

**“ROL DE LOS ARN MENSAJEROS MATERNOS, NANOS Y PUMILIO,  
DURANTE LA OVOGÉNESIS Y DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO  
DE *RHODNIUS PROLIXUS*”**

Trabajo Final de Grado  
de la alumna



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

Pergamino, 14 de diciembre de 2023.

**“ROL DE LOS ARN MENSAJEROS MATERNOS, *NANOS* Y *PUMILIO*, DURANTE LA OVOGÉNESIS Y DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO DE *RHODNIUS PROLIXUS*”**

Trabajo Final de Grado de la alumna

**CAMILA LUDUEÑA**

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Ada Nazar)  
**Evaluador**

(Agustín Rolandelli)  
**Evaluador**

(María Inés Catalano)  
**Evaluador**

(Agustina Pascual)  
**Directora**

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

Pergamino, 14 de Diciembre de 2023.

## **AGRADECIMIENTOS**

Fueron muchas las personas que de alguna u otra manera estuvieron conmigo acompañándome en todo este camino.

En primer lugar, quiero agradecer a mi Directora de TFG, Agus Pascual, por todo su apoyo y contención constante. Por la paciencia, dedicación y compromiso. Todo lo que aprendí y crecí en este tiempo se lo debo a ella.

A toda la gente del CeBio, por recibirme tan bien desde el día uno. Nunca me hicieron sentir menos y los días en el laboratorio eran más lindos con ellos. En especial, quiero agradecer a Majito, que me ayudó muchísimo en estos últimos meses.

A toda mi familia, en especial a mi mamá y mis hermanas. Gracias por estar siempre presentes. Nada hubiese sido posible sin su apoyo incondicional.

A todos mis compañeros de cursada y estudio. Gracias por hacer de mis horas de cursada una fiesta. Gracias por los mates compartidos, las tardes y noches de estudio.

Gracias a los amigos que me dejó la universidad, a Leo, Noe, Vale, Mai y Yami. Gracias por tanto años de risas. Sin todos ellos no hubiera sido lo mismo. ¡GRACIAS POR TANTO!

A todas mis amigas de la vida. Gracias por el apoyo de siempre. Siempre pendientes e incondicionales.

# Índice

<b>Resumen</b>	<b>5</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>7</b>
<b>Introducción</b>	<b>9</b>
<i>Rhodnius prolixus</i> como organismo modelo	10
Embriogénesis en insectos	12
Embriogénesis en <i>Rhodnius prolixus</i>	15
Ovogénesis en insectos	18
Ovogénesis en <i>Rhodnius prolixus</i>	20
Gentes maternos: <i>nanos</i> y <i>pumilio</i>	23
<b>Hipótesis y objetivos</b>	<b>27</b>
Hipótesis	28
Objetivo general	28
Objetivos específicos	28
<b>Materiales y métodos</b>	<b>29</b>
1. Mantenimiento de lo colonia de <i>R. prolixus</i>	30
2. Diseño de oligonucleótidos	30
3. Anotación Génica	31
4. Validación Génica	32
1. Síntesis de ADN copia y validación de la expresión por PCR de punto final (RT-PCR)	32
2. Cuantificación de la expresión mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR)	33
5. Hibridación <i>in situ</i>	34
6. Silenciamiento Génico por ARN de Interferencia	34
7. Evaluación de fenotipos observados	35
<b>Resultados</b>	<b>37</b>
1. Anotación génica de <i>Rp-pumilio</i>	38
2. Análisis de la expresión de <i>Rp-nos</i> y <i>Rp-pum</i>	40
2.1. Validación de la expresión génica	40
2.2. Patrón de localización del ARNm de <i>Rp-nos</i> y <i>Rp-pum</i>	41
3. Análisis funcional de los genes <i>Rp-nos</i> y <i>Rp-pum</i>	43
<b>Discusión</b>	<b>47</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>55</b>
<b>Material Suplementario</b>	<b>57</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>60</b>

# RESUMEN

El inicio del desarrollo embrionario está intrínsecamente ligado a una secuencia compleja de procesos que tienen lugar durante la ovogénesis. Estos procesos son responsables de establecer los ejes corporales, llevar a cabo la vitelogénesis y formar el corion. La regulación de este proceso es dirigida por la acción y la interacción de genes específicos que intervienen durante la ovogénesis, determinando así la morfología final del insecto. A pesar de la existencia de abundante literatura sobre la estructura del ovario y los factores fisiológicos que orientan la ovogénesis en insectos, el repertorio genético subyacente ha sido exhaustivamente estudiado únicamente en *Drosophila melanogaster*. Dentro de este grupo de genes se destacan *nanos (nos)* y *pumilio (pum)*, genes de origen materno, fundamentales para el correcto desarrollo del ovocito. Se plantea a *Rhodnius prolixus* como un organismo modelo para investigar el papel de *Rp-nos* y *Rp-pum* durante la ovogénesis y el desarrollo embrionario temprano que caracteriza a dicho triatomino. En un inicio, se decidió examinar la dinámica de expresión de estos genes a lo largo de las diversas etapas que definen a la ovogénesis y durante los primeros estadios del desarrollo embrionario. Esto fue complementado con análisis de hibridación *in situ* para determinar su patrón de localización. Como resultado, se concluyó que *Rp-nos* y *Rp-pum* son genes de expresión materna. Posteriormente, se procedió a investigar el papel que desempeñan durante dicho proceso mediante el silenciamiento génico específico mediado por la técnica ARN interferente (ARNi) parental. Este estudio reveló que *Rp-nos* contribuye al establecimiento del desarrollo embrionario, especialmente en la formación de los segmentos torácicos y abdominales; mientras que *Rp-pum* resulta esencial para la fertilidad y fecundidad del triatomino. Dado el papel crucial de la ovogénesis en el ciclo de vida del insecto, los resultados obtenidos permitieron identificar genes clave involucrados en el desarrollo del ovocito, aportando así conocimientos significativos sobre la biología reproductiva del vector responsable de la enfermedad de Chagas.

## ABREVIATURAS

µg: microgramos.

µl: microlitro.

µm: micrómetro.

µM: micromolar.

ml: mililitro.

mm: milímetro.

mM: milimolar.

aa: aminoácidos.

ADNc: molécula de ADN complementaria a un mensajero de ARN.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNdc: ácido ribonucleico doble cadena.

ARNi: ARN de interferencia.

ARNm: Mensajero de ARN.

BGC: banda germinal corta.

BGI: banda germinal intermedia.

BGL: banda germinal larga.

BrEt: Bromuro de Etidio.

dNTP: trifosfato de desoxiribonucleotido.

Fw: del inglés *Foward*.

H<sub>2</sub>O: agua pura.

oligos: oligonucleótidos.

ON: *over night*.

pb: pares de bases.

PCR: (Reacción en Cadena de la Polimerasa), del inglés *Polymerase Chain Reaction*.

PBS: (Solución Fosfato Salina), del inglés *Phosphate Buffer Saline*.

PFA: paraformaldeido.

qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

Rv: del inglés *Reverse*

rNTP: trifosfato de ribonucleótido.

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción.

T<sup>°</sup>m: Temperatura de *melting*.

U: unidad enzimática.

V: voltios.

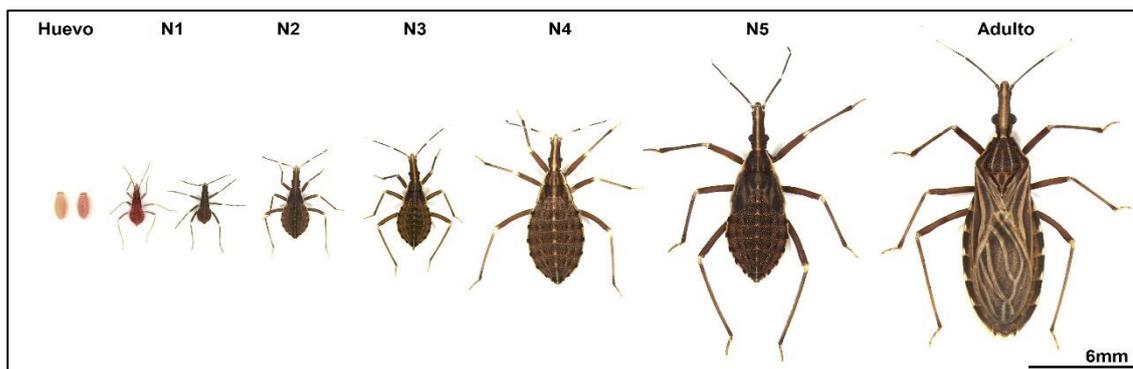
Zn-F: del inglés *Zinc Finger* (dominio proteico tipo dedo de Zinc).

# **INTRODUCCIÓN**

## ***Rhodnius prolixus* como organismo modelo**

Los insectos desempeñan un papel crucial en los ecosistemas terrestres, así como también por su notable influencia en la sociedad humana (Guzmán – Mendoza et al., 2016). Con más de un millón de especies descritas en todo el mundo, se destacan como el grupo animal más exitoso en términos evolutivos (Purvis & Hector, 2000; Stork, 2018). Este éxito se atribuye a su gran abundancia, diversidad y capacidad para colonizar una amplia variedad de hábitats como resultado de un largo proceso evolutivo (Mattoni et al., 2000; Stork, 2018), que condujo a adaptaciones específicas en respuesta a las presiones selectivas del entorno (Grimaldi & Engel, 2005; Belles, 2020).

Entre los insectos, Hemiptera es un orden numeroso y diverso que comprende cerca de 90.000 especies conocidas. La sinapomorfía de este orden es la forma del aparato bucal, tipo suctopírador, con modificaciones de la mandíbula y maxila, que dan lugar a la formación de dos canales abiertos: uno permite el traspaso de la saliva y el otro es utilizado para succionar savia o fluidos animales (Berenbaum, 1996). Dentro de dicho orden se encuentra la especie *Rhodnius prolixus*, insecto hematófago perteneciente a la subfamilia Triatominae (género *Reduviidae*). Es un insecto hemimetábolo, el cual presenta un crecimiento gradual donde las ninfas se asemejan a la morfología adulta, y no atraviesan transformaciones bruscas (Anderson, 1972; Belles, 2020) (Figura 1).



**Figura 1. Ciclo de vida de *R. prolixus*.** Huevos, estadios ninfales (N1 – N5) y adulto de *Rhodnius prolixus*. La variación del color en los huevos hace referencia al avance del estadio de desarrollo del embrión, siendo el color rosa intenso los estadios más tardíos del desarrollo. Figura extraída de <https://www.goconqr.com/es/p/5960102>.

*R. prolixus* es capaz de transmitir el protozoo *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Se estima que entre 6 y 7 millones de personas están infectadas crónicamente por *T. cruzi*, y entre 50 y 60 millones corren el riesgo de contraer la enfermedad (Coura & Dias, 2009; Aldasoro et al., 2017; Kratz et al., 2018). Debido a la ausencia de vacunas y tratamientos efectivos contra la enfermedad, el control del vector es el único medio para reducir la transmisión de la misma (Sosa et al., 2009; Buarque et al., 2013).

Debido tanto a su interés sanitario como biológico, se lo considera como organismo modelo de estudio, elegido en comparación con los otros vectores de la enfermedad (*Triatoma spp.* y *Panstrongylus spp.*), debido a que su ciclo de vida es más corto, lo que lo convierte en un modelo de estudio flexible y práctico para el trabajo de laboratorio. *R. prolixus* es uno de los insectos modelo sobre el cual se construyeron las bases de la fisiología y endocrinología de los insectos (Buxton, 1930; Wigglesworth, 1934a; 1951; 1964; Edwards, 1998; Davey, 2007;). Además, han sido descritas las etapas del desarrollo embrionario de este triatomino, a partir del cual se identificaron eventos claves como la formación de la banda germinal y los movimientos morfogenéticos de la anatrepsis y katrepsis (Kelly & Huebner, 1989; Mellanby, 1935, 1936).

La disponibilidad y accesibilidad de datos genómicos (<https://www.vectorbase.org/>) y transcriptómicos (Medeiros et al., 2011; Ribeiro et al., 2014; Brito et al., 2018; Cardoso et al., 2020; Leyria et al., 2020b; Pascual

& Rivera-Pomar, 2022), han permitido efectuar la identificación de genes ortólogos conservados durante las primeras etapas del desarrollo embrionario; además, el desarrollo de diversas herramientas moleculares (Lavore et al., 2012; Pascual et al., 2021) posibilitaron la caracterización genética de dicho proceso en el triatómido (Lavore et al., 2015; Sedra & Lange, 2016; Pascual et al., 2021; Lange et al., 2022; Pascual y Rivera-Pomar, 2022). Asimismo, debido a la relevancia de los procesos reproductivos en insectos vectores como posible blanco para agentes de control, en los últimos años, se han estudiado en detalle las bases moleculares y genéticas que dirigen el proceso de ovogénesis en *R. prolixus* (Atella et al., 2005; Alves - Bezerra et al., 2016; Vieira et al., 2018; Brito et al., 2018; Coelho et al., 2021; Pascual et al., 2021; Pascual & River – Pomar, 2022; Faria-Reis et al., 2023). A pesar de los avances significativos, aún quedan cuestiones por dilucidar.

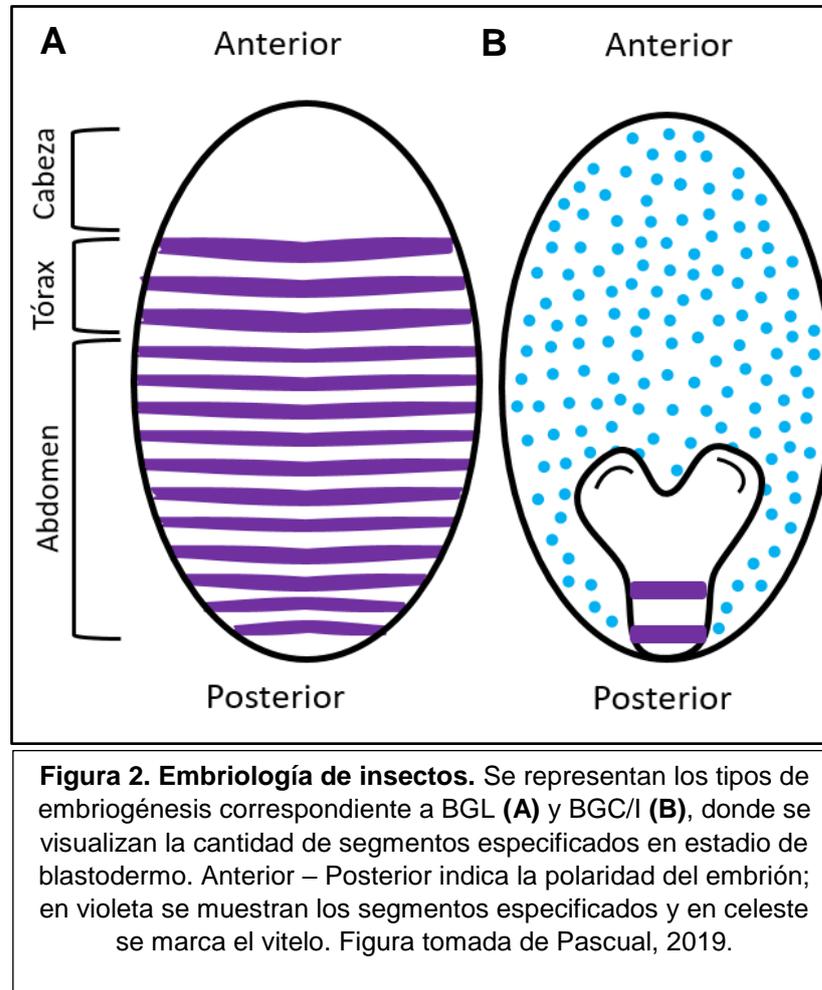
## **Embriogénesis de insectos**

El plan corporal de los insectos se encuentra altamente conservado; poseen una cabeza que consta de 6-7 segmentos, un tórax con 3 segmentos y un abdomen constituido por 8-11 segmentos. Dicha conservación morfológica esconde una gran diversidad subyacente en el desarrollo embrionario que da origen a este plan corporal (Davis & Patel, 2002; Liu & Kaufman, 2005; Lynch et al., 2012).

La embriogénesis comienza con repetidas divisiones nucleares en el centro del huevo, sin divisiones citoplasmáticas, formándose un gran sincitio. Luego estos núcleos migran a la periferia y dan lugar al estadio de blastodermo; el cual pasa de sincitial a celularizado a medida que avanza el desarrollo (Davis & Patel, 2002).

Luego del estadio de blastodermo, la embriogénesis entre los distintos grupos de insectos varía respecto a cómo y cuándo se define el patrón corporal segmentado, lo que permite clasificarlos en tres grandes grupos: insectos de banda germinal larga (BGL), corta (BGC) e intermedia (BGI) (Figura 2) (Krause, 1939; Davis & Patel, 2002). Esta clasificación se establece en base al número

de segmentos especificados en el rudimento embrionario antes de que tenga lugar el estadio de gastrulación (Krause, 1939; Tautz et al., 1994).



Los desarrollos embrionarios de BGC e BGI son una forma de embriogénesis más primitiva, representadas en los órdenes más basales de insectos, en los cuales sólo los segmentos cefálicos y/o torácicos son especificados en estadios previos a la gastrulación, los restantes son formados de manera secuencial a partir de una zona de crecimiento localizada en la región posterior de la banda germinal (BG) (Figura 2B) (Krause, 1939; Sander, 1981; Davis & Patel, 2002). La diferencia entre un desarrollo embrionario de BGC e BGI radica en el número de segmentos anteriores especificados, siendo mayor en BGI con respecto a BGC (Liu & Kaufman, 2004a, b). El desarrollo embrionario del tipo BGL se da en insectos más evolucionados, como dípteros e

himenópteros (Davis & Patel, 2002; Liu & Kaufman, 2005) (Figura 2A) donde todos los segmentos son especificados de manera simultánea durante el estadio de blastodermo.

