

# **Genómica comparada de triatominos: análisis evolutivo de los genes del desarrollo embrionario.**

Trabajo final de grado de la alumna:

**Agustina Pascual**

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

**LICENCIADA EN GENÉTICA**

Carrera:

Licenciatura en genética

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.**

**Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, fecha 28 de noviembre 2013

# **Genómica comparada de triatominos: Análisis evolutivo de los genes del desarrollo embrionario.**

Trabajo final de grado de la alumna:

**Agustina Pascual.**

Director:

**Rolando Rivera Pomar**

Co-director:

**Andrés Lavore.**

Carrera:

Licenciatura en genética

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.**

**Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que de alguna u otra manera estuvieron acompañando y compartiendo esta etapa, deseándome lo mejor, siempre dándome ánimos y buenas energías. En especial y en primer lugar a mi mamá y mi papá quienes hicieron hasta lo imposible para que pueda terminar mis estudios, siempre presentes, compartiendo y disfrutando conmigo los avances en esta carrera. También quiero agradecer a mi familia, la cual a pesar de que nunca terminara de entender qué era lo que estudiaba siempre estaban atentos a mis rendidas y me deseaban los mejores éxitos.

A mis amigos que siempre están para sacarme una sonrisa, en especial a “la familia que elegí”, Sofi, Ada, Mely, Tami, Rochi, Mari, Foti, Portis, Jux, July, Anto, Belu y Cata, las cuales son incondicionales y están a cualquier hora y en cualquier momento cuando las necesito, y cuando no también. A mis amigos de la facu, Charly, Roly, Guille, Ana y en especial a Lu, con la que pude compartir este hermoso y estresante momento haciendo que todo sea más “fácil”.

A mis compañeros del Cebio, quienes hicieron que las horas de trabajo realmente las disfrute, sin noción del tiempo. En especial a Maxi, el cual soportó mi locura siempre con su mejor sonrisa.

A mis directores Rolando y Andrés quienes siempre estuvieron para ayudarme y guiarme durante el transcurso de este trabajo. En especial a Andrés, con el que compartí horas en el laboratorio y el cual dedicó mucho de su tiempo en enseñarme, escucharme y sacar mis dudas.

# INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 Embriología de insectos</b> .....	1
<b>1.2 Desarrollo embrionario del organismo modelo, <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	3
<b>1.3 Genómica y transcriptómica de insectos</b> .....	7
<b>1.4 Secuenciación masiva del ARN (ARN-seq)</b> .....	8
<b>1.5 Sistema de descubrimiento de genes</b> .....	10
<b>1.6 Genómica de triatominos</b> .....	11
<b>1.7 Desarrollo del sistema traqueal en <i>Rhodnius prolixus</i></b> .....	13
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	16
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>2.1 Objetivo general:</b> .....	16
<b>2.2 Objetivos específicos:</b> .....	16
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	17
<b>3.1 Cría de <i>R. prolixus</i> en laboratorio</b> .....	17
<b>3.2 Secuenciación de los transcriptomas de <i>Triatoma infestans</i>, <i>Triatoma pallidipennis</i> y <i>Triatoma dimidiata</i></b> .....	17
<b>3.3 Análisis bioinformático de genes del desarrollo</b> .....	18
3.3.1 Base de datos.....	18
3.3.2 Búsqueda de similitud.....	18
3.3.3 Análisis filogenético de los genes traqueales.....	19
<b>3.4 Validación por PCR</b> .....	19
3.4.1 Obtención del molde de ADNc: .....	20
3.4.1.1 Extracción de ARN.....	20
3.4.1.2 Síntesis de ADNcopia (ADNc).....	21
3.4.2 Diseño de primers.....	22
3.4.3 Amplificaciones por PCR.....	22
3.4.4 Clonado en vectores.....	23
<b>3.5 ARN de interferencia (ARNi) parental</b> .....	24
<b>3.6 Manipulación de embriones y análisis de fenotipos</b> .....	26
<b>4. RESULTADOS</b> .....	27

<b>4.1</b>	<b>Secuenciación de transcriptomas.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2</b>	<b>Genes de desarrollo identificados a partir de la búsqueda por similitud en triatominos.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Vías de señalización: .....</b>	<b>31</b>
4.2.1.1	Vía JAK/STAT.....	32
4.2.1.2	Vía Wnt.....	34
4.2.1.3	Vía Notch.....	37
4.2.1.4	Vía Hedgehog.....	40
4.2.1.5	Vía Toll-Dorsal.....	43
<b>4.2.2</b>	<b>Procesos del desarrollo.....</b>	<b>47</b>
4.2.2.1	Ovogénesis.....	47
4.2.2.2	Proceso dorsoventral.....	53
4.2.2.3	Segmentación antero-posterior.....	58
4.2.2.4	Desarrollo de tráqueas.....	65
<b>4.3</b>	<b>Validación.....</b>	<b>72</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Análisis evolutivo de los genes traqueales.....</b>	<b>75</b>
4.3.1.1	Breathless.....	75
4.3.1.2	HIF prolyl hydroxylase.....	76
4.3.1.3	Trachealess.....	77
4.3.1.4	Similar.....	79
<b>4.3.2</b>	<b>Validación experimental por PCR de genes traqueales.....</b>	<b>80</b>
4.3.3	Validación funcional por ARNi parental.....	81
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>84</b>
5.1	Genes del desarrollo embrionario en triatominos.....	84
5.2	Genes del sistema traqueal en <i>Rhodnius prolixus</i> .....	88
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES FINALES.....</b>	<b>94</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>95</b>
<b>8.</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>113</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Embriología de insectos

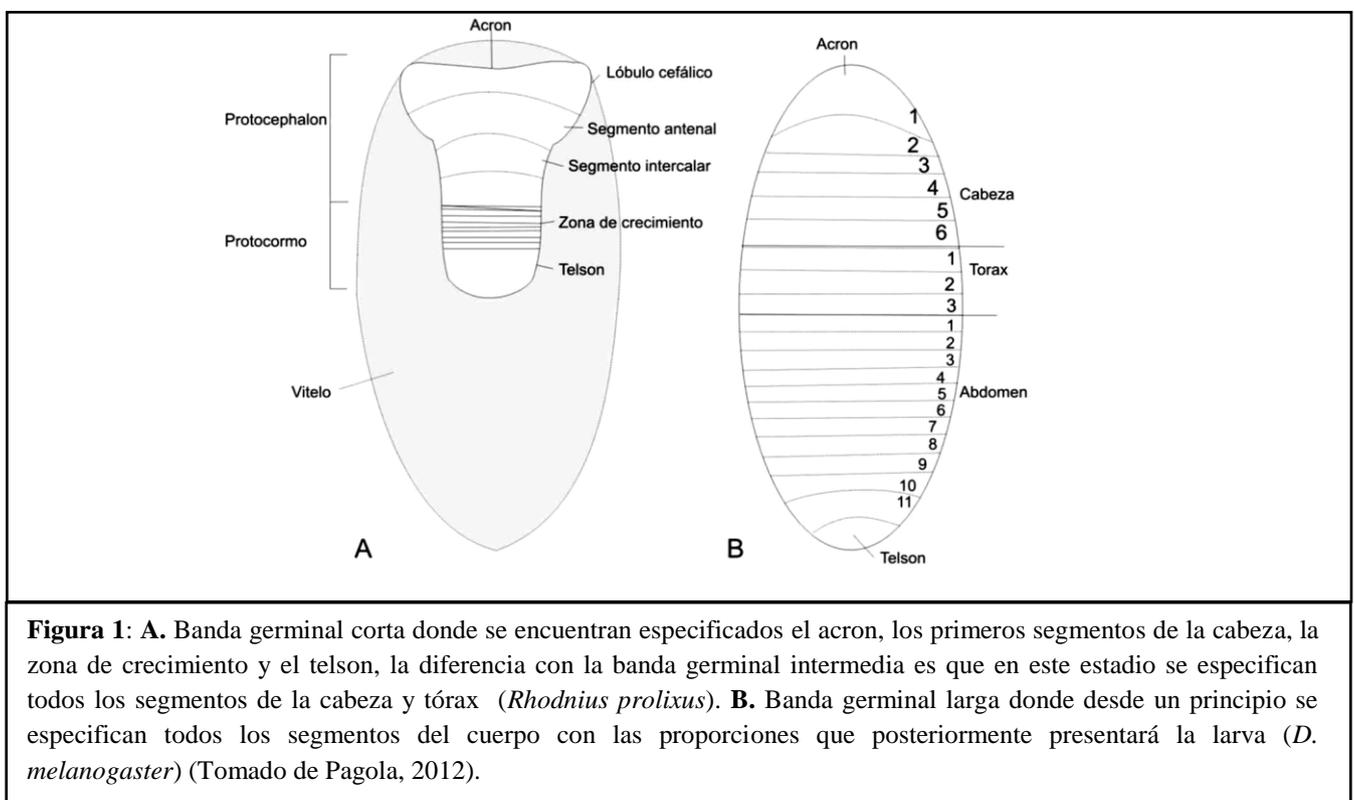
Desde los primeros estudios sobre la embriogénesis en insectos, realizados por Krause en 1939, se observó que el plan corporal de este grupo de artrópodos se encuentra altamente conservado, siguiendo un patrón compuesto por cabeza, tórax y abdomen. Este nivel de conservación no se observa tan claramente durante el desarrollo embrionario, el cual es altamente diverso aunque da origen a este mismo patrón corporal.

La embriogénesis comienza con repetidas divisiones nucleares pero sin división del citoplasma del cigoto, formándose un gran sincitio. Luego los núcleos migran a la periferia y forman el blastodermo, el cual en un principio es sincitial y luego se celulariza formando el blastodermo celularizado. Más allá del estadio de blastodermo, la embriogénesis entre los insectos varía de forma sustancial respecto a cómo y cuando el patrón corporal segmentado se modela. Para describir las diferencias al respecto de cuando se modela, tres grandes grupos son reconocidos: los insectos con embriogénesis de banda germinal corta, intermedia y larga (Krause, 1939; Davis *et al.*, 2002). Esta denominación es actualmente utilizada para describir tanto el tamaño inicial del rudimento embrionario como las diferencias en la embriología, pero la terminología original fue introducida en los primeros estudios realizados por Krause en 1939, el cual nombró como “kleinkeim” y “grosskeim” (rudimento embrionario pequeño y grande, respectivamente) a los distintos tamaños del embrión temprano en comparación con el tamaño del huevo entero, y con los términos “kurzkeim”, “halbangkeim” y “langkeim” (banda germinal corta, intermedia y larga) marcó la diferencia en la embriogénesis, basándose en el número de segmentos especificados en el rudimento embrionario antes de la gastrulación (Krause, 1939; Tautz *et al.*, 1994).

Cuando hacemos referencia a insectos de banda germinal larga, por ejemplo *Drosophila melanogaster*, notamos que todos los segmentos son especificados, de manera simultánea, dentro del estadio de blastodermo en un entorno sincitial, y que los tres tagmas (cabeza, tórax y abdomen) tienen proporciones muy similares en la larva y el adulto. En cambio, en los insectos de banda germinal corta, por ejemplo *Sphenarium purpurascens*, sólo los segmentos de la cabeza son especificados en el blastodermo, mientras que los restantes tagmas (o segmentos del tórax y abdomen) son formados de manera progresiva, a partir de una zona de crecimiento localizada en la región posterior, luego de que el proceso de gastrulación se lleve a cabo; en otras palabras, existe una segunda fase de crecimiento de la banda germinal acoplada con la especificación secuencial de los segmentos más posteriores (Sander, 1981). Estos términos se supone que representan polos opuestos de un continuo, donde entre ellos existen insectos con embriogénesis de banda germinal intermedia, por ejemplo *Rhodnius prolixus*, en los cuales el número de segmentos establecidos en el blastodermo es mayor que en los de banda germinal corta, pero menor que en los de banda germinal larga (Davis *et al.*, 2002).

El desarrollo embrionario del tipo de banda germinal larga se considera como evolutivamente derivado, ya que este tipo de embriogénesis está restringida a los insectos holometábolos más derivados, como dípteros o himenópteros; en cambio el tipo de banda germinal corta e intermedia se encuentra altamente representado en los órdenes más basales de insectos (Liu, 2005). Paradójicamente, los procesos de desarrollo, incluido la segmentación, han sido mayormente estudiados en organismos de banda germinal larga, como *D. melanogaster* donde los segmentos del embrión se especifican en un entorno sincitial permitiendo una rápida y fácil difusión de los distintos factores, estableciéndose gradientes que determinan la identidad de cada región

en el embrión (Rivera-Pomar *et al.*, 1996). En los insectos de banda germinal corta/intermedia al no encontrarse en un entorno sincitial durante el proceso de segmentación, la especificación se da por las interacciones de los factores con proteínas ancladas en la membrana activando vías de señalización, de esta forma como producto de la expresión génica diferencial en cada segmento en formación, cada uno obtiene una identidad corporal determinada (Davis *et al.*, 2002).



## 1.2 Desarrollo embrionario del organismo modelo, *Drosophila melanogaster*.

Los embriones tempranos de *Drosophila melanogaster* están organizados en gradientes y bandas de expresión génica, los cuales proporcionan la información para establecer la polaridad anteroposterior, dorsoventral y el eje izquierda-derecha que establecen un esbozo de la morfología adulta.

El ovocito se desarrolla junto a células nodrizas y se encuentra rodeado por una monocapa de células foliculares somáticas. Ambos tipos celulares proporcionan al ovocito los constituyentes citoplasmáticos, ARN mensajeros y proteínas preformados y procedentes de la madre, además de una serie de determinantes específicos necesarios para la formación del patrón inicial del embrión. Los factores aportados por las células foliculares promueven la secreción de factores de desarrollo que se asocian a la superficie extracelular del embrión, donde se generan las señales que activan receptores transmembranas en posiciones restringidas (St Johnston *et al.*, 1992).

La información posicional generada durante la ovogénesis se mantiene a lo largo del desarrollo del embrión. Tras la fertilización, comienzan una serie de divisiones nucleares sin citocinesis donde el citoplasma del embrión se encuentra ya polarizado. Esta subdivisión inicial del blastodermo sincitial se encuentra regulada por cuatro sistemas de control materno: el sistema anterior, posterior, terminal y dorsoventral. El sistema anterior determina la región del embrión que da lugar a la cabeza y el tórax, el posterior especifica la región del abdomen y la línea germinal, y el terminal especifica las regiones no segmentadas que se encuentran en los dos extremos del embrión: acron y telson (Degelmann *et al.*, 1986; Driever *et al.*, 1988a; Driever *et al.*, 1988b; Klingler *et al.*, 1988; Lehmann *et al.*, 1987).

La actividad de estos factores maternos genera una distribución de factores de transcripción a lo largo de los ejes generando futuras coordenadas espaciales en el

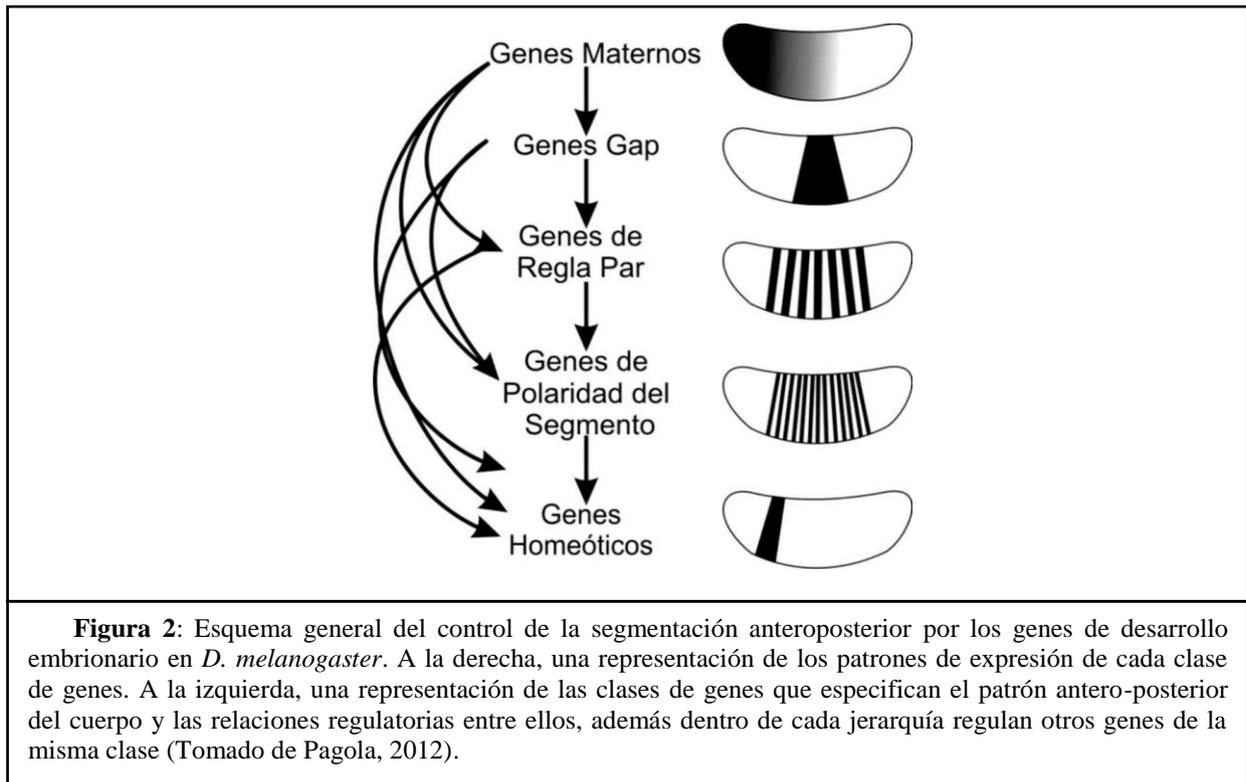
embrión (Rivera-Pomar *et al.*, 1996). Además de este grupo de genes conocidos como genes maternos, participan otros genes en la formación de las unidades metaméricas y la especificación de los segmentos; los genes de segmentación, que determinan el número y la polaridad correcta de unidades metaméricas (Rivera-Pomar *et al.*, 1996) y los genes selectores homeóticos que especifican la identidad de los segmentos (Mann *et al.*, 2000).

A nivel molecular uno de los primeros factores clave para esta subdivisión en anterior-posterior es la proteína BICOID (BCD). El ARN mensajero de *bcd* (gen materno) es depositado en la región anterior del ovocito y tras la fecundación forma un gradiente de proteína regulando varios factores de transcripción y contribuyendo a la especificación de la región anterior (Driever *et al.*, 1988a; Driever *et al.*, 1988b). Por el contrario el factor posterior codificado por el gen *nanos* (*nos*) especifica la región posterior para la formación de la zona abdominal (Lehmann *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1991) reprimiendo genes anteriores. Así, por ejemplo, el gen *hunchback* (*hb*), se encuentra activado en la región anterior por BCD y reprimido en posterior por NOS. En las regiones terminales la activación localizada de la vía de señalización de *torso* (*tor*), regula la expresión de los genes *gap* terminales *tailless* (*tll*) y *huckebein* (*hkb*) que inducen la formación de las estructuras asegmentadas (Degelmann *et al.*, 1986; Klingler *et al.*, 1988).

De esta manera, la segmentación se lleva a cabo mediante un proceso jerárquico de regulación, donde los genes maternos controlan la expresión de los genes *gap* y estos controlan a los de su misma clase y a los grupos que les suceden, en el tercer lugar de esta jerarquía encontramos a los genes de regla par, que dividen al embrión en unidades periódicas. La transcripción de los diferentes genes de regla par resulta en un patrón de franjas de siete bandas verticales perpendiculares al eje anteroposterior, las proteínas

obtenidas a partir de estos genes activan los genes de polaridad de segmento, cuyos productos de ARN mensajeros y proteínas dividen al embrión en catorce unidades segmentarias extensas, estableciendo la periodicidad del embrión. Los productos proteicos de los genes *gap*, de regla par y polaridad de segmento interactúan para regular los genes selectores homeóticos, cuya transcripción determina el destino de desarrollo de cada segmento (Martínez-Arias *et al.*, 1985; Levine *et al.*, 1989). Esta red regulatoria subdivide el eje anteroposterior en 14 segmentos corporales: 3 segmentos en la cabeza, 3 segmentos torácicos y 8 segmentos abdominales (Figura 2).

Por otra parte, el sistema dorsoventral controla la polaridad a lo largo del eje dorsoventral (Morisato *et al.*, 1995), el cual se establece por el gradiente del factor de transcripción *dorsal (dl)*, que a diferencia de *bicoid (bcd)*, se forma en un entorno celular y es establecido como una consecuencia de eventos de señalización célula-célula (Manseau *et al.*, 1989; Price *et al.*, 1989). El evento más importante en la especificación dorsoventral es la translocación de la proteína DL desde el citoplasma hacia los núcleos de las células ventrales, sólo en estas células se encuentra a DL en el núcleo; actúa activando o reprimiendo la transcripción de ciertos genes, como *snail (sna)*, *twist (twi)*, *rhomboid (rho)*. Si no ingresa al núcleo, los genes responsables para la especificación del tipo celular dorsal no son reprimidos y las células llegan a ser especificadas como dorsales (Rushlow *et al.*, 1989; Roth *et al.*, 1989; Steward, 1987).



### 1.3 Genómica y transcriptómica de insectos.

El genoma es la totalidad de la información genética que posee un organismo o una especie en particular. Uno de los mayores avances de la biología en los últimos tiempos fue la secuenciación y decodificación del genoma de diversos organismos. Esto fue posible gracias a la aparición de la genómica como una disciplina independiente dentro de la genética y a las innovaciones tecnológicas. La genómica involucra el estudio del total de la información contenida en el ADN. Esta, junto al conocimiento de la genética y el genoma de un organismo modelo, como *D. melanogaster*, permitió aplicar sus técnicas y herramientas al estudio de otros grupos de insectos (Evans *et al.*, 2003; Heckel, 2003). El desarrollo de la genómica tiene un gran impacto en la entomología básica contribuyendo a comprender mejor la evolución y taxonomía de un

grupo, así como en la entomología aplicada, en relación con el control de plagas o el mejoramiento de insectos beneficiosos (Liu *et al.*, 2005).

El conjunto de genes expresados a partir de un genoma, y su nivel de expresión, se denomina transcriptoma. A diferencia del genoma, que es esencialmente una entidad estática, el transcriptoma puede ser modulado tanto por factores internos como externos (Velculescu *et al.*, 1997). El entendimiento del mismo es esencial para la interpretación de los elementos funcionales de un genoma, y para revelar los constituyentes moleculares de las células, los tejidos y órganos (Wang *et al.*, 2009). En el caso de genomas de organismos no convencionales, es usual secuenciar el transcriptoma para obtener la máxima información del genoma expresado. Este es el caso de este trabajo.

#### **1.4 Secuenciación masiva del ARN (ARN-seq).**

La secuenciación masiva de ADN copia es una técnica que nos permite llevar a cabo la caracterización del transcriptoma de un organismo de forma rápida; sólo se analizan las secuencias que se están transcribiendo. Tradicionalmente, los proyectos de transcriptómica se basaban en la secuenciación de EST (*Expressed sequence tags*) que representan secuencias de los extremos 5' y 3' de RNA mensajeros y abarcan un estado particular del transcriptoma en un tejido u organismo en un momento fisiológico o estadio del ciclo de vida determinado. Este tipo de secuenciación permitió obtener información e investigar el nivel de la expresión génica, identificar algunos casos de *splicing* alternativo y genes, entre otras más, pero con la aparición y avance del desarrollo de la tecnología de secuenciación de nueva generación ha sido sustituido, ya que esta última permite obtener una cobertura mayor del transcriptoma (Liu *et al.*, 2013).

Una de las consecuencias de la secuenciación masiva es la generación de cientos de miles de secuencias en paralelo de no más de unos cientos de nucleótidos. Esto requiere una alta capacidad de cómputo que permita ensamblar esas secuencias “dispersas” (Wolf, 2013).

Los dos métodos de secuenciación masiva más usados son la pirosecuenciación y el método de PCR en puente (*Bridge PCR*). Una revisión detallada de dichos métodos puede encontrarse en Nagalakshmi *et al.*, 2008.

La utilización de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento para la caracterización del contenido y de la cantidad de ARN en una muestra dada se lo denomina ARNseq. Proporciona algunas ventajas con respecto a las otras tecnologías, como por ejemplo, no se limita a la detección de transcritos que corresponden a una secuencia genómica ya conocida; presentan muy poco ruido de fondo, si es que lo hay, debido a que cada secuencia mapea en una única región del genoma sin ambigüedades; no presentan un límite máximo para la cuantificación, ya que se correlaciona con el número de lecturas obtenidas; muestras pequeñas de ARN son suficientes para ser analizadas por esta tecnología, debido a que no existen pasos de clonación (Wang *et al.*, 2009).

En este trabajo se realizó la secuenciación con la tecnología de pirosecuenciación 454 de Roche, el cual tiene la capacidad de generar lecturas de un tamaño aproximado de 700 pares de bases. Estas luego se ensamblaron utilizando el programa Newbler, teniendo en cuenta la superposición de bases de las secuencias que existen; cuando la región de superposición es significativa (mínimo 40pb) se forman los *contigs*, los cuales podrían pensarse como exones o conjuntos de exones, producto de un mismo evento de transcripción y *splicing*; un grupo de *contigs* en particular, que forman un continuo, se

denomina *isotig*, el cual representa un posible transcripto. Los *singletons* son las lecturas únicas de buena calidad que no presentan superposición significativa con ninguna otra lectura, por lo que no pueden ser incorporados a ningún *contig* (Ewen-Campen *et al.*, 2011).

## 1.5 Sistema de descubrimiento de genes.

Aunque el transcriptoma de estas cuatro especies de triatominos, *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma pallidipennis* y *Rhodnius prolixus*, se encuentra secuenciado poco se conoce acerca de qué genes regulan su desarrollo; a su vez, existen muy pocas descripciones sobre el desarrollo de los mismos.

Una de las disciplinas que proporciona una vía para lograr conocer la genética del desarrollo embrionario de los triatominos es la genómica comparada, se basa en un análisis comparativo de los genomas/transcriptomas de las especies con bases de datos referentes, en este caso, compuesta por genes del desarrollo embrionario de *D. melanogaster*, el cual es el organismo modelo genético para estudios de biología del desarrollo, para poder identificar los genes que se expresan en los triatominos, y así comprender en más detalle el funcionamiento de los genomas y como esta información es interpretada para dar origen a una morfología particular.

Para llevar a cabo este análisis se plantea como hipótesis que varios de los genes del desarrollo de *D. melanogaster* están altamente conservados en las cuatro especies de triatominos. Por homología de secuencia, utilizando el algoritmo TBLASTN (Altschul *et al.*, 1990), se determina si tales genes, de la base de datos, se encuentran representados en tales especies (Behura *et al.*, 2011).

Por homología de secuencia se entiende a la situación en la que las secuencias de dos o más proteínas o ácidos nucleicos son similares entre sí debido a que presentan un mismo origen evolutivo. Usualmente se puede concluir que dos secuencias son homólogas sobre la base de la alta similitud que las mismas presentan. No obstante, la similitud de secuencias es un resultado que proviene directamente de la observación, mientras que la homología es una interpretación de que una alta similitud entre dos secuencias se debe a que las mismas poseen un origen común (Pellegrini *et al.*, 1999).

Los datos obtenidos a partir de este análisis, en este trabajo se organizaron en vías de señalización y procesos que se sabe que intervienen en el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*. Las vías que se eligieron para ser analizadas fueron, JAK/STAT, Toll-dorsal, hedgehog, Notch y Wnt; los procesos fueron, segmentación antero-posterior y dorsoventral, ovogénesis y, como modelo de organogénesis, el desarrollo de tráqueas.

