

Identificación y análisis funcional del gen Hunchback de *Rhodnius prolixus*, un insecto de banda germinal intermedia, vector de la enfermedad de Chagas.

**Tesina
del alumno**

Agustín Rolandelli

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

LICENCIADO EN GENÉTICA

Carrera:

Licenciatura en genética

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

Pergamino 08 de Marzo de 2013

Identificación y análisis funcional del gen Hunchback de *Rhodnius prolixus*, un insecto de banda germinal intermedia, vector de la enfermedad de Chagas.

**Tesina
del alumno**

Agustín Rolandelli

Director:
Andrés Lavore

Codirector:
Rolando Rivera-Pomar

Carrera:
Licenciatura en genética

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

Pergamino 08 de Marzo de 2013

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por acompañarme en todo momento, bancarme y ayudarme en todo lo que estuvo a su alcance. En especial a mi abuela, a quien le dedico esta tesis, porque sus ganas de verme recibido superaron a las mías.

A Charly, Lu, Sofi, Agus, Guille y Ana, mis compañeros y amigos de la facu, por todos los momentos vividos en esta etapa. En particular a Sofi, quien es la que más me aguantó de todos.

A mis amigos/as de la vida, porque siempre me escucharon y ayudaron a despejarme.

A Migue, por hospedarme cuando viajaba a La Plata.

A mis directores, por guiarme para poner en práctica los conocimientos teóricos adquiridos en la carrera.

A Daniel, por su colaboración en el trabajo de laboratorio.

A Natalia Esponda y Lucía Pagola por brindarme datos aún no publicados para la realización de este trabajo

ÍNDICE

| | |
|-------------------------------|----|
| Resumen..... | 5 |
| Introducción..... | 7 |
| Materiales y Métodos..... | 16 |
| Resultados..... | 21 |
| Conclusiones y Discusión..... | 33 |
| Bibliografía..... | 45 |
| Anexo 1..... | 52 |

RESUMEN

Aunque el modelo corporal de insectos culmina siempre en la formación del mismo patrón (cabeza, tórax y abdomen), el desarrollo embrionario que lleva a este estado final es muy variable. En los insectos de banda germinal larga (por ejemplo *Drosophila melanogaster*, la mosca de la fruta) todos los segmentos son definidos simultáneamente durante el estadio de blastodermo (antes de gastrulación) en un entorno sincicial. En los insectos de banda germinal corta (por ejemplo *Locusta migratoria*, la langosta del desierto) solo los segmentos anteriores son especificados en el entorno sincicial del blastodermo, mientras que los segmentos posteriores aparecen más tarde en la embriogénesis durante la fase de alargamiento del embrión. Con características intermedias entre ambos tipos de desarrollo se encuentran los insectos de banda germinal intermedia (como el caso de *Rhodnius prolixus*, la vinchuca centroamericana), 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. Se considera a estos últimos dos tipos de embriogénesis como los menos evolucionados.

Una de las grandes diferencias embriológicas entre la segmentación de banda germinal corta (e intermedia) y larga está en la delimitación temprana del blastodermo por patrones moleculares. Por esta razón, el estudio de expresión y función de los genes de desarrollo involucrados en la especificación temprana del eje antero-posterior de embriones es crucial para el entendimiento de dichas diferencias. Es así que para tener una idea mas clara acerca de estas diferencias se identificó y estudió la función del ortólogo del gen *gap Hunchback (Hb)* en *R. prolixus* mediante la técnica de ARNi parental. En el genoma de *R. prolixus* se identificó un gen que codifica una proteína de 651 aminoácidos y que posee 8 dominios de unión al ADN de tipo *zinc finger* característicos de la familia de proteínas Hb. Los fenotipos generados por la disminución en la expresión del gen mostraron defectos en dos zonas: por un lado, compactación y pérdida de segmentos abdominales en la región posterior del embrión; y por el otro, en la región anterior, desaparición del primer segmento torácico, patas malformadas y ausencia de apéndices en los segmentos gnatales. Esto apoya la idea de que Hb actúa como un gen *gap* en este insecto. Mediante la comparación de los resultados obtenidos con los conocidos en otros insectos, se propone un papel ancestral de Hb en la especificación de segmentos gnatales y torácicos y en la correcta adición de segmentos abdominales a partir de la zona de crecimiento. Durante la transición

evolutiva que generó a los insectos de banda germinal larga, la función de Hb en especificar los segmentos gnatales y torácicos parece conservarse, aunque adquiriría nuevos roles hacia anterior, abarcando los segmentos cefálicos más anteriores, y reduciría su requerimiento hacia posterior, delimitando solo los segmentos abdominales más posteriores.

INTRODUCCIÓN

Un aspecto fascinante de la biología es la evolución de la forma. La enorme diversidad morfológica de los organismos es casi infinita y, a la vez, dinámica. De esto se desprende una pregunta fundamental de la biología evolutiva del desarrollo: ¿cómo se adquiere la forma? Indudablemente, este fenómeno tiene dos componentes principales, uno genético (genes) y otro ambiental (extra-genes), que culminan en la generación de un fenotipo característico y único. Sin embargo, como lo han mostrado los genomas secuenciados hasta hoy, el número de genes es relativamente pequeño y mayoritariamente conservado. Es así que más que los genes conservados son las interacciones entre ellos y sus potenciales reguladores los que determinarían la diversidad de morfologías y, en definitiva, la biodiversidad (Damen, 2007; Peel *et al.*, 2005). Comprender estos mecanismos implica poder predecir las potenciales redes de regulación génica, uno de los desafíos de la genómica.

Embriogénesis en insectos

En 1939, Krause observó que a pesar de que el modelo corporal de insectos culmina siempre en la formación del mismo patrón (cabeza, tórax y abdomen), el desarrollo embrionario que lleva a este estado final es sorprendentemente variable. A su vez, las diferentes regiones del cuerpo son la consecuencia de la segmentación del embrión. En base a esto, definió tres modelos de segmentación embrionaria: embriogénesis de banda germinal “corta”, “intermedia” y “larga” (Krause, 1939). En los insectos de banda germinal larga (por ejemplo *Drosophila melanogaster*) todos los segmentos son delimitados simultáneamente durante el estadio de blastodermo (antes de gastrulación) en un entorno sincicial. El hecho que el proceso ocurra en un entorno inicial sin membranas celulares, hace posible la difusión de los diferentes factores (anteriores y posteriores) que por interacciones mutuas van a determinar la identidad de cada región del embrión. En insectos de banda germinal corta (por ejemplo *Locusta migratoria*) sólo los segmentos anteriores son especificados en el entorno sincicial del blastodermo, mientras que los segmentos posteriores aparecen más tarde en la embriogénesis durante una segunda fase de alargamiento del embrión. Este crecimiento se genera por la adición secuencial de segmentos corporales formados en la región más posterior del organismo, la cual se denomina zona de crecimiento. Con características intermedias entre ambos tipos de desarrollo se encuentran los insectos de banda germinal

intermedia (como el caso de *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 y Patel, 2002). La embriogénesis de *Rhodnius prolixus* se ha estudiado en detalle y un esquema general de la misma se muestra en el Anexo 1. Dado que las formas de desarrollo de banda germinal corta e intermedia son conceptualmente equivalentes se las suele agrupar y denominar conjuntamente como “corta” (Figura 1).

La embriogénesis de banda germinal corta e intermedia está ampliamente representada en los insectos de órdenes basales, más primitivos, mientras que la embriogénesis de banda germinal larga está restringida a los insectos holometábolos más derivados, como dípteros o himenópteros, lo que da indicios de que los primeros dos modelos de segmentación embrionaria son los ancestrales (Liu y Kaufman, 2005).

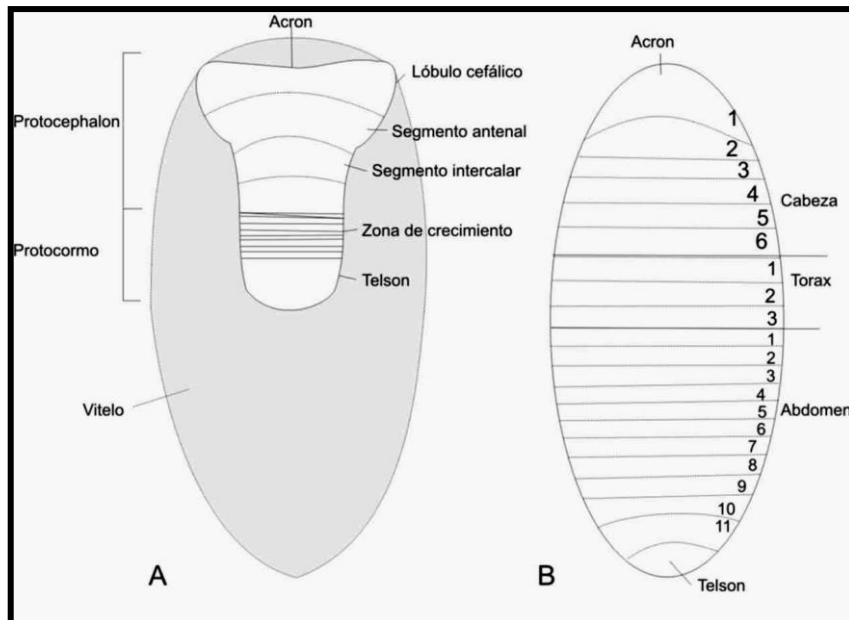


Figura 1. (A) Banda germinal corta donde se encuentran especificados los primeros segmentos de la cabeza, la zona de crecimiento, acron y telson. La diferencia con la banda germinal intermedia es que en este estadio se especifican todos los segmentos de la cabeza y tórax (B) Banda germinal larga donde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

Genética del desarrollo de insectos

Si bien el estudio de la embriología de insectos y varias de las ideas clave de la biología del desarrollo (como los conceptos de morfógenos maternos o gradientes segmentarios) datan de muchos años (Lawrence, 1966, 1971; Lawrence *et al.*, 1972);

Sander, 1975), no fue sino hasta el estudio fundamental de Lewis (Lewis, 1978) y el rastreo genético de Nüsslein-Volhard y Wieschaus (Nusslein-Volhard y Wieschaus, 1980) que se desarrolló la noción de que genes específicos están involucrados en el establecimiento del patrón corporal. Así es que en la década de 1980 y 1990 *D. melanogaster* se estableció como paradigma de la genética del desarrollo de los seres vivos, y los mecanismos genéticos y moleculares involucrados en la embriogénesis de este organismo de banda germinal larga se estudiaron en detalle. Estos agrupan una red génica de factores de transcripción maternos y cigóticos, los cuales están organizados de manera jerárquica y se encuentran distribuidos a lo largo del eje antero-posterior (A-P) del embrión. Dentro de los genes involucrados se incluyen los genes de efecto materno, los genes *gaps*, *pair-rule* y los de polaridad de segmento, los cuales son responsables de la correcta formación de segmentos a lo largo del eje A-P del embrión (Revisado en Rivera-Pomar y Jackle, 1996).

Hasta hace pocos años, la mayoría de los estudios de segmentación en otros artrópodos diferentes a *D. melanogaster* describían únicamente patrones de expresión génica. Las pruebas funcionales se acotaban a unos pocos reastreos genéticos (Maderspacher *et al.*, 1998; Pultz y Leaf, 2003; Pultz *et al.*, 2000). Con el surgimiento de las técnicas de interferencia por ARN (ARNi) (Fire *et al.*, 1998; Timmons y Fire, 1998), que inducen la degradación específica de transcritos mediada por ARN de doble cadena (ARNdc) en organismos vivos y hasta en su descendencia (ARNi parental) (Fraser *et al.*, 2000), la función de los genes comenzó a ser estudiada en sistemas experimentales diversos, particularmente en organismos “no modelos” donde los métodos de investigación son muy limitados. Con el uso de estas técnicas de genética reversa, los genes que conforman la red génica de desarrollo en *Drosophila* fueron también identificados en otros insectos, como por ejemplo *Apis mellifera*, *Nasonia vitripennis*, *Tribolium castaneum*, *Grillus bimaculatus*, *Locusta migratoria*, *Oncopeltus fasciatus*, *Rhodnius prolixus* (Bucher *et al.*, 2002; He *et al.*, 2006; Hughes y Kaufman, 2000; Lynch y Desplan, 2010; Mito *et al.*, 2005; Peel *et al.*, 2005; Wilson y Dearden, 2011; Lavore *et al.*, 2012). En estos se han estudiado los dominios de expresión y fenotipos de los genes de segmentación observándose grandes diferencias, lo que sugiere que la cascada de segmentación de *Drosophila*, lejos de ser un paradigma, representa un mecanismo derivado en comparación con la de otros artrópodos.

La primera etapa de la cascada que establece la segmentación (determinación del eje por gradientes maternos), presenta variaciones significativas entre los grupos de artrópodos, tanto a nivel de genes como a nivel de expresión espacio-temporal. Ortólogos de los genes *gap* se pueden encontrar en todos los artrópodos y, aunque su modo de acción en el proceso de segmentación puede ser variable, la función básica de determinar grandes regiones corporales permanece inalterada. El patrón generado por los genes *pair-rule* está medianamente conservado en los artrópodos, pero no está claro si este es una característica ancestral o ha evolucionado de manera convergente. La etapa mejor conservada es aquella en la que se definen los límites de los segmentos por la interacción de los genes de polaridad de segmento. La expresión de estos genes coincide con la llamada “etapa filotípica” del desarrollo de los artrópodos: la segmentación de la banda germinal (Sander y Schmitt-Ott, 2004). Por último, en la cascada, cuando la identidad segmentaria es definida por los genes Hox, los grupos de artrópodos vuelven a divergir (Liu y Kaufman, 2005; Peel, 2008; Peel *et al.*, 2005; Pueyo *et al.*, 2008; Stollewerk *et al.*, 2003).

