

# **Caracterización funcional del gen *gap hunchback* en *Rhodnius prolixus***

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, 9 de marzo de 2018

# **Caracterización funcional del gen *gap hunchback* en *Rhodnius prolixus***

Trabajo Final de Grado

de la alumna

**María José Delgado**

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

Natalia I. Esponda-Behrens  
**Co-Directora**

Andrés E. Lavore  
**Director**

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

Pergamino, 9 de marzo de 2018

## ÍNDICE

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
Embriogénesis de insectos .....	5
Mecanismos moleculares de la segmentación.....	6
Morfología del aparato bucal sucto-picador.....	8
El gen <i>hunchback</i> .....	10
<i>Rhodnius prolixus</i> como modelo de estudio .....	12
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVOS.....	13
Objetivo general .....	13
Objetivo específico.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Colonia de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	14
Amplificación por PCR.....	14
ARN de interferencia parental.....	16
Manipulación de embriones. Análisis fenotípico .....	19
RESULTADOS.....	20
Interferencia del gen <i>hunchback</i> en <i>Rhodnius prolixus</i> .....	20
La pérdida de función de <i>Rp-hb</i> altera la formación del aparato bucal.....	21
<i>Rp-hb</i> <sup>ARNi</sup> produce una severa desorganización embrionaria .....	23
DISCUSIÓN.....	25
El fenotipo <i>gap</i> de <i>Rp-hb</i> .....	25
Regulación de otros genes <i>gap</i> .....	27
<i>hb</i> como regulador de genes <i>Hox</i> .....	30
BIBLIOGRAFÍA .....	32

## RESUMEN

La clase Insecta se destaca por ser el grupo más diverso de animales, dotado de una enorme variación en la estructura corporal entre las diferentes especies. A pesar de que el modelo corporal de los insectos culmina siempre con la formación de un mismo patrón (cabeza, tórax y abdomen), el desarrollo que lleva a este estado final es asombrosamente variable.

Dentro de los genes involucrados durante la embriogénesis de insectos, se encuentran los genes de efecto materno, que determinan la polaridad del embrión; los genes *gap*, que determinan grandes dominios corporales; los genes *pair-rule* los cuales se expresan en segmentos pares o impares; y, por último, los genes de polaridad de segmento que se encargan de determinar la correcta polaridad antero-posterior (A-P) en cada segmento corporal.

Dado que la mayor parte del conocimiento sobre los mecanismos moleculares que gobiernan la segmentación en artrópodos proviene de estudios en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, en este trabajo se realizó el análisis funcional del gen *gap hunchback (hb)* en *Rhodnius prolixus*, vector de la enfermedad de Chagas, a fin de dilucidar su participación en la formación del cuerpo. Mediante el silenciamiento de *Rp-hb* con ARN de interferencia parental (ARNi) se obtuvieron 296 embriones con fenotipo interferente, los cuales se agruparon en 4 clases fenotípicas diferentes de acuerdo con el grado severidad que presentaban. Los fenotipos más severos se caracterizaron por la ausencia de los segmentos gnatales (mandíbula, maxila y labio), dejando en claro la función de *Rp-hb* como gen *gap* al determinar el correcto establecimiento de esta región cefálica. A su vez, el análisis de los fenotipos más leves dejó en evidencia el rol de *Rp-hb* como posible regulador homeótico, ya que la pérdida de su función resultó en el desarrollo defectuoso del labio y de los apéndices torácicos, así como también defectos en el patrón cuticular abdominal.

## INTRODUCCIÓN

### Embriogénesis de insectos

Dentro del filo de los artrópodos, la clase Insecta se destaca por ser el grupo más diverso de animales, dotado de una enorme variación en la estructura corporal entre las diferentes especies. Estas diferencias morfológicas, consecuencia de un vasto proceso evolutivo debido a la presión selectiva del ambiente, permiten que los insectos ocupen casi todos los nichos ecológicos del planeta. A pesar de esto, todos ellos comparten un patrón corporal básico que consiste en 3 tagmas: cefálico, torácico y abdominal, los cuales cuentan con 6, 3 y 8-11 segmentos respectivamente. Pero, una vez más, el desarrollo que lleva a este estado final es asombrosamente variable.

En 1939, Krause postuló tres tipos de desarrollo de la banda germinal: embriogénesis de banda germinal corta, intermedia y larga (Krause, 1939). Estos distintos modos de embriogénesis son adaptaciones a diferentes estrategias de vida, y estas diferencias afectarían cómo y cuándo se generan los segmentos en relación a otros procesos de la embriogénesis (Peel *et. al.*, 2005). Por un lado, Krause (1939) observó que algunos insectos producen huevos en los cuales los futuros segmentos del embrión son especificados simultáneamente durante el estadio de blastodermo sincicial. Denominó a este tipo de embriogénesis “banda germinal larga” (*long germband*), donde todos los segmentos del rudimento germinal están presentes previamente al proceso de gastrulación, con las proporciones que posteriormente presentará la larva (Fig 1B). Es un tipo de banda germinal que se encuentra con mayor frecuencia en los órdenes más derivados, los ejemplos más representativos de este grupo son los dípteros, como *Drosophila melanogaster*, himenópteros, como *Nasonia vitripennis*, entre otros (Davis & Patel, 2002). Por otra parte, Krause notó que, en los huevos de otros insectos, hay un rudimento germinal que inicialmente no posee todos sus segmentos, sino que los va añadiendo de manera secuencial y concomitante con el proceso de gastrulación. Generalmente, estos embriones son “pequeños”, es decir, la mayor parte del material del huevo consiste en vitelo, quedando el embrión restringido hacia el lado posterior-dorsal del huevo. En estos individuos, sólo los segmentos anteriores, por lo general los segmentos cefálicos y torácicos, son especificados durante el estadio de blastodermo sincicial. Por lo tanto, llamó a este tipo de embriogénesis “banda germinal corta” (*short*

*germband*), ya que el rudimento germinal representa unos pocos segmentos del embrión, ocupando una pequeña porción del huevo, mientras que los segmentos posteriores restantes se generan más tarde, luego de la celularización, en la cual la elongación de la banda germinal se produce debido a la adición secuencial de los segmentos, a partir de una región denominada “zona de crecimiento” (Fig 1A). Este tipo de embriogénesis es el más común entre los insectos, y se encuentra en los órdenes basales, como Ortóptera, e intermedios, como Hemíptera, cuyos modelos más estudiados son *Grillus bimaculatus* y *Oncopeltus fasciatus*, respectivamente. También se encuentra en algunas especies del orden Coleóptera, como es el caso del escarabajo *Tribolium castaneum*, sin embargo en este orden, aparecen ambos tipos de desarrollo (Rosenberg *et al.*, 2009). Dado que las formas de desarrollo de banda germinal corta e intermedia son conceptualmente equivalentes se las suele agrupar y denominar conjuntamente como “corta” y, ya que se encuentra representada en los órdenes basales de insectos, esto indicaría que algunas formas de desarrollo de banda germinal corta son evolutivamente ancestrales (Liu & Kaufman, 2005).

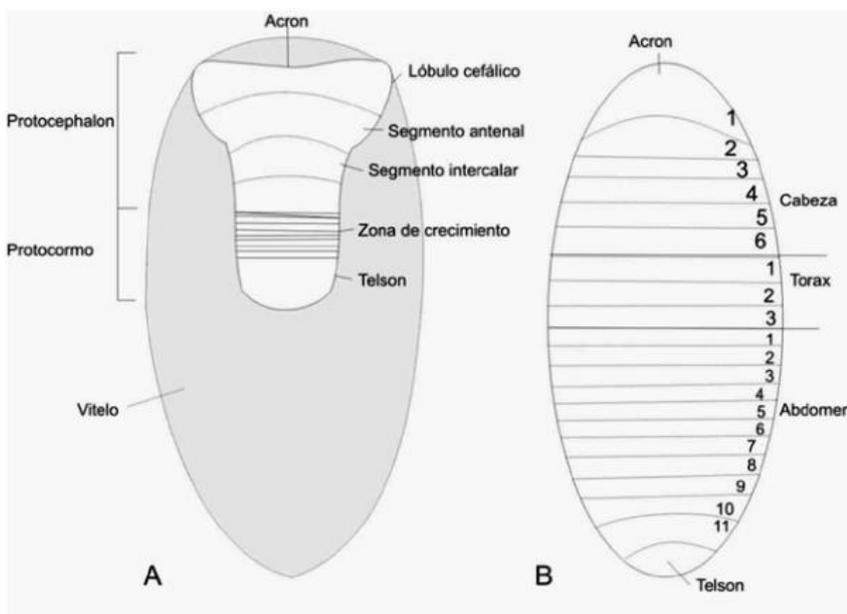


Fig. 1| A. Banda germinal corta donde se encuentran especificados los primeros segmentos de la cabeza, la zona de crecimiento, acron y telson; la diferencia con la banda germinal intermedia es que en este estadio se especifican todos los segmentos de la cabeza y el tórax. B. Banda germinal larga donde, desde un principio, se especifican todos los segmentos del cuerpo, con las proporciones que posteriormente presentará la larva. (Extraída de Pagola, 2012)

## Mecanismos moleculares de la segmentación

La mayor parte del conocimiento sobre los mecanismos moleculares que gobiernan la segmentación en artrópodos proviene de estudios en *D. melanogaster*, un díptero derivado evolutivamente. En la década de los 80 el exhaustivo *screening* genético llevado

a cabo por Nüsslein-Volhard y col. permitió conocer los genes específicos que están involucrados en la determinación del patrón corporal de la mosca (Nüsslein-Volhard & Wieschaus, 1980).

La maquinaria molecular que gobierna la segmentación de insectos se basa en una red jerárquica de los genes identificados por Nüsslein-Volhard y col. (1980). Estos genes conforman un circuito de activación-represión, involucrando factores de transcripción tanto provistos por la hembra (llamados maternos) como producidos por el embrión (llamados cigoto), los cuales se encuentran distribuidos a lo largo del eje antero-posterior (A-P) del embrión (Fig. 2) (Jäckle *et al.*, 1992; Johnston & Nüsslein-Volhard, 1992).

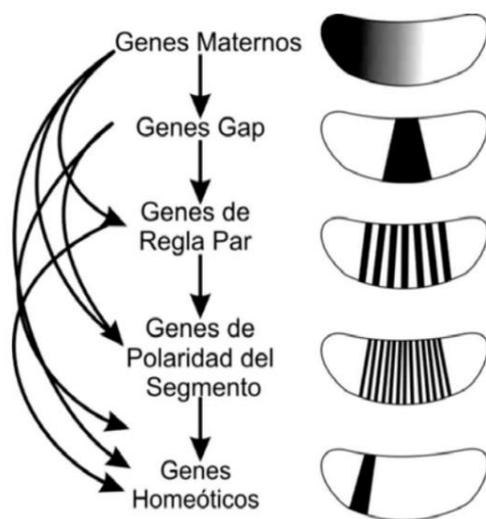


Fig. 2|Resumen de la jerarquía que controlar la segmentación en embriones de *D. melanogaster*. Derecha: representación de los patrones de expresión de cada clase de genes. Izquierda: representación de las clases de genes que especifican el patrón antero-posterior del cuerpo y las relaciones regulatorias entre y dentro de clases (Extraída de Pagola, 2012).