## 1.6 Genómica de triatominos.

*Rhodnius prolixus* es un insecto hemimetábolo perteneciente a la familia Reduviidae nativo del continente Americano (Schofield *et al.*, 2009). Dentro de esta familia, los géneros *Rhodnius*, *Panstrongylus* y *Triatoma* son los más importantes vectores de la enfermedad del Chagas (Chagas, 1909; Dias *et al.*, 2002a; Dias *et al.*, 2002b; Kollien *et al.*, 2000; Coura JR *et al.*, 2012; Garcia *et al.*, 2004). En Argentina la enfermedad es transmitida por *Triatoma infestans*, y se estima que existen aproximadamente 2.300.000 enfermos de Chagas (Vazquez-Prokopec *et al.*, 2012). Debido a que *R. prolixus* presenta un ciclo de vida más corto que otros triatominos se ha convertido en un sistema de estudio más adecuado para el trabajo de laboratorio, constituyendo un excelente modelo

para estudios en fisiología, biología celular y reproducción y, a partir de la secuenciación de su genoma, en un modelo de la biología del desarrollo.

El genoma de *Rhodnius prolixus* fue secuenciado por un consorcio internacional y realizado en el *Genome Sequencing Center* (WUSGC) de la University School of Medicine, Washington. Las lecturas que se obtuvieron a partir de la clonación llevada a cabo en vectores plasmídicos y en vectores Bac (Artificial Bacterial Chromosome), y por pirosecuenciación 454, fueron ensambladas utilizando el ensamblador CABOG. Para llevar a cabo esto, como material de partida se utilizó material suministrado por una colonia establecida en Center for Disease Control en Atlanta, Estados Unidos. Como resultado se obtuvieron 58.560 *contigs* ensamblados en 27.872 *scaffolds*, con una longitud total de 702Mb. Los datos obtenidos fueron publicados en GenBank en diciembre del 2010. Se pudo concluir que el genoma presenta una longitud de 702.648.350 pares de bases, compuesto por 17.143 genes de los cuales 15.429 codifican para proteína ([www.vectorbase.org](http://www.vectorbase.org)).

*Rhodnius prolixus* fue elegido para este proyecto dado que es el triatomino con el genoma de menor tamaño (Panzer *et al.*, 2007). Sin embargo no es la especie más importante como vector de Chagas por lo que el estudio del genoma de otras especies es importante para comprender fenómenos tales como la capacidad vectorial. Además los estudios comparados de genomas de distintas especies también son importantes para entender procesos evolutivos, biogeográficos y la conservación de genes basales para la definición biológica del grupo. En este trabajo se analizan los transcriptomas de tres especies, además del genoma de *R. prolixus* con el fin de determinar el grupo de genes conservados para el desarrollo embrionario.

## 1.7 Desarrollo del sistema traqueal en *Rhodnius prolixus*.

El sistema traqueal en insectos se caracteriza por estar compuesto por una red tubular continua que se ramifica progresivamente y de manera estereotipada en ramas más finas para proporcionar oxígeno a cada órgano y tejido del cuerpo. El oxígeno entra en esta red a través de la apertura superficial del sistema, los espiráculos traqueales, y difunde a lo largo de las ramas principales hasta alcanzar las ramas terminales (traqueolas) que se depositan sobre la superficie de todos los tejidos (Wigglesworth, 1972). Este sistema respiratorio es el encargado tanto de la captura como de la distribución del oxígeno a todas las partes del cuerpo (Ghabrial *et al.*, 2003).

Los primeros estudios realizados sobre el sistema traqueal fueron iniciados por Wigglesworth en la década de 1950. Entre sus aportes al tema determinó la plasticidad del sistema traqueal en respuesta a la concentración de oxígeno que presentan los tejidos u órganos del cuerpo. Arribó a esta conclusión realizando experimentos en larvas de ejemplares de *R. prolixus*, donde realizó una extracción delicada de varias de las ramas traqueales que se encontraban proporcionando oxígeno a la mitad del cuarto segmento abdominal. A pocas horas, observó que hubo una migración de ramas traqueales al hemisegmento privado de oxígeno, estas provenían de segmentos adyacentes anteriores, posteriores y/o laterales (Wigglesworth, 1954). Para estudiar este hecho en profundidad, llevó a cabo el trasplante de un órgano con una alta tasa de consumo de oxígeno a un hemisegmento privado del mismo y observó que las tráqueas de segmentos vecinos invadían el órgano ectópico y suministraban el oxígeno extra que requería para su alta tasa metabólica (Wigglesworth, 1954). Estos experimentos muestran claramente la capacidad de las tráqueas de ejecutar una respuesta compensatoria a la privación de oxígeno. Apoyando estos trabajos, Locke reportó la respuesta traqueal por privación de

oxígeno en la larva de *Calpodes sp.* y de *Tenebrio molitor*, llegando a las mismas conclusiones que Wigglesworth (Locke, 1958).

Por otra parte se pudo determinar que el surgimiento y la extensión de nuevas tráqueas tiene origen en las células traqueales que se encuentran en el extremo final de una rama traqueal ya existente, las cuales proliferan y crecen para formar una nueva columna celular (Wigglesworth, 1954). No se establecen a partir de las traqueolas preexistentes generadas en estadios anteriores, estas parecen persistir sin cambios, y funcionales durante toda la vida del insecto. Esto mismo fue observado por Keister (Keister, 1948) en sus trabajos realizados en el díptero *Sciara sp.*

El proceso de desarrollo traqueal recibió muy poca atención durante los estadios embrionarios, debido principalmente a que en estadios más avanzados en el desarrollo se hace más fácil poder observar, a través de la epidermis transparente del insecto, el sistema traqueal, así como también es posible realizar tinciones con colorantes para permitir una mejor visualización de la estructura de las ramas traqueales (Wigglesworth, 1950).

Más allá de que *R. prolixus* fue uno de los primeros organismos en donde se estudió el funcionamiento del sistema traqueal, con el surgimiento de *D. melanogaster* como modelo de estudio en biología del desarrollo permitió avanzar en el análisis genético y morfológico del desarrollo traqueal durante la embriogénesis (Manning *et al.*, 1993; Casanova, 2007).

Sin embargo, pese a la ventaja de otros sistemas para el estudio del sistema traqueal, la falta de conocimiento de los genes y la carencia de métodos genéticos para su estudio, no se realizaron avances significativos en esta área fuera de *D. melanogaster*. Debido a

que actualmente nada se sabe sobre la genética implicada en la formación y remodelación del sistema traqueal en *R. prolixus*, en este trabajo final de grado se decidió analizar el proceso de formación de tráqueas durante la embriogénesis de este insecto.

## 2. HIPÓTESIS

La conservación de los genes de desarrollo es parcial y la regulación de los mismos determina el patrón corporal.

## 3. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general:

Identificar y caracterizar los genes que son relevantes para el desarrollo embrionario de cuatro especies de triatomíneos; *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma pallidipennis* y *Rhodnius prolixus*.

### 2.2 Objetivos específicos:

- Identificar y anotar los genes implicados en el desarrollo embrionario de los triatomíneos.
- Analizar evolutivamente los genes del desarrollo traqueal de *Rhodnius prolixus*.
- Validar y caracterizar funcionalmente estos genes utilizando la técnica de ARNi parental.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1 Cría de *R. prolixus* en laboratorio.**

Los ejemplares machos y hembras de *R. prolixus* utilizados durante el transcurso de esta tesis fueron obtenidos a partir de una colonia establecida en el Centro de Bioinvestigaciones (CeBio-UNNOBA/CICBA). En el laboratorio, estos son criados en recipientes de plástico, de boca ancha y de paredes lisas, cuyas tapas son reemplazadas por una malla de nylon muy fina que facilita su alimentación.

Los insectos se criaron a una temperatura de 28 $\pm$  1°C, una humedad relativa de 45-50%, y con fotoperiodo regulado (luz/oscuridad de 12:12 hs.).

Dado que estos insectos son hematófagos, para la alimentación se utilizó un sistema artificial, el cual consta de un recipiente de vidrio con una cubierta de parafina fácilmente perforable por el sistema suctopizador de los triatominos. La sangre es mantenida a la temperatura constante de 37°C por recirculación de agua por una camisa que recubre el alimentador. La sangre utilizada fue facilitada por el criadero de porcinos de INTA Pergamino. La alimentación se realizó una vez cada 15 días. En estas condiciones, la duración de la embriogénesis es de 14 $\pm$ 1 días.

#### **3.2 Secuenciación de los transcriptomas de *Triatoma infestans*, *Triatoma pallidipennis* y *Triatoma dimidiata*.**

Recientemente en nuestro laboratorio se sintetizaron y secuenciaron librerías de los transcriptomas de las tres especies de triatominos nombradas (Dr. Andrés Lavore, comunicación personal), en colaboración con los Dres. Jesús Martínez-Barnetche y

Mario Henry Rodríguez del Instituto Nacional de Salud Pública de México, Cuernavaca.

La secuenciación de las librerías se realizó mediante la tecnología de pirosecuenciación utilizando la plataforma 454 GS- FLX (Roche). Posteriormente, las lecturas obtenidas fueron ensambladas, para lo que se utilizó el programa Newbler (Roche), teniendo en cuenta la superposición de base de secuencia que existe entre ellas. Esto se realizó con el fin de generar *isotigs* y/o *contigs* para facilitar la búsqueda e identificación de posibles genes del desarrollo.

### **3.3 Análisis bioinformático de genes del desarrollo.**

#### **3.3.1 Base de datos.**

Como primera instancia se realizó una búsqueda *in-silico* de genes que se expresan durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* reportados en flybase.org; y se generó una base de datos compuesta por 1.364 secuencias que corresponden a las proteínas que se expresan a partir de los genes activos durante la embriogénesis.

#### **3.3.2 Búsqueda de similitud.**

Con los datos obtenidos de la secuenciación de las tres especies del género *Triatoma* y contando con el genoma de *R. prolixus*, se llevó a cabo un análisis de similitud de secuencia entre los transcriptomas/genoma de estas cuatro especies y la base de datos

generada a partir de los genes del desarrollo embrionario descritos para *D. melanogaster*.

Para esto, se utilizó el algoritmo BLAST y la matriz BOLSUM62. Este programa compara dos bases de datos, compuestas por secuencias proteicas o nucleotídicas, y calcula la significancia estadística de identidad encontrada. El tipo de búsqueda que se realizó en este trabajo fue TBLASTN (Altschul *et al.*, 1990), el parámetro p establecido para la misma fue 0.0001 y la búsqueda se llevó a cabo de manera local.

### **3.3.3 Análisis filogenético de los genes traqueales.**

Para la construcción de árboles filogenéticos, en un principio se utilizó el programa BioEdit (Hall, 2004) para generar el alineamiento de las secuencias correspondientes a los genes involucrados en el desarrollo traqueal (*trachealess*, *breathless*, *sima* y *fatiga*) de las cuatro especies de triatominos con los ya identificados en otras especies secuenciadas. Para generarlos se utilizó el algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) y corrección manual.

El análisis filogenético se realizó aplicando el algoritmo bayesiano, y para esto se utilizó el software Beast v1.75 (Drummond *et al.*, 2007), estableciendo como parámetros 200.000 generaciones y un *burnin* de 8. La visualización de los árboles se realizó en [itol.embl.de](http://itol.embl.de).

## **3.4 Validación por PCR.**

Para validar las predicciones bioinformáticas se diseñaron oligonucleótidos con el fin de obtener secuencias para un grupo de genes a través de la utilización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Mullis, 1990)

### **3.4.1 Obtención del molde de ADNc:**

#### **3.4.1.1 Extracción de ARN.**

Se recolectaron huevos de *R. prolixus* a distintos tiempos post ovipuesta, abarcando todos los estadios del desarrollo embrionario del mismo, blastodermogastrulación, formación de banda germinal y banda germinal extendida, y fueron almacenados en ARNlater (Ambion) en un tubo Eppendorf. La extracción de ARN se llevó a cabo utilizando TRIzol Reagent (Ambion). Como primera medida, se descartó el ARNlater e identificó la cantidad de huevo que se obtuvo como material de partida (250 mg). A partir de este, se agregó 1 ml de TRIzol, y con un mortero de teflón se trituró, hasta lograr homogeneizar la muestra. Luego se centrifugó a 12.0000 x g durante 10 minutos a 4°C. Se prosiguió con una fase de separación, donde se recuperó el sobrenadante obtenido. Luego se agregaron 200 µl de cloroformo y tras una incubación de 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 12.000 x g. Nuevamente se recuperó la fase acuosa, y se le agregó 0,5 ml de isopropanol, con el objetivo de precipitar el ARN, y luego de una incubación de 10 minutos en hielo se centrifugó durante 14 minutos a una velocidad de 12.000 x g a una temperatura de 4°C. Como resultado se obtuvo un precipitado formado por ARN, el cual se lavó con 1 ml de etanol 75%. La muestra se mezcló suavemente en *Vortex* y se centrifugó durante 5 minutos a 4°C a 7.500 x g. Se descartó el sobrenadante, se dejó secar el precipitado al aire, y luego se lo disolvió en agua ultrapura estéril y ultradestilada.

Para evaluar el resultado de la extracción se sembró 1µl de la muestra de ARN (previamente incubada a 55°C por 10 minutos) con 3 µl de formamida (inhibidor de ARNasas) y 2 µl de agua estéril y ultrapura, en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. La corrida electroforética de la muestra se comparó con el marcador de peso molecular kpb plus (Life Technologies) y con el marcador L1 100pb (PBL).

La cuantificación de la extracción de ARN se llevó a cabo a través del sistema Qubit (Life technologies).

#### **3.4.1.2 Síntesis de ADNcopia (ADNc).**

Para la producción de ADNc se utilizó el kit Mint-2 (Evrogen, EE.UU). Se utilizó 3  $\mu$ l del ARN total extraído y se agregó 1  $\mu$ l de CDS-Adapter junto con 1  $\mu$ l de *PlugOligo-Adapter*, le siguió una incubación a 70°C durante 2 minutos y luego a 45°C por 3 minutos. Finalizado este periodo, se le adicionaron 2  $\mu$ l de *5X First Strand Buffer*, 1  $\mu$ l de DTT, 1  $\mu$ l de dNTPs y 1  $\mu$ l de la enzima *Mint Reverse Transcriptase*, y se lo incubó a 45°C por 30 minutos. Se adicionó 5  $\mu$ l de *IP-Solution* y se continuó la incubación por 90 minutos a 42°C. Tras este periodo de incubación, los tubos se colocaron en hielo para terminar la síntesis de la primera cadena de ADNc.

La segunda cadena se sintetizó con *long-distance* PCR, se tomó 2  $\mu$ l de la primera cadena generada previamente y se le adicionó *Sterile RNase-free water*, *10X Encyclo buffer*, *mix* de dNTPs, *PCR primer-M1* y *50X*. El programa que se utilizó para la amplificación fue: 1 minuto a 95°C → 20 ciclos (15 segundos a 95°C; 20 segundos a 66°C; 35 minutos a 74°C) → 3 minutos a 74°C. La amplificación se realizó con el termociclador *Gene Pro Thermal Cycler* (Bioer Technology CO., LTD).

Para evaluar el resultado de la reacción se utilizó un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. La muestra se sembró conjuntamente al marcador de peso molecular L1 100pb (PBL).

### 3.4.2 Diseño de primers.

Se diseñaron *primers* específicos con la ayuda del programa *onlinePrimer3* (Rozen *et al.*, 2000) y corrección manual, para poder validar mediante la técnica de PCR las predicciones bioinformáticas.

Se diseñaron dos poblaciones de *primers* diferentes: unos con parte del promotor viral T7 en el extremo 5' del *primer* y otros sin ese fragmento de secuencia. Los que tienen parte del promotor T7 se utilizaron posteriormente para realizar experimentos de de ARNi parental mediante transcripción *in vitro* (Lavore *et al.*, 2012). Los *primers* generados fueron:

trhFw	TCAACCCTGACGAAAAGAGG
trhFwT7	<u>CGACTCACTATAGGGT</u> TCAACCCTGACGAAAAGAGG
TrhRvT7	<u>CGACTCACTATAGGGGCTGGCAGCAATCCATTATT</u>
btlFw	TGAAGGGTAAGCAGGGAGAA
btlFwT7	<u>CGACTCACTATAGGGT</u> TGAAGGGTAAGCAGGGAGAA
BtlRvT7	<u>CGACTCACTATAGGGGCCTCGAGCCACTTGGTAT</u>
HphFw	CCGAAGTGTTTATTACTGTAG
HphFwT7	<u>CGACTCACTATAGGGCCGAAGTGTTTATTACTGTAG</u>
HphRvT7	<u>CGACTCACTATAGGGGTTTACTTCTACCCGCAACA</u>
simaFw	CATGGCTCAAGGTGGAGGTT
simaFwT7	<u>CGACTCACTATAGGGC</u> CATGGCTCAAGGTGGAGGTT
simaRv	<u>CGACTCACTATAGGGT</u> CAGCAGTTCTGGGACCAAA

### 3.4.3 Amplificaciones por PCR.

Para realizar las amplificaciones por PCR la mezcla de reacción se compuso por: *Buffer* (1X), Cl<sub>2</sub>Mg (3 mM), DNTPs (25 µM), *primer* Fw (250 µM), *primer* Rv (250

$\mu\text{M}$ ), Taq pol 1U, 2-10 ng ADNc como molde y agua estéril y ultrapura. El programa de PCR utilizado posee un gradiente de temperaturas de hibridación ( $T^{\circ}\text{a}$ ) para así determinar la temperatura óptima. El programa de amplificación que se utilizó fue: un ciclo de 5 minutos a  $94^{\circ}\text{C}$   $\rightarrow$  35 ciclos (30 segundos a  $94^{\circ}\text{C}$   $\rightarrow$  30 segundos a  $52^{\circ}\text{C}$  [gradiente  $7^{\circ}$ ]  $\rightarrow$  35 segundos a  $74^{\circ}\text{C}$ )  $\rightarrow$  5 minutos a  $74^{\circ}\text{C}$ .

Para cada par de *primers* se estableció una temperatura de hibridación ( $T^{\circ}\text{a}$ ) óptima para la amplificación; para el caso de *trh* la temperatura de hibridación utilizada fue  $58^{\circ}\text{C}$ , para *btl* la temperatura fue  $58^{\circ}\text{C}$ , en el caso de *Hph* fue de  $56^{\circ}\text{C}$  y para *sima* la temperatura de hibridación fue de  $58^{\circ}\text{C}$ .

El termociclador que se utilizó para llevar a cabo las reacciones fue *Gene Pro Thermal Cycler* (Bioer Technology CO., LTD).

#### **3.4.4 Clonado en vectores.**

Los amplicones obtenidos fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega). Las bacterias que se utilizaron para la transformación y clonado fueron las pertenecientes a la cepa DH5 $\alpha$  (genotipo  $F^{-}$   $\Phi 80lacZ\Delta M15$   $\Delta(lacZYA-argF)$  U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK $^{-}$ , mK $^{+}$ ) *phoA supE44*  $\lambda^{-}$  *thi-1 gyrA96 relA1*).

Los clones positivos se analizaron por digestión con enzimas de restricción y aquellas que dieron el patrón esperado fueron posteriormente secuenciadas (Macrogen Inc., Corea del Sur).

### 3.5 ARN de interferencia (ARNi) parental.

La técnica de RNAi consiste en la incorporación, mediante inyección, electroporación o expresión *in vivo*, de ARNdc (doble cadena) específico de un gen determinado en un organismo, produciendo una inhibición en la expresión del gen tanto en el organismo interferido como en su descendencia (Fire *et al.*, 1998; Bucher *et al.*, 2002; Hunter, 1999; Martinez *et al.*, 2004). El proceso se inicia cuando largas cadenas de ARNdc son procesadas por la enzima Dicer, generando fragmentos de ARNdc pequeños que mantienen 19 nucleótidos apareados, pero quedan con 2 nucleótidos sin aparear en ambos extremos 3' (Elbashir *et al.*, 2001). A estos fragmentos se los conoce como ARN pequeños interferentes (ARNpi). Los ARNpi se asocian luego con el complejo proteico RISC, donde se separan sus hebras (Hammond *et al.*, 2000), la hebra *antisense*, unida a RISC, se aparea con su ARN blanco al cual tiene complementariedad de secuencia. De esta forma, el ARN codificante es degradado por las nucleasas residentes en el complejo RISC, suprimiendo la expresión del gen (Martinez *et al.*, 2004).

En el caso de ARNi parental, los ARNdc se inyectan en las hembras y los fenotipos se observan en la progenie. El protocolo de RNAi parental utilizado fue desarrollado recientemente para trabajar en *R. prolixus* (Lavore *et al.*, 2012; Pagola, 2012).

El ARNdc se sintetizó a partir del amplicon de *tracheiless (trh)* obtenido por PCR con parte de la secuencia del promotor de fagosT7 en el extremo 5', siguiendo la estrategia de transcripción *in vitro*. Para esto se utilizó el *kit TranscriptAid T7 High Yield Transcription* (Thermo Scientific). La *mix* de reacción para la transcripción *in vitro* fue: agua tratada DEPC, Buffer 5x TranscriptAid Reaction, mix de rNTPs (100mM), 1 µg de molde del producto de PCR, transcriptasa *TranscriptAid Enzyme Mix*. La *mix* se

incubó a 37°C por 3 horas. Pasado este período, se incorporó DNAasa I junto al Buffer de ADN y se lo incubó a 37°C por 15 minutos para eliminar el ADN presente.

Luego de esto se siguió con la purificación para eliminar las proteínas y los restos de nucleótidos libres; para esto en primer lugar se hizo una extracción con fenol: cloroformo y luego precipitación alcohólica. El ARN obtenido se resuspendió en 20 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) para la inactivación de ARNasas.

Siguiendo recomendaciones del kit, para la siembra de los transcritos de ARN se realizó una dilución 1:20 de la muestra en agua tratada con DEPC y se utilizó como colorante 2X RNA Loading Dye Solution. La separación electroforética fue realizada en agarosa al 1% en buffer TBE y como marcador se utilizó *Run RiboRuler RNA Ladder* en paralelo a la muestra. La cuantificación del ARN se realizó a partir del análisis de la fluorescencia registrada con una cámara digital y el software ImageJ (Abràmoff *et al.*, 2004).

Ocho hembras vírgenes de *R. prolixus* se inyectaron con 3 µg de ARNdc del gen *trachealless* en un volumen de 2 µl. La inyección se realizó entre el segundo y tercer segmento abdominal utilizando una jeringa Hamilton de 5 µl. Luego de la inyección se dejó que las hembras se recuperen del estrés por 48 horas, y posteriormente fueron alimentadas para estimular el proceso de ovogénesis y colocadas junto con machos para el apareamiento.

Como control de la interferencia, se inyectaron hembras vírgenes con ARNdc correspondiente al gen β-lactamasa de *E. coli* bajo las mismas condiciones experimentales usadas con las hembras interferidas para el gen de interés.

### **3.6 Manipulación de embriones y análisis de fenotipos.**

Se recolectaron huevos de las hembras interferidas, así como también de las de control, y se realizó un seguimiento exhaustivo de su embriogénesis, a través de su observación en una lupa Leica MZFLIII.

Durante el transcurso de la embriogénesis, se realizó un registro fotográfico de todos los embriones durante las distintas etapas de desarrollo. Se esperó hasta que los embriones completaran su desarrollo o que detengan su crecimiento para evaluar la letalidad y/o analizar los fenotipos. En el caso de que el desarrollo se haya detenido, se procedió a la apertura de los huevos para un análisis detallado de los embriones. Para poder evidenciar cambios estructurales en el sistema traqueal, las partes blandas de los embriones fueron disueltas con hidróxido de potasio al 10% para preparar sus cutículas para microscopía. Los fenotipos interferidos se observaron en microscopio estereoscópico Zeiss Primo Star y la toma de imágenes se realizó con la cámara Cmos 5 M (Tucson Inc).

## 4. RESULTADOS.

### 4.1 Secuenciación de transcriptomas.

A partir de las librerías compuestas por los transcriptomas de *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma pallidipennis*, se pudo obtener una buena cobertura de los mismos mediante su secuenciación utilizando tecnología de pirosecuenciación (454 Roche).

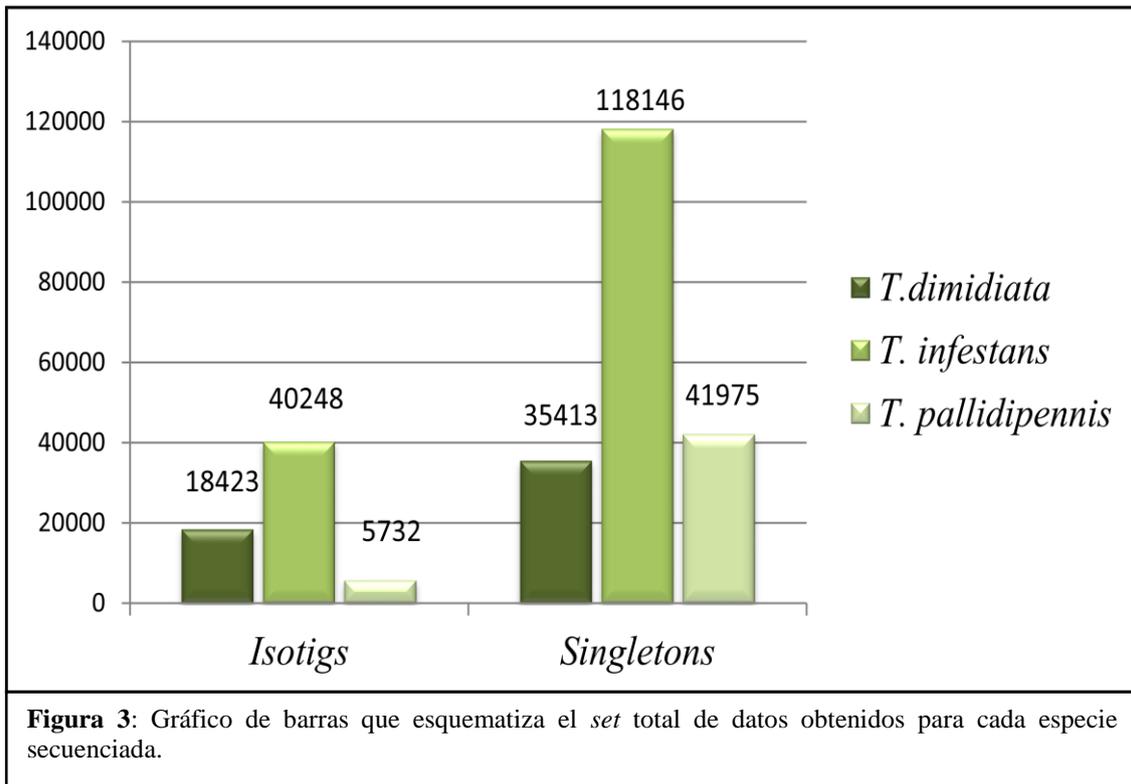
Tras el ensamblado de las lecturas obtenidas, se pudieron generar *isotig* y *singletons*, según presencia de superposición o no, para darle identidad a los diferentes transcriptos que componen el transcriptoma de cada especie. Como se puede apreciar en la Tabla 1 el set total de datos obtenidos muestra una mayor cobertura de *T. infestans*, 158.394 lecturas, en comparación con las otras dos especies, y existe una mayor representación de los transcriptos como *singletons* en las tres especies, se obtuvo casi el doble en cantidad de *singletons* que de *isotigs*. Los resultados conciben con lo esperado, con excepción de *T. pallidipennis* que por falta de un completo ensamble presentó una representación menor (Figura 3).

Para establecer el grado de cobertura de los transcriptos se analizó el porcentaje del CEG (*Core Eukaryotic Genome*) presente en cada transcriptoma. El CEG consiste en una base de datos compuesta por los genes que se consideran que están presentes en todas las especies eucariotas secuenciados y sirve como referencia de la cobertura de la secuenciación. En nuestro caso se obtuvo un 95.8% de las secuencias del CEG en *T. pallidipennis*, un 72,2% en *T. infestans* y 89,6% en *T. dimidiata*, lo que indica una cobertura extensa.

