

**Estudio de la expresión de genes codificantes de neuropéptidos y sus receptores durante el desarrollo embrionario de *Oncopeltus fasciatus*.**



**Carrera**

**Licenciatura en Genética**

**Director: Rolando Rivera Pomar**

**CoDirector: Agustín Baricalla**

**Lugar de trabajo: Centro de Bioinvestigaciones (CeBio) - Pergamino**

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

# **Agradecimientos**

"Somos lo que queremos ser"

Mi mamá a los 12 años me preguntó: ¿qué querés ser cuando seas grande?  
Y sin titubear ni dudarlo dije CIENTÍFICA.

Tengo un profundo amor y pasión por la ciencia, y doy gracias principalmente a la Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires por brindarme una educación gratuita y de excelente calidad, permitiendome ir por el camino que desde chica siempre soñé.

Gracias a mi gran amor Mateo, mi hijo. Desde los dos años vió a su mamá estudiar, y siempre entendió todo.

Infinitas gracias a mi familia, mis papas, Lorena y Fabián que me explicaron siempre las ventajas de estudiar y me ayudaron en absolutamente todo. Sin ellos no hubiese sido posible nada de esto.

Mis hermanos Sol, Pablo y Lucas por creer en mí.

¡Los amo!

Gracias a los amigos que la facultad me dio, que me abrieron las puertas de su casa para hacer todo este trayecto más leve, compartiendo risas y llantos también.

Gracias a mi gran amiga Azucena que siempre tuvo las palabras justas de aliento.

A mi director Rolando Rivera, mi admiración por él me hizo llegar al lugar donde estoy hoy en día.

A mi co director Agustín Baricalla por ser mi mentor y ayudarme en todo lo que estaba a su alcance.

GRACIAS.

!!!Y POR FIN SOY LO QUE QUISE SER, GENETISTA!!!

# Resumen

Los componentes del Sistema Nervioso Central (SNC) de los insectos se ensamblan durante el desarrollo embrionario, y han sido extensamente estudiados en *Drosophila melanogaster*, un insecto holometábolo. Por el contrario, es poco aún lo que se conoce sobre la neurogénesis embrionaria de los insectos hemimetábolos. *Oncopeltus fasciatus* es un insecto hemimetábolo perteneciente al orden Hemiptera, cuyo genoma ha sido secuenciado, ensamblado y anotado (Panfilio, 2019). Los neuropéptidos son moléculas de señalización que representan buenos marcadores de diferenciación neuronal, si bien no todos los neuropéptidos se expresan en neuronas. El neuropeptidoma ha sido caracterizado en el cerebro adulto a partir de datos de secuenciación de ARNm y espectrometría de masas, observándose la presencia de ARNm codificantes de neuropéptidos en transcriptomas derivados de embriones tempranos de *O. fasciatus* (Baricalla, 2020). En este trabajo final de grado se profundizan dichos estudios mostrando la presencia de receptores en transcriptomas embrionarios y la presencia de los ARNm codificantes de neuropéptidos en una serie temporal que abarca todo el desarrollo embrionario de *O. fasciatus*. Este trabajo final de grado provee la validación experimental de la presencia de dichos mensajeros en embriones y representa una prueba de concepto fundamental para continuar una línea de investigación novedosa y nunca estudiada de manera sistemática en ningún organismo.

# Introducción

## LOS INSECTOS COMO MODELO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA

Desde hace décadas, se utilizan diferentes organismos para diversos estudios en una amplia variedad de campos. Los organismos modelo son aquellos que nos dan una visión particular de ciertos fenómenos biológicos, con la expectativa de que los descubrimientos realizados puedan permitir comprender el funcionamiento de otros organismos (Leonelli & Ankeny, 2013). De los organismos disponibles para el estudio biológico, *D. melanogaster*, un insecto que es el eucariota mejor conocido, ha tenido un papel preponderante para entender, desde la genética, procesos comunes a muchos otros organismos, incluido el ser humano. Esto se debe a la facilidad que surge de la cría controlada en laboratorios, la alta tasa de reproducción, los cortos ciclos y su fácil manipulación en estudios a nivel genético, fisiológico y bioquímico. Sin embargo, en algunos aspectos presenta limitaciones por ser un organismo evolutivamente muy derivado (Roberts, 2006).

Los componentes del Sistema Nervioso Central (SNC) de los insectos se ensamblan durante el desarrollo embrionario, y han sido extensamente estudiados en *D. melanogaster*, un insecto holometábolo (Truman & Bate, 1988). Por el contrario, es poco aún lo que se conoce sobre la neurogénesis embrionaria de los insectos de metamorfosis incompleta, mayormente por investigaciones en la formación de las comisuras segmentarias en la langosta *Schistocerca gregaria* (Bate, 1976; Bate & Grunewald, 1981; Thompson & Siegler, 1993; Boyan et al., 1997). La desventaja del estudio en insectos holometábolos es que durante el desarrollo embrionario se forman tejidos larvarios, los que luego sufren significativos cambios durante la metamorfosis al estado adulto. En cambio, en los hemimetábolos, al no sufrir metamorfosis completa, el ensamblado de los tejidos y órganos durante la embriogénesis resulta en estructuras idénticas o muy similares a las adultas. (Yang, 2001). En el caso de la formación del sistema nervioso, el conocimiento básico de la neurogénesis en hemimetábolos es relevante para identificar componentes de uno de los principales tejidos blancos de insecticidas.

Como todos los hemípteros, *O. fasciatus* es un insecto de banda germinal intermedia, una condición más cercana al estado ancestral de los insectos, por ser compartida ampliamente en los distintos órdenes. El proceso de formación del embrión, en especial la segmentación de estos insectos, es fundamentalmente diferente de la segmentación en *D. melanogaster*, un díptero derivado con embriogénesis de banda germinal completa (Auman, T. and Chipman, A., 2018).

Las ventajas de utilizar a *O. fasciatus* como modelo para estudios de embriogénesis son:

- 1- Fácil cría.
- 2- Embriogénesis de 8 días a 25°C.
- 3- Genoma secuenciado y en gran medida anotado.
- 4- Protocolos establecidos para el estudio de función génica por ARNi.

*O. fasciatus* tiene una larga historia como animal de laboratorio en muchas disciplinas biológicas. Desde mediados del siglo XX, *O. fasciatus* es un organismo de laboratorio extremadamente popular debido a su facilidad de crianza y a su tolerancia a distintas condiciones ambientales, sumado a que es un insecto inocuo. *O. fasciatus* permitió responder una amplia gama de preguntas dentro de la entomología y la fisiología, que van desde la digestión y la alimentación, pasando por el desarrollo, la toxicología y endocrinología. A partir de estudios en este insecto se establecieron conceptos fundamentales de la embriología, como el concepto de segmento y parasegmento (Lawrence 1969, 1975), luego desarrollado desde el punto de vista genético en *D. melanogaster*, organismo que lo reemplazó como modelo de estudio de procesos embriológicos (Morata & Lawrence, 2022). En los últimos años se ha producido un renacer del estudio de *O. fasciatus* como modelo de desarrollo embrionario, con el desarrollo de distintas técnicas de genética reversa y de análisis de la expresión genética, lo cual se ha ampliado con la reciente secuenciación de su genoma (Liu & Kaufman, 2009; Chipman, 2017 ;Panfilio, 2019)

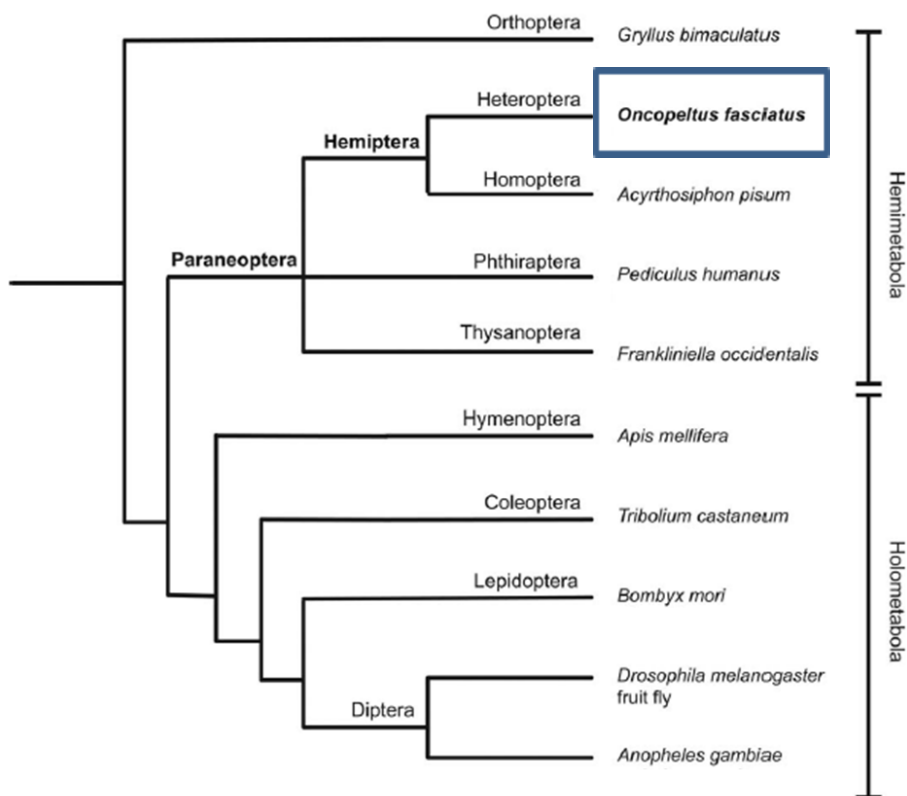
## **TAXONOMÍA Y FILOGENIA**

*O. fasciatus* es una de las especies del género *Oncopeltus*, miembro de la familia *Lygaeidae* dentro del orden Hemiptera (Figura 1). Los hemípteros son el taxón más biodiverso dentro de los hemimetábolos. Forma parte del superorden Paraneoptera (también conocido como hemipteroides). La mayoría de las filogenias sitúan a los paraneópteros como un grupo hermano de los holometábolos. Todos los hemípteros comparten las mismas piezas bucales perforadoras y succionadoras, sin embargo, se han diversificado para explotar fuentes de alimentos que van desde semillas, tejidos vegetales, savia o sangre de vertebrados. A raíz de ese tipo de alimentación muchos hemípteros son plagas agrícolas o vectores de enfermedades en vegetales o animales (Panfilio & Angelini, 2017).

La posición filogenética de *O. fasciatus* lo hace un organismo ideal para estudiar los eventos de desarrollo en la base de la separación de los holometábolos. Su importancia radica en que los hemípteros constituyen un grupo externo a los holometábolos, que en el caso de *D. melanogaster*, han



sido estudiados en detalle y pueden actuar como un punto de referencia para cambios de polarización dentro de Holometabola. La ubicación filogenética de *O. fasciatus* lo transforma en una especie muy útil para comprender la evolución de algunos programas de desarrollo, desde el punto de vista de la embriología evolutiva, pero también para poder comprender estructuras adultas que son difíciles de interpretar en insectos que sufren metamorfosis completa (Chipman, 2017).