Dentro de los genes involucrados en esta red génica, se encuentran los genes de efecto materno, que determinan la polaridad del huevo. Las hembras producen y depositan diversos ARN mensajeros que son distribuidos asimétricamente a lo largo del oocito (Frigerio *et al.*, 1986; Berleth *et al.*, 1988). La traducción de estos mensajeros da origen a factores que difunden a lo largo del embrión en estadio de blastodermo sincicial, polarizando al embrión y regulando la expresión de los siguientes genes en la cascada, llamados genes *gap*. Estos son de origen cigótico y se expresan en extensos dominios parcialmente superpuestos. De esta manera, los genes *gap* determinan grandes dominios corporales. El embrión comienza así a quedar sectorizado (proceso que se profundiza en las siguientes etapas) y cada región expresa un conjunto diferente de genes. El resultado es que el estado en un lugar y momento dados (productos, cantidades relativas,

intensidades de expresión), brinda información posicional, ya que a lo largo del eje no habrá dos puntos con una misma composición molecular. Los embriones mutantes para genes *gap* sufren la pérdida de uno o más segmentos adyacentes (Nüsslein-Volhard & Wieschaus, 1980). La acción conjunta de los genes *gap* induce la transcripción de los siguientes genes en la cascada, llamados *pair-rule* (Rivera-Pomar & Jäckle 1996; Sauer *et al.* 1996). Estos genes se expresan de forma alternada en franjas coincidentes con los futuros segmentos pares o impares, dividiendo al embrión en unidades periódicas que se denominan parasegmentos. A su vez, los genes *pair-rule* activan la transcripción de otros genes, los de polaridad de segmento. Estos se encargan de determinar la correcta polaridad A-P en cada segmento corporal y el número final de ellos. Luego, los productos de los genes *gap*, *pair-rule* y de polaridad de segmento interactúan para regular la correcta expresión del siguiente nivel, el de los genes *Hox*, también llamados genes homeóticos. Estos genes, en *D. melanogaster*, están organizados en *clusters* genómicos, a modo de estructura repetitivas, formando dos complejos génicos: el complejo *Antennapedia*, encargado principalmente del correcto desarrollo de la región céfalo-torácica, y el complejo *Bithorax*, vinculado al desarrollo de la región torácica posterior y abdominal. El complejo *Antennapedia* está formado por los genes *labial (lab)*, *proboscipedia (pb)*, *Deformed (Dfd)*, *sex comb reduced (scr)* y *antennapedia (antp)*. Estos genes actúan como reguladores maestros que dirigen la formación de la región anterior en la gran mayoría de los grupos animales y, puntualmente, en insectos, logrando en el correcto patrón morfológico de la cabeza (Lewis, 1978).

De esta forma, la acción conjunta de todos estos genes resulta en la correcta formación de todos los segmentos a lo largo del eje A-P del embrión y, por ende, del patrón morfológico que se conserva en todos los insectos.

### **Morfología del aparato bucal sucto-picador**

La cabeza de los insectos es el centro anterior sensorial y de alimentación del animal. Porta órganos y estructuras esenciales para la supervivencia. En la parte anterior se ubica la región no segmentaria (el acron), que alberga el cípeo y el labro. Por el contrario, la parte posterior es segmentaria y contiene los segmentos ocular, antenal, intercalar, mandibular, maxilar y labial (Posnien *et al.*, 2010).

Las piezas bucales están conformadas por apéndices que surgen de los 3 segmentos cefálicos posteriores (mandíbula, maxila y labio), los cuales se conocen conjuntamente como gnatocefálo. Estas piezas se han ido modificando extensivamente en los diferentes linajes, a medida que los insectos explotaban distintas fuentes alimenticias. El aparato bucal masticador es el estado más ancestral de las piezas bucales, en el cual se destaca la prominencia de los apéndices mandibulares (Fig. 3). En contraste a esta forma basal, los apéndices bucales de los hemípteros se han especializado para la succión de fluidos de plantas o animales hospedantes (Angelini & Kaufman 2004, 2005).

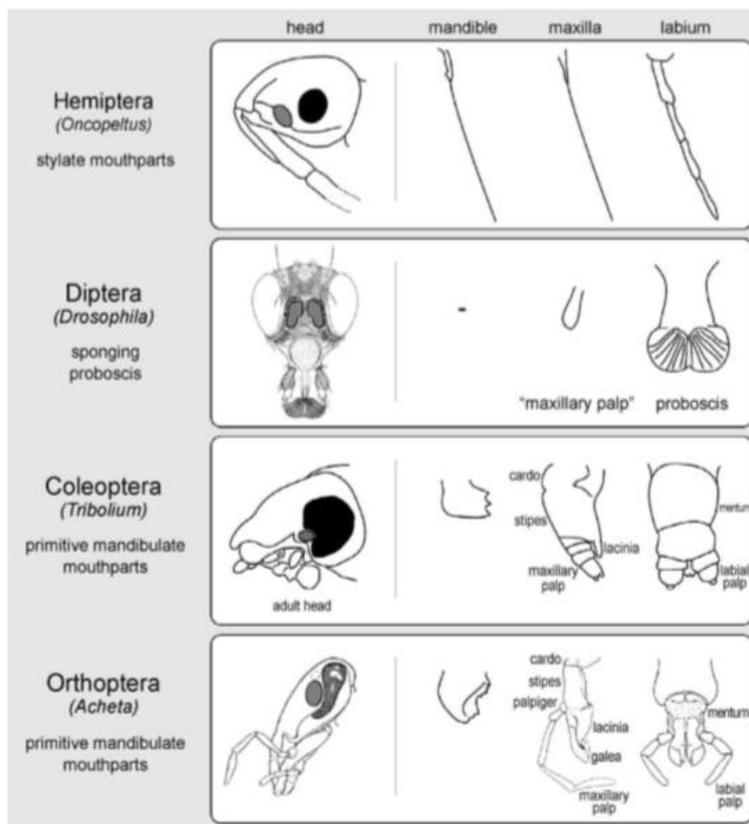


Fig. 3|Anatomía de las piezas bucales de insectos. Se muestran la cabeza y las piezas bucales de 4 especies de insectos de interés. *Tribolium* y *Acheta* representan el estado ancestral de las piezas bucales de los insectos. En comparación, las piezas bucales de *Drosophila* y *Oncopeltus* son más derivadas en relación con el estado primitivo, así como difieren significativamente entre sí. Las áreas grises en la cabeza representan el punto de unión de la antena, las que se removieron para mayor claridad (Extraída de Angelini & Kaufman 2004).

El aparato sucto-picador de hemípteros (Fig. 4), consiste en una proboscis (o rostro) larga y delgada, formada por el labio segmentado, cuyo diámetro y forma depende del régimen alimenticio de la especie: en las predadoras posee 3 segmentos, es curvo y corto; en las fitófagas 3-4 segmentos, siendo recto y más largo que la longitud de la cabeza; y en las hematófagas presenta 3 segmentos, es recto y tan extenso como la longitud de la cabeza (Fig. 4 B). Las mandíbulas y las maxilas están modificadas en finos estiletos, quedando por dentro del labio que los sostiene y posiciona. El par de estiletos

mandibulares se ubica por fuera, rodeando las maxilas. En su extremo apical presentan forma aserrada, lo cual permite perforar los tejidos (Fig. 4 D). Los estiletes maxilares se encuentran en el centro del haz, estrechamente unidos formando un canal dorsal, llamado “canal alimentario”, y uno ventral, el “canal salival”. Esta estructura penetra el tejido en busca de los haces vasculares. El canal salival es una de las razones principales de que muchas especies de hemípteros sean vectores de enfermedades, debido a que el flujo salival discurre hacia el hospedador, inyectando su contenido y así se convierte en un medio de dispersión eficiente, utilizado por muchos patógenos (Snodgrass, 1935; Essig, 1942).

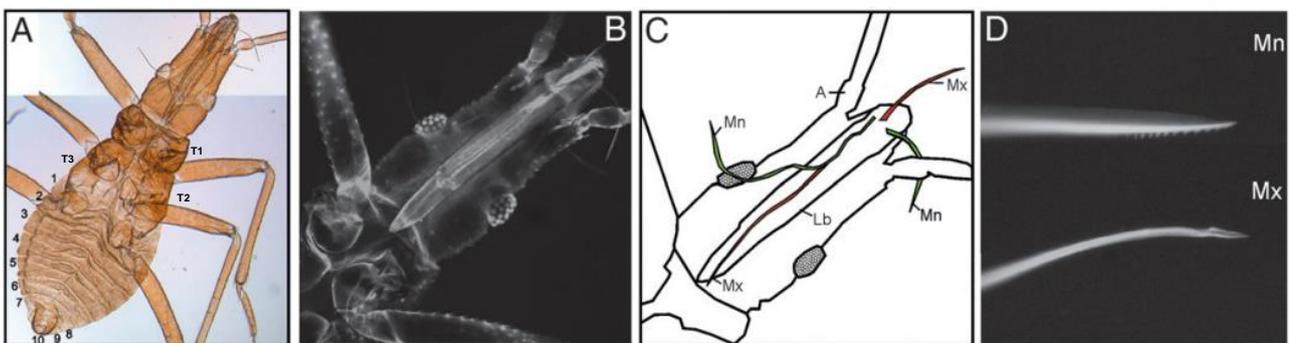


Fig. 4| Morfología cefálica del primer estadio ninfal de *R. prolixus*. A. Fotografía de cuerpo entero desde vista dorsal. B. Fotografía de la cabeza con microscopía confocal. C. Esquema de la imagen B donde se detallan los distintos apéndices cefálicos (A, antena; CL clipeo-labro; L, labio; Mn, mandíbula y Mx, maxila; T, tórax). D. Estructura de los estiletes mandibular (forma aserrada) y maxilar. (Extraída de Lavore *et. al.* 2012).

La comprensión cada vez más detallada del desarrollo de apéndices en *D. melanogaster* ha permitido contar con los genes encargados de su especificación. Sin embargo, la involución de la cabeza en el estadio larval, en la que ésta se internaliza dentro del tórax (Turner & Mahowald 1979), limita la posibilidad de extrapolar este conocimiento a otros insectos. Por lo tanto, resulta importante estudiar los genes responsables del desarrollo cefálico en otros insectos modelo con desarrollo directo durante la embriogénesis.

### El gen *hunchback*

El gen *gap hunchback* (*hb*) codifica para un factor de transcripción con dominios de reconocimiento y unión al ADN del tipo *zinc-finger* (*Zn-F*), fundamentales tanto para el control de la expresión de otros genes *gap* como de genes *pair rule* y homeóticos,

dándole una posición clave en la regulación de la segmentación embrionaria (Tautz, 1988; Simpson-Brose, Treisman & Desplan, 1994; Casares & Sánchez-Herrero, 1995; Wu *et al.*, 2001; Pinnell *et al.*, 2006). En *D. melanogaster* *Hb* actúa junto con *Bicoid* (*Bcd*), a través de un gradiente morfogénico, para regular la transcripción génica en la región anterior del embrión, de forma dependiente de concentración (Driever & Nüsslein-Volhard, 1989; Struhl, Struhl & Macdonald, 1989). Los alelos con pérdida de función para *Hb* (*Dm-Hb*) exhiben un efecto *gap* clásico, donde se pierde desde el segmento labial hasta el tercer segmento torácico, además de observarse fusión de los segmentos abdominales 7 y 8 (Lehmann & Nüsslein-Volhard, 1987).

Ortólogos del gen *hb* han sido identificados en varias especies de insectos, tanto holo como hemimetábolos (Patel *et al.*, 2001; Liu & Kaufma, 2004; Pultz, 2005; He *et al.*, 2006; Marques-Souza *et al.*, 2008). Experimentos de ARN de interferencia (ARNi) en *Tribolium castaneum* para *Tc-hb* resultaron en la delección de segmentos gnatales y torácicos (Schröder, 2003). Sin embargo, un segundo análisis de las series fenotípicas generadas sugiere que el fenotipo observado es una combinación de delección de segmentos abdominales junto con cambios de identidad de segmentos torácicos y gnatales a abdominales (Marques-Souza *et al.*, 2008). En *Gryllus bimaculatus* se han observado transformaciones de la región torácica y gnatal en abdominal (Mito *et al.*, 2005). Algo similar ocurre en *O. fasciatus*, en donde la disminución de *Of-Hb* no lleva a la pérdida de segmentos gnatales y torácicos, sino a un cambio en su identidad, donde estos segmentos toman identidad abdominal (Liu & Kaufma, 2004).

Por otro lado, Pultz y colaboradores (2005) encontraron que los mutantes *headless* en *N. vitripennis* son producto de alelos nulos del ortólogo del gen *hunchback*, cuyo fenotipo se asemeja al de *Drosophila*, mostrando una amplia delección de los segmentos anteriores y pérdidas de segmentos abdominales posteriores (Pultz *et al.*, 1999).

De esta forma queda claro que el gen *hb* está involucrado en el proceso de la segmentación A-P en todos los organismos estudiados hasta el momento. La pérdida de este gen genera cambios en el número de segmentos, así como también en algunos casos, transformaciones homeóticas en la región anterior y media del cuerpo.

En un estudio previo, se identificó el ortólogo del gen *Hb* en el genoma de *R. prolixus*, el cual consiste en 8 dominios *zinc-finger*, de los cuales 6 están altamente conservados, además de 3 dominios estructurales o dominios *box* (Lavore, 2012). A través de ensayos de ARNi parental, se encontró que la pérdida del gen *Rp-Hb* ocasiona letalidad del 100% de los embriones interferidos y se pudieron observar fenotipos de pérdida de función, donde los segmentos gnatales y torácicos no se desarrollaban correctamente (Rolandelli, 2013). Si bien este trabajo fue el primer análisis funcional del gen *hunchback* en *R. prolixus*, resta aún una descripción fenotípica más profunda y precisa para terminar de descifrar correctamente la función de este importante gen del desarrollo.

