



Naturalis

Repositorio Institucional
<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Análisis genómicos y molecular de la embriogénesis de *Rhodnius prolixus* (Stähl, 1859) (Hemíptera, Reduviidae) : implicancias morfológico-evolutivas en insectos

Pagola, Lucía Elena

Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: Rivera Pomar, Rolando

Facultad de Ciencias Naturales y Museo
2012

Acceso en:
<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20140310001322>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



Naturalis

Repositorio Institucional
FCNyM - UNLP



Facultad de Ciencias Naturales y Museo

Universidad Nacional de La Plata

Análisis genómico y molecular de la
embriogénesis de *Rhodnius prolixus*
(Stahl, 1859) (Hemíptera, Reduviidae):
implicancias morfológico-evolutivas en insectos

Lic. Lucía Elena Pagola

2012

Director: Rolando Rivera-Pomar,

Centro Regional de Estudios Genómicos (CREG- UNLP)

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Java por su constante apoyo y ayuda en cada una de las desiciones tomadas, entre ellas la de encarar un doctorado.

También a mi familia que me ha inculcado el valor de la educación y me han acompañado en cada una de sus etapas y han estado presentes cada vez que lo he necesitado.

A Rolando por darme un espacio en su laboratorio y los medios necesarios para llevar a cabo este trabajo, además de darme la libertad para compatibilizar tesis con maternidad.

A todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio, a los actuales y a los que pasaron por el mismo, no solo por la invaluable discusión diaria de resultados y experimentos, sino también por hacer de cada día de trabajo un placer.

Especialmente quiero agradecer a Naty y Andrés quienes han sido de gran ayuda a lo largo de todo este recorrido, han compartido sus experiencias y discutido resultados conmigo, enriqueciendo no solo este trabajo sino también a mi persona.

A todos los que con su cariño y ayuda hicieron que todo fuera más fácil, Estela, Amilcar, los amigos del coro, de la facu, los de toda la vida.

Por último, y no por eso menos importante, a Emi, por las horas de juego postergadas

Para Java y Emi

Abreviaturas

ADN: Acido desoxirribonucleico.
ADNc: molécula de ADN complementaria a un mensajero de ARN.
A-P: eje anteroposterior
ARN: Acido ribonucleico.
ARNdc: Ácido ribonucleico doble cadena
ARNi: refiriéndose a la técnica de ARN de interferencia.
ARNm: Mensajero de ARN.
ARNpol: ARN polimerasa.
ARNt: ARN de transferencia.
Asn: Asparagina
BG: Banda germinal
BMP: del inglés *Bone Morphogenetic Protein*
D-V: eje dorsoventral
D-P: eje distal proximal
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
EGF: del inglés *Epidermal Growth Factor*
EGTA: Etilen glicol ácido tetraacético
ESTs: del inglés *Expressed sequence tags*.
dNTP: trifosfato deoxiribonucleotido.
DMSO: Dimetilsulfoxido.
hpo: horas post ovipuesta.
dH₂O: Agua destilada.
ddH₂O
dNTP: Trifosfato deoxiribonucleotido
ETOH: etanol
Fw: Del inglés *Foward* aplicado a los *primers*.
Gln: Glicina
His: Histidina
M: Molar.
mM: milimolar.
μM: micromolar.
μl: microlitros.
METOH: metanol
NBT/BCIP: nitro-blue tetrazolium cloro/5-bromo-4-cloro-3'-indolyfosfato p-toluidino
O.N.: del inglés *Over Nigth* – durante la noche, en relación a incubaciones de 8 a 12 hs de duración.
Pb: par de bases nucleotidicas
PCR: del inglés *Polimerase Chain Reaction*.
PBS: del ingles *Phosphate Buffer Saline*.
PBT: PBS con detergente Tween 20
PFA: Paraformaldeido.
RACE: del ingles *Rapid amplification of cDNA ends*.
rATP: Trifosfato de riboadenosina
rCTP: Trifosfato de ribocitosina
rGTP: Trifosfato de riboguanidina
rUTP: Trifosfato de ribouridina
R-OH: Alcohol
Rv: del inglés *Reverse*, aplicado a los cebadores.
Ser: Serina
SSC: Buffer salino sodio-citrato
T°a : Temperatura de *anealling* (Temperatura Hibridación de los cebadores).
Thr: Treonina
U: Unidades enzimáticas.
Vf : Volumen final
Vol.: Volumen

Índice

Resumen.....	1
Abstract	2
1. Introducción.....	4
1.1. El desarrollo embrionario de los insectos	6
1.2. El eje dorsoventral.....	9
1.3. <i>Rhodnius prolixus</i> como modelo	13
1.4. Objetivos	14
2. Materiales y métodos.....	17
2.1. Cuidado de <i>R. prolixus</i> en laboratorio.....	17
2.2. Manipulación de los embriones y ovariolas.....	18
2.3. Búsqueda bioinformática de genes del desarrollo	19
2.4. Síntesis de ADNc de huevos	20
2.5. Amplificación con <i>primers</i> específicos y degenerados	21
2.6. Clonado y secuenciación	23
2.7. Síntesis de las sondas de ARN	24
2.8. Hibridación <i>in situ</i>	26
2.8.1 .Hibridación	26
2.8.2Montaje	28
2.9. ARNi.....	28
2.9.1. Armado de los <i>primers</i>	28
2.9.2. Preparación del templado	28
2.9.3. Precipitación isopropanólica / Extracción fenólica	30
2.9.4. Transcripción in vitro	31
2.10. Microscopía e imágenes.....	32
3. Resultados y discusión	34
CAPÍTULO 1. Análisis de la biología del desarrollo de <i>R. prolixus</i>	33
CAPÍTULO 2. Identificación de genes de desarrollo relacionados con el eje dorsoventral en <i>R. prolixus</i>	43
2.1. Dorsal.....	47
2.2. Toll	52

2.3. Decapentaplegic.....	58
2.4. Twist	63
2.5. Zerknüllt	67
2.6. Zelda (Vielfaltig)	71
CAPÍTULO 3. Análisis funcional de los genes dorsoventrales.....	76
3.1. Dorsal	77
3.1.1. Hibridación <i>in situ</i>	77
3.1.2. ARNi Parental	80
3.2 Toll.....	83
3.2.1 Hibridación <i>in situ</i>	83
3.2.2. RNAi Parental	85
3.3. Decapentaplegic.....	90
3.3.1. Hibridación <i>in situ</i>	90
3.3.2. ARNi parental	93
4. Conclusión.....	97
Bibliografía	104
Anexo	112
1. Soluciones.....	113
2. Solución de problemas en la hibridación <i>in situ</i>	115

Resumen

Todos los animales que poseen simetría bilateral se encuentran definidos por dos ejes de simetría ortogonales, el eje anteroposterior (A-P) que corre de la boca al ano y un eje perpendicular a este, el eje dorsoventral (D-V).

A pesar de la gran variedad de modos de desarrollo embrionario y formas finales encontradas en los animales, las redes regulatorias y factores de transcripción que dan origen a estos ejes se encuentran muy conservados. De aquí surge una pregunta central, cómo estas redes regulatorias tan conservadas crean tanta diversidad morfológica, se adaptan a nuevos ambientes y de qué manera las novedades evolutivas se incorporan en un sistema de patronamiento ya establecido.

El eje DV es un buen sistema de estudio ya que se conoce en detalle en *Drosophila melanogaster* pero no en otros insectos. Los insectos además presentan una gran variedad de especies y modos de desarrollo embrionario lo que nos permite estudiar de qué manera las redes regulatorias se adaptan a novedades evolutivas y la existencia de varias técnicas que permiten testear el funcionamiento de los genes y sus interacciones.

En este contexto hemos utilizado a *Rhodnius prolixus* como modelo para el estudio del establecimiento del eje DV en un embrión de banda germinal intermedia donde al final del desarrollo el embrión posee la misma forma que el adulto.

Hemos estudiado en detalle el desarrollo embrionario de *R. prolixus* para una mejor comprensión de los patrones de expresión de los genes estudiados y su función.

Además, se han buscado y anotado varios genes envueltos en la formación del eje DV: *toll*, *dorsal*, *decapentaplegic*, *zerknült*, *twist* y *zelda*. Mostraremos el patrón de expresión y los fenotipos resultado de ARNi parental de *toll*, *dpp* y *dorsal*, los cuales representan puntos clave en la regulación de la cascada D-V.

Abstract

All animals with bilateral symmetry are defined by two orthogonal axes, the anterior-posterior (A-P) that runs from the mouth to the anus and the dorsoventral (D-V). Despite the variety of modes of embryonic development and animal forms, the regulatory networks and transcription factors, which give rise to these axes, are conserved. This fact gives rise to a central question, how these conserved regulatory networks adapt to a new environment and how evolutionary novelties are incorporated into a patterning system already established?

The D-V axis represents a good system to study. It is known in detail in *Drosophila melanogaster*, but not in other insects. The insects present a variety of species and modes of embryogenesis that allows us to study how the regulatory networks adapt to evolutionary novelties and the existence of several techniques to test the function of genes and their interactions makes of them the ideal model.

In this context we have used *Rhodnius prolixus* as a model to study the establishment of the DV axis in an intermediate germ band embryo where it reaches at the end of its development the same shape of the adult.

We have studied the embryonic development of *R. prolixus* in detail to a better understanding of the expression patterns of genes studied and their function.

Also, we have searched and annotated several genes involved in DV axis formation: *toll*, *dorsal*, *decapentaplegic*, *zerknüllt*, *twist* and *zelda*. We will show the expression pattern and the phenotypes that result after parental RNAi of *toll*, *dpp* and *dorsal*, which represent key regulatory points of the cascade.

Introducción

1. Introducción

Todos los animales que poseen simetría bilateral se encuentran definidos por dos ejes de simetría ortogonales, el eje anteroposterior (A-P) que corre de la boca al ano y un eje perpendicular a este, el eje dorsoventral (D-V).

A pesar de la gran variedad de modos de desarrollo embrionario y formas finales encontradas en los animales, las redes regulatorias y factores de transcripción que dan origen a estos ejes se encuentran muy conservados. De aquí surge una pregunta central, cómo estas redes regulatorias tan conservadas crean tanta diversidad morfológica, se adaptan a nuevos ambientes y de qué manera las novedades evolutivas se incorporan en un sistema de patronamiento ya establecido.

Dadas estas profundas homologías génicas, animales tan distintos como por ejemplo una tenia, una serpiente, un ciempiés y una lombriz, habrían utilizado la misma estrategia génica para desarrollar la estructura elongada y metamérica que los caracteriza. Esto supone que las redes regulatorias que determinan esos patrones se encontrarían ya presentes en un ancestro común. Esta hipótesis se evidencia en el eje D-V, donde la vía de señalización *chordin/BMP* (Bone Morphogenetic Protein) fue encontrada tanto en vertebrados como invertebrados, donde los genes homólogos se llaman *short gastrulation/decapentaplegic*, (*sog/dpp*). La única diferencia en esta vía se encuentra en que están invertidos, mientras que en vertebrados *chordin* se expresa dorsalmente y *BMP* ventralmente, en *Drosophila melanogaster* (Diptera) *sog* se expresa ventralmente y *dpp* dorsalmente (Fig. 1).

Este hallazgo llevó a la reconsideración de una vieja hipótesis formulada en 1822 por el naturalista francés Geoffroy Saint-Hilaire, quien observó que el eje dorsoventral en vertebrados e invertebrados se encontraba invertido, proponiendo que Deuterostomados y Protostomados provenían de un ancestro común y en algún momento de la evolución este eje se habría invertido en los vertebrados. Esa hipótesis de Saint-Hilaire desafió conceptos establecidos hasta hace poco y fue desestimada por mucho tiempo.

Si bien esta hipótesis resurge a partir de estudios moleculares del desarrollo embrionario no contradice los aspectos morfológicos, sino que encuentra una base genética y aporta evidencias acerca del ancestro común de Deuterostomados y

Protostomados, denominado por Eduardo De Robertis –aunque sin categoría taxonómica– como Urbilateria (De Robertis y Sasai, 1996; De Robertis, 2008; Mizutani y Bier, 2008).

Sin embargo en el marco del estudio del desarrollo embrionario, desde el punto de vista morfológico, hay quienes sostienen que se debe tener extrema cautela con respecto a dicha hipótesis ya que los estudios moleculares no tienen en cuenta los linajes celulares, el estudio de los linajes celulares en estadios de desarrollo tempranos sugieren que migración y una rotación topológica de los derivados de las micrómeras podrían explicar esta dicotomía en la expresión de los genes o que el ancestro común a ambos linajes no tuviera un eje dorsoventral definido sino que sería más bien ambiguo y a partir de este ancestro los descendientes de los protostomados habrían establecido el eje dorsoventral en un sentido y los descendientes de los deuterostomados en el sentido opuesto. (Biggelaar *et al*, 2002; Gerhart, 2000). El estudio comparado de linajes celulares se encuentra en sus primeras fases de desarrollo en el oligoqueto *Platynereis sp* (Tomer *et al*, 2010) y parece sustentar que los mecanismos de patronamiento se han conservado y que su origen sería previo a la aparición de los bilaterios.

En ambos campos de la embriología la información con que se cuenta deriva de estudios en pocos modelos animales, y la falta de información que permita vincular ambas posturas resulta en la obvia necesidad de expandir estos estudios a otros modelos. Aún así es poco probable que los mecanismos bioquímicos que llevan al establecimiento del eje D-V hayan aparecido independientemente dos veces en la evolución por lo que la conclusión más probable es que la vía *chordin/sog-BMP/dpp* ya tuviera lugar en Urbilateria (De Robertis, 2008) y la polaridad habría cambiado usando los mismos componentes genéticos. Un caso similar podría considerarse el monofiletismo de los ojos o fotoreceptores en general (Gehring 2005).

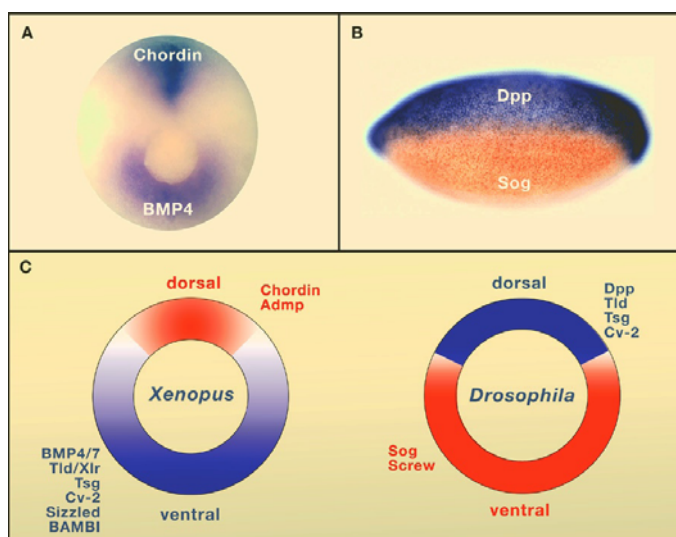


Figura 1. Aunque la red de señalización chordin/BMP se encuentra conservada, ha habido una inversión en el eje D-V de *D. melanogaster* a *X. laevis*.

(A) En *X. laevis*, chordin se expresa en el lado dorsal y BMP4 en el polo ventral.

(B) En *D. melanogaster*, dpp es dorsal (azul) y sog es ventral (rojo) en el ectodermo

(C) Una red conservada de proteínas media el patronamiento D-V en *X. laevis* y *D. melanogaster*.

Tomado de De Robertis, 2008

Por esta razón el eje dorsoventral constituye un sistema ideal de estudio en cuanto a cómo los cambios evolutivos afectan el juego entre los mecanismos conservados y los no conservados (Lynch y Roth, 2011). La utilización de insectos como modelo incluye varias ventajas, entre ellas:

- Que los insectos poseen una gran diversidad de especies permitiendo varios puntos de muestreo a través de los cuales la historia evolutiva del eje D-V puede ser reconstruida.
- La variación en los modos de embriogénesis permiten estudiar de qué manera las redes regulatorias se adaptan a las novedades evolutivas.
- La existencia de genomas secuenciados pertenecientes a varios insectos facilitando la búsqueda de los componentes de la vía (Weinstock et al.2006; Richards et al. 2008; The International Aphid Genomics Consortium 2010; Werren et al 2010).
- Varias técnicas que permiten testear el funcionamiento de los genes como el ARNi parental que nos permite entender la interacción entre los genes (Hughes and Kaufman 2000; Bucher et al 2002; Miyawaki et al. 2004; Lynch y Desplan 2006; Ohde et al. 2009).
- La casi completa comprensión de los mecanismos que llevan al establecimiento del eje D-V en *D. melanogaster* proveyendo una excelente fuente de comparación de la información y generación de hipótesis.

1.1. El desarrollo embrionario de los insectos

El plan corporal de los insectos se encuentra altamente conservado, todos poseen una cabeza que consta de 6-7 segmentos, un tórax con 3 segmentos y un abdomen constituido por 8-11 segmentos. Pero esta conservación morfológica esconde una gran diversidad subyacente en el desarrollo embrionario que da origen a este plan corporal.

En principio hasta el estadio de blastodermo todos los insectos se desarrollan de manera similar, hay división de núcleos, formando un gran sincicio, luego los núcleos migran a la periferia donde finalmente se forman las membranas plasmáticas formando el

blastodermo (o blástula). A partir de este momento es que aparecen las diferencias que tienen que ver con la gastrulación y la formación de la banda germinal (BG).

Existen tres grandes grupos, los insectos que poseen un desarrollo embrionario de tipo BG larga, los que poseen BG intermedia y los que poseen BG corta.

En los insectos que se desarrollan a partir de lo que se denomina BG larga, el desarrollo sólo involucra procesos de subdivisión del blastodermo en segmentos individuales para producir el cuerpo entero, es decir que todos los segmentos del cuerpo son especificados simultáneamente en el estadio de blastodermo y los tres tagmata (cabeza, tórax y abdomen) tienen proporciones muy similares en la larva y el adulto.

Este tipo de desarrollo embrionario es el más conocido debido a la gran cantidad de trabajo llevado a cabo en el desarrollo de la mosca de la fruta *D. melanogaster* y en general se lo considera como evolutivamente derivado ya que sólo los insectos holometábolos más derivados poseen este tipo de desarrollo (Liu y Kaufman, 2005)

Por otro lado se encuentran los insectos que se desarrollan a partir de una BG intermedia o corta, en ambos tipos de desarrollo sólo los segmentos anteriores (la cabeza en los de banda corta y cabeza y tórax en intermedia) se especifican durante el estadio de blastodermo (Heming, 2003). Los segmentos posteriores aparecen más tarde en la embriogénesis durante una segunda fase de crecimiento de la banda germinal. Este crecimiento se da por la elongación de la región posterior llamada Zona de Crecimiento que a través de divisiones mitóticas y reorganización de las células genera el resto de los segmentos que son especificados secuencialmente y progresivamente de anterior a posterior.(Fig. 2)

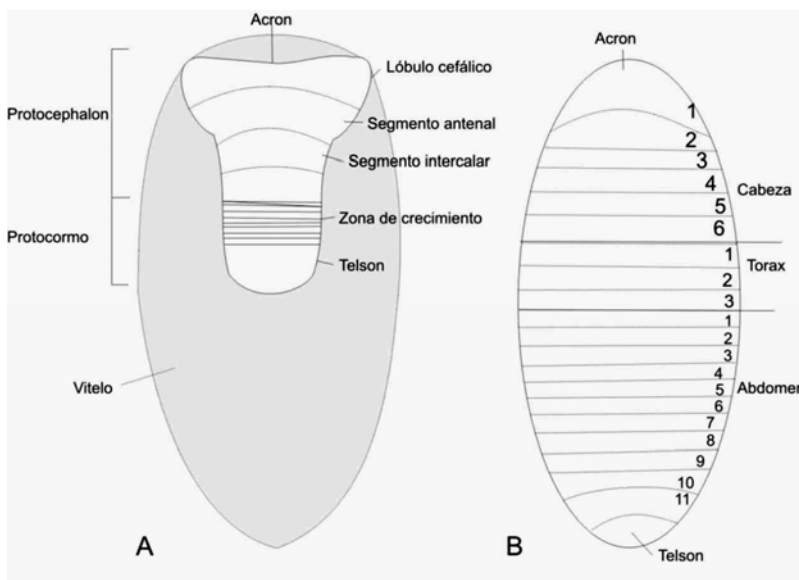


Fig. 2. (A) Banda germinal corta donde se encuentran especificados los primeros segmentos de la cabeza, la zona de crecimiento, acron y telson, la diferencia con la banda germinal intermedia es que en este estadio se especifican todos los segmentos de la cabeza y torax **(B)** Banda germinal larga donde desde un principio se especifican todos los segmentos del

cuerpo con las proporciones que posteriormente presentará la larva.

Dado que las formas de desarrollo de BG corta e intermedia son conceptualmente equivalentes se las suele agrupar y denominar conjuntamente como “corta” y se encuentra representada en los órdenes basales de insectos indicando que algunas formas de desarrollo de BG corta son evolutivamente ancestrales (Liu and Kaufman 2004), y considerándose el desarrollo por BG larga como una adaptación para una rápida embriogénesis, ya que estos insectos organizan el patrón segmental del cuerpo entero de una sola vez. Sin embargo un eco de las dos fases de segmentación de los insectos de BG corta persiste en los de BG larga en el patrón de expresión secuencial de los genes reguladores que especifican los segmentos y la identidad de los segmentos (Heming, 2003). La BG corta es ancestral y la sucesión de eventos que llevan a la segmentación del cuerpo es similar a lo observado en vertebrados.