Paradójicamente, los procesos de desarrollo embrionario, incluido la segmentación, han sido estudiados en organismos de BGL, específicamente en *Drosophila melanogaster* (Rivera-Pomar & Jackle, 1995; Gregor et al., 2007; Jaeger, 2011), permitiendo explicar la red génica que regula y dirige cada una de las etapas del proceso. El control de la segmentación está dado por una red jerárquica de genes, los cuales forman un circuito de activación – represión (Nusslein-Volhard et al., 1980; Nusslein-Volhard et al., 1987; Lawrence, 1992). El primer control comienza con factores génicos que son depositados por la madre en el ovocito en desarrollo, llamados genes maternos; los cuales establecen gradientes a lo largo del embrión que determinan la polaridad básica del mismo. En un nivel inferior y, regulado por dichos genes, están los genes *gap*, de origen cigótico que se expresan en extensos dominios parcialmente superpuestos, determinando grandes regiones corporales. Los genes *gap* no solo controlan a los de su misma clase, sino que también permiten la activación de los genes *pair – rule* (Sauer et al., 1996), los cuales se expresan de manera alternada en un patrón de franja de siete bandas verticales perpendiculares al eje anteroposterior (A-P), dividiendo al embrión en unidades periódicas que se denominan parasegmentos. A su vez, dichos genes activan la transcripción de los genes de polaridad de segmento que dividen al embrión en catorce unidades segmentarias, estableciendo la periodicidad del embrión (Lawrence, 1992).

En conjunto, los productos de los genes *gap*, *pair-rule* y de polaridad de segmento interactúan para regular la expresión de los genes selectores homeóticos, cuya transcripción determina el destino de desarrollo e identidad de cada segmento (Martínez-Arias & Lawrence, 1985; Harding et al., 1989; Lawrence, 1992).

En los insectos de BGC/BGI, la especificación se da por las interacciones de los factores génicos con proteínas ancladas en la membrana, activando distintas vías de señalización. De esta forma, como producto de la expresión génica diferencial en cada segmento en formación, cada uno obtiene una

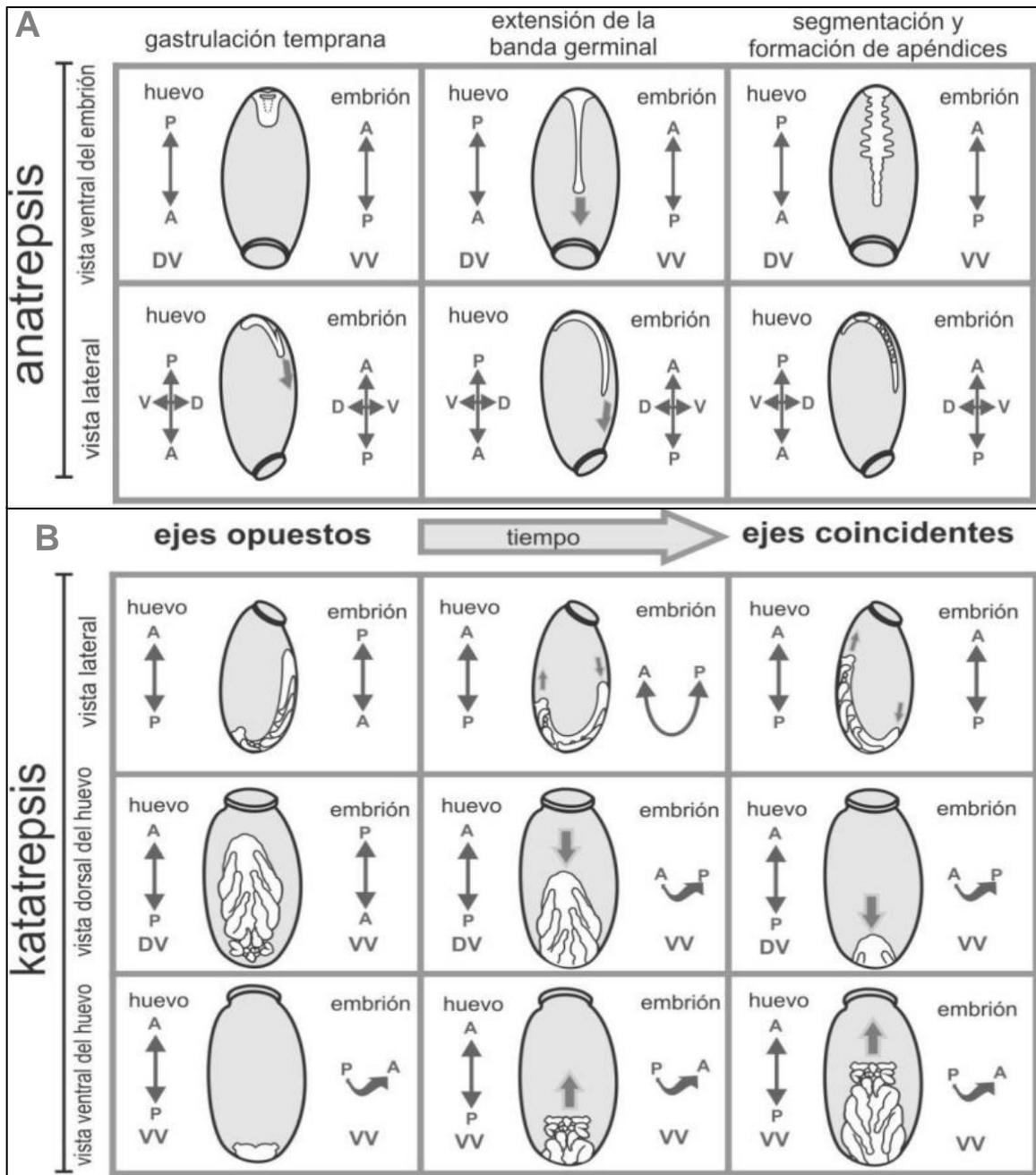
identidad corporal determinada (Davis & Patel 2002). La mayoría de los genes del desarrollo identificados originalmente en *D. melanogaster* resultaron desempeñar funciones similares en organismos de BGC/BCI (Damen et al., 2007; Farzana & Brown, 2008; Lynch & Desplan, 2010; Schmitt-Engel et al., 2012; Lavore et al., 2012, 2014; Janssen & Budd, 2013; Clark, 2017; Clark & Peel, 2017; Reding et al. 2019; Pascual et al., 2021; Pascual & Rivera - Pomar, 2022; Klingler & Bucher, 2022). Estos avances reconcilian y acercan las diferencias observadas respecto a cómo se modela el patrón corporal.

### **Embriogénesis en *Rhodnius prolixus***

El desarrollo embrionario de *R. prolixus* se caracteriza por ser del tipo BGC y ha sido descrito a nivel morfológico y celular (Mellanby, 1934, 1935; Kelly & Huebner, 1989; Liu & Kaufman, 2005; Berni et al., 2014; Heming, 2018). En este tipo de embriogénesis, una vez que se establece el blastodermo celular, algunas células migran hacia el polo posterior del huevo para dar lugar al desarrollo del rudimento embrionario, mientras que las restantes originan las estructuras extraembrionarias. A medida que se forma el rudimento embrionario, las células se invaginan en el polo posterior del huevo; desplazándose desde la cara ventral hacia la cara dorsal del mismo, dando inicio a la gastrulación (Figura 3A). En simultáneo, se produce la elongación de la BG desde su extremo posterior, en dirección al polo anterior del huevo, y tiene lugar la primera fase blastocinética, llamada anatrepsis, en donde los ejes del huevo y del embrión no son coincidentes.

Cuando la elongación de la BG se completa, ocurre la segunda fase blastocinética o katatrepsis (Figura 3B). El embrión avanza por su extremo anterior, en dirección al polo anterior del huevo, estableciéndose la orientación definitiva y coincidente de ejes embrionarios y del huevo. Visto lateralmente, el recorrido del embrión tiene forma de “U” (Mellanby, 1935; Johannsen & Butt, 1941; Kelly & Huebner, 1989; Heming, 2003; Panfilio et al., 2006). En este momento culmina la primera etapa del desarrollo conocida como desarrollo

temprano, ya no se producen otros cambios morfológicos externos y comienza la organogénesis –desarrollo tardío–.



**Figura 3. Representación esquemática del proceso de anatrepsis (A) y katrepsis (B) de *R. prolixus*. VD, vista dorsal; VV, vista ventral; A, anterior; P, posterior; D, dorsal; V, ventral. Tomada de Esponda – Behrens, 2013.**

La información genómica y transcriptómica disponible (Medeiros et al., 2011; Ribeiro et al., 2014; Brito et al., 2018; Cardoso et al., 2020; Leyria et al., 2020b; Cohelo et al., 2021; Pascual & Rivera-Pomar, 2022), hizo posible la identificación y caracterización de un gran número de genes involucrados en el desarrollo embrionario del triatomino (Lavore et al., 2012, 2014, 2015; Pagola, 2012; Esponda-Behrens, 2014; Berni et al., 2014). Dentro de la jerarquización de los genes de segmentación identificada previamente en *D. melanogaster*, en el triatomino se identificó como gen *gap* a *Krüppel* (*Rp-Kr*) y *giant* (*Rp-gt*). Ambos participan en el establecimiento del eje A-P, donde *Rp-gt* se requiere para la correcta formación de cabeza y abdomen (Lavore et al., 2012), y *Rp-Kr* para el desarrollo de los segmentos torácicos y abdominales de los embriones. Este último, además, se lo reportó involucrado en la regulación del gen homeótico *sex comb-reduced* (*Rp-scr*) (Lavore et al., 2014). Además, se identificó al gen *gap hunchback* (*Rp-hb*) (Rolandelli, 2013; Delgado, 2018), donde se demostró que la pérdida de función de dicho gen no solo afecta el desarrollo del aparato bucal, sino que también produce defectos a nivel torácicos y abdominales. Otro gen identificado como *gap* fue *mille-pattes* (*Rp-mlpt*), el cual se lo reportó actuando durante el proceso de segmentación gnatal y torácica del triatomino (Tobias-Santos et al., 2019).

Al gen *Toll* (*Rp-Toll*) se lo identificó como el actor esencial e inicial para dar lugar al establecimiento del eje D-V durante la embriogénesis del triatomino, además se evidenció su rol durante la formación del eje A-P, determinando la ubicación del embrión dentro del huevo durante los diferentes estadios del desarrollo (Pagola, 2012; Berni et al., 2014). Otros genes reportados involucrados en el establecimiento del eje D-V en *R. prolixus* fueron *dorsal* (*Rp-dl*) y *decapentaplegic* (*Rp-dpp*) (Pagola, 2012).

Dentro del grupo de genes homeóticos, los cuales desempeñan un papel crucial en la determinación de la identidad de los segmentos corporales a lo largo del eje A-P, se ha informado sobre la función del gen *caudal* (*Rp-cad*) (Esponda – Behrens, 2014). Este gen ejerce una influencia significativa en la especificación y desarrollo de las estructuras ubicadas en la región posterior del embrión. Asimismo, entre los genes homeóticos, formando parte del *cluster* HOX, se ha descrito la función de *sex combs reduced* (*Rp-scr*) (Esponda – Behrens, 2014).

Este gen está directamente implicado en la formación del segmento labial y desempeña un papel fundamental en la diferenciación y desarrollo de esta región específica del embrión. Es esencial destacar que tanto *Rp-scr* como *Rp-cad* exhiben una notable conservación en sus funciones, lo cual se refleja en similitudes identificadas en especies ortólogas, como se ha documentado en estudios previos (Pattatucci & Kaufman, 1991; Pattatucci et al., 1991; Hughes & Kaufman, 2000; Curtis et al., 2001).

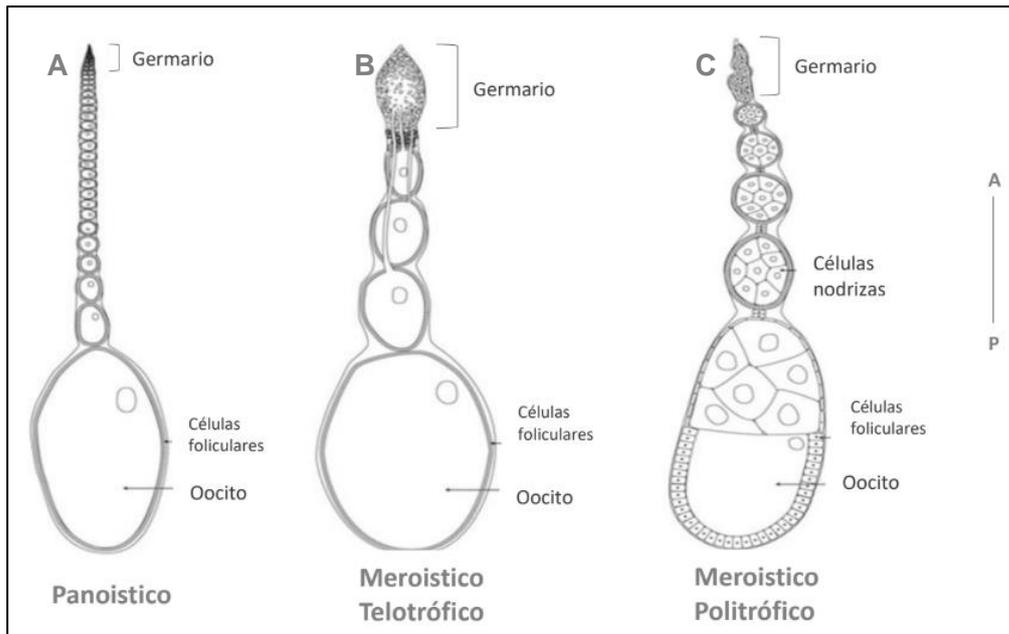
Aunque se identificó un gran número de genes conservados durante el desarrollo embrionario (Medeiros et al., 2011; Ribeiro et al., 2014; Brito et al., 2018; Cardoso et al., 2020; Leyria et al., 2020b; Pascual & Rivera-Pomar, 2022), aún se desconoce el rol de cada uno de ellos a lo largo de los diferentes estadios que caracterizan a la embriogénesis del triatomino.

### **Ovogénesis en insectos**

La formación y maduración del ovocito es un proceso altamente controlado, que debe ocurrir en el momento indicado y en la secuencia correcta para que se dé inicio al desarrollo embrionario de manera exitosa (Latham & Schultz, 2001). Durante dicho proceso, se establecen los ejes de simetría corporal (Roth et al., 1989; Schupbach & Roth, 1994; Coutelis et al., 2008), se produce la vitelogénesis (Atella et al., 2005), y se forma el corion (Papantonis et al., 2015).

Los ovarios son órganos internos compuestos de tejido somático y germinal que contienen a los ovocitos en desarrollo (De Cuevas, 2005). La estructura del ovario en los insectos es variable, lo cual es coincidente a su diversidad como grupo. Aun así, se observa que los ovarios son dos y simétricos respecto del eje longitudinal del cuerpo, y cada uno de ellos está formado por estructuras tubulares denominadas ovariolas, cuyo número es especie-específico (Lynch & Roth, 2011; McLaughlin & Bratu, 2015). Están caracterizados por la presencia de distintos tipos celulares que acompañan y nutren al ovocito en desarrollo, y que permiten el traspaso de la información genética a la siguiente generación (Lynch & Roth, 2011). Más allá de compartir este patrón general, citológicamente, se diferencian dos tipos de ovarios:

panoísticos o meroísticos. Estos no solo se caracterizan por la ausencia o presencia, respectivamente, de células nodrizas que nutren y proveen de citoplasma al ovocito hasta alcanzar su madurez, sino que también se diferencian por la vía de desarrollo que muestran para llegar al estado de ovocito (Lynch et al., 2011; McLaughlin & Bratu, 2015). El tipo de ovogénesis manifiesta una estrecha relación con la posición evolutiva que presenta el insecto, y determina qué tipo de desarrollo embrionario da origen al plan corporal del mismo (Davis & Patel, 2002; Liu & Kaufman, 2005; Lynch et al., 2011; Lynch & Roth, 2011). Los meroísticos politróficos predominan en los grupos más derivados, preferentemente en insectos holometábolos y asociados a embriogénesis del tipo BGL, se caracterizan por presentar células nodrizas que acompañan al ovocito en desarrollo a lo largo de la ovariola y, son rodeados por una capa de células foliculares que envuelven por completo a ambos conjuntos celulares. Los ovarios meroísticos telotróficos se encuentran tanto en insectos hemimetábolos como holometábolos, pero asociados con insectos de BGC/I, se caracterizan por presentar células nodrizas en el extremo anterior de cada ovariola, actuando como fuente común de ARNm y componentes citoplasmáticos para todos los ovocitos. Los ovarios panoísticos están generalizados en insectos basales, asociados exclusivamente a insectos con un desarrollo embrionario mayoritariamente del tipo BGC (Figura 4) (Lynch et al., 2011).