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

*Rhodnius prolixus* es un hemíptero hematófago nativo de Centroamérica y norte de Sudamérica, perteneciente a la familia Reduviidae. Esta familia posee la mayor diversidad de especies dentro del orden (Schofield & Galvão, 2009). Dentro de esta, los géneros *Rhodnius*, *Panstrongylus* y *Triatoma* son los más importantes vectores de la enfermedad de Chagas (Coura & Borges-Pereira, 2012). En Argentina, el principal vector es *Triatoma infestans*, comúnmente llamada vinchuca, y se estima que existen aproximadamente 2.300.000 enfermos de Chagas (Vazquez-Prokopec et al., 2012).

*R. prolixus* tiene un ciclo de vida de aproximadamente 3 meses, más corto que el de *T. infestans*. Esto la convierte en un modelo de estudio más flexible y práctico para el trabajo en laboratorio (Fig. 5). Por ese motivo, *R. prolixus* se utiliza en estudios de

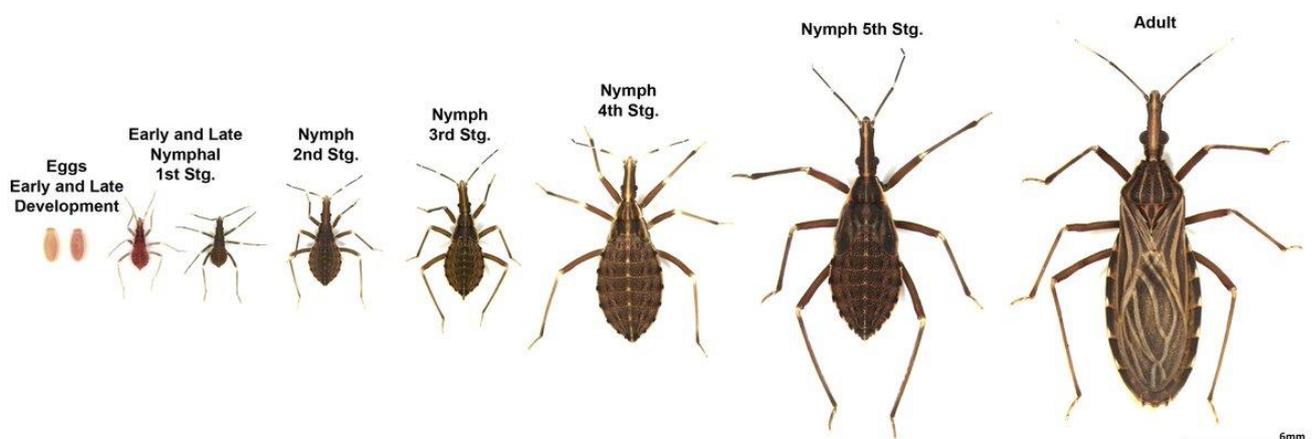


Fig.5|Desarrollo post-embrionario de *Rhodnius prolixus*. Luego de la eclosión, el insecto atraviesa por 5 estadios ninfales hasta alcanzar la adultez (imagen extraída de <http://science-explained.com/blog/project/egg-immunity-in-the-kissing-bug-the-carrier-of-chagas-disease/>).

fisiología, biología celular y reproducción. Actualmente contamos con su genoma completamente secuenciado (Mesquita *et al.*, 2015), lo cual representa otra gran ventaja.

Utilizando parte de la información genómica ahora disponible, se identificaron y caracterizaron funcionalmente una gran cantidad de genes de desarrollo, implicados en la polaridad antero-posterior, dorso-ventral y los pertenecientes al cluster *Hox* (Lavore *et al.*, 2012, 2014, 2015; Pagola, 2012; Esponda-Behrens, 2013). Esto no sólo hace que sea interesante desde el punto de vista biológico y médico, sino también desde el punto de vista evolutivo, dado que es uno de los primeros insectos hemimetábolos del cual se posee información genómica completa. Estas características, junto al hecho de que su desarrollo embrionario ha sido estudiado con gran detalle por Mellanby (Mellanby, 1934; Mellanby, 1935) y Kelly y Huebner (Kelly & Huebner, 1989), han impulsado a *R. prolixus* como modelo de biología del desarrollo.

## HIPÓTESIS

*hunchback* actúa como gen *gap* durante la segmentación del eje antero-posterior de *Rhodnius prolixus*.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Generar información funcional acerca de la acción del gen *hunchback* durante el desarrollo embrionario de *Rhodnius prolixus*.

### Objetivo específico

1. Realizar un análisis funcional por ARN de interferencia parental (RNAi parental).
2. Analizar los fenotipos resultantes de pérdida de función de *Rp-hb* e interpretar la función de este gen dentro de la red génica de segmentación en *Rhodnius prolixus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

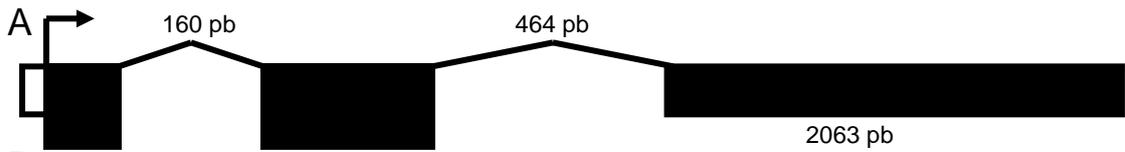
### Colonia de *Rhodnius prolixus*

Los ejemplares de *R. prolixus*, tanto hembras como machos, 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 habitual de esta especie 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).

### Amplificación por PCR

Para la validación funcional del gen *Rp-hb* se aplicó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase chain reaction*) obteniendo el amplímero correspondiente al tercer exón del gen, que incluye los dominios Zn-F 3-6 y el dominio Box-C (Fig. 6) (Lavore, 2012). Para ello se utilizaron *primers* diseñados en nuestro laboratorio, los cuales cuentan en su extremo 5' con parte del promotor del fago T7 para llevar a cabo posteriormente la transcripción *in vitro*:

HbFw	AAGATATGTGGGGCGATGAC
HbFwT7	<u>CGACTCACTATAGGGAAGATATGTGGGGCGATGAC</u>
HbRv	TCTGCTTAGGTCCTCGTCTTG
HbRvT7	<u>CGACTCACTATAGGGTCTGCTTAGGTCCTCGTCTTG</u>



**B** 193 pb

TAATTAATAATATCCAACCA TATACT TATAAGACGCATTAGCGAGAAGCTTAAGCTATCCCTTCTAGTCACATTCATT  
 ATCATGGGTTTCTAATAAAAAGTTAAATGCATGCAAGCTCATTTAAATGGCAATATTCGGCAATAAATGTAGTATCACCT  
 AAAAGTATGTAAGTCATAATGCCGC ATGTACAGATCGCAATGTTACTTCACTCACTAGAAAAGTAACTAAAAAAT  
 GCAAATTCAAGAAGTTAATTTAAATTTATTTCAATTGTTTCAAATATAAGAATTTAATTTAAGAGTTTTAGAAGCGCATCA  
 ATGATTGGATGCAGATGTACAAAGTGGGGTGGTCACTATTTAACTAGCACTTGCTCTGTTATCACCGACTGAAAATG  
 ACTTTTGATTCCAGAAAACAAGAACCACGTGATGAGAGCGAATATGGTTTCGGAAAAGGTGATAAGGCCAGTTTTTCAT  
 CTCCTTTGACACCTCCCGGCTTGAATGCTGCCTACAGTTTTCCACTCCACAATCTGAATACACGGGCTCTAGCTCAC  
 CAGGACCAGACACCTACAGCACCAAACAAACCGCCACGAACACCCTCAATGTAGTGGTATTGTGAGCGATGGCAG  
 TAGTGGAGAATCGGCCGTCTCCACTGACCCAATACCAACACCAAAGTCAGACGGTGGAAAAGAGTTCGCCTCGCCTG  
 ACACCACCTGGCTCTATACCCTCGCGTTAAATCATCATCTTTCATCAGTGGATCATCTAGAAAAACATGACAA  
 CAAGATGGCGGCTCACAGAGTTCGAATTCAGAAAAATGAATTTTATGAAAAATGGAGATTCACCTTAGACGTTTACAAATG  
 GCTCTGCAGAGAAGTGGCATGATGCCTGAAGAAAAATACAGTGTCCAATGTGTGAATTCAACTGCAATATCAGGTA  
 TGTAGTCAATTTCCAAGTGTCAAATAGTTTATTCGTTAGTAATTTGTAAGAAGAGTTCGATCAGAATATCGAAACTAT  
 GTTTCCTTGACGTTGGAAGTATTACATAAAATCGACCATAATTTCTTTTCATTTTCGATTTTTCGTTGGGAAAATGTTCAA  
 ATCGAAATAACATAATATTTAAATCTTTAATGAAGTATGAGTCCACTGTAGGAACATTTTGAAATCTAGATTTAATGT  
 ATTTATCAAAACAATTTGTTTTGAGGGAACATTCTCGAAAACCTAATCAACCGTTTCATCACTTCTGAGTATTTTAT  
 TCTTAATATAATGAAGTGTCTTCGCTTTCTTTTCATGACGTAATGAATGCGATTAATGCATTGAATTTGGGAAATACT  
 TTTAGTAATATAGTTTCAAATTTATGTCACCTTAATTAATGTTTTTCTTTTATTCTTTTCAGATCACAAATTAACGAGCACC  
 TAATGGCGCATGAGACCAAATGTAATATGTGCGACTTTAATGGGGAATCATGTGACAACTCCGAGAACACATGAAA  
 GTGGTACATGACTGCGATG **AAGATATCTGGGGCGATGAC** GAACCAGGCTTGAATACCCCAAAAGTAAATAGCCAGG  
 GCAAAGTTAAAACTTTTCGTTGCAAACAATGTGAATTTCCGCTGTAACAAAATGGAATTTGGGAACATTCTAGATC  
 GCATATAAAACAAGAAGCTTTAATACATGCCCAAAGTGCCTTTTGTACTGAATATAAACATCATTGGAATATCAT  
 TTAAGGAATCATTTCCGTTGCAAGCCATTTAAATGTGACAAATGTTTCATATTCATGTGTTAATAAATCAATGCTAAAT  
 CAAATTTAAAAAGTCACAGCAACGTTTATCAATTTAGATGCTGCTGATTGCACGTATGCTACAAAATATGGCCATGTTT  
 AACATACATTTACGTAATATGGTCATAGTCCAGCATGGTATTAATCCGGATGGTTCCACCGAATCCATTGCCAAT  
 TGTGTGATTTTATGGCA **CAAGACGAGGACCTAAGCAGA** AATCCAAACATGACAAGCAACGATCAACTCACCGCAAC  
 AGTCTCAATCACAAACAGCGATCCCAACAAAGTTCACCTCAACCGCAACAACAGCAGTCTCAGCAACAGCAACAAGTT  
 GCAGCAGCAATGCCTCTATTCAATCCTTACAGTTTGTCTCCTACTCAAATGCCTTATTATAATACTGAACGGTTTCA  
 GTCCATTTCCATTGCCCCAAGATATGAGAGTAGATGAGAAAAACAATAATTGAAAAAGAGAACAGCAGCGATGCT  
 TCAGATCTATCGTCACCGTTCGAAGGAAGAACTAAAACACCTTTAGATCTGACCTGTACCGAACAACGTATGGACGA  
 CACCCCGCCAGAAACACCGGTATTAAGAACCAGCTAAAGGTAAGCGTTTAAATTGGAACGAATCGCGATTAGAT  
 TGCAACAGCATAGCGAGGATGAAGAACCAGCAACAATTAATACCAACCGGATATCTATGTGGAACCAAGCCATGTT  
 AAATCTCCTGATATTAATACTGCGATGGAGATAGTGAACAACATCCAGCAACAACCAACCAACCAAGATTTTCA  
 AAATAAAGTAGACGATTATAACTGTAGTTATTGTGATATATCATTTAAAGACATTGTTATGTATACAATGCATATGGGT  
 TATCATGGATATCAAGATCCGTTACGTGTAATATGTGCGGACAACAGACTACCGATAAGGTGGCATTTTTCTTGCAT  
 ATCGCCAGAACGTCACACTCAT **AA** AACTGTACGACCTCAAAGTCAAATTTGAAAAACAACCTTTTATGTTTCTTTC  
 AGAAACCAGTCCATGATTCTATGTACTATTTGTCATGTTACCTAGAGATTGCGCCAATATATTATACATATCCAAAAT  
 CATGTAATAACAGTAGATATACATAATATATAAATATATATATGATTAATAAAGTTTCAAATAATTTATTTTCTAGTCA  
 TTCTTAATTTTAAATTAATTTTAAAAATGATTAAGGACAAAGTATAGAAAGATACAAAAGTAAATTTAGTTTTTCTTTA  
 TATTCAGTCTTCAGTGAATTTTATTTTTTTTTTTTATTTATTTTTTCTTCTGCTTCGAATTTAATTTTCGATTACGTTTTCGGATA  
 TTACGGGTTTATGTATATAAATAGGGCAACTTATCTATCAACATAGAGTTGACTCTGTTTATTTCTCATACAGCAGA  
 AAGATTATTTATTTATATTATATATTTCAGTAAATATTTATTTTATTTTGTATCCACTTTTAGTACGCTAAGTTACTGT  
 AAAATATATTAGCTCGAATTTGGCATATTTTTCGATTTTTTTTATTTGTTATTTCCATTTTATGTTGCATTTAAATATCGAT  
 GTACTAAGTATTTATCACGTTTGTACTACTTGCATATATATATATAGTATATCTACATTTATATATGT **AAAAAATAAA**