El proceso a través del cual se forman las unidades metaméricas y la especificación de los segmentos es bien conocida en *D. melanogaster*, tiene lugar inmediatamente después de la formación del blastodermo y se encuentra bajo el control de tres grandes grupos de genes: los genes de efecto materno, que definen las coordenadas espaciales a lo largo de los ejes anteroposterior (A-P) y dorsoventral (D-V) (Rivera Pomar y Jäckle, 1996; Morisato y Anderson, 1995); los genes de segmentación, que determinan el número y la polaridad correctos de unidades metaméricas (Rivera Pomar y Jäckle, 1996) y los genes selectores homeóticos que especifican la identidad de los segmentos (Mlodzik y Gehring, 1987; Mann y Morata, 2000). (Fig. 3)

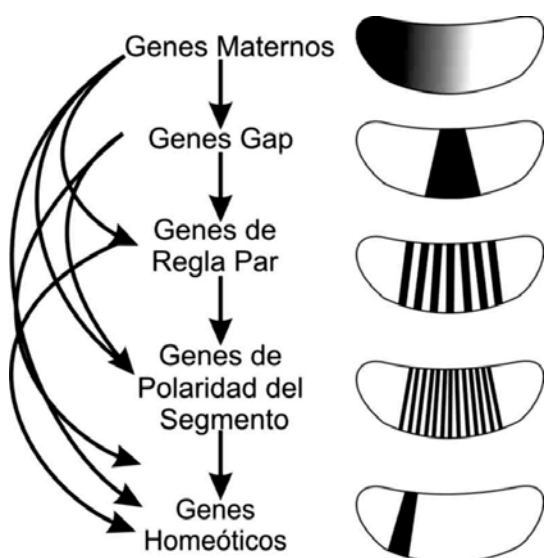


Fig.3. Resumen de la jerarquía que controla la segmentación anteroposterior en embriones de *D. melanogaster*. A la izquierda una representación esquemática de las clases de genes que especifican el patrón del cuerpo anteroposterior y las relaciones regulatorias entre ellos, además dentro de cada jerarquía regulan otros genes dentro de la misma clase. A la derecha representación de los patrones de expresión de cada clase de genes en el blastodermo o preblastodermo

1.2. El eje dorsoventral

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

La primera asimetría D-V se da durante la formación del oocito en las ovariolas, a partir de la migración del núcleo del oocito rodeado del mensajero de la proteína Gürken hacia una posición cortical que es asimétrica con respecto al eje corto de la cámara del huevo. Allí este mensajero es traducido y su proteína juega un rol instructivo señalando a las células foliculares somáticas inmediatamente próximas que asuman una identidad dorsal (Shupbach y Roth 1994). Allí se activa el homólogo del Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFR) en *D. melanogaster*, *torpedo*, reprimiendo la expresión de *pipe* en las células foliculares dorsales, esta represión sólo se da en la región dorsal del oocito (Fig. 4), sobre el lado ventral la expresión de *pipe* desencadena una cascada proteolítica integrada por los genes *nudel (ndl)*, *windbeutel (wind)*, *gastrulation defective (gd)*, *snake (snk)*, *easter (ea)* y *spätzle (spz)*. Esta cascada proteolítica culmina con el clivaje y activación del ligando de Toll, Spätzle (Spz) en la porción ventral del espacio perivitelino (Moussian y Roth 2005).

La proteína Spz clivada se une y activa al receptor de membrana Toll que es provisto por la madre y que se encuentra en la membrana plasmática embrionaria.

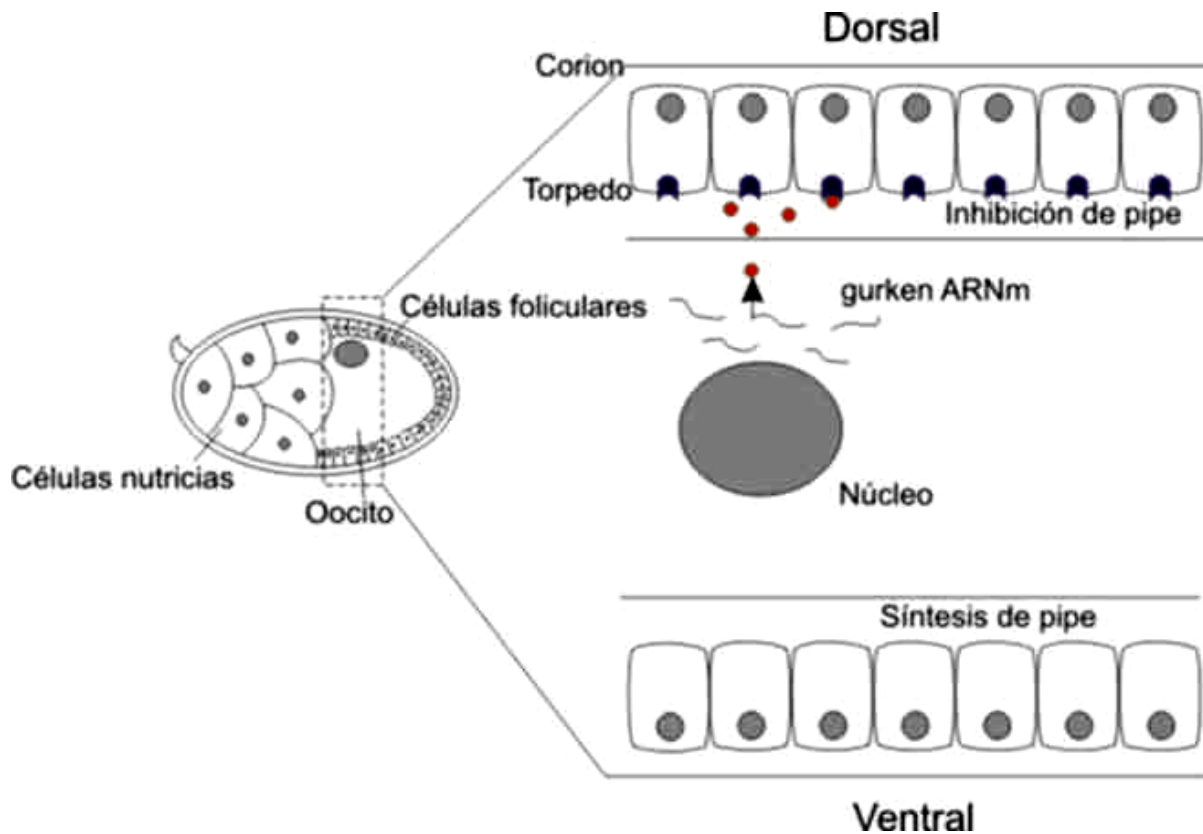


Fig. 4. El núcleo del oocito viaja hacia lo que será el lado anterior y dorsal del mismo. Allí el mensajero de *gurken* es traducido para producir la proteína Gürken que es recibida por Torpedo en las células foliculares próximas. La señal de Torpedo induce a las células foliculares a diferenciarse como dorsales. La síntesis de la proteína Pipe es inhibida en las células foliculares dorsales. La proteína Gürken no difunde hacia el lado ventral. Las células foliculares ventrales sintetizan la proteína Pipe.

Corriente abajo del receptor Toll, en el dominio citoplasmático, los genes maternos, *tube (tub)*, *pelle (pll)*, *cactus (cact)* y *dorsal (dl)* trasducen la señal en el embrión (Anderson et al., 1985; Roth et al., 1991; Hecht y Anderson, 1993; Shelton y Wasserman, 1993). Estos genes codifican componentes citoplasmáticos de la cascada de señalización, que culmina con la traslocación de Dorsal, miembro de la familia de Factores de Transcripción NFκB (Steward, 1987) a los núcleos embrionarios durante el estadio de blastodermo.

La activación de Toll lleva a la fosforilación y degradación del homólogo de IκB, Cactus (Cact), que en ausencia de señalización se une a Dorsal secuestrándolo en el citoplasma. La fosforilación de Cact permite la traslocación de Dorsal al núcleo donde se une a secuencias específicas del ADN regulando la transcripción de varios genes. Estos procesos se dan en un gradiente que encuentra su máximo sobre el lado ventral y como

consecuencia el mismo gradiente se da para Dorsal y se mantiene estable durante 14 divisiones sincrónicas de los núcleos.(Fig. 5).

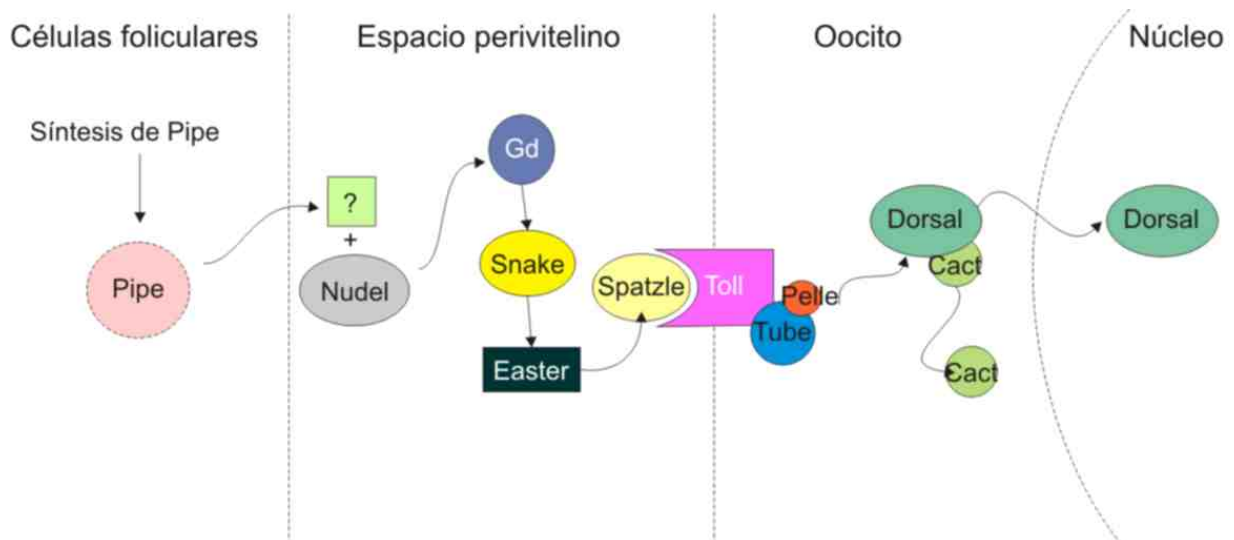


Fig. 5. Dentro de las células foliculares Pipe modificaría un factor desconocido que interactúa con Nudel para dividir la proteína Gastrulation-deficient (Gd) activándola. Gd activada cliva la proteína Snake. Una vez activada Snake cliva a la proteína Easter que a su vez activa a la proteína Spätzle. Esta última se une al receptor de membrana Toll que activa a Tube y Pelle que fosforilan a la proteína Cactus provocando su degradación y liberando a Dorsal que ahora puede ingresar al núcleo y desencadenar la ventralización de la célula.

El establecimiento del gradiente de Dorsal es el evento más importante en el establecimiento del eje D-V ya que la identidad celular sobre este eje depende directa o indirectamente de la concentración de la proteína Dorsal en el núcleo. Dorsal actúa como un morfógeno activando o reprimiendo genes blanco de manera dependiente de la concentración. Así diferentes concentraciones de Dorsal especifican diferentes dominios en el embrión.

Altos niveles de Dorsal sobre el lado ventral favorece la expresión de genes como *snail* y *twist* que indicarán a las células más ventrales identidad de mesodermo, niveles más bajos de dorsal se dan lateralmente activando la expresión de genes como *rhomboid*, *vein*, *ventral nervous system defective*, *short gastrulation* y *brinker* en lo que será el neuroectodermo (Kosman et al., 1991; Ray et al., 1991; Ip et al., 1992b; François et al., 1994; Mellerick y Nirenberg, 1995; Jazwinska et al., 1999a,b; Minami et al, 1999), mientras que la ausencia de Dorsal en la región dorsal del embrión permite la expresión de genes

como *decapentaplegic (dpp)* y *zerknüllt (zen)* que definirán la formación del ectodermo dorsal y la amnioserosa respectivamente.

El patronamiento D-V es subsiguientemente refinado y mantenido por la acción de genes zigóticos que se expresan en diferentes dominios D-V (Araujo y Bier 2000) (Fig. 6)

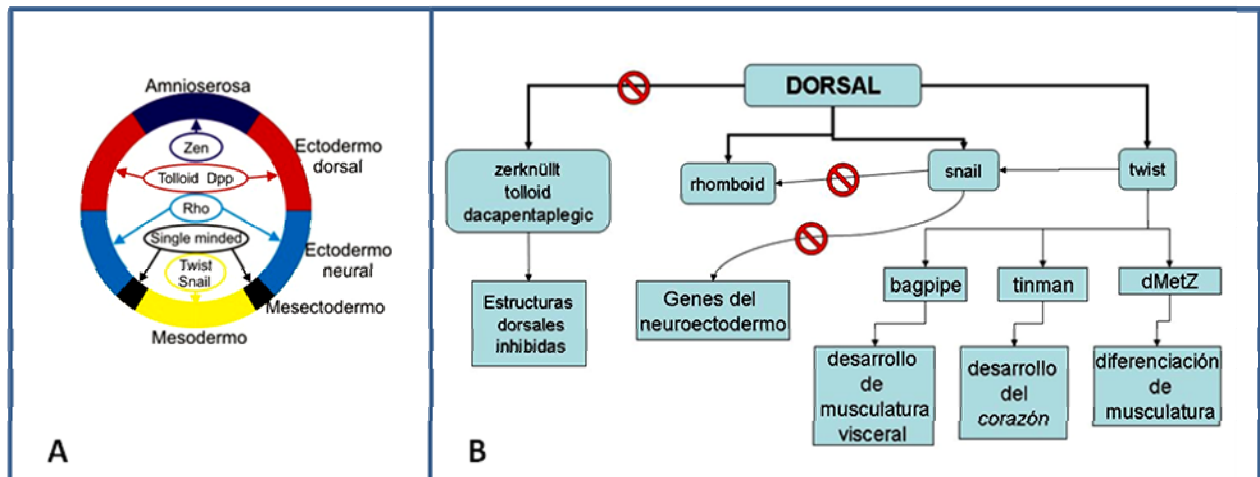


Fig. 6. (A) Corte transversal de un blastodermo de *Drosophila melanogaster* mostrando las regiones de expresión de los algunos genes zigóticos y los tejidos que se especifican como resultado en cada territorio **(B)** Cascada de señalización desencadenada por el gradiente de Dorsal en *D. melanogaster*. Si Dorsal entra en el núcleo se expresan genes como *rhomboid*, *snail* y *twist* que a su vez llevan a la expresión de genes que formarán el neuroectodermo, musculatura y corazón, e impide que se expresen genes como *zerknüllt*, *tolloid* y *decapentaplegic*, inhibiendo la formación de estructuras dorsales. La figura 6B está tomada de Gilbert,2000.

En cuanto a los mecanismos que llevan al establecimiento del eje dorsoventral se han estudiado tanto en animales vertebrados como invertebrados (Roth, 2003; Linch y Roth ,2011; Zhang et al 2007), sin embargo en insectos es un campo que recientemente está en desarrollo.

Durante años se conoció a la perfección como se establecía el eje dorsoventral en *D. melanogaster*, pero en otros insectos era escasa la información con la que se contaba. Se han llevado a cabo algunos estudios en *Thermobia doméstica* (Thysanura), *Schistocerca gregaria* (Ortoptera) y *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera) (Hughes et al, 2004; Kuchenmeister, et al, 1999; Dearden et al, 2000; Panfilio 2006). Estos datos son el resultado del clonado de algunos genes de la señalización D-V; pero no de la búsqueda sistémica de los miembros de toda la vía. Esto se debe a que sus genomas aún no han sido secuenciados. Hace unos pocos años con la secuenciación de los genomas de *Anopheles*

gambiae (Diptera) y *Tribolium castaneum* (Coleoptera) se han llevado a cabo búsquedas de la vía D-V (Goltsen, 2007 y Nunes da Fonseca et al 2008). Como es de esperarse *A. gambiae* ha mostrado muchas similitudes con *D. melanogaster* siendo que tienen un modo de desarrollo embrionario similar y también *T. castaneum*, sin embargo en este último algunas diferencias en las redes génicas regulatorias llevan a pensar que ha habido una divergencia en los linajes en cuanto a la conservación de la función de los genes en el establecimiento del eje D-V, con lo que es evidente que es necesario ahondar estos estudios en insectos menos derivados.

1.3. *Rhodnius prolixus* como modelo

Los conceptos en términos embriológicos de segmentación, polaridad, gradientes y compartimentación fueron desarrollados en los trabajos pioneros de Friedrich Seidel, Klaus Sander y Peter Lawrence con insectos hemípteros como *Euscelis plebejum*, *Rhodnius prolixus* y *Oncopeltus fasciatus*, los cuales por tratarse de insectos hemimetábolos, al final del desarrollo embrionario la larva resultante es muy similar al individuo adulto. *R. prolixus* ha sido un modelo de estudios fisiológicos y embriológicos. El vasto cuerpo de conocimientos generados por V. Wigglesworth durante casi medio siglo constituye una base conceptual sobre la cual la información molecular encuentra una razón biológica.

Aspectos tan importantes en biología como el concepto de polaridad planar fueron desarrollados por Wigglesworth y continuados por Lawrence en este tipo de insecto, en los que resulta interesante estudiar la expresión génica para descubrir diferencias en la expresión de genes y sus redes regulatorias que nos permitan entender de qué manera se originan las diferentes morfologías.

Recientemente se han iniciado estudios en el modelo *O. fasciatus*, en esta especie se han clonado varios genes de segmentación, genes selectores y se han desarrollado técnicas de genética reversa como el ARNi, pero a diferencia de *R. prolixus* su genoma no ha sido secuenciado debido a su enorme tamaño (3.500.000.000 de bases).

Al inicio de este trabajo el genoma de *R. prolixus* era un proyecto. Esta tesis se desarrolló contemporáneamente al tiempo que avanzaba la secuenciación del genoma. Esto permite un análisis más completo en un insecto hemimetábolo.

Teniendo como herramienta el genoma ensamblado de *R. prolixus*, es posible la identificación de genes que establecen las redes regulatorias que actúan durante el desarrollo embrionario de manera sistémica permitiéndonos identificar posibles blancos de acción de procesos evolutivos que determinan las diferentes morfologías de los insectos.

1.4. Objetivos

Las actuales tecnologías genómicas están conduciendo a la completa caracterización de muchos procesos comunes a diversos organismos. Por ejemplo, las tecnologías de genómica funcional, como la secuenciación de genotecas normalizadas y sustractivas, así como la de microarrays de DNA ofrecen la posibilidad de registrar simultáneamente el nivel de expresión de miles de genes, sea en respuesta a estímulos específicos, o en el transcurso del desarrollo embrionario. Con esta información es posible estudiar el funcionamiento de redes de regulación génica. Por otro lado, estas redes regulatorias nos indican procesos evolutivos comunes en diversos insectos.

La enorme variabilidad morfológica de los insectos y su consiguiente radiación, está determinada esencialmente por los mismos genes, los que forman parte de redes génicas semejantes (Rogers et al., 2002; Angelini y Kaufman, 2005). Sin embargo son los patrones de expresión de los distintos genes durante el desarrollo los que determinan la morfología final del insecto. Así es como si bien las redes regulatorias son conocidas, las moléculas efectoras que actúan en procesos morfogenéticos son muy poco conocidas.

El objetivo general de este proyecto es generar información genómica de *R. prolixus* y determinar el modo de regulación de los distintos genes durante el desarrollo en base al estudio del patrón de expresión de los genes durante el desarrollo.

Se proponen, como objetivos particulares,

1. La generación de ESTs embrionarios a partir de genotecas normalizadas, la anotación de dichos genes en el contexto del genoma de *R. prolixus*
2. Establecer métodos de estudio de genómica funcional en *R. prolixus*
3. Identificar y analizar genes de polaridad dorsoventral

La generación de ESTs a partir de genotecas normalizadas no se incluyó en esta tesis debido a que los genes con los que se propuso trabajar en este proyecto se encuentran en muy baja concentración en los estadios más tempranos de desarrollo y ni aún en la genoteca normalizada pudieron ser amplificados por lo que se utilizó para la obtención de dichos genes un ADNc generado a partir de huevos exclusivamente que no superaran los 5 días post-puesta.

En esta tesis se presenta el establecimiento de la metodología requerida para el análisis funcional de genes de desarrollo. En la sección Materiales y Métodos se detallan los protocolos de ARNi parental e hibridación *in situ* de ARN optimizados para *R. prolixus*. Estos protocolos son el resultado de series de experimentos de optimización los cuales no se presentan en la sección de resultados sino como protocolo final. De aquí en más se considera esta metodología como la base para futuros estudios en *R. prolixus*.

Como consecuencia del desarrollo de estas metodologías se pudo realizar el análisis funcional de varios sistemas regulatorios.

En esta tesis se presentan los resultados de su aplicación al estudio de genes de polaridad dorsoventral, en particular *dorsal*, *toll* y *dpp* los cuales representan puntos clave en la regulación de la cascada D-V.

Materiales y métodos

2. Materiales y métodos

2.1. Cuidado de *R. prolixus* en laboratorio

En laboratorio son criados en recipientes de plástico de boca ancha de unos 10 cm de diámetro por 15 cm de alto, de paredes lisas y transparentes cuya tapa es remplazada por una malla de nylon muy fina que facilita su alimentación y deben limpiarse periódicamente con lavandina eliminando las deposiciones que pueden contener parásitos de los insectos.

La temperatura a que son criados es de $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de 45-50% así como también el fotoperiodo se encuentra regulado (luz/oscuridad de 12:12 hs.)

R. prolixus es un hemíptero hematófago por lo que se utiliza para su alimentación aves de corral (gallinas) las cuales son inmovilizadas en cajas de madera, y se quita el plumón debajo de las alas, allí se colocan los frascos invertidos con las vinchucas y se lo sujeta fuertemente con una banda elástica hasta que todas se hayan alimentado. Cuando esto ocurre las vinchucas aumentan considerablemente su tamaño.

Su ciclo de vida se caracteriza por poseer cinco estadios larvales que se denominan del I al V y el adulto. Son hemimetábolos, poseen una metamorfosis incompleta y las larvas poseen los mismos hábitos y alimentación que el adulto. Machos y hembras adultos son fácilmente diferenciables a partir de la morfología de la genitalia que en los machos es redondeada y en las hembras es más triangular y sobresale del abdomen (Fig. .7)

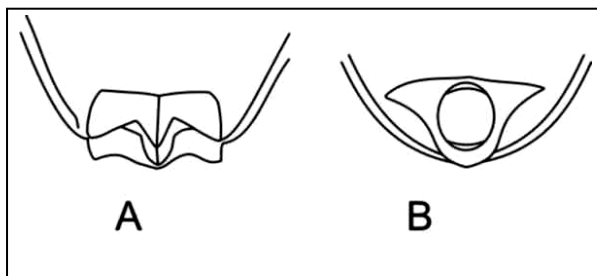


Fig. 7. Esquema de las genitalia de hembras **(A)** y machos **(B)** de *R. prolixus*.

Los huevos son dejados sobre tiras de papel plegadas colocadas dentro de los frascos, estas tiras no solo proveen un ambiente similar al que habitan naturalmente sino que además facilitan la recolección de los huevos ya que estos son adheridos al papel al momento de la oviposición.

Los huevos son de color rosa pálido y a medida que avanza el tiempo de desarrollo se vuelven cada vez más oscuros y demoran aproximadamente 15 días en eclosionar para la temperatura estipulada en éste trabajo ya que los tiempos de desarrollo varían de acuerdo con la temperatura del ambiente.

Cada uno de los estadios se separa en distintos frascos con excepción de los estadios I y II que debido a su pequeño tamaño son difíciles de diferenciar y manipular.

Una vez que han sido separados se los deja 15 días para alimentar, si se han alimentado bien no necesitan de otra ingesta para mudar al siguiente estadio. Si este es el caso demoran aproximadamente 15 días en pasar de un estadio a otro.

La cantidad de adultos por frasco tiene que estar en lo posible equilibrado entre machos y hembras.

Para la oviposición es requerimiento *sine qua non* la alimentación. Una vez alimentados demoran aproximadamente una semana para iniciar la puesta.

