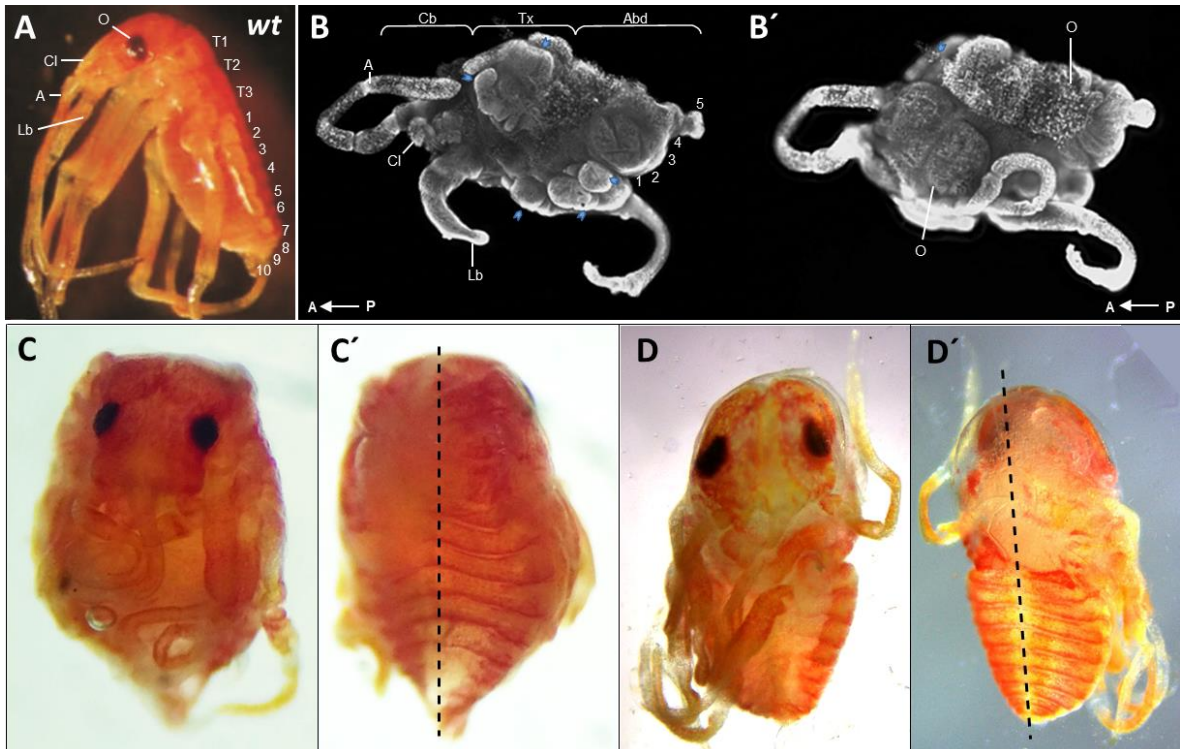


Figura 14. Fenotipos intermedios con distintos niveles de malformaciones. (A) Pre-ninfa *wt* de 10-12 días post-puesta. (B-B') Embrión interferido para *sima* con malformaciones severas en vista ventral (B) y dorsal (B'). Visualización con tinción nuclear Hoechst, bajo microscopio fluorescente. Flechas azules señalan esbozos de apéndices. (C-C') Fenotipo *sima*^{ARNi} con segmentos abdominales fusionados en vista ventral y dorsal. (D-D') Embrión interferido para *sima* sin cierre dorsal, en vista ventral y dorsal. **Cb:** cabeza. **Tx:** tórax. **Abd:** abdomen. **Lb:** labio. **A:** antena. **Cl:** cílopeo. **O:** ojo. **T1-3:** segmentos torácicos. **1-10:** segmentos abdominales.

El fenotipo leve (2.36%) se atribuyó a embriones que lograron completar su desarrollo, siendo el único fenotipo viable. El rasgo que los caracterizó fue su locomoción errática y descoordinada sobre superficies planas, dada por una mala coordinación de las patas. A su vez, algunas tenían movimientos involuntarios en sus patas, rápidos y repetidos, que también les impedían desplazarse normalmente (información no mostrada). Es entonces probable que este fenotipo se deba a fallas a nivel neuromotor en las ninfas interferidas.