Polaridad antero-posterior

La polaridad antero-posterior del embrión tiene su origen en la polaridad antero-posterior del gameto femenino. Los genes de efecto materno expresados en el ovario de la madre producen ARN mensajeros que son distribuidos asimétricamente a lo largo del oocito. Estos mensajeros codifican factores de transcripción y traducción que difunden a través del blastodermo sincitial y activan o reprimen la expresión de ciertos genes cigóticos que son expresados en dominios extensos y parcialmente superpuestos. Estos genes son denominados genes *gap* (debido a que las mutaciones en estos causan discontinuidades en el patrón de segmentación) y están entre los primeros factores de transcripción transcritos en el embrión. La acción conjunta de los genes *gap* causan la transcripción de los genes *pair-rule*, otros factores de transcripción que dividen al embrión en unidades periódicas. La transcripción de los diferentes genes *pair-rule* resulta en un patrón de 7 bandas verticales perpendiculares al eje antero-posterior. Las proteínas del gen *pair-rule* activan la transcripción de los genes de polaridad de segmento (que actúan tanto de factores de transcripción como de moléculas de señalización) en cada banda, estableciendo los bordes anterior y posterior de cada segmento, y el número final segmentos. Al mismo tiempo, los productos de los genes *gap*, *pair-rule* y polaridad de segmento interactúan para regular otra clase de genes, los

genes homeóticos, que son factores de transcripción que determinan la identidad de cada segmento (revisado en Rivera-Pomar y Jäckle, 1996) (Fig 2)

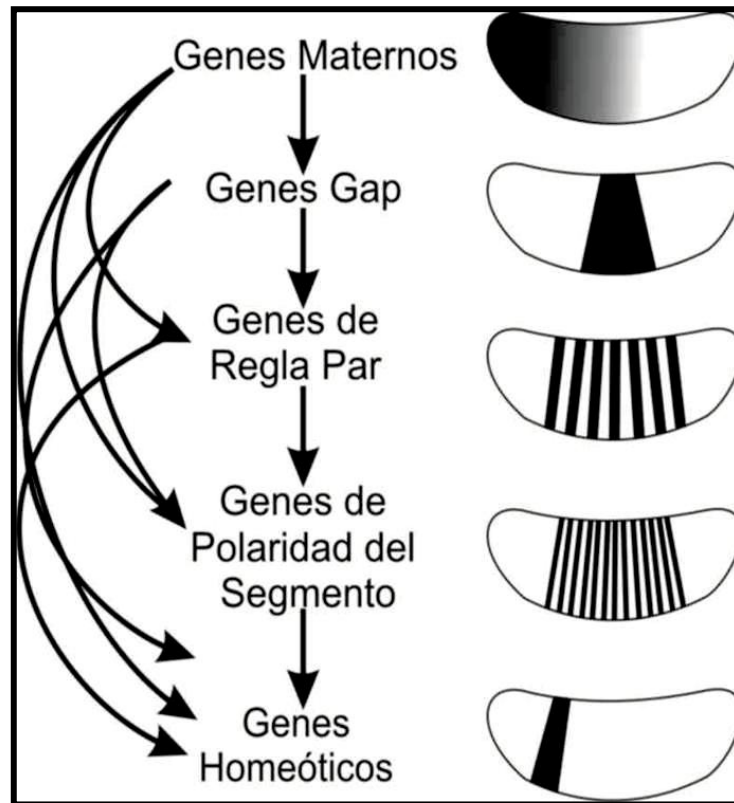


Figura 2. Esquema general del control de la segmentación anteroposterior por los genes de desarrollo embrionario. A la izquierda, una representación de las clases de genes que especifican el patrón antero-posterior del cuerpo y las relaciones regulatorias entre ellos, además dentro de cada jerarquía regulan otros genes de la misma clase. A la derecha, representación de los patrones de expresión de cada clase de genes en el blastodermo o preblastodermo (Tomado de Pagola, 2012).

Una de las grandes diferencias embriológicas entre la segmentación de banda germinal corta (e intermedia) y larga está en la delimitación temprana del blastodermo por patrones moleculares (Fig 3; ver Anexo 1). Por esta razón, el estudio de expresión y función de los genes de desarrollo involucrados en la especificación temprana del eje A-P de embriones es crucial para el entendimiento de estas desigualdades. Los genes *gap* son responsables de una subdivisión muy temprana del blastodermo en regiones amplias, cada una de las cuales abarca eventualmente varios segmentos corporales adyacentes. Así, parece razonable comparar la acción de genes *gap* entre insectos de banda germinal corta/intermedia y larga para comprender mejor sus diferencias. En este trabajo nos centramos en la función del gen *gap Hunchback* (Hb) de *Rhodnius prolixus*, un insecto hemimetábolo de banda germinal intermedia.

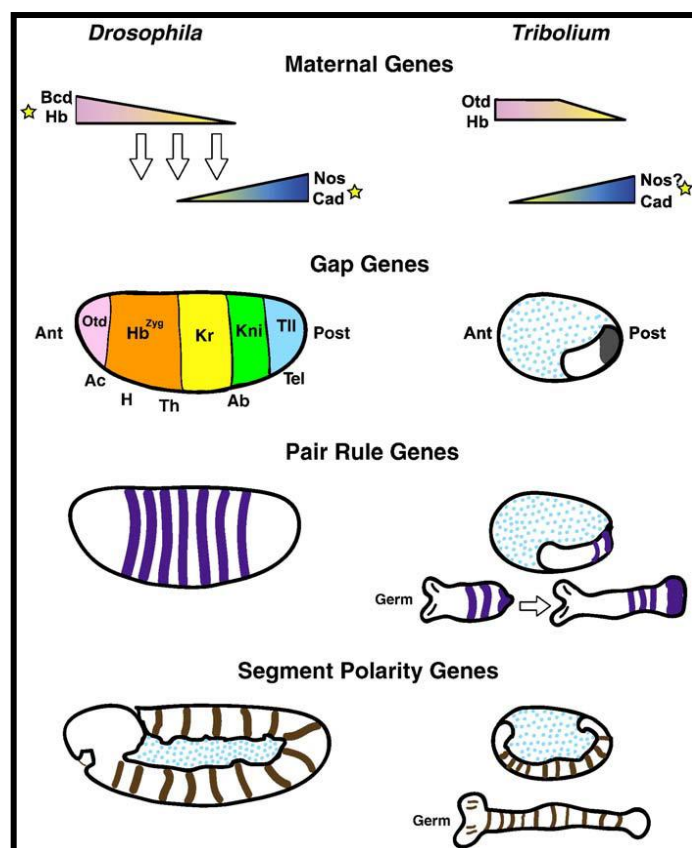


Figura 3. Representación esquemática de los patrones de expresión de genes de segmentación en insectos de banda germinal corta y larga. Los gradientes de morfógenos maternos cruciales para el correcto desarrollo antero-posterior están marcados con una estrella. El tejido extra-embionario está representado con puntos celestes. Las rayas abarcan los dominios aproximados de expresión génica. Ac: Acron. H: Cabeza. Th: Tórax. Ab: Abdomen. Tel: Telson (Tomado de Rosenberg *et al.*, 2009).

El gen Hunchback

El gen *gap Hunchback* (Hb) codifica para un factor de transcripción con dominios de reconocimiento y unión al ADN de tipo *zinc finger* fundamental tanto para el control de la expresión de otros genes *gap* como de genes *pair rule* y homeóticos, dándole una posición clave en la regulación de la segmentación embrionaria (Casares y Sanchez-Herrero, 1995; Pinnell *et al.*, 2006; Simpson-Brose *et al.*, 1994; Tautz, 1987; Wu *et al.*, 2001). En *Drosophila*, alelos con pérdida de función para Hb exhiben un defecto *gap* clásico, esto es, la desaparición de todo un bloque de segmentos desde el labial hasta los metatorácicos, y fusión de los segmentos abdominales A7/A8 (Jurgens, 1984; Lehmann y Nusslein-Volhard, 1987). Ortólogos de Hb han sido identificados en insectos de los Órdenes Himenóptera (*Nasonia vitripennis*, *Apis mellifera*), Lepidóptera

(*Manduca sexta*, *Bombyx mori*), Coleóptera (*Tribolium castaneum*), Hemíptera (*Oncopeltus fasciatus*) y Ortóptera (*Schistocerca americana*, *Locusta migratoria*, *Gryllus bimaculatus*) (He *et al.*, 2006; Kraft y Jackle, 1994; Liu y Kaufman, 2004; Marques-Souza *et al.*, 2008; Mito *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2001; Pultz *et al.*, 2005; Wilson y Dearden, 2011; Wolff *et al.*, 1995). Pultz y colaboradores (Pultz *et al.*, 2005) encontraron que los mutantes *headless* en *N. vitripennis* (insecto de banda germinal larga, como *Drosophila*) son aparentemente alelos nulos del ortólogo del gen *hunchback* cuyo fenotipo se asemeja al de *Drosophila*, con amplia delección de los segmentos anteriores y pérdidas de segmentos abdominales posteriores (Pultz *et al.*, 1999). En *A. mellifera*, otro insecto de banda germinal larga, los defectos generados por ARNi embrional contra Hb parecen ser más severos, formándose únicamente algunos de los segmentos abdominales en los fenotipos más extremos (Wilson y Dearden, 2011). También en *T. castaneum* (banda germinal intermedia), experimentos de ARNi parental contra Hb resultaron en la delección de segmentos gnatales y torácicos (Schroder, 2003). Sin embargo, un segundo análisis de las series fenotípicas generadas sugiere que el fenotipo observado es una combinación de delecciones de segmentos abdominales junto con transformaciones de segmentos torácicos y gnatales en abdominales (Marques-Souza *et al.*, 2008). De la misma manera, fenotipos obtenidos por ARNi contra Hb en otro insecto de banda germinal corta, *L. migratoria manilensis*, apoyan la idea de una función “*gap*” de Hb ya que los ejemplares afectados carecen de segmentos torácicos y gnatales y el número de segmentos abdominales disminuye (He *et al.*, 2006). Este fenotipo ha sido interpretado por otros investigadores como una transformación de segmentos anteriores en posteriores con arresto temprano del desarrollo, lo que explicaría el menor número de segmentos abdominales al detenerse la elongación de la “Zona de Crecimiento” (Marques-Souza *et al.*, 2008). En los casos de disminución de la función de Hb por ARNi en *G. bimaculatus* (banda germinal intermedia) se observan transformaciones de segmentos torácicos y gnatales en abdominales, con la formación de sólo tres segmentos abdominales en los casos más severos (Mito *et al.*, 2005). Algo similar ocurre en *O. fasciatus* (banda germinal intermedia), en donde la disminución de Hb no lleva a una desaparición de segmentos gnatales y torácicos sino que les da una identidad de abdomen y, al mismo tiempo, afecta severamente el crecimiento y alargamiento de los segmentos abdominales (Liu y Kaufman, 2004). De esta forma, queda claro que el gen Hb siempre está involucrado en el proceso de segmentación A-P de amplios segmentos corporales en todos los

organismos estudiados hasta el momento. Sin embargo, difiere en la manera en que lo hace en los distintos grupos de insectos, generando desde cambios en el número de segmentos hasta consistentes transformaciones homeóticas en la región anterior y media del cuerpo.

***Rhodnius prolixus* como insecto modelo**

R. prolixus es un insecto hemimetábolo de banda germinal intermedia perteneciente a la familia Reduviidae nativo del continente Americano (Schofield y Galvao, 2009). Dentro de esta familia, los géneros *Rhodnius*, *Panstrongylus* y *Triatoma* son los más importantes vectores de la enfermedad del Chagas (Coura JR, 2012; Chagas, 1909; Dias *et al.*, 2002a; Dias *et al.*, 2002b; Garcia y Azambuja, 2004; Kollien y Schaub, 2000). 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). *R. prolixus* tiene un ciclo de vida más corto que *T. infestans* (3 meses contra los 6 meses de *T. infestans*), convirtiéndolo en un sistema de estudio más adecuado para el trabajo de laboratorio. Esto determinó que *R. prolixus* surja como 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. Además, se transformó también en un organismo interesante desde el punto de vista evolutivo, dado que es uno de los primeros insectos hemimetábolos del cual se posee la información completa de su genoma (Figura 4).



Figura 4. Imágenes de los distintos estadios ninfales hasta adulto de *Rhodnius prolixus* (Tomado de VectorBase - <https://www.vectorbase.org/organisms/rhodnius-prolixus>)

Actualmente, el genoma de *R. prolixus* se encuentra en la etapa final de anotación con una cobertura cercana a 6X (642.712.701 pares de bases, con un contenido de 34% de GC). Dentro del Consorcio Internacional de Secuenciación de genoma de *R.*

prolixus, el grupo de investigación perteneciente a los laboratorios (CeBio, UNNOBA y CREG, UNLP) donde se realizó esta tesina contribuyó con la síntesis y secuenciación de genotecas normalizadas con el fin de obtener Expressed Sequence Tags (ESTs) y a la elaboración de genotecas para secuenciación profunda del transcriptoma y su análisis. Por otro lado, utilizando la información existente sobre el genoma, se estudiaron algunos genes de desarrollo, tanto de la segmentación antero-posterior como dorso-ventral y algunos genes Hox (Lavore, 2011; Lavore *et al.*, 2012; Pagola, 2012). Para tal fin se diseñaron protocolos específicos para el análisis de la función de genes identificados en el genoma de *R. prolixus* mediante ARNi parental.

Objetivo del trabajo final

Resumiendo, debido a la importancia de *R. prolixus* como vector de la enfermedad de Chagas, a la necesidad de interpretar parte de la gran cantidad de información generada durante la reciente secuenciación del genoma de *R. prolixus* y al rol central (pero diferencial) de los genes *gap* en la segmentación antero-posterior de embriones de banda germinal corta y larga, el objetivo de este trabajo es identificar y generar información funcional del gen Hb de *R. prolixus* (*Hb-Rp*) utilizando la técnica de ARNi parental, partiendo de la hipótesis de que la polaridad segmentaria en *R. prolixus* depende de la acción de genes altamente conservados, pero con funciones variables entre insectos de banda germinal corta (e intermedia) y larga.

