

Morfometría geométrica aplicada al análisis fenotípico del gen *empty spiracles* en *Rhodnius prolixus*

Trabajo final de grado de la alumna

Ada Paula Nazar

Este trabajo ha sido presentado como requisito para la obtención del título de

LICENCIADO EN GENÉTICA

Carrera:

Licenciatura en genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 16 de marzo de 2016

**Morfometría geométrica aplicada al análisis fenotípico
del gen *empty spiracles* en *Rhodnius prolixus*.**

Trabajo final de grado de la alumna:

Ada Paula Nazar

Director:

Andrés Lavore

Co-director:

Rolando Rivera Pomar

Carrera:

Licenciatura en genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	5
1.1	La morfometría geométrica	5
1.2	Embriología de insectos.....	8
1.3	Morfología de la región cefálica en insectos	10
1.4	<i>Rhodnius prolixus</i> como modelo de desarrollo.....	12
1.5	El gen <i>empty spiracles</i>	13
2	HIPÓTESIS	16
3	OBJETIVO.....	16
3.1	Objetivo general.....	16
3.2	Objetivos específicos	16
4	MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1	Cría <i>ex situ</i> de <i>Rhodnius prolixus</i>	17
4.2	Validación experimental de predicciones génicas reportadas para <i>Rp-ems</i>	17
4.2.1	Diseño de <i>primers</i>	17
4.2.2	Amplificación por PCR	19
4.2.3	Clonado en vectores y secuenciación	20
4.3	ARN de interferencia parental	20
4.3.1	Transcripción <i>in vitro</i>	21
4.3.2	Inyección de hembras con ARNdc	22
4.4	Análisis de fenotipo en embriones.....	23
4.4.1	Observación y manipulación de embriones.....	23
4.4.2	Análisis por morfometría.....	24
4.4.2.1	Morfometría clásica.....	24
4.4.2.2	Morfometría geométrica.....	25
5	RESULTADOS	28

5.1	Validación experimental por PCR de las predicciones génicas de <i>ems</i>	28
5.2	Descripción fenotípica y validación funcional de <i>ems2</i> y <i>ems3</i> por ARNi parental.....	29
5.3	Análisis morfométrico en preninfas interferidas para <i>Rp-ems2</i>	34
6	DISCUSIÓN.....	38
6.1	Interferencia parental mediada por ARN.....	39
6.2	La función del <i>Box B</i> de <i>Rp-ems</i>	39
6.3	<i>Rp-ems</i> y su función cefálica	40
6.4	Morfometría geométrica aplicada al análisis de fenotipos sutiles	42
6.5	Nuevos métodos de preparación de cutículas para análisis morfométrico	43
7	BIBLIOGRAFÍA.....	45
8	ANEXO.....	56

1 INTRODUCCIÓN

1.1 La morfometría geométrica

El análisis de la forma es fundamental para entender cómo distintos procesos causan variaciones y transformaciones morfológicas entre individuos o entre las diferentes regiones corporales que los componen (Zelditch et al., 2012).

En sus inicios, la morfometría estaba abocada a la descripción de la estructura observada y las comparaciones entre los grupos de estudio estaban basadas en el análisis univariado de los cambios en sus dimensiones lineales. En este enfoque, actualmente denominado morfometría clásica, la forma era considerada una cualidad de la estructura. Luego, con el avance de las tecnologías y la estadística, la descripción pasó a la cuantificación, donde no sólo se buscaba comparar parámetros entre grupos de estudio y control, sino también las relaciones entre éstos, de manera de encontrar asociaciones que permitieran explicar las diferencias observadas (Toro-Ibacache et al., 2010).

A partir de 1930, matemáticos como Pearson y Fisher desarrollaron métodos de análisis estadísticos multivariados que luego, los especialistas en biometría, comenzaron a utilizar sobre grupos de variables cuantitativas como largo, ancho y alto; un enfoque actualmente conocido en biometría como morfometría geométrica (Adams et al., 2004; Marcus, 1990; Rohlf & Marcus, 1993). Desde los comienzos de esta disciplina, el concepto de forma se ha modificado y precisado. En 1977, David G. Kendall, propuso la definición fundamental sobre la que se basa la morfometría geométrica: “Forma es toda la información geométrica que resulta de retirar los efectos de posición, escala y rotación de un objeto”, es decir, analizar la forma independientemente de aquellos componentes que no definen la geometría intrínseca del mismo. La definición de

Kendall también da una idea de cómo debieran ser los procedimientos matemáticos para llevar a cabo el análisis de la forma, aspectos donde la morfometría clásica presenta una limitación, debido a que el tamaño como dato numérico es la base de sus análisis, sin no considerar la geometría del objeto.

Otra limitación asociada a los datos en morfometría clásica es que la definición de las variables no se da de acuerdo a un criterio de homología biológica sino que se definen, por ejemplo, como medidas longitudinales máximas y mínimas, utilizando para ello puntos de referencia no homólogos entre los objetos analizados (Fig. 1 A). Por otra parte, los análisis que se realizan bajo este enfoque morfométrico no permiten la recuperación de la forma en estudio, ya que las matrices que contienen la información, sólo pueden entregar una representación abstracta de la estructura (Rohlf y Marcus, 1993).

El criterio de homología biológica, presente en morfometría geométrica, otorga restricciones en la elección de aquellos puntos que entregan la información respecto a la forma de un organismo, de manera de obtener resultados que permitan realizar inferencias sobre a la misma (Zelditch et al., 2012). Estas restricciones buscan disminuir el efecto del error de medición utilizando como referencia puntos que son estructuras claramente reconocibles y presentes como tales en un grupo de organismos a comparar. Estos puntos de referencia homólogos se denominan *landmarks* y permiten por lo tanto, capturar la geometría de la estructura (Fig. 1 B).

La morfometría geométrica dio un gran paso con el uso de datos multidimensionales, permitiendo que la forma del objeto en estudio no se describa en términos de sus dimensiones, sino de la relación espacial entre sus partes. La información relativa a la geometría de los objetos se puede recuperar permitiendo la visualización de los cambios morfológicos, a través de ilustraciones o animaciones

computacionales (Toro-Ibacache et al., 2010). De hecho, es por esta razón que la morfometría geométrica se ha establecido como disciplina independiente (Rohlf y Marcus, 1993).

En este sentido, la morfometría clásica sólo se limita a respondernos si las variables representativas de la forma de una estructura en estudio son o no distintas, discriminando en caso de ser posible, en qué zona específica se encuentran esas diferencias; mientras que la morfometría geométrica permite describir cómo se modifica la forma, cuáles son esos cambios y dónde se localizan dentro de un área determinada cuando el objeto en estudio es sometido a dos o más condiciones transformantes (Bastir et al., 2006; Cobb y O'Higgins, 2007; Franchi et al., 2001).

Por lo tanto, los análisis morfométricos permiten realizar interpretaciones con alto significado biológico de las diferencias entre individuos y poblaciones que resultan altamente útiles en el análisis del impacto de las mutaciones sobre la forma, cambios en los procesos del desarrollo, covarianzas entre los factores ambientales y la forma, así como para estimar los parámetros genético-cuantitativos de la misma.

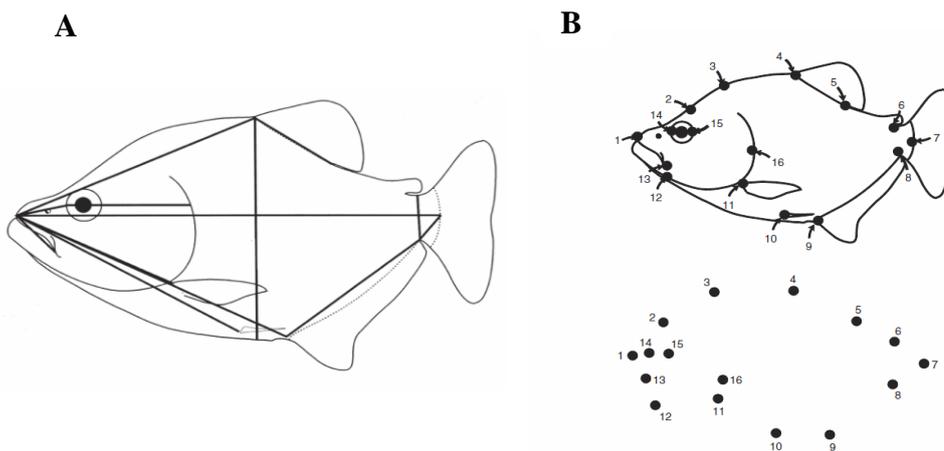


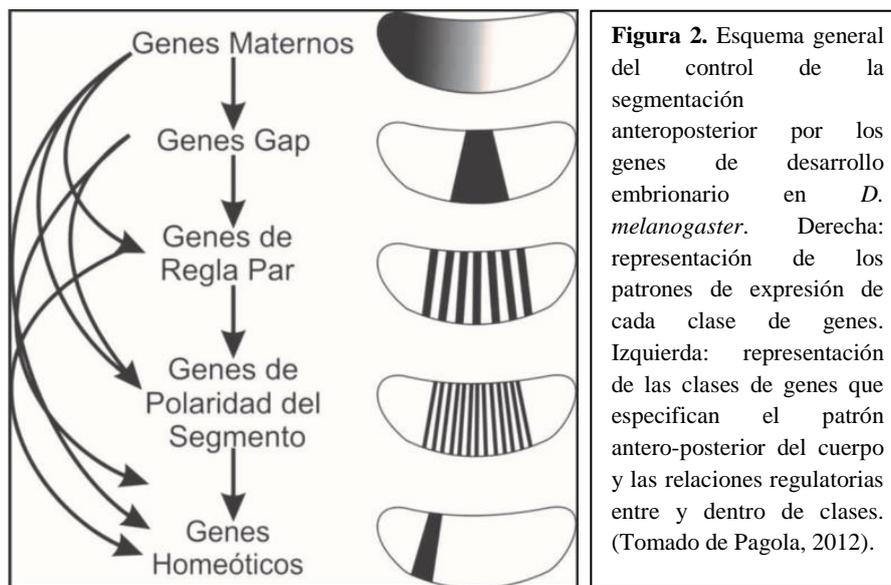
Figura 1. Dos formas de capturar la información sobre la forma de un objeto: por morfometría clásica, a través del trazado de líneas que permitan conocer sus dimensiones (A) y a través de *landmarks* que permiten capturar la estructura geométrica (B). (Tomado de Zelditch et al., 2012)

1.2 Embriología de insectos

Los insectos son un grupo de artrópodos que a pesar de conformar el grupo de animales más diverso de la Tierra, posee un plan corporal altamente conservado, siguiendo un patrón compuesto por tres tagmas: cabeza, tórax y abdomen, con 6, 3 y 8-11 segmentos, respectivamente. Estos tagmas, sin embargo, no se forman del mismo modo durante el desarrollo embrionario, pudiendo clasificarse a los insectos según su embriogénesis en aquellos de banda germinal larga y corta (Krause, 1939). En los insectos de banda germinal larga, todos los segmentos correspondientes a los tres tagmas son generados de manera simultánea ya desde el estadio de blastodermo, en un entorno sincicial. En los insectos de banda germinal corta, sólo los segmentos correspondientes a la cabeza se determinan tempranamente en el blastodermo, mientras que los restantes segmentos se forman luego de la gastrulación, de manera progresiva en el tiempo y el espacio, a partir de una zona de crecimiento localizada en la región posterior de la banda germinal (Sander, 1981). El desarrollo embrionario de banda germinal corta se encuentra representado en los órdenes filogenéticamente más basales de insectos (Liu & Kaufman, 2005), mientras que el de banda germinal larga, se considera evolutivamente más derivados y están representado en algunos clados de insectos como Dípteros e Himenópteros, entre los que encuentra la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, o la abeja, *Apis mellifera*.

Diversos análisis genéticos llevados a cabo en *D. melanogaster* permitieron identificar los genes necesarios para la correcta segmentación del embrión (Lewis, 1978; Nüsslein-Volhard & Wieschaus, 1980). Posteriormente se descubrió que muchos de estos genes codifican para factores de transcripción organizados de forma jerárquica que generan patrones de segmentación cada vez más finos. Algunos de estos factores

forman gradientes tanto maternos como cigóticos a lo largo del eje antero-posterior (A-P) del embrión para determinar la correcta formación de cada segmentos (Rivera-Pomar & Jäckle, 1996; Sauer et al., 1996). Dentro de los genes involucrados en el proceso de segmentación encontramos los genes de efecto materno, los genes *gap*, *pair rule* y los de polaridad de segmento, que actúan en cascada y son responsables de la correcta formación de segmentos a lo largo del eje A-P (Rivera Pomar y Jäckle, 1996; Fig. 2).