Por otra parte, se llevó a cabo un BLAST utilizando el proteoma de *R. prolixus* como referencia, ya que se encuentra secuenciado y ensamblado en su totalidad, con el

fin de darle más peso a las lecturas obtenidas y poder constatarlo de una manera más fehaciente. Para el caso de *T. dimidiata* se encontraron 17.327 identidades con el genoma de referencia, de los cuales el 69,2% del total de ellos se estableció con los isotigs generados a partir del transcriptoma secuenciado, para *T. infestans* se encontraron 18.428 identidades de los cuales el 61,2% del total lo formaban isotigs correspondientes de la especie y por último para el caso de *T. pallidipennis* se encontraron 17.917 identidades, de los cuales sólo el 24.2% del total lo formaban los isotigs correspondientes a la especie.

<b>Tabla1:</b> Resultados obtenidos a partir de la secuenciación de los transcriptomas de los triatominos por la plataforma 454 Roche. Set total representa la cantidad de lecturas.						
	<i>T. dimidiata</i>		<i>T. infestans</i>		<i>T. pallidipennis</i>	
<b>Set total</b>	53.836		158.394		47.707	
<i>Isotigs</i>	18.423		40.248		5.732	
<i>Singletons</i>	35.413		118.146		41.975	
<b>CEG hits</b>	403	89.6%	325	72.2%	431	95.8%
<i>Singletons</i>	285		242		279	
<i>Isotigs</i>	236		141		303	
<b>BlastX</b>						
<b>Match R. prolixus</b>	17.327		18.428		17.917	
<i>Singletons</i>	5343	30,80%	7.160	38,80%	13.573	75.8%
<i>Isotigs</i>	11.984	69,20%	11.268	61,20%	4.344	24.2%



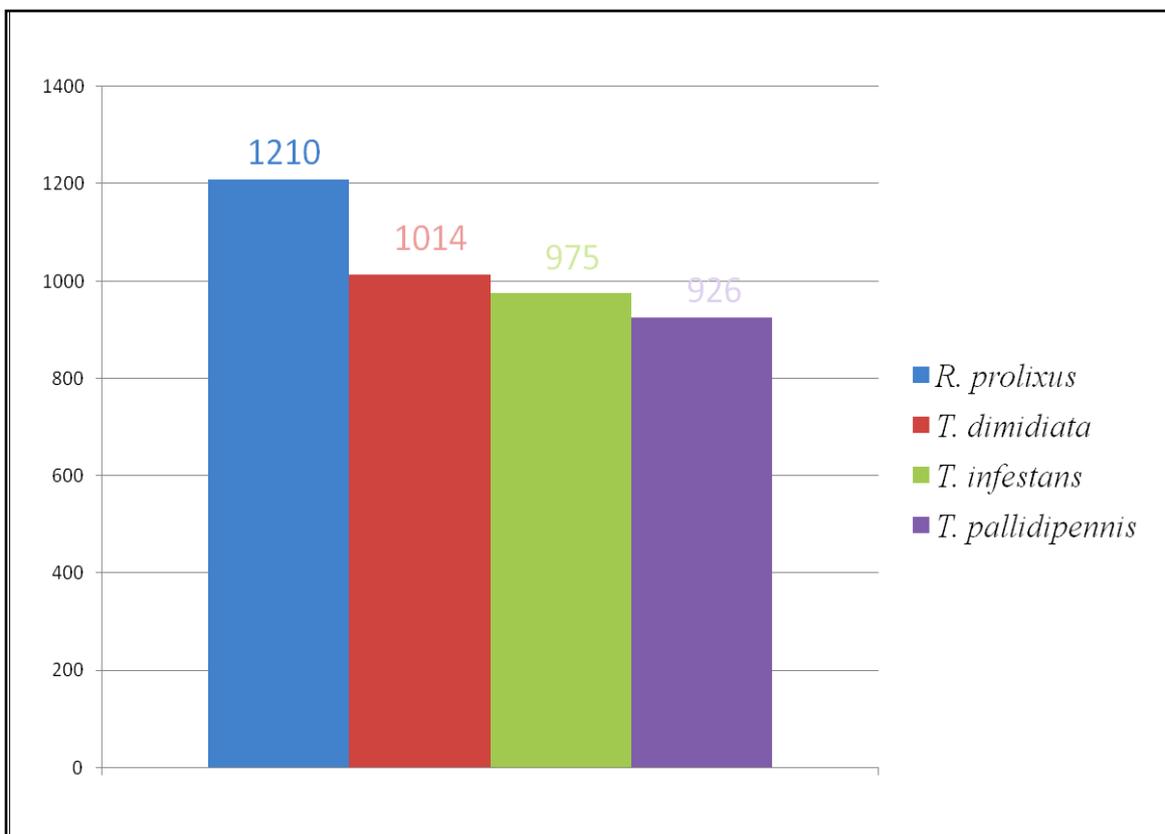
#### 4.2 Genes de desarrollo identificados a partir de la búsqueda por similitud en triatominos.

Una vez que se obtuvieron los datos crudos de la secuenciación de cada una de las especies, se llevó a cabo una búsqueda por similitud de secuencia para identificar los genes que participarían en el desarrollo embrionario de las cuatro especies de triatominos. Para esto se realizó un TBLASTN entre la base de datos de los transcriptomas/ genoma secuenciados y la generada a partir de los genes conocidos que se expresan en la embriogénesis de *D. melanogaster*, con el objetivo de poder darle identidad a las secuencias desconocidas.

Como resultado, se pudo obtener un número considerablemente grande de secuencias identificadas, las cuales participarían en el desarrollo embrionario de las cuatro especies de triatominos. En términos de números, estrictamente hablando, para *R.*

*prolixus* se encontró un total de 1.210 identidades, para *T. infestans* 975, 1.014 identidades para *T. dimidiata* y 926 para *T. pallidipennis* (Figura 4).

Como era de esperar *T. pallidipennis* mostró el menor número de identidades ya que su proceso de ensamblado se encuentra en un estadio parcial y *R. prolixus* la mayor cantidad debido a que es la especie que presenta una mayor cobertura del genoma en comparación a las otras especies.



**Figura 4:** Gráfico de barras de las identidades totales encontradas en las cuatro especies de triatominos.

Los genes putativos encontrados se organizaron dividiéndolos según las principales vías de señalización y procesos que se encuentran activos durante la embriogénesis,

teniendo como referencia para llevar a cabo esta organización al organismo modelo *D. melanogaster*.

#### **4.2.1 Vías de señalización:**

Muchas de las vías del desarrollo que se las ha encontrado y estudiado en *D. melanogaster*, se conservan evolutivamente en una amplia variedad de especies animales.

La señalización celular controla diversos procesos biológicos determinando el desarrollo, supervivencia e incluso la muerte en algunos casos. Se encontró que el funcionamiento de estas vías es sorprendentemente similar en la mayoría de los organismos con un origen evolutivo común mostrándose como un mecanismo celular importante que regula funciones claves del desarrollo. La falla en componentes de alguna vía de señalización puede conducir a problemas en el desarrollo y provocar enfermedades, como el cáncer.

Es por esta razón por la que el estudio de las vías de señalización no solamente es importante para entender el funcionamiento normal de la célula sino que es además de vital importancia para entender el crecimiento y la actividad de células aberrantes.

Sumado a esto, en nuestro caso también es importante ya que nos permitiría determinar relaciones evolutivas entre las especies estudiadas.

#### 4.2.1.1 Vía JAK/STAT.

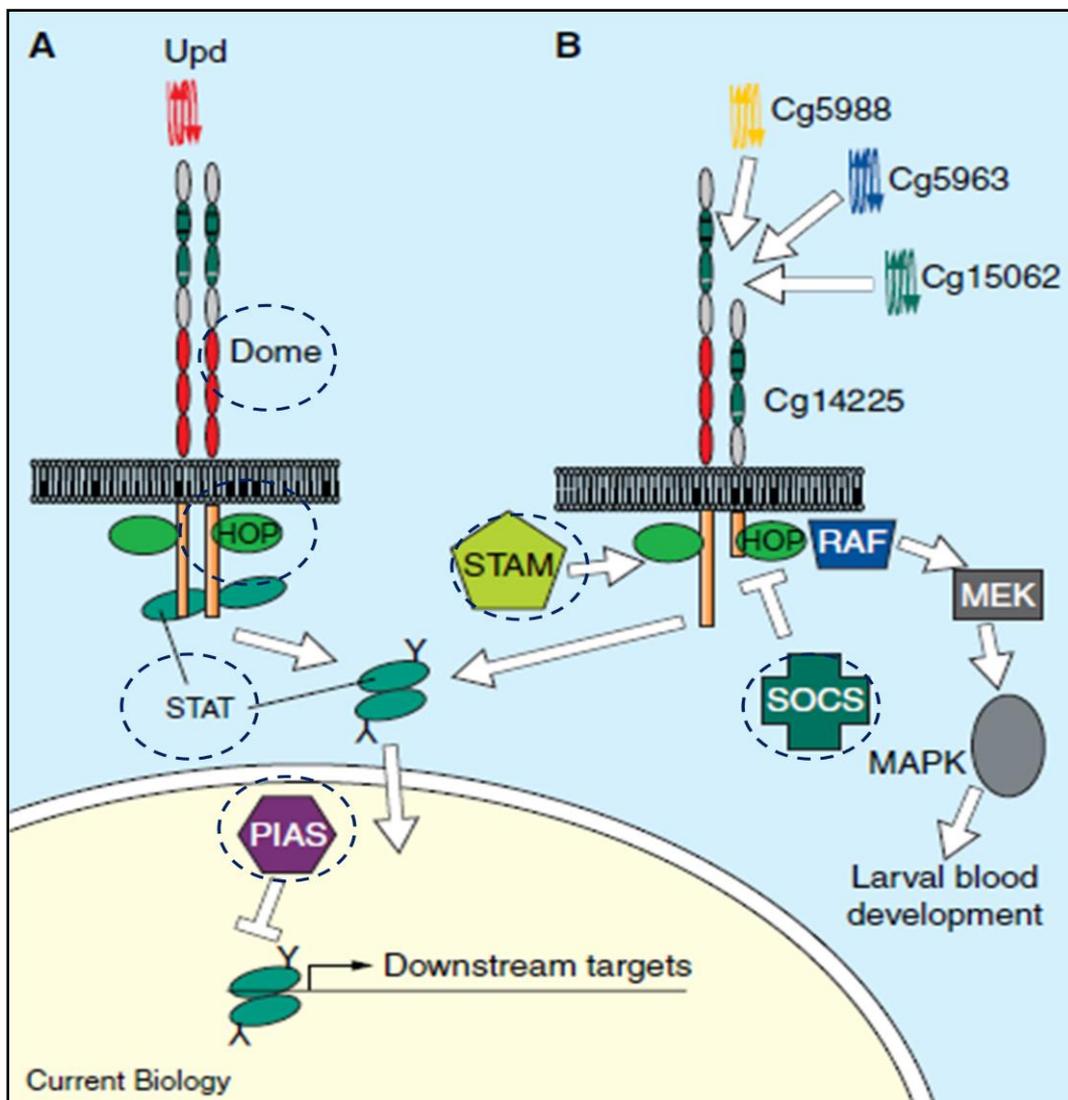
La vía JAK/STAT es una de las principales vías de señalización en eucariotas; fue identificada primero en vertebrados como mediadora de la respuesta a ciertas citoquinas y factores de crecimiento, posteriormente se la encontró conservada en invertebrados. En *D. melanogaster*, desempeña una variedad de funciones claves en varias etapas durante la embriogénesis; está presente en el proceso de segmentación, el desarrollo del ojo, el crecimiento celular, la hematopoyesis, la determinación sexual, y el desarrollo de tráqueas, formación de las invaginaciones traqueales y espiráculos posteriores (Castelli-Gair Hombría *et al.*, 2002).

A su vez, participa en un amplio conjunto de decisiones de desarrollo que incluyen determinación del destino celular, migración celular, polaridad celular planar y mantenimiento de las células madres (Baeg *et al.*, 2005).

Los componentes centrales de esta vía son la proteína quinasa JAK y el factor de transcripción STAT. Este último es el efector final de la vía y su localización varía de acuerdo al estado de la misma; en células donde la vía se encuentra inactiva STAT se localiza en el citoplasma, en caso contrario, tras la unión del ligando de activación al receptor que compone la vía, se produce la translocación de STAT al núcleo y la activación transcripcional de los genes blanco.

En invertebrados existen muchos ligandos, receptores, quinasas JAK y proteínas STAT, lo que convierte a esta cascada en una vía muy compleja para analizar. Por suerte en *D. melanogaster* la vía es poco redundante por lo que ofrece un modelo simple para el estudio (Figura 5). Los componentes principales conocidos son: el receptor *Domeless* (*Dome*), que presenta homología estructural con los miembros de la familia de receptores IL-6 en vertebrados; el receptor asociado a la quinasa Janus denominado

*Hopscotch (Hop)*; el factor de transcripción y transductor de la señal STAT92E y el ligando *Unpaired (Upd)*, que es una proteína glicosilada secretada. Los reguladores de la vía identificados son: *Su(var)2-10*, proteínas inhibidoras de la activación de los genes STAT; los miembros de la familia supresora de la señalización por citoquinas (*SOCS*) y *STAM* (Castelli-Gair Hombría *et al.*, 2002; Baeg *et al.*, 2005; <http://www.sdbonline.org>).



**Figura 5:** Modelo de señalización de la vía Jak/STAT en *D. melanogaster*, los círculos con línea discontinúa marcan los genes de la vía que fueron identificados en los triatomines (modificada de Castelli-Gair Hombría *et al.*, 2002).

A partir del análisis bioinformático se pudo obtener una buena identificación de los genes que componen la vía en las cuatro especies de triatomos (Tabla 2)

<b>Tabla 2:</b> Genes identificados de la vía JAK/STAT en triatomos. Referencias: <i>R. prolixus</i> (RP), <i>T. dimidiata</i> (TDIM), <i>T. infestans</i> (TINF) y <i>T. pallidipennis</i> (TPAL).			
<b>Vía JAK/STAT</b>			
RP	TDIM	TINF	TPAL
domeless	domeless		
hopscotch	hopscotch	hopscotch	hopscotch
STAT92E		STAT92E	STAT92E
Suppressor of variegation 3-9	Suppressor of variegation 3-9	Suppressor of variegation 3-9	Suppressor of variegation 3-9
Suppressor of variegation 205	Suppressor of variegation 205		Suppressor of variegation 205
ken and barbie	ken and barbie	ken and barbie	ken and barbie
smt3	smt3	smt3	smt3
Rab-protein5		Rab-protein5	Rab-protein5
STAM	STAM	STAM	STAM

Según su función en *D. melanogaster*, es importante resaltar que en *T. infestans* y *T. pallidipennis* no se pudo identificar el receptor *domeless* de la vía, así como tampoco el factor de transcripción STAT en *T. dimidiata*.

En ninguno de los triatomos fue posible identificar al ligando de la vía *Upd*.

Con el objetivo de una caracterización absoluta de la función de cada uno de los genes que participan en la vía, es recomendable visitar el sitio web Interactive Fly <http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm>

#### **4.2.1.2 Vía Wnt.**

La vía de señalización Wnt de *D. melanogaster*, en términos generales tiene la capacidad de dirigir una amplia variedad de respuestas en las células a nivel del desarrollo, fisiología y enfermedad. Desempeña un papel fundamental durante el desarrollo embrionario participando de procesos tales como la determinación del destino

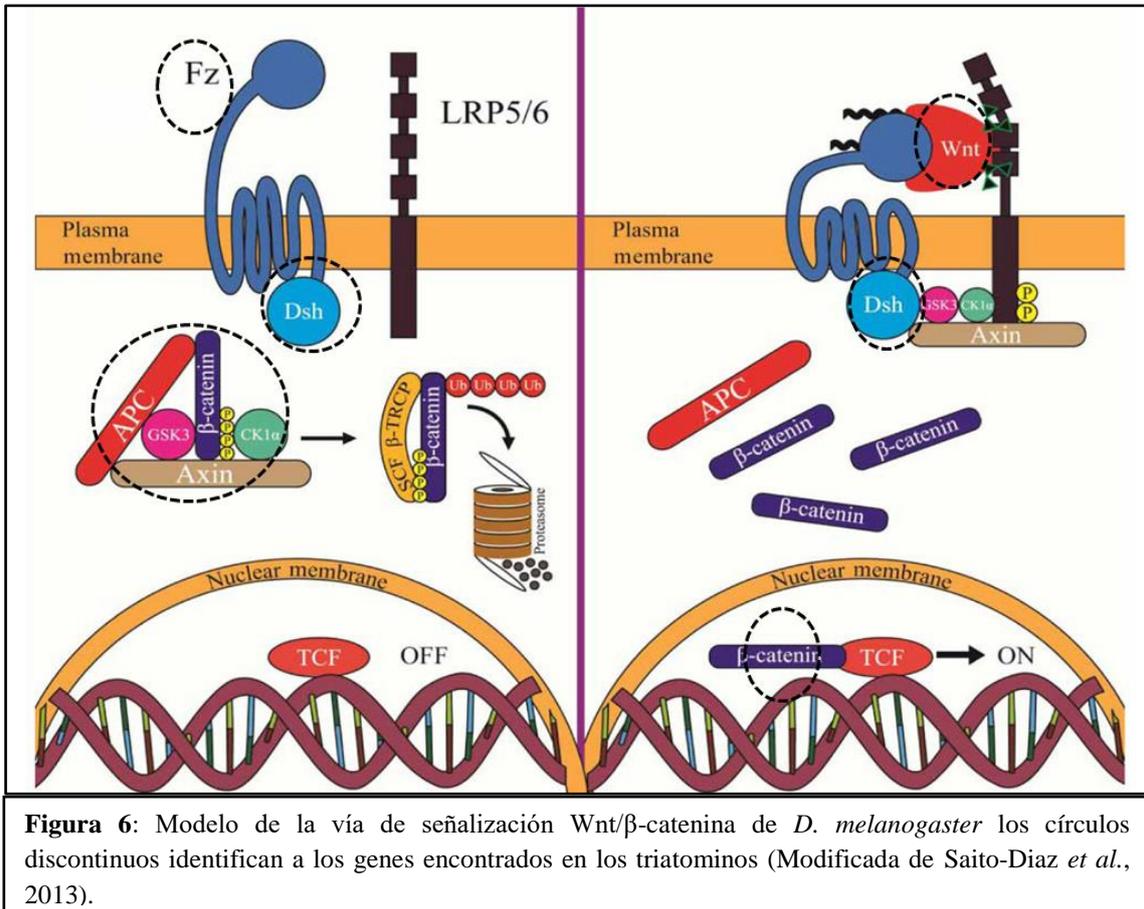
celular, la proliferación, la polaridad celular y la muerte celular, así como también durante la adultez en la homeostasis de los tejidos.

Existen dos tipos distintos de señalización, la Wnt canónica (clásica) donde se altera la transcripción de genes blancos y la no canónica donde la señal promueve cambios citoplasmáticos, como por ejemplo en los microfilamentos del citoesqueleto y en los depósitos de calcio.

En la célula, la proteína  $\beta$ -catenina se puede localizar en tres sitios distintos; en el citoplasma, transmembrana o en el núcleo. Las dos primeras ubicaciones determinan el papel fisiológico en el desarrollo y en la homeostasis, la asociación con la proteína de adherencia celular E-cadherina; mientras que la fracción nuclear de  $\beta$ -catenina está asociada con la modificación transcripcional de los genes regulados por esta vía (Du *et al.*, 2010).

La vía de señalización canónica se caracteriza por la entrada al núcleo de la proteína citoplasmática  $\beta$ -catenina (en *D. melanogaster*: *armadillo (arm)*) para modular la transcripción de los genes blanco (figura 6). Sin la activación de la vía,  $\beta$ -catenina se encuentra sujeta a un “ciclo fútil” que se caracteriza por su continua síntesis y destrucción disparado por el complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina, que se compone de proteínas de andamiaje *Axin* y *Apc* y por las quinasas GSK3 (en *D. melanogaster* *shaggy*) y CK1; cuando se produce la activación de la vía, a partir de la unión de los ligandos pertenecientes a la familia *Wnt* (*Wnt 1*, *Wnt5*, *Wnt4*, *wingless (wg)*, otros) con el receptor transmembrana *frizzled* (estructura similar a los receptores asociados a la proteína G), se remueve el complejo *Apc*; se relocalizan los demás componentes del complejo a la membrana plasmática, a través de la proteína *dishevelled*, quedando libre

la  $\beta$ -catenina permitiendo su entrada al núcleo y modulación de la transcripción (Saito-Diaz *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2010; <http://www.sdbonline.org>).



Con lo que respecta al análisis en la vía de señalización Wnt se pudo obtener una completa identificación de los componentes de la vía en el genoma de *R. prolixus*; esto gracias a la mayor cobertura de su secuenciación. Aunque en los otros triatomos existió una buena representación (Tabla 3).

<b>Tabla 3:</b> Identidades obtenidas en los triatominos de la vía de señalización Wnt. Referencias: <i>R. prolixus</i> (RP), <i>T. dimidiata</i> (TDIM), <i>T. infestans</i> (TINF) y <i>T. pallidipennis</i> (TPAL).			
<b>Via Wnt</b>			
RP	TDIM	TINF	TPAL
Wnt 5	Wnt 5	Wnt 5	
Wnt 2	Wnt 2	Wnt 2	
frizzled 2	frizzled 2	frizzled 2	frizzled 2
frizzled		frizzled	frizzled
frizzled 3		frizzled 3	frizzled 3
frizzled 4		frizzled 4	frizzled 4
dishevelled		dishevelled	
armadillo		armadillo	armadillo
wingless	wingless	wingless	
ovo/shavenbaby	ovo/shavenbaby	ovo/shavenbaby	ovo/shavenbaby
nemo	nemo	nemo	nemo
Axin			Axin
notum	notum		
shaggy	shaggy	shaggy	shaggy
adenomatous polyposis coli-like			

Un resultado que llama la atención es que en el transcriptoma de *T. pallidipennis* no se identificó ninguno de los ligandos que activan esta vía: *wg*, *Wnt5* o *Wnt 2*.

Por otro lado, en el transcriptoma de *T. dimidiata* no se identificó *arm*, proteína clave en esta vía de señalización.

Para una caracterización absoluta de cada uno de los genes revisar Interactive fly <http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm>.

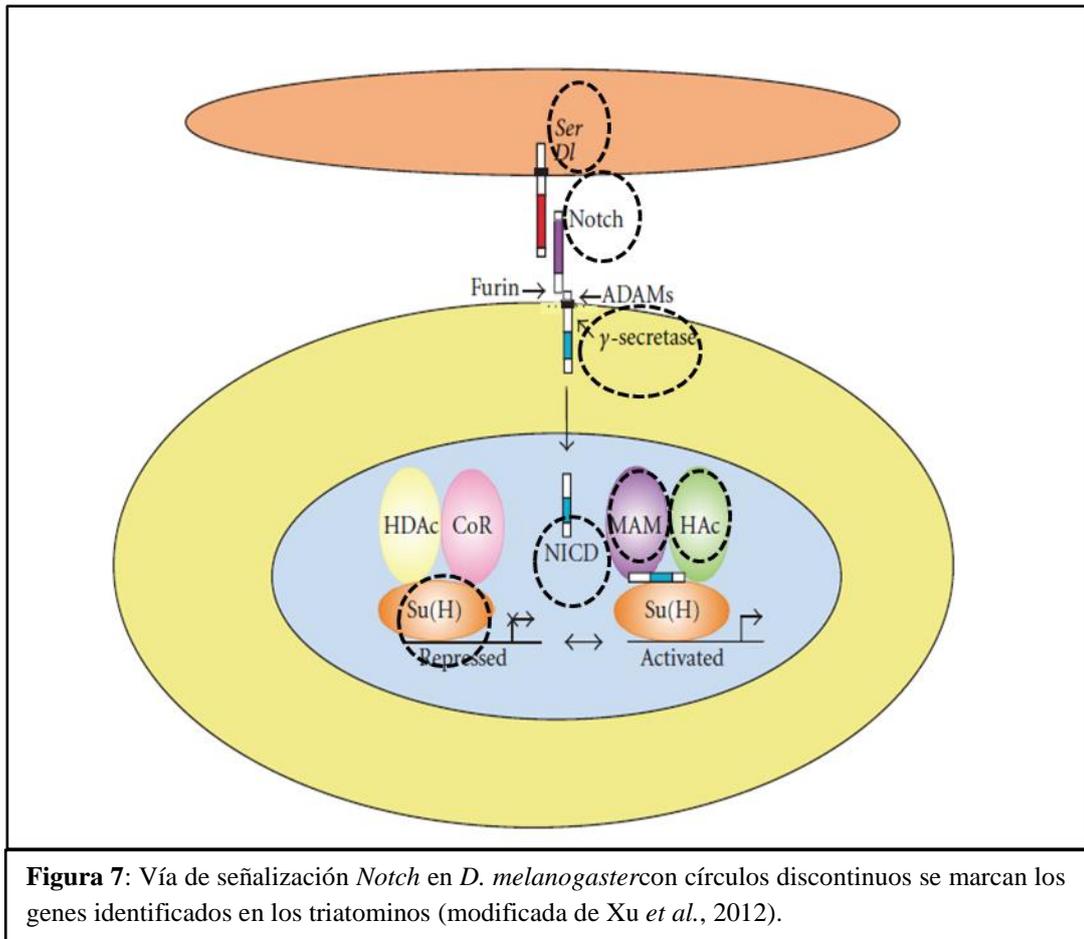
#### 4.2.1.3 Vía Notch.

Esta vía se encuentra conservada evolutivamente en el desarrollo embrionario, en la especificación del destino celular, y el mantenimiento de las células madres. La vía de señalización Notch requiere la interacción de dos células con la maquinaria de

procesamiento intracelular en correcto estado para participar por completo en la vía. La señalización canónica consiste en la participación de una célula receptora de la señal, que expresa el receptor NOTCH (N) en su superficie y una célula que envía la señal, que expresa en su superficie el ligando; para que se lleve a cabo la activación de la vía es necesario que exista una interacción física- molecular directa entre N y su ligando, siempre entre células adyacentes.

El receptor N es una proteína transmembrana de simple paso que al interactuar con su ligando dispara una serie de eventos que conducen a un cambio en la expresión génica en la célula receptora (Figura 7). Presenta dominio intracelular y dominio extracelular altamente conservado, cuando se lleva a cabo la interacción con su ligando se producen eventos de proteólisis, disociación y degradación que permiten que el dominio intracelular se libere y actúe como regulador transcripcional promoviendo la activación génica. El dominio extracelular interactúa con el ligando, *Delta (Dl)* y *Serrate (Ser)* en *D. melanogaster*, formando un complejo que es endocitado por la célula que expresa el ligando en su superficie celular, permitiendo así que la señal sea efectiva.

Además de estas moléculas principales, existen varias que actúan regulando la señalización, algunas de ellas son *Supresor of Hairless (Su(H))*, histona acetiltransferasa (*Hac*), *mastermind (mam)*, entre otras (Wang, 2011; Xu *et al.*, 2012; <http://www.sdbonline.org>)



Los componentes de la vía de señalización de Notch fueron altamente identificados en las cuatro especies de triatominos, siempre con una mayor representación en *R. prolixus* (Tabla 4). Se encontraron proteínas que participan en la liberación del dominio intracelular de N, luego de su unión al ligando, como por ejemplo las codificadas por *Presenilin (Psn)*, *Kuzbanian (kuz)*; también se identificó a *scarbous* que codifica para un ligando de N, inhibidor de la vía.

MAM, proteína que participa en la regulación de la expresión nuclear, sólo fue identificada en el genoma de *R. prolixus*.