**C**

MYRSQCLLHSLTELKQLIQEKQEPRDESEYGFKGDKASFSSPLTPPGLNAAYSFPTPQSEYTGSSSPGPDYSTKQT  
 ATNTTQCISGIVSDGSSGESAVSTDPIPTPKSDGGKSSPRLTPPGSIPSPLNHHHLHHVDHLEKHDNDGGSQSSNSENEF  
 YENGDSLRRQLMALQRTGMMPEEKL **QCPMCEFNCSNIRSQFNEHLMAHETKCNMCDFNGESCDKLREHMKVVH**DCDED  
 MWGDDEPGLNTPKVNQSGKVKTF **RCKQCEFSAVTKLEFWEHSRSHIKQERLLTCPKCPFVTEYKHHLEYHLRNH**FGSK  
**PFKCDKCSYSCVNSMLNSHLKSHSNVYQFRCSDCYATKYCHSLKHLRKYGH**SPAMVLNPDGSPNPLPIVDVYGRTR  
 GPKQKSKHDKQRSTSPQQSQSQRSQQSSPQQQQSQQQQVAAAMPLFNYPYLLPTQMPYYNILNGFSPFPFAQD  
 MRVDEKNNNIEKENSTDASDLSSPSKEETKPLDLTCTEQRMDDTPEPVLKNRRKGFALERIAIRLQQHSEDEEPE  
 QLITKPDYVPEQPCCKSPDIKSCDGDSEQHPAQQPQKPDFQNKVDDY **NCSYCDISFKDIVMYTMHMGYH**GYQDPFT **TCNM**  
**CGQQTTDKVAFFLHIARTSHS**

Fig 6|Representación gráfica del gen *gap Rp-hb*. (A) Esquema del gen. Los bloques negros representan exones, y las líneas que los unen intrones. Se aclara además la longitud de cada uno en pares de bases (pb). El bloque blanco ilustra la secuencia promotora, y la flecha el inicio de la transcripción. (B) Secuencia completa del gen. En negrita se marca la posible caja TATA promotora. Las secuencias correspondientes a los exones se marcan con la letra color azul. Se resalta en celeste al codón de inicio de traducción y en violeta al de stop. En verde se resaltan las secuencias correspondientes a los *primers*. Por último, se subraya la secuencia génica que actúa como señal de poli-adenilación e indica el fin de la transcripción. (C) Secuencia proteica codificada por el gen. Se resaltan en amarillo 8 dominios zinc fingers característicos de la proteína Hb, subrayando los residuos que les dan esta identidad (Extraída de Rolandelli, 2013).

Utilizando como molde ADNc sintetizado a partir de ARN de huevos de *R. prolixus* en diferentes tiempos de desarrollo, se llevó a cabo la amplificación de *Rp-hb* con la siguiente mezcla de reacción: *Buffer* (1x),  $MgCl_2$  (1,5mM), dNTPs (200 $\mu$ M), *primer Rv* (0,2 $\mu$ M), *primer Fw* (0,2 $\mu$ M), Taq ADN polimerasa (1U) (*Highway*, *INBIO*), 20-30ng molde y agua ultrapura estéril hasta completar un volumen de 20 $\mu$ l. El programa de amplificación utilizado fue:

1 min 95°C → 35 x [30seg 95°C → 30seg 60°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. En este caso se utilizó el mismo programa de amplificación descrito anteriormente.

Para corroborar el desempeño de la técnica, los amplímeros generados se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa 1% en *buffer* TBE (1X) a voltaje constante de 90V, utilizando bromuro de etidio como agente intercalante para la visualización en el transiluminador con cámara acoplada (*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* (*ThermoScientific*).

## ARN de interferencia parental

La técnica de interferencia por ARN (ARNi) es un método rápido y simple para inhibir la función de genes específicos, descubierta por primera vez en *C. elegans* (Fire *et al.*, 1998). 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. En muchas especies, la inyección de hembras adultas fértiles permite transmitir los efectos de la interferencia a su descendencia, al menos durante un periodo pos-inyección (Fire *et al.*, 1998; Hunter, 1999; Bucher *et al.*, 2002; Martínez & Tuschl, 2004). 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). 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 la expresión del gen (Martínez & Tuschl, 2004).

El ARNi es una metodología que se aplica regularmente en el campo de la genética de insectos para el estudio de la función, regulación y expresión de cascadas génicas, mayoritariamente en *D. melanogaster* (Miller *et al.*, 2008) y *Tribolium castaneum* (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 estas técnicas de genética reversa, se han logrado identificar en una amplia variedad de insectos, genes ortólogos a aquellos que conforman la red génica de la segmentación en *Drosophila*, como por ejemplo *Apis mellifera*, *Nasonia vitripennis*, *Tribolium castaneum*, *Grillus bimaculatus*, *Locusta migratoria*, *Oncopeltus fasciatus* y *Rhodnius prolixus*, entre otros (Hughes & Kaufman, 2000; Bucher *et al.*, 2002; Mito *et al.*, 2005; He *et al.*, 2006; Lynch & Desplan, 2010; Wilson & Dearden, 2011; Lavore *et al.*, 2012).

Para la obtención de embriones con fenotipos de falta de función para el gen *Rp-hb* se llevó a cabo el protocolo de interferencia parental con ARN (ARNi) desarrollado para *R. prolixus* (Lavore *et al.*, 2012), el cual permite evidenciar la pérdida de función genética en la progenie.

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 el *kit T7 RNA polymerase (New England Biolabs)*. La mezcla de reacción fue: *Buffer* de transcripción 1X, rNTP 2,5  $\mu$ M, inhibidor de ARNasas 40U (*RiboLock, Thermo Scientific*), molde de ADN 1 $\mu$ g, T7 ARN polimerasa 1U y agua ultrapura estéril hasta completar un volumen de 30 $\mu$ 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 Isoamilico en proporción 25:24:1 respectivamente) y luego una precipitación alcohólica del ARNdc, el cual se resuspendió en 11 $\mu$ l de agua ultrapura estéril. 1 $\mu$ l 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 (ThermoScientific)*.

Para la interferencia parental, se utilizaron hembras vírgenes de *R. prolixus*, 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). Estas hembras fueron inyectadas con el ARNdc en 2 cantidades diferentes (0,7 $\mu$ g y 2 $\mu$ g) para evaluar diferentes grados de penetrancia de la técnica. Las inyecciones se realizaron intracavitariamente, entre el segundo y tercer segmento abdominal, utilizando una jeringa Hamilton de 5 $\mu$ l. El volumen introducido osciló entre 1 y 4 $\mu$ l, dependiendo de la concentración inicial de la resuspensión de transcriptos y la cantidad de ARNdc deseada. Luego de la inyección, se dejó que las hembras se recuperaran del estrés durante 48 horas. Posteriormente se las alimentó para estimular el proceso de ovogénesis. Se las separó de acuerdo con el tratamiento aplicado y se las colocó junto con machos para el apareamiento, manteniendo las condiciones de cría *ex situ* previamente señaladas. Como control de la interferencia, se inyectaron hembras vírgenes con 1 $\mu$ g de ARNdc correspondiente al gen  $\beta$ -lactamasa ( $\beta$ -lac) de *Escherichia coli* bajo las mismas condiciones experimentales.

## **Manipulación de embriones. 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 del tratamiento y la fecha de puesta.

Una vez separados, se esperó hasta que los embriones completaran su desarrollo o detengan su crecimiento para evaluar la letalidad y/o analizar sus fenotipos, mediante la observación bajo lupa binocular estereoscópica Leica MZFLIII. Para facilitar la interpretación de los resultados, los fenotipos observados se agruparon en clases de acuerdo con características comunes.

En el caso de los embriones que detuvieron su desarrollo tempranamente, se procedió a la apertura de los huevos. Éstos fueron decorionados y devitilinizados manualmente 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. Estos embriones se analizaron bajo lupa (Leica MZFLIII) en busca de defectos en la segmentación. 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 colorante Hoechst (1:1000). 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 el colorante 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 Ism 710.

Aquellos embriones cuyo desarrollo se detuvo luego de completar la katatrepsis y el cierre dorsal (estadio de preninja) fueron fijados en PFA 4% y luego montados en medio Hoyer's (Nazar, 2016) sobre portaobjetos. Estos preparados se incubaron *overnight* a 60°C para que este medio disgregue y disuelva las partes blandas no quitinizadas del embrión y así perduren fijos de manera permanente. Por otro lado, los insectos que completaron su desarrollo y eclosionaron, pero presentaron fenotipos interferentes, fueron clarificados con potasa (KOH 1M) previo al montaje. De esta forma la cutícula resultante se montó en medio Hoyer's como se describió anteriormente, a fin de facilitar su análisis

en microscopio. Finalmente, los preparados fueron examinados en microscopio óptico (Primo Star - Zeiss) acoplado a una cámara, que se utilizó para la obtención de imágenes mediante el *software ZEN lite Digital Imaging*.

## RESULTADOS

### Interferencia del gen *hunchback* en *Rhodnius prolixus*

Con el objetivo de determinar el rol del gen *hunchback* durante el desarrollo de *R. prolixus*, se llevó a cabo la interferencia parental sobre 4 hembras, 3 inyectadas con una cantidad total de 2 µg de *hb*<sup>ARNdc</sup> y 1 con 0,7 µg de *hb*<sup>ARNdc</sup>. De esta manera, se consiguió silenciar la expresión de *Rp-hb* y así generar embriones con pérdida de función de este gen. Además, como control se inyectaron 2 hembras con 1 µg de *β-lac*<sup>ARNdc</sup>, de las cuales se hizo el seguimiento de la oviposición durante 40 días.

A partir de la interferencia parental de *Rp-hb* se obtuvieron un total de 296 embriones, de los cuales el 75,42% mostraron un fenotipo interferente (Tabla 1). Debido al gradiente fenotípico obtenido, estos embriones se pudieron agrupar según características comunes en 4 clases fenotípicas, ordenados desde los fenotipos leves a los más severos (Tabla 2).

	Total de embriones	Letales	Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV
<i>hb</i> <sup>ARNdc</sup>	700 ng	138	20 } 72 (82,48%)	9 } 23 (24,24%)	15 } 87 (7,74%)	94 } 115 (29,29%)
	2 µg	159	52 } (57,22%)	14 } (7,74%)	72 } (29,29%)	21 } (38,72%)
<i>βlac</i> <sup>ARNdc</sup>	1 µg	72	72 (100%)			

Tabla 1| Resultados de ARNi parental. Entre paréntesis se indica el porcentaje que representa cada clase sobre los 296 embriones que se analizaron en total entre los dos tratamientos. \*El porcentaje de letalidad se calculó sobre el total de embriones de cada tratamiento.

Tabla 2| Características fenotípicas de los embriones analizados en. \*Se consideró ninfa I con aspecto normal a aquellas que luego de ser alimentadas, mudaron al estadio ninfal II, no habiéndose observado alteraciones tanto morfológicas como fisiológicas.

Clase	Características fenotípicas
I	Ninfas I con aspecto normal. *
II	Ninfas I con desarrollo completo. Presencia de mandíbulas y maxilas. Segmento labial integrado a la cabeza, pero labio deforme.
III	Letales embrionarios tardíos. Segmento labial no integrado a la cabeza. Ausencia de labio; los apéndices labiales no se desarrollan correctamente. Ausencia de maxilas en la mayoría de los casos. Observación de defectos en extremidades torácicas, principalmente en segmentos T1 y T2.
IV	Letales embrionarios tempranos. Compactación corporal. A nivel torácico: ausencia de patas, principalmente en T1, algunas veces T2; en algunos casos presencia de patas bifurcadas. Pérdida de segmentos gnatales, principalmente segmentos mandibular y maxilar.