2.2. Manipulación de los embriones y ovariolas

Debido a que no pudimos establecer medios químicos que permiten la decorionación de los huevos de *R. prolixus*, la misma debe ser llevada a cabo manualmente bajo microscopio de disección con pinzas de disección.

Cuando se trabaja con estadios de banda germinal se retira el opérculo del huevo y realizando una leve presión en el extremo posterior del huevo con la pinza se empuja el contenido del huevo hacia afuera. Una vez decorionado el vitelo es retirado manualmente. Es importante tener en cuenta que *R. prolixus* es un insecto de banda germinal intermedia donde el vitelo representa aproximadamente el 90% del huevo, además en los estadios de desarrollo tempranos los embriones son translúcidos o ligeramente blanquecinos y a medida que el desarrollo continúa toman una coloración rojiza.

Este procedimiento puede llevarse a cabo tanto en etanol (ETOH) o 4% paraformaldehído (PFA). En ETOH la remoción del vitelo es más fácil pero los embriones se vuelven más rígidos y frágiles, además una rehidratación es necesaria luego de la disección, mientras que en PFA el vitelo se adhiere más al embrión pero éste permanece más flexible.

Una vez que el vitelo ha sido removido los embriones se deshidratan en una escala ascendente de alcoholes (50%ETOH; 70% ETOH; 100% ETOH) para su almacenamiento o se continúa con el protocolo a llevar a cabo.

En el caso de los huevos en estadio de blástula o previo fue necesario endurecer el vitelo para mantener la forma original del huevo en la decoración. Esto se logró a través de dos técnicas diferentes dependiendo del protocolo a seguir.

Para el screening embrionario fue necesario detener el desarrollo en nitrógeno líquido y luego calentado a 60°C durante toda la noche. Con el incremento de temperatura la membrana vitelina se separa del corion permitiendo la remoción del mismo manteniendo la integridad del huevo y finalmente teñido con el colorante de ADN, DAPI. En el caso de los blastodermos utilizados para la hibridación *in situ* el congelamiento en nitrógeno líquido afectaba la tinción con digoxigenina por lo que los embriones utilizados para este protocolo fueron calentados directamente a 60°C durante toda la noche (calor seco).

Las ovarias fueron colectadas a partir de hembras alimentadas y en estado reproductivo. La fijación de las ovarias se realizó tal cual se detalla en Osborne y Dearden (2005).

2.3. Búsqueda bioinformática de genes del desarrollo

En una primera instancia se utilizó la base de datos de trazas del genoma secuenciado de *R. prolixus* disponible para miembros del consorcio de secuenciación. Sobre esta base de datos se realizó la búsqueda de genes del desarrollo en las trazas del genoma aún no ensamblado, utilizando un algoritmo desarrollado por el Dr. Luis Diambra en el Laboratorio de Biología de Sistemas del CREG, el cual nos permitió buscar fragmentos de secuencias de proteínas muy conservadas, asignándoles un puntaje. De esta manera se obtuvieron las primeras secuencias parciales de los genes *dorsal*, *toll*,

decapentaplegic, *twist*, *zerkült* y *zelda* sobre las que se sintetizaron *primers* específicos para amplificación, síntesis de sondas para *hibridación in situ* e interferencia de los genes *dorsal*, *toll* y *dpp*.

Una vez terminado el secuenciado y ensamblado del genoma de *R. prolixus* (www.vectorbase.org) se buscaron las secuencias completas de los genes de interés a partir de dominios muy conservados en los supercontigs de dicho genoma (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?organism=euk). Para confirmar la identidad de estas secuencias se utilizó el algoritmo BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Altschul et al., 1990).

Una vez identificados se utilizó un programa de predicción de estructuras de genes, FGENESH, (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&group=programs&subgroup=gfind>) para encontrar intrones y exones en el supercontig. Finalmente se buscaron motivos proteicos en la secuencia utilizando el programa ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>). El conjunto de éstos análisis nos permitió confirmar la identidad de las secuencias completas halladas y formular hipótesis bioinformáticas sobre los mismos.

2.4. Síntesis de ADNc de huevos

Para la síntesis de ADNc se recolectaron huevos tempranos, no más de 5 días post puesta, y a medida que se los fue recolectando se los guardó en buffer de lisis con tiocianato de guanidinio y β mercaptoetanol (1 ml de buffer/ 2 μ l de β mercaptoetanol). Se extrajo el ARN total de los huevos, para ello se congelaron los huevos en nitrógeno líquido y se los trituró con un mortero. Se disolvió la muestra en unos 3 ml de buffer de lisis, se lo centrifugó por 5 minutos a temperatura ambiente para remover restos grandes y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Éste se colocó en hielo y se agregó un volumen igual de buffer saturado con fenol y se mezcló. Se agregaron 1/5 volúmenes de cloroformo: alcohol Isoamílico (24:1) y se agitó varias veces incubando en hielo entre cada agitación. Se centrifugó 30 minutos a 4 °C. Se removió y guardó la fase superior acuosa, se repitió este procedimiento dos veces más y se agregó un volumen de de etanol 96%, se centrifugó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavó el precipitado con 0.5 ml

de etanol 80% y se lo dejó secar. Finalmente se disolvió el precipitado en agua bidestilada estéril y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf y se agregó un volumen igual de LiCl 12 M y se enfrió la solución a -20 °C por 30 minutos. Se centrifugó a máxima velocidad por 15 minutos a temperatura ambiente, se lavó el precipitado con 0.5 ml de etanol 80% y se lo dejó secar. Finalmente se disolvió en agua bidestilada estéril.

Para la síntesis de ADNc se utilizó el Gene Racer Kit (INVITROGEN) y para la generación de la segunda cadena se utilizó la ADN polimerasa Expand Long (Roche - 150 U) con la siguiente mezcla de reactivos:

Reactivos	Vol.
Gene Racer 5' Primer	3 µl
Gene Racer 3' Primer	3 µl
RT templado	2 µl
10X Buffer I	5 µl
dNTP's (10mM)	1 µl
Expand Long	0.5 µl
Agua	37.5 µl
<hr/>	
Volumen final	50 µl

Programa

Paso 1	94 °C 2''	1 ciclo
Paso 2	94 °C 30''- 65 °C 30''- 68 °C 6'	20 ciclos
Paso 3	68 °C 10'- 4 °C hold	1 ciclo

2.5. Amplificación con *primers* específicos y degenerados

La búsqueda de genes que establecen el eje D-V se inició haciendo PCR con *primers* degenerados sobre una *library* normalizada de *R. prolixus* sintetizada por el Dr. Gustavo Saldaña y el Dr. Andrés Lavore (Lavore et al, 2012), ambos miembros del laboratorio de Genética y Genómica Funcional del CREG, contribuyendo en parte en la realización de la misma. Mediante ésta búsqueda no se obtuvieron resultados, posiblemente debido a la baja concentración de ARNm en las muestras.

Con la identificación bioinformática de las secuencias de algunos de los genes de interés se sintetizaron *primers* específicos para cada una de las secuencias en regiones altamente conservadas para cada uno y adicionalmente se sintetizó un par de cada uno de los *primers* que llevaran parte de la secuencia promotora del Fago T7 (CGACTCACTATAGGG) en el extremo 5' con el fin de preparar con los productos de PCR obtenidos a partir de estos *primers* las sondas para hibridación *in situ* y ARNi

Nombre del primer	Secuencia
DI Fw	GAGGGAAGATCTGCTGGTT
DI Rv	GGTAGTCGGCTTTTTGTCCA
Toll Fw	GCGAGAGATTAAAGTATGGTTATA
Toll Rv	GAAATGGGGTGATCCATGGTT
Dpp Fw	TCGCCAACCGAATTTAGAAC
Dpp Rv	TAACGTTTCGACCACAGCAT
Tw Fw	GCGATTAATGGCTAATGTAAGAGA
Tw Rv	TGACTGTGGCTCTTCCTTCG
DIT7 Fw	<u>CGACTCACTATAGGG</u> GAGGGAAGATCTGCTGGTT
DIT7 Rv	<u>CGACTCACTATAGGG</u> GGTAGTCGGCTTTTTGTCCA
TollT7 Fw	<u>CGACTCACTATAGGG</u> TCCTGGTTTGGAGAATGGTC
TollT7 Rv	<u>CGACTCACTATAGGG</u> TGACTGTGGCTCTTCCTTCG
DppT7 Fw	<u>CGACTCACTATAGGG</u> TCGCCAACCGAATTTAGAAC
DppT7 Rv	<u>CGACTCACTATAGGG</u> TAACGTTTCGACCACAGCAT
TwT7 Fw	<u>CGACTCACTATAGGG</u> GCGATTAATGGCTAATGTAAGAGA
TwT7 Rv	<u>CGACTCACTATAGGG</u> TGACTGTGGCTCTTCCTTCG

Para todas las reacciones se utilizó la siguiente mezcla de reactivos:

Reactivos	
Buffer	1X
Cl ₂ Mg	3mM
dNTP	25µM
PrFW	25µM
PrRv	25µM
Taq	1U
Molde	20 ng
Agua estéril	Hasta llegar a volumen

Inicialmente se realizó un gradiente de temperatura de anealing (T^0a) determinando de esta manera la mejor temperatura de amplificación para cada par de *primers*. El ciclador térmico utilizado para la PCR fue MBS 0.2G Hybaid (Thermo Scientific) y el programa de amplificación utilizado fue el siguiente:

1 ciclo	94°C	30 sec.
30 ciclos	94°C	30 sec.
	50°C (gradiente 10°C)	30 sec.
	74°C	1 min.
1 ciclo	74°C	5 min.
	4°C	suspender

La temperatura de anealing se modificó para cada par de *primers*, así para *dorsal* se utilizó una T^0a de 50°C, para *dpp* fue de 46,4°C y para *toll* de 52,5°C para los *primers* con T7 y de 58,4°C para los *primers* sin T7.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo con la enzima Taq T-Plus DNA Polimerasa (Inbio-Highway, Tandil), con excepción del fragmento de *toll* el cual se amplificó en primer lugar con la enzima Expand Long (Roche - 150 U) y luego se reamplificó con la Taq T-Plus.

Todos los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

2.6. Clonado y secuenciación

Todos los amplicones obtenidos se clonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega). La característica distintiva de este vector es que se comercializa predigerido y posee en el extremo 3' una "T" libre, esto favorece la disminución del ruido producto de la religación del vector. A su vez requiere que el inserto a ligar haya sido amplificado con la enzima Taq DNA polimerasa, la que deja en los extremos del amplicón una "A". De esta forma se obtiene una ligación eficiente del vector.

Para favorecer la incorporación de inserto por el vector La relación molar entre inserto y vector debe ser de 3:1, en este trabajo se utilizó la mitad de la reacción

recomendada por el fabricante ya que se comprobó que en estas condiciones se tiene una buena eficiencia.

Reactivo	Vol.
2X Rapid ligation Buffer	2,5µl
pGEM-T Easy Vector (50ng)	0,5µl
Muestra	1,0µl
DNA Ligasa T4 (3U/µl)	0,5µl
Agua	0,5µl
<hr/>	
Vol. Final	5µl

A continuación se realizó la transformación de bacterias *E. coli* para reamplificar el vector. Para esto se utilizaron bacterias competentes químicas *E. coli* de las cepas XL1-Blue y DH5α. Se sembró 100 µl de cultivo transformado en placas de LB-agar con Ampicilina (50µg/ml) a las que se les agregó previamente 10µl de IPTG y 20µl de X-Gal, para el sistema de detección blanco-azul y se mantuvo las placas en estufa a 37°C. Los clones positivos se cultivaron en medio LB líquido, se chequearon por digestión con enzimas de restricción y aquellas que dieron el patrón de bandas deseado fueron posteriormente enviadas a secuenciar a la compañía Macrogen (Corea del Sur).

2.7. Síntesis de las sondas de ARN

Las sondas de hibridación *in situ* fueron preparadas con digoxigenin-UTP (Roche) utilizando el RNA-Dig Labeling Kit (Roche)

Para la síntesis de las sondas se puede partir de una PCR o de un plásmido que contenga la secuencia de interés, en cada caso se procede de la siguiente manera:

- De PCR: hacer una PCR (5'RACE) usando adaptador T7 sólo en el *primer reverse* (T7 queda en 3' para generar el *antisense*). Hacer una extracción fenólica y una precipitación etanólica (o isopropanólica).
- De Plásmido: Linearizar el plásmido (cortar con enzimas que generen extremos romos o 5' extendido (hacer una restricción completa para impedir que se hagan transcriptos en círculo rodante). Extracción fenólica y precipitación alcohólica.

Reacción:

- 1) dH₂O c.s.p. 10µl
- 2) 10x buffer de transcripción 1µl
- 3) NTP labeling mix para RNA 1µl
- 4) Inhibidor de RNAsa (20U) 1µl (mezclar)
- 5) Molde de DNA linearizado (0,5-1µg) lo mejor es [0,25 a 0,5µg/µl]
- 6) T7 RNAPol (20 unidades) 1µl (mezclar)
- 7) Centrifugar, incubar 2hs a 37°C
- 8) detener frizando o proseguir inmediatamente
- 9) agregar 15µl dH₂O
25µl 2x buffer carbonato (ver soluciones)

Incubar a 70°C por 30'

- 10) agregar Solución Stop 50µl
LiCl 5M 8µl (o 10µl de 4M)
tRNA [20mg/ml] 10µl
EtOH 300µl

11) -20 O.N. Enfriar EtOH O.N.

12) Centrifugar 20' a 4°C, lavar con EtOH 70% frío. Resuspender en 150µl de Solución Hybe

Para tinción de embriones tratar con 0,1 a 2µl de esto, diluido en 30µl de Solución Hybe.

Análisis de calidad de sonda:

- 1) hacer un *dot blot* con 0,1µl de esta sonda y con una serie de diluciones de RNA control del kit. (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000)
- 2) R R W5 en PBTw (en eppendorf de 2ml)
- 3) Incubar con 1ml de anti-Dig 1:2000 en PBTw por 10'
- 4) R R W10 en PBTw

- 5) R R con Buffer de Tinción (o Buffer Alcalino)
- 6) Teñir con NBT-BCIP

R: (*rinse*): enjuagar: sólo enjuagar los embriones con 1ml de solución nueva

W: (*wash*): lavar: agitar el tubo de modo que los embriones se muevan y mezclen y todas las superficies del tubo se laven. Luego dejar que precipiten e invertir el tubo brevemente para que caigan los embriones que quedaron pegados a la tapa y paredes del tubo.

W5: lavar 5'

2.8. Hibridación *in situ*

Éste protocolo al igual que el de ARNi parental se desarrollaron especialmente para *R. prolixus* por lo que se detallan punto a punto a continuación. No había hasta el momento de iniciar esta tesis un método validado para el análisis por ARNi de fenotipos en *R. prolixus*. Es por ello que se estableció un protocolo de ARNi parental.

El protocolo utilizado se basó en el Boeringer Genius Kit y algunas de las modificaciones se basaron en Liu y Kaufman (2004).

Todas las reacciones y lavados se hacen en tubos eppendorf, con 20-50µl de embriones preparados por vial.

El mismo protocolo se llevó a cabo para la tinción de ovariolas

Para las soluciones ver el anexo

2.8.1 .Hibridación

- 1.- descongelar solución fijadora 10' a 70°C. Enjuagar los embriones (que están en MetOH 100%) con 1ml de MetOH 100% y luego 500µl MetOH y 500µl PBTw (agregando 1º el MetOH, luego el PBTw, agitar)
- 2.- post-fijar en 500µl PBTw + 500µl de solución fijadora x 20' en agitación
- 3.- R R W R con PBTw

- 4.- incubar x 1h. en una mezcla de detergente RIPA.
- 5.- R R W R con PBTw.
En caso de trabajar con huevos en estadio de blastodermo es necesario hacer una digestión con proteinasa K (ver anexo).
- 6.- incubar en Buffer de Hibridación (Hybe) SIN sonda a 70°C por 30'. Esto se hace a fin de inactivar las fosfatasas endógenas.
- 7.- pre-hibridar a 60°C x 30' antes de la hibridación con sonda
- 8.- aspirar tanto Hybe como sea posible, agregar sonda (~1µl) diluida en ~30µl Hybe. Hibridar 36hs. a 60°C.
- 9.- agregar 500µl de Hybe-B (a temperatura ambiente). Mantener a 60°C hasta que los embriones precipiten; reemplazar con 500µl de Hybe-B, incubar a 60°C por 15'. Repetir reemplazar e incubar 15' a 60°C.
- 10.- O.N. a 60°C en Hybe.
- 11.- R R W5 con Hybe-B. R R W5 con Hybe-C. Los lavados cortos en soluciones de baja salinidad ayudan a reducir el *background*
- 12.- R R W5 W5 en PBTw
- 13.- incubar en Solución de Hibridación-Anticuerpo por al menos 1h.
- 14.- incubar O.N. a 4°C con 1ml αDig-AP (1:2000), en agitación. (el anticuerpo αDig-AP puede reusarse > 5 veces/4 semanas).
- 15.-R R W10.
- 16.-W10 W10 W10 con PBTw.
- 17.- R R W con Buffer Alcalino (revelado de fosfatasa alcalina).
- 18.-Teñir con NBT-BCIP (usar un volumen suficiente para que todos los embriones entren en contacto con el líquido). Para impedir el aglutinado de los embriones, no agitar; colocar los tubos horizontalmente y moverlos suavemente cada tanto. La tinción puede llevar de 30' a varias hs. u O.N.; 2hs. es normal.
- 19.-detener la reacción con R R W20 con PBTw.
- 20.-R con dH₂O. Deshidratar los embriones en la siguiente escala de R-OH:
50% dH₂O/50% EtOH 70%
EtOH 70% se pueden guardar a temperatura ambiente o continuar con

2.8.2 Montaje

Deshidratar los embriones en escala ascendente de alcohol

50% EtOH 70^o/50% EtOH 100%

EtOH 100%

EtOH 100%

[Estos embriones no se clarifican con Histoclear porque son bastante transparentes.

Montar directamente]

Montaje: levantar los embriones con un tip sin punta y gotearlos sobre un porta. Agregar 220µl de Mowiol alrededor y mezclar con aguja y moviendo el porta; con cuidado y lentamente, poner el cubre (24x56mm).

2.9. ARNi

2.9.1. Armado de los *primers*

Para el armado de los *primers* se puede utilizar cualquier porción del gen que esté incluida en el ARNm maduro

En este caso se utilizaron los mismos cebadores específicos utilizados para la amplificación por PCR, a los que se les agregó en el extremo 5' los sitios de unión para la T7 Polimerasa (TAATACGACTCACTATAGGG), La secuencia de T7 debe ser la misma para ambos primers (no se debe invertir en la reversa), por ejemplo:

T7= TAATACGACTCACTATAGGG

Fw: 5' TAATACGACTCACTATAGGGGGCCATTACGGCCGGGG 3'

Rv: 5' TAATACGACTCACTATAGGGCCGCCTCCACCGCCACCG 3'

2.9.2. Preparación del templado

Se utiliza como templado para la producción de ARNdc el producto de una PCR que posee en sus extremos sitios de unión para la T7 RNA Polimerasa.

Para ello se mezclan en un tubo para PCR de 0.2 ml los siguientes componentes

Componentes	Stock	
H ₂ O		
Taq buffer	10X	1µl
Cl ₂ Mg	25mM	0.6µl
BSA	100X	0.2µl
dNTP	10mM	0.2µl
Primer Fw	10µM	0.2µl
Primer Rv	10µM	0.2µl
Muestra		
Taq (fermentas)	5U/µl	0.06µl
Volumen final		10µl

Programa PCR			
satge 1	1 ciclo	94°C	5'
stage 2	30 ciclos	94°C	30"
		66°C	30"
		72°C	1'
stage3	1 ciclo	72°C	5'
		4°C	suspender

Se realizo extracción fenólica y precipitación al producto de PCR y se analizó 1 µl del producto por electroforesis en gel de agarosa 1% con bromuro de etidio para corroborar la integridad y calidad del mismo.

2.9.3. Precipitación isopropanólica / Extracción fenólica

- Extracción Fenólica:
 1. Agregar 1 Vol. de fenol. Mezclar muy bien.
 2. Centrifugar 5 minutos a 14.000 rpm
 3. Rescatar la fase superior
 4. Agregar 1 Vol. de cloroformo. Mezclar muy bien.
 5. Centrifugar 5 minutos a 14.000 rpm
 6. Rescatar la fase superior y continuar con el siguiente protocolo
- Precipitación Isopropanólica:

1. Agregar 0,8vol. de isopropanol o 2.5 de etanol absoluto.
2. Agregar 0,1vol. de AcNa o AcNH₄.
3. Dejar a -20°C O.N.
4. Centrifugar 20min. a 14.000 rpm
5. Descartar el sobrenadante.
6. Realizar un lavado con 100µl de etanol 80°.
7. Centrifugar 5min. a 14.000 rpm
8. Secar a temperatura ambiente o a 37°C (no sobre secar).
9. Diluir en 3-5µl de agua.

Finalmente se midió la concentración de producto de PCR en espectrofotómetro

2.9.4. Transcripción in vitro

1. Mezclar

✓	10X Buffer (transcriptasa)	5µl
✓	10mM rATP	5µl
✓	10mM rCTP	5µl
✓	10mM rGTP	5µl
✓	10mM rUTP	5µl
✓	DNA	100 ng/µl
✓	Enzima(T7 RNA Polimerasa USB)	12.5U
✓	H ₂ O	c.s.p.
✓	Inhibidor de Rnasa	1µl
	Volumen total	50µl
2. Incubar 1h a 37°C
3. Digerir el ADN con DNasa I
4. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente
5. Detener con EDTA 10 minutos a 65°C
6. Extraer con 1 volumen de Fenol:Cloroformo:Isoamílico (25:24:1)
7. Vortex. Centrifugar 2 minutos a 12.000g
8. Transferir la fase acuosa y agregar 1 volumen de Cloroformo:Isoamílico (24:1)

9. Vortex. Centrifugar 2 minutos a 12.000g
10. Transferir la fase acuosa y agregar 0.5 volúmenes de 7.5M NH₄Ac y 2.5 volúmenes de ETOH absoluto
11. Mezclar y dejar 30 minutos a -70°C
12. Centrifugar 20 minutos a velocidad máxima
13. Lavar con 1ml de ETOH 70%
14. Secar a temperatura ambiente o a 37°C y disolvió en H₂O bidestilada estéril.

Es importante en todos los pasos mantener la esterilidad y limpieza de todos los elementos

En este caso se disolvió en 12 µl de agua bidestilada estéril, de los cuales 10 µl se utilizaron para inyectar (2 inyecciones de 5µl) y los 2 µl restantes para medir concentración y correr en gel de agarosa 1% con bromuro de etidio para ver la integridad del ARNdc.

El ARN se resuspendió en agua estéril en una concentración final de 0,5 µg/µl.