Esta polaridad embrionaria está determinada por la polaridad A-P del oocito. Los genes de efecto materno producen ARN mensajeros que son distribuidos asimétricamente en el oocito (Berleth et al., 1988; Frigerio et al., 1986). La traducción de estos mensajeros da origen a factores que difunden a lo largo del blastodermo sincicial y regulan la expresión de genes cigóticos que son expresados en extensos dominios parcialmente superpuestos. Estos genes, denominados *gap* causan la eliminación de segmentos adyacentes en los embriones que poseen mutaciones para ellos y constituyen uno de los primeros grupos de factores de transcripción producidos en el embrión (Nüsslein-Volhard y Wieschaus, 1980). La acción conjunta de los genes

gap causa la transcripción de genes *pair rule*, cuyos patrones de expresión dividen al embrión en unidades periódicas. Las proteínas traducidas por éstos, a su vez, activan la transcripción de los genes de polaridad de segmento en cada una de las bandas de expresión generadas, estableciendo los bordes anterior y posterior de cada segmento y el número final de ellos. Al mismo tiempo, los productos de los genes *gap*, *pair rule* y de polaridad de segmentos, interactúan para regular otra clase de genes, los homeóticos, que son factores de transcripción que determinan la identidad de cada segmento corporal (Lewis, 1978).

1.3 Morfología de la región cefálica en insectos

La cabeza de los insectos es el centro anterior sensorial y de alimentación del animal que contiene órganos y estructuras esenciales para la supervivencia. Está compuesta por una región no segmentaria ubicada en la parte anterior (el acron), que alberga el clipeo y el labro, y una parte posterior segmentaria que contiene los segmentos labial, maxilar, mandibular, intercalar, antenal y la región ocular (Posnien et al., 2010) (Fig. 3). En la parte más anterior de la cabeza, el labro que cubre la cavidad preoral tiene naturaleza aún incierta ya que los investigadores todavía deliberan si es parte de la región no segmentada o bien se trata de un apéndice (Posnien et al., 2010).

Los tres segmentos posteriores de la cabeza (labial, maxilar y mandibular) conforman el *gnathocephalon*, el cual posee los apéndices necesarios para la incorporación de alimento, próximos a la apertura de la boca. Durante la embriogénesis temprana, estos tres segmentos son indistinguibles de los segmentos del tronco (Vincent et al., 1997), en *D. melanogaster* están controlados por los genes de segmentación maternos, *gap*, *pair rule* y de polaridad de segmento (Schmidt-Ott y Technau, 1992; Schmidt-Ott et al., 1994; St Johnston et al., 1992). Por otro lado, la especificación de la

identidad de estos segmentos viene dada por los genes *Hox*, como se ha demostrado en varios estudios funcionales en *D. melanogaster*, *Tribolium castaneum*, *Oncopeltus fasciatus* y *Periplaneta americana* (Angelini et al., 2005; Brown et al., 2000, 2002; Chesebro et al., 2009; DeCamillis et al., 2001; DeCamillis, 2003; Hrycaj et al., 2010; Hughes y Kaufman, 2000; Rogers et al., 2002; Shippy et al., 2006;).

Los tres segmentos anteriores incluyen el segmento antenal, ocular e intercalar y se conocen colectivamente como *procephalon* (Snodgrass, 1935). Por lo general no llevan apéndices, se encuentran altamente modificados (Birkan et al., 2011; Kukulová-Peck, 2008) y son claramente distinguibles del tronco en etapas tempranas del desarrollo. Estas distinciones vienen dadas por la diferencia en sus patrones de segmentación (Posnien et al., 2010) pero actualmente, no se conoce con precisión cómo y cuáles genes interactúan para la correcta formación de estos segmentos en la mayoría de los insectos, donde no existe función evidente de genes *pair-rule* y donde la expresión de genes *Hox* sólo se observa en el segmento más posterior (Economou y Telford, 2009; Nie et al., 2001; Rogers y Kaufman, 1997).

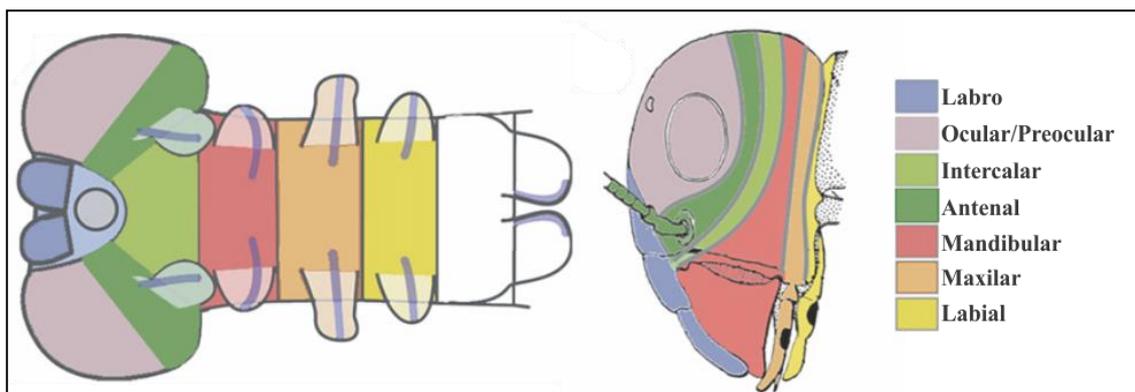


Figura 3. Composición y mapa de destino de la cabeza de un insecto por correspondencia colorimétrica. Representación de un embrión de banda germinal corta en estadio de blastodermo (izquierda) y de la cabeza del insecto adulto en vista lateral (derecha). (Tomado de Posnien et al., 2010)

Numerosos trabajos sobre *D. melanogaster* permitieron identificar los genes responsables del proceso de moldeado del *procephalon* (Jürgens et al., 1986; Schmidt-Ott y Technau, 1992; Schmidt-Ott et al., 1994). Sin embargo, la involución de la cabeza en el estadio larval, en la que ésta se internaliza dentro del tórax (Turner et al., 1979), limita extrapolar este conocimiento a otros insectos. Por lo tanto, resulta importante estudiar los genes responsables del desarrollo cefálico en insectos modelo con desarrollo directo durante la embriogénesis.

1.4 *Rhodnius prolixus* como modelo de desarrollo

Rhodnius prolixus es un hemíptero hematófago perteneciente a la familia Reduviidae nativo de Centroamérica y norte de Sudamérica (Schofield et al., 2009) (Fig. 4). Junto al género *Triatoma* constituye uno de los más importantes vectores de la enfermedad de Chagas (Chagas, 1909; Coura y Borges-Pereira, 2012; Dias et al., 2002; Garcia et al., 2004; Kollien y Schaub, 2000). Debido a que *R. prolixus* presenta un ciclo de vida más corto que otros triatominos se ha convertido en un modelo de estudio adecuado para el trabajo de laboratorio, constituyendo un excelente sistema para estudios en fisiología, biología celular y reproducción.



Figura 4. *Rhodnius prolixus*. Luego de la elosión, el insecto atraviesa 5 estadios ninfales antes de alcanzar la adultez.

La secuenciación de su genoma (Mesquita et al., 2015) permitió la identificación y caracterización de una gran variedad de genes del desarrollo en este insecto de banda germinal corta, entre ellos algunos implicados en la segmentación, el establecimiento del eje dorso-ventral, así como la mayoría de los pertenecientes al *cluster Hox* (Esponda-Behrens, 2014; Lavore et al., 2012, 2014, 2015; Pagola, 2012). Esto, lo ha transformado en un organismo interesante desde el punto de vista evolutivo, dado que es uno de los primeros 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 (1935, 1936) y Kelly y Huebner (1989), han impulsado a *R. prolixus* como modelo de biología del desarrollo.

1.5 El gen *empty spiracles*

empty spiracles fue descrito por primera vez por Jürgens y colaboradores (1984) mientras realizaban mutaciones en loci cigóticos del cromosoma 3 de *D. melanogaster*, su nombre deriva de los defectos observados en el sistema traqueal de los mutantes homocigotos para *ems*. Además de la pérdida del *filzkörper*, una estructura que reviste los tubos traqueales en los espiráculos posteriores, estos investigadores reportaron la ausencia de antenas en aquellos embriones que al final de la embriogénesis no lograban eclosionar. Posteriormente, Dalton y colaboradores (1989), lo clasificaron como miembro de una familia multigénica caracterizada por poseer un dominio tipo *Homeo box*. Esta secuencia se encuentra presente en muchos de los genes que controlan la segmentación del embrión y codifica un dominio proteico de aproximadamente 60 aminoácidos que tiene actividad de unión al ADN, permitiendo a las homeoproteínas actuar como factores de transcripción. El análisis de *Dm-ems* permitió ampliar el conocimiento sobre su función y expresión. Se observó que la actividad de este gen es

requerida para el desarrollo de los segmentos intercalar y antenal así como la región pre-antenal. En embriones mutantes para *Dm-ems* se vieron afectadas varias de las estructuras que normalmente se desarrollan a partir de estos segmentos, como los órganos sensoriales pertenecientes a la antena y las piezas cuticulares del aparato faríngeo, además de fallas en el proceso de involución de la cabeza. Además, corroboraron la ausencia del *filzkörper* y la falta de los extremos de los troncos longitudinales del sistema traqueal que permiten la unión con sus respectivos espiráculos. Por otro lado, pudieron establecer el patrón de expresión de *Dm-ems* a lo largo del embrión, el cual se encuentra correlacionado con los defectos de los mutantes anteriormente mencionados.

La clasificación de *Dm-ems* como gen *gap* la llevaron a cabo Cohen y Jürgens (1990, 1991), quienes determinaron que tanto *ems* como *orthodenticle (otd)* y *buttonhead (btd)*, denominados colectivamente “*head gap genes*” son los principales responsables del desarrollo de los segmentos anteriores de la cabeza. Estos se expresan tempranamente en la embriogénesis en dominios amplios pero superpuestos.

En los últimos años este gen fue estudiado en otros modelos biológicos. En *T. castaneum* se demostró que *ems* se expresa tempranamente durante el estadio de blastodermo tardío, en una franja angosta en la región anterior del segmento antenal, y luego, durante la fase de elongación de la banda germinal, se expresa lateralmente a modo de parches en cada segmento. Experimentos de ARN interferente (ARNi) demostraron que *Tc-ems* no se comporta como un verdadero gen *gap*, siendo este requerido sólo en la región posterior del segmento ocular y la anterior del segmento antenal, determinando el límite entre ambos. Los fenotipos fuertes de *Tc-ems*^{ARNi} presentaron formación incorrecta de la base de la antena, la cual se encontraba rotada en sentido posterior y la ausencia de ojos en algunos casos (Schinko et al., 2008).

Por otro lado, Birkan y colaboradores (2011) determinaron la expresión de *ems* en *O. fasciatus* a través de hibridaciones *in situ* a distintos tiempos de la embriogénesis, mostrando que *Of-ems* se expresa durante el estadio de blastodermo, a modo de parches laterales en la mitad anterior del embrión y luego de la invaginación del dominio cefálico, la expresión se localizó en el área presuntiva de los ojos y en la base de las antenas. Posteriormente a esta etapa, se observó en un patrón de expresión lateral reiterado en todos los segmentos a lo largo del tórax y el abdomen. Sin embargo, no fue posible validar funcionalmente a *Of-ems*, ya que no pudieron obtenerse fenotipos interferentes mediante los ensayos de ARNi parental.

Recientemente *ems* se identificó y caracterizó funcionalmente en *R. prolixus* (Lavore et al., 2015). El análisis de su secuencia codificante mostró que *Rp-ems* está compuesto por el homeodominio y los dominios N- y C-terminales (*Box A* y *Box B*, respectivamente). Al igual que los experimentos llevados a cabo en las especies anteriormente mencionadas, se utilizó la técnica de ARNi parental, lo cual reveló que los embriones interferidos presentaban fallas en el desarrollo del sistema traqueal, donde el séptimo segmento abdominal desarrollaba espiráculos pero no las tráqueas asociadas a estos, y el octavo segmento abdominal directamente no presentaba ninguna de las dos estructuras. En menor frecuencia, estos defectos también fueron observados en el sexto segmento abdominal. Las fallas en el desarrollo cefálico, comunes a todas las especies anteriormente mencionadas, no pudieron observarse.

De esta forma, partiendo de la información reportada (Lavore et al., 2015), esta tesis propone la búsqueda y validación de la función cefálica del gen *empty spiracles* en *R. prolixus*, mediante la utilización de morfometría geométrica como herramienta para establecer la significancia estadística de las diferencias encontradas en los especímenes

interferidos mediante la técnica de ARNi, y así ampliar el conocimiento de la segmentación y morfogénesis en insectos de banda germinal corta, el cual representa el tipo de embriogénesis más diversificado y, paradójicamente, menos estudiado.