### La pérdida de función de *Rp-hb* altera la formación del aparato bucal

La característica que predomina en la pérdida de función de *Rp-hb* es la alteración morfológica de la proboscis. Esta característica es compartida por las clases II, III y IV, pero se hace más evidente en las clases II y III dado que el desarrollo del embrión permitió una mejor identificación de la falla. En todos los casos se observó, principalmente, el segmento labial afectado. Este segmento no logró desarrollar el labio de manera apropiada, imposibilitando así la formación adecuada del aparato bucal en su totalidad.

En la clase fenotípica II (7,74%) se observó el labio sin fusionar, ya sea parcial o totalmente. Por otro lado, los estiletes, tanto mandibulares como maxilares, se desarrollaron normalmente, pero quedando por fuera de esta estructura bucal deforme. El 70% de los individuos de esta clase pudo completar la eclosión de forma adecuada, pero dado a las fallas que presentaba su aparato bucal, no se pudieron alimentar. El resto tuvo inconvenientes al momento de la eclosión, no fueron capaces de completarla debidamente, por lo que resultaron letales. Dentro de esta clase se encontraron ninfas cuyas alteraciones bucales impidieron la correcta extensión de la cabeza (Fig. 7).

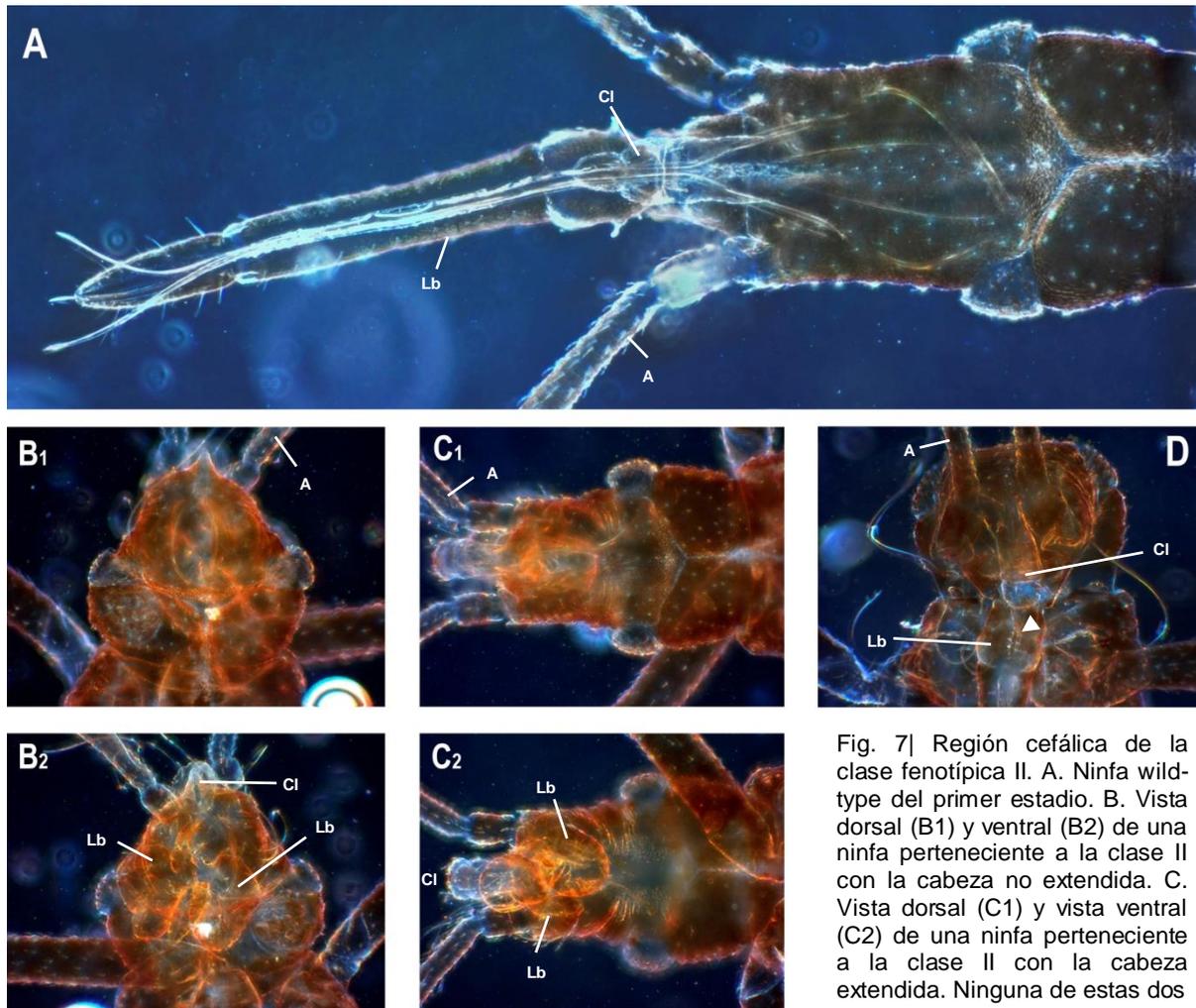


Fig. 7| Región cefálica de la clase fenotípica II. A. Ninfa wild-type del primer estadio. B. Vista dorsal (B1) y ventral (B2) de una ninfa perteneciente a la clase II con la cabeza no extendida. C. Vista dorsal (C1) y vista ventral (C2) de una ninfa perteneciente a la clase II con la cabeza extendida. Ninguna de estas dos ninfas tiene el labio fusionado. D. Preninfa cuyo labio se encuentra parcialmente fusionado. La punta de flecha indica la zona sin fusionar. (A, antena; Cl, cílopeo-labro; Lb, labio).

Por otra parte, los embriones agrupados en la clase fenotípica III se caracterizaron por el detenimiento de su desarrollo en instancias previas a la eclosión, quedando en estado de preninfas. En la mayoría de ellos se observó que el segmento labial quedaba por fuera de la cabeza, disponiéndose como un segmento adicional por encima del primer segmento torácico, mientras que en un reducido número esto no fue claro. En muy pocos casos, se encontró fusión del labio, pero en la gran mayoría los apéndices labiales no se desarrollaron completamente y en su lugar se observó un esbozo de estos (Fig. 8). Además, se pudieron observar en la zona del labro los estiletes mandibulares desarrollados adecuadamente, pero no extendidos como se esperaba. Aproximadamente en la mitad de los casos no se encontraron los estiletes maxilares.

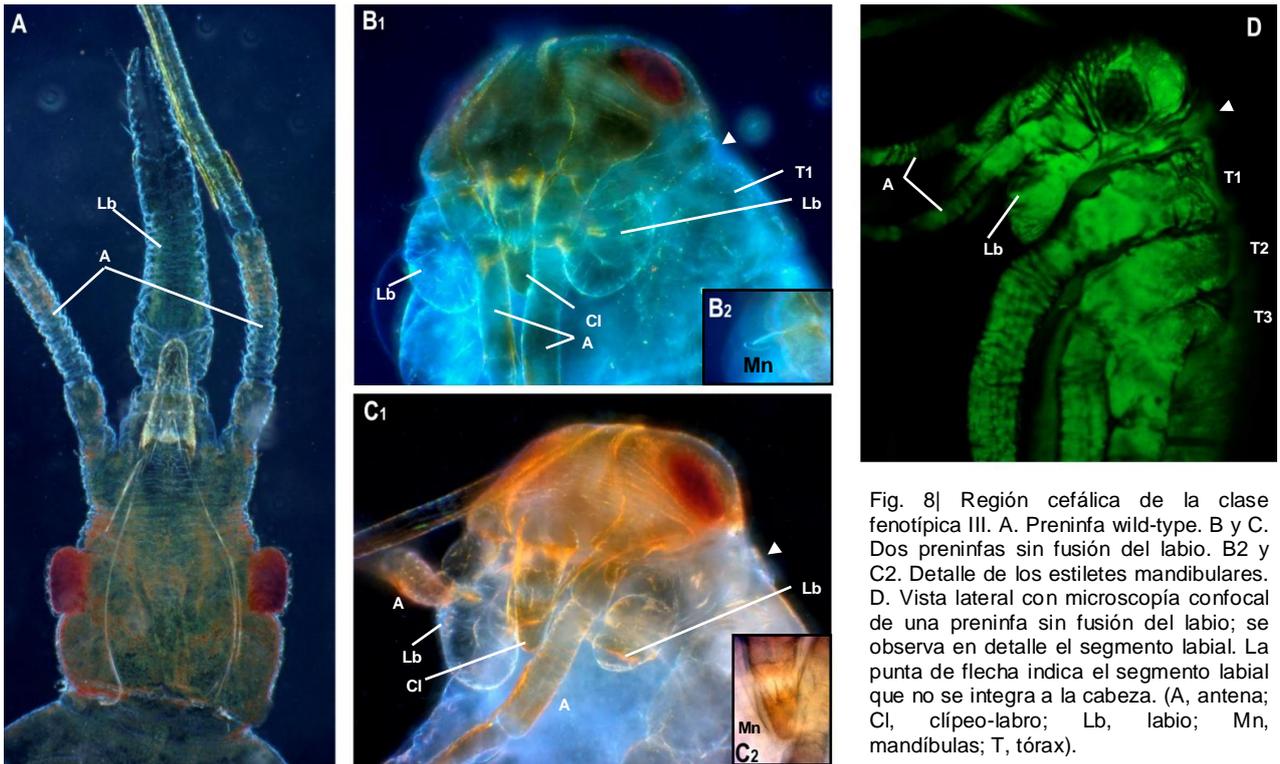


Fig. 8| Región cefálica de la clase fenotípica III. A. Preninfa wild-type. B y C. Dos preninfas sin fusión del labio. B2 y C2. Detalle de los estilotes mandibulares. D. Vista lateral con microscopía confocal de una preinfa sin fusión del labio; se observa en detalle el segmento labial. La punta de flecha indica el segmento labial que no se integra a la cabeza. (A, antena; Cl, clípeo-labro; Lb, labio; Mn, mandíbulas; T, tórax).

### ***Rp-hb<sup>ARNi</sup>* produce una severa desorganización embrionaria**

Conjuntamente a los defectos observados a nivel del aparato bucal descritos anteriormente, la pérdida de función de *Rp-hb* produjo defectos a nivel torácico y abdominal, que se acentuaron en las clases fenotípicas más severa.

Dentro de la clase III se clasificaron algunas preninfas cuyos segmentos torácicos presentaban diferentes alteraciones. Entre otras anomalías, se pueden destacar el desarrollo incompleto de los apéndices correspondientes al segmento torácico 1, quedando sólo un esbozo de estos, la presencia de patas bifurcadas, o dos patas desarrollándose a partir de la misma coxa, por lo general involucrando los segmentos torácicos 2 y 3 (Fig. 9). Además, a nivel abdominal, se observó una ventralización de los segmentos, donde el patrón cuticular del lado dorsal mostró un patrón similar al de la cutícula abdominal ventral.