Las hembras vírgenes de *R. prolixus* se inyectaron entre los esternitos quinto y sexto del abdomen con aproximadamente 5µl de solución de ARNdc

Las hembras inyectadas fueron luego reunidas con machos y 2 a 3 días luego de la inyección fueron alimentadas para inducir la oogénesis. Se permitió el completo desarrollo de los huevos para el análisis morfológico de los fenotipos

Los controles se inyectaron con ARN doble cadena correspondiente al gen β-lactamasa de *E. coli* en las mismas condiciones que las interferidas.

2.10. Microscopía e imágenes

Las fotografías de los embriones teñidos con DAPI y de los embriones WMISH, fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia Leica (Leica DM 1000) utilizando una cámara de CCD, Cool SNAP-Procf color (Media Cybernetics). Las fotografías de los embriones WMISH se tomaron con un microscopio estereoscópico Leica (Leica MZFLIII), utilizando la cámara SonyH2.

Resultados y discusión

3. Resultados y discusión

CAPÍTULO 1.

Análisis de la biología del desarrollo de *R. prolixus*

El objetivo de esta sección es hacer una referencia del desarrollo embrionario para la interpretación de los resultados de los patrones de expresión de los genes de desarrollo. Este trabajo se realizó en colaboración con la Lic. Natalia Esponda Bherens, sin embargo los objetivos de la realización del mismo fue distinto en cada trabajo. La Lic. Esponda se basó en los procesos que llevan al patronamiento anteroposterior, mientras que en el presente trabajo se focalizó en los aspectos morfológicos relacionados con eje dorsoventral.

El desarrollo embrionario de *R. prolixus* fue descrito por primera vez por Hellen Mellanby (1934-1935) y posteriormente revisado por Kelly y Huebner (1989). El tiempo en que el embrión de *R. prolixus* completa su desarrollo depende de la temperatura del ambiente, de esta forma las condiciones utilizadas por Mellanby favorecían un desarrollo embrionario lento, mientras que Huebner utilizó condiciones de cultivo similares a las utilizadas en el presente estudio acelerando los tiempo de desarrollo, con lo cual la eclosión demora unos 14-15 días post oviposición. Aun así la comparación de los tiempos de desarrollo de este trabajo con los estudios previos muestran una gran similitud, fundamentalmente en el desarrollo temprano.

Los trabajos de Mellanby y Huebner fueron descripciones morfológicas estáticas insuficientes para el estudio de patrones de expresión como los aquí descritos, por lo tanto se efectuó una completa redescrición de la embriogénesis para las condiciones y los objetivos de trabajo de la presente tesis.

A continuación se detallarán los principales eventos que ocurren durante el desarrollo embrionario de *R. prolixus*, haciendo hincapié en aquellos que muestran variaciones en el eje D-V.

R. prolixus posee dos ovarios que están constituidos su vez por siete ovariolas que desembocan en un cáliz. Cada ovariola contiene oocitos en distintas fases de desarrollo.

Estas ovariolas son de tipo telotróficas, en donde las divisiones de la oogonia son incompletas generando clones de cystocistos interconectados de los cuales muchos darán origen a oocitos.

Los oocitos primarios se mueven hacia el inicio del vitelario, dejando detrás en el germario a las células nutricias que formarán una estructura trófica denominada trofario. Cada oocito mantiene una conexión con las células nutricias mediante puentes citoplasmáticos denominados cordones tróficos (Fig. 8).

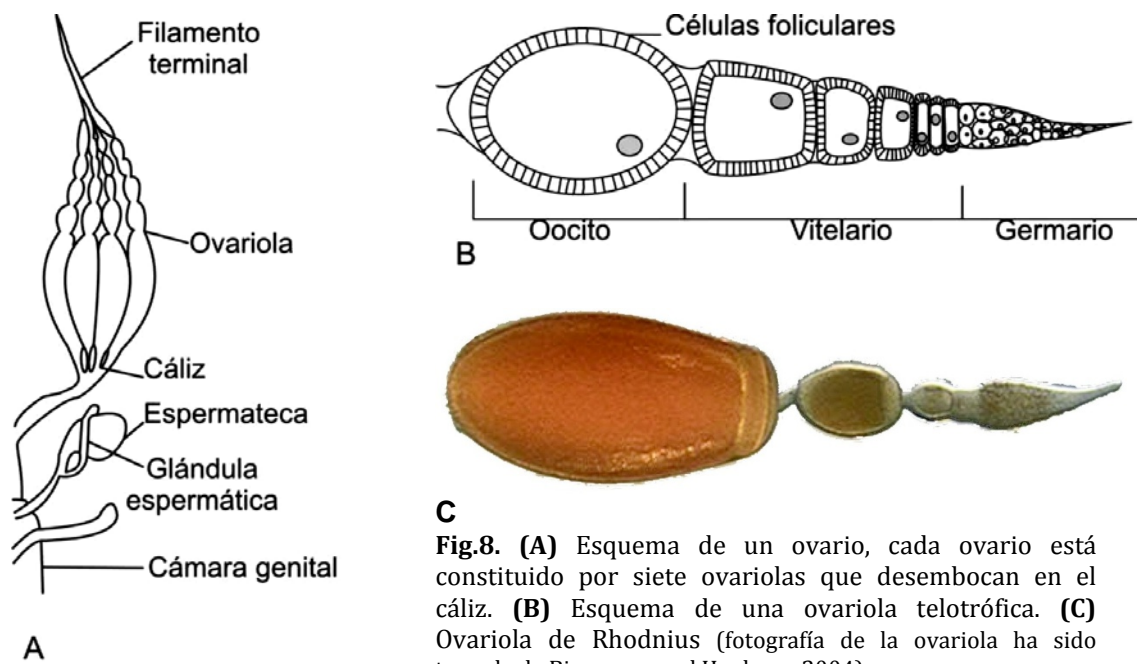


Fig.8. (A) Esquema de un ovario, cada ovario está constituido por siete ovariolas que desembocan en el cáliz. (B) Esquema de una ovariola telotrófica. (C) Ovariola de *Rhodnius* (fotografía de la ovariola ha sido tomada de Bjornsson and Huebner, 2004)

Las asimetrías en el eje D-V se encuentran presentes desde muy temprano incluso antes de comenzar el desarrollo embrionario, ya en las ovariolas maternamente se establece la primera asimetría en el huevo, el cual no es perfectamente ovalado sino que el opérculo se encuentra ligeramente desplazado hacia lo que se considera el lado dorsal del huevo. Además este lado es ligeramente achatado, mientras que el ventral es cóncavo (Fig. 9). Por ende mucho antes de la fecundación, durante la maduración del oocito y a través de transcritos maternos no conocidos aún en este insecto, se establecería la primera asimetría sobre el eje D-V.

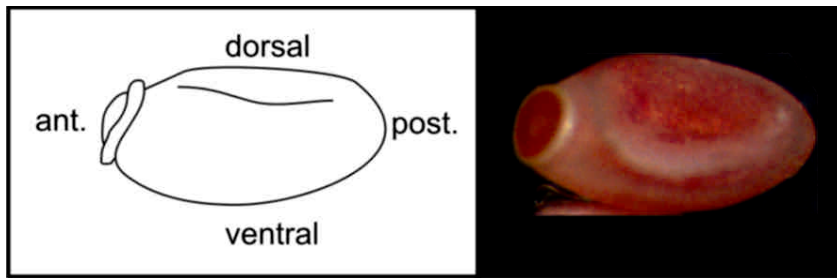


Fig.9. Morfología del huevo, a la izquierda esquema mostrando los lados anterior, posterior, dorsal y ventral del huevo.

Luego de la fecundación las primeras divisiones nucleares ocurren durante las primeras 12 horas post oviposición (hpo) (Fig.10A) momento en que los núcleos comienzan a migrar hacia la superficie (Fig. 10B). Usando microscopía de fluorescencia no se observan las primeras divisiones pero se deducen de la ausencia de núcleos en la superficie. El huevo es aún un sincicio donde los núcleos se encuentran rodeados por una masa de citoplasma. El citoplasma se intercala entre las esferas de vitelo formando un continuo.

Una vez que los núcleos llegaron a la periferia continúan dividiéndose tangencialmente (24 hpo) cubriendo toda la superficie del huevo. La actividad mitótica se da en forma asincrónica desde el polo anterior al posterior (Fig. 10 C y D).

Tras varios ciclos de división las membranas plasmáticas se forman alrededor de cada núcleo formando una simple lámina de células blastodermales dando así origen al blastodermo celular. La diferenciación del blastodermo embrionario comienza sobre el lado ventral y lateral del huevo. En este momento es que se manifiesta una asimetría dorsoventral embrionaria.

Entre el primero y segundo día dos poblaciones diferentes de células somáticas se vuelven distinguibles (Fig.10 E y H). Por un lado células con núcleos relativamente pequeños, que comienzan a condensarse sobre la superficie ventral, lateral y posterior del huevo (Fig. 10 L). Estas células formarán el rudimento embrionario y forman una U abierta hacia el extremo anterior del huevo, estas células están destinadas a invaginarse en el vitelo durante la subsiguiente gastrulación (Fig. 10 I-S).

Por otro lado las células que rodean al rudimento embrionario y que cubren toda la masa de vitelo son células más grandes pero menos numerosas que las anteriores y formarán la serosa extraembrionaria que eventualmente rodeará al primordio germinal

junto con la masa de vitelo. Una vez que los dos tipos celulares se han diferenciado dejan de dividirse.

A continuación, la anatrepsis, también referida como gastrulación en un sentido amplio (gastrulación y anatrepsis pueden ser coincidentes o no según cada especie ya que la formación del mesodermo puede darse simultáneamente, antes o después de la anatrepsis, ver Panfilio, 2008), la primer fase de la blastokinesis (característica de los insectos exopterigotas en los que los huevos tienen mucho vitelo) comienza con la invaginación de las células del rudimento embrionario por debajo de las células de la superficie dorsal del huevo, próximo al polo posterior. Esta invaginación lleva a la formación de la banda germinal (BG) temprana sobre el lado dorsal del huevo (Fig. 11 A-D). Este fenómeno es clave en el posterior desarrollo del embrión. Por ser tan temprano, cabe esperar que cualquier defecto en la formación del eje D-V en esta etapa del desarrollo tenga consecuencias sistémicas.

La BG crece internándose en el vitelo hasta que sólo el extremo de lo que formará la cabeza queda en la superficie rodeada por el vitelo y flexionada hacia el lado ventral del huevo (Fig. 11 F).

El extremo cefálico permanece en la superficie brevemente y luego se sumerge y pliega ventralmente, mostrando otro momento en que la asimetría D-V es clave para la formación del embrión. El resto del cuerpo permanece cercano al lado dorsal. De esta manera el embrión se encuentra invertido respecto de los ejes del huevo, en posición dorsal, su extremo anterior localizado posteriormente y su superficie ventral localizada dorsalmente (Fig. 12). Además en este momento para lo que será el extremo cefálico parte de la superficie ventral es además anterior, por lo que en insectos que poseen este tipo de desarrollo donde el embrión se mueve adquiriendo distintas posiciones dentro del huevo la separación de los ejes antero-posterior y dorsal-ventral no estarían del todo separados sino que se superponen pudiendo haber interacciones entre las redes regulatorias que establecen ambos ejes.

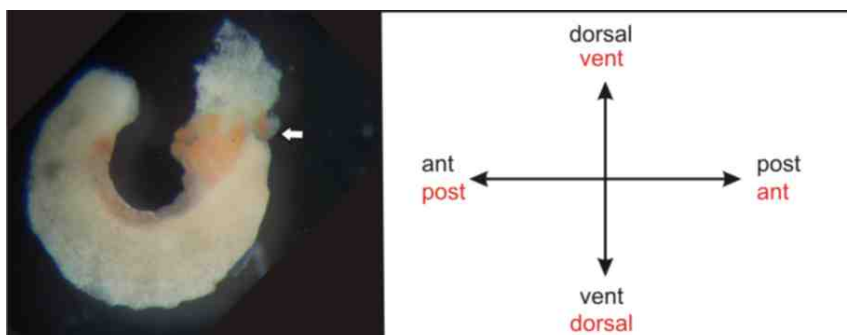


Fig. 12. Posición del embrión con respecto al huevo al final de la elongación de la banda germinal. La flecha blanca muestra la posición de la cabeza que se encuentra con respecto al huevo posterior y a su vez la superficie ventral de

la misma es además anterior. Negro: orientación del huevo. Rojo: orientación del embrión

La región invaginada se elonga hacia el polo anterior del huevo adquiriendo forma de tubo y se adelgaza. El mesodermo se forma por invaginación y crecimiento adicional. El endodermo se forma a partir de dos áreas una anterior y otra posterior. La primera cerca de la flexión cefálica y la otra cerca del extremo terminal del embrión.

A las 60 hpo en el embrión se han diferenciado tres regiones: cefálica, torácica y abdominal; ésta última sin segmentación visible (Fig. 11 E-H). En la cabeza el labro aparece como un par de apéndices, los lóbulos cefálicos se encuentran desarrollados y los apéndices del segmento antenal aparecen desde el margen posterior (Fig. 11 I). Los apéndices torácicos y de la boca en este estadio son protuberancias que emergen de la pared del cuerpo y poco a poco se elongarán sobre la superficie ventral de embrión (Fig. 11 E-K).

Hacia las 72hpo el embrión alcanza su longitud máxima. Los apéndices se han elongado y la anatrepsis se ha completado. Una pigmentación rojiza (consecuencia de la acumulación de hemo proteínas, P. Oliveira, comunicación personal) aparece en el ectodermo de la cabeza, los segmentos torácicos y los primeros abdominales son claramente distinguibles. Posteriormente el embrión se acorta y ensancha, en particular en la región abdominal.

Transcurridas 96 hpo el embrión continúa acortándose y se ensancha, los apéndices se encuentran claramente diferenciados, el labro permanece separado, las antenas son prominentes, en la boca las mandíbulas son más pequeñas que las maxilas. Los apéndices torácicos son más largos que los cefálicos. El abdomen posee ahora 8 segmentos.

Durante las próximas 36hs el embrión continúa acortándose, la cabeza permanece posicionada hacia el polo posterior del huevo. El labro se ha fusionado y el abdomen tiene ahora 10 segmentos y una región terminal no segmentada. La pigmentación rojiza del ectodermo se ha extendido y aparece en bandas a lo largo de los límites intersegmentales de cada uno de apéndices torácicos.

Para las 144 hpo (día 6) comienza la katatrepsis o segunda fase de la blastokinesis afectando ambos ejes. El embrión se mueve 180° en el eje transversal llevando un curso en U a través del polo posterior del huevo, volviendo a la superficie ventral del huevo. La serosa se contrae tirando del amnion y el embrión en dirección al opérculo. Ahora el eje anteroposterior del embrión y el huevo son coincidentes al igual que el dorsoventral (Fig. 11 L).

Durante las próximas 36hs los apéndices se elongan, el labro se extiende posterior y ventralmente; las mandíbulas se invaginan dentro de los pliegues formados por las maxilas. El segundo par de maxilas se unen en su línea media para formar el labio. Los laterales del embrión se extienden hacia el lado dorsal rodeando al vitelo. Hacia el día 8 el cierre dorsal se ha completado quedando el vitelo remanente completamente internalizado. Entre los días 8 al 14 post oviposición hay pocos cambios externos e internamente la organogénesis continúa. Debido que los procesos embrionarios que hacen a este trabajo son los que ocurren durante el desarrollo temprano de *R. prolixus*, los eventos de la organogénesis no serán descriptos aquí.

En la tabla 1 se resumen los principales eventos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario de *R. prolixus* destacando además aquellos que presentan asimetrías en el eje D-V

Tabla 1

hpo	Principales eventos embriológicos	Eventos de asimetría D-V
Primeras 12 hs	División nuclear y migración de los núcleos hacia la periferia formando un sincicio	-
24 hpo	Continúan las divisiones nucleares cubriendo toda la superficie del huevo. Formación de la membrana plasmática. Blastodermo	+
24-60 hpo	Diferenciación de dos tipos celulares somáticos. Formación del rudimento germinal. Anatrepsis o gastrulación o primera fase de la blastokinesis. Comienza a formarse la BG	+
60 hpo	Diferenciación de regiones cefálica, torácica y abdominal en la BG	-
72 hpo	Finalización de la anatrepsis. Hay segmentación torácica y abdominal. Acortamiento y ensanchamiento de la región abdominal	-
96 hpo	Clara diferenciación de los apéndices. Abdomen con 8 segmentos	-
132 hpo	Fusión del labro. Abdomen con 10 segmentos mas una región terminal no segmentada	-
144 hpo	Inicio de la katatrepsis. El embrión se mueve 180° en el eje transversal y ahora el eje anteroposterior del embrión y el eje dorsoventral son coincidentes al igual que el eje dorsoventral	+
180 hpo	Extensión ventral y posterior del labro. Las mandíbulas se invaginan en los pliegues formados por las maxilas y el 2° par de maxilas se une para formar el labio. El embrión comienza a cerrarse dorsalmente rodeando al vitelo	+
192 hpo en adelante	Pocos cambios en la morfología externa. Continúa la organogénesis	-

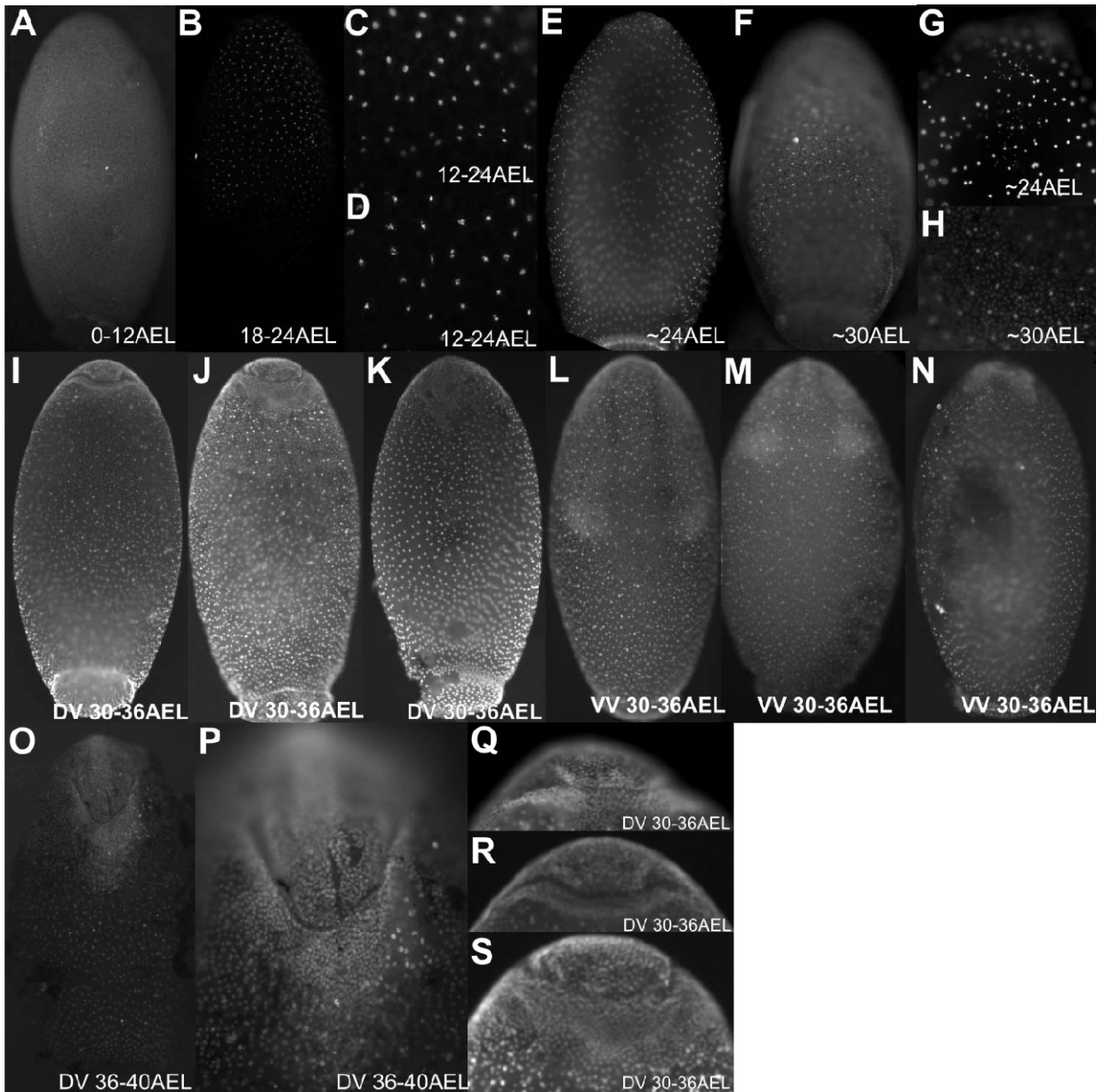


Fig. 10. Desarrollo temprano de *Rhodnius prolixus*. Tinción nuclear fluorescente con DAPI

Abajo es anterior; AEL_hpo; DV vista dorsal; VV vista ventral. **(A-H)** Estadios blastodermales, **(I-N)** y **(Q-S)** Formación de la BG temprana, **(O-P)** gastrulación. **(A)** De 0 a 12 hpo los núcleos no son visibles en la superficie por lo que en estos estadios tempranos no pueden ser determinados por tinción nuclear fluorescente. **(B)** 12-18 hpo los núcleos alcanzan la superficie y las divisiones mitóticas se continúan en olas sincrónicas desde el extremo anterior al posterior. **(C)** Extremo anterior con cromosomas en anafase y algunos en telofase, **(D)** porción media del huevo con cromosomas en metafase. **(E-F)** Se forman dos tipos celulares distintos unos con núcleos pequeños y otros con núcleos grandes, **(G-H)** detalle de E y F respectivamente. **(L-N)** Las células con núcleos pequeños se condensan sobre el lado ventral, lateral y posterior del huevo. **(I-K)** Sobre el extremos posterior del huevo y dorsalmente las células de núcleos pequeños se forman un pliegue y se invaginan en el vitelo **(Q-S)** Detalle de la formación del pliegue e inicio de la invaginación. **(O)** Gastrulación **(P)** Detalle de O