2 HIPÓTESIS

El gen *empty spiracles* se encuentra conservado estructural y funcionalmente en hemípteros y controla procesos de traqueogénesis y desarrollo cefálico en *Rhodnius prolixus*.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo general

Determinar la función cefálica del gen *empty spiracles* en *Rhodnius prolixus* mediante morfometría geométrica.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Validar experimentalmente las predicciones reportadas del gen *empty spiracles* en *R. prolixus*.
- 2) Generar mutantes de *Rp-ems* por ARN interferente parental.
- 3) Describir el fenotipo de insectos interferidos con dos regiones exónicas del gen.
- 4) Establecer la significancia estadística de las diferencias entre las poblaciones interferidas y salvaje mediante el análisis por morfometría geométrica.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cría *ex situ* de *Rhodnius prolixus*

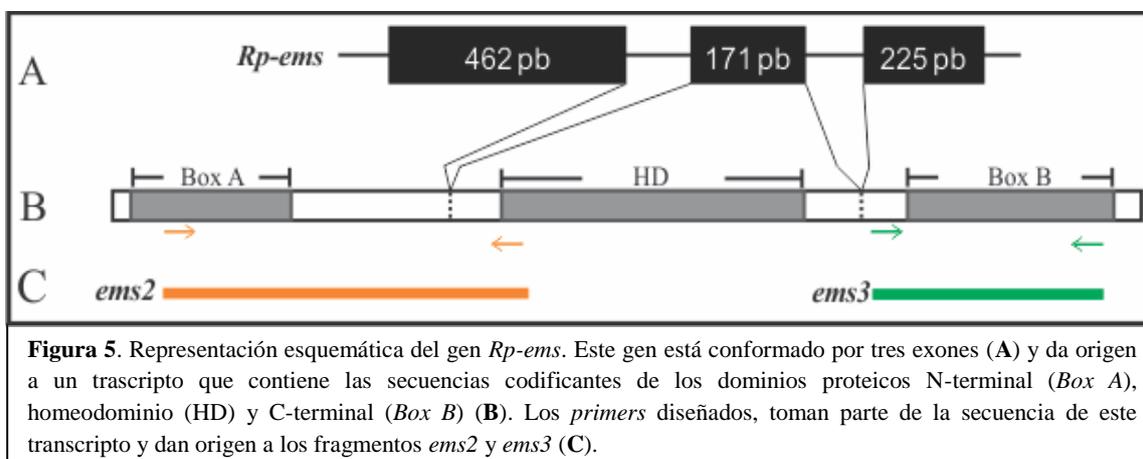
Los especímenes de *R. prolixus* fueron obtenidos a partir de una colonia establecida en el laboratorio del Centro de Bioinvestigaciones-UNNOBA. La misma se encuentra libre del protista *Trypanosoma cruzi* (agente etiológico de la enfermedad de Chagas) y se mantiene separada por estadíos ninfales en frascos plásticos de boca ancha, cubiertos por una malla de nylon fina que facilita la ventilación y alimentación. Los recipientes plásticos se limpian y cambian periódicamente con un proceso que implica utilización de lavandina, detergente no iónico y luz UV a fin de eliminar las deposiciones y cualquier microorganismo patógeno que pudiera estar presente. Los insectos se criaron a $29 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa del 60% y un fotoperíodo de 12 horas luz/oscuridad. La alimentación se realizó una vez cada 15 días utilizando aves de corral (gallinas) inmovilizadas en cajas de madera para permitir la ingesta de sangre *ad libitum* de los insectos. Bajo estos parámetros de crianza, la duración de la embriogénesis es de 14 ± 1 días (Pagola, 2012).

4.2 Validación experimental de predicciones génicas reportadas para *Rp-ems*

4.2.1 Diseño de *primers*

Dado que la validación funcional de *Rp-ems* realizada por Lavore y colaboradores (2015) implicó solo a uno de los tres exones del gen, se propuso la validación de los dos restantes, con el fin de poder asociarlos con las funciones reportadas para otras especies. A razón de esto, se decidió trabajar con dos regiones (Fig. 5): una, denominada aquí como *ems2*, que implica una extensión de la secuencia ya validada desde el *Box A* hasta el dominio *Homeo box* en el siguiente exón, y otra

denominada *ems3* que incluye al *Box B* y se corresponde con la secuencia codificante del dominio C-terminal.



En función del conocimiento de los dominios conservados, se diseñaron *primers forward* (*Fw*) y *reverse* (*Rv*) específicos para *ems2* y *ems3* con la ayuda del programa online Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). Estos oligonucleótidos contaron con parte del promotor viral del Fago T7 en el extremo 5', requerido para posteriormente realizar experimentos de parental (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias nucleotídicas de los *primers* diseñados. Las letras subrayadas se corresponden con bases que forman parte del promotor T7.

<u>ems2FwT7</u>	<u>CGACTCACTATAGGGCGCACCGAATCCAGTAATGG</u>
<u>ems2RvT7</u>	<u>CGACTCACTATAGGGTCTGGCTTCCTGTTACAACCT</u>
<u>ems3FwT7</u>	<u>CGACTCACTATAGGGGCGGACGAAGCATAAACGTA</u>
<u>ems3RvT7</u>	<u>CGACTCACTATAGGGGAGTAGTGGGGATGAAGCGT</u>

Según las predicciones realizadas, a partir de estos pares de *primers*, la región *ems2* abarcaría 511pb y *ems3*, 230pb.

La validación de su expresión se llevó a cabo mediante la utilización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Mullis, 1990).

4.2.2 Amplificación por PCR

Para realizar las amplificaciones por PCR se utilizó como molde ADNc sintetizado a partir de huevos de *R. prolixus* a distintos tiempos de desarrollo (producido por la Lic. Agustina Pascual). El termociclador utilizado fue *GenePro* (*Bioer Technology*) y la mezcla de reacción contó con los siguientes reactivos: Buffer (10X), Cl_2Mg (25 mM), DNTPs (10 mM), *primer Fw* (10 mM), *primer Rv* (10 mM), *Taq* ADN polimerasa (*Highway, INBIO*) 1U, 20-30 ng ADNc como molde y agua ultrapura estéril (*Arium 611VF -Sartorius*) hasta completar volumen.

Con el fin de determinar la temperatura óptima de hibridación de los *primers* ($T^\circ\text{a}$) se realizó un gradiente de temperaturas entre 48 y 58°C. El programa de amplificación fue:

5min 94°C→30x[30seg 94°C→30seg 48°C (gradiente 10°C)→1min 74°C]→5min 74°C.

Luego se procedió a reamplificar los fragmentos obtenidos, esta vez utilizando un primer con la secuencia completa del promotor de T7. Se mantuvo el programa de PCR pero fijando las $T^\circ\text{a}$ óptimas determinadas: 56°C para *ems2* y 58°C para *ems3*.

La integridad de los amplímeros generados se evaluó por electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TBE (1X) a voltaje constante de 90V y utilizando el intercalante de ADN Bromuro de etidio para su visualización mediante la exposición a luz UV en un transiluminador con cámara acoplada (*InGenius, Syngene*). La digitalización de las

imágenes se hizo a través del *software GeneSys VI.4.6.0 (Syngene)*. La cuantificación y estimación de la longitud de los fragmentos obtenidos se realizó tanto por comparación con un marcador de pesos moleculares (*qLadder* 100pb, Productos Bio-Lógicos) utilizando el *software ImageJ 1.48v (Abràmoff et al., 2004)* así como por flourometría usando *Qubit (Thermo Scientific)*.

4.2.3 Clonado en vectores y secuenciación

Los amplimeros fueron ligados al vector pGEMT utilizando *pGEMT-Easy Vector System (Promega)* usando el protocolo sugerido por la empresa y clonados por transformación en bacterias de la cepa DH5 α (genotipo F $^-$ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK $^-$, mK $^+$) phoA supE44 λ^- thi-1 gyrA96 relA1). Los clones se seleccionaron utilizando medio sólido selectivo LB con ampicilina y posteriormente se determinó aquellos que contenían un inserto por digestión con EcoRI (*Thermo Scientific*) a partir de ADN plasmídico purificado a partir de cultivos líquidos. Los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE y se analizó su naturaleza.

Para confirmar la identidad de secuencia de los insertos, los mismos se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. (Corea).

4.3 ARN de interferencia parental

El protocolo de ARN de interferencia (ARNi) parental utilizado en esta tesis fue recientemente desarrollado para trabajar en *R. prolixus* (Esponda-Behrens, 2014; Lavore et al., 2012; Pagola, 2012). La técnica de ARNi consiste en la incorporación, mediante inyección, electroporación o expresión *in vivo*, de ARN doble cadena (ARNdc) específico de un gen blanco en el organismo, lo cual produce silenciamiento en la

expresión del gen tanto en el organismo interferido como en su descendencia (Bucher et al., 2002; Fire et al., 1998; Hunter, 1999; Martinez y Tuschl, 2004). El proceso se inicia cuando largas cadenas de ARNdc son procesadas por la enzima Dicer, generando fragmentos de ARNdc de entre 19 y 21 nucleótidos que se los conoce 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) y la hebra *antisense*, unida a RISC, se aparea con el ARN blanco de interferencia. De esta forma, el ARN codificante es degradado por las nucleasas residentes en el complejo RISC, suprimiendo la expresión del gen (Martinez y Tuschl, 2004).

En este caso, y para analizar fenotipos de falta de función embrionarios, se utilizó la técnica de ARNi parental, inyectando hembras vírgenes y fértiles y observando los defectos en la descendencia.

4.3.1 Transcripción *in vitro*

A partir de los amplímeros acoplados a la secuencia del promotor T7, se sintetizó ARNdc mediante transcripción *in vitro*, utilizando la enzima ARN polimerasa del fago T7 en presencia de ribonucleótidos. Para esto se utilizó el *kit TranscriptAid T7 High Yield Transcription (Thermo Scientific)*. La mezcla de reacción implicó: Buffer de transcripción (5X), rNTPs (10mM), Inhibidor de ARNasas *RiboLock* 50U, T7 ARN polimerasa 30U, molde 1µg y agua ultrapura estéril hasta completar un volumen de 200 µl. La reacción se incubó por 3 hs a 37°C. Posteriormente se digirió el ADN molde utilizando 1U de ADNasa I (*Fermentas*) incubando a temperatura ambiente durante 15 min.

Luego de esto se siguió con la purificación para eliminar las proteínas y los restos de nucleótidos libres; para ello en primer lugar se hizo extracción del ARN con solventes orgánicos (fenol:cloroformo:isoamílico) y luego precipitación alcohólica. El ARN obtenido se disolvió en 10 µl de agua ultrapura estéril.

La integridad de los ARNdc se corroboró mediante una corrida electroforética y la concentración se determinó por fluorimetría usando el sistema *Qubit (Thermo Scientific)*.

4.3.2 Inyección de hembras con ARNdc

Las hembras vírgenes de *R. prolixus* requeridas para realizar ARNi parental se obtuvieron mediante la revisión y separación periódica a partir de tarros de estadíos ninfales V que hayan mudado a adulto. De este modo se pudo asegurar la inexistencia de fecundaciones previas (Schofield, 1979). Los insectos fueron inyectados con ARNdc pertenecientes a las 2 regiones de interés de *Rp-ems* (tratamientos) en 3 cantidades distintas (250, 500 y 1.000 ng) para evaluar diferentes grados de penetrancia de la técnica y evidenciar fenotipos de falta de función débiles y fuertes. Como control de la interferencia, se inyectaron hembras vírgenes con 1.000 ng de ARNdc correspondiente al gen *β-lactamasa (β-lac)* de *Escherichia coli* bajo las mismas condiciones experimentales.

La inyección se realizó intracavitariamente entre el segundo y tercer segmento abdominal utilizando una jeringa Hamilton de 5 µl. El volumen introducido osciló entre 1 y 4 µl dependiendo de la concentración inicial de la resuspensión de transcritos y la concentración deseada. Luego de la inyección se dejó que las hembras se recuperen del estrés durante 48 hs. Posteriormente fueron alimentadas para estimular el proceso de

oogénesis y colocadas junto con machos para el apareamiento, separadas en tarros de acuerdo al tratamiento y cantidad de ARNdc introducido.

4.4 Análisis de fenotipo en embriones

4.4.1 Observación y manipulación de embriones

Los recipientes con hembras interferidas se revisaron diariamente para verificar la oviposición. Los huevos encontrados fueron separados en función del tratamiento y la fecha de puesta con el fin de realizar un seguimiento exhaustivo de su embriogénesis.

Se esperó hasta que los embriones completaran su desarrollo o detengan su crecimiento para evaluar la letalidad y/o analizar los 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 a características comunes.

En el caso de los embriones que detuvieron su desarrollo, se procedió a la apertura de los huevos con el fin de analizar defectos que pudieran haber causado la detención. Los huevos fueron decorionados y devitilinizados manualmente mediante el uso pinzas de disección N° 4 y 5 (Dummont). Las disecciones se realizaron en paraformaldehído (PFA) 4%. Para una observación más detallada de los embriones que no completaron el desarrollo, se procedió a la fijación y montaje de los mismos para su observación en microscopio óptico.

Con el fin de que las características de estos embriones permanecieran lo más inalteradas posibles, los huevos próximos a completar la embriogénesis se revisaron frecuentemente durante el día para proceder a su montaje inmediato. La fijación se realizó utilizando PFA 4%. Se eliminaron los apéndices torácicos y la membrana

vitelina para visualizar mejor las estructuras de interés. Luego se transfirieron los embriones a un portaobjetos y se montaron en medio Hoyer, eliminando las posibles burbujas de aire. El preparado se incubó *overnight* a 55°C para que el medio Hoyer disgregue y disuelva las partes blandas no quitinizadas del embrión y el preparado quedara fijado de manera permanente.

Los preparados fueron examinados en microscopio óptico (*Primo Star - Zeiss*) en busca de defectos en el desarrollo, puntualizando en la región cefálica y el sistema traqueal.

4.4.2 Análisis por morfometría

Para evidenciar los cambios fenotípicos de falta de función de *empty spiracles* en la cabeza de los insectos interferidos, se comparó la morfología de los mutantes *ems2^{ARNi}* respecto a una población de embriones salvajes (*wt*). Estos últimos fueron extraídos de la colonia y montados en condiciones experimentales homogéneas.