MATERIALES Y METODOS

Colonia de *Rhodnius prolixus*:

Ejemplares machos y hembras vírgenes de *R. prolixus* fueron obtenidos de la colonia establecida en el CEBIO. Se mantuvieron en recipientes de plástico de boca ancha de unos 10 cm de diámetro por 15 cm de alto, de paredes lisas y transparentes cuya tapa es remplazada por una malla de nylon muy fina que facilita su alimentación. Se limpiaron periódicamente con lavandina eliminando las deposiciones que pudieron contener parásitos.

Fueron criados en estufa a una temperatura de 29°C +/- 2°C con una humedad relativa del 80% y un periodo de 12hs luz/oscuridad. *R. prolixus* es un hemíptero hematófago por lo que se utilizó para su alimentación aves de corral (gallinas), las cuales fueron inmovilizadas en cajas de madera para permitir la ingesta de sangre *ad libitum* por parte de los insectos. La alimentación se realizó una vez cada 15 días.

Se colocaron tiras de papel plegadas en los tarros que contenían a los insectos. Estas tiras no solo simulaban un ambiente similar al que habitan naturalmente sino que además facilitaron la recolección de los huevos, ya que estos se adhieren al papel al momento de la oviposición. En las condiciones de crianza mencionadas anteriormente, la duración de la embriogénesis fue de 14±1 días (ver Anexo 1).

Analisis *in-silico* del gen Hb de *Rhodnius prolixus*

A partir de la secuencia proteica del ortólogo de Hb de *O. fasciatus* (un insecto emparentado con *Rhodnius*, del mismo orden) se realizó una búsqueda por homología de secuencia en todo el genoma de *R. prolixus* mediante el algoritmo TBLASTN y la matriz BLOSUM62 desde la base de datos del VectorBase (<https://www.vectorbase.org/>), donde se encuentra ensamblada la última versión del genoma de *R. prolixus*. Contando con la región genómica que contenía el gen Rp-Hb, se utilizó el programa Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis>), para corregir manualmente las predicciones génicas automáticas realizadas por el VectorBase y poder anotar el gen correctamente.

La secuencia proteica encontrada de Rp-Hb fue analizada con la utilidad *online* InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan>) para determinar los dominios proteicos que esta contenía. Además, se realizó un alineamiento con los ortólogos ya conocidos en otras especies (cuyas secuencias fueron extraídas de la base de datos de

proteínas del GenBank) mediante la herramienta de alineamientos múltiples ClustalW del programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Estos alineamientos fueron utilizados para determinar las regiones conservadas entre los diferentes organismos para los cuales Hb se conoce. El análisis filogenético se realizó mediante algoritmo de máxima similitud en el sitio *web* <http://www.phylogeny.fr> (Anisimova M. y Gascuel O., 2006; Dereeper *et al.*, 2008; Guindon S. y Gascuel O., 2003). Los parámetros usados para la construcción fueron *aLRT: type SH-like*; Número de *bootstraps*: 100; Modelo de Sustitución: WAG. Las secuencia ortóloga de Hb utilizada para los análisis corresponden a los siguientes insectos: *Oncopeltus fasciatus*, *Locusta migratoria*, *Schistocerca americana*, *Nasonia vitripennis*, *Danaus plexippus*, *Aedes aegypti*, *Tribolium castaneum*, *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera* y *Harpegnathos saltator*. Se tomó además a la secuencia de Hb del crustaceo *Daphnia pulex* como ancestral, sirviendo como raíz del árbol filogenético.

Amplificación por PCR

Conociendo las regiones conservadas del gen *Rp-Hb* se diseñaron *primers* específicos con la ayuda del programa *online Primer3* (Rozen y Skaletsky, 2000), para poder validar mediante la técnica de PCR las predicciones bioinformáticas. Estos *primers* poseen en la el extremo 5' parte del promotor viral de Fago T7 en el extremo 5' para posteriormente realizar experimentos funcionales mediante la técnica de ARNi parental. Los pares de *primers* diseñados fueron:

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

Para todas las amplificaciones por PCR la mix de reacción utilizada fue: *Buffer* (1X), MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (200 μM), *Primer Fw* (200 μM), *Primer Rv* (200 μM), *Taq T-Plus DNA Polimerasa* (Inbio-Highway, Tandil) 1U, molde 25–70 ng de ADN genómico (purificado por A. Lavore) y agua estéril (hasta completar volumen). Se realizó un gradiente de temperaturas de *annealing* (T°a) para así determinar la T°a óptima. El programa de amplificación usado fue:

5min 94°C; 35 x (30 sec. 94°C; 30 sec. 52°C [Grad. 6°]; 1min. 74°C); 5min 74°C.

De esta forma la T^oa determinada para la amplificación de la región conservada de Hb con primers con T7 fue de 60°C. El programa de PCR para la posterior reamplificación de cada uno de los fragmentos con el agregado del promotor completo de T7 en ambos extremos fue una modificación del mostrado anteriormente, donde solo se cambió la T^oa a 57° y se utilizó la secuencia completa del promotor viral como *primers Fv* y *Rv*. Se trabajó con un ciclador térmico Gene Pro Thermal Cycler (Bioer Technology CO., LTD)

También, amplicones sin uno de los fragmentos del promotor T7 en solo uno de sus extremos fueron generados por PCR y enviados a secuenciar a Macrogen Inc. (Corea), para asegurar la identidad del fragmento amplificado. La T^oa determinada en este caso fue de 60°C.

ARNi parental

El protocolo de RNAi parental utilizado en esta Tesis de grado, fue desarrollado recientemente para trabajar en *R. prolixus* (Lavore *et al.*, 2012; Pagola, 2012). Esta técnica consiste en la incorporación (mediante inyección, electroporación o expresión *in vivo*) de ARNdc 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) (Bucher *et al.*, 2002; Fire *et al.*, 1998; Hunter, 1999; Martinez y Tuschl, 2004). Particularmente para el caso de ARNi parental, los fenotipos producidos se observan en la progenie.

A partir de los amplicones acoplados a los fragmentos del promotor T7, se sintetizó ARNdc mediante transcripción *in vitro*, utilizando para esto T7 ARN polimerasa en presencia de ribonucleótidos. La mix de reacción para la transcripción *in vitro* fue: *Buffer de transcripción* (1X), rNTPs (1X), *Inhibidor de RNasas* (Fermentas, 40U), T7 RNA pol 1U, molde 500 ng aprox. y agua estéril (hasta completar volumen). Luego la mix se incubó por 3 hs a 37°C. Posteriormente se realizó la digestión del ADN molde durante 15 min. a una temperatura de 65°C, utilizando 1U de DNAsa (Fermentas). Luego se realizó una extracción con solventes orgánicos y precipitación alcohólica del transcripto usando técnicas estándar. En este caso, el ARN extraído se disolvió en 10 µl de agua bidestilada estéril. 1 µl de este se utilizó para correr en gel de agarosa 1% para corroborar la integridad del ARNdc y medir su concentración tiñendo con EtBr (utilizando el software ImageJ). Los 9 µl restantes se utilizaron para inyectar a las hembras vírgenes.

Hembras vírgenes de *R. prolixus* fueron inyectadas con aproximadamente 10 µg de ARNdc (basado en la estimación de la concentración cuantificada desde el gel) en un volumen no superior a 5µl. 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 2 días, y fueron alimentadas para estimular el proceso de oogénesis y colocadas junto con machos para el apareamiento. A estas se las denomina hembras interferidas.

Como control de la interferencia, hembras vírgenes fueron inyectadas con ARNdc correspondiente al gen β-lactamasa de *E. coli* bajo las mismas condiciones experimentales usadas con las hembras interferidas.

Manipulación de embriones y análisis de fenotipos

Los huevos de *R. prolixus* de ambos tratamientos (controles e interferidos) fueron colectados y rotulados con la fecha de postura, realizándose un exhaustivo seguimiento de su embriogénesis, mediante la observación bajo lupa binocular estereoscópica BestScope BS3040. Durante el transcurso del desarrollo, se realizó un registro fotográfico de todos los embriones durante las distintas etapas de desarrollo. Se esperó hasta que los embriones llegaran al desarrollo completo o que detengan su crecimiento para evaluar su 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 más detallado de los embriones.

Los huevos fueron decorionados y devitelinizados manualmente bajo lupa con pinzas de disección (Dummond N°5). Esto consistió en retirar el opérculo del huevo, realizar una leve presión en el extremo posterior del huevo con la pinza y empujar delicadamente el contenido del huevo hacia el exterior para la devitelinización de los embriones. Es importante tener en cuenta que *R. prolixus* es un insecto de banda germinal intermedia donde el vitelo representa aproximadamente el 90% del huevo. Además, en los estadios de desarrollo tempranos los embriones son translúcidos o ligeramente blanquecinos, y a medida que el desarrollo continúa toman una coloración rojiza.

La disección de los embriones puede llevarse a cabo tanto en etanol (ETOH) o 4% paraformaldehído (PFA). En ETOH la remoción del vitelo es más fácil pero los embriones se vuelven más rígidos y frágiles (además, una rehidratación es necesaria luego de la disección), mientras que en PFA (que fue lo utilizado en este trabajo) el

vitelo se adhiere más al embrión pero este permanece más flexible. Los embriones limpios de vitelo se analizaron bajo la lupa estereoscópica (BestScope BS3040) en busca de defectos en la segmentación y se capturaron imágenes de los mismos utilizando una cámara fotográfica digital.

RESULTADOS

Identificación del ortólogo de Hb en *Rhodnius prolixus*

Mediante el análisis bioinformático del genoma completo de *R. prolixus* se pudo identificar y corregir manualmente al ortólogo del gen Hb (ver materiales y métodos). La secuencia completa tiene una longitud aproximada de 3438 pb (la aproximación se debe a que no se pudo predecir con exactitud la longitud de la región *upstream* al origen de transcripción). El gen consta de tres exones (que en orden de 5' a 3' tienen una longitud de 193 pb, 523 pb y 2063 pb respectivamente) y dos intrones (160 pb y 464 pb respectivamente). En la figura 5 se muestra detalladamente la estructura y secuencia predicha del gen, acompañado de la secuencia proteica para la cual codifica. Esta es una proteína de 651 aminoácidos. El análisis bioinformático utilizando la utilidad *on line* InterProScan permitió identificar 8 dominios de unión al ADN de tipo *zinc finger*. Todos estos *zinc finger* son de tipo C₂H₂ y son típicos para el factor de transcripción Hb (Pinnell *et al.*, 2006).

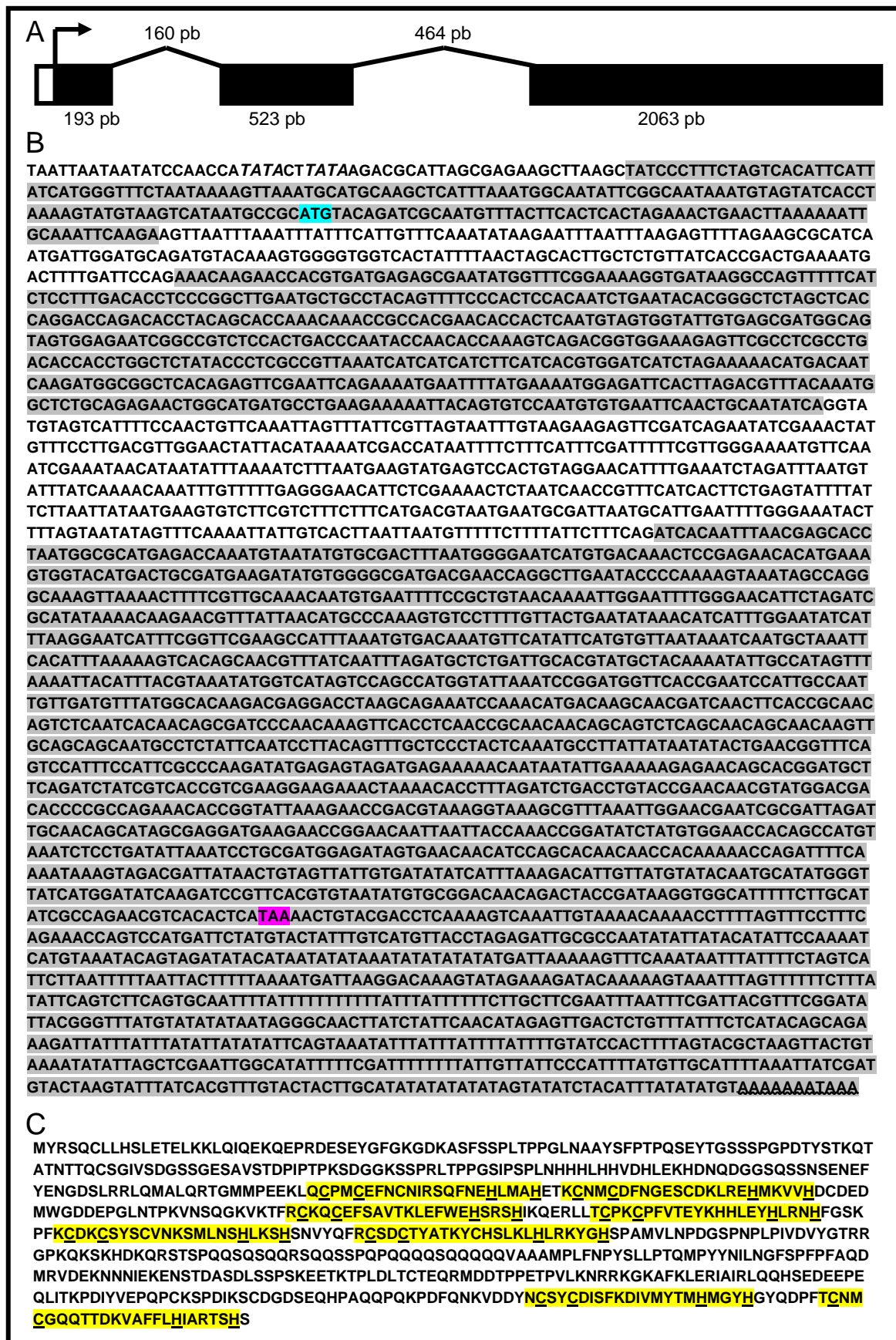


Figura 5. Representación gráfica del gen *gap Hb* de *R. prolixus*. (A) Esquema del gen. Los bloques negros representan exones, y las líneas que los unen intrones. Se aclara además la longitud de cada uno en pares de bases (pb). El bloque blanco ilustra la secuencia promotora, y la flecha el inicio de la

transcripción. **(B)** Secuencia completa del gen. En negrita se marca la posible caja TATA promotora. Las secuencias correspondientes a los exones se marcan en gris. Se resalta en celeste al codón de inicio de traducción y en violeta al de *stop*. Por último, se subraya la secuencia génica que actúa como señal de poli-adenilación e indica el fin de la transcripción. **(C)** Secuencia proteica codificada por el gen. Se resaltan en amarillo 8 dominios de dedos de zinc característicos de la proteína Hb, subrayando los residuos que les dan esta identidad.