DISCUSIÓN

Factores de transcripción con motivos bHLH-PAS

En esta tesis se realizó una búsqueda y análisis bioinformático de cuatro miembros de la familia bHLH-PAS en el genoma de *R. prolixus*: *Rp-single minded*, *Rp-similar*, *Rp-spineless* y *Rp-tango*.

Las proteínas bHLH-PAS comprenden una variada familia de reguladores transcripcionales con dominios proteicos muy conservados. A través del motivo bHLH estas proteínas se unen al ADN para regular la transcripción de diversos genes y mediante el dominio PAS pueden interactuar con otras proteínas, formando homodímeros o heterodímeros, que les confieren especificidad funcional (Crews, 1998; Crews & Fan, 1999; Zelzer *et al.*, 1997).

Las proteínas dentro de esta familia son capaces de mediar una gran variedad de procesos fisiológicos y del desarrollo. A pesar de participar en eventos sumamente diferentes podemos distinguir varias similitudes entre ellas. Un ejemplo de ello lo representa la proteína codificada por el gen *tango*, la cual tiene expresión constitutiva y forma heterodímeros con varios miembros de esta familia, entre ellos *sim* y *Trh* cuya expresión se localiza en una región más acotada del embrión, allí donde cumplen su función (Isaac & Andrew, 1996; Nambu *et al.*, 1991). De esta forma, las proteínas bHLH-PAS son capaces de regular transcripcionalmente numerosos genes, uniéndose a sitios de unión en regiones promotoras con secuencias similares tipo *CME*, *HRE* y *XRE* (Crews, 1998). Así, inducen la morfogénesis de tejidos pertenecientes al sistema nervioso, en el caso de *sim* y algunas proteínas *Npas* (Michaelson *et al.*, 2017; Nambu *et al.*, 1991), y del sistema traqueal o vascular, en el caso de *trh* y *sim*/HIF- α (Ghabrial *et al.*, 2003; Isaac & Andrew, 1996). A su vez, tanto las células precursoras de la línea media del SNC en *Drosophila* como las precursoras del sistema traqueal son derivadas del ectodermo embrionario. Si bien es evidente que además de las proteínas bHLH-PAS requieren factores reguladores adicionales para generar la especificidad transcripcional de cada tejido, existe una alta probabilidad de que la línea media del SNC y el sistema traqueal hayan tenido un origen evolutivo común (Crews, 1998).

Aquí, mediante búsqueda por similitud de secuencia pudimos identificar secuencias de alto nivel informativo para varios de los miembros de esta familia proteica, los cuales muestran alto grado de conservación genómico comparándolo con secuencias correspondientes a genes ortólogos en otras especies. Para algunos de estos genes identificados se tuvo que recurrir a la anotación y corrección manual de los mismos para obtener un modelo génico. *Rp-sima* fue uno de los genes que requirió una anotación manual. A pesar de que se pudo localizar un transcripto correspondiente a *Rp-sima*, no pudimos encontrar una predicción computacional, dentro de los datos disponibles en VectorBase, que contenga una corta región altamente conservada en insectos en el extremo 5' del gen. Esta pérdida de información podría haber sido ocasionada durante el proceso de secuenciación y posterior ensamblado del scaffold KQ034324 en la nueva versión de genoma de *R. prolixus* publicada en VectorBase, explicado también por la presencia de una gran región de baja complejidad entre las dos porciones del gen identificadas.

Se ha demostrado que las proteínas agrupadas dentro de la familia bHLH-PAS están altamente conservadas a nivel dominios funcionales y secuencias entre mamíferos y *D. melanogaster* (Crews, 1998). En este sentido, todas estas proteínas poseen un dominio bHLH localizado entre los primeros 200 aminoácidos de su secuencia y hacia 3' contienen 2 dominios PAS consecutivos. A partir de los alineamientos múltiples realizados en esta tesis fue posible localizar regiones significativamente conservadas entre *R. prolixus* y los ortólogos conocidos para otras especies de insectos y vertebrados, correspondientes a los dominios funcionales bHLH, PAS-A y PAS-B, señalando su importancia para la función de la proteína. Esta conservación a nivel de similitud de secuencia proteica, también se da a nivel topográfico, en donde los dominios bHLH y PAS se encuentran localizados relativamente en la misma posición en todas las especies (Figura 13). Más allá de la alta similitud de secuencia en todos los ortólogos analizados, algunas secuencias, puntualmente la de *sim* en *T. curvispinosus*, *G. brevipalpis* y *A. cerana*, la de *sima* en *O. ammon*, la secuencia de *ss* en *G. austeni* y la de *tgo* en *C. quinquefasciatus* y *S. scabiei*, no contenían algunas regiones correspondientes a los dominios estudiados, por lo que posiblemente se encuentren incompletas en la base de

datos. Esto podría haber influido en su localización en el árbol y, por lo tanto, en nuestro análisis filogenético respectivo.