La comparación se llevó a cabo mediante análisis por morfometría clásica y geométrica de imágenes de cabezas. La captura de las mismas se realizó utilizando la cámara *AxioCam ERc5s (Zeiss)* acoplada al microscopio *Primo Star (Zeiss)* y la digitalización y edición se llevaron a cabo utilizando el *software ZEN 2012 blue edition (Zeiss)*.

4.4.2.1 Morfometría clásica

Para un análisis comparativo general de las diferencias morfológicas entre poblaciones se establecieron puntos de referencia sobre las imágenes (Tabla 2) y se midieron las distancias entre estos a fin de representar las dimensiones lineales de las cabezas. Las mediciones se realizaron utilizando el *software ZEN (Zeiss)*.

Tabla 2. Descripción de las distancias medidas para 3 caracteres. La misma se corresponde con la longitud de la recta trazada entre los puntos referenciados con letras entre paréntesis.

Carácter	Distancia medida
Ancho	Entre las macro-setas tipo I de los <i>antennifer</i> derecho (a) e izquierdo (b).
Largo total	Entre los puntos extremos de la cabeza a través de su eje longitudinal: el punto más posterior de la sutura postoccipital (e) y el borde anterior del clipeo (c).
Largo parcial	A través del eje longitudinal, entre el borde anterior del clipeo (c) y el punto geométrico de intersección de 2 rectas trazadas desde el borde anterolateral de un ojo en la región anteocular, al borde posterolateral del otro en la región postocular (d).

4.4.2.2 Morfometría geométrica

Para establecer la significancia estadística de las diferencias de forma y tamaño entre embriones interferidos y *wt* se utilizó morfometría geométrica. Los análisis se llevaron a cabo sobre un registro fotográfico de las cabezas de *R. prolixus* tomadas en vista dorsal con objetivo 10X, orientando la región anterior hacia la izquierda y centrándolas sobre el eje longitudinal del embrión.

La geometría de la estructura se capturó mediante un conjunto de puntos morfométricos o *landmarks* y su análisis se llevó a cabo en tres pasos (Toro-Ibacache *et al.*, 2010): 1) obtención de los datos, 2) obtención de la información que describe la forma, y 3) análisis exploratorios y confirmatorios de covariación de la forma con factores causales.

1) Obtención de los datos

Se seleccionaron 8 *landmarks* en base a 5 criterios (Zelditch *et al.*, 2012): homología, coplanaridad, repetibilidad, consistencia en la posición relativa y cobertura adecuada de la forma (Tabla 3). La digitalización de los mismos se llevó a cabo usando

el software *TPDIG2* (Rohlf, 2008) y los análisis estadísticos posteriores, utilizando *MorphoJ* (Klingenberg, 2011) considerando variación de forma y tamaño.

Tabla 3. Numeración y descripción de los landmarks seleccionados. La misma se explica atendiendo al posicionamiento de las cabezas en la imagen como se describe en el texto.

Referencia numérica	Tipo	Descripción de <i>landmark</i>
1	Estructural	Base de la macro-seta tipo I derecha
2	Estructural	Borde anterolateral del ojo derecho en la región anteocular
3	Estructural	Borde posterolateral del ojo derecho en la región postocular
4	Estructural	Borde posterolateral del ojo izquierdo en la región postocular
5	Estructural	Borde anterolateral del ojo izquierdo en la región anteocular
6	Estructural	Base de la macro-seta tipo I izquierda
7	Geométrico	En la intersección de la recta trazada desde el punto 2 al 4 con la trazada desde el punto 3 al 5
8	Geométrico	En la intersección de la recta trazada desde el punto 2 al 6 y la trazada desde el punto 1 al 5

2) Obtención de la información que describe la forma

Una vez que se obtuvieron las coordenadas cartesianas x-y para todos los *landmarks*, la información de la forma se extrajo con un ajuste completo de Procrustes (Dryden y Mardia, 1998; Rohlf, 1996). Este procedimiento elimina la información de tamaño, posición y orientación para normalizar cada muestra de acuerdo al *centroid size*.

La existencia de diferencias alométricas significativas entre las dos poblaciones se determinó mediante una prueba de permutación con $\alpha=0,05$.

3) Análisis exploratorios y confirmatorios de covariación de la forma con factores causales.

El análisis de las diferencias entre tratamientos se llevó a cabo realizando un análisis de variantes canónicas (CVA) (Zelditch et al., 2012) que es un método estadístico utilizado para encontrar los caracteres de forma que mejor distinguen múltiples grupos de muestras.

El criterio de clasificación fue el tipo de tratamiento (mutante y *wt*) y la visualización de los cambios de forma se realizó mediante diagramas de *wireframes*.

5 RESULTADOS

5.1 Validación experimental por PCR de las predicciones génicas de *ems*

La comprobación de la expresión de *Rp-ems* se llevó a cabo mediante la técnica PCR. Se utilizaron los *primers* específicos diseñados para las dos regiones de interés, definidas como *ems2* y *ems3*, y utilizando como molde ADNc generado a partir de ARN extraído de huevos embrionados en distintos estadios de desarrollo. En la figura 6 se muestra el resultado de la electroforesis para los amplímeros obtenidos por PCR, el cual no mostró bandas inespecíficas y permitió estimar las longitudes de los fragmentos, que fueron coincidentes con las esperadas en función de las predicciones realizadas (Lavore et al., 2015): 511pb para *ems2* y 230pb *ems3*.

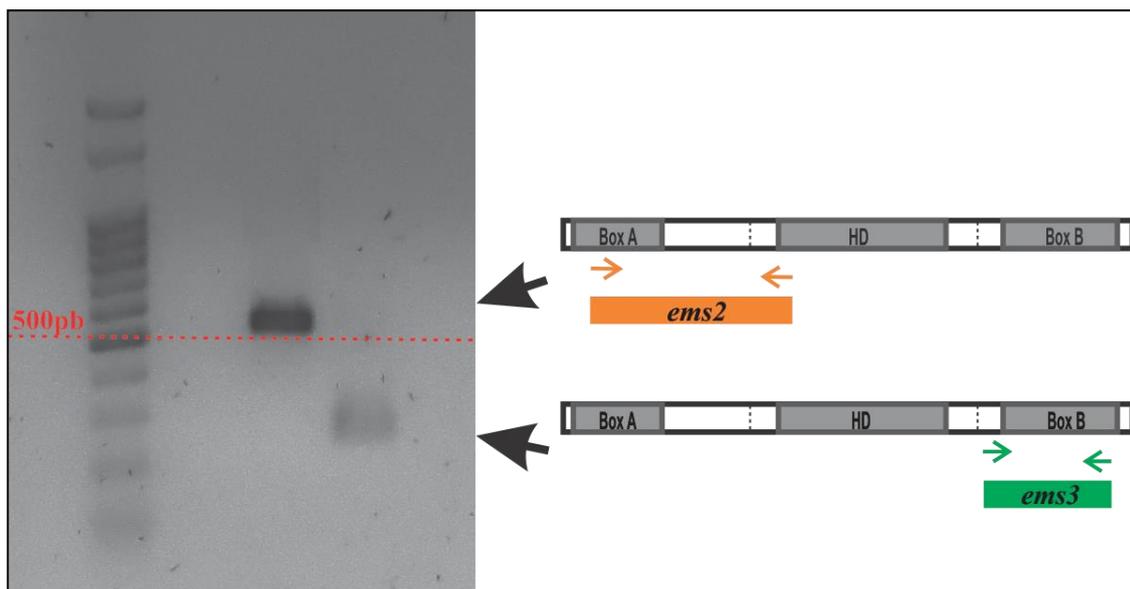


Figura 6. Gel obtenido a partir de la corrida electroforética de los fragmentos amplificados por PCR. Los *primers* diseñados (representados por flechas coloreadas) abarcaron parte de la secuencia del transcripto codificado por *Rp-ems* y dieron origen a los amplímeros *ems2* y *ems3* (bandas/cuadros coloreados). Los cuadros grises representan las secuencias codificantes de los dominios conservados de *Rp-ems* y las líneas punteadas, los sitios de unión entre exones (LO PONGO COMO SITIOS DE SPLICING?).

La secuenciación de los amplímeros permitió confirmar que los transcriptos pertenecían al gen *ems* y que el segundo exón en realidad se extendía 3 nucleótidos

upstream del inicio de la secuencia anotada para éste, por lo tanto la proteína codificada es de 285 aminoácidos, uno más que lo reportado por Lavore y colaboradores (2015).

5.2 Descripción fenotípica y validación funcional de *ems2* y *ems3* por ARNi parental

Para el estudio funcional del gen se interfirieron 20 hembras vírgenes con ARNdc correspondiente a *ems2*, *ems3* y β -*lac* como control negativo. En cada caso, a excepción del control, se inyectaron 3 cantidades distintas de cada ARNdc para evaluar diferentes grados de penetrancia de la técnica y poner de manifiesto fenotipos de falta de función débiles y fuertes. En total, las hembras ovipusieron 918 huevos de los cuales 330 correspondieron al tratamiento *ems2*, 373 a *ems3* y 215 al control.

Luego de que los embriones completaran su desarrollo o hayan detenido su crecimiento, se los observó bajo lupa para evaluar la letalidad y/o analizar los fenotipos. Para facilitar la interpretación de los resultados, la variedad de fenotipos obtenidos se agrupó en clases de acuerdo a características comunes, como indica la siguiente tabla:

Clase	Características fenotípicas
I	Aparente ausencia de embrión. Sólo se observa vitelo.
II	Embrión letal temprano. Observación de marcadores externos y presencia de mucho vitelo.*
III	Embrión con desarrollo completo (preninfa), sin presencia de vitelo libre, con eclosión parcial o nula. (no viable)
IV	Eclosión del embrión. Ninfa I con desarrollo normal.**

* El embrión se considera letal dado que no se produjo la eclosión luego del tiempo de embriogénesis en condiciones controladas. Se considera la letalidad en estadios tempranos debido a que fue posible visualizar marcadores externos, como la coloración de los ojos.

** Se considera ninfa I normal a aquellas preninfas que completaron la eclosión y que luego de aislarlas para un seguimiento exhaustivo, mudaron al estadio ninfal II.

Todos los tratamientos presentaron fenotipos ajustables a las 4 clases descriptas y el recuento se resume en la Tabla 4. En cada tratamiento una clase fenotípica fue

predominante y se halló en mayor frecuencia que el resto, independientemente de la cantidad de ARNdc inyectada. La excepción fueron las hembras inyectadas con 1.000 ng de *ems3*^{ARNdc}, en las que se observó una única clase fenotípica y probablemente haya sido consecuencia de la baja frecuencia de oviposición (n=15).

Tabla 4. Resultados de las puestas de hembras interferidas y control de acuerdo la clase fenotípica y la cantidad de nanogramos inyectados por hembra.

Identidad del ARNdc	Cantidad inyectada (ng)	Clases fenotípicas				Total
		I	II	III	IV	
		Número de huevos				
<i>ems2</i>	250	47	1	160	11	
	500	2	2	21	2	
	1000	15	0	62	7	
% total		19	1	74	6	330
<i>ems3</i>	250	110	7	4	6	
	500	206	9	11	5	
	1000	15	0	0	0	
% total		89	4	4	3	373
<i>β-lactamasa</i>	1000	13	8	6	188	
% total		6	4	3	87	215

En *ems3*^{ARNi}, 331 huevos de los 373 totales, presentaron las características de la clase I, dado que, en las condiciones experimentales de observación microscópica sin tinción no fue posible determinar la presencia de embrión (Fig. 7) sino sólo vitelo, aunque a los fines prácticos se los denomina sin embrión. Por otro lado, en el tratamiento control 188 embriones de los 215 totales presentaron el fenotipo salvaje esperado.

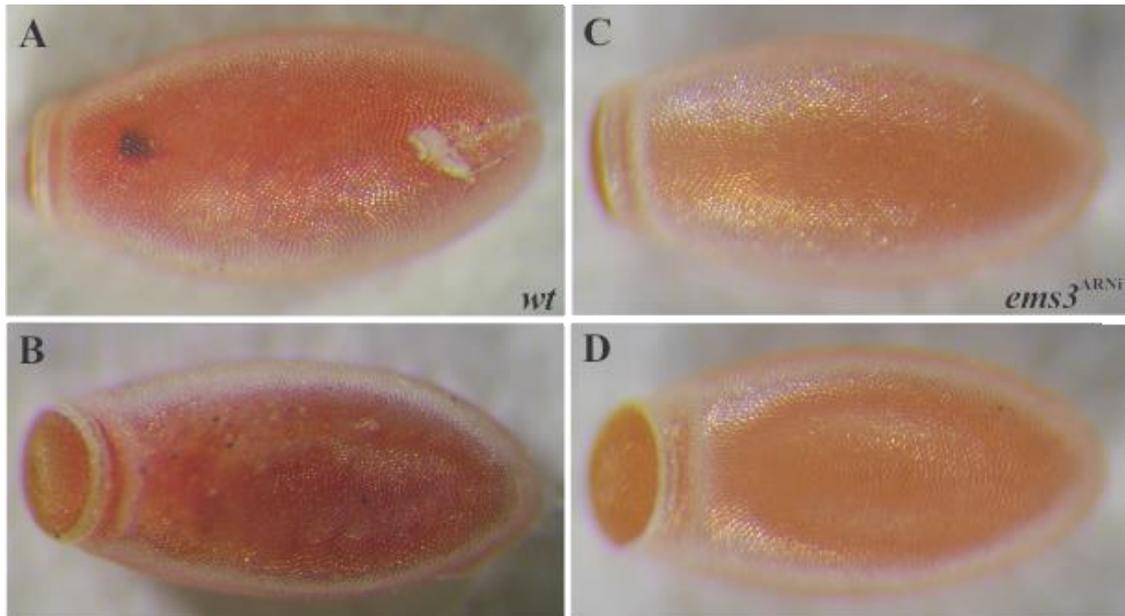


Figura 7. Fotografías de huevos *wt* y *ems3^{ARNi}* 14 días después de su oviposición en vista ventral (A,C) y dorsal (B,D). Mientras que en los huevos provenientes de parentales salvajes es posible visualizar segmentos y estructuras específicas como los ojos, en los huevos interferidos con *ems3^{ARNdc}* no se visualizan dichas estructuras, sugiriendo que el desarrollo se detuvo en algún momento anterior a la formación del ojo.