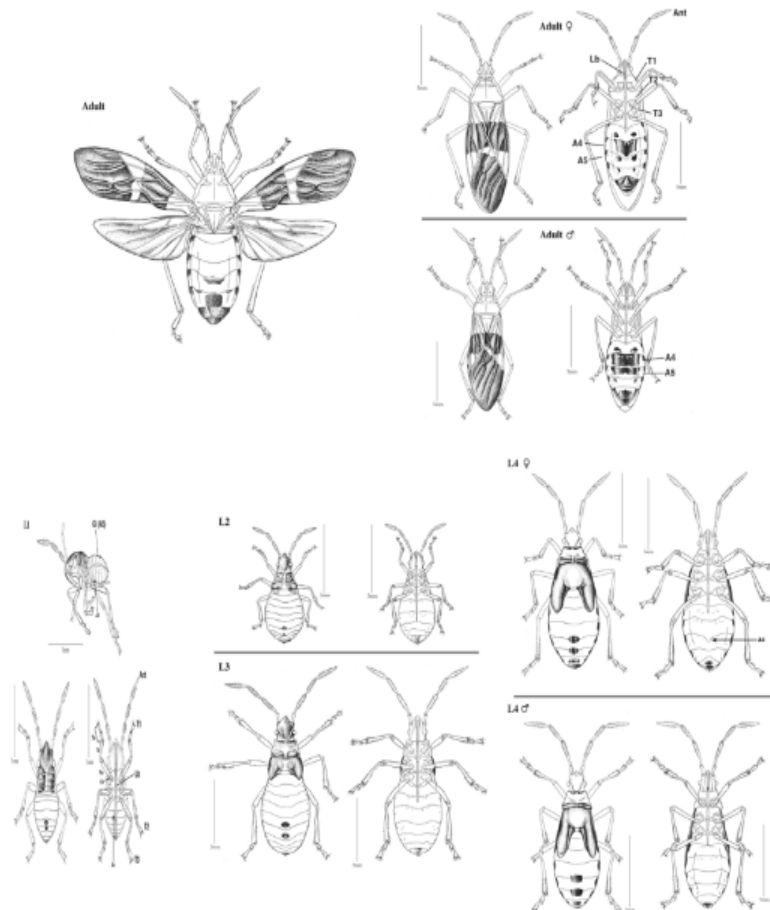


**Figura 1:** Árbol filogenético de los insectos, que muestra la posición de *O. fasciatus* dentro del contexto de los principales órdenes. (Chipman, 2017)

## REPRODUCCIÓN Y CICLO DE VIDA

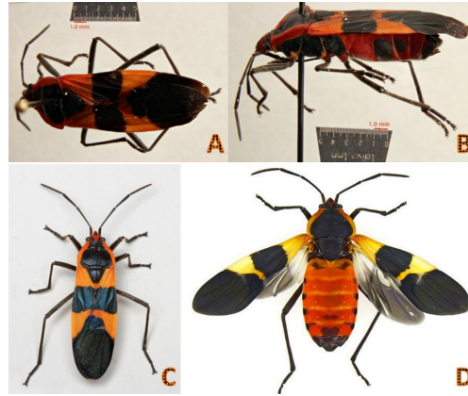
Al igual que todos los insectos del orden Hemiptera, *O. fasciatus* pasa por estadíos de pequeños cambios durante su crecimiento, con 4 estadíos larvales y una etapa adulta (figura 2). El ciclo completo de vida dura entre 30 y 90 días. Las chinches hembras son receptivas sexualmente pocos días después de su última muda. La camada, o cantidad de huevos en cada puesta por las hembras, depende especialmente de la región geográfica donde habita la

chinche. Las condiciones climáticas favorables para la reproducción de la chinche son las tropicales. (Ewen-Campen et al., 2013)



**Figura 2.** El ciclo de vida de *O. fasciatus* incluye cuatro etapas larvales (L1 a L4) y una etapa adulta. Los individuos alcanzan la diferenciación sexual en la etapa adulta, pero los sexos pueden reconocerse de manera confiable en L4. Se indican Antena (Ant); labio (Lb); segmentos torácicos (T1, T2, T3); abdomen(A) ; tarso (Tar); tibia (Tb); fémur (Fm); coxa (Cx). tomado de Liu & Kaufman (2009).

Los sexos del adulto son fáciles de distinguir. En el quinto estadio larval la hembra tiene manchas negras ventrales en los dos últimos segmentos abdominales, mientras que el macho tiene una sola mancha negra en el último segmento (figura 3). Sin embargo, no es un método completamente confiable si no se tienen condiciones de cría controladas, ya que el patrón de color puede variar con la temperatura.



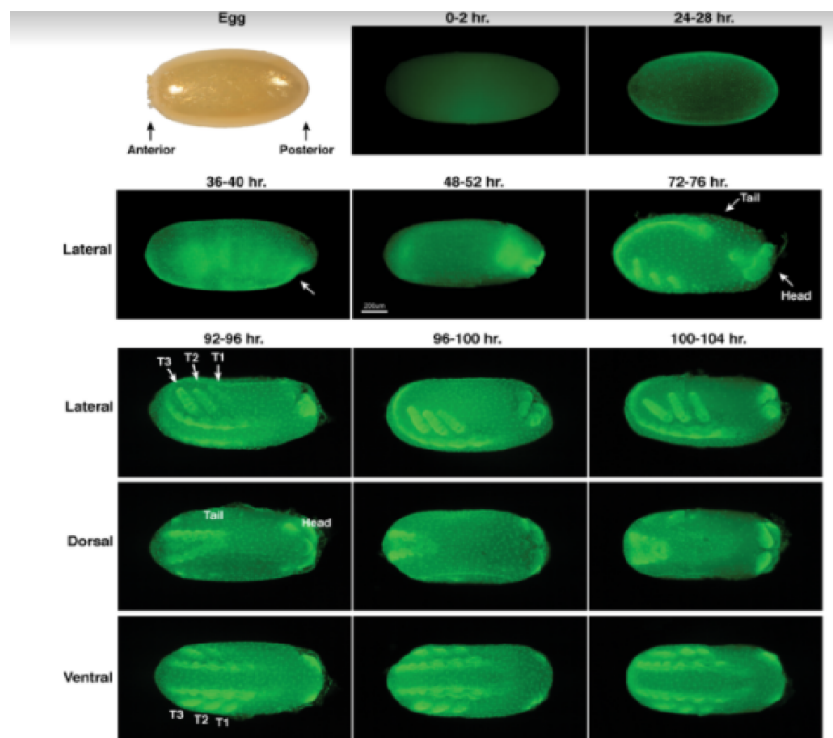
**Figura 3:** Fotografías de *O. fasciatus*. A y C- Dorsal. B- Lateral. D- Dorsal con alas abiertas. Imagen tomada de <https://eol.org/pages/74463/media>

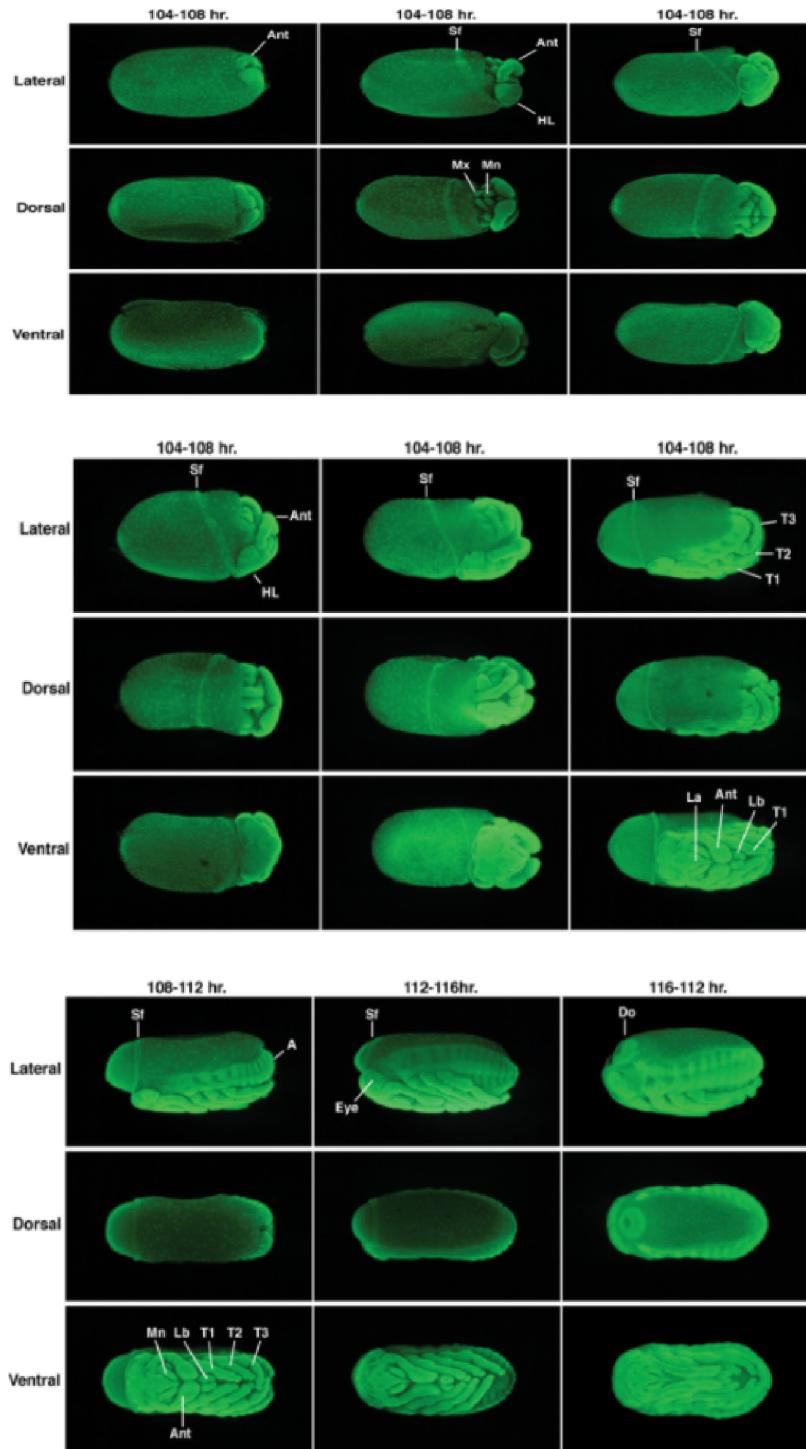
El momento del primer apareamiento depende de la temperatura, pero es aproximadamente de 5 a 12 días después de la eclosión para la hembra, y de 2 a 3 días para el macho. La duración de la cópula es desde menos de una hora hasta las diez horas en que los dos sexos permanecen unidos físicamente para la transferencia de esperma. El aumento de la oviposición debido al apareamiento se manifiesta durante las dos semanas posteriores a la primera cópula. Después de un apareamiento, las hembras almacenan los espermatozoides durante 4-5 semanas, y luego hay una rápida disminución de la fertilidad que se restaura rápidamente después de otro apareamiento. Las hembras de *O. fasciatus* ponen de 10 a 25 huevos en camadas. El inicio de la puesta de huevos está fuertemente influenciado por el fotoperiodo y la densidad de la población y, en gran medida, por la temperatura. (Feir, 1974)

## **DESARROLLO EMBRIONARIO DE *O. FASCIATUS***

Durante la oviposición, los huevos son fertilizados y, fusionados los pronúcleos, del cigoto transcurre divisiones nucleares sin división de citoplasma. Los núcleos migran hacia la superficie del huevo formando así el blastodermo sincicial. A 25°C, entre las 18 y 34 horas, se forman las membranas celulares dividiendo el embrión en células, dando lugar a la formación del blastodermo celular, en la cual ya están determinados los ejes anteroposterior y dorsoventral. Las células del blastodermo celular realizan varias rondas adicionales de mitosis aumentando el número. Alrededor de las 30 h, se forman dos regiones de mayor densidad celular en la superficie del blastodermo, las "placas laterales". Estas pasan a formar la banda germinal, mientras que las

células restantes contribuyen al tejido extraembrionario, la serosa. Luego de las 34 horas, comienza la gastrulación: las células que forman la banda germinal se invaginan formando un tubo que extiende su región anterior hacia el polo posterior del huevo, un proceso denominado anatrepsis. El tubo está compuesto por el embrión propiamente dicho (banda germinal o *Anlage embrionario*) y una capa de células que forman el amnios, parte de los tejidos extraembrionarios. En el polo posterior de la banda germinal se diferencia una zona de alta proliferación celular, la zona de crecimiento, a partir del cual se forman de manera secuencial los segmentos del embrión. A medida que aumenta el número de segmentos adicionados en el polo posterior se diferencian secuencialmente la cabeza, el tórax (ambos reconocidos por la formación de apéndices) y el abdomen. Hacia el final de la embriogénesis, cuando todos los segmentos se formaron y los tagmas del cuerpo están definidos (banda germinal extendida), el embrión sufre un movimiento que invierten su polaridad con respecto polaridad del huevo, denominados catatrepsis. Luego de la catatrepsis ocurre el cierre dorsal y se completa la organogénesis y diferenciación tisular, previo a la emergencia de la larva (Figura 4; Liu & Kaufman, 2009), (tabla 1).





**Figura 4:** Formación del blastodermo y blastocinesis. Todas las imágenes están orientadas de manera que el polo anterior del huevo quede hacia la izquierda. La flecha en la foto de 36 a 40 h indica el sitio de invaginación. Al final de la invaginación y el crecimiento (72 h), la banda germinal se encuentra a lo largo del lado ventral del huevo con el embrión orientado con la cabeza en el polo posterior del huevo y el abdomen curvado hacia de la superficie posterior y dorsal del huevo. Durante la catatrepsis (92-104 h), el embrión invierte la orientación ubicando la cabeza en la región posterior del huevo. (Sf) pliegue seroso; (HL) lóbulos de la cabeza; (Ant) antena; (La) labrum; (Mn) mandíbula; (Mx) maxilar; (Lb) labio; (T1, T2, T3) segmentos torácicos; (A) abdomen; (Do) órgano dorsal. “Egg” indica huevo, “head” indica cabeza. (Figura tomada de Liu & Kaufman, 2009)

Horas post- oviposición	Desarrollo
0-24	0-6 División y migración de núcleos
	6-24 Formación del blastodermo sincital, inicio de la formación del blastodermo celular
24-48	Formación del blastodermo celular, inicio de la formación de la banda germinal. Anatrepsis.
48-72	Extensión de la banda germinal
72-96	Retracción de la banda germinal. Katatrepsis.
96-120	Cierre dorsal e inicio de organogénesis
120-144	Finalización de diferenciación y organogénesis. Eclosión.