<b>Tabla 4:</b> Genes identificados de la vía de señalización <i>Notch</i> en los triatomíneos. Referencias: <i>R. prolixus</i> (RP), <i>T. dimidiata</i> (TDIM), <i>T. infestans</i> (TINF) y <i>T. pallidipennis</i> (TPAL).			
<b>Vía Notch</b>			
RP	TDIM	TINF	TPAL
Delta	Delta	Delta	Delta
Serrate		Serrate	Serrate
Notch	Notch	Notch	Notch
Supresor Hairless	Supresor Hairless		
mastermind			
Deltex		Deltex	
Neuralized	Neuralized	Neuralized	
strawberry notch	strawberry notch	strawberry notch	
shaggy	shaggy	shaggy	shaggy
pecanex			pecanex
Kuzbanian	Kuzbanian	Kuzbanian	
auxilin	auxilin	auxilin	auxilin
degringolade	degringolade		
Presenilin	Presenilin	Presenilin	Presenilin
scabrous		scabrous	scabrous
Groucho	Groucho	Groucho	Groucho
		Hairy	Hairy

Para una caracterización completa de cada uno de los genes identificados de la vía, se puede visitar la página Interactive Fly <http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm>

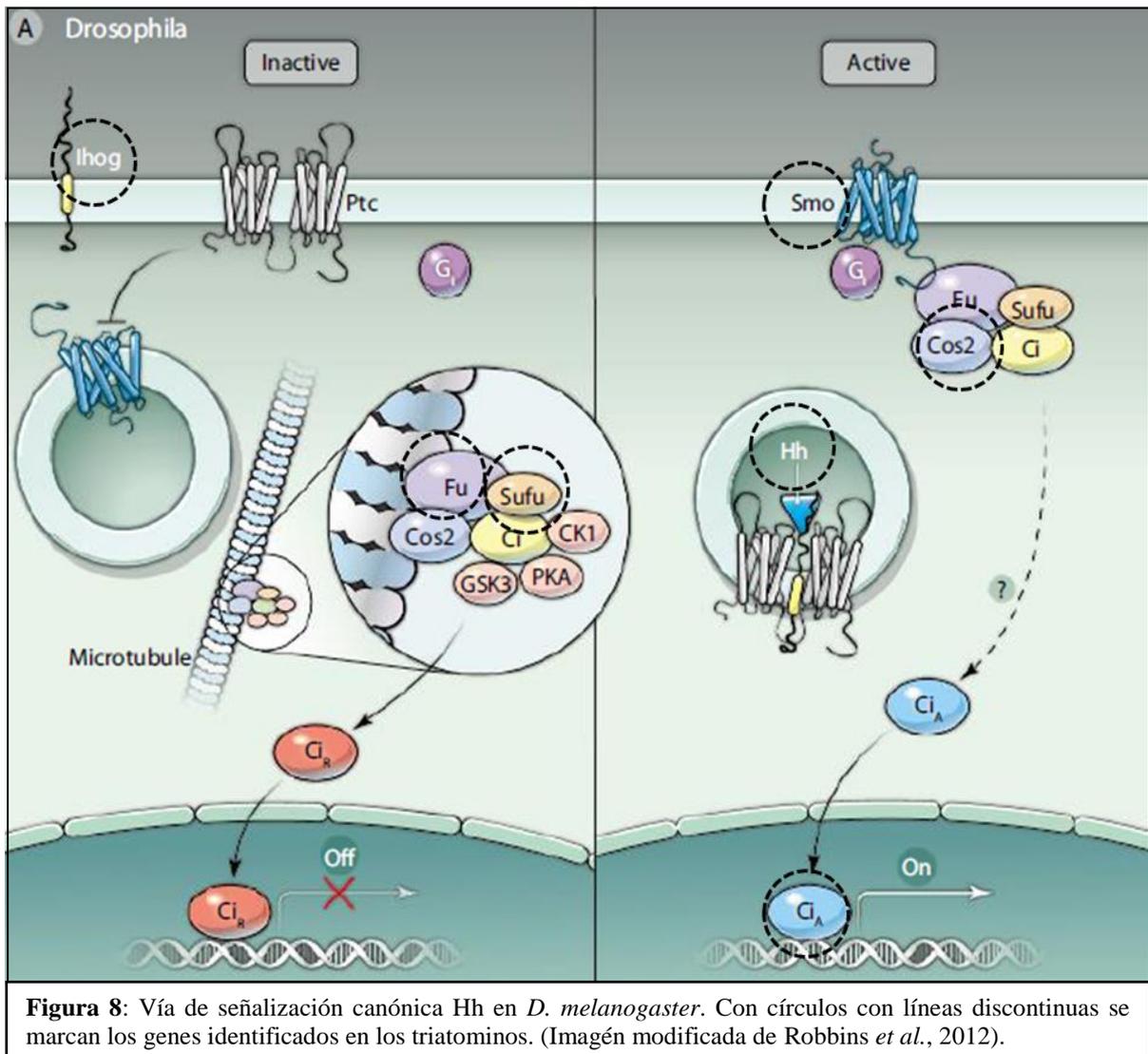
#### **4.2.1.4 Vía Hedgehog.**

La vía de señalización *Hh* (*Hedgehog*) participa como regulador en el desarrollo embrionario, como en el desarrollo de los discos imaginales que posteriormente da lugar a varias de las estructuras del adulto en *D. melanogaster* (Robbins *et al.*, 2012).

El ligando que da inicio a esta cascada de señalización, HEDGEHOG (HH) en *D. melanogaster*, es producido como una proteína precursora que se procesa autocatalíticamente, dando origen a una proteína truncada con un dominio de señalización N-terminal, el cual es modificado con la adición de molécula de colesterol en el extremo C del mismo. Para la producción y distribución de la proteína HH se requieren de la participación de 2 proteínas: SKUNNY HEDGEHOG (SKI) y DISPATCHED (DISP) (Figura 8) (Jacob *et al.*, 2007).

La señal de activación de la cascada se da cuando HH se une al receptor transmembrana PATCHED (PTC) y promueve la eliminación de la represión a cargo de SMOOTHENED (SMO), proteína perteneciente a la superfamilia de los receptores acoplados a la proteína G.

SMO regula la actividad y la abundancia del factor de transcripción CUBITUS INTERRUPTUS (CI) con el fin de modular la expresión de un conjunto específico de genes target HH. La regulación a cargo de SMO se lleva a cabo a través de una serie de complejos de proteínas asociadas a la membrana que contienen proteínas quinasas y proteínas supresoras: FUSED (quinasa), COSTAL2 y SUPPRESSOR OF FUSED (SUFU). En ausencia del ligando HH, COSTAL2 promueve el clivaje proteolítico de CI convirtiéndolo en su forma represora; con la presencia del ligando, este evento de proteólisis es inhibido y CI se encuentra en su forma activa para dar inicio a la regulación de la expresión de los genes target de la vía. Como regulador positivo de la vía se encuentra la proteína transmembrana INTERFERENCE HEDGEHOG (IHOG) (VanHook, 2011; Robbins *et al.*, 2012).



Se identificaron varios de los genes centrales de la vía en las cuatro especies de triatomíneos; aunque *R. prolixus*, fue el triatómino con mayor cantidad de identidad de genes asignados (Tabla 5).

<b>Tabla 5:</b> Genes identificados de la vía de señalización <i>Hh</i> en los triatomíneos. Referencias: <i>R. prolixus</i> (RP), <i>T. dimidiata</i> (TDIM), <i>T. infestans</i> (TINF) y <i>T. pallidipennis</i> (TPAL).			
<b>Vía Hedgehog</b>			
RP	TDIM	TINF	TPAL
interferente hedgehog	interferente hedgehog	interferente hedgehog	interferente hedgehog
Hedgehog	Hedgehog	Hedgehog	Hedgehog
Smoothened	Smoothened	Smoothened	
Fused	Fused	Fused	Fused
Suppressor of Fused			Suppressor of Fused
Costal-2	Costal-2	Costal-2	Costal-2
cubitus interruptus	cubitus interruptus	cubitus interruptus	cubitus interruptus
Dispatched			
Roadkill	roadkill	roadkill	roadkill

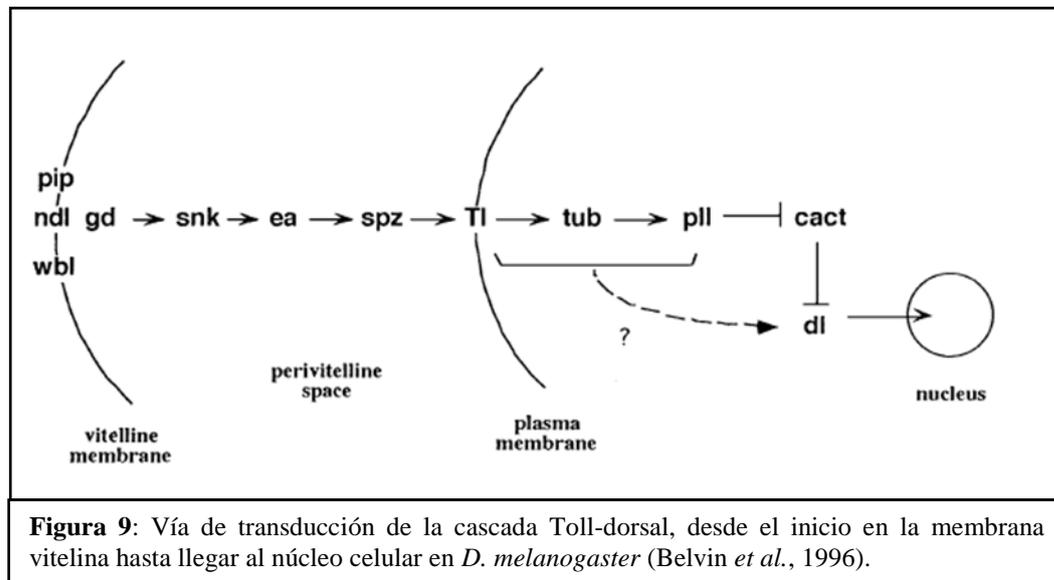
Algo interesante para aclarar, es que el gen *Disp*, el cual, según su función conocida en *D. melanogaster*, es necesario para la liberación de la proteína HH para que se dé inicio a la cascada de señalización, fue únicamente identificado por similitud de secuencia en *R. prolixus*. Por otra parte el gen *Ptc* que codifica para el receptor de la vía no fue identificado en ninguno de los triatomíneos.

Para una caracterización completa de cada uno de los genes identificados de la vía, se puede visitar la página Interactive Fly <http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm>.

#### **4.2.1.5 Vía Toll-Dorsal.**

La función mejor caracterizada de la vía Toll-Dorsal en *D. melanogaster* es su participación en el establecimiento del patrón dorso-ventral del embrión; además, se la ha identificado en procesos presentes en estadios más tardíos del desarrollo, como en la respuesta inmune, en los movimientos morfogénicos y en el desarrollo muscular.

La vía (Figura 9) está compuesta por 12 genes de efecto materno, denominados genes del grupo dorsal que controlan el patrón dorso-ventral inicial del embrión. El receptor transmembrana TOLL (TL) se une a su ligando SPÄTZLE (SPZ) y da comienzo a la cascada de señalización que culmina con la entrada de DORSAL (DL) al núcleo celular y la activación de genes que llevan a la ventralización celular. DL es un factor de transcripción que tiene ubicación tanto nuclear como citoplasmática, su entrada al núcleo especifica el patrón ventral de la célula (Belvin *et al.*, 1996).



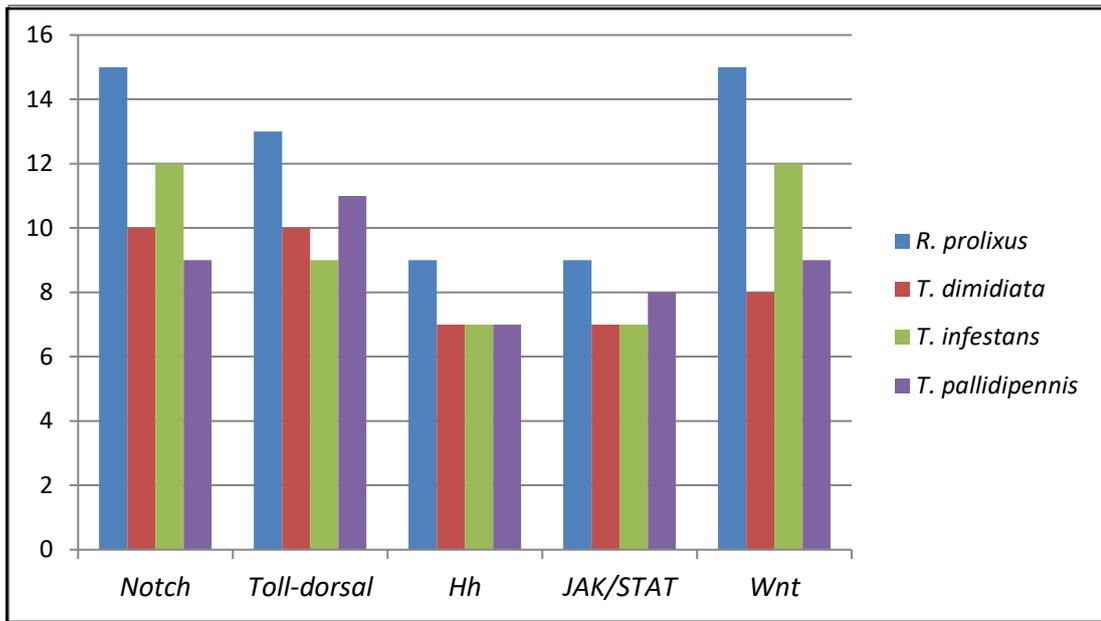
Se puede ver que en *R. prolixus* se identificó la totalidad de los genes que componen la vía de señalización Toll-Dorsal (Tabla 6).

<b>Tabla 6:</b> Genes identificados de la vía Toll-Dorsal en triatominos. Referencias: <i>R. prolixus</i> (RP), <i>T. dimidiata</i> (TDIM), <i>T. infestans</i> (TINF) y <i>T. pallidipennis</i> (TPAL).			
<b>Vía Toll- Dorsal</b>			
RP	TDIM	TINF	TPAL
Toll	Toll		Toll
Pelle	Pelle	Pelle	Pelle
Cactus	Cactus	Cactus	Cactus
Dorsal		Dorsal	
Spätzle			Spätzle
Snake	Snake	Snake	Snake
gastrulation defective	gastrulation defective		gastrulation defective
Easter	Easter	Easter	Easter
windbeutel	windbeutel	windbeutel	windbeutel
Toll-8	Toll-8	Toll-8	Toll-8
Nudel	Nudel	Nudel	Nudel
Pipe	Pipe	Pipe	Pipe
tube			

Algo que merece ser remarcado es que en los transcriptomas de *T. dimidiata* y *T. pallidipennis* no se logró identificar a *dl*, el cual codifica el factor de transcripción central de la vía; así como tampoco se encontró el receptor TL y su ligando SPZ en el transcriptoma de *T. infestans*.

Para un completo análisis de la función de cada uno de los genes que componen la vía, es recomendable acceder al sitio web Interactive Fly. <http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm>

Para visualizar los datos obtenidos para cada una de las vías de señalización en las cuatro especies de triatominos se realizó un gráfico de barras comparando las identidades obtenidas para complementar el análisis realizado (Figura 10).



**Figura 10:** Gráfico de barras que compara las identidades obtenidas en las 4 especies analizadas. Sobre el eje de las x se puede observar las diferentes vías y sobre el eje de las y la cantidad de identidades encontradas para cada vía en cada especie.

#### **4.2.2 Procesos del desarrollo.**

A pesar de la gran variedad de modos de desarrollo embrionario y formas finales encontradas en los animales, las redes regulatorias y factores de transcripción que dan origen a los ejes anteroposterior y dorsoventral, así como también los que dan lugar a procesos de organogénesis se encuentran muy conservados. Sabiendo esto, comienzan a surgir las preguntas de, ¿cómo estas redes regulatorias tan conservadas crean tanta diversidad morfológica, se adaptan a nuevos ambientes? y ¿de qué manera las novedades evolutivas se incorporan en un sistema de patronamiento ya establecido? Para esto es necesario establecer las bases, delimitando *in-silico* que genes participan en los procesos, para posteriormente realizar análisis funcionales que permitan validar lo predicho.

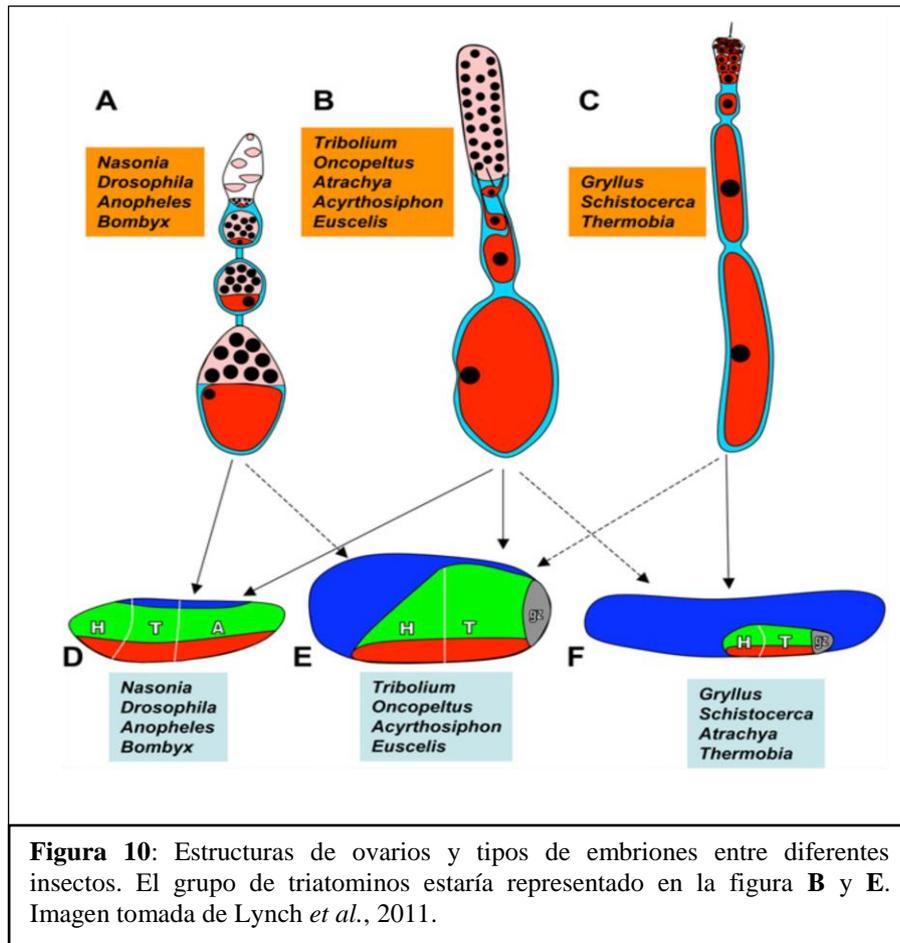
##### **4.2.2.1 Ovogénesis.**

La estructura del aparato reproductor femenino de insectos es variable, ya que estos son un grupo altamente diversificado. Como característica común observamos, que los ovarios son dos y simétricos respecto de un eje longitudinal, y que cada uno de ellos está formado por estructuras tubulares denominadas ovariolas, cuyo número es especie-específico. Las estructuras más típicas de ovarios son, los ovarios meroísticos y los panoísticos que se diferencian por la ausencia o presencia, respectivamente, de células nodrizas; y por lo tanto en el desarrollo de la ovogénesis (Figura 10) (Lynch *et al.*, 2011).

Dentro del tipo de ovario meroístico, los cuales se caracterizan por la presencia de células nodrizas, podemos diferenciar los subtipos politróficos y telotróficos. Al subtipo de ovario politrófico lo encontramos principalmente en insectos holometábolos, y asociado a insectos de banda germinal larga; se caracteriza por estar compuesto por el

ovocito, que da lugar al embrión, por una capa de células foliculares somáticas, que rodean a la cámara del huevo, y por células germinales nodrizas, que son las encargadas de la síntesis de ARNms y componentes citoplasmáticos necesarios para el desarrollo del embrión. Por otra parte el subtipo telotrófico se caracteriza por la presencia de las células nodrizas en el extremo anterior de cada ovariola, actuando como fuente común de ARNms y componentes citoplasmáticos para todos los ovocitos. Al igual que el subtipo politrófico, presenta una cubierta de células foliculares somáticas. Este tipo de ovogénesis se la puede encontrar tanto en insectos hemimetábolos como holometábolos, y está asociada principalmente con insectos de banda germinal corta (Lynch *et al.*, 2011).

Por otro lado, se puede identificar a un ovario del tipo panoístico, el cual se caracteriza por no presentar células nodrizas especializadas. Se compone de células germinales, las cuales se convierten todas en ovocito; el núcleo del ovocito es el encargado de sintetizar todos los ARNmensajeros maternos y componentes citoplasmáticos necesarios para el desarrollo embrionario. Esta estructura también se encuentra rodeada por una capa de células foliculares somáticas. Este tipo de ovogénesis se la encuentra asociada exclusivamente con insectos de banda germinal corta (Lynch *et al.*, 2011).



En el caso de la ovogénesis meroística politrófica en *D. melanogaster*, el ovario se caracteriza por estar formado por alrededor de 16 a 20 ovariolas, cada una representando una línea de producción de ovocito, el cual se desarrolla formando un citoquister de 16 células germinales envueltas por una capa de células foliculares somáticas (Figura 10 A y 11).

En el extremo anterior de la ovariola se encuentra una región denominada germario, donde se da inicio a la formación del ovocito, se caracteriza por ser una región de activa división e incipiente diferenciación. Está compuesto por células madres somáticas y germinales; las células madres germinales se ubican en el extremo anterior del germario, en contacto con estructura somática conocida como filamento terminal, y se dividen asimétricamente para producir una célula madre y una célula hija; esta última

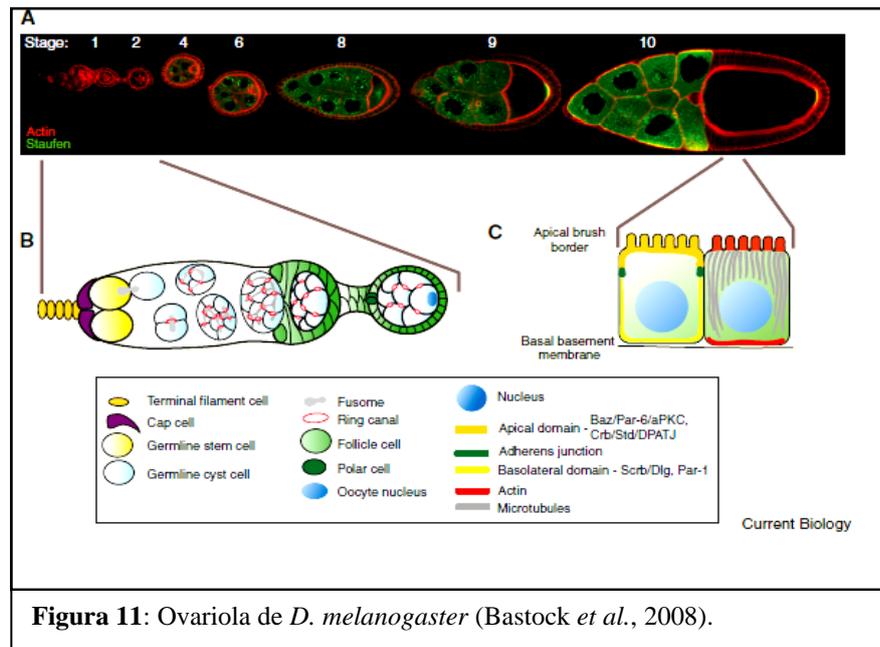
se diferencia, siguen cuatro divisiones mitóticas con incompleta citocinesis para formar una estructura llamada citoquister (*cluster*), compuesta por 16 células interconectadas por puentes citoplasmáticos denominados canales en anillo. La orientación de estas divisiones está controlada por el fusoma, una estructura ramificada compuesta por retículo endoplasmático rodeado por componentes citoesqueléticos corticales y microtúbulos. Sólo una de las células del citoquister, la que contenga los 4 canales en anillo, logra diferenciarse en ovocito; las restantes se convierten en células nodrizas (Bastock *et al.*, 2008; Gigliotti *et al.*, 2004). Tanto las células nodrizas como las foliculares proporcionan al ovocito constituyentes citoplasmáticos, además de una serie de determinantes específicos necesarios para la formación del patrón inicial del embrión. Con respecto a los determinantes de las células nodrizas (en su mayoría ARN mensajeros), estos se acumulan de forma asimétrica en el ovocito y se activan en el momento de la fertilización. Por lo que respecta a las células foliculares, estas secretan factores de desarrollo que se asocian a la superficie extracelular del embrión, donde se generan las señales que activan a los receptores transmembrana en posiciones específicas (St Johnston *et al.*, 1992).

La ovogénesis se la divide en 14 estadios según criterio morfológico, el primer estadio se establece en el germario y el 14 cuando el ovocito alcanza el estado maduro. En este proceso participan cientos de genes, con el fin de generar una célula altamente estructurada, donde la distribución de los ARN, ADN y proteínas se encuentra controlada por los procesos de determinación de la polaridad dorso-ventral y del eje antero-posterior del huevo (<http://www.sdbonline.org>).

A medida que el esbozo de ovocito va pasando desde el extremo anterior de la ovariola al extremo posterior, va madurando hasta alcanzar el estado donde es capaz de ser fertilizado.

La ovogénesis en *D. melanogaster*, como sistema modelo, se ha utilizado para investigar varios aspectos del desarrollo y de la biología celular.

El desarrollo de un huevo maduro a partir de una sola célula madre requiere casi todos los procesos celulares: desde la especificación del destino celular, el control del ciclo celular, y la polarización celular hasta la morfogénesis epitelial (Xu *et al.*, 2012).



Se encontraron casi todos los genes que componen este proceso en las 4 especies de triatomíneos, principalmente de *R. prolixus* y con una menor representación en el transcriptoma de *T. infestans* (Tabla 7).

<b>Tabla 7:</b> Genes identificados del proceso de ovogénesis en los triatominos. Referencias: <i>R. prolixus</i> (RP), <i>T. dimidiata</i> (TDIM), <i>T. infestans</i> (TINF) y <i>T. pallidipennis</i> (TPAL).			
Ovogénesis			
RP	TDIM	TINF	TPAL
bazooka	bazooka		bazooka
egalitarian	egalitarian	egalitarian	egalitarian
egghead	egghead	egghead	egghead
Bicaudal C			Bicaudal C
Bicaudal D			
cappuccino	cappuccino	cappuccino	cappuccino
cornichon	cornichon	cornichon	cornichon
pipe	pipe	pipe	pipe
pointed	pointed	pointed	pointed
aubergine	aubergine	aubergine	aubergine
domeless	domeless		
tudor	tudor		
squid	squid		
Nanos	Nanos	Nanos	Nanos
staufen	staufen	staufen	staufen
grauzone	grauzone	grauzone	grauzone
singed			singed
exuperantia			
vasa	vasa	vasa	vasa

Es importante remarcar que en ninguna de las cuatro especies se logró identificar el gen *oskar* (*osk*), el cual es fundamental en la ovogénesis de *D. melanogaster*, responsable de determinar el destino celular germinal y la polaridad posterior en el ovocito; pero si fue posible identificar el gen que codifica a la proteína que regula su transcripción, *Staufen* (*stau*).

Tampoco fue posible identificar a *valois* (*vls*) en ninguno de los tratominos. *vls* es un gen posterior materno que actúa durante la ovogénesis para la localización de VASA en la corteza posterior del ovocito, la proteína VASA es esencial para establecer el plasma polar, un citoplasma especial encontrado en la región posterior del ovocito y del embrión temprano requerido para la localización de *nanos* (*nos*) en el polo posterior. *vls*

también es necesario para lograr la acumulación y el mantenimiento de *oskar* en el plasma polar posterior. Por lo tanto no se encontraron dos genes claves necesarios para el establecimiento del polo posterior en el ovocito: *osk* y *vls*.