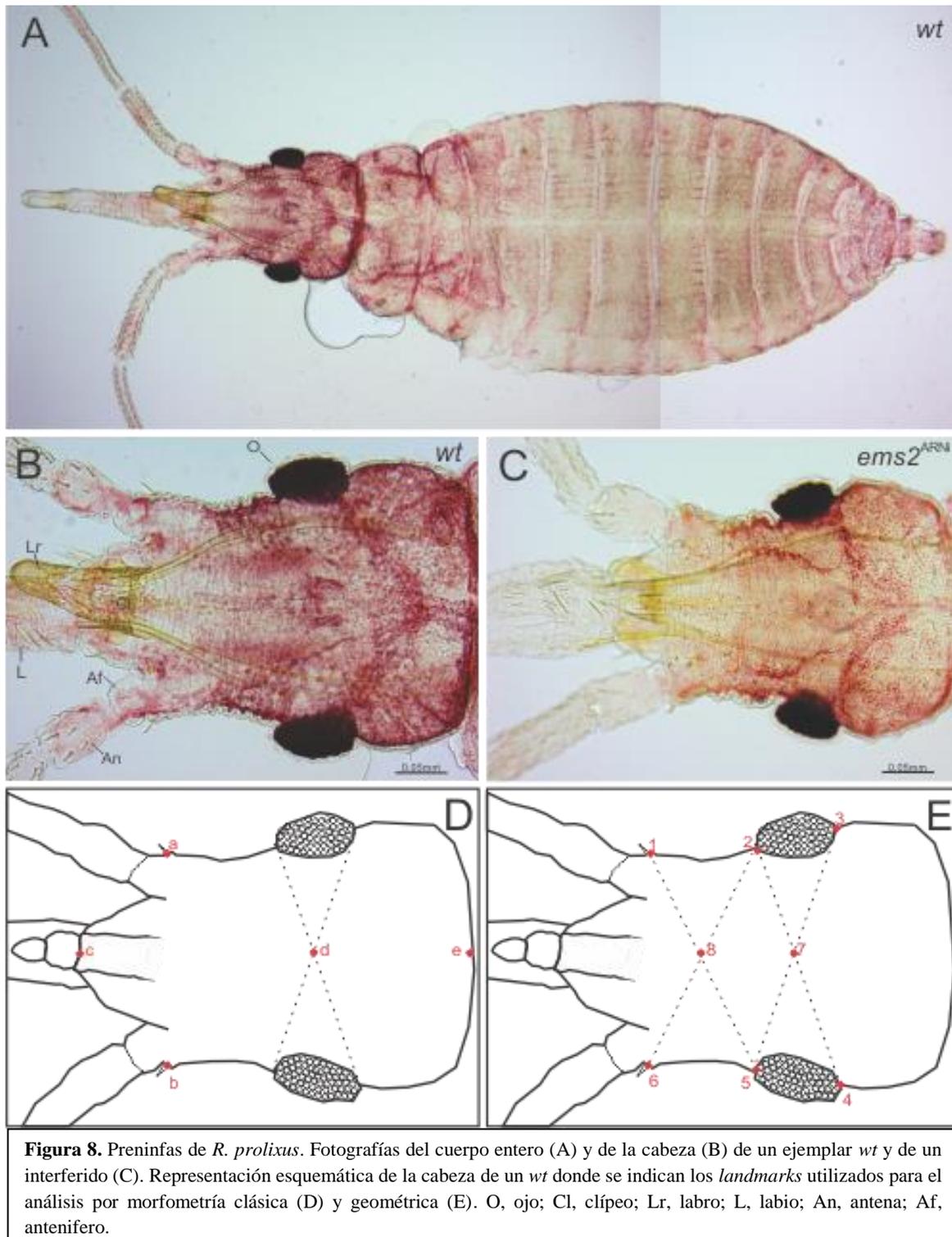
En el recuento de embriones para el tratamiento *ems2^{ARNi}*, 243 de los 330 totales presentaron un continuo de fenotipos ajustables a la clase III en los que la característica común radicó en la letalidad de las preninfas con desarrollo completo y sin alteraciones aparentes de segmentos o estructuras.

Una característica presente en todos los tratamientos pero con mayor frecuencia en *ems2^{ARNi}* fue la eclosión parcial de los embriones: luego del desprendimiento del opérculo, los insectos no podían terminar de eclosionar, pudiendo sacar sólo un tercio de su cuerpo. El tiempo en que una preninja *wt* completó la eclosión no superó los 7 minutos, mientras que los embriones clase III lo intentaron por un período de tiempo mucho mayor, aletargando sus movimientos progresivamente hasta detenerse y morir (resultados no mostrados).

Los 3 tratamientos presentaron huevos con embriones letales tempranos. Dado que las frecuencias en las que se observaron fueron muy bajas (3/330 para *ems2*^{ARNi}, 16/373 para *ems3*^{ARNi} y 8/215 para el control), no se los consideró parte de los estudios posteriores.

Para un análisis más exhaustivo de los efectos de las interferencias en el desarrollo embrionario, se procedió al montaje y examinación en el microscopio óptico de las preninfas mutantes que no completaron la eclosión. La descripción fenotípica de éstas se realizó por comparación con una población de preninfas *wt* montada en condiciones experimentales homogéneas y para lograrlo se indujo la detención del desarrollo al momento del desprendimiento del opérculo seguido de su fijación inmediata (Fig. 8 A y B).

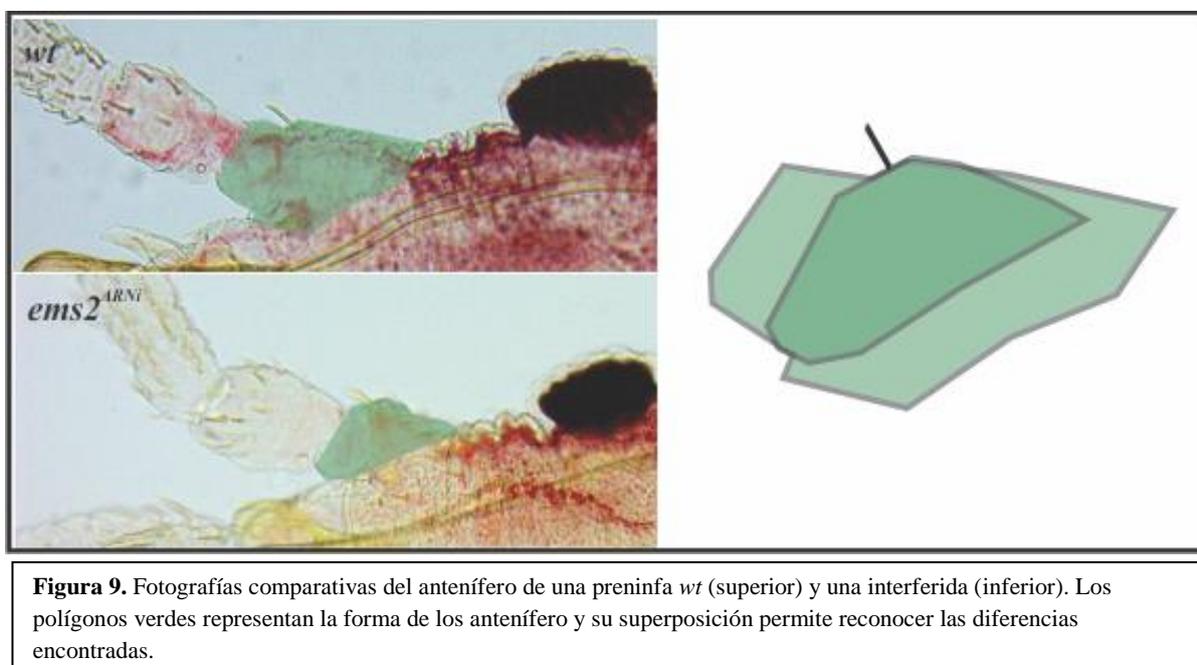
Es muy importante destacar que se compararon especímenes en las mismas condiciones, ya que las características de una preninja de *R. prolixus* difieren de las de una ninfa I, principalmente por el desarrollo cuticular incompleto, y que hasta el momento no existen publicaciones donde se describan en detalle la morfología de las preninfas. De esta forma, la observación y descripción minuciosa de su morfología fue de gran importancia para establecer la falta de función de los fragmentos génicos estudiados en los individuos interferidos. En la cabeza de ninfas I (Anexo Fig. A2) es posible observar con claridad las suturas epicraneales, así como la occipital y la postoccipital, las cuales no se ven muy definidas en las preninfas (Fig. 8 B). Por otro lado, las ninfas I presentan muchas placas asociadas a setas sobre la superficie de la cabeza que no están presentes, o bien no es posible visualizarlas en el estadio preninfal.



El desarrollo traqueal se vio alterado en los dos tipos de mutantes analizados (Anexo Fig. A1) y las características observadas fueron coincidentes con las reportadas anteriormente: ausencia de sistema tubular asociado al espiráculo del 7mo segmento

abdominal y ausencia de espiráculo y tráquea asociada en el 8vo segmento abdominal (Lavore et al, 2015).

Con el fin de analizar la función cefálica del gen, se procedió a la búsqueda de defectos en esta región en embriones *ems2*^{ARNi} clase III, donde la comparación con la población de insectos *wt* permitió detectar una clara reducción en el tamaño de la cabeza en los interferidos (Fig. 8 B-C), así como también un cambio en la morfología del antenífero, una estructura ubicada en la región anteroocular asociada a la base de la antena (Fig. 9).



5.3 Análisis morfométrico en preniñas interferidas para *Rp-ems2*

La diferencia de tamaño observada en los embriones *ems2*^{ARNi} clase III se corroboró estableciendo puntos de referencia sobre las imágenes (Fig. 8 D) y tomando medidas morfométricas que representen las dimensiones lineales de la cabeza en base a los caracteres ancho, largo parcial y largo total. Las medidas para éstos en los especímenes *wt* fueron 0,42, 0,48 y 0,91mm respectivamente, mientras que en los

interferidos las medidas confirmaron la reducción de tamaño de la cabeza dado que los valores fueron 0,37 para el ancho y 0,38 y 0,71 para largo parcial y total.

Para establecer la significancia de las diferencias fenotípicas observadas, se utilizó morfometría geométrica como herramienta estadística, destinando para esto un registro fotográfico de 68 cabezas de preninfas, de las cuales 15 pertenecían a insectos *wt* y 53 al tratamiento *ems2^{ARNi}* clase III. En cada imagen se digitalizó un conjunto de 8 *landmarks* (Fig. 8 E) elegidos para que representen la geometría de la estructura.

El análisis morfo-geométrico consideró variaciones en forma y tamaño y se realizó mediante el *software MorphoJ*. Mediante ajuste por Procrustes, se eliminaron las diferencias entre especímenes debidas a efectos de posición, rotación y escala, obteniéndose la forma pura de cada uno dada por los residuos de Procrustes (Fig. 10), es decir la desviación de cada muestra respecto a la configuración consenso.

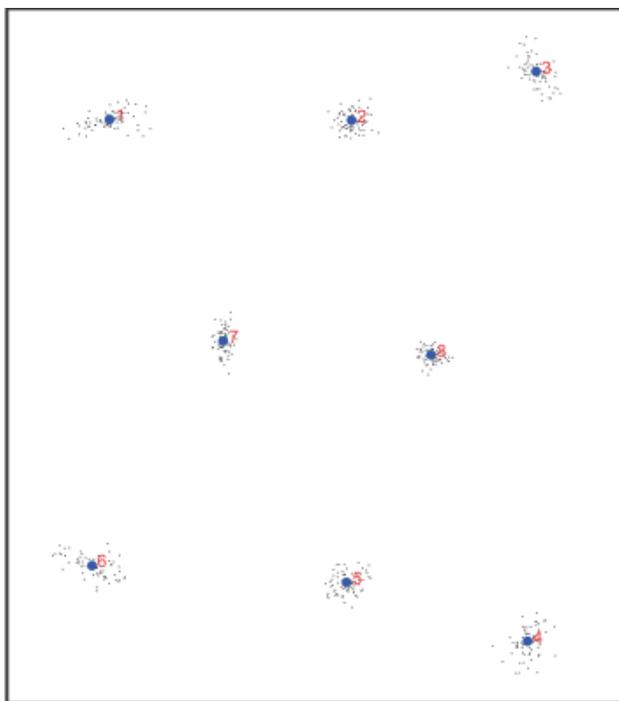


Figura 10. Diagrama de residuos de Procrustes. Se indica la distribución de coordenadas de Procrustes (puntos negros) en función del consenso (puntos azules) para la configuración de *landmarks* homólogos. Los números indican la referencia de *landmarks*.