Por otro lado, y contando con los ortólogos del gen Hb en otros grupos artrópodos, se realizó la búsqueda de dominios conservados mediante un alineamiento de estos junto con la secuencia proteica de *Rp-Hb*, utilizando el software ClustalW (ver materiales y métodos). Se encontró que seis de los ocho dominios de *zinc finger* presentes en *Rp-Hb* (los *zinc finger* de posición central, MF1-4, y los del extremo C-terminal, CF1 y CF2) estaban presentes en todos los organismos analizados, mientras que los dominios *zinc finger* de extremo N-terminal (NF-1 y NF-2) se encontraron presentes solo en los hemimetábolos analizados y *D. pulex*, mientras que no se hallaron en holometábolos (Fig. 6).

Por otro lado se encontró una alta conservación de elementos estructurales, los dominios *box*, los llamados box A, C y F (o *Basic*) *Box* (Kraft y Jackle, 1994; Rohr *et al.*, 1999; Wolff *et al.*, 1995). Los últimos dos están conservados en todos los insectos analizados, mientras que el primero solo se encontró, además de *R. prolixus*, en *O. fasciatus*, *L. migratoria*, *S. americana*, *D. melanogaster*, *T. castaneum* y *D. plexippus* (Fig. 6).

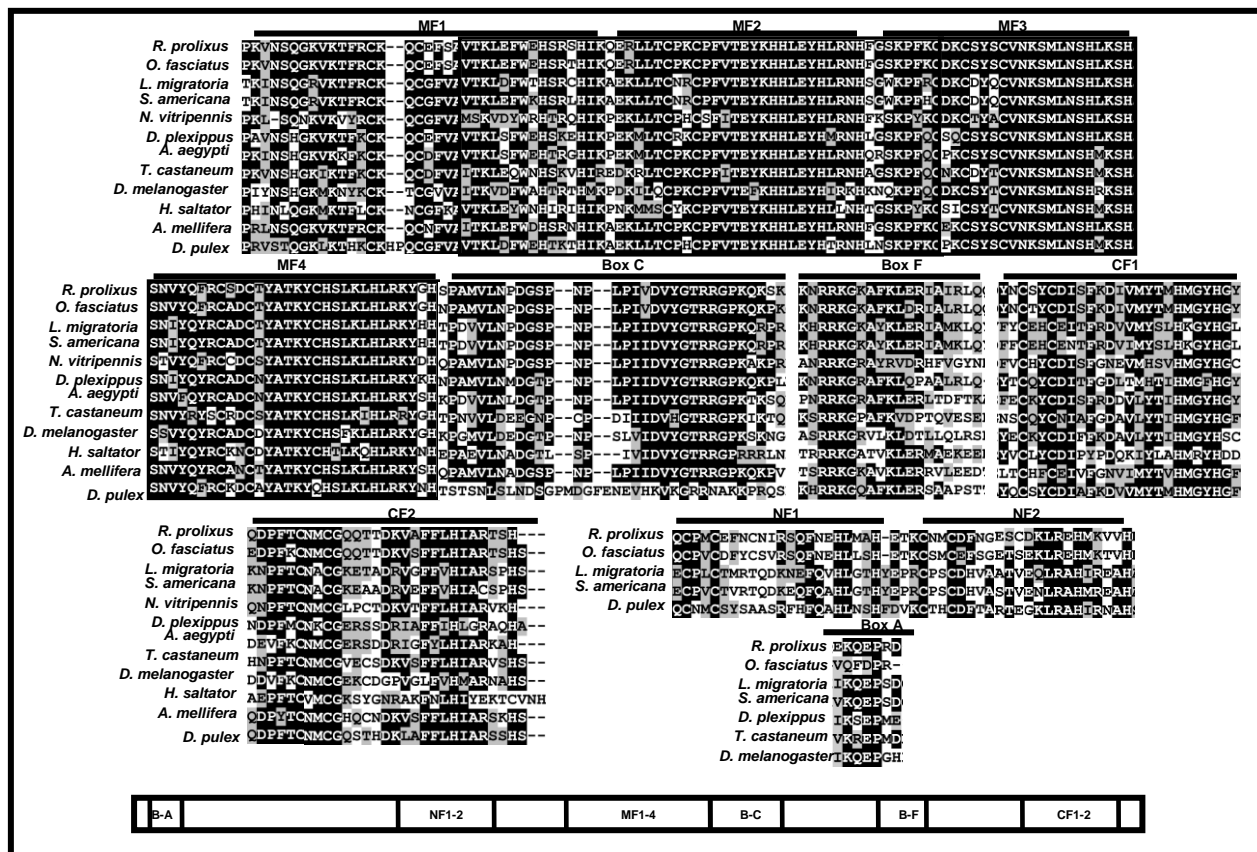


Figura. 6. Análisis comparativo de la secuencia proteica codificada por el gen *hunchback* de *R. prolixus*. Alineamiento de la secuencia con ortólogos Hb de otros insectos. Las zonas marcadas con negro indican identidad total. Las zonas en grises indican secuencias similares. Se muestran los ocho dominios *zinc finger* y los 3 motivos *Box* encontrados (*Box* A, C y F). En la parte inferior se esquematiza la secuencia proteica de Hb de *R. prolixus* (izquierda, extremo N-terminal; derecha, extremo C-terminal), con la ubicación aproximada de los dominios encontrados. MF: Dominio *zinc finger* de posición central. CF: Dominio *zinc finger* de extremo C-terminal. NF: Dominio *zinc finger* de extremo N terminal. B-A: *Box* A. B-C: *Box* C. B-F: *Box* F.

Se realizó también un árbol filogenético con las secuencias de los ortólogos de Hb de los insectos anteriormente mencionados. *D. pulex* se utilizó como *outgroup*. Se observa que, a grandes rasgos, las secuencias proteicas de Hb se ajustan a la línea evolutiva de Hexápodos. Se distinguen claramente dos ramas bien delimitadas, la de los Hemimetábolos y la de los Holometábolos. Además se agrupan correctamente los órdenes Hemípteros, Ortópteros, Himenópteros y Dípteros (Fig 7).

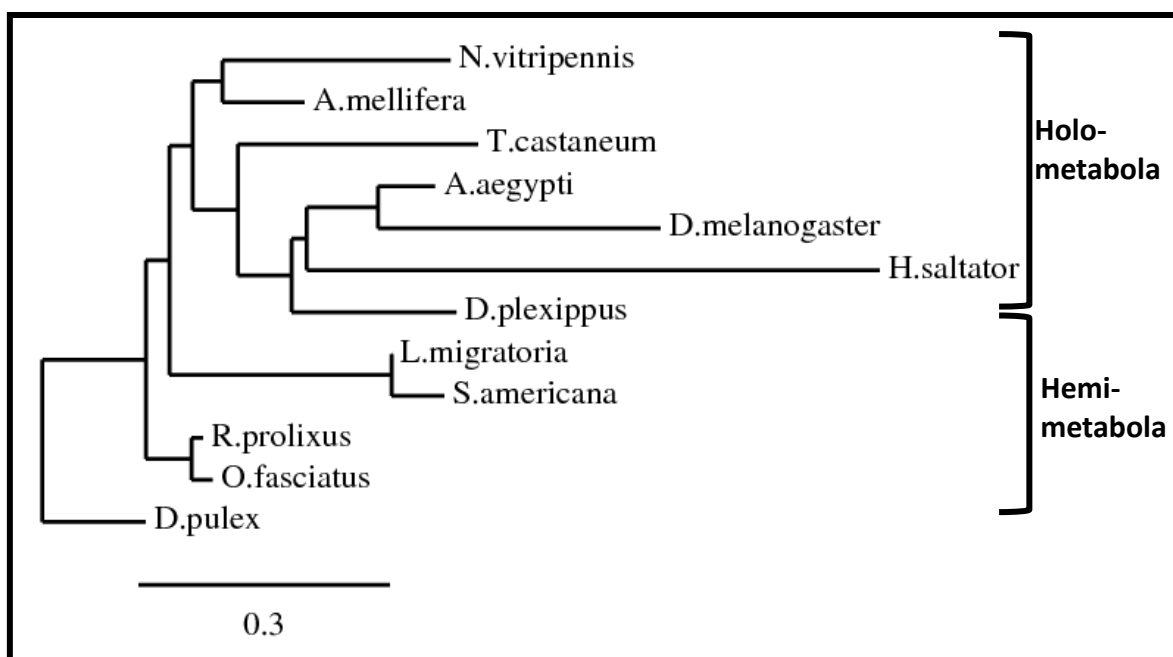


Fig 7. Árbol filogenético de *Rp*-Hb

ARNi parental de Hb en *Rhodnius*

De las diez hembras vírgenes interferidas con ARNdc específico para una región altamente conservada *Rp*-Hb sobrevivieron solo tres, a partir de las cuales se obtuvieron 132 huevos interferidos. Todos los embriones obtenidos de estos huevos mostraron algún defecto en la segmentación (penetrancia= 100%) y ninguno llegó a eclosionar, deteniendo su crecimiento en estadios tempranos del desarrollo (letalidad del 100%). Como control se inyectaron tres hembras vírgenes, todas sobrevivieron. Se obtuvieron 164 huevos controles, de los cuales solo 4 embriones (2,4%) no llegaron a completar el desarrollo (ver Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de las posturas obtenidas de hembras interferidas y control.

| | Total | Emergidos | Letalidad (%) | Embriones con defectos en el desarrollo | Penetrancia (%) |
|--------------|-------|-----------|---------------|---|-----------------|
| Hb ARNi | 132 | 0 | 100 | 132 | 100 |
| Control ARNi | 164 | 160 | 2,4 | 0 | 0 |

Desarrollo embrionario

Se realizó un seguimiento del desarrollo embrionario comparando los huevos provenientes del control negativo contra los interferidos para *Rp*-Hb durante todo el período de embriogénesis hasta la eclosión o, en los casos en que hubo detención del

crecimiento, hasta el tiempo estimado de desarrollo completo ($14^{+/-1}$ días). Para ello se siguió el esquema temporal definido por Esponda-Behrens y colaboradores (ver Anexo 1). Tomando como ventaja la pigmentación rojiza que adquieren los embriones a medida que se desarrollan, se procedió a la toma de imágenes de los huevos a distintos tiempos bajo la lupa (Fig. 8). Esta coloración permitió distinguir el rudimento embrionario de los anexos extra-embrionario recién a partir de la etapa de elongación de la banda germinal, donde se forman los segmentos abdominales (aproximadamente 48 hs después de la puesta del huevo - DPH). Así, no se observó ninguna estructura (y por ende, ninguna diferencia) en los huevos interferidos ni en los controles en las primeras horas post-puesta (Fig. 8B y B').

Pasadas las 48 hs DPH, los límites del embrión se pigmentaron, en especial los apéndices torácicos y cefálicos. En este período ocurre la adición sucesiva de segmentos abdominales a partir de una zona de elongación o zona de crecimiento ubicada en el extremo posterior del embrión, la cual también incrementa su coloración (Fig. 8C y C'). Para este periodo, en los huevos interferidos solo se pudo observar un esbozo de dos pares de apéndices torácicos. Por otro lado, en estos también se detectó un retraso en la elongación del embrión. La zona de crecimiento se localizó en la parte media del huevo, mientras que en el control la parte posterior del embrión se encontró más cercana al opérculo del huevo. (Fig. 8C y C').

A las 72 hs DPH, los embriones interferidos se extendían hasta apenas superar las $\frac{3}{4}$ partes de la longitud dorsal total del huevo, en contraposición con los embriones controles cuyo abdomen se visualizaba alcanzando el extremo posterior del huevo. Así, se observó que el abdomen de los embriones interferidos era significativamente más corto que el de los controles, lo que estaría indicando que habría algún defecto en la segmentación abdominal. Por otro lado, durante este estadio los apéndices torácicos continuaron desarrollándose, y se pudo observar claramente la presencia de solo dos pares de patas en los embriones interferidos (Fig. 8D y D').

Para las 96 hs DPH, (Fig. 8E y E') se hace evidente la asimetría en el desarrollo del tórax y el abdomen en los embriones interferidos comparados a los embriones salvajes. En ambos, el desarrollo de la región cefálica parece casi inalterada tanto en estructuras (ambos poseen los ojos y antenas conspicuas) como en tamaño, pero a nivel de la región torácica y abdominal los cambios morfológicos son enormes, donde los apéndices torácicos están muy reducidos o ausentes y el abdomen se encuentra muy acortado.