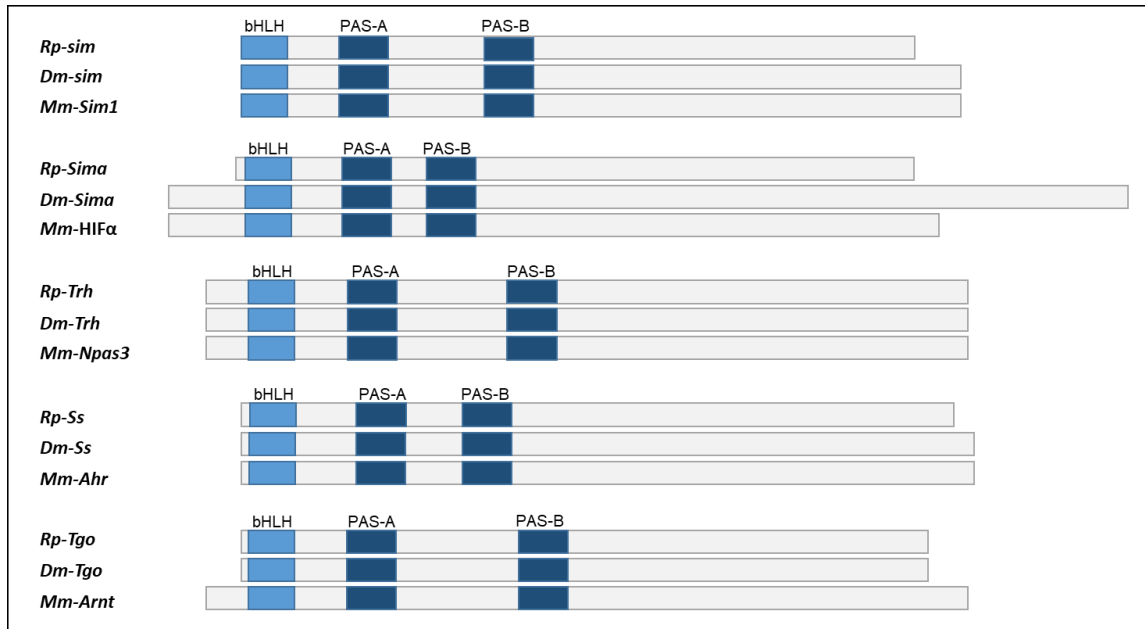


Figura 13. Estructura proteica de *Single-minded*, *Similar*, *Trachealess*, *Spineless* y *Tango* en *R. prolixus* y de sus ortólogos en *D. melanogaster* y *M. musculus*. Los bloques celestes marcan los dominios bHLH y los bloques azules los dominios PAS-A y PAS-B, en sus posiciones aproximadas.

Sima como regulador del crecimiento traqueal

Durante esta tesis se investigó el rol de *sima* en el crecimiento de las ramificaciones traqueales en ejemplares adultos de *R. prolixus*, interferidos en un estadio ninfal previo. Los resultados mostraron que en varios casos las ninfas murieron post-inyección. No se pudo determinar si esto ocurrió por causa del ARN inyectado o por una cuestión mecánica de la técnica y/o el estrés producido en los insectos. Por otro lado, la mayoría de las ninfas interferidas no lograron mudar hacia un estadio adulto. Esto posiblemente pueda deberse a fallas en los procesos fisiológicos que desencadenan la muda de los insectos, y en función de esto, les impida continuar su crecimiento. A su vez, se ha reportado en vertebrados y algunos insectos, que, además de su función en traqueogénesis y angiogénesis, *sima* es esencial en diversos procesos del crecimiento y desarrollo (Iyer *et al.*, 1998; Kotch *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2016; Tomita *et al.*, 2003; Valzania *et al.*, 2018). Si bien la mayoría de las investigaciones apuntan a un rol de *sima*

durante la embriogénesis, se trata de eventos del desarrollo; y es por ello que planteamos la posibilidad de que *sima* esté implicado directa o indirectamente en el crecimiento y desarrollo post-embrionario durante estadios ninfales posteriores, lo cual afectaría por lo tanto el crecimiento de las mismas como fue observado en este trabajo. Comprobar estos eventos de desregulación fisiológica en el proceso de ecdisis de *R. prolixus* sería muy interesante de abordar en un futuro dentro del proyecto.