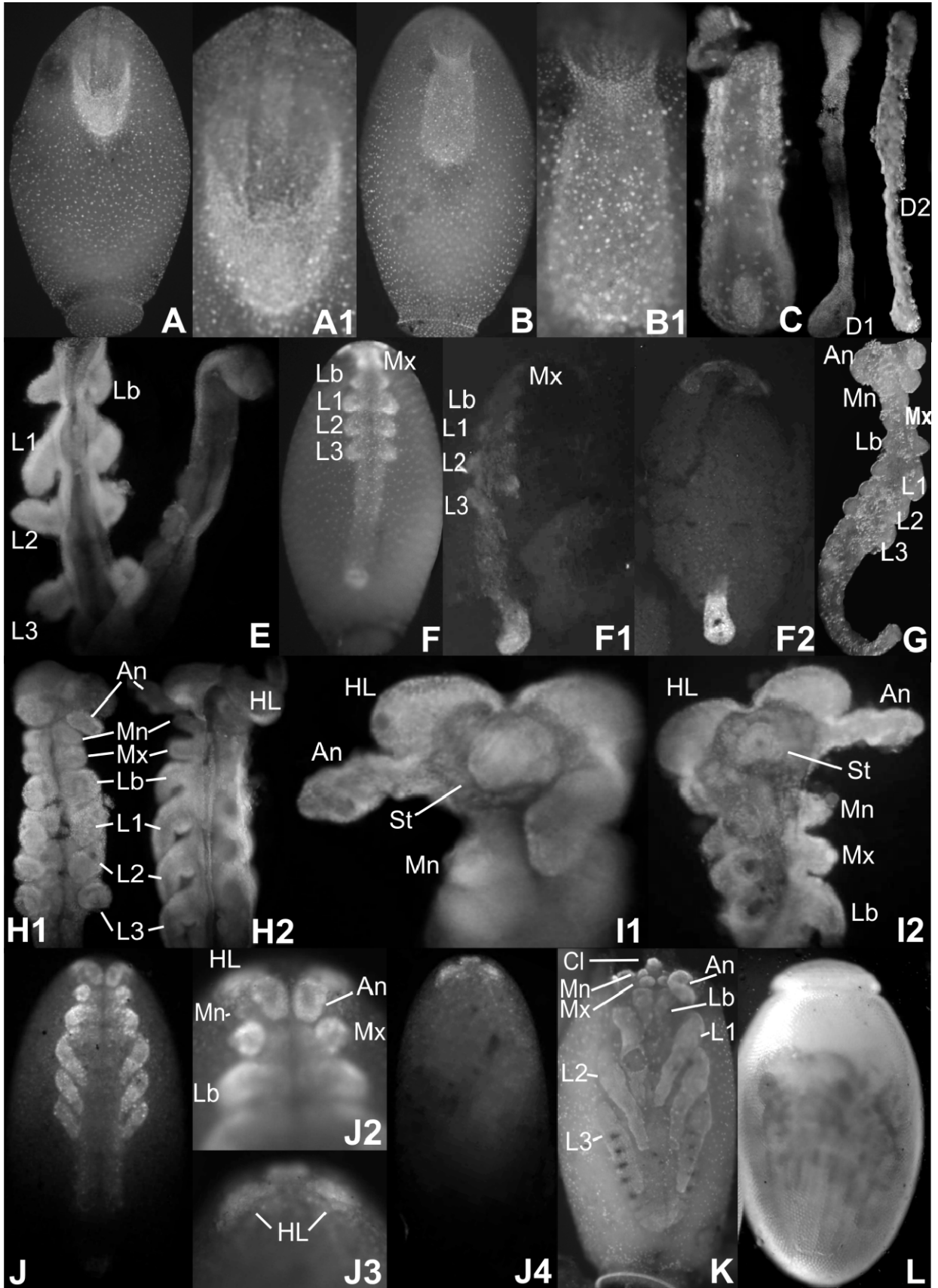


Fig. 11. Formación de la banda germinal (BG) de *Rhodnius prolixus*

Abajo es anterior salvo L donde el extremo anterior del huevo está hacia arriba. **(A-J)** Formación y elongación de la BG. **(A)** Vista dorsal del huevo. El pliegue formado por las células de núcleos pequeños se invagina en el vitelo en dirección al extremo anterior del huevo y forman el primordio germinal, **(A1)** Detalle de A. **(B)** Continúa la elongación formando la BG temprana. **(B1)** Detalle de B. **(C)** Detalle del extremo posterior de una BG en elongación, obsérvese el cúmulo de células en el extremo posterior formando la zona de crecimiento. **(D 1 y 2)** BG en elongación removida del huevo. **(E)** BG removida del huevo, faltan los segmentos más anteriores. Los segmentos anteriores comienzan a diferenciarse y los apéndices emergen de las paredes laterales de los mismos. **(F)** Localización del embrión en relación al huevo. **(F1)** Vista lateral del huevo. **(F2)** Vista ventral del huevo, nótese los lóbulos cefálicos en el extremo posterior del huevo. **(G)** BG con todos sus apéndices en desarrollo. La segmentación abdominal aún no es aparente. **(H)** BG completamente formada **(H1)** vista ventral de H **(H2)** vista dorsal de H. **(I)** Cabeza **(I1)** vista ventral del embrión mostrándolos lóbulos cefálicos, antenas y el bulto central corresponde al estomodeo, **(I2)** vista dorsal del embrión mostrando los apéndices cefálicos, la segmentación cefálica es evidente. **(J1)** Los apéndices se elongan hacia el lado medio ventral **(J2)** la BG se retrae, **(J3-4)** vista ventral del embrión mostrando los lóbulos cefálicos plegados. **(K)** La BG se ha retraído concluyendo la fase de la anatrepsis. **(L)** La katatrepsis se ha completado, ahora los ejes A-P y D-V del embrión y el huevo son coincidentes. **An:** antena, **Mn:** mandíbula, **Mx:** maxila, **Lb:** labio, **L1:** pata 1, **L2:** pata 2, **L3:** pata 3, **HL:** lóbulos cefálicos, **St:** estomodeo, **Cl:** clípeo

CAPÍTULO 2.

Identificación de genes de desarrollo relacionados con el eje dorsoventral en *R. prolixus*

Se recolectaron para extracción de ARN total por un lado adultos y cada uno de los estadios larvales y por otro lado se recolectaron huevos de manera que todos los estadios de desarrollo del insecto se encontraran representados de forma aproximadamente equivalente.

La extracción de ARN total se realizó utilizando el método de tiocianato de guanidinio-fenol ácido modificada (Chomzyski y Sacchi, 1988) para ambas muestras.

Una vez obtenido el ARN total se procedió a la extracción de ARN Poly A+ utilizando el kit Fast Track Mag Micro ARNm Isolation Kit (Invitrogen) y por columnas con Oligo (dT) celulosa. Como la concentración de ARN polyA+ obtenida por cualquiera de estos medios no fue suficiente se optó por preparar el ADNc a partir de ARN total de huevos y realizar las amplificaciones sobre este molde.

La búsqueda de dichos genes se inició por PCR usando *primers* degenerados así como por búsqueda bioinformática. Para la búsqueda por PCR se utilizó como molde una library normalizada sintetizada en el laboratorio a partir de individuos adultos, todos los estadios larvales y huevos con *primers* degenerados. Se realizó una reacción de PCR en las condiciones establecidas para cada par de *primers* y se analizó el resultado de la misma por electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio. Los fragmentos obtenidos se eluyeron del gel utilizando el kit de Qiagen (QIA quick gel extraction kit (250) QIAGEN), se midió la concentración de producto obtenido en espectrofotómetro y se clonó en vector pGEMT-EASY. Se transformaron bacterias competentes XL1blue y DH5 α . El resultado mostró que las secuencias de dichos fragmentos no correspondían a los genes buscados. En el caso de los genes dorsoventrales esta búsqueda no arrojó resultados positivos.

En forma paralela se inició la búsqueda *in silico* de dichos genes en las secuencias parciales correspondientes al genoma de *R. prolixus*.

Para realizar la búsqueda bioinformática se desarrolló un software (ver materiales y métodos) que nos permite buscar en del archivo de trazas secuencias muy conservadas dentro de los genes, haciendo un reemplazo de los aminoácidos por los nucleótidos más

probables y dándole a cada remplazo un valor, tomando como referencia los reemplazos más habituales en otros insectos como *D. melanogaster* y *T. castaneum* entre otros.

Se tomaron aquellas trazas que mostraron la mayor similitud con la secuencia requerida y los que poseían un mayor valor o puntaje. Con todas estas trazas se construyó un contig y su alineamiento para obtener un fragmento lo suficientemente grande e identificar regiones conservadas. Una vez que se tuvo el fragmento consenso se utilizó el algoritmo blastx en la base de datos de la NCBI para ver si se trataba efectivamente de la proteína buscada. Esta metodología permitió encontrar trazas correspondientes a los genes dorsoventrales: *dorsal (dl)*, *twist (twi)*, *toll*, *decapentaplegic (dpp)*, *zerknüllt (zen)* y *zelda (zld)* que si bien no está implicado exclusivamente en el establecimiento del eje dorsoventral tiene un papel clave en la activación y expresión de algunos de los genes arriba mencionados.

En algunos casos con la búsqueda bioinformática se pudo extender la secuencia encontrada a través del programa DNA baser que permite hacer un ensamblado de contigs partiendo de las trazas encontradas y de esta forma obtener secuencias lo más extensas posibles. Una vez obtenidos estos fragmentos de genes se diseñaron *primers* específicos en las regiones más conservadas y se procedió a hacer una PCR utilizando como molde ADNc obtenido de huevos tempranos (en su mayoría hasta 3 días post puesta), ya que las búsquedas anteriores en ADNc de todos los estadios no arrojaron resultados y sabiendo que estos genes se expresan en forma más abundante durante el desarrollo temprano y luego su expresión decae considerablemente (Steward 1987). Este ADNc se sintetizó utilizando el Gene Racer Kit (Invitrogen).

A partir de las secuencias encontradas *in silico* se eligieron para trabajar las secuencias de *dl*, *tl* y *dpp*, por tratarse de los principales iniciadores de la casaca que lleva al establecimiento del eje.

Se realizó una Race PCR para cada una de las secuencias de genes seleccionados para obtener las secuencias completas. Solo se pudo amplificar completamente el extremo 3' del gen *dorsal*, este gen ha sido identificado durante el desarrollo de esta tesis de forma independiente por el laboratorio del Dr. Carl Lowemberger en la búsqueda de genes de inmunidad innata (C. Lowemberger, comunicación personal y Bedoya *et al*, 2009); con respecto a los genes *toll*, *dpp*, *twi*, *zen* y *zld* se han obtenido las secuencias completas *in silico* sobre el genoma ya ensamblado de *R. prolixus* (Fig. 13). La identidad de los mismos se confirmó mediante el algoritmo blast en la base de datos de la NCBI y por la presencia

de motivos y dominios característicos de cada proteína. Las secuencias completas halladas *in silico* y las parciales halladas *in vitro* para *toll* y *dpp* (Fig. 14) se detallan a continuación, las mismas se compararon con secuencias ortólogas disponibles en la base de datos de la NCBI y en base a estas se intentó establecer árboles filogenéticos para cada secuencia, sin embargo debido a la falta de conocimiento de secuencia de estos genes en otros insectos fuera de dípteros, hizo que fuera imposible establecer relaciones filogenéticas de peso.

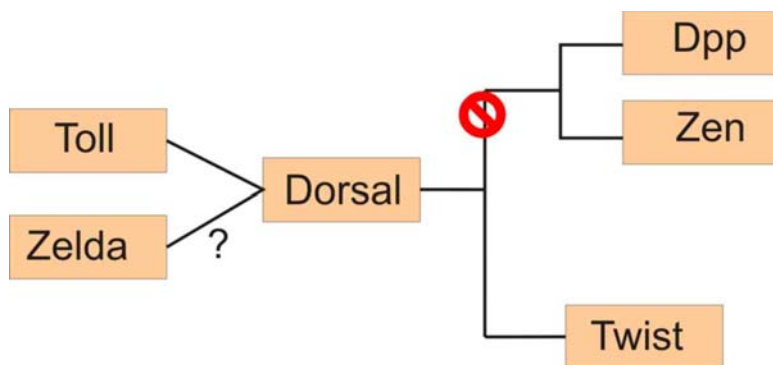


Fig.13 Genes encontrados *in silico* y sus relaciones

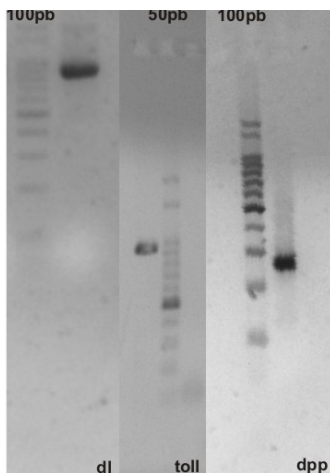


Fig. 14. Fragmentos obtenidos con la amplificación por PCR con *primer* sin T7, a partir de las condiciones descritas anteriormente. Sobre los mismos se sintetizaron las sondas para hibridación *in situ* y ARNi. Arriba se especifica el tamaño del ladder utilizado en cada caso

2.1. Dorsal

Dorsal es un gen de efecto materno esencial para el establecimiento de la polaridad dorsoventral en el embrión en desarrollo. Su proteína es un factor de transcripción que pertenece a la familia Rel/NF- κ B (Steward, 1987).

Los factores de transcripción (TF) se caracterizan por poseer una estructura modular con un dominio de unión a ADN y un dominio de activación. Los TFs pueden unirse a la secuencia ADN blanco como monómeros, homo o heterodímeros para generar un ARNm.

Un Factor de transcripción κ B (NF- κ B) contiene dos miembros de la familia de proteínas REL, caracterizadas por una región amino terminal de 300 aminoácidos altamente conservada que contiene el dominio de homología REL requerido para la formación de dímeros, unión al ADN, translocación nuclear y unión inhibidora.

Las proteínas REL son expresadas constitutivamente y se encuentran presentes en el citoplasma como zimógenos inactivos unidos a la proteína inhibidora κ B que bloquea la secuencia de señalización nuclear. Una vez removida la proteína κ B, REL es translocado al núcleo donde dimeriza y activa la transcripción de sus genes blanco (Engstrom *et al.*, 1993).

Los miembros de esta familia de proteínas (REL/NF- κ B) se encuentran altamente conservados, en los insectos el primer miembro de esta familia, Dorsal, fue descrito en *D. melanogaster* (Steward, 1987) y se encuentra involucrado tanto en la regulación del desarrollo del eje dorso-ventral del embrión como en la regulación de genes que actúan en la respuesta inmune innata.

Durante el desarrollo embrionario las distintas concentraciones de Dorsal en el núcleo especifican distintos destinos de la célula y de esta manera le da identidad a las diferentes regiones del embrión en el eje dorso ventral.

En *R. prolixus* se han encontrado tres transcritos distintos de dorsal: 1A, 1B y 1C. Las tres son muy similares diferenciándose únicamente en el extremo 5' en cuanto a su longitud.

Mientras Dorsal 1A se encuentra presente en bajo nivel tanto en tejidos embrionarios como en tejidos adultos tales como glándulas salivales, cardia, intestino y

cuerpo graso; Dorsal 1B y 1C se expresan en altos niveles durante el desarrollo embrionario sugiriendo un rol en el desarrollo (Bedoya *et al*, 2009).

Las tres isoformas de Dorsal contienen dominios proteicos conservados característicos de la familia REL/NF- κ B. El primero de ellos es el RHD característico de los factores de transcripción REL/NF- κ B eucarióticos. El segundo se encuentra C-terminal con respecto a RHD, es compartido por inmunoglobulinas, plexinas y factores de transcripción y se lo denomina dominio de transcripción inmunoglobulina plexina (IPT) responsable de la unión al ADN. Este dominio posee varios sitios de unión para la proteína Ankyrina (ANK) a los que se unen proteínas inhibitoras impidiendo el ingreso de Dorsal al núcleo (Stoven *et al.*, 2000).

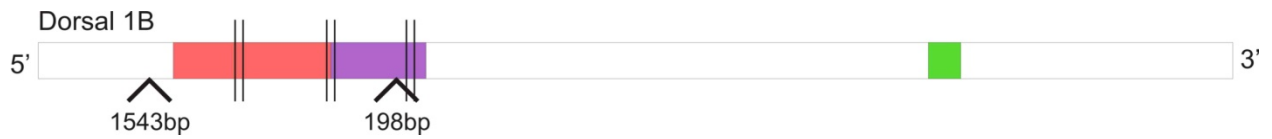
Una vez clivado el inhibidor una señal de localización de 19 aminoácidos ricos en lisina dirigen a Dorsal hacia el núcleo donde activará o reprimirá la expresión de genes zigóticos que determinaran las distintas regiones del embrión.

Pese a haber identificado el extremo 3' de *dorsal* a partir de una Race PCR se trabajó con un plásmido pET32 que contenía la secuencia completa de Dorsal 1A gentileza del Dr. Carl Lowemberger, para la síntesis de las sondas de hibridación *in situ* y ARNi

Por búsqueda bioinformática encontramos que la secuencia de dorsal 1B se encuentra distribuída en 4 contigs distintos, 17912.44-17912.43-11477.1-17912.42, aún así faltan 33 aminoácidos entre los contigs 17912.43-11477.1 los cuales no pudieron ser hallados en el genoma, tal vez debido al pequeño tamaño del fragmento faltante no fue identificado por los programas utilizados para la búsqueda (Fig. 15).

Sobre la secuencia de la figura 16 se sintetizaron las sondas para hibridación *in situ* y para ARNi Parental (ver materiales y métodos).

La misma se comparó con secuencias ortólogas de otros insectos, revelando una conservación significativa sólo en el extremo N-terminal, en el dominio de homología REL.



1 CCAAACCCCTATCTAGTTCTCATTACTCGATAACAATCTTCTCTACCCAAAAATAGCGTCCACAATTCTTC
71 TCTTTTTCAATTATTTACATTTTATATTTTTAAATAAATAATTTGTTGATATTTTATTTTAAAAATAACT

28981 GATGTTTCAGTTAATCCTGAGATGTGTTTTACATTCTGAAGGAGTACTGCTTCTAGAATTTGAAAGAGAGG
29051 GAACAAACCAACGTTTTTTTCGTTTTTTGAAGATGTACCTTTGAATTCCTAGTCTAAGGTGCAGGTTATAA
29121 ACCTACTTTTTTGGTCTTATTGGATTAAAAAAAAGCAAAATGATCTTAGGAATGTGCAAATGATTTGTAT
29191 TTTTAAAGAAATAAGAGATCCTTTCAATGTATGTTTCTTTTTGCTTGGACACCACCTACGCTTTAAGTT
29261 AACAT**TATA**AAAAACAGGGTCCATGTTTATAAACATAAATGCTTTTTTAAACGTTTTTTTTGGTAAAACCTGC
29331 AAAATGGTTTTTTGATTTTTCTATTGTGTTCTTGTTTTAAATGTATATGGTACTAATTTATTTTTATTTTGG
29401 TTGATGGGAATTGTGATGTTATATTGGGGATTTTGCAGAATCGTTTGACTTTAGTCTGAGCAGAATGGAC

M D

29471 GGGCAAAACATAGATGAAAGCAACTCTGCAATTAATATTAGTGATGTCAGTAAGTACCAAAGTCAAAAA
G Q N I D E S N S A I N I S D V
29541 CAAAATGCAAAAATCATTAAATGTTGACAATGTCGTAGTACTTTTTTATATTTTAAATTTTTCATAACA

31011 TAAATTTTTTCTGTTTACTTTTTCTAAAGTGTGCACAGCAATTTGTAGAATATTTAAAATGATATAAAT
31081 TGATAATAATATTTTGTATATATTGATTTAATATATTTTTTTTATGTCCTATTGAAGTTATAGAAACTG

I E V I E T

31151 ATTGTGCCGCTGGAGGTGGCTTAATGAACCAATCTGTTTCGGAGAACTAGTGAATCAAGTGGTGGAGGCGT
D C A A G G G L M N Q S V R R T S E S S G G G V
31221 AGCAAGTATGCCGTACATTAATAATTGAAACAACAGCATCTAAAGCGCTTAGGTTTCAGGTATGAATGT
A S M P Y I K I I E Q P A S K A L R F R Y E C
31291 GAGGGAAGATCTGCTGGTCTATTCTGGTGTAAATTTACACCAGAAAATAAAACGTTTCTACAATAC
E G R S A G S I P G V N S T P E N K T F P T I
31361 AGGTATGCTCATATAATCATCATTATTAACCAAAATAATTTTTTTGCCTCTAAGTGGCTGTTTCGTAATTT
Q
31431 TGTCATTATGGGAATTTGGTATTTCAAATATTTTTTAGGGCTGGTGGTAGAAAGGTCATTTCTTCTGTCCG

1 TTGGAAGCAGCAAATTAGACGAAAGGTGAAAAGAGTCCAGAATCCGAGAAATTTAACTCCCAAGTAGTTCCA
1821 TAATTTGAACCTTATAAAAAAGAAAAAATGTATACATTTGTAGGGTTGAAAAATTTTATTTTATTTGTT
1891 ACAATTTAAGGATATCCCATTTTATTTGCAGATTGTTGGCTACAGAGGTCGAGCAGTAGTAGTGTC A

I V G Y R G R A V V V S

1961 TGTGTGACGAAGGATAGCCCATACAGGCCCTCACCAATCTTGTGGCAAAGAAGTTGTAAAAA
C V T K D S P Y R P H P H N L V G K E G C K K
2031 GTGTTTGTACTGTGCGAGATTAATAATGAAACCATGACAGCGCCTTTGCAAATCTTGGTATTCAATGTGT
G V C T V E I N N E T M T A A F A N L G I Q C V
2101 CAAAAAAGATATTGAAGAAGCACTTAGAGTCAGAGAAAGAAATAAGGGTAGATCCATTTAGGAGTAAG
K K K D I E E A L R V R E E I R V D P F R

2171 TATCTGCGGATTTTAATAAAGGAATAAATAATCTAATTATAAATCTATGTGGACCTTGATGTGCCAAAA
2241 AAAAAATTAATAAATATTAGGTATTTAACTTGAGTTACCAAATAATCCCTTTTCCATTCGACGCTTGGTA
2311 CAGATTGCCTTAAAAATTTAATATCTATTTCACTACTACCATTTTTATTTATTTTTCGACCGGATTTCAGT
T G F S

2381 CATAAACTCAAACAAGTGGTATAGATTTGAATTCAGTTCGATTATGCTTTCAAGCATTTTGTAGAAGGAC
H K T Q T S G I D L N S V R L C F Q A F L E G
2451 CTCAAAGAGGAAAATTTACCAACCCATTATCTCCAATTTGATCAGAACCAATTTATGACAAAAGTATGTA
P Q R G K F T N P L S P I V S E P I Y D K

2521 ATTTACAGTTATATAATTTTCGTTAAATTTAATTTAATTTTTTGGGACGATAAACTAAAAA
2591 ATCAATGGAGTGTGTTAAATTTAGTTTCAATACTTTTTAAATTTAAATTTACGAAAAATTTAATTACTAA

1 AAATTTGTATAATATAGTCTATTTCGAATATCTAGAGGACATATCAGTGCGATTCTATGAAGAGAAAGATG

E D I S V R F Y E E K D

71 GCCAGGTAGTTTGGGAAGGATTAGGAGATTTACGCCAACACAAGTTCATAAACAAGTGGCTATTTTCATT
G Q V V W E G L G D F T P T Q V H K Q V A I S F

141 CCGAACGCCTAGGTACAAAACATTAGAGGTTAGTGCCTTTAAGTATTTATTAGATGTAAGATAATCTAAA
R T P R Y K T L E

211 AAAAAATTAATTATGTTATGGAATTCGTGTTCAATTGACTGTAAGTACCGTTCGAAGCAGTTATTATATT

.....