Mediante el análisis de regresión y trabajando con el logaritmo del *centroid size* como variable independiente, se estableció la significancia estadística de las diferencias alométricas entre los dos tratamientos a través de un test de permutación, estableciendo como hipótesis nula que los especímenes analizados no presentaban diferencias de tamaño entre ellos. El resultado arrojó un valor P de 0,1227 (con $\alpha=0,05$), confirmando las diferencias significativas de tamaño entre interferidos y *wt*. Los resultados del análisis de regresión pueden visualizarse en la figura 11, donde se observa la evidente separación de los tratamientos en estudio.

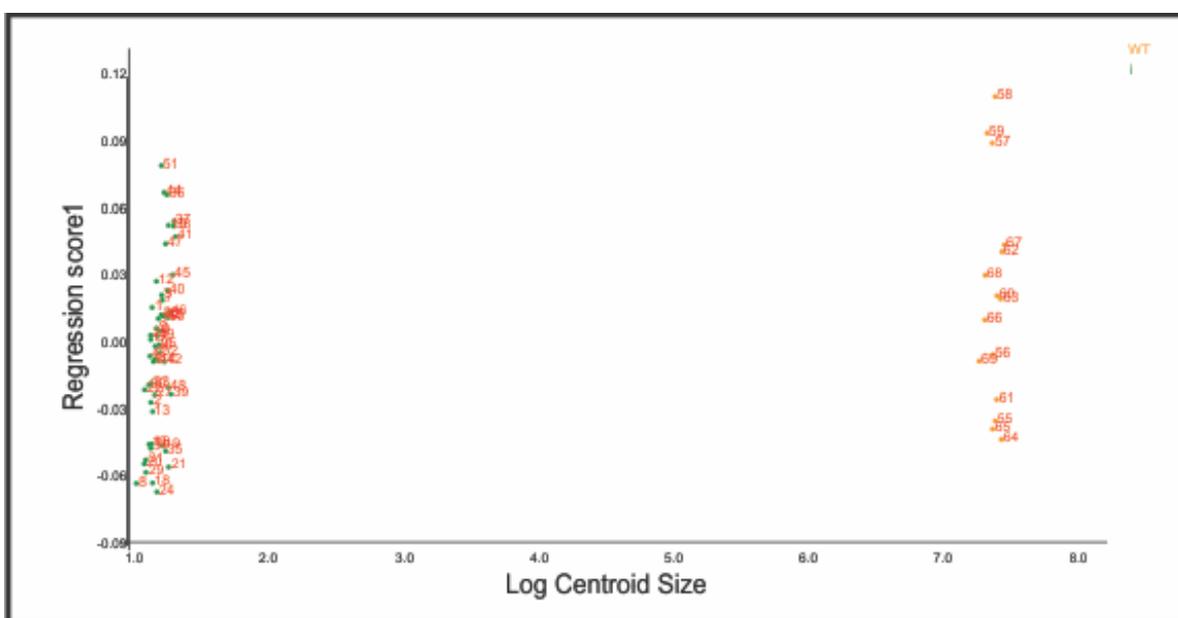


Figura 11. Gráfico resultado del análisis de regresión. Sobre el eje vertical se representan los valores de la regresión y sobre el horizontal el logaritmo del *centroid size*. Los valores numéricos se corresponden con los individuos analizados.

El análisis de variables canónicas para los residuos de la regresión (aquellos datos no sesgados por la diferencia de tamaño entre los tratamientos) mostró solapamiento total de las elipses de confianza, no permitiendo discriminar grupos. El resultado del CVA sin tener en cuenta los residuos de la regresión, permitieron la visualización de elipses de confianza que, si bien se solapan, permiten diferenciar los

dos grupos a lo largo de la variable canónica 2 (Fig. 12). Por lo tanto, existe diferencia en la forma de la cabeza de los interferidos respecto a los *wt*, la cual se debe a diferencias de tamaño y puede ser visualizada mediante *wireframes* que, en función del consenso, muestran un acortamiento general en sentido longitudinal de la geometría de la cabeza.

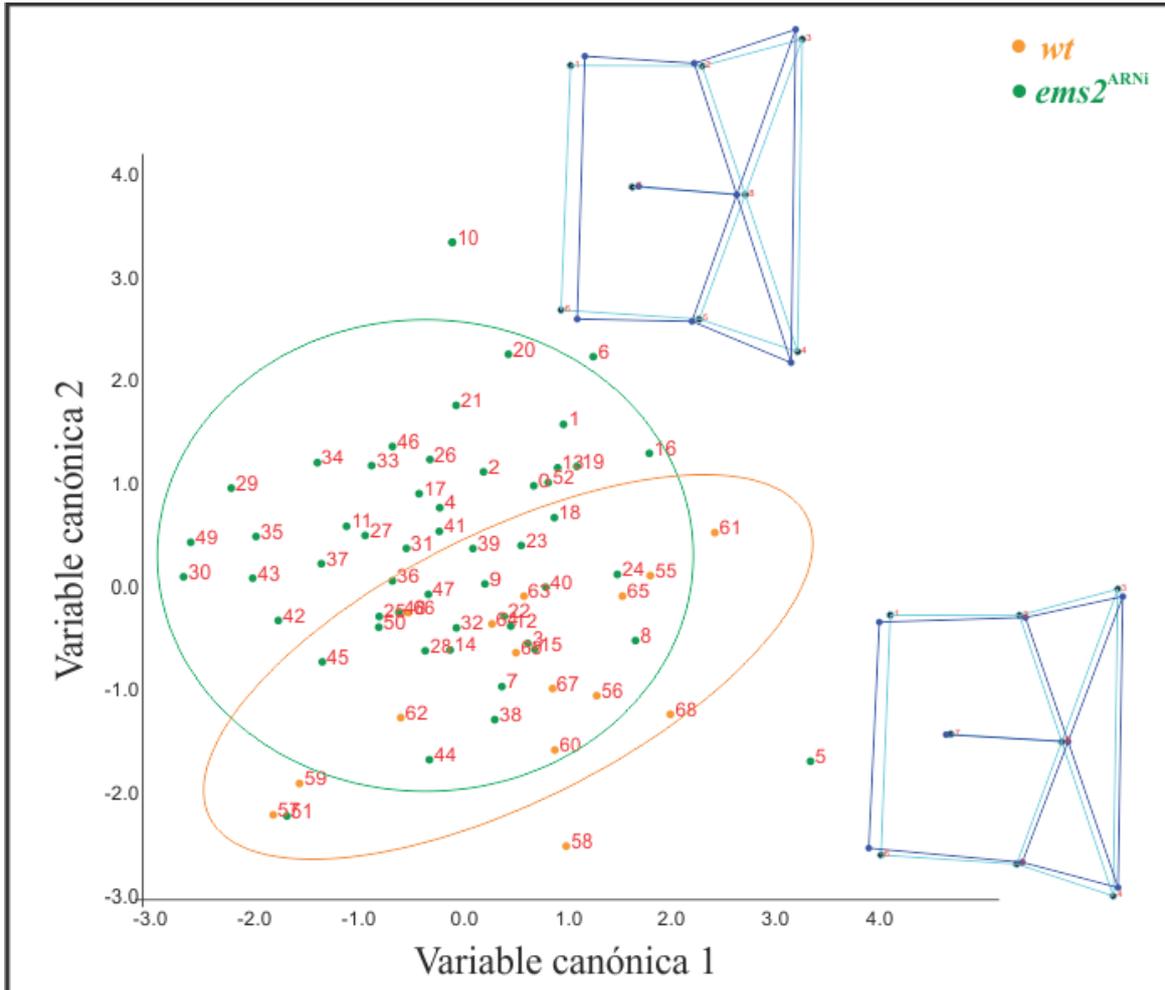


Figura 12. Diagrama bivariante de la variación de la forma por análisis de variantes canónicas. Se muestran las elipses de confianza para cada población y los diagramas *wireframe* para el consenso (celeste) y los obtenidos con valores altos y bajos de la variable canónica 2 (azul).

6 DISCUSIÓN

El gen *empty spiracles* (*ems*) fue identificado por primera vez en *D. melanogaster*. El gen codifica un factor de transcripción con un dominio de unión al ADN de tipo homeodominio (Dalton et al., 1989; Jürgens et al. 1984). Estudios posteriores llevados a cabo por Cohen y Jürgens (1990), clasificaron a *ems*, junto con *otd* y *btd* como “*head gap genes*” debido a la función de estos en el desarrollo de los segmentos anteriores de la cabeza de la mosca del vinagre. Los mutantes de *Dm-ems* se caracterizaron por defectos larvarios en el segmento antenal y en las piezas cuticulares del aparato faríngeo, así como también por la ausencia del *filzkörper* en los segmentos abdominales posteriores y la falta de los extremos de los troncos longitudinales del sistema traqueal que permiten la unión con sus respectivos espiráculos (Dalton et al., 1989). *Dm-ems* posee dos dominios de expresión en el embrión: uno anterior, en la región cefálica, desde el momento de la celularización del blastodermo hasta la fase temprana de extensión de la banda germinal, y uno metamérico, que comienza luego de la gastrulación, se expresa en los precursores de neuroblastos laterales y en células ectodérmicas en el borde anterolateral de cada segmento. Estos dominios de expresión se correlacionan, respectivamente, con la función del gen: el anterior con el fenotipo “gap” de cabeza y el metamérico con el correcto desarrollo del sistema traqueal.

ems también fue estudiado en otras especies de insectos como *O. fasciatus*, *T. castaneum* y *Apis mellifera* (Birkan et al., 2011; Dearden et al., 2014; Schinko et al., 2008). En estos insectos se corroboró la expresión metamérica en los rudimentos segmentales pero en la región cefálica, la expresión se observó restringida al dominio que da origen al segmento antenal del *procephalon* y no a varios segmentos continuos en el embrión. De esta manera, *ems* no estaría cumpliendo el rol de un verdadero gen

gap en la región cefálica. Recientemente se realizaron estudios para determinar la función de *ems* en *R. prolixus* (Lavore et al., 2015) determinándose su función en el desarrollo del sistema traqueal, pero no en el desarrollo de la cabeza. Para evaluar si esta falta de función cefálica, que no pudo determinarse por los métodos estándar, era debido a la existencia de fenotipos sutiles o cuantitativos, en esta tesis se investigó la región cefálica mediante el análisis por morfometría geométrica en fenotipos mutantes *Rp-ems* derivados de la aplicación de la técnica de ARNi parental.

6.1 Interferencia parental mediada por ARN

En el presente trabajo se estudiaron dos regiones del gen *Rp-ems* no analizadas en trabajos previos del laboratorio (Lavore et al., 2015): una correspondiente a la secuencia que codifica para el homeodominio y el dominio N-terminal o *Box A* (*ems2*) y otra, que incluye la secuencia para el dominio C-terminal o *Box B* (*ems3*). Las interferencias resultaron efectivas, ya que todas las hembras inyectadas generaron embriones que mostraron fenotipos mutantes en sus descendencias con respecto a los insectos *wt* y, al mismo tiempo diferentes características fenotípicas para ambos tratamientos analizados. A diferencia de resultados obtenidos por otros laboratorios en especies diferentes para otros genes (He et al., 2006), nuestros resultados fueron consistentes en cuanto a la expresividad en la que se presentaron a lo largo de todo el período de análisis experimental.

6.2 La función del *Box B* de *Rp-ems*

El dominio C-terminal o *Box B* descrito para *Rp-ems* está conservado en todos los insectos, a excepción de Dípteros (Lavore et al., 2015). El silenciamiento del *Box B* de

Rp-ems presentado en este trabajo resultó en embriones que detuvieron su desarrollo, en donde la mayoría de los huevos interferidos no dio lugar a la eclosión de la larva.

Dado que una vez transcurrido el tiempo de desarrollo necesario para el nacimiento del primer estadio larval/ninfal no se produjo la eclosión y que tampoco se pudieron visualizar marcadores externos, tales como la coloración de los ojos, que permiten inferir que el proceso de embriogénesis estaba suficientemente avanzado, conjeturamos que el desarrollo se detuvo en estadios tempranos. Queda por hacer un análisis detallado de los embriones remanentes en los huevos para determinar el momento en que el desarrollo se detiene y el fenotipo eventual de dichos embriones. El tiempo requerido para este análisis excedió el tiempo pautado para la terminación de esta tesis y queda abierto a futuro. Una conjetura plausible es que este dominio sea parte de una variante de *splicing* alternativo para *Rp-ems*, de origen materno y que condiciona el desarrollo temprano de los embriones. Sería interesante en una segunda etapa de este trabajo, repetir los experimentos para este tratamiento, complementándolos con estudios de PCR en tiempo real e hibridaciones in situ de ovarios y embriones, a diferentes tiempos luego de la ovipuesta para así validar la posible función materna de este gen.