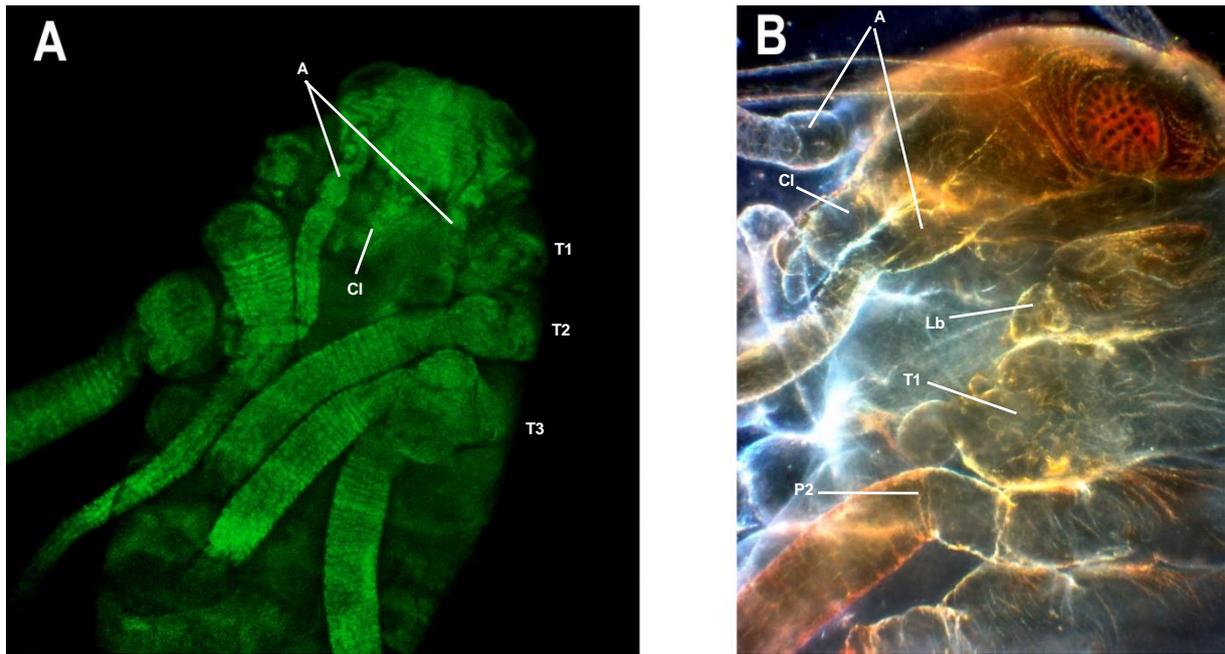


Fig. 9| Embriones de la clase fenotípica III con alteraciones del tórax. A. Imagen confocal de una preninja sin desarrollo de las patas correspondientes al segmento torácica 1. A partir de la coxa del segmento torácico 3 se desarrollaron 2 patas. Nótese además la ausencia de labio. B. Preninja sin desarrollo de labio ni pata de segmento torácico 1. (A, antena; Cl, cípeo-labro; Lb, segmento labial; P, pata; T, tórax).

La clase fenotípica más severa (clase IV) comprendió el 38,72% del total de embriones obtenidos durante el experimento de interferencia (Fig. 10). Estos detuvieron su desarrollo tempranamente, no pudiendo completar la katatrepsis y el cierre dorsal. Dado a su menor tamaño y al hecho de que los embriones mostraban un alto grado de compactación corporal en el eje A-P, su manipulación se dificultó, entorpeciendo así la descripción e interpretación de los segmentos más posteriores. En algunos de estos embriones se pudo contar la totalidad de los segmentos abdominales, no así en el resto de los casos, debido a la extrema deformación de los mismos. Dentro de esta clase fenotípica, se reconocieron claramente las estructuras correspondientes a la región prenatal (segmento antenal, ocular y el cípeo-labro). Por otro lado, en estos embriones se pudo apreciar la pérdida de segmentos gnatales (mandíbula, maxila y labio). Sólo en algunos embriones se observó un pequeño rudimento de los apéndices labiales (Fig. 10 C). Al igual que en algunos embriones de la clase III, se encontraron patas extremadamente deformes a partir del segundo y tercer segmento torácico, mientras que el primero parecería no haber desarrollado los apéndices de forma correcta (Fig. 10 B, C, D y E).

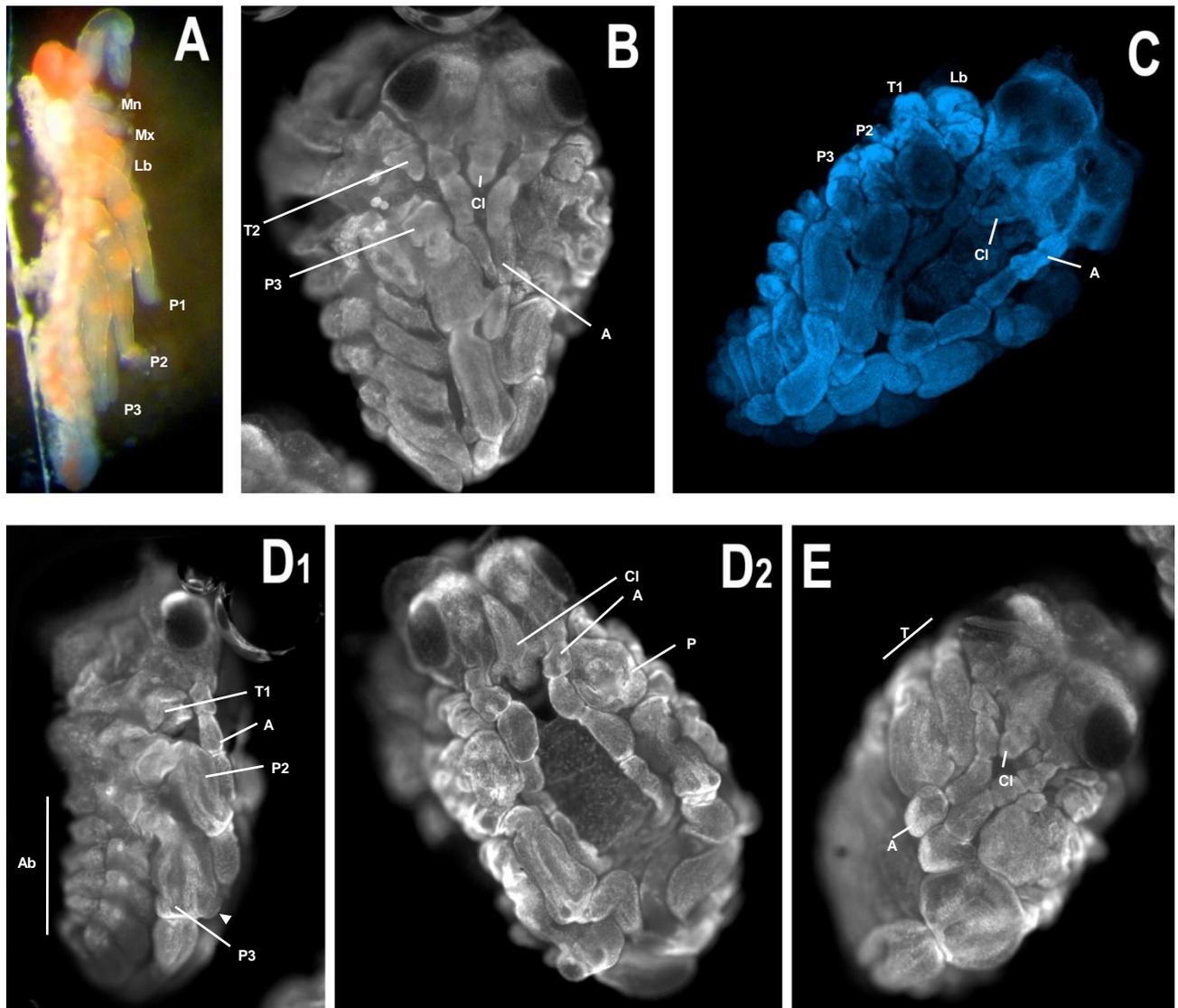


Fig. 10| Embriones de la clase fenotípica IV. A. Embrión wild-type en vista lateral. B, C, D y E. Imágenes de microscopía confocal de embriones pertenecientes a la clase fenotípica IV con diferentes alteraciones torácicas. La punta de flecha indica una posible bifurcación de la pata. Nótese la ausencia del segmento labial en la mayoría de ellos. (A, antena; Ab, abdomen; CI, cípeo-labro; Lb, segmento labial; Mn, segmento mandibular; Mx, segmento maxilar; P, pata; T, segmento torácico)

## DISCUSIÓN

### El fenotipo *gap* de *Rp-hb*

Nüsslein-Volhard & Wieschaus (1980) en su notable trabajo de *screening* por mutagénesis en la moscas de la fruta, determinaron que los defectos periódicos que causan la pérdida de varios segmentos consecutivos, caracterizan y definen a los genes *gap* como algunos de los determinantes más importantes durante la segmentación del cuerpo de los insectos. La mutación del gen *hunchback* en *D. melanogaster* se caracteriza

por la presencia de *gaps* en el patrón segmentario de la larva. El fenotipo más fuerte de los mutantes para este gen manifiesta la pérdida de los segmentos gnatales, torácicos y parte de los últimos abdominales (A7 posterior y A8 anterior) (Lehmann & Nüsslein-Volhard, 1987).

El rol de *hb* durante el desarrollo corporal ha sido evaluado en otros insectos por fuera de *D. melanogaster*. La interferencia de *hb* en *A. mellifera* dio lugar a una serie fenotípica que involucraba desde embriones que perdían todos los segmentos cefálicos y el octavo segmento abdominal, sumado a la fusión entre el último segmento torácico y el primero abdominal, hasta embriones que perdían todos los segmentos anteriores, torácicos y abdominales, quedando sólo compuestos por 2 o 3 de los segmentos más posteriores del abdomen (Wilson & Dearden, 2011). En el himenóptero *N. vitripennis*, la mutación del ortólogo de *hb*, produjo una delección en la región anterior de los embriones, involucrando los segmentos cefálicos y torácicos, además de la delección de los últimos 3 segmentos abdominales (Pultz, 2005). De esta manera, se puede considerar que la interrupción de *hb* en insectos de banda germinal larga conserva ciertas características comunes, derivando en pérdida de segmentos anteriores, así como de segmentos abdominales, consistentes con los dominios de expresión reportados para este gen.

Asimismo, los análisis funcionales de los ortólogos de *hb* llevados a cabo en insectos de banda germinal corta demostraron la persistencia de su función como gen *gap* en órdenes más basales: en *L. migratoria* los fenotipos más severos presentaron delecciones de grandes regiones corporales, abarcando desde los segmentos gnatales hasta segmentos abdominales (He *et al.*, 2006); en *Gryllus bimaculatus* la ausencia de segmentos se observó en una pequeña región de los embriones interferentes, abarcando desde la región posterior del primer segmento torácico hasta la región anterior del mesotórax (Mito *et al.*, 2005). Tanto en *O. fasciatus*, como en *T. castaneum*, la falta de función de *hb* no resultó en el clásico fenotipo *gap*, si no en una combinación de transformaciones homeóticas y pérdida de segmentos. En ambos casos, las alteraciones homeóticas involucraron los segmentos gnatales y torácicos, los cuales sufrieron un cambio de identidad hacia identidad abdominal; además, en estos dos organismos se pudo apreciar una extrema compactación del abdomen (Liu & Kaufman, 2004; Marques-Souza *et al.*, 2008).

En otros grupos de artropodos, como es el arácnido *Achaearanea tepidariorum*, la ausencia de *hb* derivó en la ausencia de los segmentos L1-L2 y el segmento L4, demostrando nuevamente la intervención de *hb* en el en el correcto establecimiento de la región medio-anterior de esta araña (Schwager *et al.*, 2009)

En esta tesis, los embriones con fenotipo interferente para *Rp-hb* se agruparon en diferentes clases, de acuerdo con el grado de severidad que estos presentaban. La funcionalidad como gen *gap* de *Rp-hb* se manifestó claramente en los embriones agrupados en la clase IV, en los cuales se observó la ausencia de los segmentos gnatales (mandíbula, maxila y labio) y, en algunos casos, también el primer segmento torácico. El hecho de que los segmentos Mx y Lb son los más afectados en la gran mayoría de los embriones interferidos, nos da la pauta que la acción de *Rp-hb* se estaría centrando principalmente en esos segmentos. Dicho fenotipo se asemeja a lo observado y mencionado anteriormente en otros insectos. Cabe destacar que otra característica notable que se observó en estos embriones fue una clara compactación corporal, acentuada principalmente en los segmentos abdominales. No fue posible comprobar si esta compactación fue debida a la pérdida de segmentos, como sucede en *T. castaneum*, *D. melanogaster*, *N. vitripennis*, *G. bimaculatus* (Lehmann & Nüsslein-Volhard, 1987; Marques-Souza *et al.*, 2008; Mito *et al.*, 2005; Pultz, 2005) o al detenimiento prematuro de la extensión de la banda germinal, como aparentemente ocurre en *O. fasciatus* y *L. migratoria* (Liu & Kaufma, 2004; He *et al.*, 2006).

### **Regulación de otros genes *gap***

A diferencia de otros genes *gap*, *hb* es un gen de expresión tanto materna como cigótica en *D. melanogaster*. La expresión cigótica de *hb* es inducida por *Bcd*, estableciéndose un gradiente de *hb* a lo largo del eje A-P, cuya mayor concentración se restringe a la región anterior del embrión (Rivera-Pomar & Jäckle, 1996). De esta forma, *hb* actúa como un morfógeno, capaz de activar y reprimir otros genes *gap* en base a su concentración. Por ejemplo, diferentes concentraciones de *hb* determinan los límites anteriores y posteriores del gen *Krüppel* (*Kr*): altas concentraciones de *hb* reprimen la expresión de *Kr* en la región anterior mientras que las bajas concentraciones inducen su transcripción en la zona central del embrión (regulación dual) (Schulz & Tautz, 1994; Papatsenko & Levine, 2008), donde se hace efectiva su actividad como regulador génico.