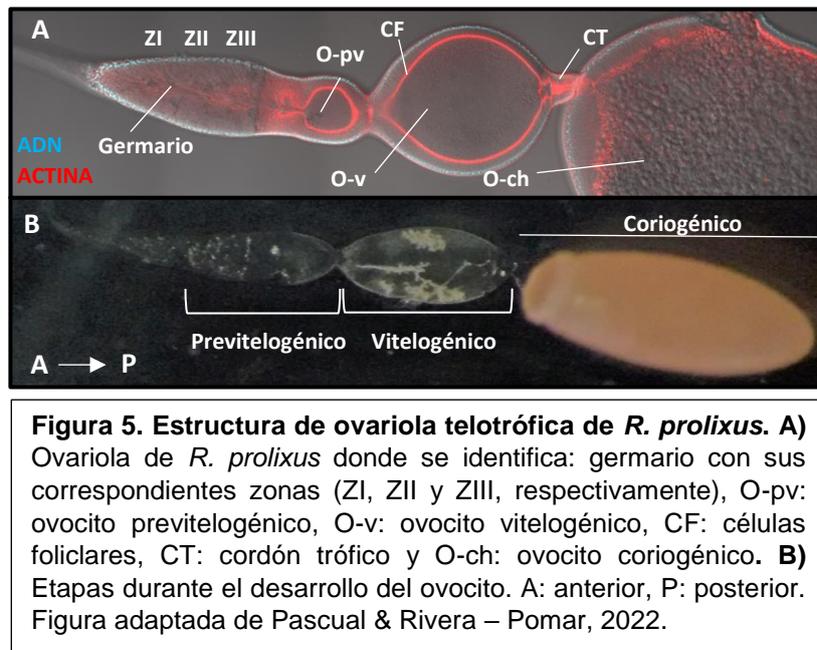
**Figura 4. Estructura de las ovariolas correspondientes a tres organizaciones distintas de ovarios de insectos. A) Ovariola de ovario panoístico, B) Ovariola de ovario telotrófico y C) Ovariola de ovario politrófico.** Para cada uno se indica las distintas partes que lo componen (germario, células foliculares, células nodrizas, oocitos en desarrollo). Referencias: A, Polo anterior; P, Polo posterior. Figura adaptada de McLaughlin & Bratu (2015).

Una característica común presente entre los diferentes tipos de ovarios y modos de embriogénesis es la deposición de ARNm y proteínas de origen materno al ovocito en desarrollo (Tadros & Lipshitz, 2009). La mayoría de estos factores maternos se han observado localizados de manera asimétrica en el ovocito, promoviendo la polarización del mismo. Dicha polarización se encuentra determinada por factores que varían según los diferentes tipos de ovogénesis (Kugler & Lasko, 2009; Lecuyer et al., 2007).

### **Ovogénesis en *Rhodnius prolixus***

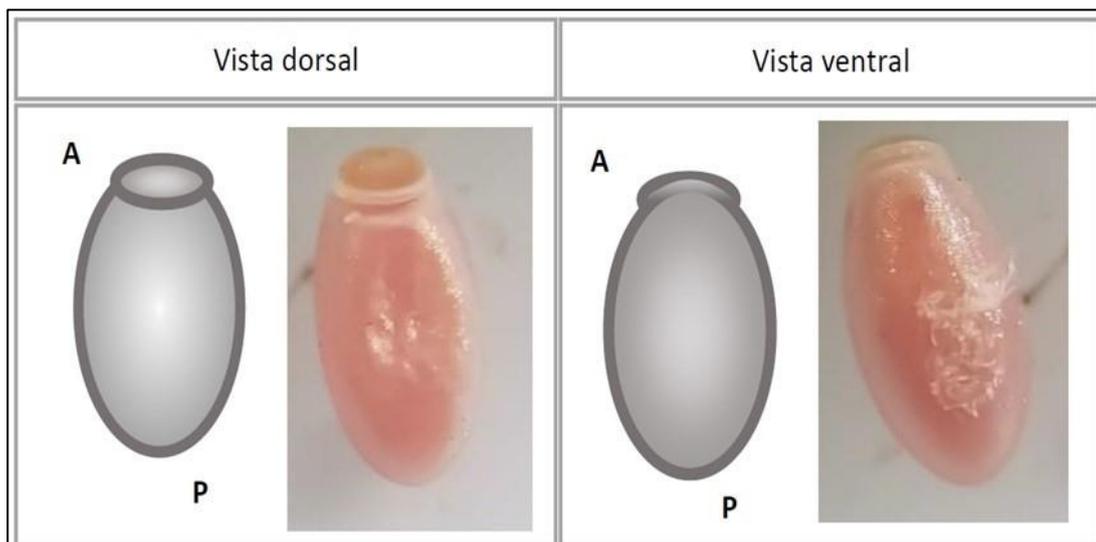
Las hembras adultas de *R. prolixus* presentan dos ovarios de tipo telotrófico formados, cada uno, por siete estructuras tubulares denominadas ovariolas (Lutz & Huebner, 1981; Huebner & Injeyan, 1981). El extremo anterior de cada ovariola se denomina germario, donde se localizan las células nodrizas, las cuales se diferencian según su tamaño nuclear y dividen al germario en tres zonas (zona I, II y III). Su función es producir y proveer al ovocito en desarrollo

de nutrientes, proteínas y ARNm a través de cordones tróficos citoplasmáticos especializados en su transporte (Huebner & Anderson, 1972c). Hacia la región posterior del germario, se encuentra el vitelario, donde se localizan los ovocitos en desarrollo, cada uno rodeado por una capa de células foliculares. (Huebner & Anderson, 1972c; Lutz & Huebner, 1981) (Figura 5A).



Durante el desarrollo del ovocito se pueden distinguir diferentes fases en base al proceso activo de captación de precursores de vitelo (vitelogenina), diferenciadas como fase pre-vitelogénica, vitelogénica y coriogénica (Figura 5B). Durante la fase pre-vitelogénica la tasa de crecimiento de los ovocitos es lenta, y se da a expensas de los nutrientes que reciben a través de cordones tróficos (Huebner & Anderson, 1972; Huebner, 1981; Büning, 1994). Avanzando con el desarrollo, continúa la fase vitelogénica; la cual es crítica para el desarrollo del huevo. En esta fase, los precursores proteicos del vitelo son producidos en grandes cantidades por tejidos extraovárico, principalmente por el cuerpo graso (Bellés, 1998; Giorgi et al., 2005). Dentro de los precursores generados, el primordial en el vitelo es la vitelogenina, proteína secretada a la hemolinfa y captada por los ovocitos en desarrollo a través de endocitosis mediada por receptor (Bellés, 1998; Giorgi et al., 2005; Pascual et al., 2021). Una fuente complementaria de vitelogenina está a cargo de las células foliculares que

rodean a los ovocitos en desarrollo (Melo et al., 2000). La vitelogenina es almacenada en los ovocitos en desarrollo, generando así grandes cantidades de reservas nutritivas que posteriormente sustentarán el crecimiento del embrión (Kunkel & Nordin, 1985). Por último, durante la fase coriogénica, se forma el corion, estructura que proporciona protección mecánica y previene su deshidratación; así como también facilita la fertilización y constituye la capa más externa del huevo (Beament, 1946; King & Aggarwal, 1965; Telfer & Anderson, 1968; Waring & Mahowald, 1979; Mazur et al., 1982; Fakhouri et al. 2006). Cuando el huevo está formado atraviesa el oviducto para ser ovipuesto (Huebner & Anderson, 1972b). En este punto, el huevo es de color rosado, debido a la pigmentación del vitelo, con 2 mm de largo y 1 mm de diámetro, de forma ovalada con la cara dorsal cóncava y con la presencia del opérculo en la región anterior, el cual permite emerger a la larva durante su eclosión (Figura 6). Esta disposición muestra la constitución de la polaridad del huevo dentro del ovario. El corion es transparente, lo que hace posible observar los cambios en la apariencia externa del embrión -morfología y pigmentación-, y permite el monitoreo del desarrollo embrionario. Además, su superficie presenta un patrón poligonal-hexagonal (ocasionalmente pentagonal) uniforme, y una sustancia cementante que le permite adherirse a las superficies donde son depositados (Beament, 1946).



**Figura 6. Morfología de la estructura del huevo de *R. prolixus*.** Se representa una esquematización gráfica del huevo junto a la fotografía tomada bajo lupa estereoscópica. A la izquierda se observa en vista dorsal y a la derecha en vista ventral. A: anterior; P: posterior. Foto extraída de Pascual, 2019.

Los diferentes estados de desarrollo del ovocito dependen del estado nutricional del insecto (Valle et al., 1987; Atella et al., 2005; Raikhel, 2005), de factores hormonales (Wigglesworth 1934; Davey, 1987, 2000; Melo et al., 2000; Davey, 2007), y factores genéticos. Referente a estos últimos, la información transcriptómica generada permitió sentar las bases para la identificación de un amplio repertorio génico (Coelho et al., 2021; Pascual & Rivera – Pomar, 2022) con potencial función durante la ovogénesis y desarrollo embrionario temprano. Algunos de ellos fueron abordados experimentalmente, como *cactus* (*Rp-cact*) (Berni et al., 2014), *piwi2* (*Rp-pw2*), *piwi3* (*Rp-pw3*), *argonauta* (*Rp-arg*) (Brito et al., 2018), *ATG6* (*Rp-ATG6*) (Vieira et al., 2018), *cornichon* (*Rp-cni*) (Pascual, 2019), *ATG-8* (*Rp-ATG-8*) (Pereira et al., 2020), *ULK1-ATG1* (*Rp-ATG*) (Bomfim & Ramos, 2020), *ATG3* (*Rp-ATG3*) (Santos & Ramos, 2021), *Bicaudal C* (*Rp-BicC*) (Pascual et al., 2021), *empty spiracles* (*Rp-ems*) (Nazar et al., 2022) y *Bicaudal D* (*Rp-BicD*) (Pascual & Rivera – Pomar, 2022), logrando identificar su acción durante el desarrollo del ovocito. Más allá de esto, no se conocen de manera comprensiva la genética subyacente a dicho proceso.

### **Genes maternos: *nanos* y *pumilio*.**

El primer control del desarrollo embrionario comienza con factores génicos que son depositados por la madre en el ovocito durante la ovogénesis, llamados genes maternos. Estos no solo establecen la polaridad del ovocito, sino que también, posteriormente, determinarán la polaridad del embrión (Roth et al., 1989; Schupbach & Roth, 1994). Se ha revelado la existencia de cuatro grupos de genes maternos, de los cuales tres grupos de genes establecen la polaridad a lo largo del eje anteroposterior (A-P), mientras que el patrón dorsoventral (D-V) está determinado por un solo grupo de genes (Niisslein-Volhard et al., 1987; Anderson, 1987; Roth & Niisslein-Volhard, 1989; Niisslein-Volhard, 1991; St. Johnston & Niisslein-Volhard, 1992).

Dos genes de origen materno que han sido identificados cumpliendo un rol fundamental en la polarización del ovocito y posterior desarrollo embrionario son *nanos* (*nos*) y *pumilio* (*pum*) (Barker et al., 1992; Nüsslein-Volhard et al., 1987; Wang & Lehmann, 1991). Identificados inicialmente en *D. melanogaster*,

ambos genes codifican proteínas que se caracterizan por formar parte de un grupo de proteínas de unión al ARN (RBP, del inglés *RNA binding - proteins*), que median mecanismos de regulación post transcripcional. *pum* codifica para una proteína con un dominio de homología Pum conservado (Pum-HD) ubicado en el extremo C - terminal (Edwards et al., 2000, 2001; Wang et al., 2001); y *nos* codifica para una proteína con dos dominios únicos de dedos zinc (ZF) de tipo CCHC en el extremo C - terminal (Curtis et al., 1997; Hashimoto et al., 2010). Dichas proteínas actúan como represores que reducen la expresión de otras proteínas y promueven la degradación de diversos ARNm (Wharton & Struhl, 1991; Wreden et al., 1997). Se las identificó actuando en diversos procesos biológicos como el control de la proliferación de células madre de la línea germinal, del desarrollo embrionario, de la morfología neuronal y en la formación de la memoria a largo plazo (Forbes & Lehmann, 1998; Asaoka-Taguchi et al., 1999; Dubnau et al., 2003; Ye et al., 2004; Muraro et al., 2008).

Durante la ovogénesis en *D. melanogaster*, se reportó que la expresión génica de ambos se encuentra localizada en el polo posterior del ovocito en desarrollo (Wang & Lehmann, 1991; Barker et al., 1992; Wang et al., 1994). Sin embargo, para el caso de *nos*, dicha expresión inicialmente se la localiza de manera ubicua en todo el germario y citoplasma del ovocito en desarrollo, y a medida que avanza la ovogénesis, su expresión se centra en el polo posterior del mismo (Wang et al., 1994; Forrest & Gavis, 2003). El rol principal, de ambos genes, es a nivel del mantenimiento de la línea germinal, aunque presentan diferentes patrones de acción durante el desarrollo del ovocito. La ausencia de *pum* da como resultado la falta de mantenimiento de las células madres que componen la línea germinal, en cambio la ausencia de *nos* promueve la detención del desarrollo de las células de la línea germinal del díptero (Forbes & Lehman, 1998). Por lo tanto, en las hembras hay una reducción drástica en el número de huevos producidos, afectándose así el proceso de ovogénesis (Wang et al., 1994; Forbes & Lehman, 1998).

Por otro lado, a nivel embrionario, se identificó a la proteína Nos conformando un gradiente de concentración a lo largo del eje A-P, con la mayor concentración en el polo posterior, mientras que Pum se localiza específicamente en el polo posterior del embrión (Barker et al., 1992; Wreden et

al., 1997; Asaoka et al., 1999; Weidmann et al., 2016). Ambas proteínas forman un complejo de regulación postranscripcional, crucial para el correcto avance del desarrollo embrionario (Barker et al., 1992; Parisi & Lin, 2000). Se reportó a Nos como represor traduccional de los ARNm que presentan una secuencia denominada NRE, Elemento de Respuesta Nanos. Dicha secuencia además contiene un sitio de unión para Pum. Uno de los ARNm que exhiben NRE y blanco de regulación es el gen *hunchback* (*hb*). Nos y Pum median su deadenilación (Wharton & Struhl 1991, Wreden et al., 1997; Parisi & Lin, 2000) y por consiguiente reprimen la expresión de la proteína Hb en la región posterior del embrión. En consecuencia, en los embriones silenciados para los genes *nos* o *pum*, los segmentos abdominales no se pueden formar debido a la expresión ectópica de Hb en la parte posterior del embrión (Nüsslein-Volhard et al., 1987; Hülskamp et al., 1989; Irish et al., 1989; Barker et al., 1992; Macdonald, 1992).

El accionar del complejo Nos/Pum también se ha reportado en especies como *Tribolium castaneum* o *Nasonia vitripennis* (Lynch & Desplan, 2010; Schmitt-Engel et al., 2012; Mak et al., 2018) donde se evidencia la conservación de la función regulatoria, participando de manera esencial en la segmentación posterior del embrión, evitando la traducción del ARNm de *hb*. En *T. castaneum*, la ausencia de Nos y Pum también da como resultado defectos en la región cefálica (Schmitt-Engel et al., 2012).

Fuera del orden Insecta, en especies como *Caenorhabditis elegans* o *Xenopus laevis* se identificó al complejo Nos/Pum con un rol durante el desarrollo de la línea germinal (Parisi & Lin, 2000; Fangfang et al., 2012). Se demostró que tanto Nos como Pum desempeñan funciones centrales en el establecimiento de la identidad, diferenciación y regulación de las células germinales (MacDonald, 1992; Zhang et al., 1997; Jaruzelska et al., 2003; Fangfang et al., 2012), reprimiendo ARNm específicos y, si bien sus funciones están ampliamente conservadas, los mecanismos para lograr dichas funciones pueden variar entre las especies (Jaruzelska et al., 2003; Schmitt-Engel et al., 2012; Fangfang et al., 2012).

Por lo antes expuesto, en el presente trabajo se propuso conocer la dinámica de expresión de los genes maternos *nanos* y *pumilio* durante las etapas

correspondientes a la ovogénesis y desarrollo embrionario temprano y revelar su función asociada a dicho proceso en el triatomino *R. prolixus*.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **Hipótesis**

Existe una jerarquía de acción e interacción de genes que actúan durante la ovogénesis y determinan la morfología final del insecto *Rhodnius prolixus*.

## **Objetivo General.**

Estudiar los mecanismos genéticos implicados en la polarización del ovocito durante la ovogénesis en *Rhodnius prolixus*.

## **Objetivos Específicos.**

- Determinar el patrón de expresión de los genes *nanos* y *pumilio* en el ovario y en los diferentes estadios embrionarios de *Rhodnius prolixus*.
- Estudiar la función de dichos genes durante la ovogénesis y el desarrollo embrionario temprano del triatomino.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **Mantenimiento de la colonia de *R. prolixus*.**

Los ejemplares utilizados se obtuvieron a partir de la colonia establecida en el bioterio del Centro de Bioinvestigaciones (CeBio-UNNOBA-CIC). Los mismos se encuentran en condiciones controladas, a una temperatura de  $28 \pm 1$  °C, humedad relativa del 70%, y con fotoperiodo regulado (luz/oscuridad de 12:12 horas (h)). Se alimentaron con sangre estéril desfibrinada equina (Laboratorio Gutiérrez) utilizando un alimentador artificial, de manera regular cada 15 días. En estas condiciones la duración de la embriogénesis es de  $14 \pm 1$  días.

## **Diseño de oligonucleótidos**

A partir de los transcritos *Rp-nos* (RPRC002927) y *Rp-pum* (RPRC000720 + RPRC005018) (Pascual & Rivera Pomar, 2022) se diseñaron oligonucleótidos (oligos) específicos para cada uno de ellos, utilizando el programa Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), considerando parámetros de temperatura de *melting* (Tm), contenido de GC e hibridación inespecífica de bases. Una vez generados, fueron evaluados manualmente y utilizando el programa Primer Stats (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

Se diseñaron dos poblaciones de *oligos* distintas (Tabla 1), las cuales se diferenciaron por la adición al extremo 5' de la secuencia parcial del promotor del Fago T7 (CGACTCACTATAGGG). La presencia del mismo sirvió para posteriormente llevar a cabo experimentos de ARN interferente e hibridación *in situ*.