En mutantes *sima* de *Drosophila*, las tráqueas terminales no logran ramificarse bajo condiciones de hipoxia debido a su incapacidad para testear el requerimiento de oxígeno (Centanin *et al.*, 2008). Cuando las ninfas de *R. prolixus* mudan a un estadio adulto aumentan su tamaño corporal y por ende el número celular es mayor. Su sistema traqueal debe extenderse para cubrir el mayor requerimiento de oxígeno que presenta, lo cual sería una situación similar a una condición de hipoxia. Siguiendo este razonamiento, nuestros resultados concuerdan con la evidencia previa, ya que el adulto interferido para *sima* presenta menor cantidad de las ramas traqueales terminales en comparación con un adulto *wt*. Más allá de que el fenotipo obtenido es muy claro y nos da fuertes indicios de la función de *Rp-sima* en la traqueogénesis en períodos intermuda, no podemos confirmar esto debido a la significancia del experimento, donde sólo un ejemplar presentó estos cambios fenotípicos. Por otro lado, en esta tesis nos hemos enfocado en analizar los cambios en las ramificaciones traqueales de la epidermis dorsal como un subsistema de un sistema más grande, y no podemos dejar de lado que estos cambios estén también ocurriendo en el sistema traqueal en general. A pesar de ello, estos resultados representan un primer acercamiento de la función del gen *similar* sobre el sistema traqueal en *R. prolixus*, respaldada por evidencias ya reportadas en otras especies (Centanin *et al.*, 2008).

De esta forma, a futuro será necesario una profundización en este aspecto, repitiendo estos ensayos para aumentar el número de ejemplares interferidos y así poder terminar de confirmar la funcionalidad de *Rp-sima*, tanto en el sistema traqueal como en el crecimiento general del organismo.

Rol de *sima* en el desarrollo embrionario

El requerimiento de oxígeno en las células embrionarias se ve incrementado a lo largo de la embriogénesis y es aún mayor en el interior del embrión; por ende, *sima* juega un papel fundamental durante este proceso. A medida que avanzan los estadios, una mayor proporción de *sima* se localiza en los núcleos celulares, y esto se acentúa cuando las condiciones del medio son hipóxicas (Dekanty *et al.*, 2005). A su vez, análisis en ratones *knockout* revelaron que *HIF-1 alpha* (homólogo de *sima*) es esencial en procesos del desarrollo embrionario y post-embionario. Participa en la formación del cerebro, corazón, vasculatura, cartílagos y placenta (Iyer *et al.*, 1998; Kotch *et al.*, 1999; Schipani *et al.*, 2001; Tomita *et al.*, 2003). La ausencia de la expresión del gen detiene el crecimiento y origina embriones letales acompañados de importantes malformaciones. Asimismo funciones homólogas fueron reportadas en especies de insectos, como *Aedes aegypti* donde la presencia de *HIF-α* es necesaria para el crecimiento larval (Valzania *et al.*, 2018).

Sin embargo, en contraste a lo mencionado anteriormente, *sima* en *Drosophila* juega un papel diferente. Los mutantes con pérdida de función son completamente viables en normoxia, pero su desarrollo se ve afectado en condiciones de hipoxia (Centanin *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2007). Además, la sobreexpresión de *HIF1-α* en el SNC de moscas transgénicas produce letalidad embrionaria temprana (Ma & Haddad, 1999). Por otro lado, los alelos mutantes para *fatiga* provocan letalidad en normoxia y los doble mutantes *sima fatiga* son viables en la misma condición (Centanin *et al.*, 2005). Todas estas evidencias indican que, en concentraciones adecuadas de oxígeno, *sima* actúa como regulador negativo del desarrollo embrionario en *Drosophila*, y *Fatiga* se encarga de disminuir sus niveles a fin de promover la embriogénesis normalmente. Cabe mencionar que, si bien los fenotipos de *D. melanogaster* obtenidos luego de la sobreexpresión de *HIF1-α* son ciertamente embrionarios letales, no hay una caracterización detallada de los mismos (Ma & Haddad, 1999).