**Tabla 1:** Resumen del desarrollo, desde la postura del huevo indicando los principales eventos del desarrollo en el que se encuentra el embrión. Estos eventos son los que se tomaron como referencia para los experimentos realizados en este trabajo final de grado.

## EL SISTEMA NERVIOSO DE ONCOPELTUS FASCIATUS.

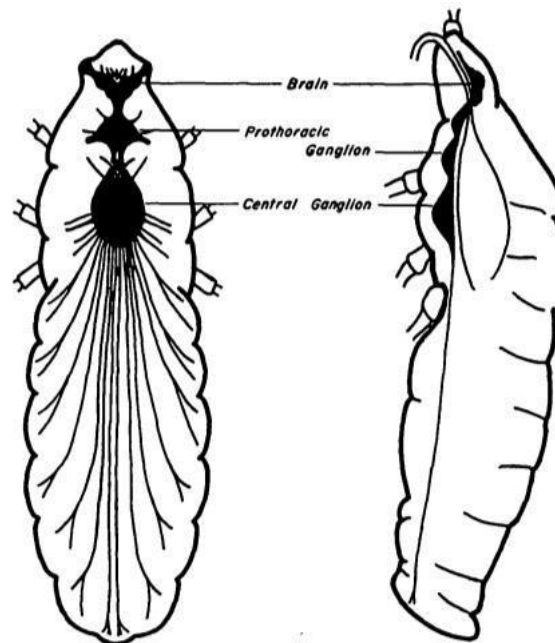
Los estudios del sistema nervioso de *O. fasciatus* tienen más de 70 años (Rutschky & Stryjak 1955; Johansson, 1957), con algunos aportes en la detección de células neurosecretoras (Mahon & Nair, 1975; Unnithan & Nair, 1977; Liechty & Sedlak, 1978) lo que muestra que es un área de investigación olvidada que requiere una urgente actualización. En base a los estudios morfológicos e histológicos, el SNC de *O. fasciatus* está concentrado en la cabeza y el tórax y la cadena ganglionar ventral del abdomen (figura 5).

Cerebro/ganglio supraesofágico: es el centro ganglionar dorsal de la cabeza y ocupa la mitad posterior de la cápsula de la cabeza. Se encuentra justo por encima del esófago y extiende los nervios ópticos hasta la retina de los ojos compuestos. Está dividido en tres regiones denominadas protocerebro, deutocerebro y tritocerebro. El protocerebro es la porción dorsal más grande de la masa cerebral, y consiste en los lóbulos protocerebrales y ópticos. El deutocerebro está representado por el ganglios del segmento antenarior:

1- Ganglio subesofágico: se encuentra directamente debajo del cerebro. De este ganglio surgen cinco pares de nervios: cuatro pares de la superficie ventral y la quinta desde la superficie dorsal.

2- Ganglio protorácico: es de forma ovoide, y es el primer ganglio de la cadena nerviosa ventral. Este ganglio se encuentra entre las endosternitas del primer par de patas, en la cavidad protorácica. Da lugar a tres pares de nervios.

3- Ganglio central: es la masa ganglionar ovalada y prominente situada en la cavidad mesotorácica. Este es el último ganglio de la cadena nerviosa ventral, y comprende los ganglios de los segmentos mesotorácico, metatorácico y abdominal. Desde este ganglio se extienden dos nervios hacia el séptimo segmento abdominal, ramificándose para inervar el aparato genital.



**Figura 5:** Esquema de la anatomía del cerebro y ganglios de *O. fasciatus*. Se muestran el cerebro (Brain) en la mitad posterior de la cápsula cefálica, el ganglio protorácico (Prothoracic Ganglion) entre las endosternitas del primer par de patas y el ganglio central (Central Ganglion) en la cavidad mesotorácica. (Figura tomada de Rutschky & Stryjak, 1955.)

El sistema simpático de la cabeza está conectado directamente con el cerebro. Es dorsal en posición, por encima de la faringe y formado, en parte, por la estructura en forma de arco del tejido nervioso. Conecta los lóbulos antenales del cerebro; este arco se compone de las raíces del ganglio frontal. El ganglio frontal da lugar a un nervio mediano delgado, el nervio frontal, y un nervio mediano delgado. Los nervios laterales estomatogástricos se extienden desde las raíces del ganglio frontal, cerca de su unión con los lóbulos de las antenas. Este complejo de nervios estomatogástricos probablemente inerva el aparato faríngeo, y controla los movimientos peristálticos del esófago. (Rutschky & Stryjak, 1955)

## NEUROPEPTIDOS

Los neuropéptidos en insectos actúan como neuromoduladores en el sistema nervioso central y periférico y como hormonas reguladoras liberadas en la circulación. No todos los neuropéptidos son generados a partir del sistema nervioso, sino que se producen y señalizan desde diferentes tejidos. Las funciones de los neuropéptidos de insectos abarcan la regulación de la homeostasis, la organización del comportamiento, la iniciación y coordinación de los procesos de desarrollo y la modulación de la actividad neuronal y muscular. Otra característica emergente de muchos neuropéptidos de insectos es que parecen ser multifuncionales. Un mismo péptido puede actuar tanto en el SNC como en una hormona circulante y desempeñar diferentes funciones funcionales en diferentes objetivos centrales y periféricos. (Nässel, 2002). En los insectos se conocen diversas funciones de los péptidos hormonales en la diapausa, la reproducción, el desarrollo, la osmorregulación, el metabolismo, la síntesis de pigmentos y el cambio de color, así como en la regulación del músculo esquelético, cardíaco y visceral. Además, se ha demostrado que algunos neuropéptidos son importantes en la regulación de comportamientos específicos, por ejemplo, la hormona de la eclosión y los péptidos cardioaceleratorios. (Nässel, 1993).

El número total de secuencias de neuropéptidos conocidas en diferentes insectos supera las 100. Estos péptidos se pueden clasificar en unos 20 grupos o familias basados en la similitud de sus secuencias de aminoácidos (Ons, 2017). A la fecha existen relativamente pocos reportes documentados acerca de los neuropéptidos y su función en *O. fasciatus*. En los primeros estudios se describe la localización en el SNC y el efecto fisiológico de hormona diurética DH31 (Te Brugge & Orchard, 2008). Luego, un nuevo estudio se limita a la describir la secuencia de taquicinina y allatotropina identificada mediante espectrometría de masas (Neupert et al. 2009). Durante el proceso de secuenciación y anotación del genoma completo de *O. fasciatus*, nuestro grupo procedió a la anotación preliminar de genes de neuropéptidos mediante homología de secuencia. Finalmente, Baricalla (2021) realizó una revisión de esta anotación mediante la integración de datos transcriptómicos y proteómicos, con los cuales se procederá a trabajar en este trabajo (tabla 2).

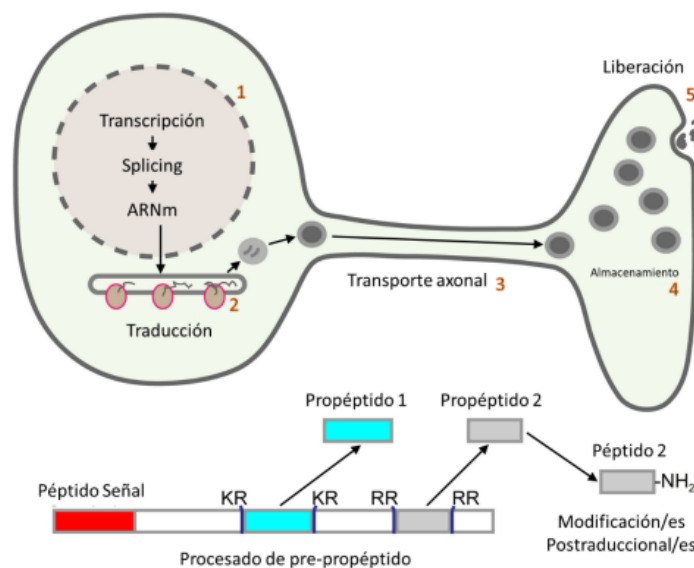


Neuropéptido	Abreviatura	Neuropéptido	Abreviatura
Allatotatina A	AstA	Miosupresina	MS
Allatotatina B	AstB	Neuroigin	Nlg
Allatotatina CC	AstCC	Neuroparsina	NPAA
Allatotatina CCC	AstCCC	Neuroparsina 1	NP1
Allatotropina	AT	Neuroparsina 2	NP2
Bursicona	Burs	Neuroparsina 3	NP3
Bursicona-beta	pBurs	Neuroparsina 4	NP4
CCH-amida	CCH	Neuropéptido activador de la biosíntesis de feromonas	PBAN
CNM-amida	CNM	Neuropéptido F largo	NPF
Corazonina	Crz	NVP	NVP
Elevenin	Elv	Orcokinina	OK
Factor dispersante de pigmentos	PDF	Péptido Cardioactivo de crustáceos	CCAP
Factor liberador de corticotropina- DH44	DH44	Péptido C-terminal	c-Ter
FMRF-amida	FMRFa	Péptido relacionado con la insulina 1	ILP1
Glicoproteína alfa 2	GPA2	Péptido relacionado con la insulina 2	ILP2
Glicoproteína alfa 5	GPB5	Péptido transportador de iones	ITP
Hormona proracicotrópica	PTTH	Proctolin	Proc
Hormona Adipoquinética	AKH	Proteína tipo Neuropéptido	NPLP
Hormona de eclosión	EH	Ry-amida	Rya
Hormona disparadora de la ecdisis	ETH	SIF-amida	SIFa
Hormona diurética DH31	DH31	SNF- Neuropéptido F corto	sNPF
ITG	ITG	Sulfaquinina	SK
Kinina	Kin	Taquicinina	TK

**Tabla 2.** Neuropéptidos estudiados y la abreviatura utilizada en este trabajo.

## EXPRESIÓN Y SÍNTESIS DE NEUROPEPTIDOS.

Los neuropeptidos y las hormonas peptídicas se producen a partir de la transcripción y traducción de pre-propéptidos dentro de una vía secretoria regulada. (Elphick et al., 2018). Las proteínas precursoras son dirigidas hacia el lumen del retículo endoplasmático rugoso, gracias a que llevan un péptido señal N-terminal. El péptido señal es clivado y la proteína resultante se modifica para ser exportada al aparato de Golgi, donde es empaquetada en vesículas de secreción. Dentro de la red trans-Golgi, los pro-péptidos se procesan por la acción de proteasas específicas (furinas, convertasas y carboxipeptidasas). El proceso de clivaje del propéptido a un péptido activo se inicia en sitios dibásicos y el péptido resultante es sometido a la acción de otras enzimas que realizan la remoción de aminoácidos terminales y modificaciones postraduccionales (amidación del extremo C-terminal, oxidaciones y acetilaciones, Veenstra, 2000) (figura 6).



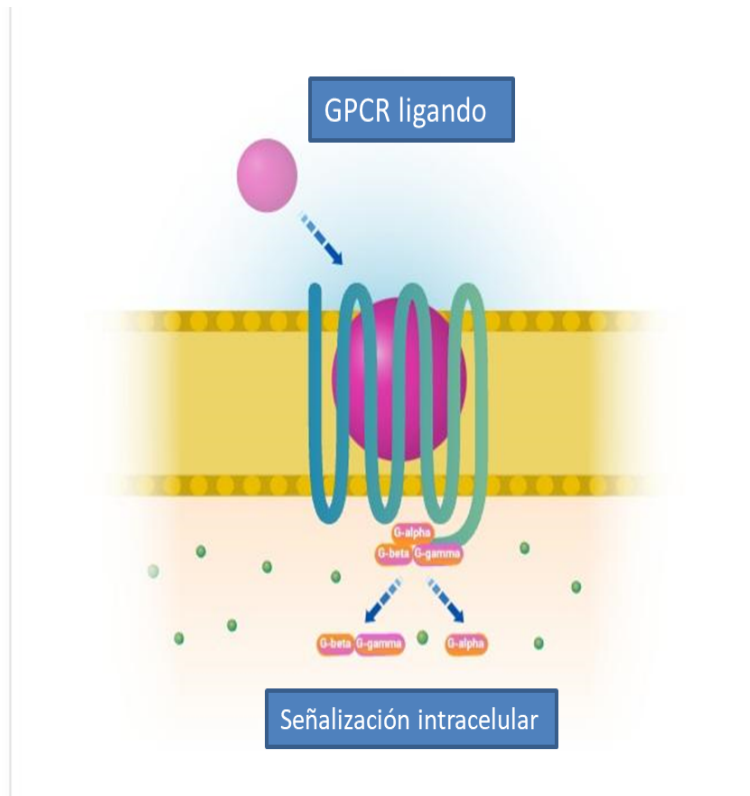
**Figura 6:** Proceso de expresión y maduración de neuropeptidos. Se indican los procesos de transcripción, maduración y exportación del ARN mensajero maduro en el núcleo (1), la traducción en ribosomas del retículo endoplasmático (RE) rugoso guiada por el péptido señal (2), el procesamiento, transporte axonal y almacenamiento en vesículas densas del aparato de Golgi (3-4) para su posterior liberación extracelular (5). En la parte inferior se visualiza un pre-propéptido en proceso de maduración. Este se transloca perdiendo su péptido señal (rojo) de localización en el RE, posteriormente es clivado en sitios dibásicos de escisión (KR y RR, K=Lisina, R=Arginina), produciendo dos pro-péptidos (gris y celeste) y finalmente es modificado a péptido 2 -NH<sub>2</sub>(péptido amidado). (Modificado de Nässel, 1993)

## **LOS RECEPTORES DE NEUROPEPTIDOS.**

Los neuropéptidos ejercen sus funciones fisiológicas al interactuar con receptores de membrana transductores de señales específicas, lo que da como resultado respuestas intracelulares. La mayoría de estos receptores de neuropéptidos pertenecen a los receptores acoplados a proteína G (GPCR), la familia más grande de proteínas de superficie celular (Caers et al., 2012). Sin embargo, hay algunas excepciones como la hormona protoracicotrópica (PTTH), que ejecuta su papel en la metamorfosis a través de la activación de un receptor tirosina quinasa (RTK). La mayoría de los péptidos similares a la insulina (ILP) también interactúan con RTK. La hormona de eclosión (EH), involucrada en la ecdisis, interactúa con un receptor de guanilato ciclasa, unido a la membrana al igual que el péptido precursor similar al neuropéptido 1 (NPLP1) (Xu et al., 2020).