**Tabla 1. Lista de oligonucleótidos.** Se detalla el ID del transcripto, sentido, nombre, secuencia, tamaño en pares de bases (pb) del amplicón y su respectivo uso.

ID Transcripto	Sentido	Nombre	Secuencia 5'-3'	Amplicón Generado	Uso
RPRC002927	Foward	PrFw1Nos	GCCGCTGAAGATAATGAAGC	217 pb	qRT-PCR
	Reverse	PrRv1Nos	AGGACAGTATTTTCGCCAGAT		qRT-PCR
	Foward	PrFw2Nos -T7	<u>CGACTCACTATAGGGGTGGGAAATTTGCAAGTT</u> C	232 pb	ARNi
	Reverse	PrRv2 Nos - T7	<u>CGACTCACTATAGGGGCAAATAACGGAGGTTG</u> CTC		ARNi
RPRC000720	Foward	PrFw1Pum	TATCTCTGGTGAACAGCAAG	248 pb	qRT-PCR
	Reverse	PrRv1Pum	TCAACGCATCCTTATGGTTG		qRT-PCR
	Foward	PrFw2Pum - T7	<u>CGACTCACTATAGGGCCAGCGTATCCTGGAAC</u> ATT	263 pb	ARNi
	Reverse	PrRv2Pum - T7	<u>CGACTCACTATAGGGCAGCTCGAGTGGCATGA</u> GTA		ARNi
RPRC012158	Foward	Rp-Rpl13A_Fw	GGAAAAGCAGCGTTGAGAAG	210 pb	qRT-PCR
	Reverse	Rp-Rpl13A_Rv	GGAAAAGCAGCGTTGAGAAG		

## Anotación génica

Transcriptomas correspondientes a huevos fertilizados de 0 horas post oviposición (*hpo*), huevos ovipuestos por hembras vírgenes (huevos no fertilizados) y ovarios en estado vitelogénico, ensamblados *de novo* y disponibles en nuestro laboratorio (Pascual, datos sin publicar), fueron utilizados como base de datos para realizar una búsqueda de similitud de secuencia, utilizando la herramienta bioinformática BLASTx (Altschul et al., 1990), contra los genes predichos (*ab initio*) del genoma del triatomino (Mesquita et al., 2015; Pascual & Rivera – Pomar, 2022).

Las predicciones proteicas de cada uno de los transcriptos inferidos, fueron consultadas de manera individual mediante una nueva búsqueda por similitud de secuencia, contra la base de datos no redundante de proteínas (Versión 2018) disponible *online* en NCBI; y se las caracterizó mediante la herramienta InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Posteriormente, mediante un alineamiento múltiple se logró identificar las diferentes regiones correspondientes a los transcriptos analizados, utilizando el programa *Clustal W* (Larkin et al., 2007).

## Validación Génica

### 1. Síntesis de ADN copia y validación de la expresión génica por PCR de punto final

Se llevó a cabo la extracción de ARN total a partir de ovarios vitelogénicos (n=35) y un *pool* de huevos recolectados a distintos tiempos post ovipuesta, abarcando todos los estadios del desarrollo embrionario (n=50). El proceso se llevó a cabo utilizando el reactivo TRIzol (Thermo Fisher), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se evaluó la integridad del ARN extraído mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (BrEt). La cuantificación de su concentración fue a partir de la utilización del software ImageJ, con el cual se determinó la concentración óptima del ARN total extraído para llevar a cabo la producción de ADN copia (ADNc). La reacción de retrotranscripción, se realizó utilizando el *kit* TransScript® Reverse Transcriptase [M-MLV, RNasa H-] (Transgen Biotech) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El ADNc generado se usó como molde para la amplificación por RT-PCR. La mezcla de reacción utilizada se compuso por: Buffer de reacción (1x), Cl<sub>2</sub>Mg (3 mM), DNTPs (25 µM), oligo forward (250 µM), oligo reverse (250µM), Taq pol 1U (Pegasus), ADNc como molde y agua estéril. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador ESCO, las reacciones se realizaron de la siguiente manera: (i) 95 °C durante 30 seg; (ii) 95 °C durante 30 seg; (iii) 52 °C durante 30 seg; (iv) 74 °C durante 30 seg; (v) etapas (ii) a (iv) durante 35 ciclos. Como control negativo de la reacción se utilizó agua estéril como molde.

Para evaluar la integridad de los amplicones generados se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE (1x) a voltaje constante de 90 V. Se utilizó Bromuro de etidio (BrEt) como agente intercalante para poder visualizar los resultados en el gel utilizando un transiluminador con cámara integrada (InGenius, Syngene). Para la digitalización de las imágenes se empleó el software GeneSys V1.4.6.0 (Syngene) y la cuantificación de los amplicones obtenidos se realizó a través del software ImageJ utilizando el marcador de peso molecular como referencia (*ladder* 100 pb, Productos Bio-Lógicos), Los

amplicones que se obtuvieron se enviaron a secuenciar a MACROGEN (Macrogen Inc., Corea del Sur) para confirmar su identidad.

## 2. Cuantificación de la expresión mediante PCR Cuantitativa (qRT-PCR)

Hembras adultas apareadas fueron utilizadas para remover sus ovarios a diferentes tiempos post alimentación con el fin de abarcar los diferentes estados del desarrollo del ovocito, cero (T0)-sin alimentar-, uno (T1), cinco (T5) y siete (T7) días. Se generaron tres réplicas biológicas de tres ejemplares cada una, para cada tiempo analizado. La remoción de sus ovarios se realizó manualmente en placas de disección, utilizando pinzas de disección *Dumont* N° 5, en Buffer fosfato salino 1x (PBS 1x), eliminando todo tejido extra a la estructura tubular. Las muestras se almacenaron en TRIzol (Thermo Fisher), en tubos *ependorf* de tapa a rosca en nitrógeno líquido hasta su utilización.

Posteriormente se realizó la extracción de ARN de cada uno de los tiempos, utilizando el reactivo TRIzol (Thermo Fisher), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total se cuantificó por fluorescencia utilizando QUBIT 2.0 (Life technologies), y se evaluó su integridad mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE (1x) a voltaje constante de 90 V, utilizando como agente intercalante BrEt.

Un µg de ARN total fue tratado con ADNsa (Transgene), y se lo utilizó como punto de partida para la síntesis de ADN copia (ADNc) mediante la *Mix first strand RevertAid Reverse Transcriptase* (ThermoFisher), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El nivel de expresión génica se cuantificó utilizando SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) en un sistema de PCR en tiempo real CFX96 (Bio-Rad). Las reacciones se realizaron por triplicado en un volumen final de 10 µl de la siguiente manera: (i) 95°C durante 10 min; (ii) 95°C durante 15 segundos; (iii) 55°C durante 30 segundos; (iv) 72°C durante 45 segundos; (v) etapas (ii) a (iv) durante 35 ciclos. Cada reacción se llevó a cabo por triplicado. Como controles negativos se realizaron reacciones sin ADNc, para determinar contaminación o la formación de dímeros. Se llevó a cabo un análisis de curvas de *melting* para confirmar que solo se amplificó un único producto para cada reacción. Se evaluó la eficiencia para cada par de oligo utilizado. Se utilizó como gen de referencia la *proteína ribosomal*

*L13A (RpI13A)* Los datos de las reacciones se recopilaron a través del software CFX Manager 3.0 (Bio-Rad). La expresión de los genes de interés en los diferentes experimentos se cuantificó mediante el método comparativo de Cts de Pfaffl (Pfaffl 2001), considerando las eficiencias de amplificación de los distintos pares de oligos, siguiendo el protocolo detallado en Pascual et al., 2021.

### **Hibridación *in situ***

Las sondas para la hibridación *in situ* fueron preparadas con digoxigenin-UTP utilizando el *kit* RNA-Dig Labeling (Roche); el molde para dicho protocolo se hizo a partir de una PCR (5´RACE) usando el adaptador T7 sólo en el oligo *reverse*. Luego de la amplificación se hizo una extracción fenólica y una precipitación isopropanólica para obtener un molde limpio. Como control negativo se utilizó la secuencia inespecífica proporcionada por el *kit* (Roche).

La hibridación se llevó a cabo en ovarios de hembras adultas los cuales fueron disectados en estado vitelogénico (T5). Además, se colectaron huevos no fertilizados (SF) y fertilizados a 0, 12, 24 y 48 hpo abarcando las distintas etapas del desarrollo embrionario temprano. Los ovarios fueron fijados en paraformaldehído (PFA) 4% durante 30 minutos (min) a 4 °C, lavados con PBT [PBS 1x + 0.1% Tween-20] y, finalmente, almacenados a 4 °C en PBT hasta que fueron utilizados, según lo detallado en Pascual et al., 2021. Los huevos se decoronaron y fijaron siguiendo el protocolo detallado en Nazar et al., 2022. La hibridación se realizó siguiendo el protocolo previamente establecido para la especie (Pascual et al., 2021). Luego de finalizada la reacción, los ovarios se visualizaron en un microscopio ZEISS A1 y se realizó el registro fotográfico utilizando una cámara acoplada al mismo.

### **Silenciamiento Génico por ARN de interferencia**

Se llevó a cabo un estudio funcional de *Rp-nos* y *Rp-pum* mediante la técnica de silenciamiento génico por ARN de interferencia (ARNi), previamente implementada con éxito en nuestro laboratorio para estudios en la especie (Lavore et al., 2012; Pascual et al., 2021; Pascual & Rivera – Pomar, 2022).

A partir de los productos de RT-PCR generados con los oligos acoplados a la secuencia del promotor T7 en ambos extremos 5', se sintetizó ARN doble cadena (ARNdc) mediante una reacción de transcripción *in vitro* con la enzima T7 polimerasa (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Como mezcla de reacción se utilizó: Buffer de reacción 1X, rNTP 2 mM, inhibidor de ARNasas 100 U (RiboLock, Thermo Scientific), molde de ADN, T7 ARN polimerasa (Thermo Scientific) 60 U y agua estéril hasta completar un volumen de 100  $\mu$ l. La reacción se dejó incubando *over-night* (ON) a 37 °C. Una vez finalizada la incubación se realizó una digestión con ADNasa libre de ARNasas (Transgene) durante 30 min a 37 °C, para eliminar cualquier remanente de ADN. Posteriormente, se procedió a realizar una purificación con solventes orgánicos y precipitación alcohólica. El precipitado se resuspendió en 14  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O ultra pura. Una dilución 1/10 del mismo se generó para corroborar su integridad y cuantificar su concentración, mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TBE (1x).

El ARNdc específico resultante se inyectó a distintas concentraciones en la región intra abdominal de hembras adultas vírgenes, con una jeringa Hamilton a fin de inducir el silenciamiento génico. Para *Rp-nos* se administraron 2  $\mu$ g, 3  $\mu$ g y 4  $\mu$ g de ANRdc<sup>nos</sup>; mientras que para *Rp-pum* se inyectaron concentraciones de 1 y 2  $\mu$ g de ARNdc<sup>pum</sup>. Para cada uno de los experimentos se utilizaron tres hembras (n = 3) por concentración administrada. Como grupo control se inyectó ARNdc correspondiente a una secuencia inespecífica amplificada a partir del plásmido pGemT (ARNdc  $\beta$ -lac) (Lavore et al., 2012).

Luego de la inyección, se dejó que los ejemplares se recuperaran del estrés durante 48 h. Posteriormente se los alimentó para inducir la ovogénesis y fueron colocados junto con machos para dar lugar a la cópula.

## **Evaluación de los fenotipos observados**

En primera instancia se realizó un análisis de la eficiencia reproductiva de las hembras tratadas con los diferentes ARNdc específicos. Para esto se colectaron los huevos ovipuestos por cada tratamiento cada 48 h, a lo largo de tres períodos oviposicionales (determinados como consecuencia de una nueva

ingesta de sangre). Así, se evaluó la oviposición (número de huevos ovipuestos) y eclosión (número de huevos eclosionados) para cada uno de los grupos analizados. En los casos donde fue necesario, los huevos fueron fijados y analizados bajo lupa estereoscópica Leica MZFLIII. En los que no era posible distinguir estructura embrionaria alguna, se realizó una tinción con el colorante de ADN Hoechst (Sigma-Aldrich, USA, 1 µg/ml) y se utilizó el microscopio de fluorescencia ZEISS Axio Imager A2 para la visualización y adquisición de imágenes. Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software, CA, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) y se aplicó un análisis de ANOVA (*two-way* ANOVA), en los cuales se consideró efectos fijos “concentración”, “tiempo” e “interacción”. Los valores predictivos se compararon con un nivel de significancia del 5 %.

# **RESULTADOS**

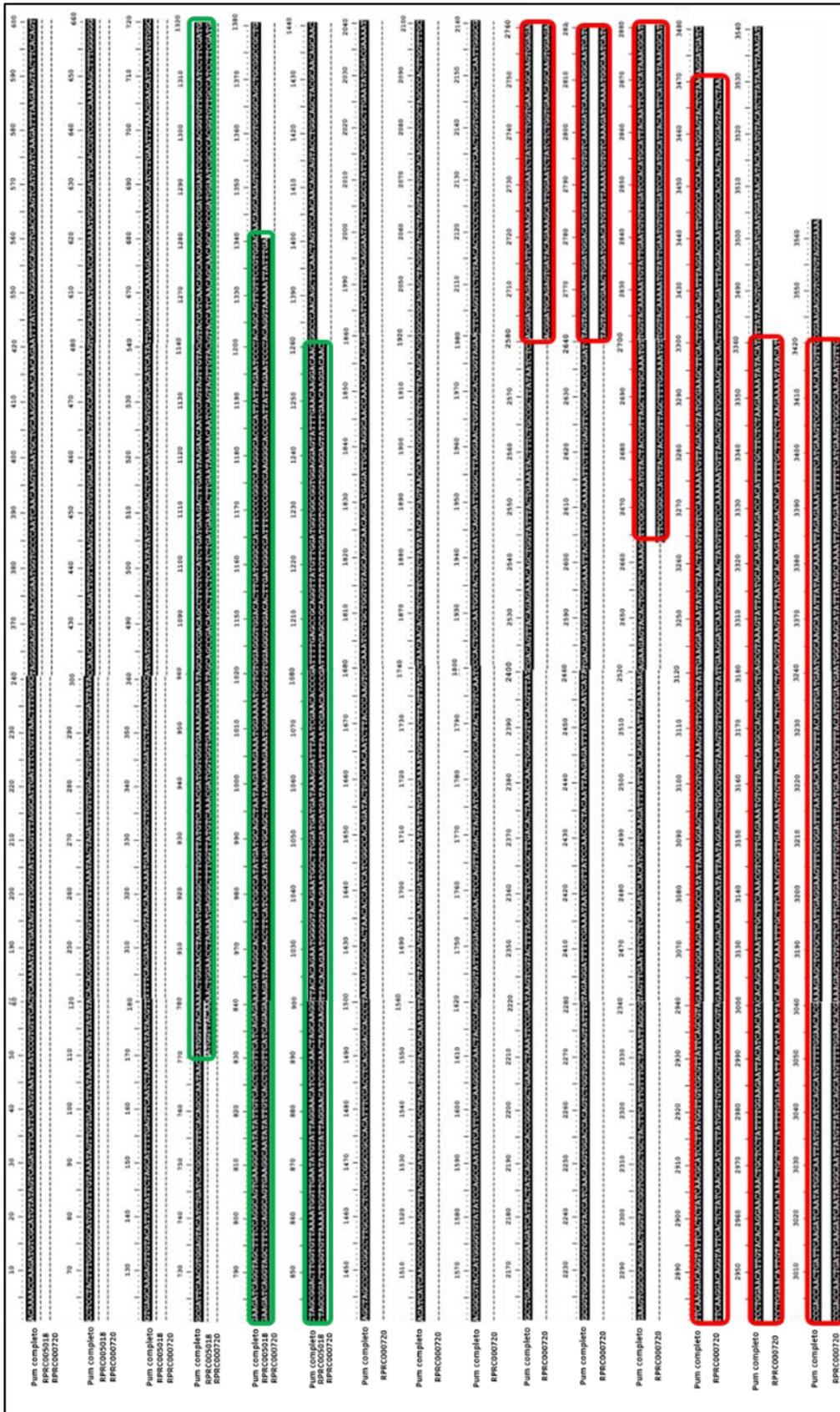
## 1. Anotación génica de *Rp-pumilio*.

Inicialmente, se llevó a cabo una revisión exhaustiva de las predicciones génicas *ab initio* de cada uno de los genes de interés. Particularmente para *Rp-pum*, se notó que su marco de lectura estaba incompleto. Ante esto, se recurrió a la información transcriptómica disponible en el laboratorio, reconstruida utilizando la estrategia de *de novo*. Como resultado de un análisis de similitud de secuencias, se logró finalmente completar la estructura génica correspondiente al gen *Rp-pum* (Tabla 3).

<b>Tabla 3.</b> <i>Rp-pum</i> anotado vs. <i>Rp-pum</i> completo. Se detalla la longitud de cada uno de los transcritos y la predicción proteica correspondiente a cada uno de ellos.			
	<b>ANOTACIÓN GÉNICA <i>ab initio</i></b>		<b>TRANSCRIPTOMA</b>
<b>ID transcripto</b>	RPRC005018	RPRC000720	TRINITY_DN3193_c0_g1_i9
<b>Long. transcripto</b>	646 pb	807 pb	3.563 pb
<b>Predicción proteica</b>	189 aa	268 aa	1.089 aa

Se identificó que el marco de lectura para dicho gen fue de 3.563 pares de bases (pb), y que codifica para una proteína de 1.089 aminoácidos (aa) que se caracteriza por la presencia de un dominio denominado PUM – HD, ubicado en la región C- terminal (Figura 7).