En este trabajo se obtuvieron embriones interferidos para *sima* en *R. prolixus* y, debido a los diferentes niveles de penetrancia de la técnica, se consiguió analizar detalladamente estos fenotipos. El alto porcentaje de embriones letales

embrionarios (83%) observado sugiere que *sima* cumple una función importante durante la embriogénesis en *R. prolixus*, como ocurre en vertebrados y algunos insectos, excepto en *Drosophila*.

Curiosamente, existen varias similitudes entre los fenotipos interferidos para *sima* y los observados en embriones interferidos para los genes *dorsal* y *Toll* en *R. prolixus*, los cuales actúan sobre el establecimiento del eje dorsoventral (DV) (Pagola, 2012). En la mayoría de los fenotipos para *dorsal* su desarrollo se detiene tempranamente, llegando a formar masas celulares pigmentadas en muchos casos. A su vez, algunos de ellos desarrollan embriones con aparente dorsalización, y sólo un pequeño porcentaje forma parcialmente la cabeza con ocelos y apéndices indiferenciados. En los fenotipos para *Toll* gran parte detiene su desarrollo en estadios tempranos, algunos llegando a formar masas celulares sin estructuras reconocibles. En estos experimentos los huevos *Toll^{ARNi}* resultaron ser sistemáticamente más cortos que los huevos *wt*. Sólo algunos fenotipos *Toll* desarrollaron embriones con distintos grados de malformaciones, desde patrones de segmentación deficientes en tórax y abdomen hasta malformaciones en los apéndices bucales. A partir de estos datos podemos inferir que los fenotipos previamente detallados presentan rasgos comunes con los observados en este trabajo para *sima*. Defectos en la gastrulación temprana fueron evidentes en la mayoría de los huevos interferidos así como también la formación de masas celulares pigmentadas sin estructuras distinguibles. A su vez nuestros resultados también mostraron embriones con malformaciones extremas, como errores graves en la segmentación de tórax y abdomen principalmente. Además, la diferenciación parcial de la cabeza fue también un rasgo compartido. Por lo tanto, esto indica que *sima*, al igual que *dorsal* y *Toll*, podrían tener una influencia, ya sea directa o indirecta, sobre la embriogénesis temprana en *R. prolixus*, más puntualmente en la determinación del eje dorso-ventral.

En conclusión, en esta tesis logramos una aproximación a la función de *sima* tanto en la remodelación traqueal en períodos intermuda como durante la embriogénesis de *R. prolixus*. No fue posible evidenciar la función de *sima* en la traqueogénesis temprana debido a la severidad y letalidad de los fenotipos obtenidos; sin embargo, a lo largo de este análisis fue posible determinar que *sima*, debido a su acción como sensor de oxígeno ambiental, es capaz de inducir traqueogénesis en estadios ninfales avanzados y, más aún, de participar en mecanismos que influyen sobre el crecimiento y desarrollo embrionario de *R. prolixus*.