A su vez, *hb* actúa como un fuerte represor del gen *gap gt*: el borde anterior del dominio de expresión posterior de *gt* se establece gracias a que el gradiente de la proteína HB se encuentra en bajas concentraciones (Struhl *et al.*, 1992).

La regulación de *Kr* por parte de *hb* también ha sido reportada en otras especies. En *T. castaneum* se encontró que el dominio de expresión de *Tc-Kr*, establecido en los 3 segmentos torácicos, depende de la presencia de *Tc-hb*, ya que en los embriones *Tc-hb<sup>ARNi</sup>* esta región corporal se encontró altamente reducida o incluso ausente; a su vez, y en contraste con *D. melanogaster*, los autores sugieren que *Tc-hb* actúa como activador de *Tc-gt*, al menos de forma indirecta, ya que durante la interferencia de *Tc-hb* los segmentos posteriores que deberían expresar *Tc-gt* (desde el metatórax al segundo segmento abdominal) están parcialmente fusionados (Marques-Souza *et al.*, 2008). Asimismo, en *G. bimaculatus* el dominio de expresión de *Gb-Kr* en la región torácica se vio seriamente afectado en los embriones *Gb-hb<sup>ARNi</sup>*, encontrándose desde reducido hasta completamente suprimido en algunos casos, sugiriendo de este modo que *Gb-hb* estaría implicado de forma directa o indirecta en la regulación transcripcional de *Gb-Kr* (Mito *et al.*, 2005).

Recientemente, el análisis fenotípico de la doble interferencia para *Kr* y *hb* en *Bombyx mori* demostró el posible rol de ambos genes en la formación y adición de los segmentos posteriores. Mientras que la interferencia para *Bm-hb* produce la aparición de segmentos extra en la región abdominal de los embriones (segmentos supernumerarios), *Bm-Kr<sup>ARNi</sup>* genera el detenimiento de la segmentación, resultando en la ausencia o fusión de los segmentos torácicos posteriores y abdominales. Los embriones con el doble *knockdown* de estos genes, a pesar de que presentaron otras anomalías, restituyeron el normal establecimiento de los segmentos abdominales, por lo que el autor señala la posibilidad de que *Bm-Kr* actué como represor de *Bm-hb* en la región posterior del cuerpo (Nakao, 2016).

En trabajos previos, realizados por Lavore y colaboradores (2012, 2014) se estudiaron los patrones de expresión de los genes *Rp-Kr* y *Rp-gt* en embriones de *R. prolixus* y los fenotipos resultantes de su pérdida de función. Por un lado, se encontró que *Rp-gt* posee dos dominios de expresión a lo largo del eje (A-P) del embrión: un dominio posterior, y uno anterior, que, a su vez, se divide en dos, uno más anterior y uno que se

ubica en el centro. Mediante la interferencia de este gen se demostró que su función es requerida para la formación de la región más anterior de la cabeza, las maxilas, mandíbulas y el abdomen. En los embriones *Rp-gt<sup>ARNi</sup>* se observó el normal desarrollo de la proboscis, pero con ausencia de los estiletes mandibulares y maxilares; además, también se observó la reducción del clípeo-labro. En adición a lo observado en la región anterior de los embriones, muchos de ellos mostraron alteraciones a nivel abdominal, con fusión de segmentos en los fenotipos más leves y ausencia de estos en los fenotipos más severos (Lavore *et al.*, 2012). Es importante mencionar que en ninguna de las clases fenotípicas analizadas durante la interferencia para *Rp-hb*, se encontraron alteraciones en los segmentos más anteriores de la región cefálica, esto es, segmento ocular, intercalar, antenal y clípeo-labro. Estas estructuras siempre se desarrollaron correctamente. Por otro lado, el hecho de que los segmentos mandibulares y maxilares se hayan visto seriamente afectados en los fenotipos más severos nos sugiere que en esa región *Rp-hb* podría estar actuando como activador directo o indirecto de *Rp-gt*.

Por otro lado, se determinó que *Rp-Kr* se expresa en la mitad anterior del embrión, con mayor intensidad en la zona torácica-abdominal (Lavore *et al.*, 2014). En los insectos con fenotipos de falta de función más leve para *Rp-Kr*, se observaron de forma recurrente defectos a nivel torácico: mientras que los apéndices del primer y segundo segmento torácico se encontraron reducidos, el apéndice correspondiente al metatórax directamente no se formó. Los defectos en estos embriones se acentúan hacia la región posterior del tórax. Por otro lado, en los embriones con fenotipo más aberrante, todos los apéndices torácicos también se encontraron muy reducidos o ausentes, sumado a la fusión del segundo y/o tercer segmento torácico con el primero y/o segundo abdominal, lo que se corresponde con el dominio de expresión de *Rp-Kr* (Lavore *et al.*, 2014). El análisis fenotípico en los embriones *Rp-hb<sup>ARNi</sup>* mostró que los defectos por la ausencia de este gen se concentraban en la región anterior de los embriones, abarcando desde el segmento mandibular hasta la porción media del tórax. En base a lo observado en la interferencia de *Rp-Kr*, podríamos sugerir la posibilidad de una función activadora (directa o indirecta) de *Rp-hb* sobre *Rp-Kr* en la región media del embrión. Futuros experimentos de hibridación *in situ* permitirán conocer los dominios donde se expresa *Rp-hb*, y con ello comprobar el posible rol regulatorio de este gen sobre otros genes *gap*, lo cual excede los objetivos de esta tesis.

## ***hb* como regulador de genes *Hox***

Los genes *Hox*, también conocidos como genes homeóticos, han sido caracterizados como los determinantes de la identidad segmentaria en diferentes grupos animales (Akam, 1987; Bachiller *et al.*, 1994). Dentro del complejo *Antennapedia*, se sabe que los genes *proboscipedia* (*pb*) y *Sex combs reduced* (*Scr*) están implicados en la determinación de la identidad labial. El dominio de expresión de *pb* se establece en los segmentos maxilar y labial, mientras que *Scr* se expresa en el extremo posterior del segmento maxilar y a través del segmento labial hasta la región anterior del protórax (Hughes & Kaufman, 2002). Estos dominios de expresión se conservan en otros insectos, como en *T. castaneum* y *O. fasciatus*, entre otros (DeCamillis *et al.*, 2001; Rogers *et al.*, 2002). Ambos genes se han identificado en el genoma de *R. prolixus*, y, mediante ensayos de expresión e interferencia, se ha demostrado que *Rp-Scr* conserva los dominios de expresión y su rol de gen *Hox* descrito en otros insectos (Esponda-Behrens, 2013).

Numerosos estudios proponen que *hb* regula la expresión de genes *Hox* durante el desarrollo de diferentes organismos. Tanto en *T. castaneum*, como en *O. fasciatus* y *G. bimaculatus* se ha observado que la ausencia de *hb* produce la expresión ectópica de los genes *Antp*, *Ubx* y *AbdA*, portándole identidad abdominal a los segmentos gnatales y torácicos (Liu & Kaufma, 2004; Mito *et al.*, 2005; Marques-Souza *et al.*, 2008). Esta expansión de los dominios de expresión de los *Hox* hacia la región anterior también fue demostrada en *B. mori*, donde no se observó el cambio a identidad abdominal, pero si la morfología torácica en el apéndice que correspondería al labio (Nakao, 2016). Alternativamente, en *D. melanogaster* se identificaron alelos de *hb* que, además del fenotipo *gap*, muestran transformaciones homeóticas. En los mutantes que portan los alelos *hb*<sup>9K57</sup> y *hb*<sup>14C</sup>, los dos segmentos gnatales anteriores, así como el primer segmento abdominal, adquieren identidad abdominal posterior (Lehmann & Nüsslein-Volhard, 1987). En este trabajo, el defecto más relevante observado sobre la región gnatal en las clases fenotípicas II y III de *Rp-hb*<sup>ARNi</sup> fue la imposibilidad de formar correctamente la proboscis, ya que, por un lado, en muchos embriones *Rp-hb*<sup>ARNi</sup> el segmento labial quedó excluido del tagma cefálico y los apéndices desarrollados por este no se fusionaron debidamente. Una posibilidad es que *Rp-hb* actúa, de forma directa o indirecta, como activador homeótico de genes, como *pb* y *Scr*, para determinar la correcta identidad del labio. Cabe

mencionar que no se observaron defectos en los peines tibiales del primer par de patas en las ninfas de la clase II, por lo que podría no haber tanta incidencia de *Rp-hb* sobre *Rp-Scr*. Por otra parte, las modificaciones observadas en los apéndices torácicos también podrían deberse a cambios homeóticos en esa región, en función a la ausencia de *Rp-hb*. Con esta información, ¿podemos afirmar que en los embriones interferidos para *Rp-hb*, los apéndices desarrollados en el segmento labial corresponden a un labio o a una pata (estructuralmente hablando)? ¿Podemos, además, hablar de cambios homeóticos a nivel torácico cuando se pierde la función de este gen? La respuesta obvia a estas preguntas es no. Para llegar a una conclusión de esta naturaleza se necesitaría hacer un análisis genético-funcional más profundo, indagando la función de *Rp-hb* sobre los genes homeóticos del complejo *Antennapedia*, lo que nos permitiría desentrañar aún más los mecanismos regulatorios que actúan en la determinación del patrón corporal de *R. prolixus*.

En esta tesis se realizó la descripción detallada del fenotipo *gap* de del gen *hunchback* en *Rhodnius prolixus*, sumando valiosa información en lo referente al proceso de segmentación durante el desarrollo embrionario de este importante insecto, vector de la enfermedad de Chagas. Como dato remarcable, se puede destacar que la desorganización generalizada que sufren los embriones interferidos durante el desarrollo lleva a que la cabeza (centro sensorial y de la alimentación) no logre formarse adecuadamente, en la cual el segmento labial no es incorporado a su conformación típica. Estos datos abren la puerta a nuevos trabajos en el campo de la genética del desarrollo para analizar de qué forma *Rp-hb* actúa en la formación normal del cuerpo, fruto de su interacción, directa o indirecta, con otros genes *gap* y homeóticos, esperando, de esta manera, poder generar un modelo de regulación del proceso de segmentación en *R. prolixus*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Akam, M. (1987) 'The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo.', *Development*, 101(1), pp. 1–22. doi: citeulike-article-id:10064978.
- Angelini, D. R. and Kaufman, T. C. (2004) 'Functional analyses in the hemipteran *Oncopeltus fasciatus* reveal conserved and derived aspects of appendage patterning in insects', *Developmental Biology*, 271(2), pp. 306–321. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.04.005.
- Angelini, D. R. and Kaufman, T. C. (2005) 'Insect appendages and comparative ontogenetics', *Developmental Biology*, 286(1), pp. 57–77. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.07.006.
- Bachiller, D. *et al.* (1994) 'Conservation of a functional hierarchy between mammalian and insect Hox/HOM genes', *The EMBO journal*, 13(8), pp. 1930–1941. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7909514>.
- Berleth, T. *et al.* (1988) 'The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the *Drosophila* embryo.', *The EMBO journal*, 7(6), pp. 1749–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2901954><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC457163>.
- Bucher, G., Scholten, J. and Klingler, M. (2002) 'Parental RNAi in tribolium (coleoptera)', *Current Biology*. doi: 10.1016/S0960-9822(02)00666-8.
- Casares, F. and Sánchez-Herrero, E. (1995) 'Regulation of the infraabdominal regions of the bithorax complex of *Drosophila* by gap genes.', *Development (Cambridge, England)*, 121(6), pp. 1855–1866.
- Coura, J. R. and 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), pp. 286–296. doi: 10.1590/S0037-86822012000300002.
- Davis, G. K. and Patel, N. H. (2002) 'Short, long, and Beyond: Molecular and Embryological approaches to insect Segmentation', *Annual review of entomology*, 47, pp. 660–699.
- DeCamillis, M. A. *et al.* (2001) 'Interactions of the *Tribolium* Sex combs reduced and

proboscipedia orthologs in embryonic labial development', *Genetics*, 159(4), pp. 1643–1648.

Driever, W. and Nüsslein-Volhard, C. (1989) 'The bicoid protein is a positive regulator of hunchback transcription in the early *Drosophila* embryo.', *Nature*, pp. 138–143. doi: 10.1038/337138a0.

Elbashir, S. M. *et al.* (2001) 'RNA interference is mediated 1- and 22-nucleotide RNAs', *Genes Dev.*, 15, pp. 188–200. doi: 10.1101/gad.862301.vents.