1 AAGAGCAAAGCGGCAAAAACAAAACCTAGAAATAGATAGAGTTGCTCTATCTTCGCTTTGCTCGCCACTA
3011 AACTAATCTTAAGTTTAAATATCTTGTTTCAGATAGAGCAGCCTGTGCAGGTACTTATAACAATTCGAA
I E Q P V Q V L I Q L R

3081 GGCCGTCAGATAACGCTACGAGTGAAGCATTACCTTTTTCAGATAACTCCACTTGATTTCAGGTAGGCCTTT
R P S D N A T S E A L P F Q I T P L D S G R P F

3151 CTTTTGGTCATTGCGTCGAAGTATTGGACAAAAAGCCGACTACCGTACGTTTTCAACAATACTTCAAACG
F W S L R R S I G Q K A D Y R T F S T I L K T

3221 AATACAAAATTATTAATACTAATCAAGAAAAGAAATGACGATGATGCAAAACAATAACACCAACAATAGTAATA
N T K L L T N Q E R I D D D A N N N T N N S N

3291 ATAATAATGAAATTAAGATGTTGAAGTAGAAGATAATGTAGTTAGTGTAGCAGATATCCACAACCAAAA
N N N E I K D V E V E D N V V S V A D I P Q P K

3361 AGTTGTTGTAGTATCAAATCAAGAAGAAGAGATAAAAGACGAAGAAGAAAATTTGTGGTCAGTCAGAGTTA
V V V V S N Q E E E I K D E E E N C G Q S E L

3431 GAACAACCTTTTAGTTAAAGATTTGGAAAATATTTGCAATAATAATAGCGATCTTGTTATATACACAAGTT
E Q L L V K D L E N I C N N N S D L G I Y T S

3501 TCCAGATGGCTTTGAAAAATCCCTGTCAAGATCTGCTTGATCATGAAAAGTTACGAAGATATTGCACCACC
F Q M A L K N P C Q D L L D H E S Y E D A P P R

3571 AAGACCAACAGCTGCTAAACCGACACTTTTGCACAACCATTATCACCAGTGCCACATTTAGATGATGAA
P T A A C K P T L L Q Q P L S P V P H L D D E

3641 GTTTTACCACCATTACCGCCAAAACGAGCCAAAACGTACTGGACCAGATACGAAGCCTTCCATCACCTC
V L P P L P P K R A K R T G P D T K T L P S P

3711 CACAAAAGAAAACCTGGTCTTTTTTCAAAAATTATTCAACACAAAATAAAAAGAAAAAAAATAAAGAAGTCCA
P Q K K T G L F Q K L F N T N K R K K N K E V Q

3781 AGAACGACCATTTGCAATCACGCGGAAGTATTAAATCACTTCCAGCTGAAATGATAATATCATCTAATGAA
E R P L Q S R G S I K S L P A E M I I S S N E

3851 GTAGATGTTACAGAAGCTGAACATTATGCTTTGTATACATCTGTAGCACCGCATGCTACAGCTTCTGAGT
V D V T E A E H Y A L Y T S V A P H A T A S E

3921 TCGATGAAATGTCTTTCTATTACAGTTCAGTCGAACAACAAAAGTAAACTAAAAACAAATTGTCCCAT
F D E M S F Y Y S S V E Q Q K V N STOP

3991 GTGGCTAAACTGAAATTTATACATCAAAAATGCCTCAAAACATTTAAGTACTTAAGATTTTGAAATTT

.....

12671 TAGGTAATTTGTGTGTCTTAAGATCAACCTATGTTTAAAAAGAAAGTACCGTTCATTAGATAGAAGGCTA
12741 **CTAAATAAATA**GTAGATCCCAATATGACAAAATAAATTTAATACTCATACTTGTTTTAAAGTTGATTTCCAA

Fig. 15. En *negrita cursiva* (rosa en el esquema) se encuentra indicado el dominio de homología REL, *sombreado* (violeta en el esquema) el dominio IPT que a su vez es una región rica en asparagina. *Subrayado* (verde en el esquema) se encuentra la señal de localización nuclear. En *negrita* se indican un posible TATA box y una cola de poli A. Simple línea de puntos es abreviación del intrón y la doble línea de puntos representa el cambio de supercontig (doble barra) Las puntas de flecha en el esquema indican la posición aproximada del intrón y su tamaño.

2.2. Toll

La proteína Toll en *D. melanogaster* es suplida al oocito por vía materna y codifica para un receptor transmembrana responsable de mediar el patrón dorsoventral a través de una cascada de señalización que lleva a la disociación del factor de transcripción Dorsal de su inhibidor I κ B asociado, Cactus (Whalen y Steward, 1993; Bergman *et al.*, 1996), cumpliendo un rol fundamental en el establecimiento del eje dorsoventral. También cumple un importante rol en la respuesta inmune, las proteínas Toll o los receptores de tipo Toll (TLRs) al igual que la superfamilia de receptores de interleukina-1 (IL-1R) tienen función en la inmunidad innata antibacterial y antifungal tanto en insectos como en mamíferos. Estos receptores comparten un dominio citoplasmático conservado de aproximadamente 200 aminoácidos conocido como región homóloga Toll/IL-1R (TIR).

Por otro lado Toll se expresa en el embrión de *D. melanogaster* post-blastodermis donde se cree que posee función de adhesión celular participando en los movimientos embrionarios durante el desarrollo (Gerttula *et al.*, 1988; Keith y Gay, 1990; Hashimoto *et al.*, 1991). La similitud estructural y funcional en el *cassette* de genes receptor IL1/TI, I κ B/Cactus y NF κ B/Rel/Dorsal, sugiere que el mismo se ha conservado evolutivamente (Wasserman, 1993) (Lemaitre *et al.*, 1996)

En *D. melanogaster* la secuencia proteica de Toll muestra que se trata de una proteína integral de membrana con un dominio citoplasmático relacionado con las proteínas IL-1r (receptor de interleukina 1), un dominio PEST, las N y C-box y un gran dominio extracelular que contiene al menos 15 repeticiones de 24 aminoácidos ricos en Leucina

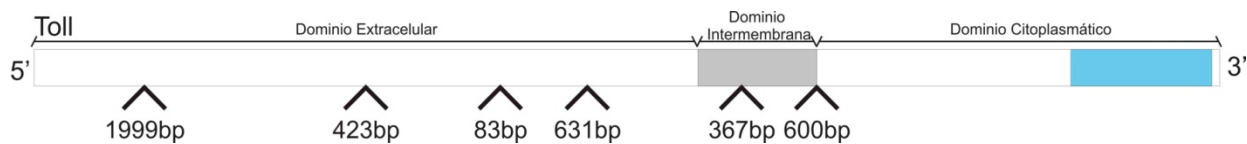
En general entre dípteros esta secuencia se encuentra bien conservada (Maxton-Kuchenmeister *et al.*, 1999), entre los insectos de banda germinal corta *toll* sólo se ha estudiado hasta ahora en *T. castaneum* donde el dominio C-terminal está ausente y la proteína termina poco después del receptor de interleukina 1. En *R. prolixus* el dominio TIR se encuentra altamente conservado y pese a que el dominio extracelular no se encuentra tan conservado contiene al menos 19 sitios ricos en leucina similar a lo observado en *D. melanogaster* y al igual que en *T. castaneum* se ha observado, en las

secuencias obtenidas *in silico* y por PCR la ausencia del dominio C-terminal (C-box), terminando la proteína poco después del dominio TIR.

Se supone que el dominio C-terminal conservado en dípteros es una característica derivada de la función de *toll* en los insectos de banda germinal larga. La región PEST media la degradación de proteínas mediante la 26S proteosoma, afectando la vida media de las proteínas. Como el desarrollo temprano, incluyendo la formación del blastodermo es prolongado tanto en *T. castaneum* como *R. prolixus*, comparado con *D. melanogaster*, se podría especular que los dominios PEST conservados servirían para prevenir la actividad prolongada de *toll* en los insectos de banda germinal larga, mientras que podría ser requerida para los insectos de banda germinal corta en su desarrollo (Maxton-Kuchenmeister *et al* 1999).

La secuencia completa del gen *toll* de *R. prolixus* se encuentra en el supercontig 17925.24, de 53991pb (Fig.17).

A partir de las trazas del genoma de *R. prolixus* se encontró inicialmente una secuencia parcial del gen *toll* como se describió previamente. Se desarrollaron *primers* específicos para la misma, obteniéndose la secuencia parcial que corresponde al dominio TIR de la proteína Toll [GQ919045.1](#), la misma se comparó con secuencias ortólogas (Fig. 18). A partir de la misma se desarrollaron sondas de hibridación *in situ* y para ARNi



```

1      TCCTTCCCTTCACTCCTGCTTTTGCTAAGATTACTTTAAATCTAGGATATGGATGGCCGATATCTAAACT
71     AGTTCATGTTTTGTTTCGCTTTTAGATTGTATCAACCTTCTTTGAGAGTGAGGATCAATACTATTTCTCA
141    AAATTATTATTGTTTTTACACTATTTTTCTAATCAGGGAGGAACATAGCAATTCAATACATGATTTTC
.....
8961   TTGTTTTTTTTTCAAAGCTTTACGTTAATTTAGACTATCTTGATATCTTTCGTTGAAATCTATATTTGTAA
9031   CCAATGCTGGTAAAGTTATAAAAAAGCAGGCATAGTCATTTGTAAAGCATTCAATTAACCAACCATCGAGC
9101   AAAGCAATGGCCAAGGTCGTTGCAAGACAATGAAAACAAAAGATGCAATTAAAAAAAAAGCAGCAAATTT
9171   TCAGTGAGAATATAGTTTTAAAAACGAATTTTAAAAAGATAAAACAATAACAATAAACCGTGAACATTCAAAC
9241   AAAACCACGGTCAAATTTCTCCAAAAGTTGGAATTTACAAATTTAAATACAAAATTAACCTGCGTTTTATTG
9311   TAACAAAATTATTGAATGCGAAACAGGCTTACCAATTTCTGCCAATGTAAATAGCATTTCTCTAAAACAA
9381   GACTCCACGTTTCAGACTGTATTCCAGAAAAGATGCAAAAAAAAAATAGAACAGTTTGGCATTGGCTAACT
9451   TTATCACTTGGGAAGTGTAGCTAAAAATTTGATTTCTTAAATGATAATAAAAAATAATAAAGAAGTAGCA
9521   ACCGATGAATTTGACTTTGAACATGTTTTTAATATTTCTTAACTCTCCTTGAAAAAGTATCCAAGAAATAG
9591   CAACGTTTTAGAAAAGGGATCCCTGAATGAAGGAGATGACTTTTAACTTTCTAGTATCACTTCTGTTTTCG
9661   TACCTACAGAAATAGTGAAATATTTCACTAGATTTAAATTCAGAAATTAATAAATAATTTAAAAATTTATG
9731   CCTAAGTGAGGCGCCACGATAGCCATAGCCGAACGGTTAGAGGCGAGACCTGCAAAGCTAATATGTATTG
                                     M Y C
9801   TGGTACTGGGTTGACTCCCGGTCTTTAGGCCTTTGGATTTTATTTAATGGTTAATAAAAAGAAATTTACAG
      G T G F D S R S L G L G F Y L M
9871   TAAAGTGTGTTTGTAGTCGCCTCCGTCCACGACACCTAATTTGGTAGTTGGACGTTAAGCCCCGACTGAA
9941   AAAATAGGCAATTACTTCACTTTACTTTTTATTATGCCTAAGTGAGGCGCCACGATAGCCGAACGGTTAG
.....
11691  CAAAAAATTTCTTCTCATTATGCTGAATTAAGGCTTCTTAAATAACAATATTGCGAATAACAAAACCTTCT
11761  TCTTCCATTAACCAATAATTAATCTTAAAACTCTGCATTTCTCTAATAAAAACCTTCTCATTAAATGATTT
11831  TGTCACATGATTTATATTTTTTTACATTTTTTATGTTTTAGATGAAGTGGGTAATATTAGTGTTCCTCAGCG
                                     M K W V Y L V F L S
11901  CACTACCTAATAAGCTGTTAGCTGAATTTAATTTGCCAATATTTCCGAAAACGTACATGCTCGAATGGTGT
      A L P N K L L A E F N C Q Y S E N C T C S N G V
11971  ACGTGGTGATTACGAATTAATGTGTCCAAAAGGAATTTGAATCCCCAAAATTAACCTCGCTCAAATTTATGCCA
      R G D Y E L M C P K G I E S P K L L A Q I M P
12041  GAAAAATTTGTACAAATACAATGTTTACAGATACGAACAAATGGGAAGTATTAAATTCATTATATGGTATTG
      E K F V Q I Q C S D T N K W E V L N S L Y G I
12111  AAGTTGGCCCAGTTTCATCATTTATCATTAGATATTGTCCATTACCAACGGTATCATTTAAAGAATTTGTT
      E V G P V S S F I I R Y C P L P T V S F K E L L
12181  AAACAATCTTAAATACCAACAATTAAGCATTAGGTGTGTCCACTCTAGTAAATTCAGCAATGGACTG
      N N L K Y P T I K A L G V S T L V N S S N G L
12251  ACTAGAAAACATTTAGAAGGATTGAAAGATATTACAAAGTTAAATCTGAATACAAATTTCTTTACGAGAAT
      T R K H L E G L K D I T K L N L N T N S L R E
12321  TGCCTGAAGATCTATTTTCATGATACAACCAATATAACTTTGGTTAGATCTTAAAAATAATCATTTGACATT
      L P E D L F H D T T N I T W L D L K N N H L T L
12391  ACCAAAGAACATTTTCCGATATACGCCTAAAACCTTGATGTACTGGAACCTAGGCAGTAATAACTTGAGTTAT
      P K N I F R Y T P K L D V L E L G S N N L S Y
12461  CTTGAGCCAGGAATATTTAAGAATCTAACAAAAATTAAGATTATTGAACTTGTGGGGTAATAGATTGAGAA
      L E P G I F K N L T K L R L L N L W G N R L R
12531  ATCTTTACGAGCACTATTTACTGACGTACCAATCTAGAGAATTTGGATATTAATTCAAATGGGCTAAC
      N L S R A L F T D V P N L E N L D I N S N G L T
12601  TAGTTTACCACCAGATATATTCGCTGATCTTACAAAATTAATAATAATCAACTTATCAACAAATAATTTCT
      S L P P D I F A D L T K L K I I N L S T N N F
12671  ACATCATTACCGCAAGGATTATTTTAAAGCAATCCAAATTTAGAATCAGTTTTGATCAACAATAATCGTA
      T S L P Q G L F L S M P N L E S V L Y N N N R
12741  TAGATTTGCCATCACTTCCGGCAGGTTTTCTAGCAAAACATGACTCAATTACAAAAATTTCTATTCTAAA
      I D L P S L P A G F L A N M T Q L Q K I S I L N

```

12811 TTGTAATCTGCTAATTCTAACTGAAGACTTCATCGCTGGAAGTACGTCGCTTATTAATCTAACTCTGGAG
C N L L I L T E D F I A G S T S L I N L T L E
12881 AAAAATCTATTAGTAACCTTTGCCCAAGGATTTCTTCAAAGATAAATACTAAATGGAAAAATATTAATTTGA
K N L L V T L P K D F F K D N T K L E N I N L
12951 GCAGAAATAAAATTAACCTTCTTTGCCGGACGGGCTTTTCCAGACAACGACTCAGCTGAAGATTCTCAATTT
S R N K I T S L P D G L F Q T T T Q L K I L N L
13021 GGCTAGAAATGCACTTACGACATTAACAGACTAAGTATAAATTCGTAAGAACTAATAGAATAGAAGCAATA
A R N A L T T L T D
13091 ATAGATAAGTAATTTCTTTCTTTTAAATGTTAATTTAAATAAATTTCAATTATATAATATACGATACAAACAC
13161 AGAATTATTGTTTTACATTTAGTTAAAATTAACAAGTTTTTCGCGAAAATATTTCTGAACAGAGGATAACTTT
13231 AGAAGAAGAGCTACTTTTTATATGAGCTAAACATTTTCTACATGATTTTACTTTTTAATTTGTTTTTCATAA
13301 TTTATGTTTACAAATAAAAAAAGAAGTATTTAAAATATAAATATATTAAGACACGCATGGTTTTTAAATAT
13371 TGTATATTTTTGAATGAAATTTACGCATGAAAGTCCCAGACACTGTTTCGATAACCACCGGGTAGGTTATTA
13441 ATTACCTTTATGGGATAGGCCCAGGAAAAAAGAAAACACGAAACCAAATTTAAATGCTGAATTTCTATC
13511 CGAAACCTTCAAAAAAATATGGCTCTCAATTTAAAATATAGGCTAAGTGCATGAATTTAAAATAAATTTTA
13581 TTAATTTTCAATTTTTCTTTATTTTTTTAGAAAAATTTTCAGCTCTTTGAATAACTTGGAAGTTTTAGACC
S L N N L E V L D
13651 TATCACGCAATAGCATCAAAAAATCAATAGTTATACATTTTTAAAAACAACAACTTAAACAATCAA
L S R N S I K N I N S Y T F L K T N K L K T I N
13721 TTTGTCTAACAACAAGATCAAAGATTTGCAAGTAACTATCCAGGACTGGATCCTCCACAATCCATTCTT
L S N N K I K D L Q V N Y P G L D P P Q S I L
13791 AAAGACTGTTTCAGAAAATTTGGAAAGCTCTTTATCTAAGTCATAATAACATATCACAAATATATCAAGACT
K D C S E N L E A L Y L S H N N I S Q I Y Q D
13861 GGATTATATTAATGTCACGTTTACAAATACTTGATCTCAGTTACAACAATCTACCAAATCTATCGGTAAG
W I I L M S R L Q I L D L S Y N N L P N L S
13931 TATGATTGATTTATACCAGAAAAATGTTTGTTTTTCAAATTTTCGTTATTCATTGCTTTTTTTTTTTTTCTT
14001 TTCTTCTTTCAGTACGCATCTCTAGCTTCCGTAACAGCAGCTAAACTAACAATGGATTTAAGTTACAATA
Y A S L A S V T A R K L T M D L S I N
14071 AAATCGACCGGATAGATTTTGATATTGCTGAAGATTTGGCAAGATATAAAATTTGGAGTAAATGATACAAT
K I D R I D F D I A E D L A R Y K F G V N D T I
14141 AAATGAATTCGATATTGGTGTAAGAGTAGTCTTAAAAAGGCAATCCATTGGTTTGGCATTGTAGATCATAT
N E F D I G V R V V L K G N P L V C D C R S Y
14211 GACCTGGTGAATTATTTTTAGAGATCAATTCGCTCCACAGGTATTGTAATATTCATTACAAAATAATTTAT
D L V N Y F R D Q F A P Q
14281 AATTTCCGATTTTACTTTACTATGGAAGTGCATGTCTTGAGGTCCTTGATTGAAAGAATTTTCGAGTAC
14351 TTTATTTTTTTAATTATTGCAGTCTTTTCTGCTCCATCCAGATTCTTTCAAATTTGGATGAACAATAAAT
14421 TTAATAAATCAACTAACTGCTTATATTATAATTTTACCAAGAAAGACGTTTGTTTAAGAGCTTGAGCCA
14491 AAGTGGGCAAGTCTTTCTTTTATGTAGTTTATACTGCTATGTCACGCCACTAATTTTCTCTAGAAT
14561 AAGGAGATTCAACAATACGGCTAGATTGATTATCAGAGCAGAAGGAAGGTAGTGGGTAACACAAAGGCAG
14631 TAAAAAGAGAAAATGAATTTAAAAATAATCAATAAATTTGGGCGTTACCTAATTTATTTATAGGTACAAAT
14701 CAAAATATTCAACTAAAAAGAAAACAAAAAACAATATCGTTCTCTCTGATTTTCTTACTATAGTAAATAGTG
14771 TAGTAATTATGCCCAATACAAAGTGAAGAAAAACAAATATTAGGATCAGCAAATCTAGAAACGATTGGGA
14841 ATAAAAGAAATGTAATTTGGGTAATGGAGCTGTTGATCTTCACTTCAAAGGCAATAAATATTAGAAAAAA
14911 TCTTTACTCTAAGATTTAAGTAATCATTTTACAGAACTATAGACTTATGAGGAAATATATCAAAATTTAA
14981 AAACAATGATTAATTTTTTTTTTTAATTTTCAGTGAAATCAGTAGTAAGATTTGATGGTACAGAATTTAA
V K S V V R F D G T E L N
15051 TTGCGCTGGTGATAATGAAATGAAAGGTACACTAGTTGTAACGCTAGATCCAAAATTACTTACATGCGAA
C A G D N E M K G T L V V T L D P K L L T C E
15121 GAGAAACAATGCCCCACAAATTGTACATGCTACTATAGACCACACGATGATGCTTTAATTGTGGATTGTT
E K Q C P H N C T C Y Y R P H D D A L I V D C
15191 TTGAAAGAGGATTTGAAAGCTTACCGTTATACATGCCTAGCAATGTTAATAGAACGAAACATTATGACCA
F E R G F E S L P L Y M P S N V N R T K H Y D H
15261 TATTGAGTTAGATATTAGTCATAACAAATTTGGAAGTAATCCCATCTAACTTGGGCCAAATTTATGATATG
I E L D I S H N K L E V I P S K L G P N Y D M
15331 GTGACCAAGATAGATCTATCTAATAACAATATCAGAAAGCTTAGTTTAGGATCTTTCTCCAAAAATTTAA
V T K I D L S N N N I R K L S L G S F S K N L
15401 CGGTATGTATTCTATTTAAATAGTTATCCTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATAATGCAGAACT
T
15471 AATTTTTCTTTATTATACTTATATTTACCACTTAATATTTCTTTCTACTACTTATTCTTAATTACGAAT
15541 GTGGGCTTCTTCTGCAAGAAGAAAACCCAGGTTGTTTTTTTTTCGTGTAAAACGTTTTTATCTTCAACAAC
15611 TTTTCATTAGTTAACCAATTTATTTTCCAATTTTATGTAGCTTTTAAAATACCGACAGAATTCGGCCAT

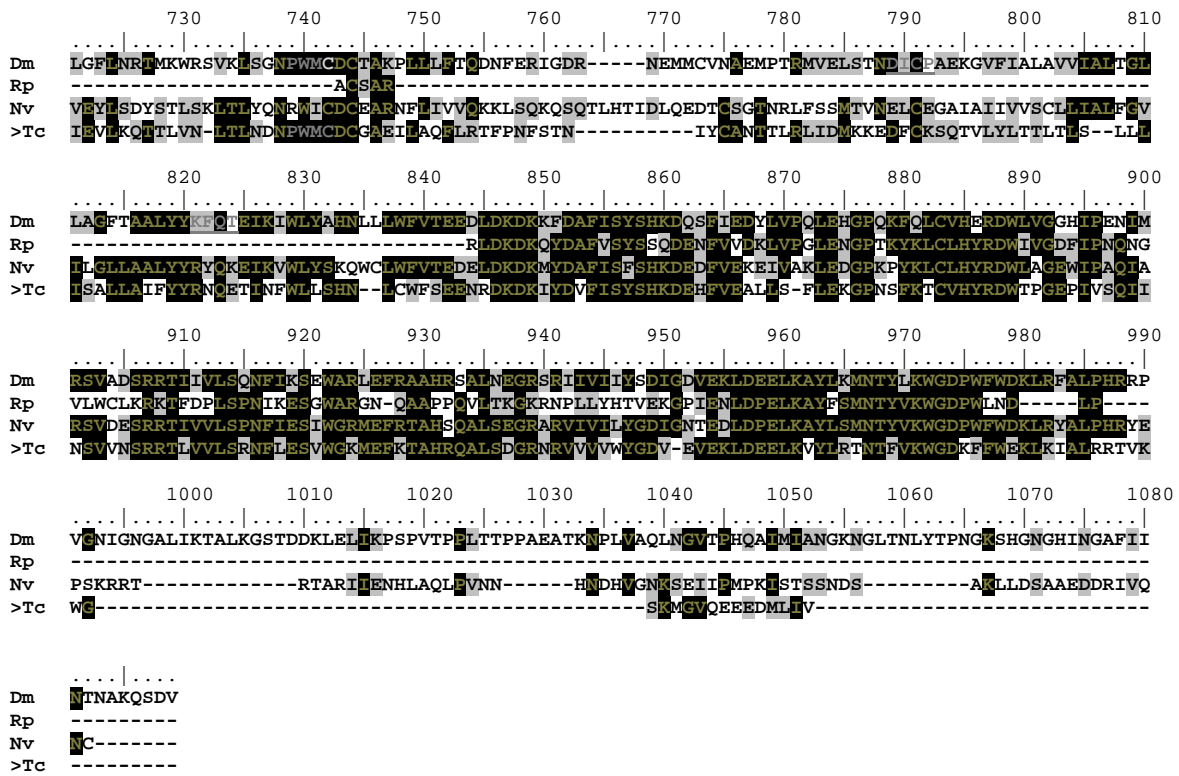


Fig.18. Casillas negras: regiones idénticas/Casillas grises: regiones similares. **Dm** *Drosophila melanogaster*, **Tc** *Tribolium castaneum*, **Nv** *Nasonia vitripennis*, **Rp** *Rhodnius prolixus*

2.3. Decapentaplegic

decapentaplegic (dpp) codifica una proteína ortóloga de las BMP2 y BMP4 (Bone Morphogenetic Proteins) de vertebrados (Padgett *et al*, 1987) y es miembro de la superfamilia TGF- β (factor de crecimiento transformante β). Los miembros de esta familia son proteínas multifuncionales de señalización entre células jugando un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos y el desarrollo de animales multicelulares. Todas las proteínas miembros de ésta familia se originan como precursores más largos que son clivados para activarse quedando en unos 110 aminoácidos y se encuentran activos en forma de dímeros (Piek *et al*, 1999; Gelbart, 1989).