BIBLIOGRAFÍA

- Adelman, DM; Gertsenstein, M; Nagy, A; Simon, MC; Maltepe, E. 2000. Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses. *Genes & development*. 14(24): 3191-3203.
- Arquier, N; Vigne, P; Duplan, E; Hsu, T; Therond, PP; Frelin, C; D'angelo, G. 2006. Analysis of the hypoxia-sensing pathway in *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry journal*. 393(2): 471-480.
- Bacon, NCM; Wappner, P; O'Rourke, JF; Bartlett, SM; Shilo, B; Pugh, CW; Ratcliffe, PJ. 1998. Regulation of the *Drosophila* bHLH-PAS Protein Sima by Hypoxia: Functional Evidence for Homology with Mammalian HIF-1 α . *Biochemical and biophysical research communications*. 249: 811-816.
- Bucher, G; Scholten, J; Klingler, M. 2002. Parental RNAi in *Tribolium (Coleoptera)*. *Current biology*. 12(3): 85-86.
- Carmeliet, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*. 9(6): 653-660.
- Centanin, L; Ratcliffe, PJ; Wappner, P. 2005. Reversion of lethality and growth defects in Fatiga oxygen-sensor mutant flies by loss of hypoxia-inducible factor-alpha/Sima. *EMBO reports*. 6(11): 1070-1075.
- Centanin, L; Dekanty, A; Romero, N; Irisarri, M; Gorr, TA; Wappner, P. 2008. Cell autonomy of HIF effects in *Drosophila*: tracheal cells sense hypoxia and induce terminal branch sprouting. 14(4): 547-558.
- Coura, JR; Borges-Pereira, J. 2012. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 45(3): 286-296.
- Crews, ST. 1998. Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes & development*. 12(5): 607-620.
- Crews, ST; Fan, CM. 1999. Remembrance of things PAS: regulation of development by bHLH-PAS proteins. *Current opinion in genetics & development*. 9(5): 580-587.
- Dekanty, A; Lavista-Llanos, S; Irisarri, M; Oldham, S; Wappner, P. 2005. The insulin-PI3K/TOR pathway induces a HIF-dependent transcriptional response in *Drosophila* by promoting nuclear localization of HIF-alpha/Sima. *Journal of cell science*. 118(23): 5431-5441.
- Duncan, DM; Burgess, EA; Duncan, I. 1998. Control of distal antennal identity and tarsal development in *Drosophila* by spineless-aristopedia, a homolog of the mammalian dioxin receptor. *Genes & development*. 12(9): 1290-1303.
- Elbashir, SM; Lendeckel, W; Tuschl, T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & development*. 15(2): 188-200.
- Esponda-Behrens, N. 2013. Estudios funcionales comparados de la evolución de la segmentación en insectos. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. 269 p.
- Fahim, A; Rehman, Z; Bhatti, MF; Ali, A; Virk, N; Rashid, A; Paracha, RZ. 2018. Structural insights and characterization of human Npas4 protein. *PeerJ*. 6: 4978.
- Fire, A; Xu, S; Montgomery, MK; Kostas, SA; Driver, SE; Mello, CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391(6669): 806-811.

- Ghabrial, A; Luschnig, S; Metzstein, MM; Krasnow, MA. 2003. Branching morphogenesis of the *Drosophila* tracheal system. Annual review of cell and developmental biology. 19: 623-47.
- Hahn, ME; Poland, A; Glover, E; Stegeman, JJ. 1994. Photoaffinity labeling of the Ah receptor: phylogenetic survey of diverse vertebrate and invertebrate species. Archives of biochemistry and biophysics. 310(1): 218-228.
- Hammond, SM; Bernstein, E; Beach, D; Hannon, GJ. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. Nature. 404(6775): 293-296.
- Hankinson, O. 1995. The aryl hydrocarbon receptor complex. Annual review of pharmacology and toxicology. 35: 307-40.
- He, ZB; Cao, YQ; Yin, YP; Wang, ZK; Chen, B; Peng, GX; Xia, YX. 2006. Role of hunchback in segment patterning of *Locusta migratoria manilensis* revealed by parental RNAi. Development, growth & differentiation. 48(7): 439-445.
- Hughes, CL; Kaufman, TC. 2000. RNAi analysis of Deformed, proboscipedia and Sex combs reduced in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*: novel roles for Hox genes in the hemipteran head. Development. 127(17): 3683-3694.
- Irisarri, M; Lavista-Llanos, S; Romero, NM; Centanin, L; Dekanty, A; Wappner, P. 2009. Central role of the Oxygen-dependent Degradation Domain of *Drosophila* HIF- α /Sima in Oxygen-dependent Nuclear Export. Molecular Biology of the Cell. 20(17): 3878-3887.
- Isaac, DD; Andrew, DJ. 1996. Tubulogenesis in *Drosophila*: a requirement for the trachealess gene product. Genes & development. 10(1): 103-117.
- Iyer, NV; Kotch, LE; Agani, F; Leung, SW; Laughner, E; Wenger, RH; Gassmann, M; Gearhart, JD; Lawler, AM; Yu, AY; Semenza, GL. 1998. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. Genes & development. 12(2): 149-162.
- Kotch, LE; Iyer, NV; Laughner, E; Semenza, GL. 1999. Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. Developmental biology. 209(2): 254-267.
- Kuhnlein, RP; Schuh, R. 1996. Dual function of the region-specific homeotic gene spalt during *Drosophila* tracheal system development. Development. 122: 2215-2223.
- 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. Molecular and Cellular Biology. 22(19): 6842-6853.
- Lavore, A; Esponda-Behrens, N; Pagola, L; Rivera-Pomar, R. 2014. The gap gene Krüppel of *Rhodnius prolixus* is required for segmentation and for repression of the homeotic gene sex comb-reduced. Developmental biology. 387(1): 121-129.
- Lavore, A; Pagola, L; Esponda-behrens, N; Rivera-pomar, R. 2012. The gap gene giant of *Rhodnius prolixus* is maternally expressed and required for proper head and abdomen formation. Developmental Biology. 361(1): 147-155.
- Lavore, A; Pascual, A; Salinas, F; Esponda-Behrens, N; Martinez-Barnetche, J; Rodriguez, M; Rivera-Pomar, R. 2015. Comparative analysis of zygotic developmental genes in *Rhodnius prolixus* genome shows conserved features