### Receptores acoplados a proteína G (GPCRs)

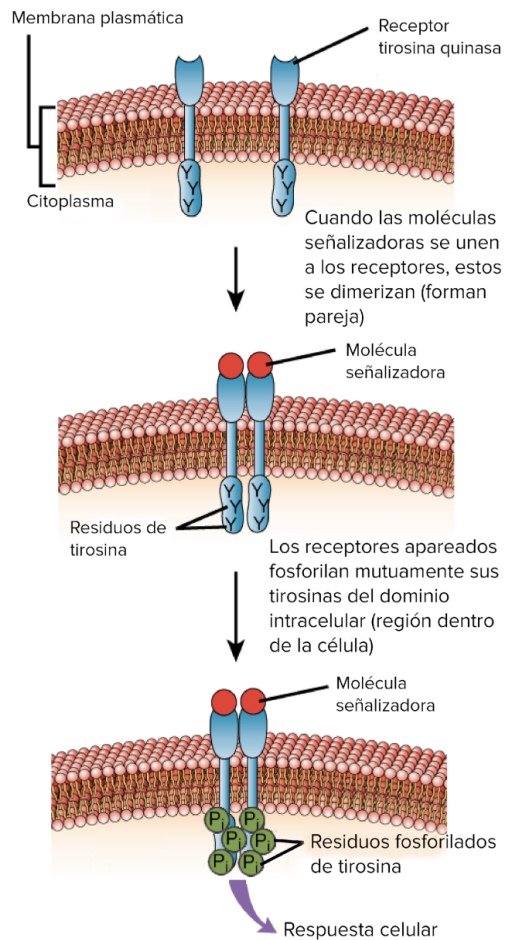
Varias subfamilias GPCR se originaron antes de la divergencia de animales protostomos y deuterostomos. Esto condujo a una gran diversificación en la especificidad química de estímulos externos, como neuropéptidos, glicoproteínas, nucleótidos, aminas biogénicas, odorantes, ligandos gustativos y fotones (Krishnan et al., 2012). Aunque los GPCR, en general, no comparten similitud de secuencia, presentan una estructura topográfica similar, conservada durante la evolución. Por lo general, se componen de siete  $\alpha$ -hélices transmembrana (7TM), cada una de las cuales consta de 20 a 30 aminoácidos hidrofóbicos y de tres bucles extracelulares e intracelulares que conectan las diferentes hélices. El extremo N-terminal es extracelular y, a menudo, posee varios sitios de glicosilación; el extremo C-terminal, por otro lado, está expuesto en el citoplasma y posee sitios de potencial fosforilación. Las regiones extracelulares están involucradas en la unión específica del ligando, mientras que las áreas intracelulares interactúan con un miembro de la familia de proteínas de señalización de unión a GTP (proteínas G), que consisten en subunidades  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$  (figura 7). En base a motivos de secuencia compartidos, los GPCR se clasifican en al menos seis subfamilias. Todos los GPCR que actúan como receptores de neuropéptidos pertenecen a las denominadas familias A (similares a la rodopsina) o B (similar a la secretina) (Caers et al., 2012).



**Figura 7:** Los GPCR contienen 7 hélices alfa transmembrana (7TM), un extremo C-terminal ubicado hacia el citoplasma con sitios de fosforilación (unión a proteína G), un extremo N-terminal extracelular con sitios de unión a NP. Tomado de <https://reactome.org/content/detail/R-HSA-372790>

### Receptor Tirosin Quinasa (RTK)

Los RTK son una clase de receptores ligados a quinasas que se encuentran en todos los organismos multicelulares. Las quinasas son enzimas que transfieren grupos fosfato a una proteína o molécula orgánica específica. Los RTKs transfieren grupos fosfato específicamente al aminoácido tirosina. Los RTKs son receptores diméricos en los cuales la unión de la molécula de señalización induce la interacción entre monómeros para formar homo o heterodímeros. La dimerización activa la actividad quinasa y resulta en la adición de fosfatos en tirosinas específicas de cada monómero del receptor iniciando la cascada de señalización intracelular (figura 8) (Haj et al., 2003).



**Figura 8:** Las características moleculares del receptor de tirosina quinasa comprenden la posesión de una hélice alfa transmembranal individual, aunque la proteína intrínseca posee un dominio citosólico con actividad de tirosina quinasa. Su activación mediante un estímulo externo provoca una cascada interna de reacciones enzimáticas que facilita la adaptación de la célula a su entorno, por mediación de mensajeros secundarios. *Imagen modificada de "Moléculas señalizadoras y receptores celulares", de OpenStax College, Biología.*

# **Hipótesis y objetivos**

### Construcción de la hipótesis

El neuropeptidoma de *O. fasciatus* ha sido caracterizado en el cerebro adulto a partir de datos de secuenciación de ARNm y espectrometría de masas (Baricalla, 2020). Asimismo Baricalla (2020) observó la presencia de ARNm codificantes de neuropéptidos en transcriptomas derivados de embriones tempranos de *O. fasciatus* (Ginzburg et al., 2017). A partir de estas observaciones se planteó si los receptores de los neuropéptidos también estaban presentes en el embrión y cómo era la expresión de los neuropéptidos en distintas etapas del desarrollo embrionario.

### Hipótesis

Los genes codificantes de neuropéptidos y receptores se expresan durante los estadios del desarrollo embrionario de *Oncopeltus fasciatus*.

### Objetivo general

Estudiar la expresión de neuropéptidos (NP) y la presencia de sus receptores durante el desarrollo embrionario en *Oncopeltus fasciatus*.

### Objetivos específicos

- Identificar neuropéptidos y receptores expresados durante el desarrollo embrionario de *O. fasciatus*.
- Estudiar la expresión de neuropéptidos (NP) en distintas etapas del desarrollo embrionario de *O. fasciatus*.

# **Materiales y Métodos**



A continuación se describe...

### **1- CRÍA DE *O. FASCIATUS* EN CONDICIONES CONTROLADAS**

Los insectos se mantuvieron a temperatura 25°C, se criaron en contenedores plásticos aptos con algodón sintético como superficie para la oviposición, alimentados ad libitum con semillas de girasol y agua.

### **2- DISECCIÓN DE CEREBROS**

Los insectos adultos se anestesiaron en hielo y fueron fijados a soportes de parafina con alfileres entomológicos. El cerebro, incluyendo los lóbulos ópticos se extrajo por ruptura de la cutícula de la cabeza con pinzas Dumont Nr5 y se mantuvieron, una vez extraídos, en PBS frío, hasta la extracción de ARN.

### **3- RECOLECCIÓN DE HUEVOS**

Se colectaron huevos de *O. fasciatus* a 25°C en los tiempos de desarrollo de 0-6 hs , 6-24 hs, 0-24 hs, 24-48 hs, 48-72 hs, 72-96 hs, 96-120 hs, 120-144 hs (ver Tabla 1). Los huevos se congelaron instantáneamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### **4- PREPARACIÓN DE ARN TOTAL (ARNT)**

El ARN se preparó usando el reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo al protocolo provisto por los fabricantes. Se homogeneizaron 10 cerebros o 100 mg de embriones de cada tiempo colectado con 800 µl de Trizol en tubos tipo Eppendorf de 2 ml usando un homogenizador de plástico. Una vez verificada visualmente la ruptura de los embriones se agregaron 200 µl de cloroformo y la mezcla se agitó en vortex para provocar la separación de fases acuosa y fenólica. Las muestras se centrifugaron por 10 min a 14.000xg en una microcentrífuga. La fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se agregaron 500 µl de isopropanol. Luego de incubar en hielo por 10 minutos las muestras se centrifugaron durante 10 min a 14.000xg. El precipitado, conteniendo el ARN total, se lavó dos veces con 200 µl de etanol al 70% en agua con centrifugación de 1 min a 14.000xg entre cada lavado. El precipitado se secó al aire y se disolvió en 100 µl de agua libre de nucleasas. La concentración de ácidos nucleicos se midió por absorbancia a 260nm usando el equipo Nanodrop. La concentración de todas las muestras se ajustó a 0,5 µg/µl y se almacenaron en alícuotas de 25 µl a -80oC hasta su uso.

## 5- PREPARACIÓN DE ADNc

A partir de 1  $\mu\text{g}$  del mismo ARNT de cerebro usado para la secuenciación del transcriptoma (Baricalla 2020) o de 4  $\mu\text{g}$  de ARNT obtenido de embriones se sintetizó ADNc (primer cadena) usando el kit Maxima cDNA (Thermo Life Science) usando una mezcla de primers oligo-dT y hexanucleótidos al azar de manera de obtener la mayor cobertura posible

---

1  $\mu\text{l}$  de Buffer de ADNasa 10x

8  $\mu\text{l}$  de Muestra (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

1  $\mu\text{l}$  de DNasa

---

Se incubó por 2 minutos a 37°C y se mantuvo en hielo hasta agregar

2  $\mu\text{l}$  Buffer de reacción

8  $\mu\text{l}$  Agua

2  $\mu\text{l}$  Transcriptasa reversa

---

Se incubó la mezcla secuencialmente a las siguientes temperaturas:

10 min a 20°C (hibridación de primers e inactivación de DNasa)

30 min a 55°C (activación de RT)

5 min a 85°C (inactivación de enzima)

---

El ADNc obtenido no se cuantificó sino que se diluyó hasta una concentración equivalente a 10  $\text{ng}/\mu\text{l}$  (cerebro) o 40  $\text{ng}/\mu\text{l}$  (embriones) del ARN usado en la reacción.

## 6- DISEÑO DE PRIMERS

Se diseñaron primers específicos para PCR y qRT-PCR. Se consideraron las opciones que produjeran amplicones de entre 100 y 800 pb de longitud. Los parámetros de amplificación fueron Tm de entre 57 y 63°C. Este proceso fue llevado a cabo en Primer3-Plus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC3424584/>). Los primers fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (Lovaina, Bélgica).

Neuropéptido	Nombre	Fw	Rv	Fw Tm	Rv Tm	Fragmento amplificado (pb)
AKH	Hormona	ATCAGCGGAGAAGCC	TGCTTGTTAAAGG			
	Adipoquinética	CTATT	ATCACTGGA	60,2	59,7	248
ASTA	Alastotatina A	ACAGCCCAAACGTCTT	TTGGGAGTCGCTT			
		TACG	TCCTAGA	60,2	59,9	309
ASTCC	Alastotatina CC	CGCCCTCATCAACTAC	TGTTGAGTGTCGG			
		CTGT	AGAGTGG	59,75	58,17	159
ASTCCC	Alastotatina CCC	AATACCTTTGGAAGAC	CTGAATTAGTCGA			
		ACGA	TCCGTTT	60	60	163
AT	Alatotropina	ACTTGGAGTATGGCTG	GTTGCGGAAGTTC			
		GTT	TTGGT	62,9	61,9	155
CCAP	Peptido cardioactivo de crustáceos	GCAGTTATACGCTACC	TAACCTTCCACTG			
		CTTC	CTGGTT	60,2	59,9	238
CCH	CCH-amida	ACTTGGAGTATGGCTG	GTTGCGGAAGTTC			
		GTT	TTGGT	60	61,9	155
CRZ	Corazonina	TCTCCAGACCTTCCA	CGTCCTCACTTCTC			
		GTA	TGCTAT	60,3	59,3	235
ETH	Hormona disparadora de ecdisis	AGAATCAGTCATCAGC	CCTTGAGGAAGAA			
		CACA	ATCATTG	60,3	60	174
FMRF	FMRF-amida	CCAGTTGCTTCTCTC	TTTCCAAGATGGT			
		CT	CCAGT	60,8	58,8	231
KIN	Kinina	GGCAGATGAAATTGTA	TTCTGTAATGCCA			
		GAAG	ATGTCTC	57,6	58,1	220
MS	Miosupresina	AAGTGAGCACAGTCT	GTTCTCGTCGATG			
		GCCTA	TACTGCT	60,4	59,9	173
NPAA	Neuroparsina	GGAAATCCTCCGAAGT	TGGTCATGTCTGC			
		CTCA	TGAGTCC	59,2	59,8	164
NPLP	Proteína tipo neuropeptido	GAGCAAACCAAAGGA	TGTTCACTGGAGA			
		GCAAG	GGTGTCG	60	59,9	177
ORC	Orcokinina	TTCTAAGAGGTTTCGAC	GAAGGTTTAGTTG			
		CAAG	TGGGTTG	59,9	60	208
PTTH	Hormona protoracicotrópica	GGACTTGGCTGTTTAT	CTCTGGTAAGCTT			
		TAGG	CCATCTG	60	60	210
TAC	Taquicinina	CTCTGCTCTGCCTCAC	GGGAGAATAAATG			
		TTC	AGGACTT	60,7	58,1	746

**Tabla 3:** Cada primer individual (Fw - Rv) cuenta con una longitud de entre 16-20 bases. Se mantiene un contenido de G:C (Guanina:Citosina) entre 40 y 60 %. Los dos primers del par tienen una temperatura de fusión "Tm" cercanas, dentro de los 5 °C.