Esponda-Behrens, N. I. (2013) *Estudios funcionales comparados de la evolución de la segmentación en insectos.*

Essig, E. O. (1942) *College Entomology*. Macmillan. Available at: <https://books.google.com.ar/books?id=TIEgAQAAMAAJ>.

Fire, A. *et al.* (1998) 'Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*', *Nature*, 391(6669), pp. 806–811. doi: 10.1038/35888.

Frigerio, G. *et al.* (1986) 'Structure of the segmentation gene paired and the *Drosophila* PRD gene set as part of a gene network', *Cell*, 47(5), pp. 735–746. doi: 10.1016/0092-8674(86)90516-7.

Hammond, S. M. *et al.* (2000) 'An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells', *Nature*, 404(6775), pp. 293–296. doi: 10.1038/35005107.

He, Z. B. *et al.* (2006) 'Role of hunchback in segment patterning of *Locusta migratoria manilensis* revealed by parental RNAi', *Development Growth and Differentiation*, 48(7), pp. 439–445. doi: 10.1111/j.1440-169X.2006.00881.x.

Hughes, C. L. and Kaufman, T. C. (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 (Cambridge, England)*, 127(17), pp. 3683–3694.

Hughes, C. L. and Kaufman, T. C. (2002) 'Hox genes and the evolution of the arthropod body plan1', *Evolution and Development*, 4(6), pp. 459–499. doi: 10.1046/j.1525-

142X.2002.02034.x.

Hunter, C. P. (1999) 'Genetics: A touch of elegance with RNAi', *Current Biology*, 9(12). doi: 10.1016/S0960-9822(99)80276-0.

Jäckle, H. *et al.* (1992) 'Transcriptional control by *Drosophila* gap genes.', *Journal of cell science. Supplement*, 16, pp. 39–51.

Johnston, D. S. and Nüsslein-Volhard, C. (1992) 'The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo', *Cell*, pp. 201–219. doi: 10.1016/0092-8674(92)90466-P.

Kelly, G. M. and Huebner, E. (1989) 'Embryonic development of the hemipteran insect *Rhodnius prolixus*', *Journal of Morphology*, 199(2), pp. 175–196. doi: 10.1002/jmor.1051990205.

Krause, G. (1939) *Die Eitypen der Insekten*. Thieme.

Lavore, A. *et al.* (2012) 'The gap gene giant of *Rhodnius prolixus* is maternally expressed and required for proper head and abdomen formation', *Developmental Biology*, 361(1), pp. 147–155. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.06.038.

Lavore, A. *et al.* (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), pp. 121–129. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.12.030.

Lavore, A. *et al.* (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, pp. 32–43. doi: 10.1016/j.ibmb.2015.06.012.

Lavore, A. E. (2012) *Análisis genómico-funcional de la embriología de *Rhodnius prolixus* (Stähl, 1859) (Hemiptera, Reduviidae)*. Universidad Nacional de La Plata - Facultad de Ciencias Naturales y Museo. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.06.038.I.

Lehmann, R. and Nüsslein-Volhard, C. (1987) 'hunchback, a gene required for segmentation of an anterior and posterior region of the *Drosophila* embryo', *Developmental Biology*, 119(2), pp. 402–417. doi: 10.1016/0012-1606(87)90045-5.

- Lewis, E. B. (1978) 'A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*', *Nature* 276:565-570, 276(5688), pp. 565–570. Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/v276/n5688/abs/276565a0.html>.
- Liu, P. Z. and Kaufman, T. C. (2004) 'hunchback is required for suppression of abdominal identity, and for proper germband growth and segmentation in the intermediate germband insect *Oncopeltus fasciatus*', *Development*, 131(7), pp. 1515–1527. doi: 10.1242/dev.01046.
- Liu, P. Z. and Kaufman, T. C. (2005) 'Short and long germ segmentation: Unanswered questions in the evolution of a developmental mode', *Evolution and Development*, 7(6), pp. 629–646. doi: 10.1111/j.1525-142X.2005.05066.x.
- Lynch, J. A. and Desplan, C. (2010) 'Novel modes of localization and function of nanos in the wasp *Nasonia*', *Development*, 137(22), pp. 3813–3821. doi: 10.1242/dev.054213.
- Marques-Souza, H., Aranda, M. and Tautz, D. (2008) 'Delimiting the conserved features of hunchback function for the trunk organization of insects', *Development*, 135(5), pp. 881–888. doi: 10.1242/dev.018317.
- Martinez, J. and Tuschl, T. (2004) 'RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease', *Genes and Development*, 18(9), pp. 975–980. doi: 10.1101/gad.1187904.
- Mellanby, H. (1935) 'The Later Embryology of *Rhodnius prolixus* .', *Ebryology of Rhodnius*, (313), pp. 1–40.
- Mellanby, H. (1934) 'The Early Embryonic Development of *Rhodnius prolixus* ( Hemiptera , Heteroptera ).', *Development of Rhodnius*, pp. 71–90.
- Mesquita, R. D. *et al.* (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), pp. 14936–14941. doi: 10.1073/pnas.1506226112.
- Miller, S. C., Brown, S. J. and Tomoyasu, Y. (2008) 'Larval RNAi in *Drosophila*?', *Development Genes and Evolution*, 218(9), pp. 505–510. doi: 10.1007/s00427-008-0238-8.

Mito, T. *et al.* (2005) 'Non-canonical functions of hunchback in segment patterning of the intermediate germ cricket *Gryllus bimaculatus*.', *Development (Cambridge, England)*, 132(9), pp. 2069–2079. doi: 10.1242/dev.01784.

Nakao, H. (2016) 'Hunchback knockdown induces supernumerary segment formation in *Bombyx*', *Developmental Biology*, 413(2), pp. 207–216. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.03.024.

Nazar, A. P. (2016) *Morfometría geométrica aplicada al análisis fenotípico del gen empty spiracles en Rhodnius prolixus* *Morfometría geométrica aplicada al análisis fenotípico del gen empty spiracles en Rhodnius prolixus*.

Nüsslein-volhard, C. and Wieschaus, E. (1980) 'Mutations affecting segment number and polarity in drosophila', *Nature*, 287(5785), pp. 795–801. doi: 10.1038/287795a0.

Pagola, L. E. (2012) *Análisis genómico y molecular de la embriogénesis de Rhodnius prolixus (Stähl, 1859) (Hemíptera, Reduviidae): implicancias morfológico-evolutivas en insectos*.

Papatsenko, D. and Levine, M. S. (2008) 'Dual regulation by the Hunchback gradient in the *Drosophila* embryo', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), pp. 2901–2906. doi: 10.1073/pnas.0711941105.

Patel, N. H. *et al.* (2001) 'Grasshopper hunchback expression reveals conserved and novel aspects of axis formation and segmentation.', *Development (Cambridge, England)*, 128(18), pp. 3459–3472.

Peel, A. D., Chipman, A. D. and Akam, M. (2005) 'Arthropod segmentation: Beyond the *Drosophila* paradigm', *Nature Reviews Genetics*, 6(12), pp. 905–916. doi: 10.1038/nrg1724.

Pinnell, J. *et al.* (2006) 'The divergent roles of the segmentation gene hunchback', *Integrative and Comparative Biology*, 46(4), pp. 519–532. doi: 10.1093/icb/icj054.

Posnien, N. *et al.* (2010) 'Genetics, development and composition of the insect head - A beetle's view', *Arthropod Structure and Development*, pp. 399–410. doi: 10.1016/j.asd.2010.08.002.

- Pultz, M. A. (2005) 'A major role for zygotic hunchback in patterning the *Nasonia* embryo', *Development*, 132(16), pp. 3705–3715. doi: 10.1242/dev.01939.
- Pultz, M. a, Pitt, J. N. and Alto, N. M. (1999) 'Extensive zygotic control of the anteroposterior axis in the wasp *Nasonia vitripennis*.', *Development (Cambridge, England)*, 126, pp. 701–710.
- Rivera-Pomar, R. and Jäckle, H. (1996) 'From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: Filling in the gaps', *Trends in Genetics*, pp. 478–483. doi: 10.1016/0168-9525(96)10044-5.
- Rivera-Pomar, R. and Jäckle, H. (1996) 'From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: filling in the gaps', *Trends in Genetics*, 12(11), pp. 478–483. doi: 10.1016/0168-9525(96)10044-5.
- Rogers, B. T., Peterson, M. D. and Kaufman, T. C. (2002) 'The development and evolution of insect mouthparts as revealed by the expression patterns of gnathocephalic genes', *Evolution and Development*, 4(2), pp. 96–110. doi: 10.1046/j.1525-142X.2002.01065.x.
- Rolandelli, A. (2013) *Identificación y análisis funcional del gen Hunchback de Rhodnius prolixus , un insecto de banda germinal intermedia , vector de la enfermedad de Chagas. Tesis de Licenciatura. Pergamino, Argentina. Universidad Nacional del Noroeste de la Prov.de Buenos Aires.*
- Rosenberg, M. I., Lynch, J. A. and Desplan, C. (2009) 'Heads and tails: Evolution of antero-posterior patterning in insects', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier B.V., 1789(4), pp. 333–342. doi: 10.1016/j.bbagr.2008.09.007.
- Sauer, F. *et al.* (1996) 'TAF(II)s mediate activation of transcription in the *Drosophila* embryo', *Cell*, 87(7), pp. 1271–1284. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81822-X.
- Schofield, C. J. (1979) 'The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): a review', *Bulletin of Entomological Research*, 69(3), p. 363. doi: 10.1017/S0007485300018897.
- Schofield, C. J. and Galvão, C. (2009) 'Classification, evolution, and species groups within the Triatominae', *Acta Tropica*, 110(2–3), pp. 88–100. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.01.010.

- Schröder, R. (2003) 'The genes orthodenticle and hunchback substitute for bicoid in the beetle *Tribolium*', *Nature*, 422(6932), pp. 621–625. doi: 10.1038/nature01536.
- Schulz, C. and Tautz, D. (1994) 'Autonomous concentration-dependent activation and repression of Krüppel by hunchback in the *Drosophila* embryo.', *Development (Cambridge, England)*, 120(10), pp. 3043–3049.
- Schwager, E. E. *et al.* (2009) 'hunchback Functions as a Segmentation Gene in the Spider *Achaearanea tepidariorum*', *Current Biology*, 19(16), pp. 1333–1340. doi: 10.1016/j.cub.2009.06.061.
- Simpson-Brose, M., Treisman, J. and Desplan, C. (1994) 'Synergy between the hunchback and bicoid morphogens is required for anterior patterning in *Drosophila*', *Cell*, 78(5), pp. 855–865. doi: 10.1016/S0092-8674(94)90622-X.
- Snodgrass, R. E. (1935) *Principles of insect morphology. Principles of Insect Morphology.*
- Struhl, G., Johnston, P. and Lawrence, P. A. (1992) 'Control of *Drosophila* body pattern by the hunchback morphogen gradient', *Cell*, 69(2), pp. 237–249. doi: 10.1016/0092-8674(92)90405-2.
- Struhl, G., Struhl, K. and Macdonald, P. M. (1989) 'The gradient morphogen bicoid is a concentration-dependent transcriptional activator', *Cell*, 57(7), pp. 1259–1273. doi: 10.1016/0092-8674(89)90062-7.
- Tautz, D. (1988) 'Regulation of the *Drosophila* segmentation gene hunchback by two maternal morphogenetic centres.', *Nature*, pp. 281–4. doi: 10.1038/332281a0.
- Tomoyasu, Y. and Denell, R. E. (2004) 'Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development', *Development Genes and Evolution*, 214(11), pp. 575–578. doi: 10.1007/s00427-004-0434-0.
- Turner, F. R. and Mahowald, A. P. (1979) 'Scanning electron microscopy of *Drosophila melanogaster* embryogenesis: III. Formation of the head and caudal segments', *Developmental Biology. Academic Press*, 68(1), pp. 96–109. doi: 10.1016/0012-1606(79)90246-X.

Vazquez-Prokopec, G. M. *et al.* (2012) 'Spatial Heterogeneity and Risk Maps of Community Infestation by *Triatoma infestans* in Rural Northwestern Argentina', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8). doi: 10.1371/journal.pntd.0001788.

Wilson, M. J. and Dearden, P. K. (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), pp. 3497–3507. doi: 10.1242/dev.067926.

Wu, X. *et al.* (2001) 'Thoracic patterning by the drosophila gap gene *hunchback*', *Developmental Biology*, 237(1), pp. 79–92. doi: 10.1006/dbio.2001.0355.