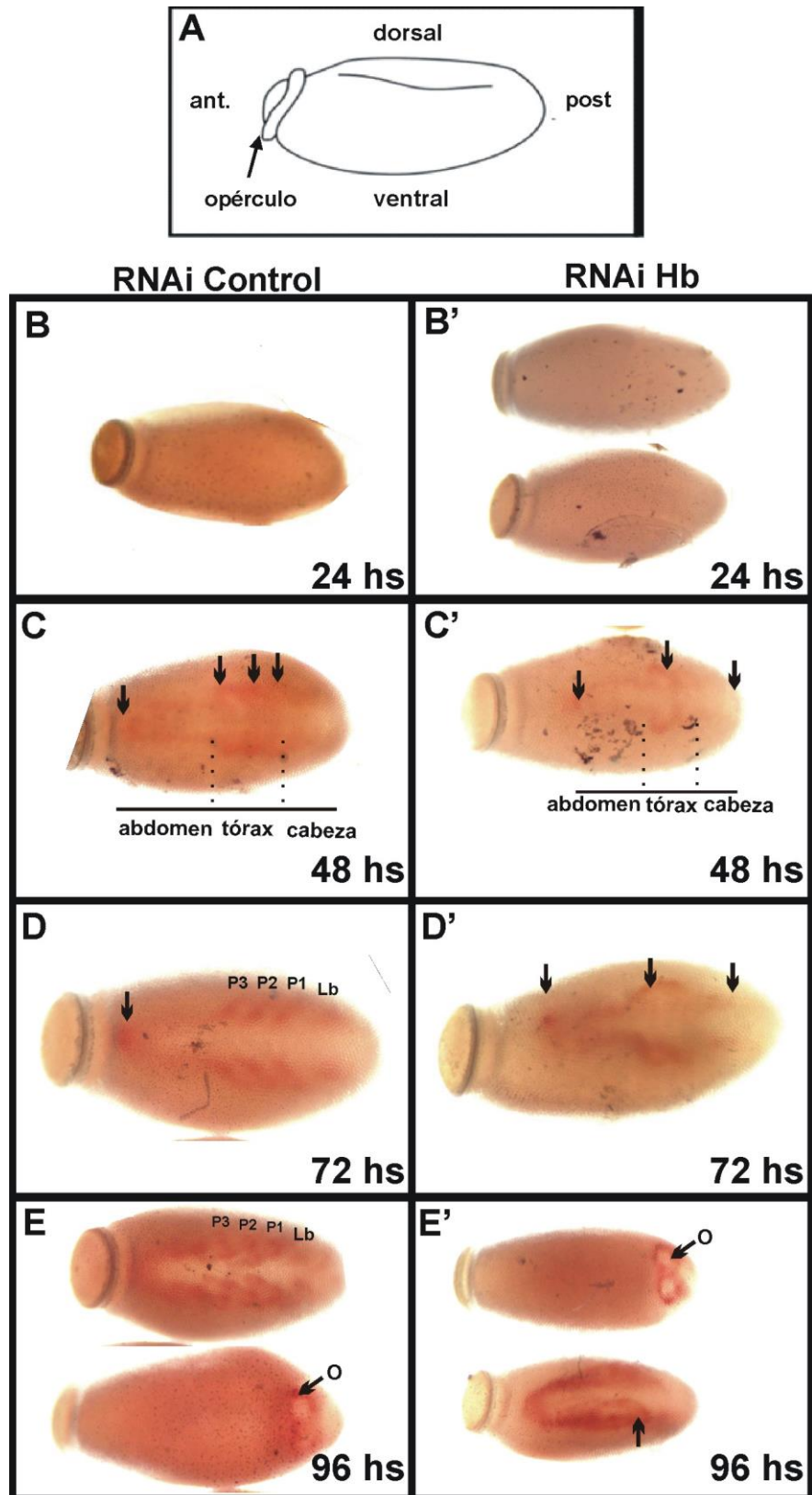


Figura 8. Anomalías durante el desarrollo de los huevos interferidos para el gen Hb de *R. prolixus*, en los primeros 4 días (96 hs) de embriogénesis. (A) Esquema de los ejes A-P y D-V del huevo (ant., anterior; post., posterior). (B-E) Huevos controles y (B'-E') Huevos interferidos a distintos tiempos de desarrollo, indicándose las regiones corporales y los apéndices que se pueden distinguir. ZC: Zona de

Crecimiento (extremo posterior del embrión). Lb: labio (último apéndice gnatal). P1: primer par de patas. P2: segundo par de patas. P3: tercer par de patas. O: ojos.

Entre el 5to y 6to día de desarrollo (120-144 hs DPH) es el periodo donde ocurrió la katatrepsis. En esta etapa el embrión se mueve desde la región posterior del huevo hacia la región anterior, rotando 180°. De esta manera, la cabeza (que se encuentra en la parte posterior del huevo) termina posicionada en el extremo anterior. Cuando esta etapa culmina, los ejes A-P y D-V del huevo y del embrión coinciden. En el caso de los embriones interferidos no se encontró ninguno que realizara con éxito la katatrepsis. Varios de los embriones intentaron rotar hacia el extremo anterior del huevo, pero ninguno tuvo éxito, sin siquiera llegar la mitad de su recorrido (Fig. 9 A-B y A'-B'). A partir de este estadio los embriones interferidos detuvieron su desarrollo, sin completar la katatrepsis ni realizar el cierre dorsal, de forma tal que permanecieron inalterados hasta el día 14 DPH, día en el cual los embriones control eclosionaron (Fig. 9 C-E y C'-E').

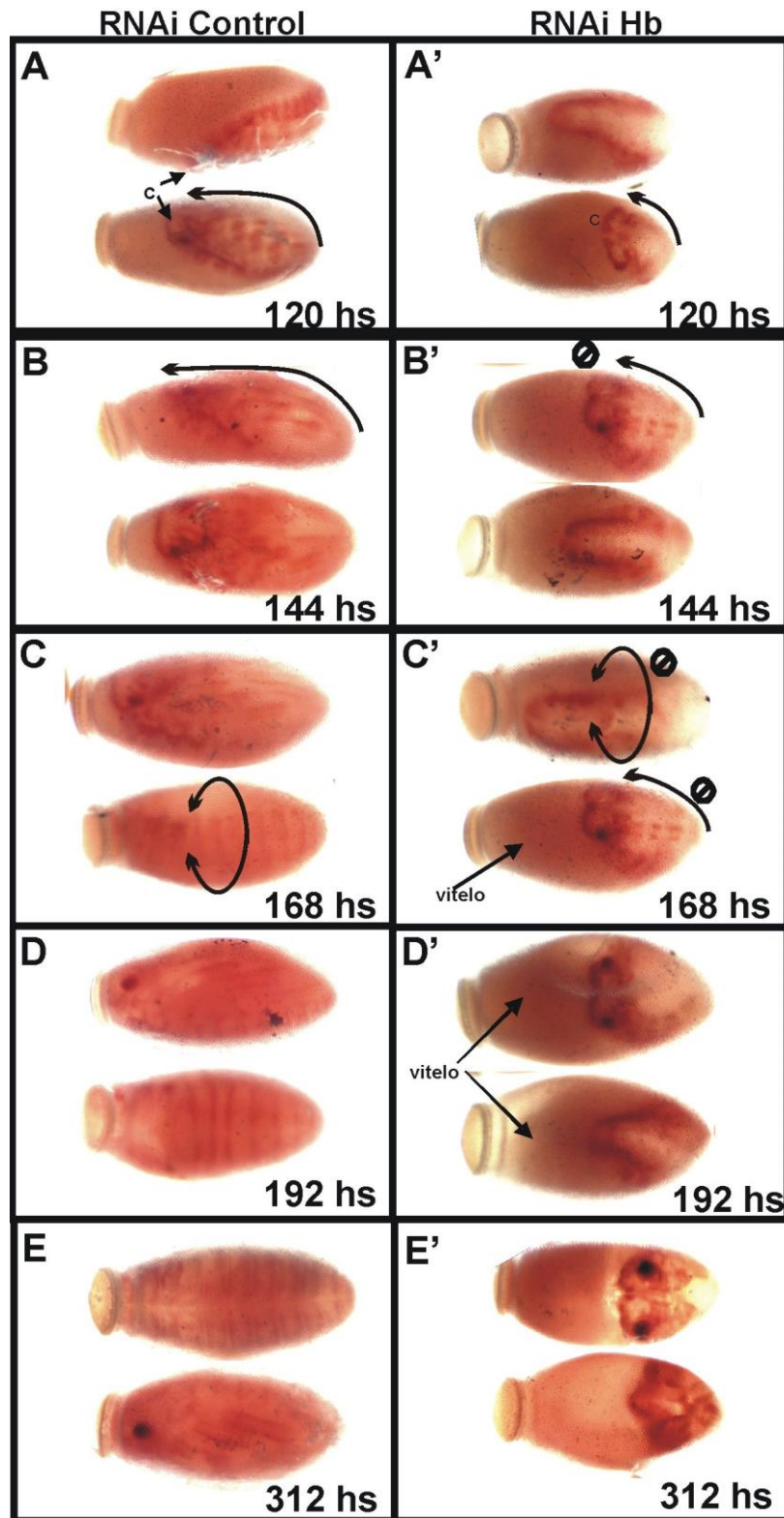


Figura 9. Anomalías durante el desarrollo de los huevos interferidos para el gen Hb de *R. prolixus*, desde comienzo de katatrepsis (120 hs de embriogénesis) hasta supuesto tiempo de emergencia (312 hs). (A-E) Huevos controles. (A'-E') huevos interferidos. Flechas curvas a los 120-144 hs de desarrollo indican el movimiento que siguen los embriones controles o deberían seguir los embriones interferidos para terminar la katatrepsis. Flechas curvas a las 168 hs DPH, durante el período de cierre dorsal,

muestran cómo se desarrollan los embriones controles o deberían desarrollarse los embriones interferidos encerrando al vitelo. C: Cabeza

Esto demuestra que la ausencia de *Rp-Hb* los embriones interferidos genera la detención del desarrollo embrionario, no pudiendo superar la etapa de katatrepsis ni realizar el cierre dorsal. En el siguiente capítulo de esta tesis analizaremos los cambios morfológicos que sufren los embriones ante la ausencia de *Rp-Hb*

Fenotipo embrionario Hb

Los efectos producidos por la ausencia de *Rp-Hb* en los embriones son muy amplios y afectan tanto a la región cefálica, torácica como abdominal. La parte más anterior de la cabeza (labro, segmento ocular y segmento antenal) se desarrolló normalmente. Sin embargo, los segmentos gnatales (Mandíbula Maxila, Labio) se vieron altamente afectados por la falta de *Rp-Hb* y fallaron en la formación de sus apéndices (Fig. 10).

Al examinar el tórax de los embriones interferidos, se observó la presencia de solo dos segmentos, con sus respectivos pares de patas, en lugar de los tres pares que poseen los embriones salvajes. Los apéndices torácicos presentes en estos embriones tenían una longitud menor a la de los embriones salvajes y frecuentemente la longitud del último par de patas era superior al del más anterior. Esto podría estar indicando que la acción de *Rp-Hb* es mayor en la parte anterior del tórax que en la posterior. Teniendo esto presente, y el hecho que los segmentos gnatales se ven altamente afectados por la interferencia, podemos suponer que el segmento torácico ausente en estos embriones corresponde al segmento T1, de forma tal que el efecto fenotípico de la ausencia de *Rp-Hb* disminuye hacia la parte posterior del embrión. En algunos casos se observó la presencia de un esbozo de segmento T1 ubicado entre el último segmento gnatal y el segundo segmento torácico. Esto apoyaría aún más la idea de que habría una pérdida del segmento T1 en los embriones con defectos más severos y que las patas que se observan corresponden a los segmentos torácicos 2 y 3 (Fig. 10 B-D).

En lo que se refiere a los cambios presentes en el abdomen, se pudo observar un claro acortamiento en comparación con los embriones salvajes. Esto se debe tanto a un acortamiento de los segmentos, como a una reducción en su número. En algunos casos, era tal la deformación del abdomen que no se pudo contar la cantidad de segmentos que formaban el abdomen, mientras que en otros se pudo comprobar que el número de

segmentos era menor (y más compactado) considerando los 10 segmentos abdominales que poseen los embriones salvajes (Fig. 10 D-F).

De esta forma se puede ver claramente como *Rp-Hb* está implicado en la morfogénesis a lo largo del eje A-P del embrión, determinando la correcta formación de los segmentos y apéndices gnatales, torácicos y abdominales, alterando así la longitud total del embrión