## 7- PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

Se utilizó el sistema Hot-Start PCR (Quiagen) para prevenir hibridación espúrea de los primers antes de la desnaturalización del templado. Se usaron los equivalentes a 10 ng (cerebro) o 40 ng (embriones) de ARN total convertido en ADNc para cada reacción.

---

15 min @ 94°C

40 ciclos de 15 seg @ 94°C + 30 seg @ 50°C + 30 seg @ 74°C

5 min @ 74°C

---

La extensión durante 30 segundos es suficiente para todos los amplicones esperados y solo en el caso de detección de takiquinina la extensión se extendió a 45 segundos, ya que el producto esperado es mayor a 700 bp. Los productos de la reacción se separaron por electroforesis en geles de agarosa (1%) en buffer Tris-Borato y se revelaron por tinción con Midori Green (Biometra).

## 8- IDENTIFICACIÓN BIOINFORMÁTICA DE RECEPTORES DE NEUROPEPTIDOS

### 8a- Identificación de secuencias genómicas y transcriptómicas:

A partir de un transcriptoma ensamblado de cerebro, realizado previamente en el laboratorio para ayudar a la anotación genómica, se realizó un BLASTX y un BLASTP (con las secuencias traducidas) contra una base de datos de receptores de neuropéptidos manualmente curada de especies filogenéticamente cercanas de UNIPROT. Aquellos hits que superaron los parámetros establecidos fueron seleccionados para los análisis posteriores.

Parámetros utilizados: fueron los establecidos por el programa por default, salvo el e-value:  $10^{-3}$ .

### 8b- Alineamientos de múltiples secuencias (MSA) y árboles filogenéticos:

A partir de las secuencias identificadas en el punto anterior y secuencias conocidas de receptores de especies filogenéticamente relacionadas (*D.*

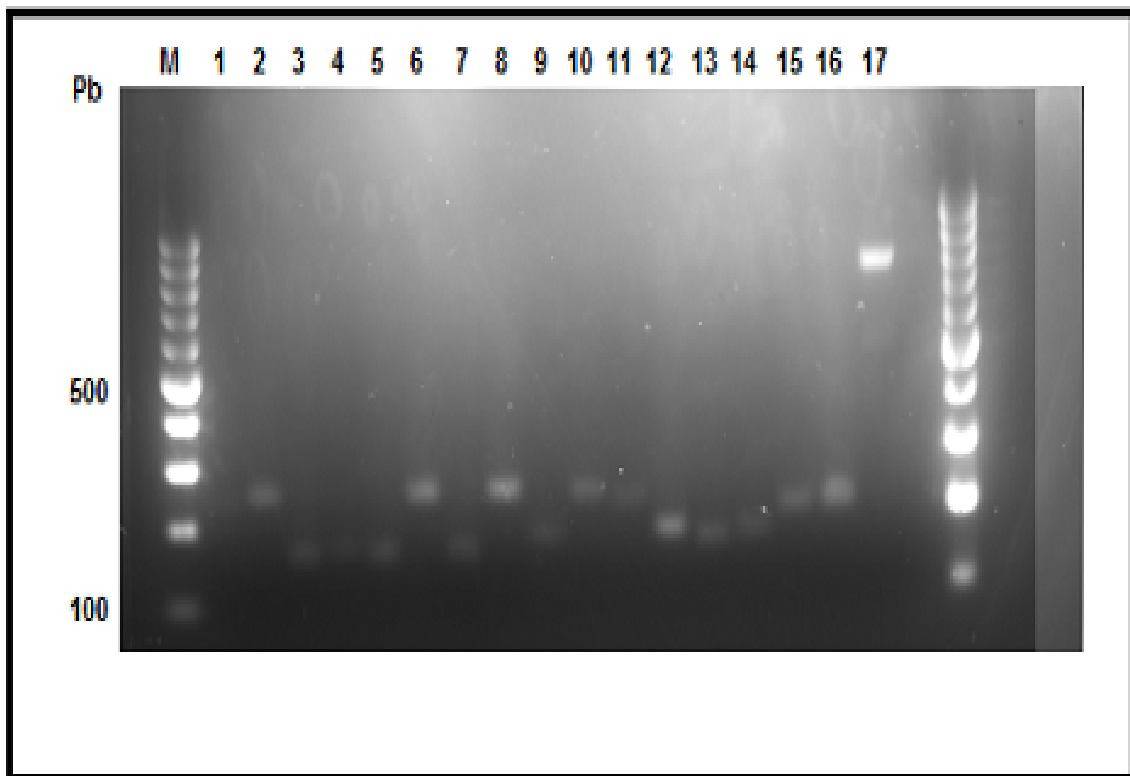
*melanogaster*, *Rhodnius Prolixus*, *Halyomorpha hyals*, *Pyrrhocoris apterus*) se realizó un MSA con ClustalW en el programa MEGA. Luego de realizados los alineamientos se procedió a la construcción de un árbol con la metodología de máxima verosimilitud. El árbol obtenido fue visualizado con Interactive Tree Of Life (iTOL) v5 (Letunic & Bork, 2021; <https://academic.oup.com/nar/article/49/W1/W293/6246398> )

# Resultados

## **1- LA EXTRACCIÓN FUNCIONÓ CORRECTAMENTE COMO TAMBIÉN LA PCR CON LOS PRIMERS DISEÑADOS.**

Se realizó el diseño de primers para los siguientes neuropéptidos: AKH, ASTA, ASTCC, ASTCCC, AT, CCAP, CCH, CRZ, ETH, FMRF, KIN, MS, NPAA, NPLP, ORC, PTTH y TAC, mediante primer3-plus. Se consideraron las opciones de primers específicos que produjeran amplicones de entre 100 y 800 pb de longitud con una temperatura de melting de entre 57 y 63°C. Para corroborar el funcionamiento los primers fueron usados en PCR utilizando 10ng de ARN total convertido en ADNc para cada reacción y temperaturas de melting variables 3°C por encima o debajo de la temperatura menor para cada par. Asimismo se optimizó el tiempo de extensión.

El análisis electroforético de los productos de PCR muestra que se amplifica un único fragmento con un peso molecular cercano al esperado para cada caso, por la predicción de Primer3 (Figura 9). Como el fragmento amplificado para cada primer concuerda con el fragmento de la banda visualizada en el gel de agarosa se concluye que AKH, ASTA, ASTCC, ASTCCC, AT, CCAP, CCH, CRZ, ETH, FMRF, KIN, MS, NPAA, NPLP, ORC, PTTH y TAC se expresan en el cerebro de *O. fasciatus*, consistente con los resultados obtenidos por el análisis transcriptómico (Baricalla, 2020). Estos resultados permiten usar esos mismos primers para análisis en embriones.



**Figura 9:** Amplificación de ADNc sintetizado a partir de ARN total de cerebro de *O. fasciatus*. Gel de agarosa revelado con Midori Green luego de electroforesis. M- M: Marcador de peso molecular; 1- AKH; 2- ASTA; 3- ASTCC; 4 -ASTCCC; 5 -AT; 6- CCAP; 7- CCH; 8- CRZ; 9- ETH; 10- FMRF; 11- KIN; 12- MS; 13- NPAA; 14- NPLP; 15- ORC; 16- PTTH; 17- TAC.

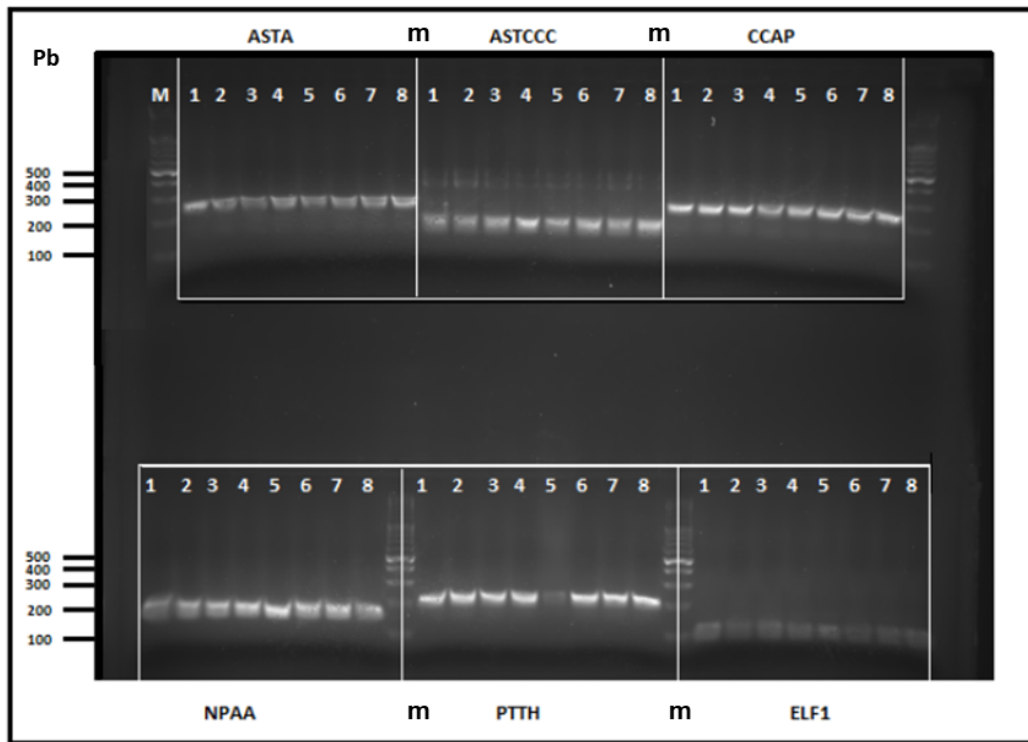
## **2- LOS NEUROPEPTIDOS ALLASTOTATINA A, ALLASTOTATINA CCC, PÉPTIDO CARDIOACTIVO DE CRUSTÁCEOS, NEUROPARSINA Y HORMONA PROTORACICOTRÓPICA SE EXPRESAN EN TODOS LOS ESTADIOS DE DESARROLLO EMBRIONARIO DE *O. FASCIATUS*.**

Habiendo corroborado el diseño de primers contra neuropéptidos en cerebro adulto se procedió a analizar, como prueba de concepto, la expresión de los neuropéptidos ASTA, ASTCCC, CCAP, NPAA, PTTH en embriones, utilizando 40ng de ARN total convertido en ADNc. Estos 5 neuropéptidos fueron seleccionados en base a datos de RNAseq (Ginzburg et al. 2017; Baricalla 2020).

Por separación de los productos de amplificación en gels de agarosa pudimos corroborar que los neuropéptidos ASTA (Allastotatina A), ASTCCC (Allastotatina CCC), CCAP (péptido cardioactivo de crustáceos, NPAA (Neuroparsina) y PTTH (Hormona protoracicotrópica) se expresan en todos los estadios embrionarios de *O. fasciatus* (figura 10). Como control se amplificó el



gen *housekeeping* Elongation factor 1 alfa (ELF1) de acuerdo a los trabajos de Meinzer (2019).



**Figura 10:** Amplificación de ADNc sintetizado a partir de ARN total de embriones de *O. fasciatus*. Gel de agarosa revelado con Midori Green luego de electroforesis. M: Marcador de peso molecular; Calle 1: 0-24 hs de desarrollo embrionario; Calle 2: 0-6 hs; Calle 3: 6-24 hs; Calle 4: 24-48 hs; Calle 5: 48-72 hs; Calle 6: 72-96 hs; Calle 7: 96-120 hs; Calle 8: 120-144 hs. ASTA (Allatotatina A), ASTCCC (Allatotatina CCC), CCAP (péptido cardioactivo de crustáceos, NPAA (Neuroparsina), PTTH (Hormona protoracicotrópica), ELF1 (Control, Elongation factor 1 alfa).