Para una caracterización completa sobre los genes que participan en esta vía, es recomendable visitar el sitio web Interactive Fly. <http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm>

#### **4.2.2.2 Proceso dorsoventral.**

Toda la información de la que se dispone acerca de cómo se regulan los genes que determinan el eje dorsoventral durante el desarrollo embrionario en insectos proviene de detallados estudios realizados en *D. melanogaster*.

El eje dorsoventral embrionario en *D. melanogaster*, comienza su polarización durante la ovogénesis y conduce a la subdivisión del embrión en mesodermo, neuroectodermo y ectodermo dorsal.

La cascada de interacciones moleculares que conducen al establecimiento del destino celular, a lo largo del eje dorsoventral del embrión de *D. melanogaster*, comienza con la ruptura de la simetría en el ovario, en donde el núcleo del ovocito se mueve a una posición cortical.

Alrededor del núcleo del ovocito se localiza el ARNm de *gurken* (*grk*), el cual se traduce y se obtiene la proteína que es secretada hacia la capa de células foliculares somáticas. Estas presentan en su superficie el receptor para la proteína secretada, EGFR del inglés *Epidermal Growth Factor* (gen: *torpedo* en *D. melanogaster*), por lo tanto se lleva a cabo la activación del mismo. El principal blanco de la señalización, relevante

para el establecimiento del eje DV, es *pipe* (*pip*), cuya expresión se encuentra reprimida en las células foliculares dorsales, en respuesta a la activación de EGFR. En otras palabras, la activación de la vía de señalización EGFR a cargo de GRK le confiere un destino dorsal a las células foliculares adyacentes en detrimento del ventral (Manseau *et al.*, 1989) (Figura 12).

*Pip* codifica para una sulfotransferasa cuyos blanco fueron identificados como proteínas residentes en la membrana vitelina. En el lado ventral, *pipe* inicia una cascada proteolítica que culmina con el clivaje y activación del ligando del receptor TOLL (TL), SPÄTZLE (SPZ) en la porción ventral del espacio perivitelino (Moussian *et al.*, 2005).

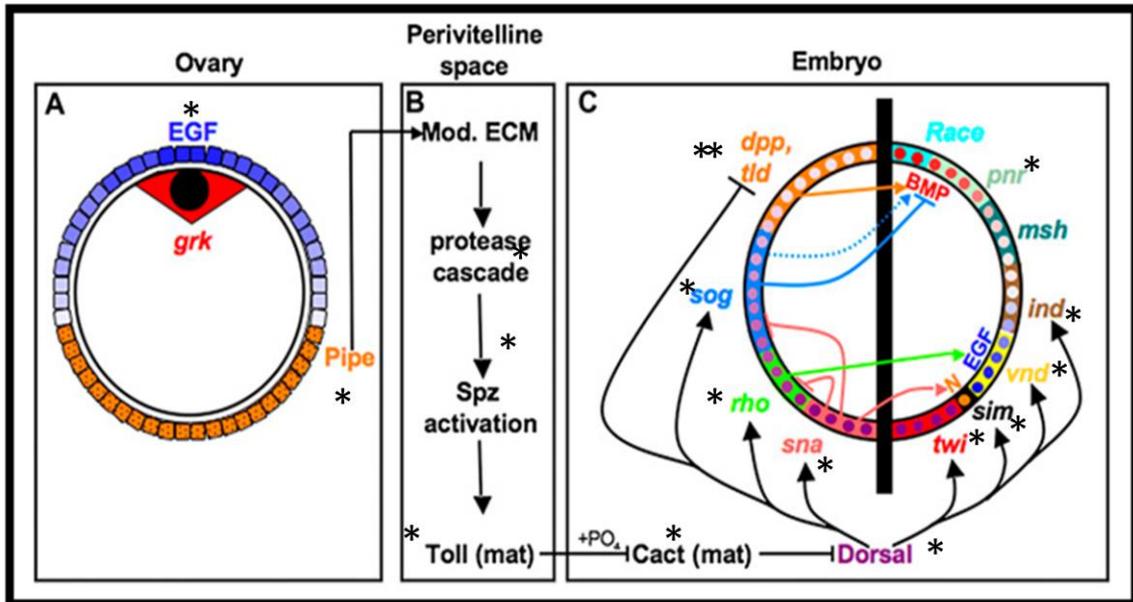
Esto permite la unión a su receptor TL, ubicado en la membrana plasmática del embrión, y consecuentemente, a la activación de la cascada de señalización que lleva a la fosforilación y degradación de CACTUS (CACT), dando lugar a la entrada de DORSAL (DL) al núcleo donde regula la expresión de numerosos genes blanco. En ausencia de señal, CACT se une a DL secuestrándolo en el citoplasma.

La activación de TL ocurre en un gradiente que se emite desde la línea media ventral, lo que lleva al correspondiente gradiente nuclear de DL. Este último, es el acontecimiento fundamental en la formación del eje dorso-ventral en *D. melanogaster*, ya que todos los destinos celulares a lo largo de este eje dependen directa o indirectamente de DL para su correcta regulación. DL actúa como un morfógeno, activando y reprimiendo sus genes blanco en una manera dependiente de su concentración (Stathopoulos *et al.*, 2002).

Altos niveles de DL sobre el lado ventral favorece la expresión de genes como *snail* (*sna*) y *twist* (*twi*) que indicarán a las células más ventrales identidad de mesodermo, niveles más bajos de dorsal se dan lateralmente activando la expresión de genes como

*rhomboïd (rho)*, *vein (vn)*, *ventral nervous system defective (vnd)*, *short gastrulation (sog)* y *brinker (brk)* en lo que será el neuroectodermo (Kosman *et al.*, 1991; Ray *et al.*, 1991; Ip *et al.*, 1992b; François *et al.*, 1994; Mellerick *et al.*, 1995; Jazwinska *et al.*, 1999a; Jazwinska *et al.*, 1999b; Minami *et al.*, 1999), mientras que la ausencia de DL en la región dorsal del embrión permite la expresión de genes como *decapentaplegic (dpp)* y *zerknüllt (zen)* que definirán la formación del ectodermo dorsal y la amnioserosa respectivamente.

La sensibilidad diferencial de los genes se refleja en parte, a su afinidad y disposición de los sitios de unión a DL en sus respectivos potenciadores; así como también por la cooperación con otros factores maternos, con genes blancos y la regulación de distintos componentes de las vías de señalización (Lynch *et al.*, 2011).



**Figura 12:** Establecimiento del patrón dorso-ventral. La figura fue modificada con asteriscos mostrando los genes que si fueron identificados en los triatominos, extraída de Lynch *et al.*, 2011.

Se identificaron una gran cantidad de genes que se expresan durante este proceso, con una mayor representación en *R. prolixus* en comparación con las otras especies (Tabla 8).

<b>Tabla 8:</b> Genes del proceso dorsoventral identificados en triatominos. Referencias: <i>R. prolixus</i> (RP), <i>T. dimidiata</i> (TDIM), <i>T. infestans</i> (TINF) y <i>T. pallidipennis</i> (TPAL).			
<b>Eje Dorso-ventral</b>			
RP	TDIM	TINF	TPAL
decapentaplegic	decapentaplegic	decapentaplegic	decapentaplegic
short gastrulation			short gastrulation
Tolloid	tolloid	Tolloid	tolloid
twisted gastrulation	twisted gastrulation	twisted gastrulation	twisted gastrulation
Punt	punt	Punt	Punt
saxophone	saxophone	saxophone	saxophone
Medea	medea	Medea	medea
Cactus	Cactus	Cactus	Cactus
Dorsal		Dorsal	
Spätzle			Spatzle
Snake	snake	Snake	Snake
Snail	snail	Snail	Snail
Brinker			
Pipe	Pipe	Pipe	Pipe
Nudel	Nudel	Nudel	Nudel
torpedo	torpedo	torpedo	torpedo
Toll	Toll		Toll
Tuve			
Pelle	Pelle	Pelle	Pelle
Thisbe			
windbeutel	windbeutel	windbeutel	windbeutel
Rho guanine nucleotide exchange factor at 64C		Rho guanine nucleotide exchange factor at 64C	Rho guanine nucleotide exchange factor at 64C
rhomboid	rhomboid	rhomboid	rhomboid
Rho-like	Rho-like	Rho-like	Rho-like
Rho guanine nucleotide exchange factor 2	Rho guanine nucleotide exchange factor 2	Rho guanine nucleotide exchange factor 2	Rho guanine nucleotide exchange factor 2
Rho1	Rho1	Rho1	Rho1
gastrulation-defective	gastrulation-defective		gastrulation-defective
intermediate neuroblast defective	intermediate neuroblast defective	intermediate neuroblast defective	
ventral nervous system defective	ventral nervous system defective	ventral nervous system defective	
zerknüllt	zerknüllt	zerknüllt	
torpedo	torpedo	torpedo	torpedo
Twist	twist	twist	Twist
single-minded		single-minded	single-minded
pannier		pannier	pannier

Se tuvo en cuenta tanto los genes que intervienen en el proceso de señalización para establecer el eje (Vía Toll-dorsal), así como los genes blanco que se expresan y determinan que las células tengan característica dorsal o ventral, y los genes que se expresan en un comienzo en el ovario.

Un resultado interesante es que en las cuatro especies de triatomíneos se encontró *torpedo* (EGF) pero no se encontró *gurken* (grk). Lo llamativo es que como se explicó anteriormente, EGF es un receptor de las células foliculares somáticas y GRK es su ligando, la activación de la señalización, en estas células, le da un destino celular dorsal.

Otro resultado que merece ser remarcado es la ausencia de *dl*, en *T. dimidiata* y *T. pallidipennis* y la presencia de los genes que se expresan a partir de la regulación a cargo de DL, como *sna*, *twi*, *rho*, entre otros.

Para mayor información acerca de la función de cada uno de los genes que se expresan durante este proceso, Interactive Fly <http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm>

#### **4.2.2.3 Segmentación antero-posterior.**

A partir del estudio fundamental de Lewis (Lewis, 1978) y el rastreo genético de Nüsslein-Volhard y Wieschaus (Nüsslein-Volhard *et al.*, 1980) fue posible estudiar en detalle el proceso de segmentación e identificar qué genes específicos están involucrados en el establecimiento del patrón corporal de *D. melanogaster*.

La polaridad anteroposterior del embrión, de la larva y del adulto en *D. melanogaster* tiene su origen en la polaridad anteroposterior del gameto femenino. Las células nodrizas del ovario depositan ARN mensajero, de origen materno, en el ovocito en desarrollo; son colocados en diferentes regiones del gameto femenino, y codifican

proteínas reguladoras de la transcripción y de la traducción que difunden a través del blastodermo sincitial y activan o reprimen la expresión de ciertos genes cigóticos.

Estos ARN mensajeros son críticos para la formación del eje anteroposterior, por un lado encontramos a los ARN mensajeros de *bicoid* (*bcd*) y *hunchback* (*hb*) cuyos productos proteicos son fundamentales para la formación de la cabeza y el tórax, y por otro lado, los ARN mensajeros de *nanos* (*nos*) y *caudal* (*cad*), cuyos productos proteicos son necesarios para la formación de los segmentos abdominales. El ARN mensajero de *bcd* se encuentra localizado en la región anterior del gameto femenino sin fecundar, amarrado con microtúbulos anteriores, el ARN mensajero de *nos* por su parte se encuentra en la región posterior; los de *cad* y *hb* se encuentran distribuidos por todo el ovocito. Tras la fecundación, estos ARN mensajeros son traducidos a proteínas.

En el polo anterior, *bicoid* es traducido a la proteína BICOID (BCD), que forma un gradiente que es más elevado en la región anterior. Esta proteína inhibe la traducción del ARN mensajero de *cad*, por lo tanto esta proteína es sintetizada únicamente en la región posterior del embrión y actúa en la especificación de los dominios de esta región (Xu *et al.*, 1998; Rivera-Pomar *et al.*, 1996; Niessing *et al.*, 2000) Además BCD funciona como un factor de transcripción donde ingresa en los núcleos de los embriones en segmentación temprana y activa al gen *hb* (Driever *et al.*, 1989). HB es un factor de transcripción que reprime los genes específicos del abdomen, permitiendo de este modo que la región de expresión de HB forme la cabeza y tórax, por lo que también actúa para generar el patrón anterior del embrión.

El polo posterior, es definido por las actividades del gen *nos* (Lehmann *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1991; Wharton *et al.*, 1991). El mensajero de *nos* está inactivo en el ovocito sin fecundar debido a que se encuentra reprimido por la unión de la proteína

SMAUG a su extremo 3'UTR (Smibert *et al.*, 1996), pero tras la fecundación se elimina la represión y la proteína puede ser sintetizada, estableciendo un gradiente que es más elevado en la región posterior. Se une a PUMILIO, y deadenila el ARN mensajero de *hb*, evitando su traducción (Barker *et al.*, 1992; Wreden *et al.*, 1997).

Además de estos morfógenos anteriores y posteriores, hay un tercer grupo de genes maternos cuyas proteínas generan las extremidades no segmentadas del eje anteroposterior: el acron y el telson. El gen crítico en este sistema es *torso* (*tor*), que codifica para un receptor tirosina quinasa (Casanova *et al.*, 1989). Esta proteína es activada por las células foliculares en los dos polos del ovocito y lleva a que los productos finales de la misma difundan hacia el citoplasma en los extremos del embrión (Gabay *et al.*, 1997). Se piensa que estas quinasas inactivan a la proteína GROUCHO (GRO), inhibidor transcripcional de los genes *tailless* (*tll*) y *huckebein* (*hkb*), genes *gap* que especifican los terminales del embrión. La distinción entre terminal anterior y posterior depende de la presencia de BCD, si *tll* y *hkb* actúan solos, la región terminal se diferencia a telson, cuando BCD está presente, la región terminal forma un acron (Paroush *et al.*, 1997; Pignoni *et al.*, 1992).

En la siguiente etapa en el desarrollo los gradientes de estos factores de transcripción actúan para activar los genes específicos a lo largo del eje anteroposterior. Estos son los genes de segmentación que dividen al embrión temprano en una serie repetida de primordios de segmentación a lo largo del eje anteroposterior, llamado parasegmentos. Estos no llegan a convertirse en los segmentos de la larva o del adulto; en su lugar, incluyen la parte posterior de un segmento anterior y la parte anterior del segmento que se encuentra detrás de este (Martínez-Arias *et al.*, 1985).

Hay tres clases de genes de segmentación y se expresan secuencialmente (ver Figura 2, sección 1.2). En primer lugar los genes maternos actúan sobre el gen cigótico *gap*. Los patrones de transcripción de los genes *gap* anteriores son iniciados por las diferentes concentraciones de las proteínas HB y BCD. Los altos niveles de HB inducen la expresión del gen *giant* (*gt*), mientras que el transcripto de *krüppel* (*kr*) aparece sobre la región donde HB comienza disminuir. El gradiente de la proteína CAD, más alto en el polo posterior, es responsable de la activación de los genes *gap* abdominales *knirps* (*kni*) y *gt* en la parte posterior del embrión. El gen *gt* por lo tanto tiene dos métodos para su activación, uno para su banda de expresión anterior y uno para su banda de expresión posterior (Rivera-Pomar *et al.*, 1995; Schulz *et al.*, 1995).

Después de que estos patrones han sido establecidos, la expresión de cada gen *gap* es estabilizada y mantenida por interacciones entre los diferentes productos de sus genes en límites definidos. Las interacciones se ven favorecidas por el hecho de que se producen dentro de un entorno sincitial.

Diferentes concentraciones de las proteínas de los genes *gap* causan la transcripción de los genes *pair-rule* (regla de los pares), que dividen al embrión en unidades periódicas, que son precursoras del plan segmentario del cuerpo. Se dividen en dos tipos, primarios que son los que están controlados por las proteínas del gen *gap* y secundarios que están regulados por los gen *gap* primarios.

La transcripción de los diferentes genes *pair-rule* resulta en un patrón en franjas de 7 bandas verticales perpendiculares al eje anteroposterior, se expresan de tal manera que dan como resultado un patrón de “bandas de cebra”. En estas bandas no todos los núcleos expresan los mismos genes, por lo que en cada hilera hay una combinación única y patricular de los genes *pair-rule* (Hafen *et al.*, 1984).

Las proteínas del gen *pair-rule* activan la transcripción de los genes de polaridad de segmentos; estos actúan dentro de un entorno celularizado y sus productos de ARN mensajero y proteína dividen al embrión en 14 unidades segmentarias extensas, estableciendo la periodicidad del embrión y los destinos celulares dentro de cada parasegmento.

Luego que los límites segmentarios han sido establecidos, las estructuras características de cada segmento son especificadas. Esta es llevada a cabo por los genes selectores homeóticos, los cuales se establecen en dos complejos; el *Antennapedia*, compuesto por los genes, *labial (lab)*, *antennapedia (Antp)*, *sex combs reduced (scr)*, *deformed (dfd)* y *proboscopedia (pb)*, que son responsables de las identidades segmentarias de la cabeza y torác, y el *bithorax* formado por *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal A (abdA)*, *Abdominal B (AbdB)*, responsables de las identidades de los segmentos abdominales (Lewis, 1978).

El dominio inicial de expresión del gen homeótico está influido por los genes *gap* y los genes *pair-rule*. Funcionan mediante la activación o represión de un grupo de “genes realizadores”, aquellos genes que son el blanco de interés de las proteínas de los genes homeóticos y que funcionan para formar los tejidos específicos o los primordios de los órganos.

Los genes correspondientes al proceso anteroposterior se muestran en la Tabla 9.

<b>Tabla 9:</b> Genes de la segmentación anteroposterior identificados en triatomos. Referencias: <i>R. prolixus</i> (RP), <i>T. dimidiata</i> (TDIM), <i>T. infestans</i> (TINF) y <i>T. pallidipennis</i> (TPAL).			
<b>RP</b>	<b>TDIM</b>	<b>TINF</b>	<b>TPAL</b>
<b>Maternos</b>			
nanos			nanos
Hunchback	Hunchback	Hunchback	Hunchback
caudal	caudal	caudal	
torso	torso	torso	torso
<b>Gap</b>			
Krüppel	Krüppel	Krüppel	Krüppel
giant	giant	giant	
tailless	tailless		
Hunchback	Hunchback	Hunchback	Hunchback
huckebein	huckebein	huckebein	huckebein
buttonhead	buttonhead	buttonhead	buttonhead
empty spiracles	empty spiracles	empty spiracles	
knot		knot	
crocodile	crocodile		crocodile
degringolade	degringolade		
Paired	Paired	Paired	
Tenascin major	Tenascin major	Tenascin major	Tenascin major
<b>Pair-rule</b>			
even skipped	even skipped		
Hairy		Hairy	Hairy
odd skipped	odd skipped	odd skipped	odd skipped
Paired	Paired	Paired	
runt			
odd paired	odd paired		odd paired
sloppy paired 1	sloppy paired 1		sloppy paired 1
degringolade	degringolade		
<b>Polaridad de segmento</b>			
cubitus interruptus	cubitus interruptus	cubitus interruptus	cubitus interruptus
Hedgehog	Hedgehog	Hedgehog	Hedgehog
wingless	wingless	wingless	
Fused	Fused	Fused	Fused
armadillo		armadillo	armadillo
decapentaplegic	decapentaplegic	decapentaplegic	decapentaplegic
mirror			mirror
engrailed	engrailed	engrailed	
smoothened	smoothened	smoothened	
rasp	rasp		
tout-velu	tout-velu	tout-velu	tout-velu
	pangolín		
<b>(A la página siguiente)</b>			

**Tabla 1:** Genes de la segmentación anteroposterior identificados en triatominos. Referencias: *R. prolixus* (RP), *T. dimidiata* (TDIM), *T. infestans* (TINF) y *T. pallidipennis* (TPAL). **(Continuación).**

RP	TDIM	TINF	TPAL
<b>Terminales</b>			
tailless	tailless		
huckebein	huckebein	huckebein	huckebein
torso	torso	torso	torso
torso-like			
capicúa	capicúa		capicúa
corkscrew	corkscrew	corkscrew	corkscrew
pole hole	pole hole	pole hole	pole hole
rolled	rolled	rolled	rolled

En lo que respecta a los genes maternos, como cabía esperar, no se pudo identificar en ninguno de los triatominos el gen *bcd*, así como tampoco se identificó a *cad* en *T. pallidipennis* y *nos* en *T. dimidiata* y *T. infestans*. En la siguiente línea de genes que actúan en el desarrollo, los genes *gap*, fue llamativo no encontrar en *T. pallidipennis* al gen *gt*. Dentro de los genes *pair-rule* primarios, *hairy* (*h*) no se pudo identificar en el transcriptoma de *T. infestans*; *even-skipped* (*eve*), tampoco pudo ser identificado, en este caso en *T. pallidipennis*; y *runt* (*run*) no se lo encontró en ninguna de las tres especies del género *Triatoma*.

Los principales genes de polaridad de segmentos fueron identificados en las cuatro especies de triatominos; y los genes homeóticos, de identidad de segmentos, no fueron incluidos en este análisis debido a que están siendo analizados por la Lic. Natalia Esponda como parte de su tesis doctoral en el Centro Regional de Estudios Genómicos, UNLP.

En cuanto a los genes terminales, el gen clave en el desarrollo de estos polos es *tor*, el cual fue identificado en las cuatro especies de triatominos.

Para una caracterización absoluta de la función de cada uno de los genes identificados, Interactivw Fly <http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm>

#### **4.2.2.4 Desarrollo de tráqueas.**

Un objetivo importante en la biología del desarrollo es definir los principios de los patrones y los programas moleculares que gobiernan la formación de los órganos. Los órganos más comunes en cuanto a su estructura son los formados por una red tubular ramificada, tal caso lo encontramos en el pulmón, riñón y sistema vascular en vertebrados. Cada uno de estos sistemas transporta un gas esencial o fluido corporal, y para lograr este cometido los tubos constituyentes siguen un patrón de ramificación, así como también una forma y tamaño característico.

El estudio en mamíferos se dificulta por diferentes razones, principalmente porque presenta estructuras que son demasiado complejas, sumado a que no se identificaron marcadores celulares que permitan seguir su desarrollo.

Ante esto, el sistema traqueal de *D. melanogaster*, con su estructura simple y genética accesible, surgió como un paradigma de la morfogénesis de la ramificación y permitió resolver algunos interrogantes sobre el proceso.

El desarrollo del sistema traqueal en *D. melanogaster* comienza aproximadamente a las 4 hs luego de la fertilización del ovocito, estableciéndose una red interconectada de tubos durante la embriogénesis. Esta red se convierte en funcional a comienzos del primer estadio larval y se ramifica de manera notable durante el segundo y tercer estadio larval, acompañando al incremento del tamaño corporal de la larva. Finalmente, en el

estado de pupa es reconstruida para adquirir el patrón final del adulto (Ghabrial *et al.*, 2003)

El sistema traqueal embrionario de *D. melanogaster* es una red tubular epitelial que se forma a partir de 20 *clusters* de 90 células ectodérmicas precursoras. Cada *cluster*, también llamado placoda, se establece simétricamente a ambos lados del embrión desde el segmento torácico dos hasta el segmento abdominal ocho (Samakovlis *et al.*, 1996). La participación del factor de transcripción *tracheiless* (*trh*) es fundamental para determinar el destino de las células precursoras en células traqueales y para regular los genes *downstream* que median el desarrollo traqueal (Isaac *et al.*, 1996; Wilk *et al.*, 1996). A las 5hs post puesta, cada placoda se invagina y forman los sacos traqueales, que son las primeras estructuras tipo tubo que se originan; cada invaginación se cierra en la superficie del ectodermo y forma un saco epitelial elongado, conectando el saco con la superficie se encuentra una estructura denominada espiráculo; la apertura de la tráquea.

Se alcanza un estado en el que en el sistema traqueal embrionario no se detecta proliferación celular, muerte celular o cambios en el número celular. Pasadas las 7hs de la puesta, desde el saco traqueal comienzan a generarse las seis ramas primarias del sistema traqueal, en posiciones estereotipadas. En cada sitio donde brota una rama, células traqueales migran fuera del saco, organizándose en estructura tubular. Luego del periodo de extensión, la mayoría de ellas se encuentran y se fusionan con ramas que surgen de hemisegmentos contra laterales y de segmentos adyacentes, para generar una red continua e interconectada de tubos tipo epiteliales (Samakovlis *et al.*, 1996).

Los genes que especifican la ramificación primaria son *breathless* (*btl*) y *branchless* (*bnl*), los cuales son receptor y ligando de la vía de señalización de FGF

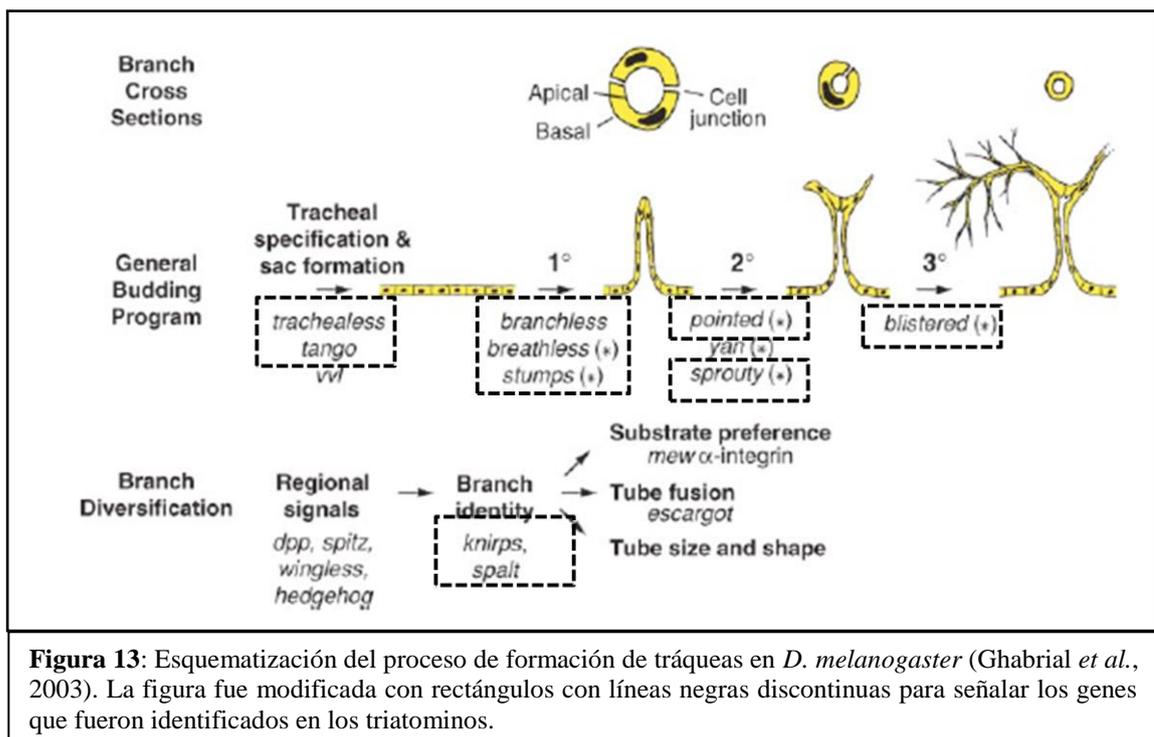
respectivamente; permiten la migración celular y formación de la rama principal (Glazer *et al.*, 1991). Bajo la regulación de TRH, las células precursoras traqueales expresan *btl*; (Glazer *et al.*, 1991; Klambt *et al.*, 1992; Reichman-Fried *et al.*, 1995) por fuera de la tráquea, en el tejido blanco, BNL actúa como un quimiotractante de las células traqueales (Sutherland *et al.*, 1996). Una vez que las células precursoras traqueales se encontraron con las células BNL-positivas, estas dejan de expresar *bnl*, y comienza a expresarse en células más alejadas, en el sentido de crecimiento de la rama; esto se repite varias veces permitiendo la extensión y una continua elongación de las ramas traqueales (Sutherland *et al.*, 1996).