6.3 *Rp-ems* y su función cefálica

De los trabajos ya mencionados sobre *ems* en especies filogenéticamente más basales que *D. melanogaster*, sólo en *T. castaneum* se pudieron ver defectos fenotípicos cefálicos por ARNi parental, donde la base de las antenas se encontraba doblada en sentido posterior (Schinko et al., 2008). Tampoco Lavore y colaboradores (2015)

registraron defectos en el desarrollo de la región cefálica en *R. prolixus* luego del silenciamiento de *Rp-ems*.

En este trabajo, un análisis más detallado y exhaustivo usando morfometría de la región comprendida entre el Box A y el HD (llamada *ems2*) mostró fenotipos sutiles, no descritos anteriormente para *R. prolixus*. Los embriones interferidos para *ems2*^{ARNi} mostraron un alto porcentaje de letalidad en estadios tardíos del desarrollo, donde la gran mayoría de éstos no completaron la eclosión (Tabla 4). Estudios de otros laboratorios en el ortólogo de *ems* en *D. melanogaster*, describieron que los mutantes *Dm-ems* tienen fenotipo de desarrollo del cerebro y el cordón nervioso ventral (Hirth et al., 1995; Hartmann et al., 2000). Esto nos permite conjeturar que el retraso e impedimento de la eclosión en los mutantes *Rp-ems* quizás se deba a defectos en el aparato neuromotor, con una función homóloga a *Dm-ems*, que impiden la correcta coordinación de movimientos para la eclosión. La demostración de nuestra hipótesis queda abierta para futuros estudios acerca de la función de *Rp-ems* en el sistema nervioso.

La observación minuciosa de los insectos interferidos para *Rp-ems* permitió confirmar la presencia de todas las estructuras derivadas del *gnathocephalon*, *procephalon*, así como el acron y el clípeo, mostrando que *ems* no tiene función *gap* en *R. prolixus*, coincidiendo con los resultados obtenidos en *T. castaneum* en los que sólo la base de las antenas y en menor frecuencia los ojos, presentaron defectos morfológicos (Schinko et al., 2008).

Sin embargo, el análisis de las preninfas *Rp-ems*^{ARNi} mostró una apreciable reducción del tamaño del *procephalon*. A través del análisis morfométrico se vio claramente que las dimensiones lineales de la cabeza del tratamiento *ems2*^{ARNi} variaban

con respecto a las de la población *wt*. Esto podría correlacionarse directamente con los cambios morfológicos que se evidencian en el antenífero, el cual está reducido en las preinfas interferidas, permitiendo concluir que *Rp-ems* se encuentra implicado en el desarrollo de la región cefálica y, más precisamente, en el correcto desarrollo del segmento antenal.

Para establecer la significancia estadística de la reducción de la cabeza de los insectos interferidos para *ems2^{ARNi}*, las mismas fueron analizadas mediante el uso de morfometría geométrica. Esta herramienta estadística permitió determinar que el tamaño de la cabeza de los individuos analizados difería significativamente entre ambos tratamientos (interferido y *wt*). Por otro lado, se pudo ver a través de los resultados del CVA, que las diferencias observadas no se debían a un cambio de forma, sino a un cambio en el tamaño de las mismas. Con esto, podemos concluir que la reducción del antenífero sería la causante del cambio en el tamaño del *procephalon* que confirma la función cefálica del gen *Rp-ems* en la región cefálica.

6.4 Morfometría geométrica aplicada al análisis de fenotipos sutiles

Una gran variedad de procesos biológicos produce diferencias en la forma de los individuos, diferencias que podrían estar indicando distintos roles funcionales, diferentes respuestas frente a la misma presión de selección, así como diferencias en el proceso de crecimiento y morfogénesis (Zelditch et al., 2012). La morfometría geométrica implica el estudio de la covariación de la forma con factores subyacentes, y su aplicación permite abstraer la forma de los organismos mediante el uso de marcas o puntos, donde la información sobre el tamaño, la posición y la orientación se ajustan para obtener la información precisa de la forma a partir de un análisis estadístico. El

análisis morfométrico por puntos fue concebido por Bookstein en 1997 y su aplicación involucra la identificación de puntos homólogos (*landmarks*) en los organismos para determinar de manera cuantitativa el cambio en la forma teniendo en consideración el cambio en el tamaño.

En este trabajo se establecen las bases y se valida la aplicación de técnicas de morfometría geométrica para resolver problemas fenotípicos de índole estrictamente morfológica.

La aplicación de estas técnicas al análisis de fenotipos sutiles en la región cefálica derivados de la utilización de la técnica de ARNi, constituye una novedad. En este trabajo se comprobó de manera estadísticamente demostrable la hipótesis de que *Rp-ems* tiene una función en el desarrollo cefálico durante la embriogénesis. Esto permite extrapolar esta metodología al estudio de otros genes en *R. prolixus* y en distintos insectos.

6.5 Nuevos métodos de preparación de cutículas para análisis morfométrico

Es importante destacar que durante este trabajo se aplicó un nuevo método para la preservación de la morfología de las preninfas y la observación de los fenotipos embrionarios de modo que permitió el análisis morfométrico. El desarrollo experimental no implicó la tradicional clarificación de embriones con potasa para la visualización de cutículas sino el uso del método de Hoyer, habitualmente usado en el análisis de fenotipos larvarios de *D. melanogaster*. De esta forma, las características estructurales pueden ser mejor preservadas y más claramente visualizadas, resultando en una determinación de la forma del embrión/preninfia más ajustada a la real. Este trabajo permitió, además, realizar la primera caracterización morfológica de preninfas de *R.*

prolixus. Si bien el proceso de montaje es más laborioso, representa una ventaja frente a los preparados cuticulares donde su fragilidad y elasticidad no permite la manipulación necesaria que permita unificar los criterios de posición de los embriones en los preparados, lo cual es fundamental para aplicar análisis por morfometría geométrica.

Los resultados del presente Trabajo Final de Licenciatura contribuyen al avance en el conocimiento del desarrollo embrionario de *Rhodnius prolixus* a partir del establecimiento de la morfometría geométrica como una herramienta válida y certera para el análisis de fenotipos sutiles, la determinación de que diferentes exones del mismo gen producen diferentes fenotipos, indicando un posible pleiotropismo debido a *splicing* alternativo, la demostración de la función de *empty spiracles* en el desarrollo del *procephalon* y la confirmación de que *Rp-ems* no posee función *gap* en la región cefálica, corroborando lo hallado en otros insectos de banda germinal corta.

En suma, resultados presentados aquí abren nuevas perspectivas para el análisis de fenotipos en insectos, que permitirán responder nuevas preguntas y comprobar nuevas hipótesis que surjan como consecuencia de este trabajo.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., & Ram, S. J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics international*, 11(7), 36-42.
- Adams, D. C., Rohlf, F. J., & Slice, D. E. (2004). Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology*, 71(1), 5-16.
- Angelini, D. R., Liu, P. Z., Hughes, C. L., & Kaufman, T. C. (2005). Hox gene function and interaction in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera). *Developmental biology*, 287(2), 440-455.
- Bastir, M., Rosas, A., & O'Higgins, P. (2006). Craniofacial levels and the morphological maturation of the human skull. *Journal of Anatomy*, 209(5), 637-654.
- Berleth, T., Burri, M., Thoma, G., Bopp, D., Richstein, S., Frigerio, G., ... & Nüsslein-Volhard, C. (1988). The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the *Drosophila* embryo. *The EMBO journal*, 7(6), 1749.
- Birkan, M., Schaeper, N. D., & Chipman, A. D. (2011). Early patterning and blastodermal fate map of the head in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. *Evolution & development*, 13(5), 436-447.
- Bookstein, F. L. (1997). *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge University Press.
- Brown, S. J., Shippy, T. D., Beeman, R. W., & Denell, R. E. (2002). *Tribolium* Hox genes repress antennal development in the gnathos and trunk. *Molecular phylogenetics and evolution*, 24(3), 384-387.

- Brown, S., DeCamillis, M., Gonzalez-Charneco, K., Denell, M., Beeman, R., Nie, W., & Denell, R. (2000). Implications of the *Tribolium* deformed mutant phenotype for the evolution of Hox gene function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4510-4514.
- Bucher, G., Scholten, J., & Klingler, M. (2002). Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Current Biology*, 12(3), 85-86.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2), 159-218.
- Chesebro, J., Hrycaj, S., Mahfooz, N., & Popadić, A. (2009). Diverging functions of *Scr* between embryonic and post-embryonic development in a hemimetabolous insect, *Oncopeltus fasciatus*. *Developmental biology*, 329(1), 142-151.
- Cobb, S. N., & O'Higgins, P. (2007). The ontogeny of sexual dimorphism in the facial skeleton of the African apes. *Journal of Human Evolution*, 53(2), 176-190.
- Cohen, S. M., & Jürgens, G. (1990). Gap-like segmentation genes that mediate *Drosophila* head development. *Nature*, 346, 482-485.
- Cohen, S., & Jürgens, G. (1991). *Drosophila* headlines. *Trends in Genetics*, 7(8), 267-272.
- Coura, J. R., & Borges-Pereira, J. (2012). Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(3), 286-296.

Dalton, D., Chadwick, R., & McGinnis, W. (1989). Expression and embryonic function of *empty spiracles*: a *Drosophila* homeo box gene with two patterning functions on the anterior-posterior axis of the embryo. *Genes & Development*, 3(12a), 1940-1956.

Dearden, P. K. (2014). Expression pattern of *empty-spiracles*, a conserved head-patterning gene, in honeybee (*Apis mellifera*) embryos. *Gene Expression Patterns*, 15(2), 142-148.

DeCamillis, M. (2003). *Proboscipedia* represses distal signaling in the embryonic gnathal limb fields of *Tribolium castaneum*. *Development genes and evolution*, 213(2), 55-64.

DeCamillis, M. A., Lewis, D. L., Brown, S. J., Beeman, R. W., & Denell, R. E. (2001). Interactions of the *Tribolium* *Sex combs reduced* and *proboscipedia* orthologs in embryonic labial development. *Genetics*, 159(4), 1643-1648.

Dias, J. C. P., Silveira, A. C., & Schofield, C. J. (2002). The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(5), 603-612.

Dryden, I. L., & Mardia, K. V. (1998). *Statistical shape analysis* (Vol. 4). Chichester: J. Wiley.

Economou, A. D., & Telford, M. J. (2009). Comparative gene expression in the heads of *Drosophila melanogaster* and *Tribolium castaneum* and the segmental affinity of the *Drosophila* hypopharyngeal lobes. *Evolution & development*, 11(1), 88-96.

Elbashir, S. M., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs. *Genes & development*, 15(2), 188-200.

Esponda-Behrens N. (2014). Estudios funcionales comparados de la evolución de la segmentación en insectos (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, La Plata.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811.

Franchi, L., Baccetti, T., & McNamara Jr, J. A. (2001). Thin-plate spline analysis of mandibular growth. *The Angle Orthodontist*, 71(2), 83-89.

Frigerio, G., Burri, M., Bopp, D., Baumgartner, S., & Noll, M. (1986). Structure of the segmentation gene paired and the *Drosophila* PRD gene set as part of a gene network. *Cell*, 47(5), 735-746.

Garcia, B. A., Zheng, L., ROSAS, A. R., & Segura, E. L. (2004). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Molecular Ecology Notes*, 4(4), 568-571.

Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404(6775), 293-296.

Hartmann, B., Hirth, F., Walldorf, U., & Reichert, H. (2000). Expression, regulation and function of the homeobox gene *empty spiracles* in brain and ventral nerve cord development of *Drosophila*. *Mechanisms of development*, 90(2), 143-153.

- He, Z. B., Cao, Y. Q., Yin, Y. P., Wang, Z. K., Chen, B., Peng, G. X., & Xia, Y. X. (2006). Role of hunchback in segment patterning of *Locusta migratoria manilensis* revealed by parental RNAi. *Development, growth & differentiation*, 48(7), 439-445.
- Hirth, F., Therianos, S., Loop, T., Gehring, W. J., Reichert, H., & Furukubo-Tokunaga, K. (1995). Developmental defects in brain segmentation caused by mutations of the homeobox genes *orthodenticle* and *empty spiracles* in *Drosophila*. *Neuron*, 15(4), 769-778.
- Hrycaj, S., Chesebro, J., & Popadić, A. (2010). Functional analysis of *Scr* during embryonic and post-embryonic development in the cockroach, *Periplaneta americana*. *Developmental biology*, 341(1), 324-334.
- Hughes, C. L., & 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*, 127(17), 3683-3694.
- Hunter, C. P. (1999). Genetics: a touch of elegance with RNAi. *Current Biology*, 9(12), R440-R442.
- Jürgens, G., Lehmann, R., Schardin, M., & Nüsslein-Volhard, C. (1986). Segmental organisation of the head in the embryo of *Drosophila melanogaster*. *Roux's archives of developmental biology*, 195(6), 359-377.
- Jürgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C., & Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's archives of developmental biology*, 193(5), 283-295.