### 3- IDENTIFICACIÓN, CLASIFICACIÓN Y RELACIÓN EVOLUTIVA DE LOS RECEPTORES DE LOS NEUROPEPTIDOS ANALIZADOS EN *O. FASCIATUS*.

Mediante una búsqueda informática se pudo identificar, clasificar y establecer relaciones evolutivas de los receptores de los siguientes neuropéptidos: AKH, CRZ, ASTA, ASTC, CCH, DH44, DH31, FMRFa, SK, NPF, RYa, TK, AT, SIFa, CCAP e Insulina (Tabla 4 y 5). Se hallaron secuencias proteicas con alto grado de identidad a la de los receptores de los neuropéptidos CAPA, PIROKININA, SP y CK en especies de clase insecta.

Al momento de la escritura de este trabajo dichos NPs no habían sido anotados en el genoma ni identificados en los distintos transcriptomas de *O. fasciatus*, pudiendo tratarse de receptores de otros NPs que podrían estudiarse en futuras investigaciones.

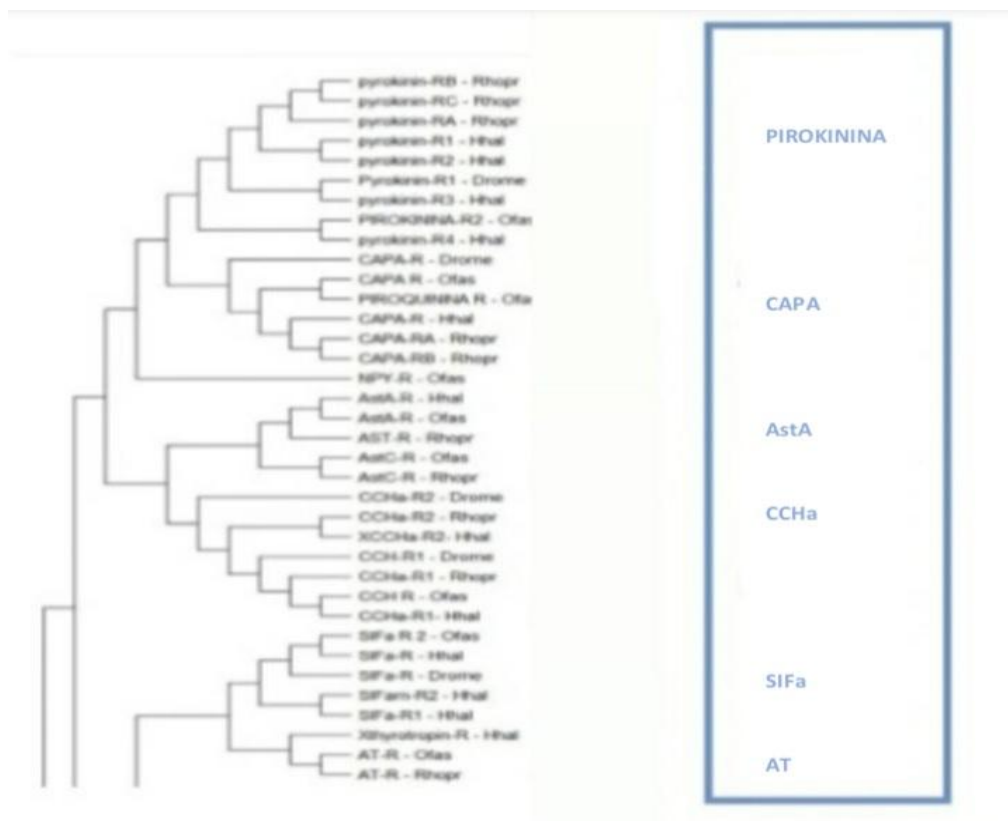
Proteína	Organismo	Identificador	Porcentaje de identidad	evaluate	UNIPROT_ID	GENE ID
insulina Receptor 1	Halyomorpha halys	XP_014273515.1	76.166	0	A0A2R7WTX2	OFAS025194
Insulina Receptor 2	Oncopeltus fasciatus	AVT56270.1	100	0	A0A2R7WFC4	OFAS008161

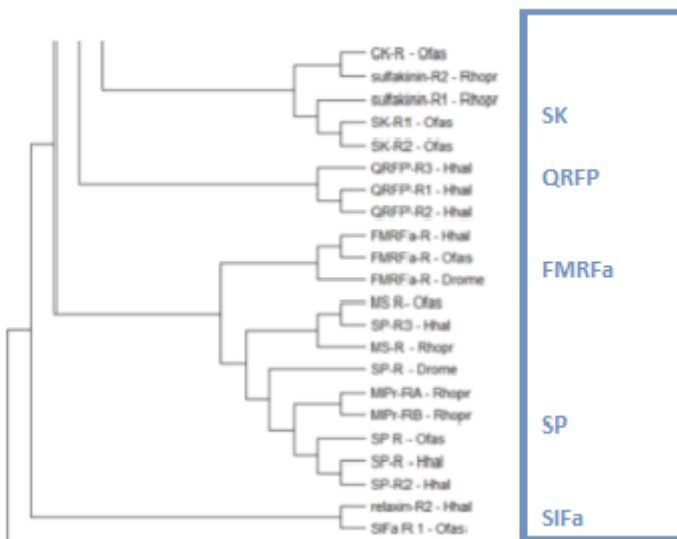
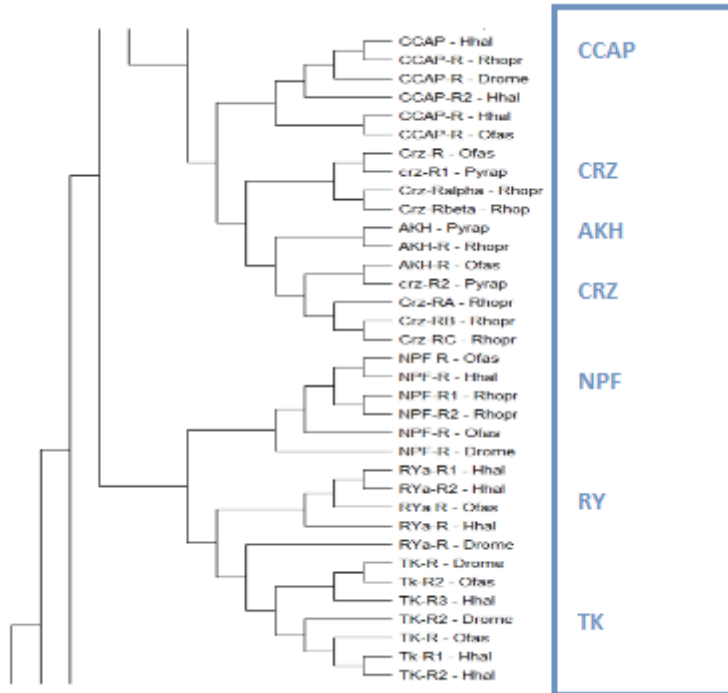
**Tabla 4:** RTK identificados. La tabla fue generada a partir de un BLAST de secuencias de receptores RTK de *O.fasciatus* contra BD de *D. melanogaster* (Drome), *R. prolixus* (Rhopr), *H. hyalis* (Hhal) y *P. apterus* (Pyrap). Se muestra la proteína en cuestión, el organismo al cual pertenece, el porcentaje de identidad que describe cuán similar es la secuencia query a la secuencia blanco, el ID de Uniprot y el ID del gen. Dichos parámetros establecen la identificación del receptor de insulina.

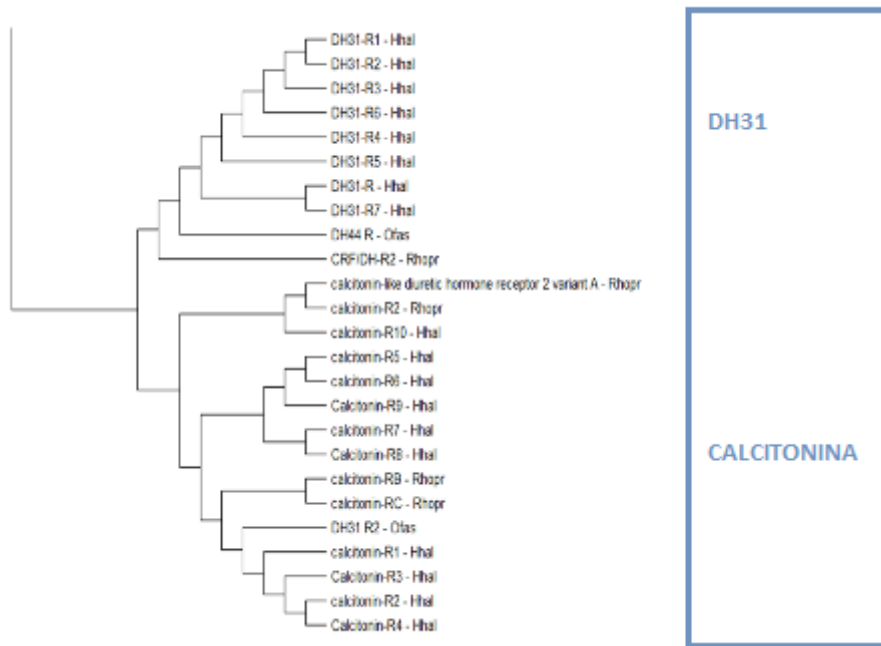
Proteína	Organismo	Identificador	Porcentaje de identidad	evalúe	UNIPROT_ID	Gene_ID
AKH receptor	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	<a href="#">AGZ62588.1</a>	50,72	1E-21	A0A2R7WJF3	OFAS011374
akh/gonadotropina	<i>Halyomorpha halys</i>	<a href="#">XP_024215229.1</a>	69,61	9,78E-86	A0A2R7W1G6	OFAS002757
Allatostatina A receptor	<i>Halyomorpha halys</i>	<a href="#">XP_014294757.1</a>	85,41	1,05E-126	A0A2R7X7W7	ALSR - OFAS018732
Allatostatina C- somatostatina receptor	<i>Halyomorpha halys</i>	<a href="#">XP_014285192.1</a>	94	0	A0A2R7WUG9	ALSCR - OFAS014197
Allatotropina receptor	<i>Halyomorpha halys</i>	<a href="#">XP_024218588.1</a>	92,59	2E-27	A0A2R7WB39	ATR - OFAS009154
Calcitonina receptor	<i>Rhodnius prolixus</i>	<a href="#">AHB86318.1</a>	81,82	3E-95	A0A2R7WKH2	OFAS011438
Calcitonina	<i>Halyomorpha halys</i>	<a href="#">XP_024218726.1</a>	65,65	0	A0A2R7WD56	OFAS010048
CAPA	<i>Melanaphis sacchari</i>	<a href="#">XP_025195140.1</a>	53,69	2E-82	A0a2r7W7N1	OFAS007472
CCAP receptor	<i>Halyomorpha halys</i>	<a href="#">XP_024216533.1</a>	79,53	4,93E-63	A0A2R7WKR3	ccap-r - OFAS012776
CCH amida	<i>Cimex lectularius</i>	<a href="#">XP_014250294.1</a>	80,95	0	A0A2R7W5T6	OFAS006804
Corazonina receptor	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	<a href="#">ARV86500.1</a>	92	2E-42	A0A2R7X1I5	OFAS017255
Hormone diuretica receptor	<i>Halyomorpha halys</i>	<a href="#">XP_024214720.1</a>	51,43	3E-15	A0A2R7WYX5	OFAS015318
Hormona de la eclosión	<i>Cimex lectularius</i>	<a href="#">XP_024086218.1</a>	71,43	2E-32	A0A2R7WLS3	OFAS009237
FMRF amida	<i>Halyomorpha halys</i>	<a href="#">XP_014284854.1</a>	75,66	0	A0A2R7VSW2	OFAS000734
Neuroipéptido largo F receptor	<i>Rhodnius prolixus</i>	<a href="#">AKO62911.1</a>	76,35	2E-74	A0A2R7X135	OFAS017080
lutropin receptor	<i>Halyomorpha halys</i>	<a href="#">XP_014291441.1</a>	92,48	0	A0A2R7WGM2	OFAS010052
lutropin receptor	<i>Halyomorpha halys</i>	<a href="#">XP_014284756.1</a>	77,3	5,59E-81	A0A2R7WQJ4	OFAS013115
lutropin receptor	<i>Cimex lectularius</i>	<a href="#">BAO01098.1</a>	59,68	0	A0A2R7WBA7	OFAS008835
miosupresina receptor	<i>Rhodnius prolixus</i>	<a href="#">AGT02812.1</a>	67,57	9E-172	A0A2R7W256	OFAS003806
neuropeptide SIFamide receptor	<i>Halyomorpha halys</i>	<a href="#">XP_014277948.1</a>	84,71	1E-139	A0A2R7WSQ9	OFAS012396
neuropeptido F receptor	<i>Aphis gossypii</i>	<a href="#">XP_027847101.1</a>	45,55	7E-28	A0A2R7VWM6	OFAS001608
neuropeptido Y- hormona de crecimie	<i>Agrilus planipennis</i>	<a href="#">XP_018327128.1</a>	72,41	1E-39	A0A2R7WP72	OFAS014096
PDF receptor	<i>Halyomorpha halys</i>	<a href="#">XP_024218284.1</a>	57,89	1E-61	A0A2R7WUF8	OFAS014602
piroquinina receptor	<i>Blattella germanica</i>	<a href="#">PSN47400.1</a>	60	3E-23	A0A2R7W804	OFAS007471
piroquinina 1 receptor	<i>Apis cerana</i>	<a href="#">PBC25820.1</a>	58,76	8E-34	A0A2R7WTU4	OFAS014703
QRFP	<i>Halyomorpha halys</i>	<a href="#">XP_014285976.1</a>	56,76	2E-34	A0A2R7WS74	OFAS014390
RY amida	<i>Cimex lectularius</i>	<a href="#">XP_024084634.1</a>	89,34	1E-72	A0A2R7X5Q5	OFAS018630
Peptido sexual receptor	<i>Halyomorpha halys</i>	<a href="#">XP_024217957.1</a>	81,69	6E-78	A0A2R7VS44	OFAS001646
sulfaquinina receptor	<i>Rhodnius prolixus</i>	<a href="#">QEI59506.1</a>	82,02	9E-48	A0A2R7X7M2	OFAS018825
sulfaquinina receptor	<i>Rhodnius prolixus</i>	<a href="#">QEI59506.1</a>	68,67	3E-29	A0A2R7X530	OFAS017991
taquinina	<i>Nilaparvata lugens</i>	<a href="#">XP_039301089.1</a>	87,67	5E-37	A0A2R7W7X4	OFAS006052
TK	<i>Cimex lectularius</i>	<a href="#">XP_024082499.1</a>	79,58	6E-111	A0A2R7WCB5	OFAS007130
SIFamide receptor	<i>Cimex lectularius</i>	<a href="#">XP_014239390.1</a>	56,67	5E-35	A0A2R7WRH6	OFAS012392
QRFP receptor	<i>Halyomorpha halys</i>	<a href="#">XP_014285976.1</a>	59,48	7E-32	A0A2R7X835	OFAS019270
cholecystokinin receptor	<i>Cimex lectularius</i>	<a href="#">XP_024083411.1</a>	82,35	5E-32	A0A2R7WNB3	OFAS014706