Por otro lado, para el gen *Rp-nos* no se identificó un transcripto nuevo ya que la unidad transcripcional asignada presentaba el marco de lectura completo.



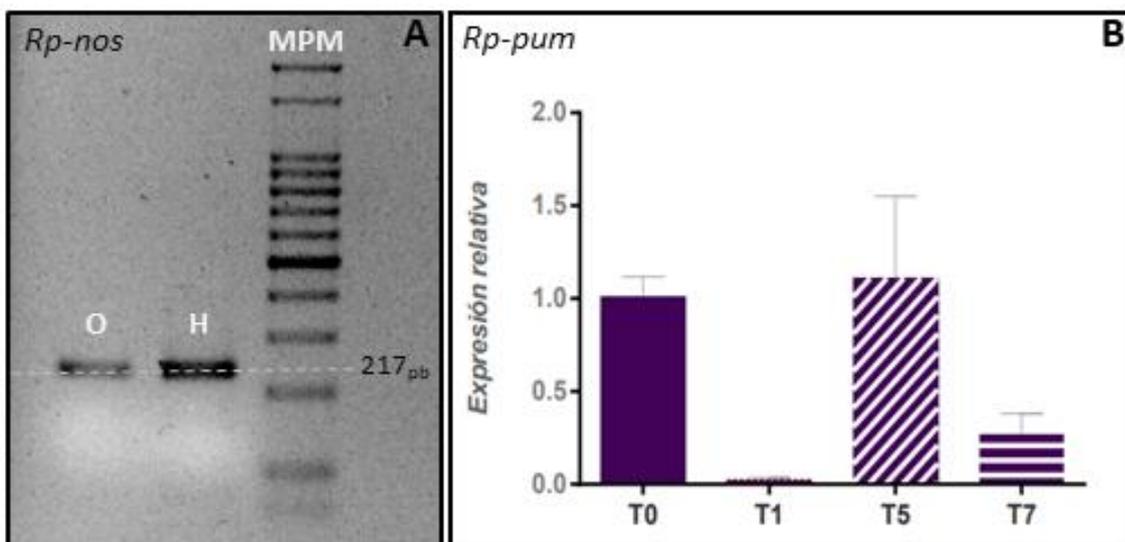
**Figura 7. Alineamiento múltiple entre secuencias (transcriptoma completo de *pum*, RPRC00518 y RPRC00720, respectivamente). En verde se marca la región de similitud entre el transcriptoma de *pum* y RPRC00518; mientras que, en rojo la similitud con RPRC00720.**

## 2. Análisis de la expresión de *Rp-nos* y *Rp-pum*

### 2.1 Validación de la expresión génica

El análisis de expresión de *Rp-nos* sólo pudo ser determinado a nivel cualitativo. Esto fue como consecuencia de que no fue posible cuantificar, mediante qRT-PCR, su expresión durante los diferentes estadios del desarrollo del ovocito. Si se observó expresión tanto durante la ovogénesis como el desarrollo embrionario, evidenciado con la obtención un amplicón del tamaño esperado e identidad corroborada tras la realización de una RT-PCR de punto final (Figura 8A).

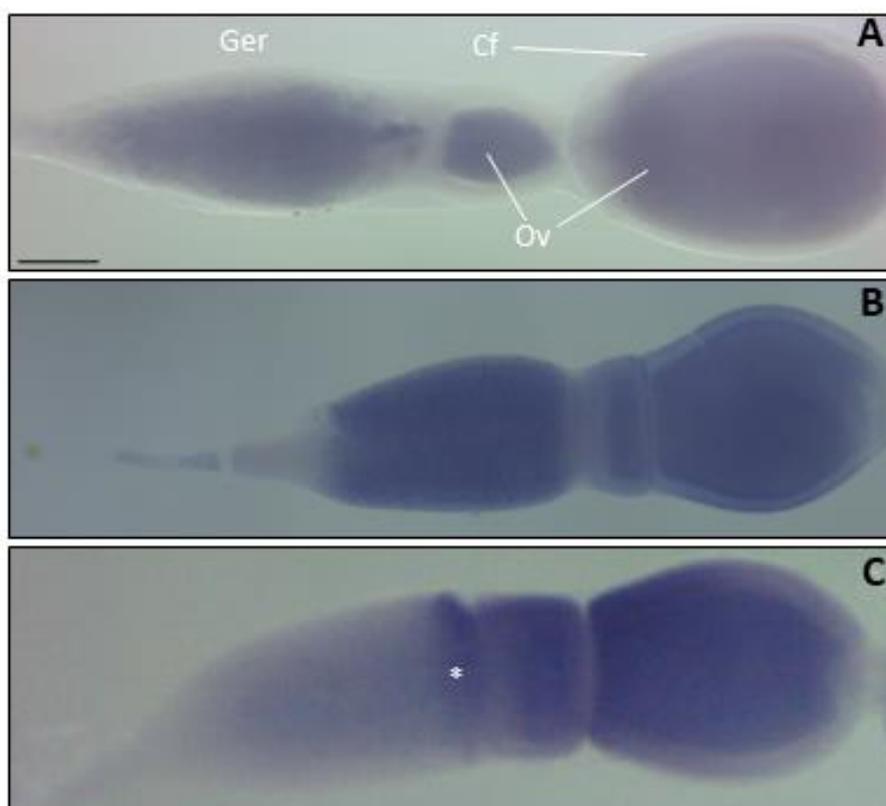
En cuanto a la expresión de *Rp-pum*, no solo se evidenció su presencia en el ovario del triatomino, sino que también se logró conocer la dinámica de expresión durante los estados del desarrollo del ovocito. Mostró una expresión variable durante los diferentes estados de desarrollo del ovocito analizados, identificándose una menor expresión en el estado pre-vitelogénico (T1) durante el proceso de ovogénesis (Figura 8B). Es importante destacar que no se observaron diferencias significativas entre los estadios analizados.



**Figura 8. Análisis de expresión para *Rp-nos* y *Rp-pum*. A) Expresión de *Rp-nos* por RT-PCR.** Gel de agarosa al 1% donde se visualiza el amplicón obtenido de *Rp-nos* para ovario (O) y huevo (H), respectivamente. MPM corresponde al marcador de peso molecular utilizado. La línea punteada marca la longitud del amplicón correspondiente a los 217 pares de bases (pb). **B) Expresión de *Rp-pum* por qRT-PCR.** Se muestra el nivel de expresión relativa de *Rp-pum* en cada uno de los tiempos analizados. T0 (barra sólida): sin alimentar; T1, T5 (barra líneas oblicuas) y T7 (barra líneas horizontales), corresponde a uno, cinco y siete días post-alimentación, respectivamente.

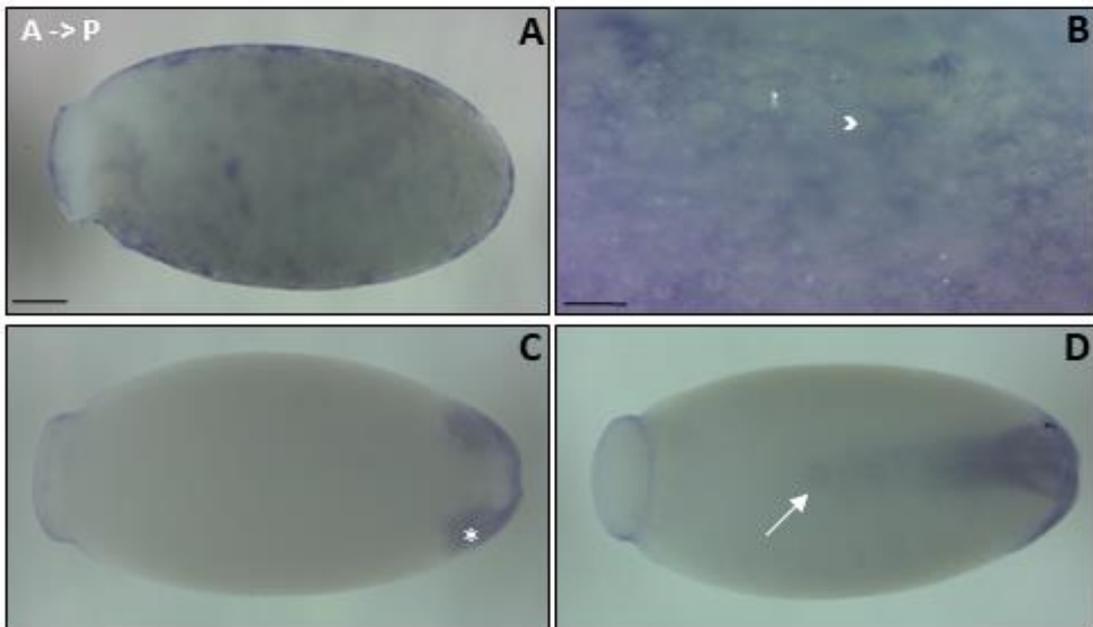
## 2.2. Patrón de localización de los ARNm de *Rp-nos* y *Rp-pum*

Continuando con el análisis de expresión, se decidió conocer la localización de dichos ARNm. Respecto a *Rp-nos* se observó que la expresión identificada a nivel de ovario se localizaba en todas las células del germario, excepto en el filamento terminal del mismo. Además, se observó expresión en el citoplasma de los ovocitos en desarrollo (Figura 9B). Con respecto a *Rp-pum*, en el ovario se evidenció localización específica en la zona más posterior del germario, denominada Z III, y en el citoplasma de los ovocitos en desarrollo (Figura 9C). A nivel somático, las células foliculares evidenciaron una presencia muy débil de ARNm específico, con una mayor concentración en la región anterior de las células foliculares que rodean al ovocito vitelogénico.



**Figura 9. Localización de los ARNm de *Rp-nos* y *Rp-pum* mediante hibridación *in situ* en el ovario del triatomo. A)** Ovario control de hembra adulta de *R. prolixus* sin expresión específica. Germario (Ger), Ovocitos (Ov), Células foliculares (Cf). **B)** Expresión homogénea de *Rp-nos* en las células del germario y en el citoplasma de los ovocitos en desarrollo. **C)** Patrón de localización de *Rp-pum*, en la zona III (ZIII) del germario y en el citoplasma de los ovocitos. \* indica la ZIII. Escala: 200  $\mu\text{m}$ .

Por otra parte, durante el desarrollo embrionario, se observó expresión de *Rp-nos* a partir del estadio correspondiente a blastodermo celularizado (24 *hpo*) a nivel citoplasmático (FIG 10A - B). En el estadio de gastrulación (48 *hpo*) se observó una homogénea marcación a lo largo del todo el rudimento embrionario (Figura 10C - D). No se observó expresión alguna de *Rp-nos* en los estadios correspondientes a 0 *hpo*, 12 *hpo* y huevos SF (datos sin mostrar).



**Figura 10. Localización de el ARNm de *Rp-nos* en diferentes estadios embrionarios.** **A) y B) Expresión citoplasmática de *Rp-nos* en estadio de blastodermo (24 *hpo*).** En **B)** se muestra en detalle la expresión citoplasmática de *Rp-nos*. La punta de flecha señala la no marcación del núcleo celular **C) y D) Expresión de *Rp-nos* en estadio de gastrulación (48 *hpo*).** En ambas imágenes se ve la expresión homogénea de *Rp-nos* en la formación del rudimento embrionario; **C)** huevo en vista ventral y **D)** huevo en vista dorsal. A: anterior, P: posterior. \* indica lóbulo cefálico; mientras que la flecha muestra la zona posterior de crecimiento. Escala A, C y D: 200  $\mu$ m. Escala B: 100  $\mu$ m.

En conjunto, estos resultados nos permitieron inferir que *Rp-pum* y *Rp-nos* son genes de expresión materna, depositados en el ovocito durante el proceso de ovogénesis.

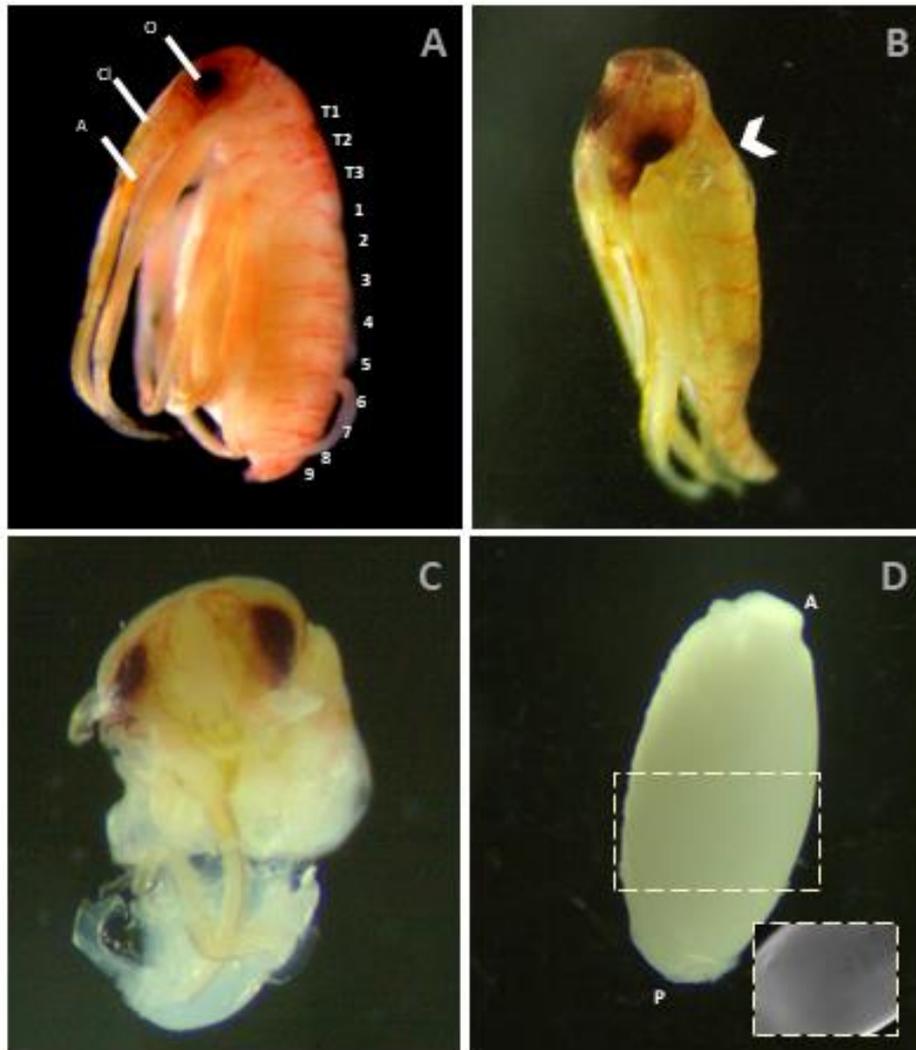
## **Análisis funcional de los genes *Rp-nos* y *Rp-pum***

Con la finalidad de conocer la función de los genes estudiados se llevó a cabo el silenciamiento génico de cada uno de ellos, y se evaluó si la oviposición y el subsecuente desarrollo del embrión se encontraban afectados tras la administración de ARNdc específico.

Las hembras silenciadas para *Rp-nos* no mostraron diferencias significativas respecto al número total de huevos ovipuestos en comparación a las hembras control (Figura Suplementaria 1). Sin embargo, se manifestaron diferencias respecto a la progresión del desarrollo embrionario. Esto llevó a establecer cuatro clases fenotípicas en base al estado del mismo (Tabla 4). Del total, 88.74 % correspondieron a huevos con embriones que lograron completar el desarrollo, y alcanzaron su estado ninfal I, conformando la clase I (Figura 10A). El 6.17 % correspondieron a huevos que lograron completar la embriogénesis, pero no lograron eclosionar y conformaron la clase II (Figura 11A). La clase III se correspondió de huevos que no eclosionaron y mostraron alteraciones severas en el desarrollo embrionario. Dentro de este grupo, algunos embriones mostraron no solo fusión de sus segmentos torácicos (específicamente los segmentos T2 y T3), sino que también ausencia de sus segmentos abdominales. Dicho grupo representó el 1 % del total de los huevos analizados (Figura 11B-C). Por último, se identificó a la clase IV la cual se correspondió a el 4.35 % del total de huevos, los cuales no lograron avanzar en el desarrollo del embrión, evidenciado por la ausencia de pigmentación rosada típica correspondiente a las células embrionarias. La disección, fijación y tinción de dichos huevos corroboró la ausencia de embrión (Figura 11D).

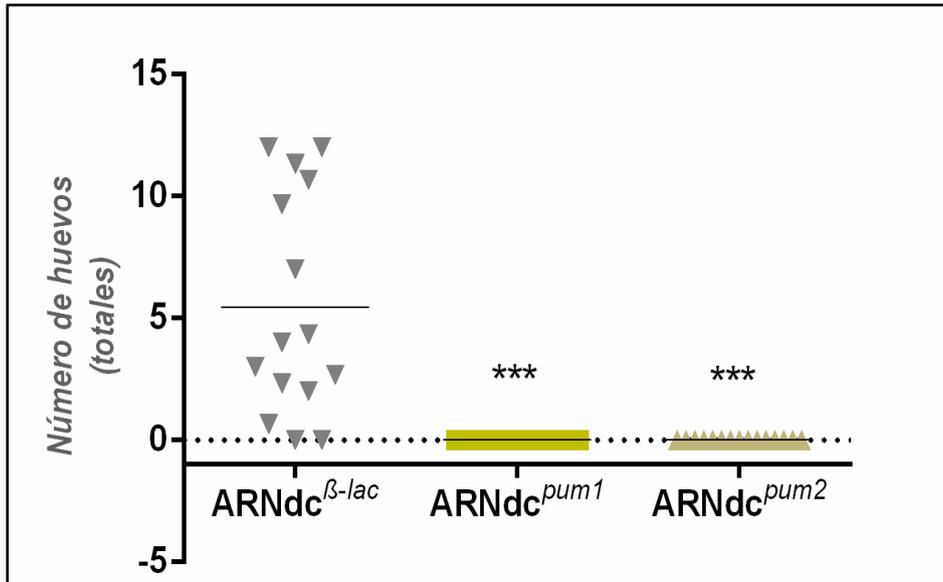
**Tabla 4. Resultados del silenciamiento génico para *Rp-nos*.** Se detalla el número total de huevos obtenidos luego de la administración de las diferentes concentraciones de ARNdc<sup>nos</sup> y ARNdc <sup>$\beta$ -lac</sup>. Las clases se diferencian según la severidad de los efectos en los embriones tras el silenciamiento génico específico, siendo IV la más severa y la clase I embriones sin alteraciones aparentes.