- Kelly, G. M., & Huebner, E. (1989). Embryonic development of the hemipteran insect *Rhodnius prolixus*. *Journal of Morphology*, 199(2), 175-196.
- Kendall, D. G. (1977). The diffusion of shape. *Advances in applied probability*, 9(3), 428-430.
- Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular ecology resources*, 11(2), 353-357.
- Kollien, A., & Schaub, G. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitology today*, 16(9), 381-387.
- Krause, G. (1939). Die Eitypen der Insekten. *Biol Zentralbl.* 59.
- Kukalová-Peck, J. (2008). Phylogeny of higher taxa in Insecta: finding synapomorphies in the extant fauna and separating them from homoplasies. *Evolutionary biology*, 35(1), 4-51.
- Lavore, A., Esponda-Behrens, N., Pagola, L., & Rivera-Pomar, R. (2014). The gap gene *Krüppel* of *Rhodnius prolixus* is required for segmentation and for repression of the homeotic gene *sex comb-reduced*. *Developmental biology*, 387(1), 121-129.
- Lavore, A., Pagola, L., Esponda-Behrens, N., & Rivera-Pomar, R. (2012). The gap gene *giant* of *Rhodnius prolixus* is maternally expressed and required for proper head and abdomen formation. *Developmental biology*, 361(1), 147-155.
- Lavore, A., Pascual, A., Salinas, F. M., Esponda-Behrens, N., Martinez-Barnetche, J., Rodriguez, M., & Rivera-Pomar, R. (2015). Comparative analysis of zygotic

developmental genes in *Rhodnius prolixus* genome shows conserved features on the tracheal developmental pathway. *Insect biochemistry and molecular biology*, 64, 32-43.

Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, 276(5688), 565-570.

Liu, P. Z., & Kaufman, T. C. (2005). Short and long germ segmentation: unanswered questions in the evolution of a developmental mode. *Evolution & development*, 7(6), 629-646.

Lynch, J. A., Peel, A. D., Drechsler, A., Averof, M., & Roth, S. (2010). EGF signaling and the origin of axial polarity among the insects. *Current Biology*, 20(11), 1042-1047.

Marcus, L. F. (1990). Traditional morphometrics. In *Proceedings of the Michigan morphometrics workshop*. University of Michigan Museum of Zoology, Ann Arbor. 2:77-122

Martinez, J., & Tuschl, T. (2004). RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes & development*, 18(9), 975-980.

Mellanby, H. (1935). *Memoirs: The Early Embryonic Development of Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Heteroptera). *Journal of Cell Science*, 2(309), 71-90.

Mellanby, H. (1936). *Memoirs: The Later Embryology of Rhodnius prolixus*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 2(313), 1-42.

Mesquita, R. D., Vionette-Amaral, R. J., Lowenberger, C., Rivera-Pomar, R., Monteiro, F. A., Minx, P., ... & Torres, A. Q. (2015). Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect

vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(48), 14936-14941.

Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-61.

Nie, W., Stronach, B., Panganiban, G., Shippy, T., Brown, S., & Denell, R. (2001). Molecular characterization of *Tc*-labial and the 3' end of the *Tribolium* homeotic complex. *Development genes and evolution*, 211(5), 244-251.

Nüsslein-Volhard, C., & Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287(5785), 795-801.

O'Higgins, P. (2000). The study of morphological variation in the hominid fossil record: biology, landmarks and geometry. *Journal of Anatomy*, 197(01), 103-120.

Pagola, L. (2012). Análisis genómico y molecular de la embriogénesis de *Rhodnius prolixus*: implicancias morfológico-evolutivas en insectos (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, La Plata.

Posnien, N., & Bucher, G. (2010). Formation of the insect head involves lateral contribution of the intercalary segment, which depends on *Tc*-labial function. *Developmental biology*, 338(1), 107-116.

Posnien, N., Schinko, J. B., Kittelmann, S., & Bucher, G. (2010). Genetics, development and composition of the insect head – A beetle's view. *Arthropod structure & development*, 39(6), 399-410.

Rempel, J. G. (1975). Evolution of the insect head: the endless dispute. *Quaestiones Entomologicae*.

Rivera-Pomar, R., & Jäckle, H. (1996). From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: filling in the gaps. *Trends in Genetics*, 12(11), 478-483.

Rogers, B. T., & Kaufman, T. C. (1997). Structure of the insect head in ontogeny and phylogeny: a view from *Drosophila*. *International review of cytology*, 174, 1-84.

Rogers, B. T., Peterson, M. D., & Kaufman, T. C. (2002). The development and evolution of insect mouthparts as revealed by the expression patterns of gnathocephalic genes. *Evolution & development*, 4(2), 96-110.

Rohlf, F. J. (2008). TpsDIG2. 12. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.

Rohlf, F. J., & Marcus, L. F. (1993). A revolution morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(4), 129-132.

Rohlf, F. J., Loy, A., & Corti, M. (1996). Morphometric analysis of Old World Talpidae (Mammalia, Insectivora) using partial-warp scores. *Systematic Biology*, 45(3), 344-362.

Rozen, S., & Skaletsky, H. (1999). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics methods and protocols*, 365-386.

Sander, K. (1981). Pattern generation and pattern conservation in insect ontogenesis-problems, data and models. *Progress in Developmental Biology*, 101-119.

Sauer, F., Wassarman, D. A., Rubin, G. M., & Tjian, R. (1996). RETRACTED: TAF II s Mediate Activation of Transcription in the *Drosophila* Embryo. *Cell*, 87(7), 1271-1284.

Schinko, J. B., Kreuzer, N., Offen, N., Posnien, N., Wimmer, E. A., & Bucher, G. (2008). Divergent functions of *orthodenticle*, *empty spiracles* and *buttonhead* in early head patterning of the beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera). *Developmental biology*, 317(2), 600-613.

Schmidt-Ott, U., & Technau, G. M. (1992). Expression of *en* and *wg* in the embryonic head and brain of *Drosophila* indicates a refolded band of seven segment remnants. *Development*, 116(1), 111-125.

Schmidt-Ott, U., González-Gaitán, M., Jäckle, H., & Technau, G. M. (1994). Number, identity, and sequence of the *Drosophila* head segments as revealed by neural elements and their deletion patterns in mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(18), 8363-8367.

Schofield, C. J. (1979). The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): a review. *Bulletin of entomological research*, 69(03), 363-379.

Schofield, C. J., & Galvão, C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta tropica*, 110(2), 88-100.

Shigenobu, S., Bickel, R. D., Brisson, J. A., Butts, T., Chang, C. C., Christiaens, O., ... & Janssen, R. (2010). Comprehensive survey of developmental genes in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: frequent lineage-specific duplications and losses of developmental genes. *Insect Molecular Biology*, 19(s2), 47-62.

Shippy, T. D., Rogers, C. D., Beeman, R. W., Brown, S. J., & Denell, R. E. (2006). The *Tribolium castaneum* ortholog of *Sex combs reduced* controls dorsal ridge development. *Genetics*, 174(1), 297-307.

Snodgrass, R. E. (1935). Principles of insect morphology. Principles of Insect Morphology.

St Johnston, D., & Nüsslein-Volhard, C. (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell*, 68(2), 201-219.

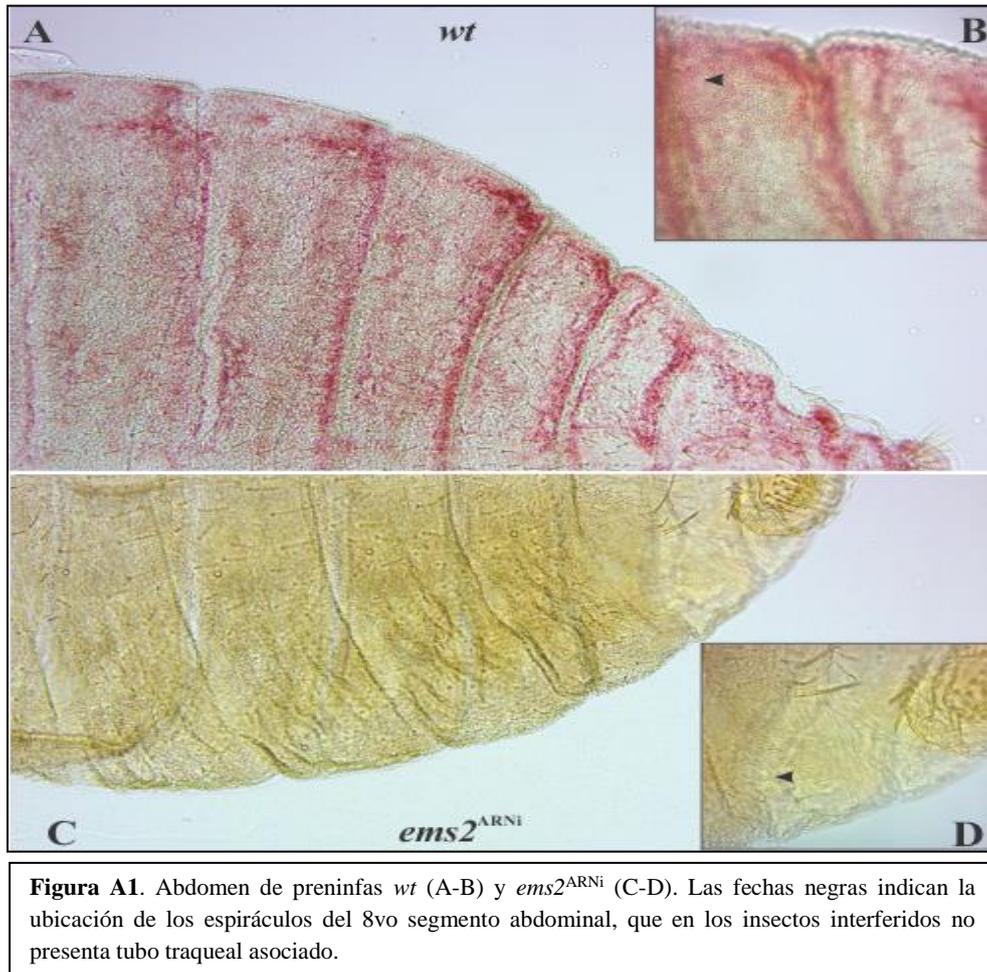
Toro Ibacache, M. V., Manriquez Soto, G., & Suazo Galdames, I. (2010). Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: de la morfología descriptiva a la morfología cuantitativa. *International Journal of Morphology*, 28(4), 977-990.

Turner, F. R., & Mahowald, A. P. (1979). Scanning electron microscopy of *Drosophila melanogaster* embryogenesis: III. Formation of the head and caudal segments. *Developmental biology*, 68(1), 96-109.

Vincent, A., Blankenship, J. T., & Wieschaus, E. (1997). Integration of the head and trunk segmentation systems controls cephalic furrow formation in *Drosophila*. *Development*, 124(19), 3747-3754.

Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., & Sheets, H. D. (2012). Geometric morphometrics for biologists: a primer. Academic Press.

8 ANEXO



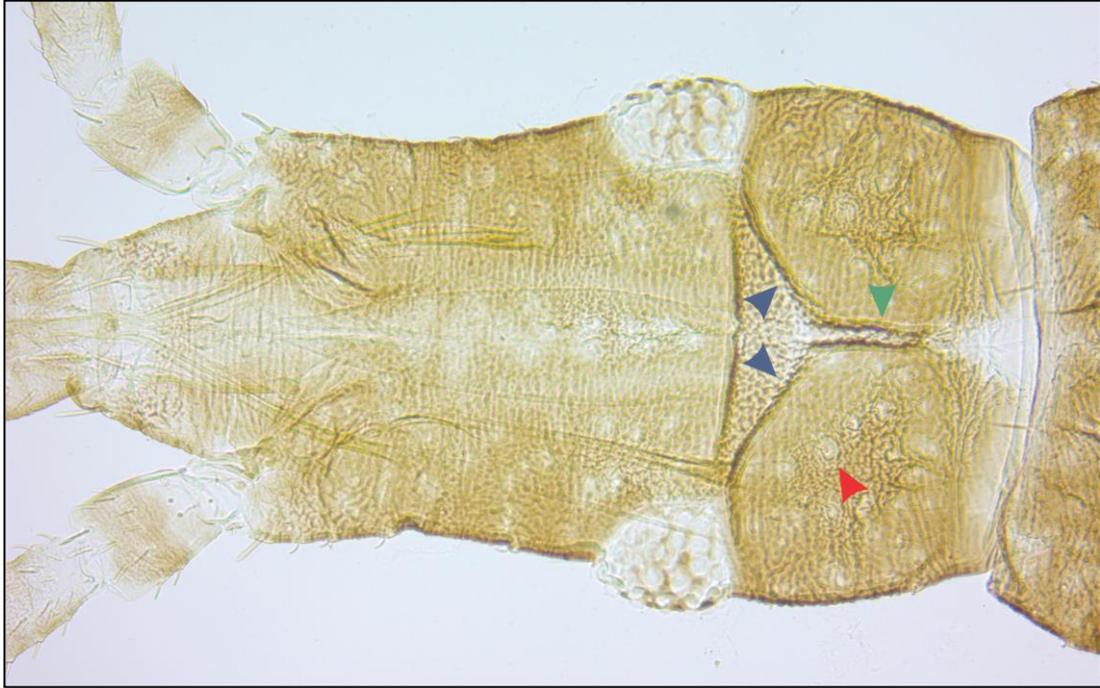


Figura A2. Cabeza de ninfa I. Las flechas indican una placa asociada a una seta (rojo), la sutura coronal (verde) y las suturas frontales (azul). La falta de pigmentación del insecto es consecuencia del proceso de clarificación con potasa.