La activación de esta vía lleva, entre otras cosas, a la inducción de la expresión génica en las células traqueales en inmediata migración, favoreciendo la misma; así como también a la inducción de la expresión de los genes que participan en la ramificación secundaria, los encargados de dar inicio del próximo paso en el desarrollo traqueal.

No todas las células que reciben la señalización a cargo de la cascada de FGF van a formar ramas secundarias, ya que esta misma señalización activa la expresión de genes que actúan limitando la ramificación secundaria, uno de ellos es *sprouty*; actúa restringiendo la formación de rama secundaria y terminal solo en las células más cercanas a los centros de señalización de FGF (Ghabrial *et al.*, 2003).

La formación de la rama secundaria se da a partir de células traqueales individuales, a las 11hs post puesta y a partir de las 13 hs comienzan a surgir las ramas terminales. Las células traqueales terminales, también conocidas como células traqueolares (Chapman, 1998), son las únicas que tienen la capacidad de producir extensiones citoplasmáticas, que crecen a lo largo de la superficie del tejido blanco con el objetivo

de suministrarle oxígeno al mismo (Harrison, 2003). Estas extensiones se caracterizan por tener una estructura celular extremadamente fina, con pocas estructuras de unión a lo largo de la longitud de la rama. A diferencia del establecimiento del patrón traqueal anterior, la ramificación es muy variable y se encuentra regulada por las necesidades de oxígeno en el tejido (como la angiogénesis en mamíferos). Cuando existe un déficit de oxígeno (hipoxia) en el tejido, se estimula la formación de las ramas terminales. Los genes que participan en el sensado del oxígeno son *HIF prolyl hydroxylase (Hph)* y *similar (sima)* (Centanin *et al.*, 2009). En la Figura 13 se esquematiza el proceso de formación de las ramas traqueales.



**Figura 13:** Esquemización del proceso de formación de tráqueas en *D. melanogaster* (Ghabrial *et al.*, 2003). La figura fue modificada con rectángulos con líneas negras discontinuas para señalar los genes que fueron identificados en los triatomos.

Como resultado obtuvimos que dentro de los genes claves y fundamentales para el desarrollo de tráqueas, el gen *trh* no pudo ser identificado en los transcriptomas de *T.*

*dimidiata* y *T. infestans*. El ligando de la cascada de señalización FGF, BNL, sólo se lo identificó en *R. prolixus* y en *T. dimidiata*. No se encontró en el genoma de *R. prolixus*, uno de los sensores del oxígeno: *Hph*, pero si se encontró el factor inducible por hipoxia *sima*, y fue en la única especie donde fue identificado. En ninguno de los triatominos se encontró *von Hippel-Lindau* que codifica para una proteína que funciona como una ligasa de ubiquitina (E3) donde el blanco de su acción es la subunidad  $\alpha$  del factor inducible por hipoxia SIMA (Tabla 10).

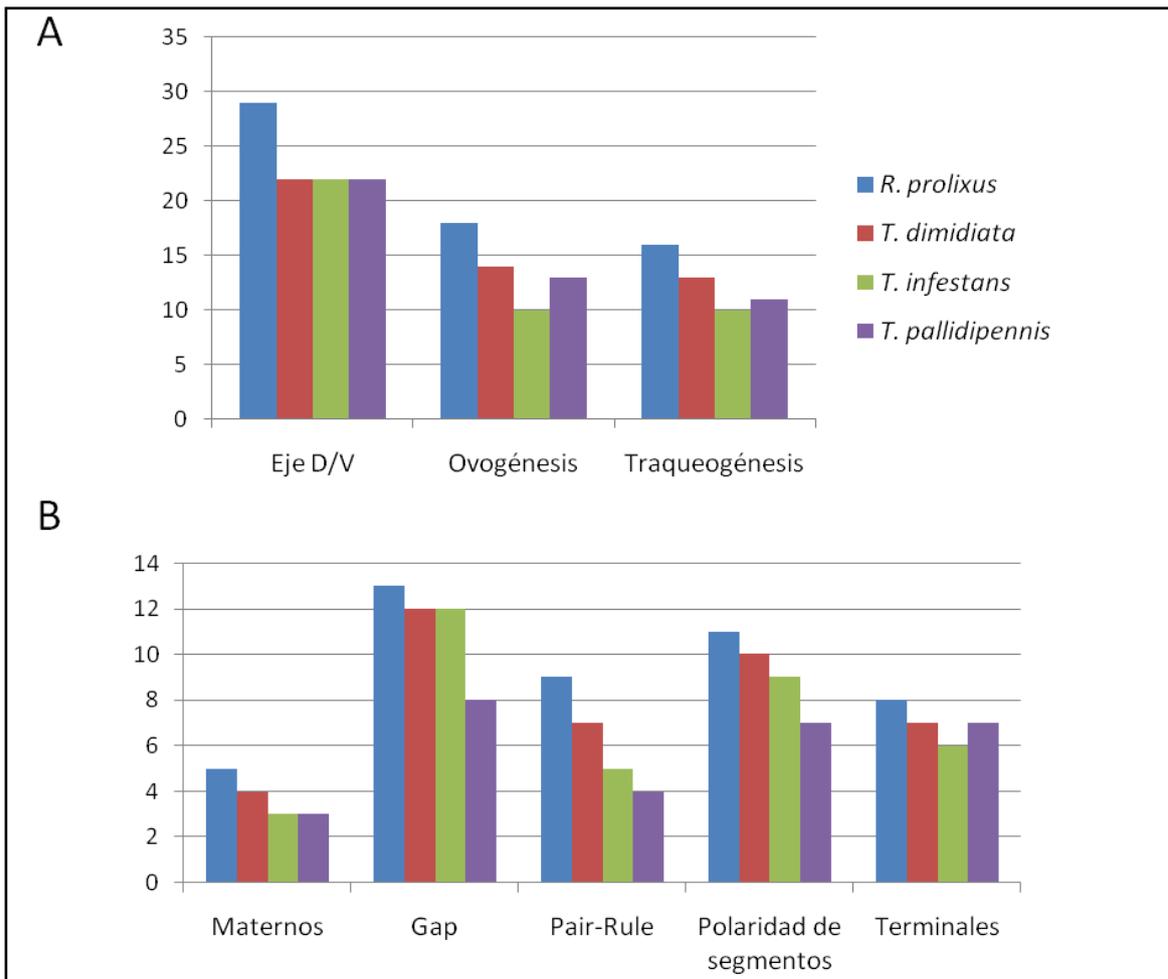
<b>Tabla 10:</b> Genes del sistema traqueal identificados en triatominos. Referencias: <i>R. prolixus</i> (RP), <i>T. dimidiata</i> (TDIM), <i>T. infestans</i> (TINF) y <i>T. pallidipennis</i> (TPAL).			
<b>Desarrollo de Tráqueas</b>			
<b>RP</b>	<b>TDIM</b>	<b>TINF</b>	<b>TPAL</b>
trachealess			trachealess
Breathless	breathless	breathless	breathless
Sima			
Branchless	branchless		
	HIF prolyl hydroxylase	HIF prolyl hydroxylase	HIF prolyl hydroxylase
Spalt	spalt	spalt	spalt
ventral veins lacking	ventral veins lacking		
Stumps			
Thickveins	thickveins	thickveins	thickveins
Tango			tango
Pointed	pointed	pointed	pointed
Rhomboid	rhomboid	rhomboid	rhomboid
Corkscrew	corkscrew	corkscrew	corkscrew
Blistered		blistered	
Ribbon	ribbon	ribbon	ribbon
Sprouty	sprouty		
	pebbled		

Ante la llamativa ausencia de *Hph* en *Rhodnius prolixus* pero su presencia en los demás triatominos se decidió realizar una búsqueda manual en el Vector Base y ante una búsqueda de similitud de secuencia (BLAST) se pudo encontrar en esta base de

datos *online* un transcripto con la identificación de RPTMP01803 que presentaba una alta similitud de secuencia con *Hph*. Si bien no esta abierta la anotación de genes en *R. prolixus*, nuestro trabajo comparativo permitió identificar un transcripto desconocido y no anotado en el genoma de *R. prolixus*, el cual se incorpora a este trabajo final para análisis posteriores.

Para mayor información acerca de la función de cada uno de los genes que se expresan durante este sistema ver, Interactive Fly <http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm>

Para visualizar los datos obtenidos para cada uno de los procesos analizados en las cuatro especies de triatomíneos se realizó un gráfico de barras comparando las identidades obtenidas para complementar el análisis realizado (Figura 14 A y B).



**Figura 14:** **A.** Gráfico de barra que compara las identidades obtenidas en las 4 especies de triatominos en los procesos de establecimiento del eje dorsoventral, ovogénesis y traqueogénesis. **B.** Gráfico de barra que compara las identidades obtenidas en las cuatro especies de triatominos en la segmentación anteroposterior del embrión. Para ambos casos, sobre el eje de las x se puede observar los diferentes procesos y sobre el eje de las y la cantidad de identidades encontradas para cada proceso en cada especie.

Para lograr una cobertura más específica sería necesario realizar un ensamble *de novo* o una secuenciación masiva utilizando otra tecnología como lo es la plataforma de Illumina Hiseq2000. Esta permite obtener lecturas con una longitud promedio de 100pb, mucho menor que las obtenidas con la tecnología 454 que son de 800-1000pb, con un alto nivel de precisión a nivel de secuencia ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)), lo que podría permitir darle identidad de *isotigs* a varios de los *singletons* generados previamente con la plataforma de Roche.

Ante esta situación, en nuestro laboratorio se está llevando a cabo una segunda secuenciación de los transcriptomas con la plataforma de Illumina, lo que generaría nueva información que permitirá darle más peso a la obtenida previamente. Se espera que el número de genomas y transcriptomas secuenciados continúe creciendo exponencialmente en los próximos años.

### **4.3 Validación.**

A partir de los datos identificados se prosiguió con la validación experimental y funcional del proceso de desarrollo de tráqueas, en *R. prolixus*. Se eligió este sistema porque no se encuentra estudiado con detalle en otros insectos, con excepción de *D. melanogaster*, y porque presenta fenotipos que son fáciles de observar.

Los genes que participan—en este proceso en *D. melanogaster* que fueron seleccionados: *tracheiless*, *breathless*, *similar* y *HIF prolyl hydroxylase*.

- ***Tracheiless*:**

*Tracheiless* (*trh*) junto al gen *tango* (*tgo*) establecen un factor de transcripción heterodímero que tiene una participación central en el sistema traqueal. *trh* codifica para un dominio bHLH-PAS y se expresa en todas las células traqueales. La activación de este gen en las células precursoras traqueales es justo antes de que estas reciban las primeras señales morfológicas de su especialización y son los genes de segmentación *domeless* (*dome*) y *stat92E* los encargados de dar inicio a esta expresión (Isaac *et al.*, 1996; Wilk *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002). *Tgo*, la otra subunidad del factor, codifica también para un dominio bHLH-PAS pero su expresión no es específica de tráqueas.

*trh* juega un rol clave en la invaginación de las placodas para dar origen al sistema tubular traqueal, así como también induce la expresión de genes traqueales necesarios para continuar el desarrollo de las ramas del sistema, entre los más importante se encuentra *rhomboid* (*rho*), un activador de la vía de señalización EGF (Factores de crecimiento epidérmico) que es requerido para una completa invaginación, y *breathless* (*btl*) que es necesario para la ramificación primaria, el siguiente paso en el desarrollo del sistema traqueal (Llimargas *et al.*, 1999; Wilk *et al.*, 1996; Ohshiro *et al.*, 1997; Boube *et al.*, 2000).

- ***Breathless:***

En *Drosophila* es homólogo al receptor de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Glazer *et al.*, 1991; Klambt *et al.*, 1992). Es un receptor tirosina quinasa que contiene la estructura típica y los dominios funcionales de la familia de receptores FGF.

Es el receptor de la vía de señalización FGF que en el sistema traqueal se activa tanto para especificar la primera rama traqueal, como para inducir la migración traqueolar a tejidos con déficit de oxígeno. La cascada de activación induce la expresión de numerosos genes necesarios para el crecimiento de las ramas traqueales, tanto para una ramificación primaria como secundaria, así como también de genes que actúan limitando la señalización solo en las células más cercanas al centro de expresión de los genes ligando y receptor de la vía (Reichman-Fried *et al.*, 1994; Reichman-Fried *et al.*, 1995; Ghabrial *et al.*, 2003).

- ***Similar:***

*Similar* codifica para la subunidad  $\alpha$  del factor de transcripción HIF (factor inducible por hipoxia), la subunidad  $\beta$  es codificada por el gen *tgo* (Nagao *et al.*, 1996;Adryan *et al.*, 2000;Bruick *et al.*, 2001;Lavista-Llanos *et al.*, 2002). Mientras que la subunidad  $\beta$  se expresa de manera constitutiva, la subunidad  $\alpha$  se encuentra regulada por los niveles de oxígeno celular. En condiciones de normoxia, la subunidad  $\alpha$  es hidroxilada, lo que permite que sea ubiquitinizada y degradada por el proteosoma. En condiciones de hipoxia, la subunidad permanece estable, lo que le permite activar genes blanco para revertir esta situación, como lo son los genes de la vía glicolítica, factores angiogénicos y genes que sirven para restaurar el balance del oxígeno. Entre estos genes se encuentra *bnl*, el ligando de la vía de señalización FGF, que se une al receptor y promueve la migración de las ramas traqueales al tejido deficitario (Ghabrial *et al.*, 2003).

- ***HIF prolyl hydroxylase:***

Es un gen que codifica para una enzima citoplasmática que se encarga de censar la concentración de oxígeno en los tejidos. Esta enzima es una hidroxilasa que hidroxila la subunidad  $\alpha$  (SIMA) del factor inducible por hipoxia, promoviendo su degradación proteosomal en condiciones de normoxia (Acevedo *et al.*, 2010). Se encuentra inactiva bajo condiciones de hipoxia, lo que permite que el factor de transcripción HIF se acumule y active sus genes blanco(Ghabrial *et al.*, 2003).

### 4.3.1 Análisis evolutivo de los genes traqueales.

Para complementar la identificación de los genes que participan en la traqueogénesis, se llevó a cabo un análisis filogenético de los mismos. En un primer lugar se estableció un alineamiento múltiple con genes ya identificados en otras especies, a partir de un BLAST, y se analizó la similitud de las secuencias proteicas de cada uno de estos genes estudiados. El alineamiento múltiple de secuencias de proteínas es una herramienta que permite detectar homologías entre distintas secuencias. Con la información generada por dichos alineamientos se generaron árboles filogenéticos, mediante el algoritmo bayesiano, para permitir una visualización más clara de dichas homologías.

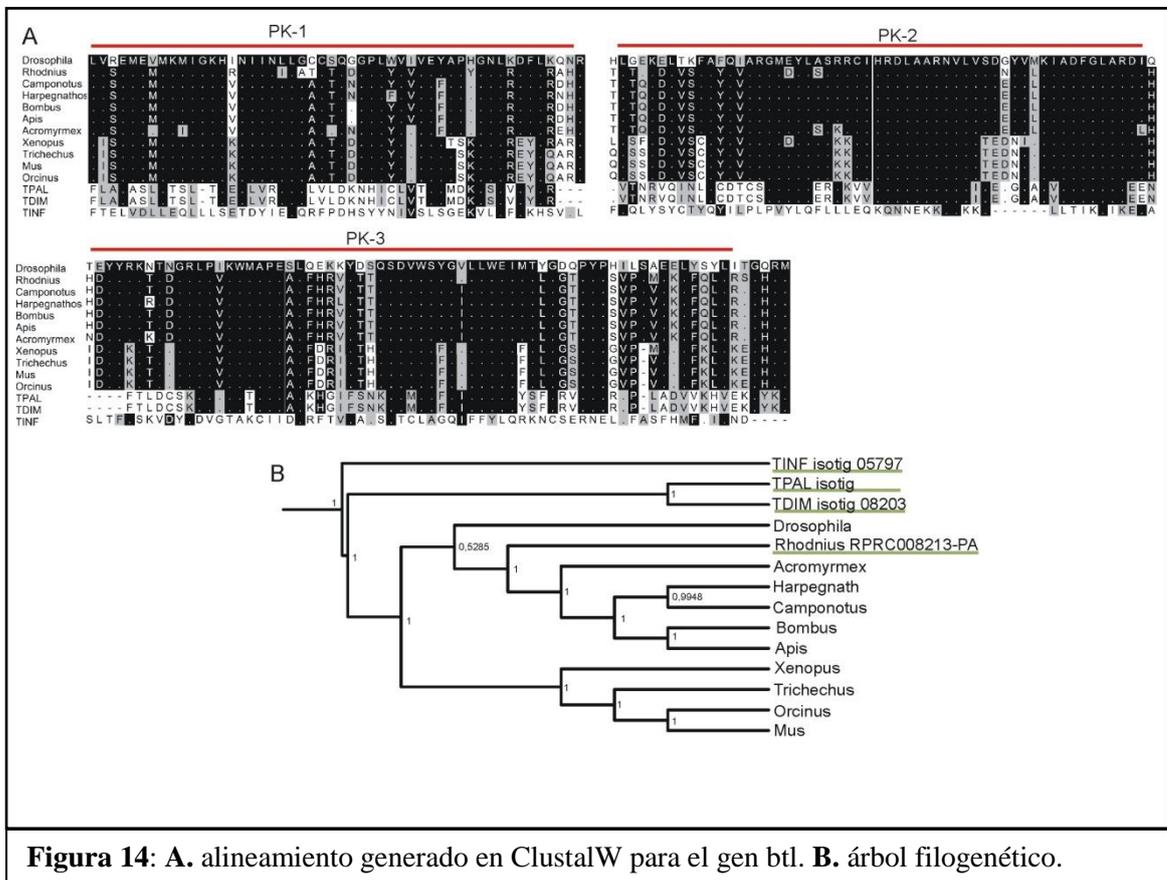
#### 4.3.1.1 *Breathless.*

En el alineamiento múltiple realizado en ClustalW para el gen *breathless* (*bt1*) se incluyeron secuencias de *Acromyrmex echinator* (hormiga), *Camponotus floridanus* (hormiga), *Harpegnathos saltator* (hormiga), *Apis florea* (Abeja) (PREDICTED), *Bombus terrestris* (Abejorro) (PREDICTED), *Mus musculus* (ratón), *Xenopus laevis* (rana), *Trichechus manatus* (manatí) (PREDICTED), *D. melanogaster* (mosca de la fruta) (isoforma B) y *Orcinus orca* (orca) (PREDICTED) más las cuatro identidades obtenidas tras el análisis por búsqueda de similitud de secuencia en los triatomíneos. Como se ve en la figura 14 A se conservan los 3 dominios intracelulares con actividad quinasa característicos de estos tipos de receptores (InterProScan-ebi).

En el árbol generado para el gen *breathless* (Figura 14 B) se puede ver claramente como el análisis separa *Triatoma infestans* del resto de todas las especies incluidas en el análisis. Estas últimas forman un grupo parafilético donde *T. pallidipennis* y *T. dimidiata* se encuentran más alejadas evolutivamente que el resto de las especies, y más

relacionadas entre ellas. Los tres triatomíneos, *T. pallidipennis*, *T. dimidiatay* *T. infestans*, se ubican alejados evolutivamente tanto de los holometábolos (*A. echinator*, *C. floridanus*, *H. saltator*, *A. florea*, *B. terrestres*, *D. melanogaster*) como del hemimetábolo *R. prolixus*.

*R. prolixus* se encuentra más relacionado con los himeinópteros *A. echinator*, *C. floridanus*, *H. saltator*, *A. florea* (PREDICTED) y *B. terrestris* (PREDICTED). Dentro de este grupo parafilético los vertebrados *M. musculus*, *T. manatus*, *X. laevis* y *O orca*, forman un clado separado de los invertebrados.



**Figura 14:** A. alineamiento generado en ClustalW para el gen *btl*. B. árbol filogenético.

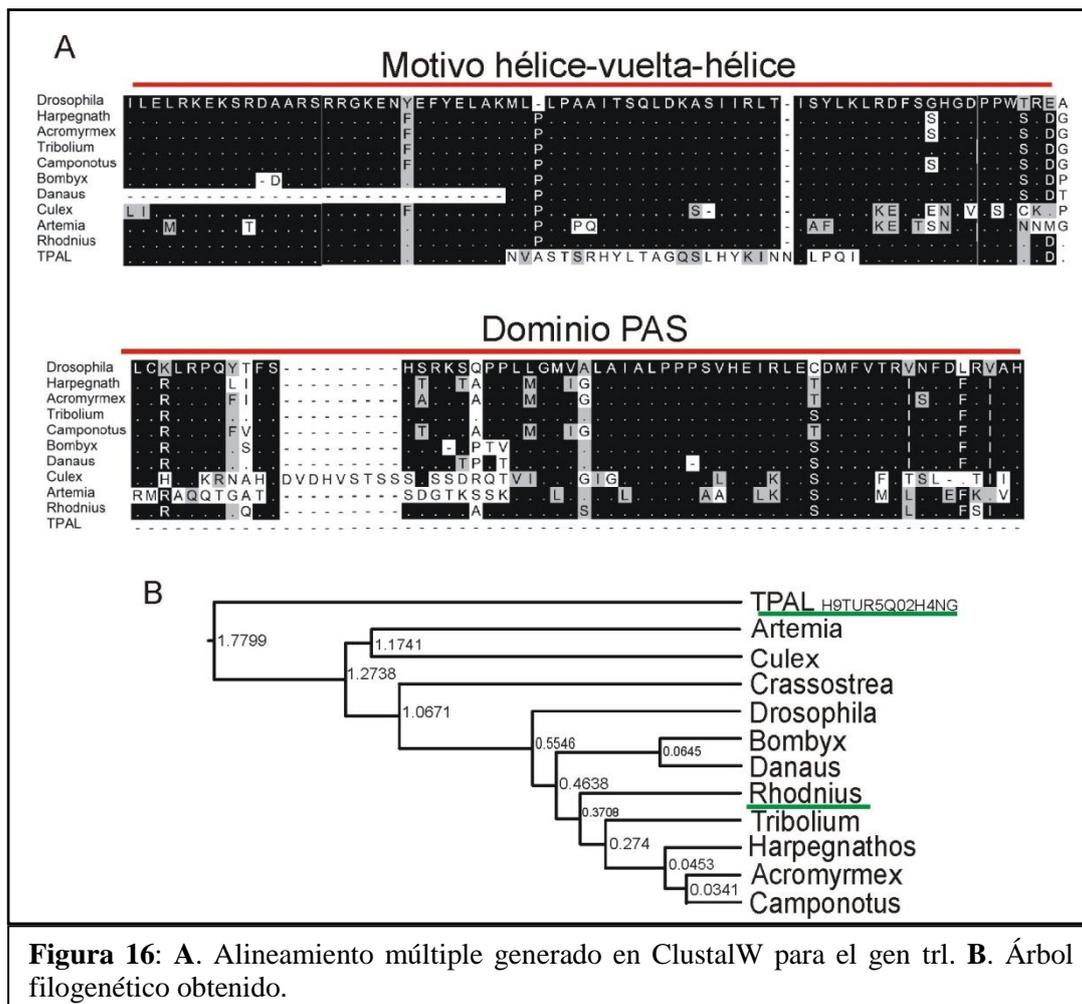
#### 4.3.1.2 *HIF prolyl hydroxylase*.

El alineamiento múltiple generado para el gen *HIF prolyl hydroxylase* (*Hph*), se formó con las secuencias proteicas de *Tribolium castaneum* (falso gorgojo), *Trichoplax*



identificadas en *Rhodnius prolixus* y en *Triatoma pallidipennis*. Tras la salida obtenida de ClustalW, se pudieron encontrar dos dominios conservados característicos de este tipo de proteína, el dominio PAS y el dominio con motivo hélice-vuelta-hélice (InterProScan-ebi). (Figura 16 A) Sólo en *R. prolixus* se observaron los dos dominios característicos, en *T. pallidipennis* se vio el dominio con motivo hélice-vuelta-hélice.

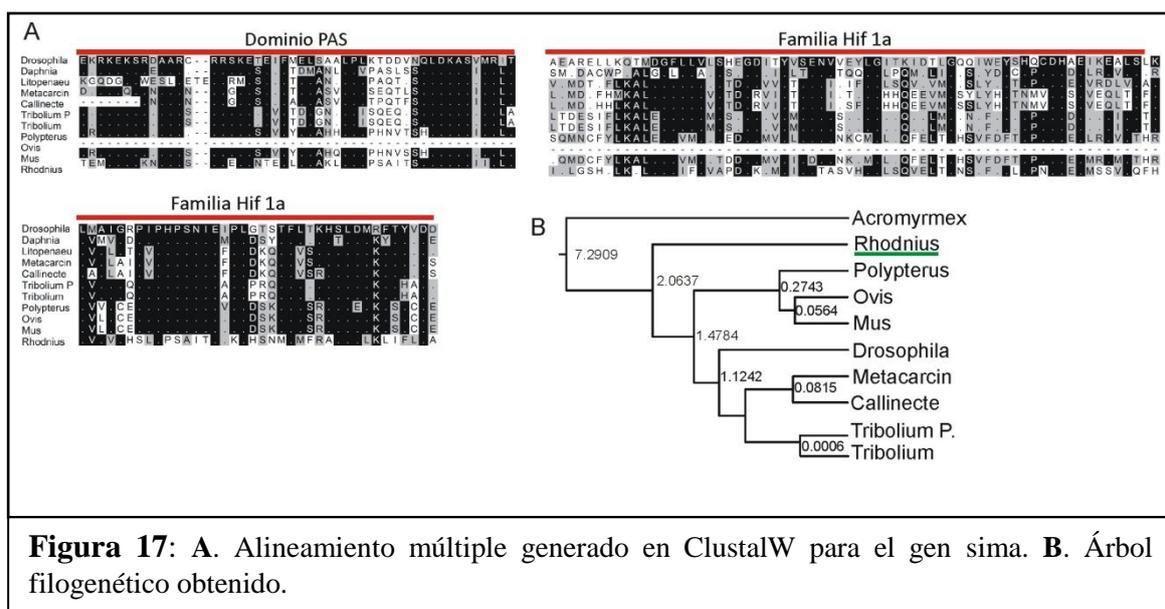
El árbol obtenido (Figura 16 B) muestra a *T. pallidipennis* alejada evolutivamente de las restantes especies incluidas en este análisis, ya que el árbol presenta una división principal que la separa, lo que resultó inesperado. *R. prolixus* se ubica más cerca de los himenópteros *H. saltator*, *A. echinator* y *C. floridanus* y del coleóptero *T. castaneum*. Algo llamativo fue que los dípteros, *H. saltator*, *A. echinator*, *C. floridanus*, *D. melanogaster* y *C. quinquefasciatus*, no fueron ubicados dentro de un mismo grupo.