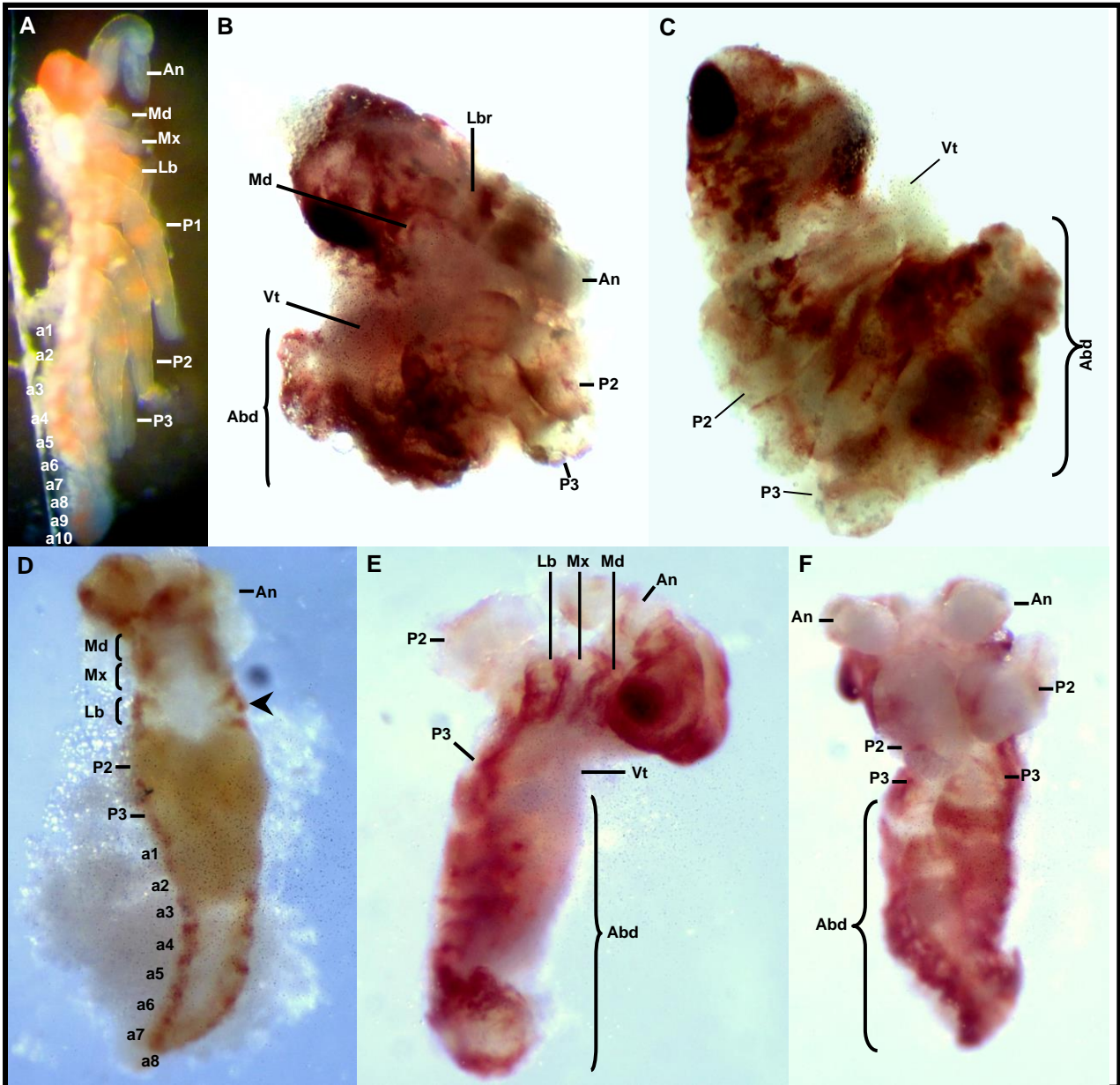


Figura 10. Fenotipo embrionario Hb en *R. prolixus*. (A) Vista lateral de un embrión salvaje de aproximadamente 72 hs de desarrollo. Se observan claramente los 3 segmentos gnatales (Mn, Mx, Lb), los 3 segmentos torácicos y sus apéndices (patas) y los 10 segmentos abdominales. (B-C) Ambas vistas laterales del mismo embrión interferido, el cual posee el segundo y tercer par de patas, altamente reducidos (los segmentos más anteriores no se pueden visualizar claramente). El abdomen está extremadamente contraído y desorganizado. (D) Embrión interferido de aproximadamente 48 hs DPH. No se pueden distinguir apéndices gnatales ni los del primer segmento torácico. La flecha marca el primordio de primer segmento torácico, entre el segmento labial y el torácico 2. El segundo par de patas se encuentra reducido en comparación con el tercero. Pueden observarse únicamente 8 segmentos abdominales. Estos se indican con números correlativos, que no se corresponden necesariamente al salvaje. (E-F) Vista dorso-lateral (E) y ventral (F) del mismo embrión. Los apéndices gnatales se encuentran ausentes o muy reducidos. No se distingue el primer segmento torácico. Se observa el segundo y tercer segmento torácico con sus apéndices. Nótese la reducción del segundo par en comparación con el tercer par. El abdomen está contraído y desorganizado hacia posterior, siendo identificable únicamente los primeros segmentos. An: Antena. Lbr: Labro. Md: mandíbula. Mx: maxila. Lb: Labio. P1-3: primer a tercer par de patas. Abd: Abdomen. a1-10: primer a décimo segmento abdominal. Vt: Vitelo

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

Características conservadas del gen Hb

La proteína Hb pertenece a una amplia familia de proteínas que comparten como característica principal la presencia de dedos de zinc de tipo C_2H_2 . Estos motivos fueron descritos por primera vez en el Factor de Transcripción IIIA de *Xenopus laevis* (Brown *et al.*, 1985; Miller *et al.*, 1985; Schuh *et al.*, 1986). Los análisis estructurales realizados sobre las proteínas de esta familia revelaron que son dos residuos de Cisteína y dos de Histidina los que coordinan la unión del ión zinc al dominio, y que esta unión es requerida para que los aminoácidos que forman el dominio se plieguen de manera adecuada para reconocer secuencias específicas de unión tanto al ADN como al ARN e interactuar con otras proteínas (Berg, 1988; Hahm *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1989; Mackay y Crossley, 1998; McCarty *et al.*, 2003; Pavletich y Pabo, 1991).

Los rasgos que distinguen a Hb del resto de los miembros de la familia de dedos de zinc son la presencia de cuatro de estos dominios en la posición central de la proteína y dos en el extremo C-terminal. A los primeros se los conoce como dedos de zinc de posición central (MF) 1, 2, 3 y 4, y a los segundos como dedos de zinc de extremo C-terminal (CF) 1 y 2 (Pinnell *et al.*, 2006; Tautz, 1987). Además, es probable que el ortólogo más ancestral de Hb haya poseído dos dominios de dedos de zinc adicionales hacia el extremo N-terminal (NF1 y 2), ya que se encuentran altamente conservados en las especies evolutivamente “más primitivas”, como *C. elegans*, *H. triserialis*, *L. migratoria*, *S. americana*, *O. fasciatus* y *R. prolixus* (Liu y Kaufman, 2004; Patel *et al.*, 2001; Pinnell *et al.*, 2006). Por último, excluyendo a los dedos de zinc, hay otras regiones conservadas que caracterizan a los miembros de la familia de proteínas Hb llamados dominios *Box*. Estos varían entre 7 y 54 aminoácidos de longitud, y fueron encontrados mediante estudios comparativos de ortólogos de la proteína Hb en insectos y por análisis funcionales de regiones en el ortólogo de *D. melanogaster* (Hulskamp *et al.*, 1994; Kraft y Jackle, 1994; Tautz, 1987; Wolff *et al.*, 1995).

El ortólogo del gen Hb localizado en el genoma de *R. prolixus* muestra altas similitudes con el resto de los ortólogos de este gen. Los 6 dominios típicos de este factor de transcripción (MF1-4 y CF1-2) se encuentran altamente conservados. Por otro lado, se hallaron dos dominios de dedos de zinc adicionales hacia el extremo N-terminal (NF1 y 2), los cuales también están presentes en de *O. fasciatus*, *L. migratoria*, *S. americana* y *D. pulex*.

Además, se encontraron tres dominios *box*: el A, C y F (*Basic box*). Los últimos dos están conservados en todos los artrópodos analizados, mientras que el primero solo se encontró, además de en *R. prolixus*, en *O. fasciatus*, *L. migratoria*, *S. americana*, *D. melanogaster*, *T. castaneum* y *D. plexippus*. Sin embargo, se ha postulado que estos tres dominios podrían estar conservados entre los ortólogos de Hb de todos los insectos (Kraft y Jackle, 1994; Pinnell *et al.*, 2006; Wolff *et al.*, 1995).

Todo lo dicho anteriormente, junto con los bajísimo *e-value* que resultaron de la comparación de secuencias ortólogas ya conocidas de Hb, el alto grado de identidad obtenido a partir del alineamiento de los motivos conservados y la ubicación en la secuencia proteica de los dominios encontrados confirman que el gen encontrado en el genoma de *R. prolixus* codifica para la proteína ortóloga de Hb. Además, el árbol obtenido en base a estas secuencias refleja a grandes rasgos la filogenia de la clase Hexápoda, corroborando lo antes mencionado

Interferencia parental mediada por ARN (RNAi parental)

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 *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998; Guo y Kemphues, 1995). Se basa en el mecanismo de defensa de las células contra virus de ARN. En esencia, se inicia cuando largas cadenas de ARNdc son procesadas por la enzima Dicer (Bernstein *et al.*, 2001). Esta corta el ARNdc en fragmentos 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 *sense* del ARNpi (aquella que es igual en secuencia a la del ARN codificante) es degradada por nucleasas; mientras que 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 y Tuschl, 2004).

Esta técnica 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 lo conoce como 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 (Bucher

et al., 2002; He *et al.*, 2006; Hughes y Kaufman, 2000; Liu y Kaufman, 2004; Lynch y Desplan, 2010; Mito *et al.*, 2005; Schwager *et al.*, 2009). La gran diversidad de organismos en la que se aplicó esta metodología con éxito permite intuir que una de las características conservadas de la ARNi es la transferencia del ARNdc a través de los límites celulares (Bucher *et al.*, 2002). Además, se ha notado para el caso de ARNi parental 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; Liu y Kaufman, 2004). 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 aplicó la técnica de ARNi parental en *R. prolixus* con el fin de estudiar los fenotipos de pérdida de función embrionarios generados por la depleción del ARNm que codifica para la proteína Hb. Es importante resaltar que durante el período de investigación no se pudo demostrar la efectividad de la interferencia a medida que transcurría el tiempo desde la inyección debido a que, por un lado, todos los embriones tratados mostraron aproximadamente los mismos defectos en el desarrollo, por lo que no se los pudo agrupar clases de fenotipos de distinta intensidad, y por el otro, las hembras tratadas murieron repentinamente alrededor de la cuarta semanas luego de la primer postura, sin llegar a generar embriones normales hasta ese momento.

Por todo esto, queda claro que la técnica de ARNi parental utilizada en este trabajo de investigación cumplió con las expectativas previstas.

Fenotipo embrionario de falta de función de Hb

Fue a partir de los *screenings* genéticos en *D. melanogaster* realizados por Nüsslein-Volhard y Wieschaus (Nüsslein-Volhard y Wieschaus, 1980) que se descubrieron muchos de los genes de desarrollo que hoy en día conocemos, entre ellos el gen gap Hunchback. Ellos realizaron un exhaustivo *screening* genético en el genoma de la mosca en busca de mutaciones que afectaran el desarrollo embrionario, y denominaron como Hb al gen que mutado producía deleciones en dos grupos de segmentos: por un lado, los gnatales y torácicos, y por el otro, los 3 últimos abdominales. Posteriormente, este gen fue estudiado con mayor detalle, describiendo exhaustivamente su fenotipo mutante y patrón de expresión. En los mutantes con alelos nulos, todos los segmentos torácicos junto con el labial se eliminaron y se fusionaron los segmentos abdominales 7 y 8. (Hulskamp *et al.*, 1994). En los alelos hipomórficos más débiles solo el segmento

torácico 2 no se formó, mientras que las restantes partes del cuerpo parecieron normales. En los alelos hipomórficos más fuertes se fue perdiendo también el segmento torácico 3, el labial y el abdominal 8, con deformaciones en el torácico 1. Es interesante resaltar que encontraron además 3 mutaciones que no se ajustaron a la serie alélicas que obtuvieron (Lehmann y Nusslein-Volhard, 1987). Los embriones homocigotos para la mutación hb^{9K49} no poseían el segundo segmento torácico y el tercero estaba transformado en abdomen. Los mutantes homocigotas para Hb^{9K57} y hb^{14C} fueron descritos como embriones con el mismo fenotipo que los alelos amorfos, pero con transformaciones de los restantes segmentos gnatales en abdominales. Luego, se comprobó que la primera de estas mutaciones (hb^{9K49}) generaba únicamente una sustitución en el Box C y las otras 2 (Hb^{9K57} y hb^{14C}) un codón de stop prematuro que impedía la traducción del Box D y los últimos dos dedos de zinc (CF1-2) (Hulskamp *et al.*, 1994).

Hunchback también fue estudiado en otros insectos de banda germinal larga: *N. vitripennis* (Pultz *et al.*, 1999; Pultz *et al.*, 2005) y *A. mellifera* (Wilson y Dearden, 2011). En *A. mellifera*, los embriones con fenotipo débil mostraron pérdida de segmentos cefálicos por delante del segmento labial, fusión del tercer segmento torácico y el primer abdominal y pérdida de los últimos tres segmentos abdominales. En los embriones con fenotipos fuertes, la región anterior del embrión presentó serias dificultades para su formación, donde la región cefálica y torácica no se forma. A esto se le suma la pérdida de los últimos tres segmentos abdominales (al igual que los embriones con fenotipos débiles) (Wilson y Dearden, 2011).

En *N. vitripennis*, mediante un screening genético, se encontraron varias mutaciones en el genoma que generaban defectos en el desarrollo embriones (Pultz *et al.*, 1999; Pultz *et al.*, 2000). Una de estas, la que llamaron *headless*, producía una delección en el anterior del embrión que incluía a los segmentos cefálicos y torácicos y otra en el extremo posterior que abarcaba a los últimos 3 segmentos abdominales. Años después el mismo autor (Pultz *et al.*, 2005) volvió a estudiar esta mutación, encontrando que se debía a una delección en el ortólogo del gen Hunchback de *N. vitripennis*, la cual abarcaba la secuencia codificante para 5 dominios de dedos de zinc (el NF1 y los 4 MF), por lo que la mutación *headless* era en realidad una mutación nula de Hb.

En *L. migratoria* (Orden: Ortóptera), un insecto de banda germinal corta, también se encontró que la depleción del gen Hb afecta la segmentación tanto a anterior como a posterior del cuerpo (He *et al.*, 2006). Se agruparon los fenotipos obtenidos por ARNi

parental en 3 clases en base a la severidad. Los más débiles presentaban cambios morfológicos en el abdomen, con compactación y pérdida de segmentos, y patas deformes. Los intermedios mostraban una mayor severidad en los defectos abdominales, junto con la delección de todos los segmentos gnatales y torácicos. En los fenotipos más fuertes solo se encontraron los segmentos pre-gnatales, habiendo sido eliminadas las restantes partes del cuerpo. Los defectos encontrados en *R. prolixus* se asemejan a los fenotipos más leves de *L. migratoria*, estando en una posición intermedia entre el grupo de los débiles y los intermedios. Además, en *L. migratoria* se demostró que Hb se expresa durante el período de blastodermo y en la zona de crecimiento, durante la etapa de elongación de la banda germinal (Patel et al., 2001), lo que explicaría los defectos encontrados. Esto mismo podría estar ocurriendo en *R. prolixus*. Es importante remarcar que también en *L. migratoria* los embriones interferidos no completaron el cierre dorsal.