ARNdc	ARNdc	N° hembras	Huevos Ovipuestos	Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV
ARNdc <sup>nos</sup>	2 $\mu$ g	3	261	232	8	4	17
	3 $\mu$ g	3	107	79	25	0	3
	4 $\mu$ g	3	183	178	1	0	4
ARNdc <sup><math>\beta</math>-lac</sup>	2 $\mu$ g	3	192	184	0	0	8



**Figura 11. Clases fenotípicas observadas luego de la administración de ARNdc<sup>nos</sup>. A) Clase I-II.** Embriones control. Se especifican los segmentos cefálicos: A: antena, Cl: clípeo, O: ocelos; segmentos torácicos T1 – T3 y segmentos abdominales 1 – 9. **B) y C) Clase III.** Embriones con alteración en el desarrollo embrionario. En **B)** se muestran alteraciones en el desarrollo de los segmentos cefálicos y fusión de los segmentos torácicos T2 y T3, señalada por la punta de flecha. En **C)** se evidencia ausencia de desarrollo de segmentos torácicos y abdominales. **C) Clase IV.** Huevo no embrionado, sin pigmentación característica. En el recuadro se reportó la tinción con Hoechst confirmando la ausencia embrionaria. (A: anterior, P: posterior).

Por su parte, el silenciamiento del gen *Rp-pum* afectó significativamente el número de huevos ovipuestos (Figura 12). Independientemente de la concentración de ARNdc<sup>pum</sup> administrado (Tabla Suplementaria 1), ninguna de las hembras silenciadas logró oviponer a lo largo de los periodos analizados.



**Figura 12. Número de Ovoposiciones totales de hembras control y silenciadas para *Rp-pum*.** Gráfico de dispersión donde se representa el número total de huevos para 3 hembras inyectadas con ARNdc <sup>$\beta$ lac</sup> vs. 3 hembras inyectadas con ARNdc<sup>pum</sup>. El efecto tratamiento afecta significativamente la variable respuesta ( $p < 0.005$ ). Las líneas negras indican la media de cada grupo.

# DISCUSIÓN

El inicio del desarrollo embrionario se desencadena con el proceso esencial de formación del huevo durante la ovogénesis, donde se desencadenan eventos cruciales. En esta etapa, tiene lugar la vitelogénesis, proceso que otorga material nutritivo al embrión para sobrevivir y desarrollarse por fuera del cuerpo de la madre. Este material, denominado vitelo, está compuesto por proteínas, lípidos, azúcares, entre otros. El tejido extra ovárico denominado cuerpo graso es la principal fuente productora de las proteínas del vitelo, siendo la vitelogenina la proteína esencial, fuente de aminoácidos, fosfatos y en menor medida lípidos (Atella et al., 2005; Melo et al., 2000), que contribuye de manera significativa a la maduración del ovocito (Atella et al., 2005). Asimismo, se lleva a cabo la formación del corion, estructura externa que proporciona protección mecánica y permite el correcto desarrollo embrionario después de la oviposición (Papantonis et al., 2015). Además, se establecen los ejes de las coordenadas del cuerpo (Roth et al., 1989; Schupbach & Roth, 1994; Speder et al., 2006; Coutelis et al., 2008); la cual está intrínsecamente ligada a la acción coordinada de genes maternos (Nusslein-Volhard & Roth, 1989; Schupbach & Roth, 1994). Dentro de la compleja red genética que guía la embriogénesis, dichos genes son depositados en el ovocito durante su desarrollo. Siendo un fenómeno que se observa de manera consistente en diversos grupos taxonómicos (Simpson, 1983; Nusslein-Volhard, 1991; Fitch et al., 1998; Goto & Kinoshita, 1999; Tadros & Lipshitz, 2009).

A pesar de que estos genes establecen la polaridad del ovocito y futuro embrión, no todos contribuyen de manera uniforme al desarrollo embrionario (Tadros & Lipshitz, 2009). Se ha estudiado la transición materna a cigótica en organismos modelos como insectos (*D. melanogaster*), peces (*Danio rerio*) y mamíferos (*Mus musculus*). En todos los casos, dicha transición involucra la desestabilización y posterior degradación de ARNm maternos; los cuales no son necesarios para dar inicio a la transcripción cigótica y consecuentemente al desarrollo embrionario (Tadros & Lipshitz, 2009).

Gran parte del conocimiento sobre la acción y regulación de los genes maternos proviene de estudios realizados en *D. melanogaster*, quien exhibe un modo de ovogénesis y desarrollo embrionario presente sólo en los linajes más derivados de la clase Insecta (Davis & Patel, 2002; Liu & Kaufman, 2005; Lynch

et al. al., 2011; Lynch & Roth, 2011). Por esto, comprender la relevancia de los ARNm maternos en distintas especies nos brinda la capacidad de inferir similitudes o divergencias inherentes a los diferentes modos de ovogénesis y desarrollo embrionario.

En este trabajo nos propusimos profundizar el conocimiento genético del proceso de ovogénesis y desarrollo embrionario temprano que caracteriza a *R. prolixus*. La información genómica y transcriptómica disponible de la especie permitió dilucidar los genes activos durante dicho proceso estudiado (Cohelo et al., 2021; Pascual & Rivera – Pomar, 2022). Se reportó que el 54% del genoma codificante del triatomino es de origen materno (Pascual & Rivera – Pomar, 2022), es decir que se encuentra depositado en el ovocito en desarrollo. Además, se identificó que existen diferentes dinámicas de expresión a lo largo de los distintos estadios del desarrollo, las cuales fueron clasificadas en tres patrones de expresión génica en base a las fluctuaciones reportadas (Pascual & Rivera – Pomar, 2022).

Dos genes de particular interés, *nanos* y *pumilio*, identificados *in silico* como de origen materno (Wang et al., 1994; Lin & Spradling, 1997; Forbes & Lhemann, 1998; Parisi & Lin, 1999; Sano et al., 2001; Forrest & Gavis, 2003; Calvo et al., 2005; Rezende – Teixeira et al., 2012; Cohelo et al., 2021; Pascual & Rivera – Pomar, 2022) fueron estudiados experimentalmente en el presente trabajo. El gen *pum* ha sido identificado en especies como *D. melanogaster* (Barker et al., 1992), y *T. castaneum* (Schmitt-Engel et al., 2012), mientras que *nos* se reportó en otros dípteros además de *D. melanogaster* (Asaoka et al., 1998), como *Aedes gambiae*, *Aedes stephensi* y *Aedes aegypti* (Calvo et al., 2005), en el coleóptero *T. castaneum* (Schmitt-Engel et al., 2012; Weidmann et al., 2016) y en los himenópteros *N. vitripennis* (Lynch & Desplan, 2010) y *Apis mellifera* (Cullen et al., 2023).

En primera instancia, luego de realizar una revisión de las anotaciones génicas de cada uno de los genes de interés, determinadas por el número de acceso RPRC002927 para *Rp-nos*, y RPRC000720 + RPRC005018 para *Rp-pum*, se reveló que el transcripto codificante para *pum* presenta una longitud de 3.563 pb y presenta todos los dominios que caracteriza a dicha proteína (McDonald, 1992; Wang et al., 2001). Nuestros resultados evidencian la

presencia de posiciones no anotadas en el genoma de referencia (Mesquita et al., 2015), lo cual es consistente con el análisis transcriptómico reportado previamente para la especie (Coelho et al., 2021). Este enfoque *de novo* (Graveley, 2001), en contraste con un ensamblaje guiado por la referencia (sea genoma o transcriptoma), posibilita la reconstrucción de transcritos sin depender de conocimiento previo sobre el genoma en cuestión, haciendo posible la reconstrucción de nuevos genes (Medeiros et al., 2011). Por lo que surge como una alternativa factible cuando no se cuenta con un genoma o el mismo se encuentra fragmentado (Conesa et al 2016). Por otra parte, cabe destacar que el gen *Rp-nos* se encontraba correctamente anotado en el genoma publicado (Mesquita et al., 2015), por lo que no fue necesario un análisis posterior.

Una vez obtenido el transcritpo completo de cada uno de los genes de interés se prosiguió a validar experimentalmente la expresión materna observada *in silico* (Pascual & Rivera – Pomar, 2022). Se observó expresión de ambos en el ovario del triatomino, sugiriendo un potencial rol durante el desarrollo del ovocito. En el caso de *Rp-nos*, la cuantificación de su expresión en el ovario resultó desafiante, posiblemente debido al uso de oligos no óptimos y/o limitaciones inherentes a la técnica empleada. Sin embargo, se confirmó su expresión mediante una RT-PCR, consolidando la evidencia de que este gen está activo en el ovario. Este resultado concuerda con lo observado para *T. castaneum* (Schmitt-Engel et al., 2012), donde sólo fue posible conocer la expresión de dicho gen mediante RT-PCR. En este contexto, se ha identificado la presencia del ARNm de *nos* en el ovario, indicando que *nos* es suministrado de manera materna al ovocito. Complementando el análisis de expresión, la identificación de los ARNm para *Rp-nos* de manera ubicua en el citoplasma del germario y de los ovocitos en desarrollo terminó de confirmar la expresión de *Rp-nos* durante la ovogénesis. Este patrón de localización mostró ciertas diferencias respecto a lo reportado para *nos* en *Apis mellifera* (Dearden, 2006; Cullen et al., 2023), *N. vitripennis* (Lynch & Desplan, 2010) y *D. melanogaster* (Forbes & Lehmann, 1998), en las cuales la localización se evidencia en el polo posterior del ovocito (Wang et al., 1994; Forrest & Gavis, 2003; Rezende – Teixeira et al., 2012; Calvo et al., 2012). En *D. melanogaster*, se ha informado que, durante las

etapas iniciales del desarrollo del ovocito, la expresión de *nos* es uniforme en todo el ovocito (Forbes & Lehmann, 1998). Sin embargo, a medida que avanza el desarrollo se reportó un patrón de localización específico en la región posterior del ovocito, coincidente con la función reportada para dicho gen (Wang et al., 1994; Forrest & Gavis, 2003). Esto destaca la relevancia de la distribución espacial en relación con las funciones específicas durante el desarrollo del ovocito. Nuestros resultados no muestran una expresión localizada en una región específica, pero dado que el análisis es en un momento particular del estado del desarrollo del ovocito (vitelogénico) no descartamos que esta homogeneidad podría representar un momento específico de expresión de dicho gen, ni una posible localización de *Rp-nos* en el polo posterior del ovocito a medida que progresa su desarrollo. Por otro lado, vale aclarar que las especies en donde la expresión y localización de *nos* fue analizada se caracterizan por presentar ovarios politróficos, por lo que podría existir un patrón diferente asociado al tipo de ovario que presenta la especie.

El análisis de *Rp-pum*, mostró una dinámica de expresión variable entre los distintos estadios de desarrollo del ovocito. Específicamente, en el estadio pre-vitelogénico, se observó una disminución de la expresión, coincidente con una fase lenta de crecimiento de ovocitos. A medida que la ovogénesis avanza, se observa un aumento en el crecimiento de los ovocitos, lo que se correlaciona con un aumento en la expresión de *Rp-pum*. El patrón de localización reveló la presencia de dichos ARNm en la región III del germario, donde se evidencia un incremento en el tamaño de los núcleos y la formación de nucléolos diferenciados. En esta región específica, se despliega una función crucial: proveer nutrientes y ARN al ovocito en desarrollo (Huebner & Anderson, 1972a; Harrison & Huebner, 1997; Valdimarsson & Huebner, 1989). Además, se observó presencia de transcritos en el citoplasma de los ovocitos en desarrollo. Dicho patrón de expresión guarda similitud con lo reportado para *D. melanogaster* (Macdonald 1992; Forbes & Lehmann, 1998), donde *pum* también se localiza en el germario y el citoplasma del ovocito, expresión asociada con el mantenimiento de las células germinales (Forbes & Lehmann, 1998). En este trabajo, la relación entre los niveles de expresión de *Rp-pum* y el desarrollo de los ovocitos sugiere

una participación durante la regulación del desarrollo de los mismos, destacando la importancia de *Rp-pum* en la ovogénesis de *R. prolixus*.

A nivel embrionario, se observó que *Rp-nos* se encuentra presente durante los estadios embrionarios (0 *hpo* - 48 *hpo*) de *R. prolixus*, aunque su cuantificación tampoco se logró llevar a cabo. No obstante, como se mencionó anteriormente, en *T. castaneum* (Schmitt-Engel et al., 2012) sólo se identificó la expresión de *nos* de manera cualitativa. Por último, cabe destacar que los estudios transcriptómicos identificaron a *Rp-nos* con una muy baja, prácticamente nula, expresión en el ovocito en estadio pre-vitelogénico y huevos no fertilizados (Cohelo et al., 2021), lo que sería consistente con lo obtenido en este trabajo.

Particularmente, el patrón de localización de los ARNm para *Rp-nos* se observó en los estadios de blastodermo celularizado (24 *hpo*) y gastrulación (48 *hpo*) durante el desarrollo embrionario del triatomino. En el estadio de blastodermo, *Rp-nos* exhibió un patrón de localización citoplasmática en todo el huevo. Aunque en este trabajo no se diferenció, mediante marcación específica, el núcleo de la región citoplasmática, resultados previos en el laboratorio corroboran que el patrón observado en este caso es citoplasmático. No obstante, consideramos que es necesario realizar tinciones con fluorescencia para conocer la distribución nuclear y re confirmar lo reportado en este trabajo. En el estadio de gastrulación, se observó una expresión uniforme a lo largo de todo el rudimento embrionario, con una incipiente expresión en la región posterior del mismo (zona de crecimiento). Estos resultados señalan la expresión activa de *Rp-nos* en las etapas tempranas del desarrollo embrionario del triatomino, lo cual concuerda con resultados observados en *D. melanogaster* (Lehmann & Nüsslein-Volhard, 1991; Wang & Lehmann, 1991; Wang et al., 1994).

Después de examinar detalladamente la dinámica de expresión, procedimos a llevar a cabo un análisis funcional de ambos genes para comprender su contribución materna al desarrollo embrionario temprano de *R. prolixus*. El silenciamiento de *Rp-nos* en hembras adultas reveló una gama de fenotipos, entre los más severos se encontraron huevos que no progresaron en su desarrollo y embriones con anomalías en los segmentos torácicos y/o abdominales. Estos resultados encuentran respaldo en investigaciones sobre

ortólogos de *nos* en diversas especies, como *D. melanogaster* (Barker et al., 1992; Wreden et al., 1997), *Drosophila virilis*, *Musca domestica* y *Chironomus samoensis* (Curtis et al., 1995). En estas investigaciones, se ha evidenciado la función de *nos* como determinante posterior, afectando el desarrollo embrionario en esa región, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. Lo mismo fue reportado en especies como *T. castaneum* (Schmitt-Engel et al., 2012) o *N. vitripennis* (Lynch & Desplan, 2010), donde también se identificó a *nos* como determinante posterior; ya que su ausencia conduce a defectos abdominales. Asimismo, en *T. castaneum* la ausencia de *nos* también produce defectos en el desarrollo de la región cefálica del coleóptero.

En contraste, el silenciamiento para *Rp-pum* reveló una marcada disminución en el número de huevos ovipositados, impactando negativamente la fertilidad y fecundidad del triatomino. Estos resultados concuerdan con lo observado en mutantes homocigotas para *D. melanogaster* (Forbes & Lehmann, 1998), y en *N. vitripennis* (Lynch & Desplan, 2010), en los cuales se identificó a *pum* vinculado al mantenimiento de la línea germinal. Fuera de Insecta, se ha evidenciado en especies como *Schistosoma japonicum* que el silenciamiento de *pum* conlleva a cambios en la morfología del ovario y afecta la cantidad de huevos producidos por las hembras (Xia et al., 2020).

Si bien en este trabajo no se realizó un análisis funcional en conjunto para *Rp-nos* y *Rp-pum*, es importante mencionar que existen investigaciones que exploran cómo dichos genes actúan en simultáneo, formando un complejo de represión. En *D. melanogaster* (Barker et al., 1992; Weidmann et al., 2016), se demostró que la actividad del complejo Nos/Pum es fundamental para la formación de los segmentos abdominales al reprimir la traducción del ARNm de *hunchback (hb)*. Asimismo, se identificó este complejo en *T. castaneum* (Schmitt-Engel et al., 2012), *N. vitripennis* (Lynch & Desplan, 2010), así como en el nematodo *C. elegans* (Parisi & Lin, 2000); en estas especies, se conserva la función del complejo en la determinación de los segmentos abdominales.