- on the tracheal developmental pathway. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 64: 32-43.
- Li, Y; Wei, Y; Guo, J; Cheng, Y; He, W. 2015. Interactional role of microRNAs and bHLH-PAS proteins in cancer (Review). *International journal of oncology*. 47(1): 25-34.
- Lin, X-W; Tang, L; Yang, JH; Xu, W-H. 2016. HIF-1 regulates insect lifespan extension by inhibiting c-Myc-TFAM signaling and mitochondrial biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1863(11): 2594-2603.
- Locke, M. 1958. The coordination of growth in the tracheal system of insects. *Quarterly Journal of Microscopical Science*. 99(3): 373-391.
- Lynch, JA; Desplan, C. 2010. Novel modes of localization and function of nanos in the wasp *Nasonia*. *Development*. 137(22): 3813-3821.
- Ma, E; Haddad, GG. 1999. Isolation and characterization of the hypoxia-inducible factor 1beta in *Drosophila melanogaster*. *Brain research. Molecular brain research*. 73(1-2): 11-16.
- Martínez, J; Tuschl, T. 2004. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes & development*. 18(9): 975-980.
- Mesquita, RD; Vionette-Amaral, RJ; Lowenberger, C; Rivera-Pomar, R; Monteiro, FA; Minx, P; Torres, AQ; ... Oliveira, PL. 2015. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112(48): 14936-14941.
- Michaelson, JJ; Shin, MK; Koh, JY; Brueggeman, L; Zhang, A; Katzman, A; McDaniel, L; Fang, M; Pufall, M; Pieper, AA. 2017. Neuronal PAS Domain Proteins 1 and 3 Are Master Regulators of Neuropsychiatric Risk Genes. *Biological psychiatry*. 82(3): 213-223.
- Michaud, JL; Rosenquist, T; May, NR; Fan, CM. 1998. Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes & development*. 12(20): 3264-3275.
- Mito, T; Sarashina, I; Zhang, H; Iwahashi, A; Okamoto, H; Miyawaki, K; Shinmyo, Y; Ohuchi, H; Noji, S. 2005. Non-canonical functions of hunchback in segment patterning of the intermediate germ cricket *Gryllus bimaculatus*. *Development*. 132(9): 2069-2079.
- Nambu, JR; Franks, RG; Hu, S; Crews, ST. 1990. The single-minded gene of *Drosophila* is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells. *Cell*. 63(1): 63-75.
- Nambu, JR; Lewis, JO; Wharton, KA; Crews, ST. 1991. The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell*. 67(6): 1157-1167.
- Pagola, LE. 2012. Análisis genómico y molecular de la embriogénesis de *Rhodnius prolixus* (Stahl, 1859) (*Hemiptera, Reduviidae*): implicancias morfológico-evolutivas en insectos. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. 121 p.
- Pugh, CW; Ratcliffe, PJ. 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature medicine*. 9(6): 677-684.
- Rao, PR; Lin, L; Huang, H; Guha, A; Roy, S; Kornberg, TB. 2015. Developmental compartments in the larval trachea of *Drosophila*. *eLife*. 4: e08666.