Mediante ARNi parental se estudió la función del gen Hb de *Gryllus bimaculatus* (Orden: Ortóptera), un insecto de banda germinal intermedia (Mito et al., 2005). Los fenotipos más débiles obtenidos, al igual que en *R. prolixus*, mostraron compactación y pérdida de segmentos abdominales, desaparición del segmento torácico 1, malformaciones en el segundo y tercer par de patas (siendo también el segundo par más afectado que el tercero) y ausencia de apéndices en los segmentos gnatales (a excepción de la mandíbula). En los fenotipos más fuertes, la compactación y pérdida de segmentos abdominales fue mayor, al igual que el acortamiento de las patas. Se encontró además que los segmentos deformados anteriores adquirirían una identidad abdominal. No puede descartarse la posibilidad de que esto también ocurra en los segmentos gnatales sin apéndices obtenidos en la interferencia de los embriones de *R. prolixus*. Estudiar si hay expresión de marcadores de abdomen (como por ejemplo el gen *abdA*) en estas regiones sería un mecanismo para corroborar o rechazar este supuesto. Nuevamente, ahora para el caso de *G. bimaculatus*, se demostró la expresión de Hb (entre otros períodos) en la etapa de blastodermo y en la zona de crecimiento (Mito et al., 2005).

Liu y Kaufman (Liu y Kaufman, 2004) investigaron el patrón de expresión y la función del gen Hb en *O. fasciatus*, un insecto que comparte con *R. prolixus* el Orden y el tipo de banda germinal. Los fenotipos embrionarios más débiles generados por ARNi parental mostraron únicamente defectos en el segmento labial y torácico 1. A medida que los fenotipos se hacían más severos, las alteraciones incluían a los segmentos circundantes (maxilar, tórax 2 y 3). Esto, al igual que en los resultados obtenidos en *R.*

prolixus, da idea de un gradiente de requerimiento de expresión de Hb, siendo la región del tórax 1 la más susceptible a las deficiencias de Hb. En los fenotipos más severos se encontraron, además, defectos abdominales. Estos eran, al igual que en el resto de los insectos nombrados hasta el momento, compactación y fusión de algunos segmentos abdominales. Así, los fenotipos del grupo IV de embriones interferidos en *O. fasciatus* son los más parecidos a los embriones de *R. prolixus* obtenidos en este trabajo, con defectos en los apéndices gnatales y torácicos, así como compactación y anomalías en los segmentos abdominales. Además, estos embriones tampoco completaron el cierre dorsal. Podría ocurrir que la interferencia generada en los embriones de *O. fasciatus* por estos investigadores no sea la máxima posible, y que una mayor disminución de la expresión de Hb genere fenotipos más parecidos a los obtenidos en *R. prolixus* o incluso a los observados en *L. migratoria* o *G. bimaculatus*. Lo que si comparten todos estos insectos, es que expresan Hb durante el estadio de blastodermo y en la zona de crecimiento, lo que aún no conocemos en *R. prolixus*.

En el insecto de banda germinal intermedia *T. castaneum* (Orden: Coleoptera), Schröder interpretó que los embriones obtenidos por ARNi parental contra Hb poseían deleciones de los segmentos maxilares, labiales y torácicos, generándose embriones mas cortos con los restantes segmentos normales (Schroder, 2003). Un re-análisis de las series fenotípicas generadas sugiere que en realidad los fenotipos observados se deben a una combinación de transformaciones y pérdidas de segmentos (Marques-Souza *et al.*, 2008). En los fenotipos más débiles, los segmentos maxilares, labiales y torácicos 1 pierden sus apéndices, lo que lo atribuyen a transformaciones de estos segmentos a abdomen. El segundo y tercer par de patas están presentes, aunque deformes. En mi opinión, estas diferencias de alteraciones permiten volver a intuir un gradiente de requerimiento de expresión de Hb. En los fenotipos más fuertes se observa una reducción en la longitud del embrión y al segmento mandibular seguido por varios segmentos con identidad de abdomen. Los autores interpretan que son los restantes segmentos gnatales y torácicos transformados en abdomen, seguidos de la desaparición de los segmentos abdominales. Alternativamente, el acortamiento del embrión puede interpretarse (ya en estos fenotipos muy severos) como la desaparición de alguno de los segmentos gnatales o torácicos junto con la compactación del abdomen. Esto sería más similar a lo observado en los embriones interferidos para el ortólogo de Hb de los insectos anteriormente mencionados. También en *T. castaneum*, Hb se expresa durante los estadios de blastodermo y elongación de la banda germinal (Wolff *et al.*, 1995)

La técnica de ARNi parental permitió el estudio de la función del gen *gap Rp-Hb*, al disminuir la expresión de dicho gen, y definir el fenotipo de falta de función del gen. En este caso, por las amplias regiones en las que se encontraron las deformaciones al reducirse la expresión del gen Hb en los embriones de *R. prolixus*, se puede confirmar que el gen Hb actúa también como un gen *gap* de desarrollo en este insecto.

Las deformaciones se encontraron tanto a anterior como a posterior de los embriones interferidos. En la región anterior del embrión, toda la zona que abarcó desde los segmentos gnatales (Md, Mx y Lb) hasta los torácicos (tórax 1, 2 y 3) se vio afectada. En ningún caso se detectó la presencia del primer par de patas, aunque en algunos embriones pudo verse un esbozo de tórax 1 entre el último segmento gnatal y el segundo segmento torácico. Tampoco pudieron observarse apéndices gnatales en ninguno de los embriones interferidos. Incluso, en ciertos casos, las malformaciones de la zona hicieron imposible una identificación apropiada de los segmentos mandibulares, maxilares y labiales. Los segmentos torácicos 2 y 3 se encontraron en todos los embriones, con sus correspondientes apéndices. Sin embargo, la longitud de los mismos era menor con respecto a la longitud de las patas de los embriones salvajes; siendo, a su vez, el segundo par de patas mucho menor en comparación con el tercero. Esto último podría estar denotando una mayor susceptibilidad del segmento torácico 2 en comparación al 3 a la disminución de la expresión de Hb. Así, queda claro que el gen Hb es requerido en *R. prolixus* para una correcta segmentación del área gnatal y torácica, y que actúa como un gen *gap* debido a que es necesario en una región muy amplia del embrión

En la zona posterior de los embriones, se encontraron defectos abdominales. En todos los casos, la longitud del abdomen fue inferior en comparación a la de los controles. Esto se debió a una combinación entre compactación y pérdida de segmentos. En algunos embriones, la compactación era tal que no se pudo identificar la cantidad de segmentos que estaban presentes. En otros casos, la compactación fue menor, pero igualmente el número de segmentos nunca igualó a los 10 que posee el abdomen de los embriones salvajes. De esta forma, también es probable que el gen Hb sea necesario en *R. prolixus* para una apropiada elongación de la banda germinal, actuando en la correcta formación y adición de segmentos abdominales sucesivos que ocurre desde la zona de crecimiento.

Si bien no se agruparon a los embriones interferidos en grupos de fenotipos en base a su severidad, las alteraciones en las distintas regiones corporales tienen cierto grado de

variación propia de la técnica de ARNi parental. Como se dijo anteriormente, con esta técnica se degrada el ARNm del gen diana, por lo que en algunos embriones puede haber una mayor degradación que en otros, dependiendo el contenido de ARNdc que fue brindado por la madre. Cuanto mayor es la degradación, menor es la cantidad de proteína funcional que se expresa. Esto puede ocasionar un gradiente de alteraciones en la zona donde actúa el gen interferido, siendo los defectos más severos los generados por una mayor reducción de la expresión del gen, y las regiones más afectadas las más susceptibles a esta disminución. Parece ser que el segmento más afectado por la disminución de la expresión del gen Hb en *R. prolixus* es el torácico 1. Este fue el único que se eliminó o se redujo de manera consistente, con la máxima penetrancia fenotípica. Los restantes defectos hacia anterior (en los segmentos gnatales) y posterior (en los restantes segmentos torácicos) son más leves, ya que no implican la desaparición de los mismos. Sin embargo, se puede suponer que el segmento torácico 2 es más susceptible a la merma en la expresión de Hb que el segmento torácico 3, ya que en la mayoría de los embriones el segundo par de patas era menor en longitud que el tercero. Lo mismo para la mandíbula con los restantes segmentos gnatales, dado que en algunos casos el único segmento gnatal identificable era este. Así, podría hablarse de un gradiente en el requerimiento del gen Hb en *R. prolixus* para un correcto desarrollo embrionario, siendo el segmento torácico 1 el que necesita mayores niveles de expresión de este gen, disminuyéndose los valores hacia anterior y posterior. Propongo, además, que las variaciones observadas en las alteraciones se deben a cambios muy pequeños en los niveles de expresión del gen Hb entre los embriones interferidos y que los fenotipos generados no se deben necesariamente a una completa degradación de transcritos, por lo que se podrían encontrar fenotipos más severos si se realizaran interferencias más fuertes. Algo similar podría ocurrir en el abdomen, donde los defectos encontrados también presentan cierto grado de variación.

Aunque el patrón de expresión normal de dicho gen no fue estudiado, por los fenotipos obtenidos se intuye que Hb se expresa al menos en dos momentos diferentes del desarrollo: durante el estadio de blastodermo y durante el período de elongación de la banda germinal. Como se dijo anteriormente, *R. prolixus* es un insecto de banda germinal intermedia. Como tal, los segmentos más anteriores del cuerpo (los pertenecientes a la cabeza y al tórax) se especifican durante el estadio de blastodermo mientras que los restantes segmentos aparecen más tarde en la embriogénesis durante la etapa de elongación de la banda germinal (Davis y Patel, 2002). Si el gen Hb en *R.*

prolixus se expresara únicamente durante el estadio de blastodermo, se esperaría que la técnica de ARNi no generara ningún efecto en el abdomen. Si cumpliera su función solamente durante el período de banda germinal, no habría defectos en las regiones más anteriores. El hecho de encontrar defectos tanto en regiones anteriores como posteriores de los embriones estaría apoyando la idea de una expresión en ambos períodos de desarrollo.

Además de lo dicho hasta el momento, es importante remarcar que ninguno de los embriones interferidos desarrolló cutícula, se cerró dorsalmente ni culminó con éxito la katatrepsis, por lo que se estimó que debido a la desregulación en la expresión de HB interrumpieron su crecimiento antes o alrededor de este período.

De esta forma, aunque con ciertas diferencias, los fenotipos generados por ARNi contra Hb en los insectos de banda germinal corta/intermedia son más similares entre sí que a los obtenidos por fallas en la función del gen Hb en insectos de banda germinal larga. Con la información que se posee hasta el momento del rol de Hb en la determinación del eje A-P en insectos, pareciera que en los insectos de banda germinal corta/intermedia el gen Hb actúa para una correcta formación de todos los segmentos hacia posterior a partir los gnatales, mientras que para los de banda germinal larga esta función se expande hacia anterior (abarcando más segmentos de la cabeza) y se contrae hacia posterior (abarcando únicamente los segmentos anteriores terminales). La figura 11 esquematiza estas relaciones.

| Especie | Tipo de BG | Segmentos afectados por Hb | | | | | | | |
|---------------------------|------------|----------------------------|------------|----|----|----|----|----|------------|
| | | Anteriores | Mn | Mx | Lb | T1 | T2 | T3 | Abdomen |
| <i>L. migratoria</i> | Corta | | [Redacted] | | | | | | [Redacted] |
| <i>G. bimaculatus</i> | Intermedia | | [Redacted] | | | | | | [Redacted] |
| <i>O. fasciatus</i> | Intermedia | | [Redacted] | | | | | | [Redacted] |
| <i>R. prolixus</i> | Intermedia | | [Redacted] | | | | | | [Redacted] |
| <i>T. castaneum</i> | Intermedia | | [Redacted] | | | | | | [Redacted] |
| <i>N. vitripennis</i> | Larga | [Redacted] | [Redacted] | | | | | | [Redacted] |
| <i>A. mellifera</i> | Larga | [Redacted] | [Redacted] | | | | | | [Redacted] |
| <i>D. melanogaster</i> | Larga | [Redacted] | [Redacted] | | | | | | [Redacted] |

Fig. 11. Esquematación del rol de Hb en la segmentación de insectos de banda germinal corta/intermedia y larga. Los recuadros en rojo indican las áreas del cuerpo que se encontraron afectadas en los embriones de los distintos insectos cuando se mutó o bloqueó la expresión del gen Hb. El recuadro en verde resalta que todos los segmentos abdominales se ven afectados únicamente en los insectos de banda germinal corta/intermedia. El recuadro rojo indica lo que podría ser un corrimiento hacia anterior de la función de Hb en insectos de banda germinal larga.

Observaciones finales

Es probable que en *R. prolixus*, como ocurre en los insectos de banda germinal corta/intermedia antes mencionados (Liu y Kaufman, 2004; Mito *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2001; Wolff *et al.*, 1995), Hb se exprese en dos estadios diferentes: durante el blastodermo y en la fase de elongación de la banda germinal. La primera fase de expresión estaría involucrada en el correcto desarrollo de los segmentos gnatales y torácicos, mientras que la expresión en el área de la zona de crecimiento estaría relacionada con la adición sucesiva de todos los segmentos abdominales.

Esto último podría ser lo que genera las diferencias entre los fenotipos de insectos de banda germinal corta/intermedia y los de banda germinal larga, en el extremo posterior de los embriones. Si la expresión de Hb en el lado posterior del huevo/embrión se correlaciona con una correcta formación de segmentos, los insectos de banda

germinal corta verán afectados todos los segmentos abdominales ya que se forman desde la zona de crecimiento mientras que los insectos de banda germinal larga solo tendrán afectados los segmentos abdominales formados en la región que abarca la expresión de Hb.