#### 4.3.1.4 Similar.

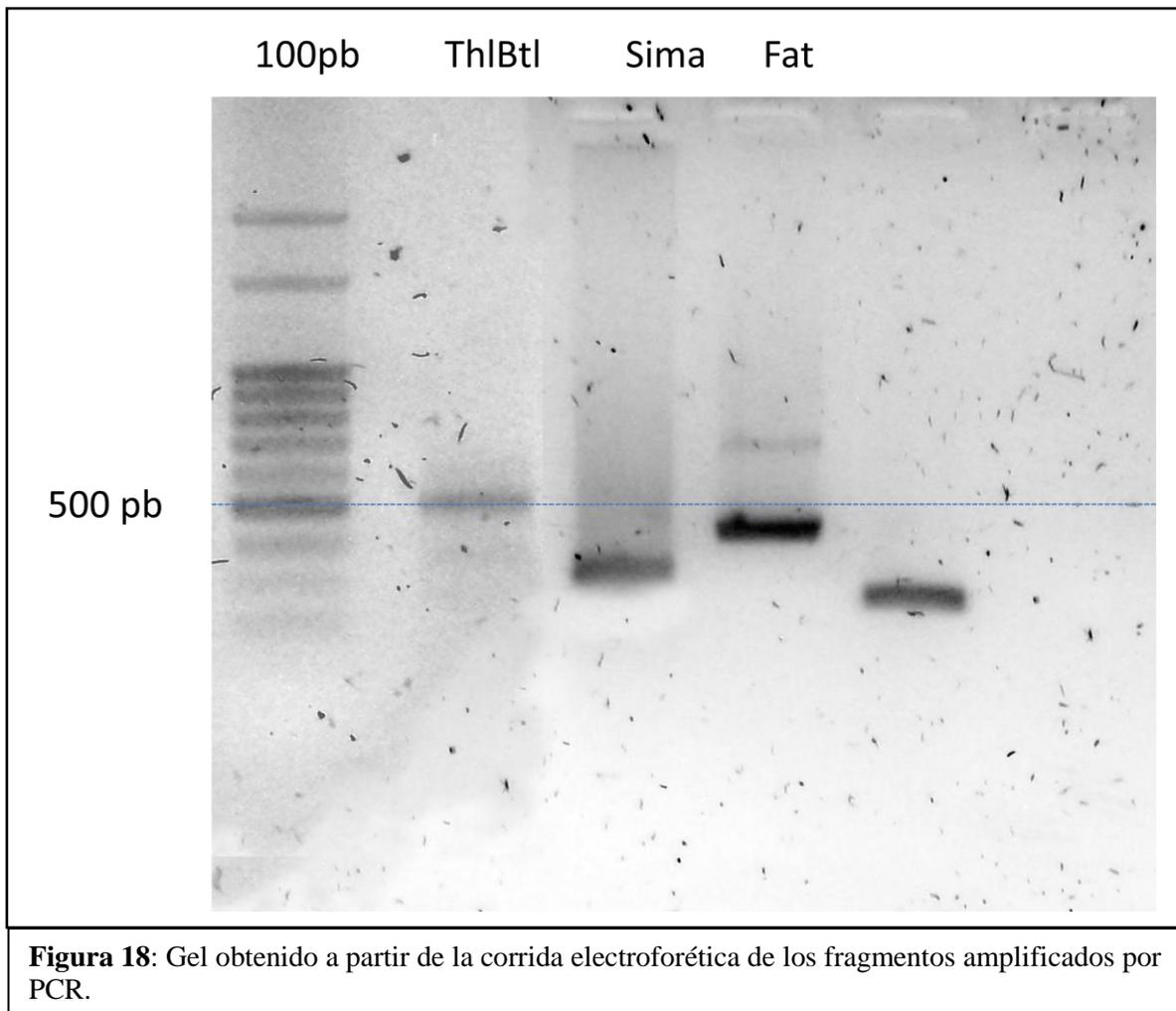
El alineamiento múltiple se llevó a cabo a partir de las secuencias proteicas del gen *similar* de *Tribolium castaneum* (PREDICTED), *Tribolium castaneum*, *Metacarcinus magister* (crustáceo), *Callinectes sapidus* (crustáceo), *D. melanogaster*, *Polypterus senegalus* (pez), *Ovis ammon* (muflón), *Acromyrmex echinator*, *Mus musculus* y *Rhodnius prolixus*, único triatomino encontrado en el análisis de similitud de secuencia realizado en este trabajo. Se pudo observar a partir de la salida del ClustalW que entre las secuencias utilizadas se conservan dos dominios característicos de este tipo de proteínas, el dominio PAS y el dominio de la familia de Hif 1 $\alpha$  (InterProScan-ebi) (Figura 17 A).

El árbol obtenido tras el alineamiento (Figura 17 B) muestra una división principal que separa a *A. echinator* del resto de las especies incluidas en el análisis, que conforman un grupo parafilético. Dentro de este *R. prolixus* se encuentra más alejado evolutivamente del resto de los integrantes del clado. A su vez, los vertebrados forman un grupo separado de los invertebrados, formado por insectos y crustáceos.



#### 4.3.2 Validación experimental por PCR de genes traqueales.

Para validar los resultados bioinformáticos hallados previamente de los genes *trh*, *btl*, *sima* y *Hph*, se llevó a cabo una amplificación por PCR. Para esto, teniendo en cuenta la secuencia de los transcritos hallados en el genoma de *R. prolixus*, se diseñaron *primers* específicos para cada uno de los genes de interés y como material molde para la amplificación se sintetizó ADN complementario a partir de ARN que fue extraído de huevos de *R. prolixus* recolectados a distintos tiempos de post puesta, para abarcar todos los estadios del desarrollo. En la figura 18 se puede ver que se obtuvo una buena amplificación, sin bandas inespecíficas y con los fragmentos esperados, según longitud de amplificación, para cada uno de los genes.



**Figura 18:** Gel obtenido a partir de la corrida electroforética de los fragmentos amplificados por PCR.

### 4.3.3 Validación funcional por ARNi parental.

Para llevar a cabo la interferencia del gen *tracheless*, se inyectaron 8 hembras vírgenes, entre el segundo y tercer segmento abdominal, con 3 µg de ARN doble cadena generado por transcripción in vitro a partir del fragmento de PCR obtenido. De las 8 hembras interferidas, sólo 4 sobrevivieron y a partir de ellas fueron analizados los huevos obtenidos.

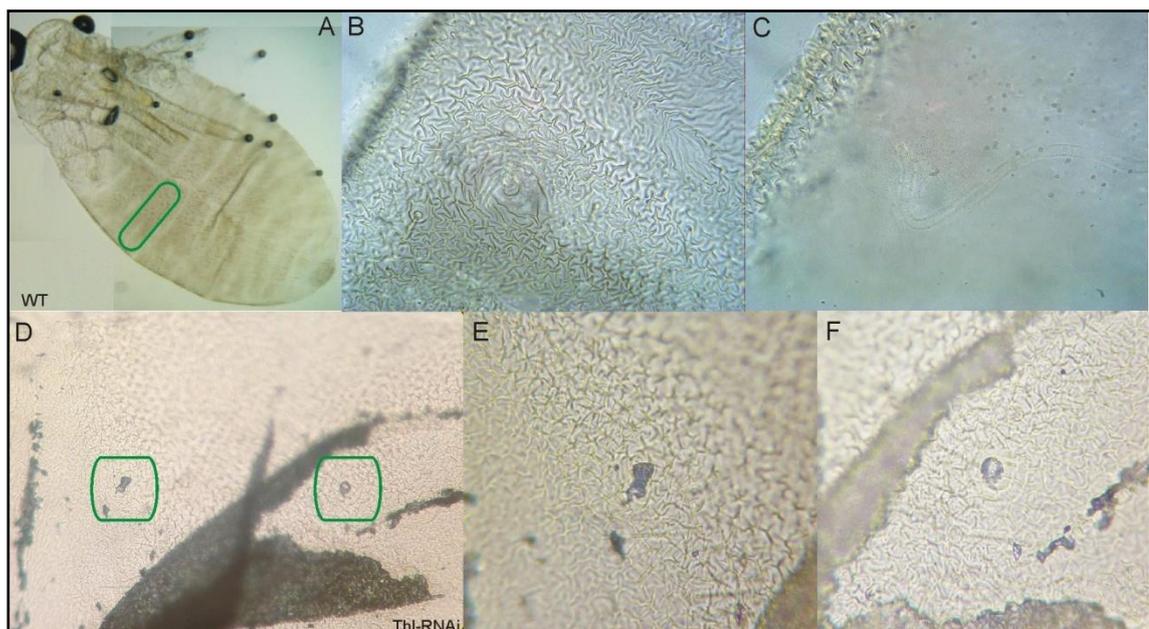
Las hembras pusieron un total de 200 huevos, de los cuales 10 arrestaron su desarrollo. Ninguno de los 10 huevos interferidos llegó a eclosionar, deteniendo su crecimiento en estadios tempranos del desarrollo. Los embriones fueron extraídos de los huevos y manipulados con el fin de encontrar características distintivas de falta de función con respecto a los embriones control.

El desarrollo de sistema traqueal, según lo conocido en *D. melanogaster*, comienza con la invaginación de un grupo de células ectodérmicas precursoras (placodas) ubicadas a ambos lados del embrión de manera asimétrica. Esta invaginación se establece desde el segundo segmento torácico hasta el octavo segmento abdominal, observándose en la superficie del embrión una estructura anular denominada espiráculo, el cual lleva a cabo la función de permitir la entrada de oxígeno al sistema traqueal. En el lado interno del organismo se puede ver la formación de los sacos traqueales que son las primeras estructuras tipo tubo que se originan, y que establecen el vestíbulo a partir del cual comienza la elongación y desarrollo de las ramas traqueales principales. Un gen que cumple un rol clave en la determinación del destino de las células precursoras en células traqueales y en la regulación de los genes necesarios para continuar el proceso de desarrollo del sistema traqueal es el gen *trh* (Ghabrial *et al.*, 2003). En la figura 19 B se puede observar el desarrollo del sistema traqueal normal donde se ve que en la

superficie se establece la estructura anular denominada espiráculo, a partir del cual comienza formarse el vestíbulo traqueal que continúa proyectando hacia el interior estableciendo la rama traqueal principal (Figura 19C).

En nuestro caso, el fenotipo observado se caracterizó por una invaginación parcial de las células ectodérmicas, donde se alcanzaron a establecer los espiráculos con su respectivo vestíbulo traqueal en cada uno de los segmentos del embrión. (Figura 19 D, E y F). Más allá de estos no se observa presencia de ramas traqueales que permitan suministrar oxígeno a los tejidos y órganos del cuerpo, quedando frenado en un estadio inicial del desarrollo traqueal.

Se puede suponer que en el embrión se generaron las placodas de manera correcta, por lo que el momento de determinación del destino celular si se llevó a cabo, pero los pasos siguientes no se desarrollaron normalmente ya que el proceso de invaginación fue parcial, y no se alcanzó a formar de manera completa el saco traqueal, así como tampoco se dio origen a las ramas principales del sistema tubular.



**Figura 19:** A. Segmento abdominal analizado del embrión control. B. Espiráculo y vestíbulo traqueal de un embrión control. C. Primera ramificación que se origina luego de la invaginación completa de las células ectodérmicas en embrión control. D. Segmentos abdominales del embrión interferido donde se observan espiráculos rudimentarios e invaginación parcial (recuadros verdes). E y F. Magnificación del detalle mostrado figura D mostrando. En ninguno de los dos segmentos del embrión interferido se ve desarrollo de ramas traqueales.

Estos resultados obtenidos mediante ARNi parental, representan un resultado preliminar en donde solo un embrión mostró fenotipo de falta de función. Estos ensayos tienen que repetirse para aumentar el tamaño muestral y así aumentar las significancias de estos resultados.

## 5. DISCUSIÓN.

### 5.1 Genes del desarrollo embrionario en triatominos.

La comparación entre genomas se está convirtiendo en un componente indispensable para comprender una gran variedad de procesos biológicos (Tatusov *et al.*, 1997). Es una herramienta poderosa para el estudio de la evolución de los genomas, que permite transferir información génica desde un organismo modelo bien estudiado a especies no convencionales (Jiang *et al.*, 2013). En este trabajo se pudo identificar a partir de similitud de secuencia de genes que participan en el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* en los transcriptomas de *Triatoma spp.* y en el genoma de *R. prolixus*. Este análisis minucioso permite sentar las bases de futuros estudios funcionales sobre el desarrollo embrionario en los triatominos.

Cabe recordar que las especies comparadas se clasifican en distintos grupos de acuerdo a su proceso de desarrollo embrionario, *D. melanogaster* presenta embriogénesis de banda germinal larga, es un organismo más derivado, evolutivamente hablando, y con metamorfosis completa (Holometábolo), y los triatominos presentan metamorfosis incompleta (Hemimetábolo), con embriogénesis de banda germinal corta/intermedia que caracteriza a los órdenes basales de insectos. A pesar de estas diferencias embriológicas ambos establecen un plan corporal compuesto por cabeza, tórax y abdomen (Davis *et al.*, 2002), y en este establecimiento participan diferentes vías de señalización y se activan diferentes procesos de desarrollo para cumplir con tal objetivo.

Por estudios previos se sabe que los componentes de las vías de señalización se encuentran conservados tanto en especies vertebradas como invertebradas (Tusher *et al.*,

2001), esto permite inferir la conservación de componentes de las vías en los triatominos.

A su vez análisis comparativos entre el genoma del organismo modelo *D. melanogaster* y las especies de insectos, *Apis mellifera*, *Tribolium castaneum*, *Bombyx mori*, *Oncopeltus fasciatus*, *Acyrtosiphon pisum*, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles gambiae* (Dearden *et al.*, 2006; Harker *et al.*, 2013; Ewen-Campen *et al.*, 2011; Shigenobu *et al.*, 2010; Behura *et al.*, 2011), realizados previamente, mostraron la conservación de varios de los genes que componen los procesos y vías que son analizados en este trabajo, lo que permite darle apoyo a las secuencias génicas identificadas en los triatominos.

Así como existió una gran conservación de genes en las especies de triatominos hubo casos claves donde no fue encontrado el gen en ninguna de las 4 especies analizadas, lo que merece ser remarcado y discutido en esta sección. Uno de los genes que no pudo ser identificado en ninguna de las especies fue el gen *osk*, quien participa en el establecimiento del plasma polar, una región especializada de citoplasma, en el polo posterior del embrión durante la ovogénesis, y en la especificación del destino de las células polares como líneas germinales dentro de esta región especializada, estableciendo así el destino celular sexual en el embrión (Lehmann *et al.*, 1986). Sumado a su ausencia en los triatominos, en estudios previos no fue posible identificarlo en el genoma de especies como *A. mellifera*, *T. castaneum* y *B. mori* todas especies holometábolos (Dearden *et al.*, 2006), así como tampoco pudo ser identificada dentro de los hemimetábolos en *O. fasciatus* (Ewen-Campen *et al.*, 2011), a partir de un análisis del transcriptoma embrionario temprano del mismo, y en *A. pisum*, a partir de un análisis de los genes del desarrollo de su genoma (Shigenobu *et al.*, 2010). Si fue identificada en las especies de mosquitos *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus* y *A. gambiae*,

todos pertenecientes al orden díptero como *D. melanogaster*, lo que permitiría considerarlo específico de dípteros (Gould *et al.*, 2008), sugiriendo que el modo de determinación de las células germinales que se lleva a cabo en *D. melanogaster* con la participación especial de *osk* no es un modo ancestral encontrado entre los insectos (Lynch *et al.*, 2011).

Otro de los genes que no logró ser identificado fue *valois* que codifica para una proteína materna que es la encargada de acumular a la proteína OSKAR en el polo posterior, así como también de localizar la proteína VASA, quien forma parte de los componentes del citoplasma especial del plasma polar. Este gen si pudo ser identificado en las especies holometábolos nombradas previamente, pero no en hemimetábolos como *A. pisum* (Shigenobu *et al.*, 2010) y *O. fasciatus* (Ewen-Campen *et al.*, 2011). Lo que permitiría inferir que es un gen que durante la evolución divergió tanto que no puede ser identificado a partir de similitud de secuencia entre los dos grupos de insectos o simplemente que se haya surgido dentro de los holometábolos.

Uno de los genes claves que determinan el inicio del desarrollo dorsoventral, *grk*, no pudo ser identificado en ninguna de las especies analizadas en este trabajo. Actúa como ligando de la vía de señalización Toll-dorsal para establecer el eje dorsoventral del embrión y posteriormente conducir a la subdivisión del mismo en mesodermo, neuroectodermo y ectodermo dorsal (Manseau *et al.*, 1989). Este gen analizado en estudios previos tampoco pudo ser encontrado en *A. mellifera*, *T. castaneum*, *B. mori*, *O. fasciatus* y *A. pisum* (Ewen-Campen *et al.*, 2011; Shigenobu *et al.*, 2010; Dearden *et al.*, 2006), lo que sugeriría que *gurken* podría ser una novedad evolutiva en los dípteros (Dearden *et al.*, 2006), sin embargo en *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus* y *A. gambiae*, todos del orden díptero, no pudo ser encontrado (Behura *et al.*, 2011).

Uno de los determinantes de la región anterior del embrión es *bcd*, el cual tampoco pudo ser identificado en los triatomíneos, y previamente tampoco fue identificado en *A. mellifera*, *T. castaneum*, *B. mori*, *O. fasciatus* y *A. pisum* (Dearden *et al.*, 2006; Shigenobu *et al.*, 2010), esto no fue inesperado ya que estudios previos indicarían que este gen evolucionó en su papel como determinante anterior en los dípteros (Stauber *et al.*, 2000; Stauber *et al.*, 2002). La ausencia de *bcd* implica que otros genes puedan llevar a cabo esta función, posiblemente *orthodenticle (otd)* y *hunchback (hb)* podrían serlo ya que se los vio como determinantes anteriores en *Tribolium* (Schroder, 2003) y *Nasonia vitripennis* (Pultz *et al.*, 2005). Sin embargo, en los dípteros *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus* y *A. gambiae* tampoco fue identificado, sugiriendo que sólo se lo encuentra en los dípteros grandes (*D. melanogaster*) (Tusher *et al.*, 2001; Behura *et al.*, 2011).

El gen *swallow (swa)* quien también participa en el establecimiento del eje anteroposterior, regulando la localización del ARN mensajero de *osk* en el polo posterior (Knox *et al.*, 2005), no pudo ser encontrado en ninguno de los triatomíneos, así como tampoco en las especies que fueron estudiadas previamente (Dearden *et al.*, 2006; Ewen-Campen *et al.*, 2011; Harker *et al.*, 2013; Shigenobu *et al.*, 2010; Behura *et al.*, 2011).

*Patched (Ptc)* el receptor de la vía de señalización HH no pudo ser identificado en ninguno de los triatomíneos, estudios previos en *T. castaneum* mostraron una gran conservación de los componentes de la vía, incluido *Ptc* (Farzana *et al.*, 2008). También fue identificado en el anélido *Platynereis dumerilii* (Dray *et al.*, 2010). Por lo tanto, puede ser que haya divergido en el grupo de hemimetábolos no pudiendo encontrárselo a partir de similitud de secuencia o que otro gen sea el encargado de actuar como receptor de la vía, reemplazando a *ptc*.

Es dificultoso conocer si la imposibilidad de identificar un gen dado refleja la ausencia del mismo o si se debe a una divergencia significativa de las secuencias génicas con respecto a *D. melanogaster*, que es la especie utilizada como la base de la asignación (Behura *et al.*, 2011). Hubo casos en donde la falta de identificación de un gen fue sólo en alguna de las cuatro especies, estos resultados podrían adjudicarse a problemas en la secuenciación y ensamblado, por lo que en la perspectiva futura de un análisis más profundo del transcriptoma con mayor número de secuencias se espera que permita mejorar la cobertura total y encontrar las identidades no identificadas previamente.

A pesar de estos casos específicos, la mayoría de los genes que conforman las vías y los procesos que participan en el desarrollo embrionario se conservan en los triatomíneos, esto es consistente con la idea de que estos son procesos básicos que son fundamentales para el desarrollo de insectos o animales.

## **5.2 Genes del sistema traqueal en *Rhodnius prolixus*.**

Como primer paso a partir de las identidades encontradas se decidió testear las hipótesis evolutivas por lo que se construyeron árboles filogenéticos utilizando la inferencia bayesiana. Se obtuvieron los árboles correspondientes a cada gen analizado y se pudo inferir que tipo de relación evolutiva tenía cada gen con respecto a otras secuencias equivalentes encontradas en otras especies. Existieron casos que no fueron tal y como se los esperaba, generando cierto ruido en los árboles trazados. Tal es el caso para *breathless* que las secuencias de *T. palidipennis*, *T. infestans* y *T. dimidiata* en el árbol se ubicaron alejadas con respecto a los demás insectos. Observando el alineamiento realizado se podría llegar a inferir que el *isotig05797* identificado como *bt1* para *T. infestans* en realidad no correspondería a este gen ya que la secuencia no

presentó homología clara con ninguna de las otras secuencias analizadas; a su vez los otros dos triatominos presentaron secuencias muy cortas en cuanto a su longitud, por lo que con los datos obtenidos por la secuenciación por la plataforma Illumina esperaríamos tener una mejor cobertura y poder darle una mayor identidad a estos *isotigs* como *btl* y así encontrar mayor relación evolutiva de estas secuencias con la de los demás insectos. Para el gen *HIF prolyl hydroxylase* se pudo ver que las secuencias de los cuatro triatominos mostraron una mayor relación evolutiva entre ellos y a su vez, se los ubicaron más próximos a los demás insectos que fueron incluidos en el análisis. Este árbol mostró las relaciones que se esperaban de acuerdo a los órdenes y tipo de embriogénesis correspondiente a cada especie. El árbol generado para *similar* mostró a *A. echinator* alejada del resto de los insectos, observando el alineamiento se pudo ver la falta de similitud de secuencia de esta especie con respecto a las demás incluidas en el análisis. Se podría inferir que la secuencia en realidad no corresponde a esta proteína o que en el grupo de himenópteros este gen haya divergido en cuanto a su secuencia con respecto a los demás insectos. A *R. prolixus* también se lo ubica alejado evolutivamente de los demás insectos, por lo que se podría pensar que ocurrió lo mismo que en *A. echinator*, apoyando la hipótesis de divergencia de secuencia. Para constatar esto sería ideal identificar a *sima* en los demás triatominos así podríamos establecer las relaciones de homología entre ellas y a partir de eso poder afirmar o refutar tal supuesto. Con los nuevos datos que están siendo procesados usando la plataforma Illumina podríamos identificar al gen.

En el caso para el gen *tracheless*, el árbol que se obtuvo muestra a *T. pallidipennis* alejado evolutivamente de todas las especies incluidas en el análisis, principalmente de los demás insectos. Esto sugeriría que el *singleton* H9TUR5Q02H4NG identificado como *trh* podría no estar representando tal gen o que el tamaño de la lectura fuera

demasiado corto como para abarcar la longitud total del gen. Esta última hipótesis parece ser la más certera ya que al observar el alineamiento múltiple de las secuencias proteicas se puede ver un pequeño fragmento de la misma, sólo encontrándose uno de los dominios característico de la proteína. Otra especie que quedó fuera del grupo esperado fue *C. quinquefasciatus* que se lo ubicó muy alejado de las otras especies del orden díptero y junto a *A. franciscana* un crustáceo. Tras el alineamiento se puede ver que la secuencia en el mosquito difiere significativamente de las otras especies de dípteros, por lo que se podría inferir que la secuencia en realidad no corresponde a esta proteína o que en *C. quinquefasciatus* este gen haya divergido en cuanto a su secuencia con respecto a los demás dípteros.

Luego de los análisis bioinformáticos, fue posible validar de manera experimental la presencia de genes *btl*, *trh*, *sima* y *Hph* en el transcriptoma embrionario de *R. prolixus*, y así poder establecer un paso fundamental para realizar una validación funcional.

Como previamente fue mencionado en este trabajo, el sistema traqueal en *R. prolixus* a dejado de ser estudiado con el surgimiento de *D. melanogaster* como organismo modelo en la biología del desarrollo. Wigglesworth en sus trabajos determinó la estructura y fisiología del sistema traqueal pero no llegó a realizar una búsqueda sobre qué genes participaban para determinar tales características (Wigglesworth, 1954; Wigglesworth, 1972), es por esto que este trabajo se decidió recopilar lo que Wigglesworth determinó en *R. prolixus* sobre el sistema traqueal junto con la información genética conocida en *D. melanogaster* del mismo (Ghabrial *et al.*, 2003) y así poder determinar la función que desempeñan los genes durante el estadio embrionario en la traqueogénesis a partir de la interferencia de la expresión de los mismos.

La técnica de interferencia mediada por ARN (ARNi) es un método simple y rápido para inhibir la función de genes específicos, descubierta por primera vez en *C. elegans* (Fire *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 1995). Ha permitido el estudio de la función génica por la degradación específica de transcritos mediada por ARNdc tanto en los organismos interferidos como en su descendencia (Cejka *et al.*, 2006; Couzin, 2002). A esto último se le da el nombre de interferencia parental mediada por ARN (ARNi parental), y se la ha aplicado con éxito en *T. castaneum*, *O. fasciatus*, *L. migratoria*, *G. bimaculatus*, entre otros (Hughes *et al.*, 2000; Bucher *et al.*, 2002; He *et al.*, 2006; Lynch *et al.*, 2010). Algo interesante para tener en cuenta a la hora de analizar los fenotipos es que a medida que aumenta el tiempo desde la interferencia, el número de embriones que exhiben algún fenotipo disminuye, como así la severidad de los mismos (He *et al.*, 2006). Esta pérdida gradual en la actividad de la RNAi puede deberse a una depleción continua del ARNdc introducido en el organismo parental (Bucher *et al.*, 2002).

En este trabajo se realizó la interferencia parental para el gen *tracheless* el cual previamente fue identificado, en otras especies, como un gen necesario para dar inicio a tubulogénesis embrionaria (Isaac *et al.*, 1996). Uno de los procesos de organogénesis en que la tubulogénesis tiene un rol principal es el desarrollo del sistema traqueal, en base al estudio en *D. melanogaster* se sabe que el sistema se origina a partir de placodas traqueales, *cluster* de células ectodérmicas que aparece a cada lado del embrión desde el segmento torácico dos hasta el segmento abdominal ocho, que se invaginan y consecuentemente dan lugar a la formación del árbol traqueal a través de migración y fusión de ramas, sin división celular (Manning *et al.*, 1993). La formación de las placodas traqueales está regulada por genes de polaridad de segmento que a lo largo del eje anteroposterior del embrión, en cada segmento, limitan que células ectodérmicas desarrollan como traqueales (De Celis *et al.*, 1995). Por análisis genético se pudo

determinar que *tracheiless* junto al gen *tango* (*tgo*) establecen un factor de transcripción heterodímero que tiene una participación central en el sistema traqueal. *Trh* codifica para un dominio bHLH-PAS y se expresa en todas las células traqueales. La activación de este gen en las células precursoras traqueales es justo antes de que estas reciban las primeras señales morfológicas de su especialización y son los genes de segmentación *dome* y *stat92E* los encargados de dar inicio a esta expresión (Isaac *et al.*, 1996; Wilk *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002). *Tgo*, la otra subunidad del factor, codifica también para un dominio bHLH-PAS pero su expresión no es específica de tráqueas.

Por estudios en mutantes *trh* se pudo observar fallas en el proceso de invaginación inicial y en la inducción de expresión de genes traqueales, necesarios para continuar el desarrollo de las ramas traqueales como *btl* y *rho* (Boube *et al.*, 2000). BTL es un receptor FGF (Factor de crecimiento de fibroblastos) y actúa en la ramificación primaria, el próximo paso luego de la invaginación ectodérmica en el desarrollo traqueal. Rho actúa para que la invaginación ectodérmica se complete correctamente (Llimargas *et al.*, 1999; Wilk *et al.*, 1996; Ohshiro *et al.*, 1997; Boube *et al.*, 2000). Además, mediante análisis de expresión de *trh* de manera ectópica se pudo observar que es capaz de inducir invaginaciones traqueales adicionales; ante esto se lo propuso como un posible inductor del destino celular traqueal, lo que queda sustentado por su temprana expresión en las células precursoras (Boube *et al.*, 2000).

Con la información previa sobre el funcionamiento de *trh* y el resultado obtenido en la interferencia realizada en este trabajo, se podría inferir que durante el estadio embrionario de *R. prolixus* *trh* se activa en el sistema traqueal para dar comienzo al proceso de invaginación ectodérmica estableciendo el primer paso del desarrollo del sistema e inducir la expresión de los genes traqueales necesarios para continuar el

proceso. Sólo se lo considera como un supuesto ya que el resultado obtenido es preliminar debido a que solamente un embrión mostró fenotipo de falta de función. Con un número mayor de embriones se obtendrían una mayor significancia de los resultados, haciendo posible afirmar fehacientemente la función del gen *trachealess* en *R. prolixus*.