**Tabla 5:** GPCR identificados. La tabla fue generada a partir de un BLAST de secuencias de receptores GPCR de *O.fasciatus* contra BD de *D. melanogaster* (Drome), *R. prolixus* (Rhopr), *H. halys* (Hhal) y *P. apterus* (Pyrap). Se muestra la proteína en cuestión, el organismo al cual pertenece, el porcentaje de identidad que describe cuán similar es la secuencia query a la secuencia blanco, el ID de Uniprot y el ID del gen. Dichos parámetros establecen la identificación de los receptores de los siguientes neuropéptidos: Pirokinina, CAPA, AstA, CCHa, SIFa, AT, CCAP, CRZ, AKH, NPF, RYa, TK, SK, QRFP, FMRFa, SP, DH31 y Calcitonina

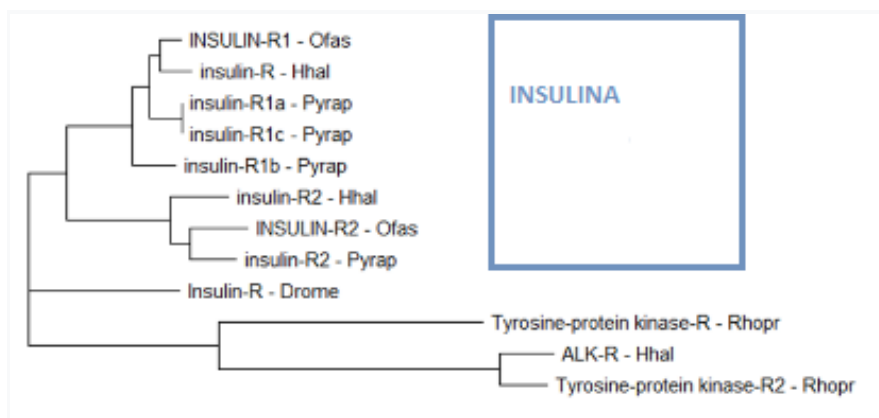
El análisis filogenético y los alineamientos múltiples de secuencias realizados con los receptores descubiertos en los embriones muestra que los mismos se agrupan dentro de dos clases. Por un lado, están los GPCR de Pirokinina, CAPA, AstA, CCHa, SIFa, AT, CCAP, CRZ, AKH, NPF, RYa, TK, SK, QRFP, FMRFa, SP, DH31 y Calcitonina. Por otro lado, están los RTK de insulina.





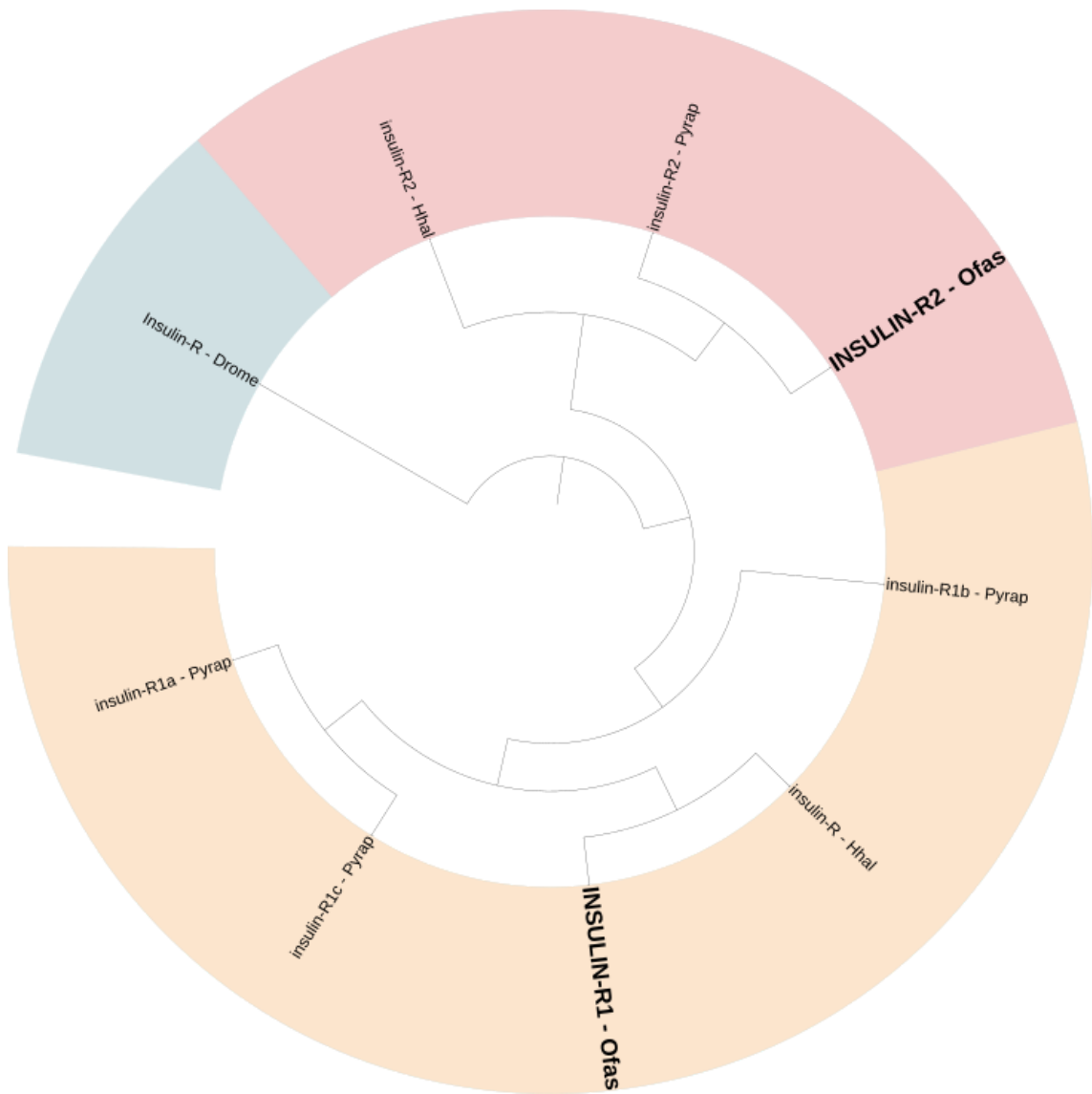


**Figura 11:** Árbol filogenético de máxima verosimilitud de GPCR de neuropéptidos y hormonas proteicas de *O. fasciatus* (Ofas), *D. melanogaster* (Drome), *Rhodnius prolixus* (Rhopr), *Halyomorpha hyalis* (Hhal) y *Pyrrhichoris apterus* (Pyrap).



**Figura 12:** Árbol filogenético de máxima verosimilitud de RTK para Insulina de *O. fasciatus* (Ofas), *D. melanogaster* (Drome), *R. prolixus* (Rhopr), *H. hyalis* (Hhal) y *P. apterus* (Pyrap).





**Figura 14:** Análisis filogenético de máxima verosimilitud de RTK para neuropéptidos y hormonas proteicas de *O. fasciatus* (Ofas), *D. melanogaster* (Drome), *R. prolixus* (Rhopr), *H. hyalis* (Hhal) y *P. apterus* (Pyrap). Cada familia de RTK está indicada por diferentes colores.



# **Discusión**

*O. fasciatus* es un modelo de estudio hemimetábolo en el cual iniciamos estudios básicos de la expresión de genes relacionados con la neurogénesis. Entre estos aspectos la identificación de neuropéptidos en cerebro adulto llevada a cabo en trabajos previos sirvió como base para validar la expresión de estos neuropéptidos mediante la técnica PCR con ADNc que pudimos sintetizar a partir de ARN extraído de cerebros a partir de *primers* diseñados para tal efecto. Con este primer resultado se utilizaron 5 primers corroborados en cerebro adulto para estudiar la expresión de los mismos neuropéptidos en embriones. Los neuropéptidos ASTa, ASTCCC, CCAP, NPAA y PTTH se expresan en todos los estadios embrionarios desde 0 hasta 144 hs. Si bien los estudios realizados no son cuantitativos y no permiten hablar de expresión constitutiva, nos permiten afirmar que dichos neuropéptidos están presentes desde el momento previo a la formación del blastodermo celular, es decir que posiblemente son de origen materno. Estos resultados sientan las bases para un desarrollo futuro de este proyecto para determinar si los ARNm son provistos en el ovocito y cual es la distribución del mismo. Estudios con qPCR e hibridación in situ permitirán definir este tema, así como el análisis de la presencia de los productos proteicos por espectrometría de masas, ya que la presencia de un mensajero no es indicador inequívoco de la traducción del mismo.

El análisis bioinformático permitió descubrir receptores de neuropéptidos en el genoma y el transcriptoma, los que se pudieron identificar y clasificar a partir de alineamientos de múltiples secuencias y análisis filogenéticos. La identificación de estos receptores abre la puerta a estudios más complejos que permitan analizar la expresión en el sistema nervioso tanto de adultos como en embriones y definir si los receptores se coexpresan o no con sus ligandos.

El estudio de los neuropéptidos y su función durante el desarrollo embrionario es inexistente hasta el día de la fecha. De hecho este trabajo final de grado aporta la primera evidencia de la expresión de neuropéptidos en el embrión de un insecto, y resta por saber cuál es su función y si están regulados. Un muy reciente trabajo de Feng y colaboradores (Feng et al, 2022) sugiere que los últimos pasos del proceso de formación de sinapsis y adquisición de características de identidad de terminales neuronales durante el ensamblado del sistema nervioso embrionario puede estar relacionado con la expresión de receptores de neurotransmisores, neuropéptidos y canales iónicos, ya que representan los eventos finales que conducen al establecimiento de un circuito neuronal funcional. Esto implica que primero se diferencian las neuronas, luego los circuitos neuronales y, finalmente, se liberan los NPs. En este sentido los NP podrían representar marcadores de estas etapas de diferenciación del sistema nervioso. Por otro lado se ha demostrado que la acción regulatoria de los genes HOX en *D. melanogaster* en el sistema nervioso ocurre sobre las neuronas leucokinérgicas abdominales (ABLKs), que expresan de forma

característica el neuropéptido leucokinina (Estacio-Gómez & Díaz Benjumea, 2014). El complejo Bithorax (formado por los genes *Ubx*, *abd-A* y *Abd-B*) regula la transcripción del gen codificante de leucokinina, si bien aún no se conoce si de manera directa o indirecta. La expresión de *Ubx* y *abd-A* es necesaria para mantener la expresión de leucokinina, mientras que *Abd-B* reprime la expresión del gen en las neuronas de la región abdominal posterior. Si bien no se ha descrito la expresión de leucokinina en este trabajo, un efecto semejante se observó que en neuronas productoras de CCAP, un transcripto que hemos demostrado que se expresa durante el desarrollo embrionario de *O. fasciatus*, la expresión de CCAP y Bursicon alfa está regulada de manera negativa por *Abd-B* (Moris-Sanz et al. 2015).