Este trabajo contribuye a ampliar el entendimiento de la dinámica de expresión y la función que desempeñan los genes maternos, *nanos* y *pumilio*, durante la ovogénesis y el desarrollo embrionario temprano en *R. prolixus*. Además, aporta nuevo conocimiento sobre los factores genéticos que

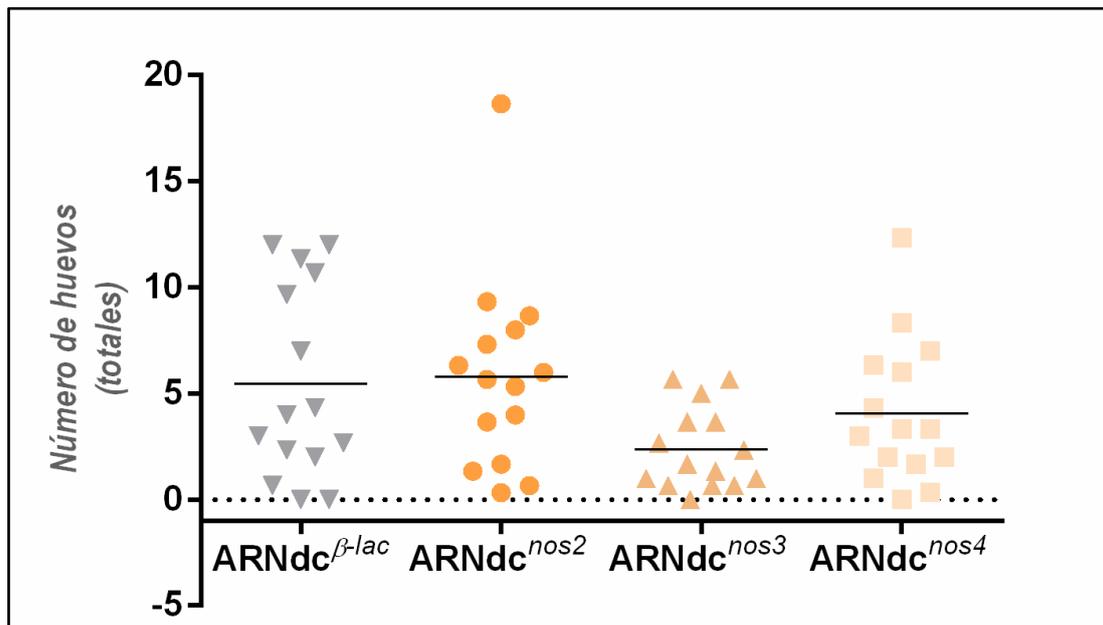
intervienen en la regulación de la ovogénesis y la biología reproductiva de los triatomíneos. Esto a su vez, abre el camino para la realización de futuras investigaciones que puedan profundizar en estos campos y desarrollar un mayor entendimiento de estos procesos en estos insectos.

# **CONCLUSIONES**

- *Rp-nos* y *Rp-pum* son genes de expresión materna.
- *Rp-nos* actúa durante el establecimiento de los segmentos embrionarios posteriores del triatomino *R. prolixus*.
- *Rp-pum* afecta la fertilidad y fecundidad de *R. prolixus*.

# **MATERIAL SUPLEMENTARIO**

## Suplementario 1



**Figura Suplementaria 1.** Gráfico de dispersión que representa el número total de huevos ovipuestos por tratamiento (ARNdc<sup>β-lac</sup> vs ARNdc<sup>nos2</sup> 2 μg, 3 μg y 4 μg, respectivamente). El factor tratamiento no afecta significativamente la variable respuesta. Las líneas negras indican la media de cada grupo.

## Suplementario 2

**Tabla Suplementaria 2. Resultados de ARNi parental.** Se detalla el número total de huevos obtenidos luego de la inyección con ARNdc<sup>pum</sup>. Para cada concentración se inyectaron tres hembras adultas vírgenes.

ARNdc	ARNdc	Nº hembras	Huevos ovipuestos
ARNdc <sup>pum</sup>	1 µg	3	0
	2 µg	3	0
ARNdc <sup>β-lac</sup>	2 µg	3	192

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Aldasoro, E. et al. What to expect and when: benzimidazole toxicity in chronic Chagas' disease treatment. En: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017. p.1-8.
- Altschul, S. F., & Lipman, D. J. (1990). Protein database searches for multiple alignments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(14), 5509-5513.
- Alves-Bezerra, M., De Paula, I.F., Medina, J.M., Silva-Oliveira, G., Medeiros, J.S., Gade, G., Gondim, K.C., 2016. Adipokinetic hormone receptor gene identification and its role in triacylglycerol metabolism in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 69, 51–60.
- Anderson, D.T. 1972. The development of hemimetabolous insects. *Developmental Systems: Insects*. 1: 95–163.
- Asaoka-Taguchi, M., Yamada, M., Nakamura, A., Hanyu, K., & Kobayashi, S. (1999). Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in *Drosophila* embryos. *Nature cell biology*, 1(7), 431-437.
- Atella, G. C., Gondim, K. C., Machado, E. A., Medeiros, M. N., Silva-Neto, M. A., & Masuda, H. 2005. Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77, 405-430.
- Barker, D. D., Wang, C., Moore, J., Dickinson, L. K., & Lehmann, R. (1992). Pumilio is essential for function but not for distribution of the *Drosophila* abdominal determinant Nanos. *Genes & Development*, 6(12a), 2312-2326.
- Beament, J.W., 1946. The formation and structure of the chorion of the egg in an hemipteran, *Rhodnius prolixus*. *Q J Microsc Sci.* 87, 393-439.
- Bellés, X. 1998. Endocrine effectors in insect vitellogenesis. In: Coast, G.M. and Webster, S.G. Eds., *Recent Advances in Arthropod Endocrinology*. Cambridge, Cambridge University Press, pp. 71-90.
- Belles, X. 2020. *Insect metamorphosis: from natural history to regulation of development and evolution*. Academic Press.
- Berenbaum, M.R., 1996. *Bugs in the System*, in: Wesley., N.Y.A. (Ed.).
- Berni, M., Ribeiro, J.M., Tobias-Santos, V., Caceres-Rodrigues, A., Borges Muty, F., Vionette-Amaral, R.J., Masuda, H., Sorgine, M.H., Nunes da Fonseca, R., Araujo, H. 2014. Toll signals regulate dorsal–ventral patterning and anterior–posterior placement of the embryo in the hemipteran *Rhodnius prolixus*. *EvoDevo*. 5, 38.
- Brito, T., Julio, A., Berni, M., de Castro Poncio, L., Bernardes, ES., Araujo, H., et al. 2018. Transcriptomic and functional analyses of the piRNA pathway in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *PLoS Negl Trop Dis* 12(10): e0006760.

- Buarque, D. S., Braz, G. R., Martins, R. M., Tanaka-Azevedo, A. M., Gomes, C. M., Oliveira, F. A., & Tanaka, A. S. (2013). Differential expression profiles in the midgut of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*, 8(5), e61203.
- Büning, J. 1994. The Insect Ovary: Ultrastructure, previtellogenic growth and evolution.
- Buxton, P.A., (1930). The biology of a blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. Transactions of the Entomological Society London. 78, 227–236.
- Calvo, E., Walter, M., Adelman, Z. N., Jimenez, A., Onal, S., Marinotti, O., & James, A. A. (2005). Nanos (nos) genes of the vector mosquitoes, *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(7), 789-798.
- Cardoso JC., Ribeiro, JMC., dos Santos DV., Pereira MH, Araújo, RN., Gontijo, NF., Pessoa, GCD., Sant'Anna, MRV., Sorgine, MHF., Majerowicz, D., Medeiros, M., Braz, GRC. Mesquita, RD., Oliveira, PL., Koerich, LB. 2020. Analysis of the testicle's transcriptome of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. bioRxiv: 61619
- Clark, E. (2017). Dynamic patterning by the *Drosophila* pair-rule network reconciles long-germ and short-germ segmentation. *PLoS biology*, 15(9), e2002439.
- Clark, E., & Peel, A. D. 2017. Evidence for the temporal regulation of insect segmentation by a conserved set of developmental transcription factors. bioRxiv, 145151.
- Coelho, V. L., de Brito, T. F., de Abreu Brito, I. A., Cardoso, M. A., Berni, M. A., Araujo, H. M. M., ... & Pane, A. 2021. Analysis of ovarian transcriptomes reveals thousands of novel genes in the insect vector *Rhodnius prolixus*. *Scientific reports*, 11(1), 1918.
- Conesa, A; Madrigal, P; Tarazona, S; Gomez-Cabrero, D; Cervera, A; McPherson, A; Mortazavi, A. 2016. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology*. 17(1):13.
- Coura, J. R., & Dias, J. C. P. (2009). Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 31-40.
- Coutelis, J. B., Petzoldt, A. G., Speder, P., Suzanne, M., & Noselli, S. (2008, June). Left–right asymmetry in *Drosophila*. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 19, No. 3, pp. 252-262). Academic Press.
- Cullen, G., Gilligan, J. B., Guhlin, J. G., & Dearden, P. K. (2023). Germline progenitors and oocyte production in the honeybee queen ovary. *Genetics*, 225(1), iyad138.
- Curtis, D., Treiber, D. K., Tao, F., Zamore, P. D., Williamson, J. R., & Lehmann, R. (1997). A CCHC metal-binding domain in Nanos is essential for translational regulation. *The EMBO journal*, 16(4), 834-843.

- Curtis, C. D., Brisson, J. A., DeCamillis, M. A., Shippy, T. D., Brown, S. J., & Denell, R. E. (2001). Molecular characterization of Cephalothorax, the *Tribolium* ortholog of Sex combs reduced. *Genesis*, 30(1), 12-20.
- Damen, W. G. (2007). Evolutionary conservation and divergence of the segmentation process in arthropods. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 236(6), 1379-1391.
- Davey, K.G., 1987. Inputs to the hormonal control of egg development in *Rhodnius prolixus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 82 Suppl 3, 103-8.
- Davey, K.G., 2000. The modes of action of juvenile hormones: some questions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 663–670.
- Davey, K., 2007. The interaction of feeding and mating in the hormonal control of egg production in *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol.* 53, 208-15
- Davis, G.K., Patel, N.H. 2002. Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation. *Annu Rev Entomol.* 47, 669-99.
- Dearden, P. K. (2006). Germ cell development in the Honeybee (*Apis mellifera*); Vasa and Nanosexpression. *BMC developmental biology*, 6(1), 1-14.
- De Cuevas, M., 2005. *Drosophila* Oogenesis, *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*.
- Delgado, M. J. (2018). Caracterización funcional del gen gap hunchback en *Rhodnius prolixus*.
- Dubnau, J., Chiang, A. S., Grady, L., Barditch, J., Gossweiler, S., McNeil, J., & Tully, T. (2003). The stufen/pumilio pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. *Current Biology*, 13(4), 286-296.
- Edwards, J. S. (1998). Sir Vincent Wigglesworth and the coming of age of insect development. *International Journal of Developmental Biology*, 42, 471-473.
- Edwards, T. A., Trincao, J., Escalante, C. R., Wharton, R. P., & Aggarwal, A. K. (2000). Crystallization and characterization of Pumilio: a novel RNA binding protein. *Journal of Structural Biology*, 132(3), 251-254.
- Edwards, T. A., Pyle, S. E., Wharton, R. P., & Aggarwal, A. K. 2001. Structure of Pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs. *Cell*, 105(2), 281-289.
- Esponda Behrens, N. (2014). Estudios funcionales comparados de la evolución de la segmentación en insectos (Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata).
- Fakhouri, M., Elalayli, M., Sherling, D., Hall, J. D., Miller, E., Sun, X., & LeMosy, E. K. 2006. Minor proteins and enzymes of the *Drosophila* eggshell matrix. *Developmental biology*, 293(1), 127-141.

- Fangfang L., Singh, A., & King, M. L. (2012). *Xenopus* Nanos1 is required to prevent endoderm gene expression and apoptosis in primordial germ cells. *Development*, 139(8), 1476-1486.
- Faria-Reis, A., Santos-Araújo, S., Pereira, J., Rios, T., Majerowicz, D., Gondim, K. C., & Ramos, I. 2023. Silencing of the 20S proteasomal subunit- $\alpha 6$  triggers full oogenesis arrest and increased mRNA levels of the selective autophagy adaptor protein p62/SQSTM1 in the ovary of the vector *Rhodnius prolixus*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 17(6), e0011380.
- Farzana, L., & Brown, S. J. (2008). Hedgehog signaling pathway function conserved in *Tribolium* segmentation. *Development genes and evolution*, 218, 181-192.
- Fitch, K.R., Yasuda, G.K., Owens, K.N., Wakimoto, B.T. (1998). Paternal effects in *Drosophila*: implications for mechanisms of early development. *Curr Top Dev Biol* 38. 1-34.
- Forbes, A., & Lehmann, R. (1998). Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. *Development*, 125(4), 679-690.
- Forrest, K. M., & Gavis, E. R. (2003). Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for nanos mRNA localization in *Drosophila*. *Current biology*, 13(14), 1159-1168.
- Giorgi, F., Snigirevskaya, E.S., Raikel, A.S. 2005. Progress in Vitellogenesis. *Reproductive Biology of Invertebrates*. vol. XII. Part B. The cell biology of yolk proteinprecursor synthesis and secretion, in: Raikel, A.S. (Ed.), Science Publishers Inc., Enfield, USA, pp. 33-68.
- Goto, T., Kinoshita, T. (1999). Maternal transcripts of mitotic checkpoint gene, Xbub3, are accumulated in the animal blastomeres of *Xenopus* early embryo. *DNA Cell Biol* 18. 227-234.
- Graveley, B. R. (2001). Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *TRENDS in Genetics*, 17(2), 100-107.
- Gregor, T., Wieschaus, E. F., McGregor, A. P., Bialek, W., & Tank, D. W. (2007). Stability and nuclear dynamics of the bicoid morphogen gradient. *Cell*, 130(1), 141-152.
- Grimaldi, D., & Engel, M. S. 2005. *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press.
- Guzmán-Mendoza, R., Calzontzi-Marín, J., Salas-Araiza, M. D., & Martínez-Yáñez, R. 2016. La riqueza biológica de los insectos: análisis de su importancia multidimensional. *Acta zoológica mexicana*, 32(3), 370-379.
- Harding, K., Hoey, T., Warrior, R., & Levine, M. 1989. Autoregulatory and gap gene response elements of the even-skipped promoter of *Drosophila*. *The EMBO journal*, 8(4), 1205-1212.
- Hashimoto, H., Hara, K., Hishiki, A., Kawaguchi, S., Shichijo, N., Nakamura, K., ... & Sato, M. (2010). Crystal structure of zinc-finger domain of Nanos and its functional implications. *EMBO reports*, 11(11), 848-853.
- Heming, B. S. 2018. *Insect development and evolution*. Cornell University Press.

- Huebner, E., & Anderson, E. (1972). A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus*. I. The ontogeny of the follicular epithelium. *Journal of morphology*, 136(4), 459-493.
- Huebner, E., & Anderson, E. (1972). A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus*. II. Oocyte differentiation. *Journal of Morphology*, 137(4), 385-415.
- Huebner, E., & Anderson, E. (1972). A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus*. III. Cytoarchitecture and development of the trophic chamber. *Journal of Morphology*, 138(1), 1-39.
- Huebner, E. (1981). Oocyte—follicle cell interaction during normal oogenesis and atresia in an insect. *Journal of ultrastructure research*, 74(1), 95-104.
- Huebner, E., & Injeyan, H. (1981). Follicular modulation during oocyte development in an insect: formation and modification of septate and gap junctions. *Developmental biology*, 83(1), 101-113.
- Hughes, C. L., & Kaufman, T. C. (2000). RNAi analysis of *Deformed*, *proboscipedia* and *Sex combs* reduced in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*: novel roles for Hox genes in the hemipteran head. *Development*, 127(17), 3683-3694.
- Hülskamp, M., Schröder, C., Pfeifle, C., Jäckle, H., & Tautz, D. (1989). Posterior segmentation of the *Drosophila* embryo in the absence of a maternal posterior organizer gene. *Nature*, 338(6217), 629-632.
- Irish, V., Lehmann, R., & Akam, M. (1989). The *Drosophila* posterior-group gene *nanos* functions by repressing *hunchback* activity. *Nature*, 338(6217), 646-648.
- Jaeger, J. (2011). The gap gene network. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 243-274.
- Janssen, R., & Budd, G. E. (2013). Deciphering the onychophoran 'segmentation gene cascade': gene expression reveals limited involvement of pair rule gene orthologs in segmentation, but a highly conserved segment polarity gene network. *Developmental biology*, 382(1), 224-234.
- Jaruzelska, J., Kotecki, M., Kusz, K., Spik, A., Firpo, M., & Reijo Pera, R. A. (2003). Conservation of a Pumilio-Nanos complex from *Drosophila* germ plasm to human germ cells. *Development genes and evolution*, 213, 120-126.
- Johannsen, O. A., & Butt, F. H. (1941). Embryology of insects and myriapods. *Embryology of insects and myriapods*.
- Kelly, G. M., & Huebner, E. (1989). Embryonic development of the hemipteran insect *Rhodnius prolixus*. *Journal of morphology*, 199(2), 175-196.
- King RC, AGGARWAL SK (1965). Oogenesis in *Hyalophora cecropia*. *Growth* 29: 17-83.
- Klingler, M., & Bucher, G. (2022). The red flour beetle *T. castaneum*: elaborate genetic toolkit and unbiased large scale RNAi screening to study insect biology and evolution. *EvoDevo*, 13(1), 1-11.