- Romero, NM; Dekanty, A; Wappner, P. 2007. Cellular and developmental adaptations to hypoxia: a *Drosophila* perspective. *Methods in enzymology*. 435: 123-144.
- Rowlands, JC; Gustafsson, JA. 1997. Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Signal Transduction. *Critical reviews in toxicology*. 27(2): 109-134.
- Samakovlis, C; Hacohen, N; Manning, G; Sutherland, DC; Guillemin, K; Krasnow, MA. 1996. Development of the *Drosophila* tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but genetically coupled branching events. *Development*. 122(5): 1395-1407.
- Schipani, E; Ryan, HE; Didrickson, S; Kobayashi, T; Knight, M; Johnson, RS. 2001. Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes & development*. 15(21): 2865-2876.
- Schmidt, JV; Su, GH; Reddy, JK; Simon, MC; Bradfield, CA. 1996. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93(13): 6731-6736.
- Schofield, CJ. 1979. The behaviour of *Triatominae (Hemiptera: Reduviidae)*: a review. *Bulletin of Entomological Research*. 69(3): 363-379.
- Schottenfeld, J; Song, Y; Ghabrial, AS. 2010. Tube continued: morphogenesis of the *Drosophila* tracheal system. *Current Opinion in Cell Biology*. 22(5): 633-639.
- Sonnenfeld, M; Ward, M; Nystrom, G; Mosher, J; Stahl, S; Crews, S. 1997. The *Drosophila* tango gene encodes a bHLH-PAS protein that is orthologous to mammalian Arnt and controls CNS midline and tracheal development. *Development*. 124(22): 4571-4582.
- Sun, X; Lin, Y. 2017. Npas4: Linking Neuronal Activity to Memory. *Trends in neurosciences*. 39(4): 264-275.
- Thomas, JB; Crews, ST; Goodman, CS. 1988. Molecular genetics of the single-minded locus: a gene involved in the development of the *Drosophila* nervous system. *Cell*. 52(1): 133-141.
- Tomita, S; Ueno, M; Sakamoto, M; Kitahama, Y; Ueki, M; Maekawa, N; Sakamoto, H; Gassmann, M; Kageyama, R; Ueda, N; Gonzalez, FJ; Takahama, Y. 2003. Defective brain development in mice lacking the Hif-1alpha gene in neural cells. *Molecular and cellular biology*. 23(19): 6739-6749.
- Tomoyasu, Y; Denell, RE. 2004. Larval RNAi in *Tribolium (Coleoptera)* for analyzing adult development. *Development genes and evolution*. 214(11): 575-578.
- Valzania, L; Coon, KL; Vogel, KJ; Brown, MR; Strand, MR. 2018. Hypoxia-induced transcription factor signaling is essential for larval growth of the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 115(3):457-465.
- Vazquez-Prokopec, GM; Spillmann, C; Zaidenberg, M; Gürtler, RE; Kitron, U. 2012. Spatial heterogeneity and risk maps of community infestation by *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. *PLoS neglected tropical diseases*. 6(8): e1788.
- Wigglesworth, VB. 1954. Growth and Regeneration in the Tracheal System of an Insect, *Rhodnius prolixus (Hemiptera)*. *Journal of Cell Science*. 3(95): 115-137.
- Wilk, R; Weizman, I; Shilo, BZ. 1996. trachealess encodes a bHLH-PAS protein that is an inducer of tracheal cell fates in *Drosophila*. *Genes & development*. 10(1): 93-102.
- Wilson, MJ; Dearden, PK. 2011. Diversity in insect axis formation: two orthodenticle genes and hunchback act in anterior patterning and influence dorsoventral

- organization in the honeybee (*Apis mellifera*). *Development*. 138(16):3497-507.
- Wu, D; Rastinejad, F. 2017. Structural characterization of mammalian bHLH-PAS transcription factors. *Current opinion in structural biology*. 43: 1-9.
- Xiao, H; Hrdlicka, LA; Nambu, JR. 1996. Alternate functions of the single-minded and rhomboid genes in development of the *Drosophila* ventral neuroectoderm. *Mechanisms of development*. 58(1-2): 65-74.
- Zelzer, E; Wappner, P; Shilo, BZ. 1997. The PAS domain confers target gene specificity of *Drosophila* bHLH/PAS proteins. *Genes & development*. 11(16): 2079-2089.
- Zhou, S; Degan, S; Potts, EN; Foster, WM; Sunday, ME. 2009. NPAS3 is a trachealess homolog critical for lung development and homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(28): 11691-11696.