Las evidencias sugieren que sea cual sea el tipo de banda germinal del insecto, Hb se expresa también en la región anterior del huevo/embrión durante los estadios tempranos de desarrollo (Bender *et al.*, 1988; Liu y Kaufman, 2004; Mito *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2012; Pultz *et al.*, 2005; Wolff *et al.*, 1995), delimitando correctamente los segmentos anteriores. La proteína Hb de todos los insectos estudiados posee 6 dominios de dedos de zinc, los 4 MF y los 2 NF (He *et al.*, 2006; Hulskamp *et al.*, 1994; Liu y Kaufman, 2004; Mito *et al.*, 2005; Pinnell *et al.*, 2006; Pultz *et al.*, 2005; Wolff *et al.*, 1995). El análisis de la proteína encontrada en *R. prolixus* no contradice a esta tendencia. Puede ser posible, entonces, que estos dominios sean cruciales para una delimitación apropiada de los segmentos gnatales y torácicos, que son los más afectados por una alteración en la expresión de Hb en todos los insectos estudiados. Aunque no se hayan realizado experimentos de mutagénesis en la secuencia ortóloga de Hb en los insectos más ancestrales, la localización y el efecto de las mutaciones del gen Hb en *D. melanogaster* (Hulskamp *et al.*, 1994) y *N. vitripennis* (Pultz *et al.*, 2005) apoyarían esta idea, ya que los fenotipos más fuertes son los obtenidos cuando las mutaciones impiden la traducción de los 6 dominios de dedos de zinc (MF1-4 y CF1-2). De esta forma, el rol ancestral de la proteína Hb en el desarrollo embrionario de insectos podría ser la delimitación de estos segmentos junto con la correcta adición de segmentos abdominales a partir de la zona de crecimiento. Y, durante la transición evolutiva que generó a los insectos de banda germinal larga a partir de los de banda germinal corta, la función de especificar los segmentos gnatales y torácicos se conservó pero adquirió nuevos roles hacia anterior, abarcando los segmentos cefálicos más anteriores, y redujo su requerimiento hacia posterior, delimitando solo los segmentos abdominales más posteriores. Quizás, otros dominios sean los responsables de tales cambios.

Estudios más detallados de la expresión y función del gen Hb en otros insectos, así como también trabajos de regulación génica, tanto en insectos de banda germinal corta/intermedia como larga, podrían aclarar todas estas cuestiones y elucidar de qué forma Hunchback interviene en la determinación del patrón corporal de insectos en un marco evolutivo.

Concluyendo, en esta tesis de grado se realizó el primer análisis funcional del gen *gap* Hunchback en *R. prolixus*, insecto hematófago vector de la enfermedad del Chagas. Aquí, mostramos que este gen está altamente conservado tanto a nivel de secuencia como a nivel funcional, estando principalmente involucrado en la correcta formación de los segmentos gnatales y torácicos, así como en la determinación de la longitud y forma del abdomen. Quedó demostrado que no solo es un verdadero gen “*gap*”, sino que también tiene implicancias en la formación del patrón segmentario durante la fase de adición de segmentos a partir de la zona de crecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Anisimova M., Gascuel O. (2006). Approximate likelihood ratio test for branches: A fast, accurate y powerful alternative. *Syst Biol.* 55, 539-52
- Bender, M., Horikami, S., Cribbs, D., y Kaufman, T.C. (1988). Identification and expression of the gap segmentation gene hunchback in *Drosophila melanogaster*. *Dev Genet* 9, 715-732.
- Berg, J.M. (1988). Proposed structure for the zinc-binding domains from transcription factor IIIA and related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 99-102.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., y Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Brown, R.S., Sander, C., y Argos, P. (1985). The primary structure of transcription factor TFIIIA has 12 consecutive repeats. *FEBS Lett* 186, 271-274.
- Bucher, G., Scholten, J., y Klingler, M. (2002). Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Curr Biol* 12, R85-86.
- Casares, F., y Sanchez-Herrero, E. (1995). Regulation of the infraabdominal regions of the bithorax complex of *Drosophila* by gap genes. *Development* 121, 1855-1866.
- Cejka, D., Losert, D., y Wacheck, V. (2006). Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic? *Clin Sci (Lond)* 110, 47-58.
- Coura JR, 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, 2296-2297.
- 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.
- Damen, W.G. (2007). Evolutionary conservation and divergence of the segmentation process in arthropods. *Dev Dyn* 236, 1379-1391.
- Davis, G.K., y Patel, N.H. (2002). Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation. *Annu Rev Entomol* 47, 669-699.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., *et al.* (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36, W465-469.

- Dias, J.C., Prata, A., y 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., y Schofield, C.J. (2002b). The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 603-612.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. y Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. y Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fraser, A.G., Kamath, R.S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M. y Ahringer, J. (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* 408, 325-330.
- Garcia, E.S. y Azambuja, P. (2004). Lignoids in insects: chemical probes for the study of ecdysis, excretion and *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions. *Toxicon* 44, 431-440.
- Guindon S., Gascuel O.(2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*.52, 696-704
- Guo, S. y 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, 611-620.
- Hahm, K., Cobb, B.S., McCarty, A.S., Brown, K.E., Klug, C.A., Lee, R., Akashi, K., Weissman, I.L., Fisher, A.G. y Smale, S.T. (1998). Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev* 12, 782-796.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. y Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- He, Z.B., Cao, Y.Q., Yin, Y.P., Wang, Z.K., Chen, B., Peng, G.X. y Xia, Y.X. (2006). Role of hunchback in segment patterning of *Locusta migratoria manilensis* revealed by parental RNAi. *Dev Growth Differ* 48, 439-445.
- Hughes, C.L. y 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, 3683-3694.

- Hulskamp, M., Lukowitz, W., Beermann, A., Glaser, G. y Tautz, D. (1994). Differential regulation of target genes by different alleles of the segmentation gene hunchback in *Drosophila*. *Genetics* 138, 125-134.
- Hunter, C.P. (1999). Genetics: a touch of elegance with RNAi. *Curr Biol* 9, R440-442.
- Jurgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. & Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev Biol* 193, 283–295.
- Kollien, A.H. y Schaub, G.A. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today* 16, 381-387.
- Kraft, R. y Jackle, H. (1994). *Drosophila* mode of metamerization in the embryogenesis of the lepidopteran insect *Manduca sexta*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6634-6638.
- Krause, G. (1939). Die Eitypen der Insekten. *Biol Zentralbl* 59.
- Lavore, A. (2011). Análisis genómico-funcional de la embriogenesis de *Rhodnius prolixus*, vector de la enfermedad de Chagas. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.
- Lavore, A., Pagola, L., Esponda-Behrens, N. y 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.
- Lawrence, P.A. (1966) Gradients in the insect segment: The orientation of hairs in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. *J. Exp. Biol.*, 44: 607-20.
- Lawrence, P.A. (1971) The organization of the insect segment. *Symp. Soc. exp. Biol.* 25: 379-92.
- Lawrence, P.A., Crick, F.H.C. , Munro, M. (1972) A gradient of positional information in an insect, *Rhodnius*. *J. Cell Sci.* 11: 815-53.
- Lee, M.S., Gippert, G.P., Soman, K.V., Case, D.A. y Wright, P.E. (1989). Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. *Science* 245, 635-637.
- Lehmann, R. y 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.
- Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570.

- Liu, P.Z. y Kaufman, T.C. (2004). hunchback is required for suppression of abdominal identity, and for proper germband growth and segmentation in the intermediate germband insect *Oncopeltus fasciatus*. *Development* 131, 1515-1527.
- Liu, P.Z. y Kaufman, T.C. (2005). Short and long germ segmentation: unanswered questions in the evolution of a developmental mode. *Evol Dev* 7, 629-646.
- Lynch, J.A. y Desplan, C. (2010). Novel modes of localization and function of nanos in the wasp *Nasonia*. *Development* 137, 3813-3821.
- Mackay, J.P. y Crossley, M. (1998). Zinc fingers are sticking together. *Trends Biochem Sci* 23, 1-4.
- Maderspacher, F., Bucher, G. y Klingler, M. (1998). Pair-rule and gap gene mutants in the flour beetle *Tribolium castaneum*. *Dev Genes Evol* 208, 558-568.
- Marques-Souza, H., Aranda, M. y Tautz, D. (2008). Delimiting the conserved features of hunchback function for the trunk organization of insects. *Development* 135, 881-888.
- Martinez, J. y Tuschl, T. (2004). RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev* 18, 975-980.
- McCarty, A.S., Kleiger, G., Eisenberg, D. y Smale, S.T. (2003). Selective dimerization of a C2H2 zinc finger subfamily. *Mol Cell* 11, 459-470.
- Miller, J., McLachlan, A.D. y Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 4, 1609-1614.
- Mito, T., Sarashina, I., Zhang, H., Iwahashi, A., Okamoto, H., Miyawaki, K., Shinmyo, Y., Ohuchi, H. y Noji, S. (2005). Non-canonical functions of hunchback in segment patterning of the intermediate germ cricket *Gryllus bimaculatus*. *Development* 132, 2069-2079.
- Nusslein-Volhard, C. y Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
- Pagola, L. (2012). Análisis genómico y molecular de la embriogénesis de *Rhodnius prolixus*: implicancias morfológico-evolutivas en insectos. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata (La Plata).
- Patel, N.H., Hayward, D.C., Lall, S., Pirkel, N.R., DiPietro, D. y Ball, E.E. (2001). Grasshopper hunchback expression reveals conserved and novel aspects of axis formation and segmentation. *Development* 128, 3459-3472.
- Pavletich, N.P. y Pabo, C.O. (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 252, 809-817.

- Peel, A.D. (2008). The evolution of developmental gene networks: lessons from comparative studies on holometabolous insects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 1539-1547.
- Peel, A.D., Chipman, A.D. y Akam, M. (2005). Arthropod segmentation: beyond the *Drosophila* paradigm. *Nat Rev Genet* 6, 905-916.
- Perry, M.W., Bothma, J.P., Luu, R.D. y Levine, M. (2012). Precision of hunchback expression in the *Drosophila* embryo. *Curr Biol* 22, 2247-2252.
- Pinnell, J., Lindeman, P.S., Colavito, S., Lowe, C. y Savage, R.M. (2006). The divergent roles of the segmentation gene hunchback. *Integr Comp Biol* 46, 519-532.
- Pueyo, J.I., Lanfear, R. y Couso, J.P. (2008). Ancestral Notch-mediated segmentation revealed in the cockroach *Periplaneta americana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16614-16619.
- Pultz, M.A. y Leaf, D.S. (2003). The jewel wasp *Nasonia*: querying the genome with haplo-diploid genetics. *Genesis* 35, 185-191.
- Pultz, M.A., Pitt, J.N. y Alto, N.M. (1999). Extensive zygotic control of the anteroposterior axis in the wasp *Nasonia vitripennis*. *Development* 126, 701-710.
- 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., *et al.* (2005). A major role for zygotic hunchback in patterning the *Nasonia* embryo. *Development* 132, 3705-3715.
- Pultz, M.A., Zimmerman, K.K., Alto, N.M., Kaeberlein, M., Lange, S.K., Pitt, J.N., Reeves, N.L. y Zehrung, D.L. (2000). A genetic screen for zygotic embryonic lethal mutations affecting cuticular morphology in the wasp *Nasonia vitripennis*. *Genetics* 154, 1213-1229.
- Rivera-Pomar, R. y Jackle, H. (1996). From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: filling in the gaps. *Trends Genet* 12, 478-483.
- Rohr, K.B., Tautz, D. y Sander, K. (1999). Segmentation gene expression in the mothmidge *Clogmia albipunctata* (Diptera, psychodidae) and other primitive dipterans. *Dev Genes Evol* 209, 145-154.
- Rosenberg, M.I., Lynch, J.A. y Desplan, C. (2009). Heads and tails: evolution of antero-posterior patterning in insects. *Biochim Biophys Acta* 1789, 333-342.
- Rozen, S. y Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132, 365-386.
- Schofield, C.J. y Galvao, C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110, 88-100.

- Sander K. (1975) Pattern specification in the insect embryo. *Ciba Found Symp.* 29:241-63.
- Sander K, Schmidt-Ott U. (2004) Evo-Devo aspects of classical and molecular data in a historical perspective. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 302, 69-91.
- Schroder, R. (2003). The genes *orthodenticle* and *hunchback* substitute for *bicoid* in the beetle *Tribolium*. *Nature* 422, 621-625.
- Schuh, R., Aicher, W., Gaul, U., Cote, S., Preiss, A., Maier, D., Seifert, E., Nauber, U., Schroder, C., Kemler, R., *et al.* (1986). A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by *Kruppel*, a *Drosophila* segmentation gene. *Cell* 47, 1025-1032.
- Schwager, E.E., Pechmann, M., Feitosa, N.M., McGregor, A.P. y Damen, W.G. (2009). *hunchback* functions as a segmentation gene in the spider *Achaearanea tepidariorum*. *Curr Biol* 19, 1333-1340.
- Simpson-Brose, M., Treisman, J. y Desplan, C. (1994). Synergy between the *hunchback* and *bicoid* morphogens is required for anterior patterning in *Drosophila*. *Cell* 78, 855-865.
- Stollewerk, A., Tautz, D. y Weller, M. (2003). Neurogenesis in the spider: new insights from comparative analysis of morphological processes and gene expression patterns. *Arthropod Struct Dev* 32, 5-16.
- Tautz, D., Lehmann, R., Schnürch, H., Schuh, R., Seifert, E., Keinlin, A., Jones, K., Jäckle, H. (1987). Finger protein of novel structure encoded by *hunchback*, a second member of the gap class of *Drosophila* segmentation genes. *Nature* 327, 383-389.
- Timmons, L. y Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395, 854.
- Vazquez-Prokopec, G.M., Spillmann, C., Zaidenberg, M., Gurtler, R.E. y Kitron, U. (2012). Spatial heterogeneity and risk maps of community infestation by *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1788.
- Wilson, M.J. y Dearden, P.K. (2011). Diversity in insect axis formation: two *orthodenticle* genes and *hunchback* act in anterior patterning and influence dorsoventral organization in the honeybee (*Apis mellifera*). *Development* 138, 3497-3507.
- Wolff, C., Sommer, R., Schroder, R., Glaser, G. y Tautz, D. (1995). Conserved and divergent expression aspects of the *Drosophila* segmentation gene *hunchback* in the

short germ band embryo of the flour beetle *Tribolium*. *Development* 121, 4227-4236.

Wu, X., Vasisht, V., Kosman, D., Reinitz, J. y Small, S. (2001). Thoracic patterning by the *Drosophila* gap gene hunchback. *Dev Biol* 237, 79-92.

ANEXO 1

Esquema de la embriogénesis de *Rhodnius prolixus* (tomado de Esponda-Behrens y colaboradores, manuscrito en revisión)