En este trabajo observamos que CCAP (y otros mensajeros codificantes de neuropéptidos) se expresan en el desarrollo embrionario, antes, durante y después de la aparición de las primeras neuronas. Por lo que una hipótesis muy atractiva es que los neuropéptidos podrían estar cumpliendo funciones diferentes a las canónicas en los embriones tempranos antes de la diferenciación del sistema nervioso y otros tejidos. Un ejemplo interesante podría ser el estudio del neuropéptido PTTH que tiene funciones conocidas y determinadas en etapa adulta y además es clave en el desarrollo temprano, dado que su receptor de tirosina quinasa, Torso, tiene funciones cruciales en el establecimiento de la polaridad embrionaria en *D. melanogaster*. En el adulto de *D. melanogaster*, la interacción entre PTTH y Torso activa el Vía de MAP-quinasa que conduce a la síntesis y liberación de ecdisona. (Duncan et al. 2014). Pero asimismo, el gen *trunk*, que codifica el ligando materno de Torso en el embrión temprano, está filogenéticamente relacionado con PTTH y se demostró que PTTH expresada ectópicamente en el embrión puede rescatar el fenotipo que produce una mutación de *trunk* (Rewitz et al. 2009). El descubrimiento de que PTTH se expresa en embriones de *O. fasciatus*, abre la puerta a investigaciones que permitan comprender la función de los neuropéptidos durante la embriogénesis temprana, un aspecto de la biología del desarrollo completamente inexplorado.

# **Conclusiones**

- Se profundizó el estudio de los neuropéptidos y sus receptores en *O. fasciatus*. Se presentaron nuevos datos sobre la expresión temporal de neuropéptidos durante el desarrollo embrionario y el descubrimiento de nuevos receptores expresados en el embrión.
- Se aportó evidencia experimental que confirma la expresión de ARNm mediante PCR de un análisis bioinformático previo (Baricalla, 2020).
- Se confirmó la expresión de AKH, ASTA, ASTCC, ASTCCC, AT, CCAP, CCH, CRZ, ETH, FMRF, KIN, MS, NPAS, NPLP, ORC, PTTH y TAC en el cerebro de *O. fasciatus*.
- Se determinó la expresión de los transcritos de ASTA, ASTCCC, CCAP, NPAA, PTTH a lo largo de todo el desarrollo embrionario.
- Finalmente, mediante una identificación de secuencias genómicas y transcriptómicas, alineamientos múltiples y árboles filogenético pudimos identificar, clasificar y relacionar evolutivamente los receptores de los neuropéptidos AKH, CRZ, ASTA, ASTC, CCH, DH44, DH31, FMRFa, SK, NPF, RYa, TK, AT, SIFa, CCAP e Insulina.

# **Bibliografía**

- Auman, T and Chipman, A.D. (2018). Growth zone segmentation in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* sheds light on the evolution of insect segmentation. *BMC Evol Biol*, 18, 178. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1293-z>
- Baricalla A. (2020). Genómica, transcriptómica y proteómica de neuropéptidos de *Oncopeltus fasciatus*. Tesis de maestría, Maestría en Bioinformática y Biología de sistemas, UNNOBA-UNQ
- Bate CM. (1976) Embryogenesis of an insect nervous system. I. A map of the thoracic and abdominal neuroblasts in *Locusta migratoria*. *J Embryol Exp Morphol*. 35(1):107-123.
- Bate CM, Grunewald EB. (1981) Embryogenesis of an insect nervous system II: a second class of neuron precursor cells and the origin of the intersegmental connectives. *J Embryol Exp Morphol*. 61:317-330.
- Boyan GS, Williams JL, Reichert H. (1995) Organization of a midline proliferative cluster in the embryonic brain of the grasshopper. *Roux Arch Dev Biol*. 205(1-2):45-53. doi:10.1007/BF00188842
- Caers, J., Verlinden, H., Zels, S., Vandersmissen, H. P., Vuerinckx, K., & Schoofs, L. (2012). More than two decades of research on insect neuropeptide GPCRs: An overview. *Frontiers in Endocrinology*, 1–30. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00151>
- Chipman, A. D. (2017). *Oncopeltus fasciatus* as an evo-devo research organism. *Genesis*, 55(5). <https://doi.org/10.1002/dvg.23020>
- Duncan, E. J., Johnson, T. K., Whisstock, J., Warr, C. G., & Dearden, P. K. (2014). Capturing embryonic development from metamorphosis: how did the terminal patterning signalling pathway of *Drosophila* evolve? *Current Opinion in Insect Science*, 1, 45 - 51. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.04.007>
- Elphick, M. R., Mirabeau, O., Larhammar, D. (2018). Evolution of neuropeptide signalling systems. *J Exp Biol* . 221 (3): jeb151092. <https://doi.org/10.1242/jeb.15109>
- Estacio-Gómez A, Díaz-Benjumea FJ. (2014) Roles of Hox genes in the patterning of the central nervous system of *Drosophila*. *Fly (Austin)*. 8(1):26-32. doi:10.4161/fly.27424
- Ewen-Campen, B., Jones, T. E. M., & Extavour, C. G. (2013). Evidence against a germ plasm in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*, a hemimetabolous insect. *Biology Open*, 2(6), 556–568. <https://doi.org/10.1242/BIO.20134390>
- Feir, D. (1974). *Oncopeltus fasciatus*: a research animal. *Natural History*, 144, 81–96.
- Feng, W., Li, Y. and Kratsios, P. (2022). Emerging Roles for Hox Proteins in the Last Steps of Neuronal Development in Worms, Flies, and Mice. *Front. Neurosci*. 15:801791. doi: 10.3389/fnins.2021.801791
- Ginzburg N, Cohen M, Chipman AD. Factors involved in early polarization of the anterior-posterior axis in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. *Genesis*. 2017;55(5):10.1002/dvg.23027. doi:10.1002/dvg.23027
- Haj, F. G., Markova, B., Klamann, L. D., Bohmer, F. D., & Neel, B. G. (2003). Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 739–744. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210194200>

- Johansson, A. S. (1890). The Nervous System of the Milkweed Bug, *Oncopeltus Fasciatus* (Dallas) (Heteroptera, Lygaeidae). *Transactions of the American Entomological Society*, 83(3), 119–83. <http://www.jstor.org/stable/25077748>.
- Krishnan A, Almén MS, Fredriksson R, Schiöth HB. (2012). The Origin of GPCRs: Identification of Mammalian like Rhodopsin, Adhesion, Glutamate and Frizzled GPCRs in Fungi. *PLoS ONE* 7(1): e29817. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0029817>
- Lawrence PA. (1969) Cellular differentiation and pattern formation during metamorphosis of the milkweed bug *Oncopeltus*. *Dev Biol.* 19(1):12-40. doi:10.1016/0012-1606(69)90068-2
- Lawrence PA. (1975). The structure and properties of a compartment border: the intersegmental boundary in *Oncopeltus*. *Ciba Found Symp.* 0(29):3-23. <http://doi.org/10.1002/9780470720110.ch2>
- Leonelli S & Ankeny RA. (2013). What makes a model organism? *Endeavour* 37(4) 209-12. [Http://doi.org/10.1016/j.endeavour.2013.06.001](http://doi.org/10.1016/j.endeavour.2013.06.001)
- Letunic, I. Bork, P. (2021) Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation, *Nucleic Acids Research*, 49: W293–W296, doi: [10.1093/nar/gkab301](https://doi.org/10.1093/nar/gkab301)
- Liechty L. and Sedlak BJ. (1978) The ultrastructure of precocene-induced effects on the corpora allata of the adult milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. *Gen Comp Endocrinol.* 1978;36(3):433-436. doi:10.1016/0016-6480(78)90126-0
- Liu, P., & Kaufman, T. C. (2009). Morphology and husbandry of the large milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(8), 1–13. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo127>
- Mahon DC, Nair KK.(1975) A comparison of aldehyde fuchsin and alcian blue staining of neurosecretory material in *Oncopeltus fasciatus*. *Cell Tissue Res.*161(4):477-484. <http://doi.org/10.1007/BF00224138>
- Meinzer F, Dobler S, Donath A, Lohr JN. Robust reference gene design and validation for expression studies in the large milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*, upon cardiac glycoside stress. *Gene.* (2019) Aug 20;710:66-75. [Http://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.032](http://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.032)
- Morata, G., Lawrence, P. (2022). An exciting period of *Drosophila* developmental biology: Of imaginal discs, clones, compartments, parasegments and homeotic genes”. *Developmental Biology.* 484. 12-21. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2022.01.008>.
- Moris-Sanz M, Estacio-Gómez A, Sánchez-Herrero E, Díaz-Benjumea FJ. (2015) The study of the Bithorax-complex genes in patterning CCAP neurons reveals a temporal control of neuronal differentiation by Abd-B. *Biol Open.* 4(9):1132-1142.
- Nässel, D. R. (1993). Neuropeptides in the insect brain: a review. *Cell and Tissue Research*, 273(1), 1–29. <https://doi.org/10.1007/BF00304608>
- Nässel DR. (2002). Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Prog Neurobiol.* 68(1), 1-84. [Http://doi.org/10.1016/s0301-0082\(02\)00057-6](http://doi.org/10.1016/s0301-0082(02)00057-6)
- Ons S. (2017). Neuropeptides in the regulation of *Rhodnius prolixus* physiology. *J Insect Physiol*, 97, 77-92. <http://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.05.003>.
- Panfilio KA, Angelini DR. (2017) By land, air, and sea: hemipteran diversity



- through the genomic lens. *Curr Opin Insect Sci.* 2018;25:106-115.  
<http://doi.org/10.1016/j.cois.2017.12.005>
- Panfilio, K. A., Vargas Jentsch, I. M., Benoit, J. B., Erezyilmaz, D., Suzuki, Y., Colella, S., Robertson, H. M., Poelchau, M. F., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Weirauch, M. T., Hughes, D. S. T., Murali, S. C., Werren, J. H., Jacobs, C. G. C., Duncan, E. J., Armisen, D., Vreede, B. M. I., Baa-Puyoulet, P., ... Richards, S. (2019). Molecular evolutionary trends and feeding ecology diversification in the Hemiptera, anchored by the milkweed bug genome. *Genome Biology*, 20(1).  
<https://doi.org/10.1186/s13059-019-1660-0>
- Rewitz KF, Yamanaka N, Gilbert LI, O'Connor MB. (2009). The insect neuropeptide PTTH activates receptor tyrosine kinase torso to initiate metamorphosis. *Science*. 326(5958):1403-1405.  
<http://doi.org/10.1126/science.1176450>
- Roberts, D.B. (2006), *Drosophila melanogaster*: the model organism. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 121, 93-103.  
<https://doi.org/10.1111/j.1570-8703.2006.00474.x>
- Rutschky, C. W., & Stryjak, E. R. (1955). A Gross Study of the Nervous System of the Large Milkweed Bug, *Oncopeltus Fasciatus* (Dallas)1. *Annals of the Entomological Society of America*, 48(4), 219–221.  
<https://doi.org/10.1093/aesa/48.4.219>
- Thompson KJ, Siegler MV. Development of segment specificity in identified lineages of the grasshopper CNS. *J Neurosci.* 1993;13(8):3309-3318.  
<http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-08-03309.1993>
- Truman J. W. & Bate M. (1988). Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*, 125(1), 145-57. [http://doi.org/10.1016/0012-1606\(88\)90067-x](http://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90067-x)
- Unnithan GC, Nair KK.(1977) Fine structure of the A cells of the pars intercerebralis of normal and gamma-irradiated female milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae). *J Morphol.*154(1):59-81.  
<http://doi.org/10.1002/jmor.1051540105>
- Veenstra JA. 2000. Mono- and dibasic proteolytic cleavage sites in insect neuroendocrine peptide precursors. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 43:49–63.
- Xu G, Teng Z. W., Gu G. X., Qi Y. X., Guo L., Xiao S., Wang F., Fang Q., Wang F., Song Q. S., Stanley D., Ye G. Y. (2020). Genome-wide characterization and transcriptomic analyses of neuropeptides and their receptors in an endoparasitoid wasp, *Pteromalus puparum*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 103(2), e21625. <http://doi.org/10.1002/arch.21625>
- Yang, A.S. (2001). Modularity, evolvability, and adaptive radiations: a comparison of the hemi- and holometabolous insects. *Evolution & Development*, 3, 59-72. doi:10.1046/j.1525-142x.2001.003002059.x