A pesar de la gran variedad de roles biológicos que cumplen estas proteínas los componentes de ésta vía de señalización se han conservado sobre grandes distancias evolutivas y poseen una serie de estructuras comunes (Kingsley, 1994). Son secretadas como polipéptidos y comparten cierto grado de similitud de secuencia en el dominio maduro. La característica de ésta familia es una serie de siete residuos de cisteínas completamente conservadas en el extremo C-terminal del dominio maduro. Esta característica además se encuentra conservada entre varios Phyla (Sanchez-Salazar *et al*, 1996) y en particular para *dpp* un intrón cuyos límites se encuentran altamente conservados. Dentro de éste intrón del prodominio se encuentra una región conservada que contiene varios elementos silenciadores a los que se une el Factor de Transcripción Dorsal para reprimir la expresión de *dpp* durante la embriogénesis temprana (Newfeld y Gelbart 1995).

Dpp se comporta como un morfógeno, es decir que difunde desde una fuente en la cual se encuentra de manera concentrada y declina en un continuo, controlando el comportamiento de las células en función de su distancia con la fuente (Affolter y Basler, 2007; Kicheva *et al* 2008) y participa en gran cantidad de procesos del desarrollo de *D. melanogaster* como el patronamiento D-V del embrión, venación del ala, patronamiento de los discos imaginales, crecimiento del ala y halterio, morfogénesis de la pata, desarrollo del ojo, patronamiento del corion, remodelamiento del citoesqueleto en las células del disco imaginal del ala y células foliculares, desarrollo de células neurosecretoras en el cerebro, mantenimiento de líneas celulares maternas y formación de tumores neoplásicos

(Van der Zee *et al*, 2008; Rusch y Levine 1997; Bienz 1994; Massague *et al* 1994; Rusch y Levine 1996).

En *D. melanogaster* el dominio maduro de *dpp* posee tres regiones bien definidas cada una de las cuales cumple una función durante el desarrollo embrionario: *dpp^{disk}* cumple funciones de patronamiento en los discos imaginales, *dpp^{shv}* controla la venación del ala y su pérdida de función provoca la letalidad de la larva y *dpp^{Hin}* (región haplo-letal, *Haplo-Insufficiency near dpp*) necesaria tempranamente en el desarrollo embrionario para la formación de tejido epidermal dorsal y cuya pérdida de función provoca la ventralización del embrión.

A continuación se muestra la secuencia completa de *dpp* encontrada *in silico* con las características típicas de la familia resaltadas. El gen completo se encuentra dentro del contig 17667.8, de 12951pb. (Fig. 19)

A partir de la trazas del genoma de *R. prolixus* se consiguió identificar un homólogo de *Dm-dpp* que contiene las 7 cisteínas características de la familia TGF- β , lamentablemente por PCR sólo se pudo obtener un pequeño fragmento de éste que contiene 3 de las 7 cisteínas características (GU906792.1). Esta secuencia parcial ha mostrado estar altamente conservada como puede observarse en la figura 20 comparada con ortólogos de otras especies. El fragmento de *Rp-dpp* obtenido corresponde al extremo C-terminal de la proteína. Dado que esta región es la que dimeriza para formar el producto secretado maduro es esperable que se encuentre altamente conservado dentro de la familia de proteínas y entre distintos insectos. En contraposición el extremo N-terminal se encuentra poco conservado entre los miembros de la familia.

Este fragmento obtenido por PCR fue el que se utilizó para el desarrollo de sondas para hibridación *in situ* y ARNi (ver materiales y métodos)


```

10151 TCCAAGCGTTGTACCTAAAGCATGTTGTGTACCTACCCAATTGTCTTCAATATCGATGTTATATGTTGAC
      P S V V P K A C C V P T Q L S S I S M L Y V D
10221 GATGAGAACATAGTTTTGAAGAACTATCAAGATATGGTGGTAGAAGGATGTGGCTGTAGATGAAACCTCT
      D E N I V L K N Y Q D M V V E G C G C R stop
10291 CCATCTTTTATCTGAAAACAAACAAAAATAATTCTATGCCTACTTTTTTATTTTCTTGAATATGTGAT
10361 ATTGTAAAGTGAATAGTCTTTATGTGCTTGTAAATAGATTGTTGTATATTGTAAATAAATTCGCTTAAAT
10431 TTAAGTAATAAAATAAATTTTAAACGGGTAAATGAAAGAACCATACAGTCATAGTATTAATTTCTTAT
10501 AGTTTATTAAGCAACGCGAACGATAAAATAAATAAATTTGTAAAGAGGGCATATACAACCTTGTAAATC
10571 CAAAACATTTATTTGGCACAAAACTTAAACATCTTGATAAAAAAGATATTATTTAAAAAGCTACTTAAAT
10641 ATTCAGTAGTGGAGAAATCCAAGGAGAAGTTTTATGGAGCGCTGCCATCTGGTTAGGTGTGTATTCCAC
.....
12881 TTTGAAATAGAACTTTTGTTTAGGATAATTCCTTTGTCAATTTTCCTCATTTCACATGTGCAGTTCAGTG
12951 CAAACCAAAAATAAAAGACACATCTTTA

```

Fig. 19. La simple línea de puntos constituye abreviación del intrón, en negrita se indica el posible TATA. En rojo y subrayado se indica el consenso en las secuencias nucleotídicas de GT y AG en los extremos 5'y 3'del intrón conservado en todas las secuencias ortólogas, sombreado (amarillo en el esquema) se indica el dominio TGF-β2 que lo caracteriza como miembro de la familia TGF-β, sobre la misma se encuentran indicadas en verde las siete cisteínas altamente conservadas y características de la proteína. Las puntas de flecha en el esquema indican posición aproximada del intrón y su tamaño.

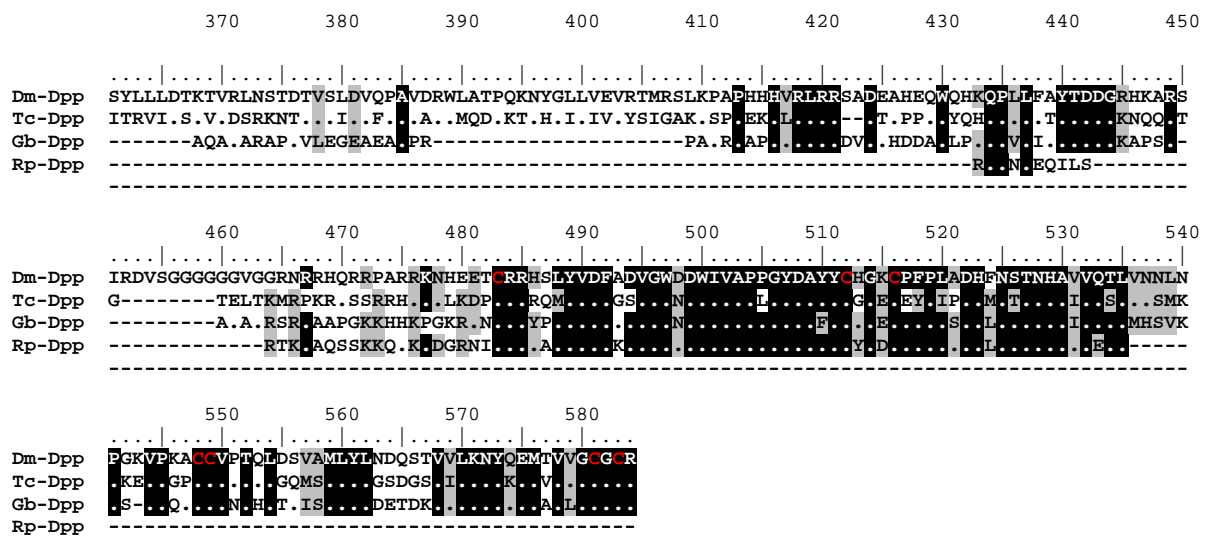


Fig.20. Casillas negras: regiones idénticas/Casillas grises: regiones similares. En rojo se resaltaron las siete cisteínas características de la proteína. **Dm** *Drosophila melanogaster*, **Tc** *Tribolium castaneum*, **Gb** *Grillus bimaculatus*, **Rp** *Rhodnius prolixus*

2.4. Twist

En *D. melanogaster* es un factor de transcripción activado por *dorsal*, y es el primer gen zigótico de la cascada dorsoventral.

Twist es un factor de transcripción de tipo hélice-loop-hélice básico (bHLH), como dijimos antes se expresa zigóticamente y es un regulador clave en la formación del mesodermo y también se expresa en los polos anterior y posterior del embrión temprano (Simpson *et al*, 1983; Nüslein-Volhard *et al*, 1984; Thisse, 1988; Leptin *et al*, 1991; Pan *et al*, 1991). La expresión de *twist* es absolutamente necesaria para la gastrulación y la diferenciación celular activando o reprimiendo genes que se encuentran corriente abajo a nivel transcripcional. Esta habilidad de *twist* para comportarse como represor o como enhancer según el contexto tendría que ver con el hecho de que *twist* tiene el potencial para formar homodímeros (que se ha visto está involucrado en activación en *D. melanogaster*) y heterodímeros (involucrado en represión transcripcional) (Sandmann *et al*, 2007).

En *D. melanogaster* Twist es una proteína nuclear de unos 490 aminoácidos. La secuencia nucleotídica posee un único intrón de unos 120 pb en el extremo 3', mientras que en el extremo 5' se observan repeticiones de nucleótidos CAX, también denominadas OPA boxes que codifican para los aminoácidos Gln/His, Asn/Ser, Thr, Gln; las cuales se han hallado también en otros genes de *D. melanogaster* como *notch*, *dorsal*, *antennapedia*, *deformed* y *engrailed* (Thisse, 1988).

Twist se encuentra presente desde las medusas (*Podocoryne sp*, Spring *et al*, 2000), ascidias (*Ciona intestinalis*, Harfe *et al*, 1998) y vertebrados (*Xenopus laevis*, Hopwood *et al*, 1989 y *Mus musculus*, Gitelman *et al*, 1997), sin embargo estudios en la expresión y pérdida de función indican que todas las proteínas Twist identificadas se encuentran envueltas en al menos algún aspecto de la diferenciación del mesodermo, pero ninguna tiene función en la gastrulación y determinación del mesodermo comparable a lo observado en *D. melanogaster* (Haendel *et al*, 2000).

A partir de la secuencia hallada *in silico* para *R. prolixus* podemos observar que la proteína predicha es mucho más corta que la proteína de *D. melanogaster* (206 aminoácidos), lo mismo se observa en las secuencias homólogas de *T. castaneum* y

vertebrados (Haendel, 2005), esto se debería a la ausencia de las OPA boxes, las cuales estarían implicadas en la activación transcripcional. Estas OPA boxes aparentemente han sido adquiridas específicamente por los dípteros más evolucionados ya que se encuentran ausentes en otros dípteros como *A. gambiae* (Holt *et al*, 2002) y en himenopteros como *A. mellifera* (Haendel *et al* 2005).

La secuencia para el gen *twist* de *R. prolixus* se encuentra codificada en el supercontig 18057.179, de 14561pb (Fig.21).

En la comparación de *Rp-twi* con secuencias ortólogas sólo se halló similitud de secuencia significativa en el dominio bHLH en el extremo C-terminal (Fig. 22).

2.5. Zerknült

zerknült (*zen*) descrito inicialmente en *D. melanogaster* a partir de su fenotipo, constituye el gen ortólogo de *Hox 3* en insectos, se encuentra en el cluster antenapedia entre los genes *proboscipedia* y *deformed*.

A diferencia de la mayoría de los genes del cluster Hox cuyo rol es el patronamiento anteroposterior, el ortólogo en insectos del gen *Hox 3* ha derivado y ha adquirido un rol en la especificación de tejidos extraembrionarios. Si bien no se sabe en qué momento ocurrió este cambio los datos existentes sugieren que habría ocurrido luego que los clados Hexapoda-Crustacea y Chelicerata-Myriapoda hubieran divergido (Falciani *et al* 1996).

zen codifica un factor de transcripción homeobox y es blanco de los gradientes de morfógenos tanto maternos como zigóticos dorsoventrales.

En *D. melanogaster* durante los estadios más tempranos del blastodermo el gradiente de la proteína Dorsal reprime la expresión de *zen* en la mitad ventral del embrión confinando su transcripción al dominio dorsal. Durante la gastrulación niveles altos de Dpp en la línea media dorsal activan la transcripción de *zen* en las células que darán origen a la amnioserosa, por lo que esta última está restringida a un dominio mínimo en la línea media dorsal.

Se han hallado homólogos de *zen* en *T. castaneum*, *S. gregaria* y *O. fasciatus* (Falciani *et al* 1996; Van der Zee *et al* 2005 y Panfilio *et al* 2006). En *T. castaneum* existen dos formas de Zen, 1 y 2. Zen 1 se encuentra implicado en la especificación temprana de la serosa de posición anterior y dorsal y en este caso estaría cumpliendo un rol de patronamiento anteroposterior. En *D. melanogaster* Zen 1 derivaría en *bicoid*, un gen materno que establece la polaridad anterior, mientras que Zen 2 mantiene su función extraembrionaria y corresponde a Zen. Algo similar ocurre en *S. gregaria*, estas diferencias con *D. melanogaster* tendrían que ver con el hecho que tanto *T. castaneum* como *S. gregaria* poseen desarrollo embrionario de tipo banda germinal corta. En hemípteros como es el caso de *O. fasciatus* el panorama es distinto ya que por medio de ensayos de ARNi se ha observado que en ausencia de *zen* las membranas extraembrionarias amnion y serosa se especifican normalmente pero falla la katatrepsis debido a que estas membranas no se contaren para tirar del embrión sumergido en el vitelo, son “inertes”.

Es decir, en *D. melanogaster* las membranas extraembrionarias constituyen un porcentaje mínimo del total del embrión, por ello la expresión de *zen* se encuentra tan acotada y su función fundamental sería la culminación del cierre dorsal. En los insectos de banda germinal corta o intermedia (*T. castaneum*, *S. gregaria*, *O. fasciatus*, entre los que se ha estudiado a expresión de este gen) las membranas extraembrionarias constituyen un gran porcentaje del embrión, tomando la expresión de este gen un rol mucho más importante.

La secuencia del gen se encuentra codificada en el supercontig 18033.98, cuyo tamaño es de 30591pb (Fig. 23). La comparación de la secuencia hallada para *R. prolixus* (275 aminoácidos) comparada con secuencias ortólogas muestra que fuera del homeodominio no hay homología significativa y tampoco se han encontrado otros dominios estructurales (Fig. 24).

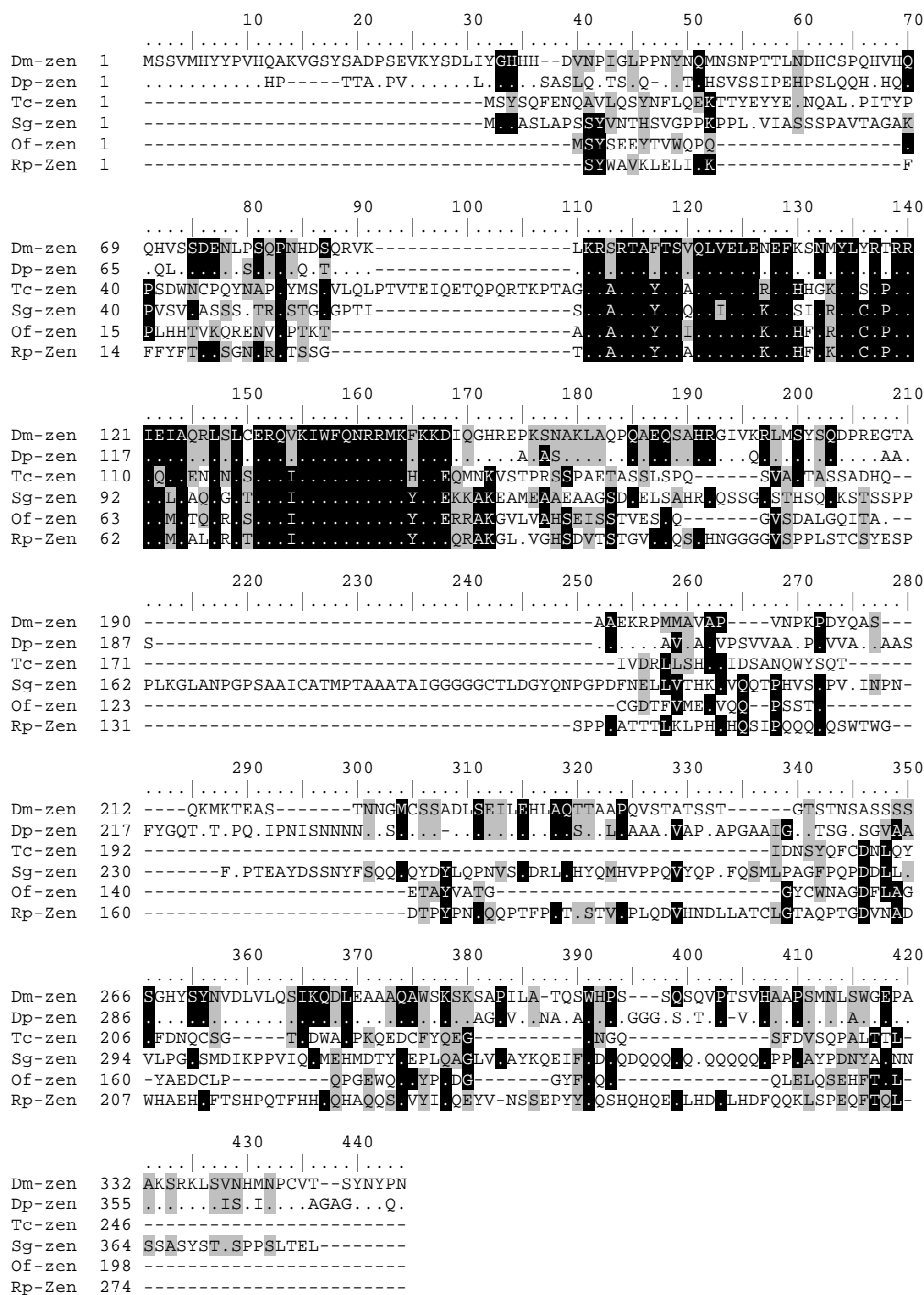


Fig. 24. Secuencia de *Rp-Zen* obtenida in silico y su comparación con ortólogos de otros insectos (en negro residuos conservados y en gris residuos similares). **Dm** *Drosophila melanogaster*, **Dp** *Drosophila pseudoscura*, **Tc** *Tribolium castaneum*, **Sg** *Schistocerca gregaria*, **Of** *Oncopeltus fasciatus* **Rp** *Rhodnius prolixus*

2.6. Zelda (Vielfaltig)

Zelda (*zld*) es un factor de transcripción del tipo zinc finger cuya función es regular la expresión génica temprana en el desarrollo del embrión.

Durante las primeras fases del desarrollo embrionario el mismo se encuentra controlado por los ARNm y proteínas aportadas por la madre y luego a partir de lo que se denomina “transición materno-zigótica” (MZT por sus siglas en inglés) se degradan los transcritos maternos y comienza la transcripción zigótica (Foe *et al*, 1983, Anderson *et al*, 1979, McKnight *et al*, 1976).

En *D. melanogaster*, durante el ciclo 8 comienzan a transcribirse zigóticamente genes que tienen que ver con la celularización y determinación del sexo y en el ciclo 14 el blastodermo celulariza y se inicia la transcripción zigótica.

Todos estos genes comparten una serie de motivos de DNA denominados TAGteam en sus regiones reguladoras sin las cuales se inhibe la activación temprana. Existen muchos factores de transcripción que se unen a estos TAGteam (De Renzis *et al*, 2007, Harrison, *et al*, 2010, Liang *et al*, 2008) pero la evidencia existente hasta el momento sugiere que *zld* es el más importante en la regulación de expresión de estos genes ya que su mutante negativo trae como consecuencia defectos en la mitosis y celularización en el ciclo 14. Por este motivo se lo ha denominado “factor de transcripción pionero”.