- Kratz, J.M. et al. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. En: Expert Review of Clinical Pharmacology. 2018. p. 1-45
- Krause, G., 1939. Die Eitypen der Insekten. Biol Zentralbl. 59.
- Kugler, J. M., & Lasko, P. (2009). Localization, anchoring and translational control of oskar, gurken, bicoid and nanos mRNA during *Drosophila* oogenesis. *Fly*, 3(1), 15-28.
- Kunkel, J. G., & Nordin, J. H. (1985). Yolk proteins. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, 1, 83-111.
- Lange, A.B. & C, J., Orchard, I., 2020b. What happens after a blood meal? A transcriptome analysis of the main tissues involved in egg production in *rhodnius prolixus*, an insect vector of chagas disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.1–35 pp.
- Lange, A.B., Leyria, J., Orchard, I. 2022. The hormonal and neural control of egg production in the historically important model insect, *Rhodnius prolixus*: A review, with new insights in this post-genomic era, *General and Comparative Endocrinology*.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
- Lavore, A., Pagola, L., Esponda-Behrens, N., Rivera-Pomar, R. 2012. The gap gene giant of *Rhodnius prolixus* is maternally expressed and required for proper head and abdomen formation. *Dev Biol*. 361: 147-55
- Lavore, A., Esponda-Behrens, N., Pagola, L., & Rivera-Pomar, R. (2014). The gap gene Krüppel of *Rhodnius prolixus* is required for segmentation and for repression of the homeotic gene *sex comb-reduced*. *Developmental biology*, 387(1), 121-129.
- Lavore, A., Pascual, A., Salinas, F.M., Esponda-Behrens, N., Martinez-Barnette, J., Rodriguez, M., Rivera-Pomar, R. 2015. Comparative analysis of zygotic developmental genes in *Rhodnius prolixus* genome shows conserved features on the tracheal developmental pathway. *Insect Biochem Mol Biol*. 64, 32-43.
- Latham, K. E., & Schultz, R. M. (2001). Embryonic genome activation. *Front Biosci*, 6, D748-D759.
- Lawrence, P.A., 1992. *The Making of a Fly: The Genetics of Animal Design*, Blackwell Scientific Publications, OXFORD.
- Lécuyer, E., Yoshida, H., Parthasarathy, N., Alm, C., Babak, T., Cerovina, T., & Krause, H. M. (2007). Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell*, 131(1), 174-187.
- Lin, H., & Spradling, A. C. (1997). A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development*, 124(12), 2463-2476.

- Liu, P. Z., & Kaufman, T. C. (2004). Kruppel is a gap gene in the intermediate germband insect *Oncopeltus fasciatus* and is required for development of both blastoderm and germband-derived segments.
- Liu, P. Z., & 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*.
- Liu, P.Z., Kaufman, T.C. 2005. Short and long germ segmentation: unanswered questions in the evolution of a developmental mode. *Evol Dev.* 7, 629-46.
- Lutz, D. A., & Huebner, E. (1981). Development of nurse cell-oocyte interactions in the insect telotrophic ovary (*Rhodnius prolixus*). *Tissue and Cell*, 13(2), 321-335.
- Lynch, J. A., & Desplan, C. (2010). Novel modes of localization and function of nanos in the wasp *Nasonia*. *Development*, 137(22), 3813-3821.
- Lynch, J.A., Ozuak, O., Khila, A., Abouheif, E., Desplan, C., Roth, S. 2011. The phylogenetic origin of oskar coincided with the origin of maternally provisioned germ plasm and pole cells at the base of the Holometabola. *PLoS Genet.* 7, e1002029.
- Lynch, J. A., & Roth, S. 2011. The evolution of dorsal–ventral patterning mechanisms in insects. *Genes & development*, 25(2), 107-118.
- Lynch, JA, El-Sherif, E. y Brown, SJ. 2012. Comparaciones del desarrollo embrionario de *Drosophila*, *Nasonia* y *Tribolium*. *Reseñas interdisciplinarias de Wiley: biología del desarrollo*, 1 (1), 16-39.
- Mak, W., Xia, J., Cheng, E. C., Lowther, K., & Lin, H. (2018). A role of Pumilio 1 in mammalian oocyte maturation and maternal phase of embryogenesis. *Cell & bioscience*, 8(1), 1-17.
- Martinez-Arias, A., & Lawrence, P. A. 1985. Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo. *Nature*, 313(6004), 639-642.
- Mattoni, R., Longcore, T., & Novotny, V. 2000. Arthropod monitoring for fine scale habitat analysis: a case study of the El Segundo Sand Dunes. *Environmental Management*, 25, 445-4521.
- Mazur, G. D., Regier, J. C., and Kafatos, F. C., 1982, Morphogenesis of the silkworm chorion: Modification of the early framework (manuscript in preparation).
- Macdonald, P.M. 1992. The *Drosophila pumilio* gene: An unusually long transcription unit and an unusual protein. *Development* 114: 221–232.
- McLaughlin, J. M., & Bratu, D. P. 2015. *Drosophila melanogaster* oogenesis: an overview. *Drosophila oogenesis: methods and protocols*, 1-20.
- Medeiros, M.N, Ramos, I.B, Oliveira, DMP., da Silva, RCB., Gomes, F.M, Medeiros, L.N, Kurtenbach, E., Chiarini, L.B, Masuda, H., de Souza, W., Machado, E.A. 2011. Microscopic and molecular

characterization of ovarian follicle atresia in *Rhodnius prolixus* Stahl under immune challenge. *J Insect Physiol.* 57: 945–953.

Mellanby, H., 1934. The Early Embryonic Development of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Heteroptera). In *Development of Rhodnius* (London: Department of Zoology, University College), 71-90.

Mellanby, H. 1935. The early embryonic development of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Heteroptera). *Q J Microsc Sci.*

Mellanby, H., 1935. The Later Embryology of *Rhodnius prolixus*. In *Embryology of Rhodnius* (London: Department of Zoology, University College), 1-40.

Mellanby, H. 1936. The latter embryology of *Rhodnius prolixus*. *Q J Microsc Sci.* 1-40.

Melo, A.C., Valle, D., Machado, E.A., Salerno, A.P., Paiva-Silva, G.O., Cunha, E.S.N.L., de Souza, W., Masuda, H., 2000. Synthesis of vitellogenin by the follicle cells of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol.* 30, 549-57.

Mesquita, R. D., Vionette-Amaral, R. J., Lowenberger, C., Rivera-Pomar, R., Monteiro, F. A., Minx, P., ... & Oliveira, P. L. (2015). Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(48), 14936-14941.

Muraro, N. I., Weston, A. J., Gerber, A. P., Luschnig, S., Moffat, K. G., & Baines, R. A. (2008). Pumilio binds para mRNA and requires Nanos and Brat to regulate sodium current in *Drosophila* motoneurons. *Journal of Neuroscience*, 28(9), 2099-2109.

Nazar, A. P., Delgado, M. J., & Lavore, A. (2022). Empty-spiracles is maternally expressed and essential for neurodevelopment and early embryo determination in *Rhodnius prolixus*. *Developmental Biology*, 490, 144-154.

Nunes da Fonseca, R., von Levetzow, C., Kalscheuer, P., Basal, A., van der Zee, M., & Roth, S. (2008). Self-regulatory circuits in dorsoventral axis formation of the short-germ beetle *Tribolium castaneum*. *Developmental Cell*, 14, 605–615.

Nüsslein-Volhard, C., Lohs-Schardin, M., Sander, K., & Cremer, C. 1980. A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of *Drosophila*. *Nature*, 283(5746), 474-476.

Nüsslein-Volhard, C., Frohnhofer, H. G., & Lehmann, R. 1987. Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila*. *Science*, 238(4834), 1675-1681.

Nüsslein-Volhard, C. 1991. Determination of the embryonic axes of *Drosophila*. *Development*, 113(Supplement\_1), 1-10.

Pagola, L. E. (2012). Análisis genómico y molecular de la embriogénesis de *Rhodnius prolixus* (Stål, 1859)(Hemiptera, Reduviidae): implicancias morfológico-evolutivas en insectos (Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata).

- Panfilio, K. A., Liu, P. Z., Akam, M., & Kaufman, T. C. 2006. *Oncopeltus fasciatus* zen is essential for serosal tissue function in katatrepsis. *Developmental biology*, 292(1), 226-243.
- Papantonis, A., Swevers, L., & Iatrou, K. 2015. Chorion genes: a landscape of their evolution, structure, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 60, 177-194.
- Parisi, M., & Lin, H. (2000). Translational repression: a duet of Nanos and Pumilio. *Current Biology*, 10(2), R81-R83.
- Pascual, A. (2019). *Genómica del desarrollo embrionario de Rhodnius prolixus* (Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata).
- Pascual, A., Vilardo, ES, Taibo, C., Sabio y García, J., & Pomar, RR 2021. Bicaudal C es necesario para la función del epitelio folicular durante la ovogénesis en *Rhodnius prolixus*. *Development Genes and Evolution*, 231,33-45.
- Pascual, A., Rivera-Pomar, R. Dynamics of maternal gene expression in *Rhodnius prolixus*. *Sci Rep*. 2022 Apr 20;12(1):6538. doi: 10.1038/s41598-022-09874-7.
- Pattatucci, A. M., & Kaufman, T. C. (1991). The homeotic gene *Sex combs reduced* of *Drosophila melanogaster* is differentially regulated in the embryonic and imaginal stages of development. *Genetics*, 129(2), 443-461.
- Pattatucci, A. M., Otteson, D. C., & Kaufman, T. C. (1991). A functional and structural analysis of the *Sex combs reduced* locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 129(2), 423-441.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Purvis, A., & Hector, A. 2000. Getting the measure of biodiversity. *Nature*, 105, 212-219.
- Raikhel, A., Brown, M., & Belles, X. (2005). 3.9 Hormonal control of reproductive processes. *Comprehens Mol Insect Sci*, 3, 433-91.
- Reding, K., Chen, M., Lu, Y., Cheatle Jarvela, A. M., & Pick, L. (2019). Shifting roles of *Drosophila* pair-rule gene orthologs: segmental expression and function in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. *Development*, 146(17), dev181453.
- Rezende-Teixeira, P., Palomino, N. B., & Machado-Santelli, G. M. (2012). *Rnanos* expression pattern during oogenesis and early embryonic development in *Rhynchosciara americana*. *Development genes and evolution*, 222, 153-164.
- Ribeiro, J.M., Genta, F.A., Sorgine, M.H., Logullo, R., Mesquita, R.D., Paiva-Silva, G.O., Majerowicz, D., Medeiros, M., Koerich, L., Terra, W.R., Ferreira, C., Pimentel, A.C., 59 Bisch, P.M., Leite, D.C., Diniz, M.M., da, S.G.V.J.J.L., Da Silva, M.L., Araujo, R.N., Gandara, A.C., Brosson, S., Salmon, D., Bousbata, S., Gonzalez-Caballero, N., Silber, A.M., Alves-Bezerra, M., Gondim, K.C., Silva-Neto, M.A., Atella, G.C., Araujo, H., Dias, F.A., Polycarpo, C., Vionette-Amaral, R.J., Fampa, P.,

- Melo, A.C., Tanaka, A.S., Balczun, C., Oliveira, J.H., Goncalves, R.L., Lazoski, C., Rivera-Pomar, R., Diambra, L., Schaub, G.A., Garcia, E.S., Azambuja, P., Braz, G.R., Oliveira, P.L. 2014. An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. *PLoS Negl Trop Dis*. 8, e2594.
- Rivera-Pomar, R., Lu, X., Perrimon, N., Taubert, H., & Jäckle, H. (1995). Activation of posterior gap gene expression in the *Drosophila* blastoderm. *Nature*, 376(6537), 253-256.
- Roth, S., Stein, D., & Nüsslein-Volhard, C. (1989). A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell*, 59(6), 1189-1202.
- Sachs, L., Chen, Y. T., Drechsler, A., Lynch, J. A., Panfilio, K. A., Lassig, M., Berg, J., Roth, S. (2015). Dynamic BMP signaling polarized by Toll patterns the dorsoventral axis in a hemimetabolous insect. *Elife*, 4, e05502.
- Sander, K. y Nübler-Jung, K. (1981). Polaridad y gradientes en el desarrollo de insectos. En *Biología celular internacional 1980-1981: artículos presentados en el Segundo Congreso Internacional de Biología Celular Berlín (Oeste)*, 31 de agosto al 5 de septiembre de 1980 (págs. 497-506). Berlín, Heidelberg: Springer Berlín Heidelberg.
- Sano, H., Mukai, M., & Kobayashi, S. (2001). Maternal Nanos and Pumilio regulate zygotic vasa expression autonomously in the germ-line progenitors of *Drosophila melanogaster* embryos. *Development, growth & differentiation*, 43(5), 545-552.
- Sauer, K., Weigmann, K., Sigrist, S., & Lehner, C. F. (1996). Novel members of the cdc2-related kinase family in *Drosophila*: cdk4/6, cdk5, PFTAIRE, and PITSLRE kinase. *Molecular biology of the cell*, 7(11), 1759-1769.
- Schmitt-Engel, C., Cerny, A. C., & Schoppmeier, M. (2012). A dual role for nanos and pumilio in anterior and posterior blastodermal patterning of the short-germ beetle *Tribolium castaneum*. *Developmental biology*, 364(2), 224-235.
- Schüpbach, T., & Roth, S. (1994). Dorsoventral patterning in *Drosophila* oogenesis. *Current opinion in genetics & development*, 4(4), 502-507.
- Sedra, L., & Lange, A. B. (2016). Cloning and expression of long neuropeptide F and the role of FMRFamide-like peptides in regulating egg production in the Chagas vector, *Rhodnius prolixus*. *Peptides*, 82, 1-11.
- Simpson, P. (1983). Maternal-Zygotic Gene Interactions during Formation of the Dorsoventral Pattern in *Drosophila* Embryos. *Genetics* 105. 615-632.
- Sosa-Estani, S., Viotti, R., & Segura, E. L. (2009). Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 167-180.
- Speder, P., Adam, G. and Noselli, S., 2006. Type ID unconventional myosin controls left-right asymmetry in *Drosophila*. *Nature*. 440, 803-7.

- St Johnston, D., & Nüsslein-Volhard, C. (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell*, 68(2), 201-219.
- Stork, NE (2018). ¿Cuántas especies de insectos y otros artrópodos terrestres hay en la Tierra? *Revista anual de entomología*, 63, 31-45.
- Tadros, W., & Lipshitz, H. D. (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*, 136(18), 3033-3042.
- Tautz, D., Friedrich, M. & Schröder, R. (1994). Embriogénesis de insectos: ¿qué es ancestral y qué se deriva? *Desarrollo*, 1994 (Suplemento), 193-199.
- Telfer, W. H., & Anderson, L. M. (1968). Functional transformations accompanying the initiation of a terminal growth phase in the cecropia moth oocyte. *Developmental Biology*, 17(5), 512-535.
- Tobias-Santos, V., Pane, A., Berni, M., Araujo, H. M., & Nunes-da-Fonseca, R. (2021). Embryonic Development of the Kissing Bug *Rhodnius prolixus*. In *Triatominae-The Biology of Chagas Disease Vectors* (pp. 101-121). Cham: Springer International Publishing.
- Valle D, Lima Gomes JEP, Goldenberg S and Garcia ES. 1987. *R. prolixus* vitellogenesis: dependence upon the blood source. *J Insect Physiol* 33: 249-254.
- Vieira, P. H., Bomfim, L., Atella, G. C., Masuda, H., & Ramos, I. (2018). Silencing of RpATG6 impaired the yolk accumulation and the biogenesis of the yolk organelles in the insect vector *R. prolixus*. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(5), e0006507.
- Wang, C., & Lehmann, R. (1991). Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila*. *Cell*, 66(4), 637-647.
- Wang, C., Dickinson, L. K., & Lehmann, R. (1994). Genetics of nanos localization in *Drosophila*. *Developmental dynamics*, 199(2), 103-115.
- Wang, X., Zamore, P. D., & Hall, T. M. T. (2001). Crystal structure of a Pumilio homology domain. *Molecular cell*, 7(4), 855-865.
- Wang, X., McLachlan, J., Zamore, P. D., & Hall, T. M. T. (2002). Modular recognition of RNA by a human pumilio-homology domain. *Cell*, 110(4), 501-512.
- Waring, G. L., & Mahowald, A. P. (1979). Identification and time of synthesis of chorion proteins in *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 16(3), 599-607.
- Weidmann, C. A., Qiu, C., Arvola, R. M., Lou, T. F., Killingsworth, J., Campbell, Z. T., & Goldstrohm, A. C. (2016). *Drosophila* Nanos acts as a molecular clamp that modulates the RNA-binding and repression activities of Pumilio. *Elife*, 5, e17096.
- Wharton, R. P., & Struhl, G. (1991). RNA regulatory elements mediate control of *Drosophila* body pattern by the posterior morphogen nanos. *Cell*, 67(5), 955-967.

- Wigglesworth, V.B., 1934. The physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II. Factors controlling moulting and metamorphosis. *Q. J. Microsc. Sci.* 77, 191–222.
- Wigglesworth, V. B. (1951). Source of moulting hormone in *Rhodnius*. *Nature*, 168(4274), 558-558.
- Wigglesworth, VB (1964). La regulación hormonal del crecimiento y la reproducción en insectos. *Avances en fisiología de insectos*, 2, 247-336.
- Wreden, C., Verrotti, A. C., Schisa, J. A., Lieberfarb, M. E., & Strickland, S. (1997). Nanos and pumilio establish embryonic polarity in *Drosophila* by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA. *Development*, 124(15), 3015-3023.
- Ye, B., Petritsch, C., Clark, I. E., Gavis, E. R., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2004). Nanos and Pumilio are essential for dendrite morphogenesis in *Drosophila* peripheral neurons. *Current biology*, 14(4), 314-321.
- Zhang, B., Gallegos, M., Puoti, A., Durkin, E., Fields, S., Kimble, J., and Wickens, M.P. (1997). A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the *C. elegans* hermaphrodite germ line. *Nature* 390, 477–484.