## 6. CONCLUSIONES FINALES.

- En este trabajo fue posible identificar la mayoría de los genes relevantes para el desarrollo embrionario de triatominos, un grupo de insectos que ha sido poco estudiado.
- Se pudo determinar las relaciones evolutivas de los genes *tracheless*, *breathless*, *similar* y *HIF prolyl hydroxylase*, protagonistas del desarrollo del sistema traqueal.
- Se pudo dar comienzo a la validación funcional del gen *tracheless* en *Rhodnius prolixus*, estableciendo resultados preliminares.

Este trabajo sienta las bases para futuros estudios funcionales que nos permitan entender los procesos evolutivos subyacentes en la determinación del fenotipo de especies relacionadas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J. and Ram, S. J. (2004). "Image Processing with ImageJ." Biophotonics International **11**(7): 36-42.

Acevedo, J. M., Centanin, L., Dekanty, A. and Wappner, P. (2010). "Oxygen sensing in *Drosophila*: multiple isoforms of the *prolyl hydroxylase fatiga* have different capacity to regulate HIFalpha/Sima." PLoS One **5**: e12390.

Adryan, B., Decker, H. J., Papas, T. S. and Hsu, T. (2000). "Tracheal development and the von Hippel-Lindau tumor suppressor homolog in *Drosophila*." Oncogene **19**: 2803–11.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.

Baeg, G. H., Zhou, R. and Perrimon, N. (2005). "Genome-wide RNAi analysis of JAK/STAT signaling components in *Drosophila*." Genes Dev **19**(16): 1861-70.

Barker, D. D., Wang, C., Moore, J., Dickinson, L. K. and Lehmann, R. (1992). "Pumilio is essential for function but not for distribution of the *Drosophila* abdominal determinant, Nanos." Genes Dev **6**: 2312-2326.

Bastock, R. and St Johnston, D. (2008). "Drosophila oogenesis." Curr Biol **18**(23): R1082-7.

Behura, S. K., Haugen, M., Flannery, E., Sarro, J., Tessier, C. R., Severson, D. W. and Duman-Scheel, M. (2011). "Comparative genomic analysis of *Drosophila melanogaster* and vector mosquito developmental genes." PLoS One **6**(7): e21504.

- Belvin, M. P. and Anderson, K. V. (1996). "A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway." Annu Rev Cell Dev Biol **12**: 393-416.
- Boube, M., Llimargas, M. and Casanova, J. (2000). "Cross-regulatory interactions among tracheal genes support a co-operative model for the induction of tracheal fates in the *Drosophila* embryo." Mech Dev **91**: 271–78.
- Brown, S., Hu, N. and Hombria, J. C. (2001). "Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*." Curr Biol **11**: 1700–5.
- Bruick, R. K. and McKnight, S. L. (2001). "A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF." Science **294**: 1337–40.
- Bucher, G., Scholten, J. and Klingler, M. (2002). "Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera)." Curr Biol **12**(3): R85-6.
- Casanova, J. (2007). "The emergence of shape: notions from the study of the *Drosophila* tracheal system." EMBO Rep **8**(4): 335-9.
- Casanova, J. and Struhl, G. (1989). "Localized surface activity of *torso*, a receptor tyrosine kinase, specifies body pattern in *Drosophila*." Genes Dev **3**: 2025-2038.
- Castelli-Gair Hombria, J. and Brown, S. (2002). "The Fertile Field of *Drosophila* JAK/STAT Signalling." Curr Biol **12**: R569-R575.
- Cejka, D., Losert, D. and Wacheck, V. (2006). "Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic?" Clin Sci (Lond) **110**(1): 47-58.
- Centanin, L., Gorr, T. A. and Wappner, P. (2009). "Tracheal remodelling in response to hypoxia." J Insect Physiol **56**(5): 447-54.

Coura JR and B.-P.J. (2012). "Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review." Rev Soc Bras Med Trop. **45**: 286-296.

Couzin, J. (2002). "Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash." Science **298**(5602): 2296-7.

Chagas, C. R. J. (1909). "Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. esp., agente da nova entidade mórbida do homem. ." Mem Inst Oswaldo Cruz. **1**: 159–218.

Chapman, R. F. (1998). "The Insects Structure and Function." fourth ed. Cambridge University Press.

Chen, H. W., Chen, X., Oh, S. W., Marinissen, M. J., Gutkind, J. S. and Hou, S. X. (2002). "*mom* identifies a receptor for the *Drosophila* JAK/STAT signal transduction pathway and encodes a protein distantly related to the mammalian cytokine receptor family." Genes Dev **16**: 388–98.

Davis, G. K. and Patel, N. H. (2002). "Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation." Annu Rev Entomol **47**: 669-99.

De Celis, J. F., Llimargas, M. and Casanova, J. (1995). "*ventral veinless*, the gene encoding the Cf1a transcription factor, links positional information and cell differentiation during embryonic and imaginal development in *Drosophila melanogaster*." Development **121**: 3405–16.

Dearden, P. K., Wilson, M. J., Sablan, L., Osborne, P. W., Havler, M., McNaughton, E., Kimura, K., Milshina, N. V., Hasselmann, M., Gempe, T., Schioett, M., Brown, S.,

Elsik, C., Holland, P., Kadowaki, T. and Beye, M. (2006). "Patterns of conservation and change in honey bee developmental genes." Genome Res **16**: 1376–1384.

Degelmann, A., Hardy, P. A., Perrimon, N. and Mahowald, A. P. (1986). "Developmental analysis of the torsolike phenotype in *Drosophila* produced by a maternal-effect locus." Dev Biol **115**: 479-489.

Dias, J. C., Prata, A. and Schofield, C. J. (2002a). "Chagas' disease in the Amazon: an overview of the current situation and perspectives for prevention." Rev Soc Bras Med Trop. **35**: 669-678.

Dias, J. C., Silveira, A. C. and Schofield, C. J. (2002b). "The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. ." Mem Inst Oswaldo Cruz **97**: 603-612.

Dray, N., K., T.-R., Le Gouar, M., Vibert, L., Christodoulou, F., Schipany, K., Guillou, A., Zantke, J., Snyman, H., Béhague, J., Vervoort, M., Arendt, D. and Balavoine, G. (2010). "Hedgehog signaling regulates segment formation in the annelid *Platynereis*." Science **329**: 339–342.

Driever, W. and Nusslein-Volhard, C. (1989). "The Bicoid protein is a positive regulator of *hunchback* transcription in the early *Drosophila* embryo." Nature **337**: 138-143.

Driever, W. and Nusslein-volhardd, C. (1988a). "A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryo." Cell **54**: 95-104.

Driever, W. and Nusslein-volhardd, C. (1988b). "The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner." Cell **54**: 95-104.

- Drummond, A. J. and Rambaut, A. (2007). "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees." BMC Evol Biol **7**: 214.
- Du, Q. and Geller, D. A. (2010). "Cross-Regulation Between Wnt and NF-kappaB Signaling Pathways." For Immunopathol Dis Therap **1**(3): 155-181.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." Genes Dev **15**(2): 188-200.
- Evans, J. D. and Gundersen-Rindal, D. (2003). "Beenomes to Bombyx: future directions in applied insect genomics." Genome Biol **4**(3): 107.
- Ewen-Campen, B., Shaner, N., Panfilio, K., Suzuki, Y., Roth, S. and Extavour, C. (2011). "The maternal and early embryonic transcriptome of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*." BMC Genomics **12**: 1471-2164.
- Farzana, L. and Brown, S. J. (2008). "Hedgehog signaling pathway function conserved in *Tribolium* segmentation." Dev Genes Evol **218**(3-4): 181-92.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-11.
- François, V., Solloway, M., O'Neill, J. W., Emery, J. and Bier, E. (1994). "Dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo depends on a putative negative growth factor encoded by the short gastrulation gene." Genes Dev **8**: 2602-2616.
- Gabay, L., Seger, R. and Shilo, B. Z. (1997). "In situ activation pattern of *Drosophila* EGF receptor pathway during development." Science **277**(5329): 1103-6.

- Garcia, E. S. and Azambuja, P. (2004). "Lignoids in insects: chemical probes for the study of ecdysis, excretion and *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions." Toxicon **44**: 431-440.
- Ghabrial, A., Luschnig, S., Metzstein, M. M. and Krasnow, M. A. (2003). "Branching morphogenesis of the *Drosophila* tracheal system." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 623-47.
- Gigliotti, S., Cavaliere, V., Gargiulo, G., Graziani, F. and Malva, C. (2004). "Molecular genetics of oogenesis in *Drosophila melanogaster*." ISJ **1**: 72-81.
- Glazer, L. and Shilo, B. Z. (1991). "The *Drosophila* FGFR homolog is expressed in the embryonic tracheal system and appears to be required for directed tracheal cell extension." Genes Dev **5**: 697-705.
- Gould, E. A. and Solomon, T. (2008). "Pathogenic flaviviruses." Lancet **371**: 500-509.
- Guo, S. and Kemphues, K. J. (1995). "par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed." Cell **81**(4): 611-20.
- Hafen, E., Levine, M. and Gehring, W. J. (1984). "Regulation of *Antennapedia* transcript distribution by the bithorax complex in *Drosophila*." Nature **307**: 287-289.
- Hall, T. (2004). "BioEdit 6.0.7." Department of Microbiology, North Carolina State University. from <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G. J. (2000). "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells." Nature **404**(6775): 293-6.

Harker, B. W., Behura, S. K., deBruyn, B. S., Lovin, D. D., Mori, A., Romero-Severson, J. and Severson, D. W. (2013). "Stage-specific transcription during development of *Aedes aegypti*." BMC Dev Biol **13**: 29.

Harrison, J. F. (2003). "Tracheal system." Encyclopedia of Insects. Academic Press.

He, Z. B., Cao, Y. Q., Yin, Y. P., Wang, Z. K., Chen, B., Peng, G. X. and Xia, Y. X. (2006). "Role of hunchback in segment patterning of *Locusta migratoria manilensis* revealed by parental RNAi." Dev Growth Differ **48**(7): 439-45.

Heckel, D. G. (2003). "Genomics in pure and applied entomology." Annu Rev Entomol **48**: 235-60.

Hughes, C. L. and Kaufman, T. C. (2000). "RNAi analysis of Deformed, proboscipedia and Sex combs reduced in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*: novel roles for Hox genes in the hemipteran head." Development **127**(17): 3683-94.

Hunter, C. P. (1999). "Genetics: a touch of elegance with RNAi." Curr Biol **9**: R440-442.

Ip, Y. T., Park, R. E., Kosman, D., Bier, E. and Levine, M. (1992b). "The dorsal gradient morphogen regulates stripes of rhomboid expression in the presumptive neuroectoderm of the *Drosophila* embryo." Genes Dev **6**: 1728- 1739.

Isaac, D. D. and Andrew, D. J. (1996). "Tubulogenesis in *Drosophila*: a requirement for the *tracheless* gene product." Genes Dev **10**: 103–17.

Jacob, L. and Lum, L. (2007). "Hedgehog signaling pathway in *Drosophila*." Sci STKE **2007**(407): cm7.

Jazwinska, A., Kirov, N., Wiechaus, E., Roth, S. and Rushlow, C. (1999b). "The *Drosophila* gene *brinker* reveals a novel mechanism of Dpp target gene regulation." Cell **96**: 563-573.

Jazwinska, A., Rushlow, C. and Roth, S. (1999a). "The role of *brinker* in mediating the graded response to Dpp in early *Drosophila* embryos." Development **126**: 3323-3334.

Jiang, Y., Gao, X., Liu, S., Zhang, Y., Liu, H., Sun, F., Bao, L., Waldbieser, G. and Liu, Z. (2013). "Whole genome comparative analysis of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with four model fish species." BMC Genomics **14**: 1471-2164.

Keister, M. L. (1948). "The morphogenesis of the tracheal system of *Sciara*." J Morphol **83**(3): 373-423.

Klamt, C., Glazer, L. and Shilo, B. Z. (1992). "*breathless*, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for migration of tracheal and specific midline glial cells." Genes Dev **6**: 1668-78.

Klingler, M., Erdély, M., Szabad, J. and Nusslein-Volhard, C. (1988). "Function of *torso* in determining the terminal anlagen of the *Drosophila* embryo." Nature **335**: 275-277.

Knox, M. A., Awuor, B. and Stephenson, E. C. (2005). "Evolutionary analysis of the swallow gene. ." A. Dros. Res. Conf. **46 Suppl.**: 1025B.

Kollien, A. H. and Schaub, G. A. (2000). "The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. ." Parasitol Today **16**: 381-387.

Kosman, D., Ip, Y. T., Levine, M. and Arora, K. (1991). "Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the *Drosophila* embryo." Science **254**: 118-122.

Krause, G. (1939). "Die Eitypen der Insekten." Biol Zentralbl **59**.

Lavista-Llanos, S., Centanin, L., Irisarri, M., Russo, D. M., Gleadle, J. M., Bocca, S. N., Muzzopappa, M., Ratcliffe, P. J. and Wappner, P. (2002). "Control of the hypoxic response in *Drosophila melanogaster* by the basic helix-loop-helix PAS protein similar." Mol Cell Biol **22**(19): 6842-53.

Lavore, A., Pagola, L., Esponda-Behrens, N. and Rivera-Pomar, R. (2012). "The gap gene giant of *Rhodnius prolixus* is maternally expressed and required for proper head and abdomen formation." Dev Biol **361**: 147-155.

Lehmann, R. and Nusslein-Volhard, C. (1986). "Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of *oskar*, a maternal gene in *Drosophila*." Cell **27**: 141–152.

Lehmann, R. and Nusslein-Volhard, C. (1987). "hunchback, a gene required for segmentation of an anterior and posterior region of the *Drosophila* embryo." Dev Biol **119**: 402-417.

Lehmann, R. and Nusslein-Volhard, C. (1991). "The maternal gene *nanos* has a central role in posterior pattern formation of *Drosophila* embryo." Development **112**: 679-691.

Levine, M. and Harding, K. W. (1989). "Drosophila: The zygotic contribution." Genes and Embryos **IRL**: 39-94.

Lewis, E. B. (1978). "A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*." Nature **276**(5688): 565-70.

Liu, H., Wang, T., Wang, J., Quan, F. and Zhang, Y. (2013). "Characterization of liaoning cashmere goat transcriptome: sequencing, de novo assembly, functional annotation and comparative analysis." PLoS One **8**(10): e77062.

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

Locke, M. (1958). "The coordination of growth in the tracheal system of insects." Quart. J. Micr. Sci. **99**.

Lynch, J. A. and Desplan, C. (2010). "Novel modes of localization and function of nanos in the wasp *Nasonia*." Development **137**(22): 3813-21.

Lynch, J. A., Özüak, O., Khila, A., Abouheif, E., Desplan, E. and Roth, S. (2011). "The Phylogenetic Origin of *oskar* Coincided with the Origin of Maternally Provisioned Germ Plasm and Pole Cells at the Base of the Holometabola." PLoS Genet **7**: e1002029.

Lynch, J. A. and Roth, S. (2011). "The evolution of dorsal-ventral patterning mechanisms in insects." Genes Dev **25**(2): 107-18.

Llimargas, M. and Casanova, J. (1999). "EGF signalling regulates cell invagination as well as cell migration during formation of tracheal system in *Drosophila*." Dev. Genes Evol. **209**: 174–79.

Mann, R. and Morata, G. (2000). "The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila*." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 243-71

Manning, G. and Krasnow, M. A. (1993). "Development of the *Drosophila* tracheal system." The Development of *Drosophila melanogaster*: 609–85.

Manseau, L. and Schupbach, T. (1989). "cappuccino and spire: two unique maternal effect loci required for both the anteroposterior and dorsoventral patterns of the *Drosophila* embryo." Genes Dev **3**: 1437-52.

Martínez-Arias, A. and Lawrence, P. A. (1985). "Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo." Nature: 639-642.

Martinez, J. and Tuschl, T. (2004). "RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease." Genes Dev **18**(9): 975-80.

Mellerick, D. M. and Nirenberg, M. (1995). "Dorsal-ventral patterning genes restrict NK-2 homeobox gene expression to the ventral half of the central nervous system of *Drosophila* embryos. ." Dev Biol **171**: 306-316.

Minami, M., Kinoshita, N., Kamoshida, Y., Tanimoto, H. and Tabata, T. (1999). "*brinker* is a target of Dpp in *Drosophila* that negatively regulates Dpp-dependent genes." Nature **398**: 242-246.

Morisato, D. and Anderson, K. (1995). "Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo." Annu. Rev. Genet **29**: 371-99

Moussian, B. and Roth, S. (2005). "Dorsoventral axis formation in the *Drosophila* embryo- Shaping and transducing a morphogen gradient." Curr Biol **15**: R887-R889.

Mullis, K. B. (1990). "Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction." Ann Biol Clin (Paris) **48**(8): 579-82.

Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M. and Snyder, M. (2008). "The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing." Science **320**(5881): 1344-9.

Nagao, M., Ebert, B. L., Ratcliffe, P. J. and Pugh, C. W. (1996). "*Drosophila melanogaster* SL2 cells contain a hypoxically inducible DNA binding complex which recognises mammalian HIF-binding sites." FEBS Lett. **387**: 161–66.

Niessing, D., Driever, W., Sprenger, F., Taubert, H., Jackle, H. and Rivera-Pomar, R. (2000). "Homeodomain position 54 specifies transcriptional versus translational control by Bicoid." Mol. Cell. **5**: 395-401.

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

Ohshiro, T. and Saigo, K. (1997). "Transcriptional regulation of breathless FGF receptor gene by binding of TRACHEALESS/dARNT heterodimers to three central midline elements in *Drosophila* developing trachea." Development **124**: 3975–86.

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

Panzer, F., Ferrandis, I., Ramsey, J., Salazar-Schettino, P. M., Cabrera, M., Monroy, C., Bargas, M. D., Mas-Coma, S., O'Connor, J. E., Angulo, V. M., Jaramillo, N. and Pérez, N. (2007). "GENOME SIZE DETERMINATION IN CHAGAS DISEASE TRANSMITTING BUGS (HEMIPTERA-TRIATOMINAE) BY FLOW CYTOMETRY." Am J Trop Med Hyg **76**: 516-521.

Paroush, Z., Wainwright, S. M. and Ish-Horowitz, D. (1997). "*Torso* signaling mediates terminal patterning in *Drosophila* by antagonizing Groucho-mediated repression." Development **124**: 3827-3834.

Pellegrini, M., Marcotte, E. M., Thompson, M. J., Eisenberg, D. and Yeates, T. O. (1999). "Assigning protein functions by comparative genome analysis: protein phylogenetic profiles." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(8): 4285-8.

Pignoni, F., Steingrímsson, E. and Lengyel, J. A. (1992). "*bicoid* and the terminal system activate *tailless* expression in the early *Drosophila* embryo." Development **115**: 239-251.

Price, J. V., Clifford, R. J. and Schupbach, T. (1989). "The maternal ventralizing gene *torpedo* is allelic to faint little ball, an embryonic lethal, and encodes the *Drosophila* EGF receptor homolog." Cell: 1085-1092.

Pultz, M. A., Westendorf, L., Gale, S. D., Hawkins, K., Lynch, J., Pitt, J. N., Reeves, N. L., Yao, J. C., Small, S., Desplan, C. and Leaf, D. S. (2005). "A major role for zygotic hunchback in patterning the *Nasonia* embryo." Development **132**(16): 3705-15.

Ray, R. P., Arora, K., Nüsslein-Volhard, C. and M., G. W. (1991). "The control of cell fate along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo." Development **113**: 35-54.

Reichman-Fried, M., Dickson, B., Hafen, E. and Shilo, B. Z. (1994). "Elucidation of the role of *breathless*, a *Drosophila* FGF receptor homolog, in tracheal cell migration." Genes Dev **8**(4): 428-39.

Reichman-Fried, M. and Shilo, B. Z. (1995). "*Breathless*, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is required for the onset of tracheal cell migration and tracheole formation." Mech Dev **52**(2-3): 265-73.

Rivera-Pomar, R. and Jackle, H. (1996). "From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: filling in the gaps." Trends Genet **12**: 478-483.

Rivera-Pomar, R. V., Lu, X., Perrimon, N., Taubert, H. and Jackle, H. (1995). "Activation of posterior gap gene expression in the *Drosophila* blastoderm." Nature **376**: 253-6.

Robbins, D. J., Fei, D. L. and Riobo, N. A. (2012). "The Hedgehog signal transduction network." Sci Signal **5**(246): re6.

Roth, S., Neuman-Silberberg, F. S., Barcelc, G. and Schupbach, T. (1989). "A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo." Cell: 1189-1202.

Rozen, S. and Skaletsky, H. (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." Methods Mol Biol **132**: 365-86.

Rushlow, C. A., Han, K., Manley, J. L. and Levine, M. (1989). "The graded distribution of the dorsal morphogen is initiated by selective nuclear transport in *Drosophila*." Cell: 1165-1177.

Saito-Diaz, K., Chen, T. W., Wang, X., Thorne, C. A., Wallace, H. A., Page-McCaw, A. and Lee, E. (2013). "The way Wnt works: components and mechanism." Growth Factors **31**(1): 1-31.

Samakovlis, C., Hacohen, N., Manning, G., Sutherland, D., Guillemin, K. and Krasnow, M. A. (1996). "Development of the *Drosophila* tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but genetically coupled branching events." Development **122**: 1395-1407.

Sander, K. (1981). "Pattern generation and pattern conservation in insect ontogenesis—problems, data, and models." Progress in Developmental Biology: 101–19.

Schofield, C. J. and Galvao, C. (2009). "Classification, evolution, and species groups within the Triatominae." Acta Trop **110**(2-3): 88-100.

Schroder, R. (2003). "The genes orthodenticle and hunchback substitute for bicoid in the beetle *Tribolium*." Nature **422**: 621–625.

Schulz, C. and Tautz, D. (1995). "Zygotic *caudal* regulation by *hunchback* and its role in abdominal segment formation of the *Drosophila* embryo." Development **121**: 1023-1028.

Shigenobu, S., Bickel, R. D., Brisson, J. A., Butts, T., Chang, C.-c., Christiaens, O., Davis, G. K., Duncan, E. J., Ferrier, D. E. K., Iga, M., Janssen, R., Lin, G.-W., Lu, H.-L., McGregor, A. P., Miura, T., Smagghe, G., Smith, J. M., van der Zee, M., Velarde, R. A., Wilson, M. J., Dearden, P. K. and Stern, D. L. (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**: 47–62.

Smibert, C. A., Wilson, J.-E., Kerr, K. and Macdonald, P. M. (1996). "Smaug protein represses translation of unlocalized *nanos* mRNA in the *Drosophila* embryo." Genes Dev **10**: 2600-2609.

St Johnston, D. and Nusslein-Volhard, C. (1992). "The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo." Cell **68**: 201-19.

Stathopoulos, A. and Levine, M. (2002). "Dorsal gradient networks in the *Drosophila* embryo." Dev Biol **246**: 57-67.

Stauber, M., Prell, A. and Schmidt-Ott, U. (2002). "A single *Hox3* gene with composite bicoid and zerknüllt expression characteristics in non-Cyclorrhaphan flies." Proc. Natl. Acad. Sci. **99**: 274-279.

Stauber, M., Taubert, H. and Schmidt-Ott, U. (2000). "Function of bicoid and hunchback homologs in the basal cyclorrhaphan fly *Megaselia* (Phoridae)." Proc. Natl. Acad. Sci. **97**: 10844–10849.

Steward, R. (1987). "Dorsal, an embryonic polarity gene in *Drosophila*, is homologous to the vertebrate proto-oncogene, c-rel. ." Science, New Series **238**: 692-694.

Sutherland, D., Samakovlis, C. and Krasnow, M. A. (1996). "*branchless* encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching." Cell **87**: 1091–101.

Tatusov, R. L., Koonin, E. V. and Lipman, D. J. (1997). "A genomic perspective on protein families." Science **278**(5338): 631-7.

Tautz, D., Friedrich, M. y. and Schrdder, R. (1994). "Insect embryogenesis - what is ancestral and what is derived?" Development Supplement: 193-199.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucl. Acids Res. **22**(22): 4673-4680.

Tusher, V. G., Tibshirani, R. and Chu, G. (2001). "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response." Proc Natl Acad Sci USA **98**: 5116–21.

VanHook, A. M. (2011). "Focus issue: fine-tuning Hedgehog signaling in development and disease." Sci Signal **4**(200): eg10.

Vazquez-Prokopec, G. M., Spillmann, C., Zaidenberg, M., Gurtler, R. E. and Kitron, U. (2012). "Spatial heterogeneity and risk maps of community infestation by *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina." PLoS Negl Trop Dis **6**(8): e1788.

Velculescu, V. E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M. A., Bassett, D. E., Jr., Hieter, P., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1997). "Characterization of the yeast transcriptome." Cell **88**(2): 243-51.

Wang, C. and Lehmann, R. (1991). "Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila*." Cell **66**: 637-47.

Wang, M. M. (2011). "Notch signaling and Notch signaling modifiers." Int J Biochem Cell Biol **43**(11): 1550-62.

Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009). "RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics." Nat Rev Genet **10**(1): 57-63.

Wharton, R. P. and Struhl, G. (1991). "RNA regulatory elements mediate control of *Drosophila* body pattern by the posterior morphogen Nanos." Cell **67**: 955-967.

Wigglesworth, E. C. (1972). "A comparative assessment of eye protective devices and a proposed system of acceptance testing and grading." Am J Optom Arch Am Acad Optom **49**(4): 287-304.

Wigglesworth, V. B. (1950). "The science and practice of entomology." Nature **166**(4218): 379-80.

Wigglesworth, V. B. (1954). "Growth and regeneration in the tracheal system of an insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera)." Quart J. Micr. Sci. **95**: 115-137.

Wigglesworth, V. B. (1972). "The Principles of Insect Physiology." London: Chapman and Hall.

Wilk, R., Weizman, I. and Shilo, B. Z. (1996). "*tracheiless* encodes a bHLH-PAS protein that is an inducer of tracheal cell fates in *Drosophila*." Genes Dev **10**: 93-102.

Wolf, J. B. W. (2013). "Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial." Molecular Ecology Resources **13**: 559–572.

Wreden, C., Verrotti, A. C., Schisa, J. A., Lieberfrab, M. E. and Strickland, S. (1997). "Nanos and pumilio establish embryonic polarity in *Drosophila* by promoting posterior deadenylation of *hunchback* mRNA." Development **124**: 3015-3023.

Xu, J. and Gridley, T. (2012). "Notch Signaling during Oogenesis in *Drosophila melanogaster*." Genet Res Int **2012**: 648207.

Xu, L. H. and Lengyel, J. A. (1998). "Role of *caudal* in hindgut specification and gastrulation suggests homology between *Drosophila* amnioproctodeal invagination and vertebrate blastopore." Development **125**: 2433-2442.

## 8. RESUMEN.

El desarrollo de la genómica de insectos tiene un gran impacto en la entomología básica y aplicada al control de plagas o a insectos beneficiosos. Recientemente un consorcio internacional del cual nuestro laboratorio forma parte completó el secuenciamiento del genoma de *Rhodnius prolixus*, un insecto modelo vector de la enfermedad de Chagas. Con el fin de ampliar el conocimiento del genoma de triatomíneos, se secuenció y ensambló el transcriptoma de tres especies de la familia Reduviidae de distintas regiones de América: *Triatoma dimidiata*, *Triatoma pallidipennis* y *Triatoma infestans*. Usando la información generada se realizó búsqueda y análisis del complemento total de los genes implicados en el desarrollo embrionario de insectos, desde estadios embrionarios temprano hasta el desarrollo post-embrionario. Con ese fin se generó una base de datos de aproximadamente 1.364 genes con los que se realizó una búsqueda por similitud de secuencia utilizando el algoritmo BLAST para comparar nuestra base de datos con los transcriptomas de las tres especies del género *Triatoma* y de *R. prolixus*. De esta forma se identificó un amplio repertorio de genes en las cuatro especies analizadas con un alto nivel de conservación de secuencia. Los genes se compararon con los conocidos en otros insectos y se determinaron las diferentes tasas de evolución. A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron alguno de los genes para su validación funcional por PCR y ARNi parental.