Se cree que la actividad de *zld* no solo regula directamente la transcripción de transcritos zigóticos, sino que además su unión al ADN está asociado al control de la accesibilidad y/o modificación de histonas, jugando un rol crucial en el manejo de la transición materno-zigótica reclutando o repeliendo proteínas remodeladoras de la cromatina, manteniendo estas zonas accesibles (Harrison *et al* 2011).

Estudios sobre embriones tempranos que carecían de la expresión de *zld* revelaron que el 70% de los genes que normalmente se activan en las primeras dos horas de desarrollo se encontraban inhibidos, fundamentalmente aquellos relacionados con la celularización, determinación sexual y el patronamiento dorsal (donde tiene un rol importante potenciando la actividad morfogénica de *dl*). También se observó que *zld* es necesario para la correcta expresión en el tiempo afectando genes tanto del eje dorsoventral como anteroposterior. Entre los dorsoventrales afecta el momento de

expresión de *snail*, *twist*, *short-gastrulation*, *brinker* y *rhomboid* y lo hace de acuerdo a una mayor o menor afinidad de los sitios blanco para *zld* (Chung-Yi Nien *et al*, 2011).

La secuencia del gen se encuentra codificada en el contig 18051.61, de 158320pb de longitud (Fig. 25).

Fuera de los estudios realizados en *D. melanogaster*, sólo se han encontrado secuencias ortólogas en *T. castaneum* y en la presente tesis en *R. prolixus*. En ninguna de estas secuencias se han encontrado otros motivos proteicos fuera de zinc fingers (Fig. 26).



1 TAACCCCTCCCCCAAATAAGTCATTAATAAACGCTGCTCTGCTGCCCTTCCGTGAATAAAAAAATATCAA
71 TATTGGCATGGTCCACTTTAATTTAAAAAATAAATGGTTAACACACTTTAAAAAATAAAGTCGA

.....

48931 ATATGTGAGTGATACACGCGTTCGAGGTGTACATTTTTTTTTTGGTAGTTTTTTTTTAGTTTTTGGTTTA
49001 TTTTCGTTATGCATTTTTTTGAAATACTAAAAACGCAAAACAAAAAATACTAGCACTAAAGTTCGCGGTGC
49071 CCCTTTTTAATTTTTTTTTTTTATTTTCCACAAGTCAAGAAATATTTGTTGTGTAAACAAGAAAAATTAATT
49141 AGTGCACAAGATTAAGAATGTAATGAATTATACTTTTATAAAATAGAAAATGAATTAAGTGTTTTGAT
49211 GAATTTGAACTTAGTTGATCTTAATTGCTTTAAGTTTGTAGTAAATACTATAATAAATAGAGAAATTAATT
49281 CGTGCTAATCAACT**ATGGAGCCAGTAAACTCCTGTACAGACTGTGGACTAGTGTTTGATTCGTCTAAAAG**
M E P V N S C T D C G L V F D S S K S
49351 TTTGGACGTACATTTGAGTTACCACAAGGAGAATCTGTTGAGCAAGTGGGGTAGTTCTGCGACCGGTGGT
L D V H L S Y H K E N L L S K W G S S A T G G
49421 GGTGCCGGCACGGGATCGGAGGCCAACAACAGTCAACGTGAAGAAAGAGAAAGTGCAGCCCGACAGTT
G A G T G S E A N N N V N V K K E K V Q P D S
49491 CAGATTTCTATTTGATTTCCAACAACAACAAGAGTATCGCCATCAACAGTTGCAGCACCAACACCAGCA
S D F L F D F Q Q Q Q E Y R H Q Q L Q H Q H Q Q
49561 GCAGCAACACCAACAACAACACCAGCAGCAGCAAAATGATTAGCCGAGGTTACAGGTTCCATCCTTATGGA
Q Q H Q Q Q H Q Q Q Q M I S R G Y R F H P Y G
49631 TACGAACGACAGGTTAGCTCTAGCCAGGTTAACTGTGAGAAATGTGGCCTCAGCATGGACGCCAGTCAAT
Y E R Q V S S S Q V N C E K C G L S M D A S Q
49701 TAGCCGAGCACAATGCTCAAATGCATCCGTGGGAAGAACCACAGGCAGAGATATTAGATTTAGACTCACA
L A E H N A Q M H P W E E P Q A E I L D L D S H
49771 TAAAGTGCATGTGTACCAACCCCTGAAGACTCCCCCTTGGAGATACTTCAAAGDAAAAATGGAAT
K V H V Y Q P P E E T P P W R Y F K E E N G N
49841 ACTAGTCCAGAGTTGGGTGGTGTAAACACGACTACAAACAGCGGGGGCGGCAACGATCTGTACAGCTATG
T S P E L G G V S T T T N S G G G N D L Y S Y
49911 AGCCGTCTCCACAGCAAAAAGTTCTGCCTAAAGCGGCCGCTGGAAGAGTAACGAAGCTAGACGGCCCAA
E P S P Q Q K F L P K A A A W K S N E A R R P K
49981 AACGTACAACCTGTTCCGCTTGTAAACAAGTGGTTTACGTCGTCCGGTCACCTGAAGCGTCATTACAATACA
T Y N C S A C N K W F T S S G H L K R H Y N T

50051 ACGCTGCACAAGAACGCGGTGAAACAGAGTGGCGGACTAGATCCAGCTTCAATGCCGGTAGCGTCACATC
T L H K N A V K Q S G G L D P A S M P V A S H
50121 ACCATCCGCCCCAGCAACCTCCTCAACAACAACAACAGCCACAACAGCAGCAGCAACATCAAGAGGAAAC
H H P P Q Q P P Q Q Q Q Q P Q Q Q Q Q H Q E E T
50191 TACGTCTCGACTACTACTTGGCACCAGCCCCAGTCGGTGGGTGGACCAAACCTCGGGCGGCCAGCAGTCT
T S S T T T W H Q P Q S V G G P N S G G Q Q S
50261 GCACCGGCCGCTCTGTACGCTCATCATCCGCCACCTGACGTGGCTCCGCCGCCGAGTGCATACTTTCTGT
A P A A L Y A H H P P P D V A P P P S A Y F L
50331 CCGGTACCATCACCAAAATGGGAGCCCCCGCGGTATGTTACCGAGTTTCTCCAGTTGACGGGAGT
S G Y H H P N G E P P R R M L P S F S Q L T G V
50401 CTCGTACGATCGGGACATGGCGGGGGGCTGGAAGATCACCGGGAAGCCGCTTGGAGATGCATACCAG
S Y D R D M A G G L E D H R E A V L E M H H Q
50471 GTTCAGCCTCCTCTTACGCCGAGCAACAGGACCTCACCTCCATCTCCAAACATCTTCTCTCCACTCAGG
V Q P P L Q P Q Q Q D L T S I S K H L L S T Q
50541 TAAGTTATATTTAACTAATATATAAAGAACAATAGGTAGTCAATTTACAGATAACCTCTTGAGGCCATT
50611 AATCTCAGATCAACCAACGAAACAAAATTAATCGAATAATTCACGATGAGACAATCAAGCATCTAAAGT

.....

52571 TAATGCACTGAAGTGCATAAATCTACTTTCTCAATACCATAAACAAGTAAAAATGCTCAGTTTCATCAAG
52641 TGCTACTCTATCATCCAAGTCTGAAGACAAAATCTCGAAACTATCCAGACCAGCCTGATGAATCGATCTC
52711 TGAAGGTTAAAGAAAAATAAGCCGGATATAAGCGTATATTTAAATGGATTAATATTTGTACACAGGAAGTT
52781 GCTAATATCCTGGCGTGACAACTAAATAGCCTTCATGTTATGCCAAAATTTTCAGACTAGAAGAAAAAAT
52851 ATCCTTTTAGCTTAGCAAAATTAATAAATGTTATTATTAATAATTTTGAAAAAAGAAGACAATTTGTA
52921 TTTAATATTTTGCAGCTCATGCCTGTTTACTTGCACCCGCCCGGTTAGTAACCTGCACAGATACCCCTC
L M P V Y L H P P P V V T C T D T L

52991 TTGTTGGCAATGAAAACAGCACACCGCCTCCTGTATTTGCAATCAGAACAATACCTCATCACCACCAAC
L V G N E N S T P P P V F R N Q N N T S S P P T
53061 CTACTCTCCTGCTTATGATCCTGCGACGGCGGTACGTTTATTTAATTTTCTTATATTTAAAATCTTATGG
Y S P A Y D P A T A
53131 TTAACACTTACTTGTGTTATTGTGTTGTGCAATAGCTGTATAAATTGTGGCAAACAATGCTAAAATACAGT
53201 TTATGCCACTAGTTTTTAATTTTTGTTC CAATATAGCGGTGACTCGCGCTTGTGCCAAACTACATGGAAA
.....
55231 CCAGTTGCCTCAAGACTGCCTTGTACCTCTTGTCTTCTTTTCGCCGCAAGTTTTCTTTAGGCATTATT
55301 TATTTTTATTTTGTTTAATTTAATTTTTGTTTATTTATTTTTTATTTTTTGAATTTTTTGATTGACATTT
55371 GTAAAACTTGGATTTTGCAGGTAGTGAGTTCCTCAAGAAGAGGCGACACAAGTACATAAGTGTATAG
V V S S T Q E E A T Q V H K C I
55441 ACTGCGACAAGACGTTTAATAAAGCCTGCTATTTGACCCAGCACATAAATCCTTCCATGCGGGTGACAA
D C D K T F N K A C Y L T Q H N K S F H A G D K
55511 ACCTTACAAGTGTAATCGGTGTGGCAAACGTTTTTACCCAGGAATATCTACATTTGGAACATCTATCCAAA
P Y K C N R C G K R F T Q E Y L H L E H L S K
55581 CATGCCGGTGAAAAACCGCATAAATGCGAAATATGTCCAAAAACAGTTTAATCATAAAACTGATTTAAGAA
H A G E K P H K C E I C P K Q F N H K T D L R
55651 GGCATATGTGTTTACATTTCCGGTGATAAACCTTATGCATGCCATTTTTGTGGCAAAGGTTTCATACGAAA
R H M C L H S G D K P Y A C H F C G K G F I R K
55721 AGATCATATGTTAAAACATTCTGAAACGCATAGGAAGAAACAGAAATGCTAACCATAAAGAAAGATGATTTT
D H M L K H S E T H R K K Q N A N H K K D D F
55791 CTAAGATCAATGGTAGTGCAACAGGTGATGCAATAGTGCGATAAAATTCGAAATAATATCATTTGATGCAT
L R S M V V Q Q
55861 TATTTTAAACTGCCAAAGACGTGCCATTTGGACAGACGAACAACACTACTCGTTAAGTTTAAGTATAAAAA
.....
56631 TTCACGTATTTTGTCTCTAGCATGTTATTCAATTTCTTCAGGTCTAGGGACTGGATACGTAGCTCTATC
56701 CCTAAGTGGCGCGTTATGTGCACACTTACACTGCCCAAAGCTGAAAGCTGTTTCAATTAATTTAGGATGATT
56771 CCAAGAACATAACCAGCCCAAGGATTGCTAAGATCTTGAAGACAAAATGCCAAAGTGCAAAATAACGGATTC
56841 AGATCTTCTAACGTCTAATGTGGAACGGACAAAATCTCTACCCCTTTTCTCATCCCTTGCCTTTCTATAAA
56911 TGTTTCCCGACTATCTGTCAATTTGGAGGCAGATCTTCTGAGCAAAAAATGCCTTCTTGTCTGTTTATG
A D L L S K K C L L V L F M
56981 CTCATTCCAGTCATCGTTTTTCGATGTTGTAGTTCCAAAACCCCTTCATTCTAATCCAAACGGGTCTCTCTT
L I P V I V F D V V V P K P F I L I Q T G L S
57051 CACCTTCTGAAGTGAAGCCGCATAGTAACCCACGCTCTAATTACTTGGGTTCTCCACTTATCTCTTAGA
S P S E V E A A *
57121 CAAGAGCCCTGTACGCAGTGCTTTAAAGAAAACGTGCCATTTACAGCAACAGCCGCTTTTATTTTTAACAA
57191 CACTTTTCGCAATGCTATGAAATTCAGTATAAACTTTATAAAA **AAATAAAAA**TAGAATTAAGGTGATGAA
57261 TTAAACTTTTAAAGAATTTATTGCATCATTTTCTCTAATCTCCATAACTACAACAAAAAATGACAAGT
.....
157991 AGGCTCCTGTTCTTACCCACTAGGGGTTATCCTCCTCTCCATCCATGTCTCTTCTTTAAGGGTTAGAA
158061 CTGCCCTTGTAACATCGCCACAGCATTCCACTGCGCCCTGCCAGAGAGCATTATGCTTTGAAAGCGCTC
158131 AGGAACCCATTGACCCACTCTTTCTTCCAGATCTCTTCTGATACGACCCCATCTTTTCGCACTCAAAGAAT
158201 GTGTGATGGGCGTCGTCTTATTCTTGAACAGTGGGGGCAATTTCCACCGACCGCTTCCCTATCTTCC
158271 GGAGAAACTCCCGAAGTAACCATGGCCACTGAGGAGCTGGGTGAGGTGA

Fig. 25. La línea de puntos indica la abreviación del intrón, sombreado (azul en el esquema) se indican los dominios de tipo zinc finger, en negrita el posible TATA y en rojo la cola de poli-A. Las puntas de flecha en el esquema indica la posición aproximada de los intrones y tamaño.

```

      10      20      30      40      50      60      70
DM A ZLD  1  MTSIKTEMPPLHAAEAATASSSATDSSGGGGAGGGGGGGGGGSGGEPGAGGTGGVGSAPATPNATISAADSS
Tc ZLD    1  -----M...NSGVQHYQPQLNTPHCKEC...LYLNSAESLQVHLQYHKENLLNKWATQ
Rp ZLD    1  -----MEPVNS-----CTDC...LVFDSKSLVHLSYHKENLLSKWG...

      80      90      100     110     120     130     140
DM A ZLD  71  DNQPGTPTPTQQQQSTQQQLQQLPQSQQQQQAMGGGDPQQQQQQQVITGITHQPYATHHMYASGGQQQQ
Tc ZLD   55  AATSHSEETNNNNPKAIKREFI...NNTIAAADSSDSMNKKSPDYSRTPPETIFGHPP...POS.QSASSPY...N
Rp ZLD   39  ATGG...AGTG-----SE...NNNVNVKKEKV...PDSSDFLFDQFQQQ...QE...RHQQL...H...H

      150     160     170     180     190     200     210
DM A ZLD  141  QQQIYGGLYGDMQQQGYASSYINSYEQFYQQQQQQQGGTDYAFGTGVVDYKKSAGVRYHPYLQPTPTSG
Tc ZLD  125  HDNSAFSPNFQNF...L...K...ERT...PNYPNNYPNFAES...FFPMDN...NQOYSQEFIH...APSY...Q...
Rp ZLD   88  ...-----Q...HQHQHQQQQMI...R...Y...F...G-----

      220     230     240     250     260     270     280
DM A ZLD  211  LGGIPTASSAQEEAGSAPSAVSTTTAVAMSPRVVSSSPTSTSSHLQLGSSSGQTTPGSPGGAAGSAGCKL
Tc ZLD  189  -----YD...SQ...NAQVS...S...PAYPPQPTSPS...K-----
Rp ZLD  112  -----YE...Q...QVN-----

      290     300     310     320     330     340     350
DM A ZLD  281  QCKKCGLLTTNESELOEHIANVHGESP...YSSSYASSPYIKEEMPTPQP...G...VGSATANPCEL...LDLDSQK...M...V
Tc ZLD  218  ...D...YVCD...S...A...Q...I...Q...N...L...A...P...P...T...A...Y...H...P...N...H...F...L...-----F...N...D...H...Q...I...K...I...E...D...A...Q...S...I...I...I...I...H...V...H
Rp ZLD  123  ...E...L...S...M...D...A...Q...A...N...Q...M...P...-----W...E...E...P...Q...A...I...I...I...I...H...V...H

      360     370     380     390     400     410     420
DM A ZLD  351  YHQQLLQQQQQHDVAVGLPLGALPDPPLHSMQSMOORALHSWEQPQQQTVASVEGLPPYMQQGLGVGLGV
Tc ZLD  281  QVYPEDEK...R...NGDMNGPNPHSVTALLNTW...PPQQ...QOKMYQQ...Q-----
Rp ZLD  163  VY...P...P...E...-----T...P...P...R...Y...F...K...E...-----

      430     440     450     460     470     480     490
DM A ZLD  421  GVDKSPYVSPKQSPYHQSTGVGATLIKQEQYCGHGLIKSEYPDSQHYVDKSFDP...TAGGAGGAELCASVAT
Tc ZLD  326  -----MNGPQVM...NQEFM...N...V...T...T...S...P...O...D...Q...Y...R...P...F...H...L...P...A...P...S...A...P...I...T...S...T...Q...V...-----
Rp ZLD  178  -----E...N...G...N...T...P...E...L...V...S...T...T...N...S...G...N...D...Y...S...Y...P...S...P...Q...-----

      500     510     520     530     540     550     560
DM A ZLD  491  SPAEFPSTTTGGPGQEGAAGAAPGGGYRGFEPSPSSSVLPANSLTAKAATWKSNEARRPKTYNCTACNKW
Tc ZLD  375  -----PTNPPQT...V...P...V...T...S...N...-----
Rp ZLD  211  -----K...F...L...P...A...-----S...-----

      570     580     590     600     610     620     630
DM A ZLD  561  FTSSGHLKRHYNTTLHKNAVKS...SGQPDPA...T...L...P...I...S...A...H...H...P...A...R...D...P...V...T...K...P...S...R...R...G...N...A...A...A...A...A...A...A...A...S...A...S...G...G
Tc ZLD  413  -----S...M...-----S...A...S...-----
Rp ZLD  240  -----Q...G...L...S...M...V...A...S...P...Q...P...Q...-----

      640     650     660     670     680     690     700
DM A ZLD  631  QQQQPPIPPPANVPPPEPPRSPPDYGGGGGLGVGAMGGAAMSQYSASPSPTQQQHHLNNHQQQANGYA
Tc ZLD  457  -----
Rp ZLD  284  -----

      710     720     730     740     750     760     770
DM A ZLD  701  NGTANGYGYMQQVQSTTNASPHASNNNSNNQQQQQ...QQQQH...H...Q...Q...M...P...Q...H...N...S...V...L...N...G...H...P...N...G...L...A...G...P...S...A...P...H...N
Tc ZLD  457  -----N...K...E...D...A...N...N...S...P...G...E...D...T...N...S...M...P...M...P...A...P...Y...D...R...P...E...P...T...S...I...L
Rp ZLD  284  -----P...Q...E...E...T...S...S...T...T...W...H...Q...P...Q...S...V...G...P...N...S...G

      780     790     800     810     820     830     840
DM A ZLD  771  NNNTQMPSSQMRGLLNETTTTTPPTTTTTRAPQITTTTATTTTAAATTVAIKSEQMEDSNHTHTHTHTHPNH
Tc ZLD  496  D...S...H...G...F...N...M...G...P...H...M...M...E...L...-----D...S...P...Q...M...Y...G...G
Rp ZLD  319  G...-----Q...S...A...P...A...A...Y...A...H...P...D...V...A...P...-----P...S...A...M...F...L...S...G...Y...H...

      850     860     870     880     890     900     910
DM A ZLD  771  -----
Tc ZLD  496  -----
Rp ZLD  319  -----

```


CAPÍTULO 3.

Análisis funcional de los genes dorsoventrales.

3.1. Dorsal

3.1.1. Hibridación *in situ*

El propósito de este experimento es conocer el patrón de expresión del gen *dorsal* en embriones de *R. prolixus*. La síntesis de las sondas *sense* y *antisense* de ARN se realizó a partir de productos de PCR que incorporaban el promotor de T7 en el extremo 3'. Las sondas para ARN se sintetizaron utilizando el kit de Roche (ver materiales y métodos).

A partir de estudios anteriores tanto en *D. melanogaster* (Steward, 1987) y en *T. castaneum* (Chen *et al* 2000) se sabe que *dorsal* es suministrado al oocito por la madre y se expresa tempranamente en el desarrollo embrionario antes de la formación del blastodermo de forma regular en toda la circunferencia del embrión y luego su expresión decae considerablemente.

Luego de la fertilización la proteína se acumula en los núcleos en el lado ventral del embrión formando un gradiente dorsoventral. En *T. castaneum*, a diferencia de *D. melanogaster*, se acumula en la serosa y no hay rastros de la proteína en el rudimento germinal y tampoco se observa marcación de la proteína en estadios posteriores del desarrollo embrionario como tampoco en la zona de crecimiento donde junto con la formación de segmentos el patrón dorsoventral aún continúa desarrollándose (Chen *et al*, 2000).

Por esta razón se decidió realizar las hibridaciones *in situ* en todos los estadios embrionarios pero haciendo hincapié en huevos que no superaran las 30 hpo momento en que ocurre la gastrulación y según lo observado en otros insectos momento en que la detección de *dorsal* no es posible.

En *R. prolixus* se ha observado que inicialmente, cuando hay unos pocos núcleos en el oocito, el ARNm materno de *dorsal* se acumula formando cúmulos en toda la periferia

del huevo (Fig.27 A y C). Posteriormente, cuando aumenta el número de núcleos y éstos migran a la periferia, este ARN se liberaría al citoplasma que rodea los núcleos, intercalándose entre las células de vitelo (Fig.27 B y E).

El transcripto se detecta en la periferia alrededor de los núcleos y no en el vitelo indicando que el mensajero se encuentra en el citoplasma. Este es un fenómeno aparentemente común para genes maternos ya que el mismo se ha observado también para *giant* (Lavore *et al*, 2012) y *caudal* (N. Esponda-Beherens, resultados no publicados)

No se ha observado la formación de ningún tipo de gradiente. Esto es esperable, dado que el gradiente tanto en *D. melanogaster* como en *T. castaneum* es formado por el ingreso de la proteína al núcleo es de esperar que este no se observe con sondas de ARN. Para ello sería necesaria la realización de una inmunohistoquímica sobre la proteína Dorsal. Al momento no se cuenta con un anticuerpo adecuado ni ha sido posible desarrollar aún un protocolo de inmunohistoquímica reproducible (esta tesis; N. Esponda; A. Lavore; R. Nunes da Fonseca, comunicación personal)

Tampoco se observó marcación en estadios posteriores del desarrollo embrionario donde se esperaba observar algún tipo de expresión de *dorsal* durante la elongación de la banda germinal, en la zona de crecimiento, donde la asimetría dorso-ventral continúa estableciéndose. El mismo fenómeno se ha observado en *T. castaneum* que posee el mismo mecanismo de desarrollo que *R. prolixus*, quedando pendiente de qué manera se establece la asimetría dorsoventral en los segmentos en formación. Puede hipotetizarse que es un fenómeno de memoria molecular establecido tempranamente.

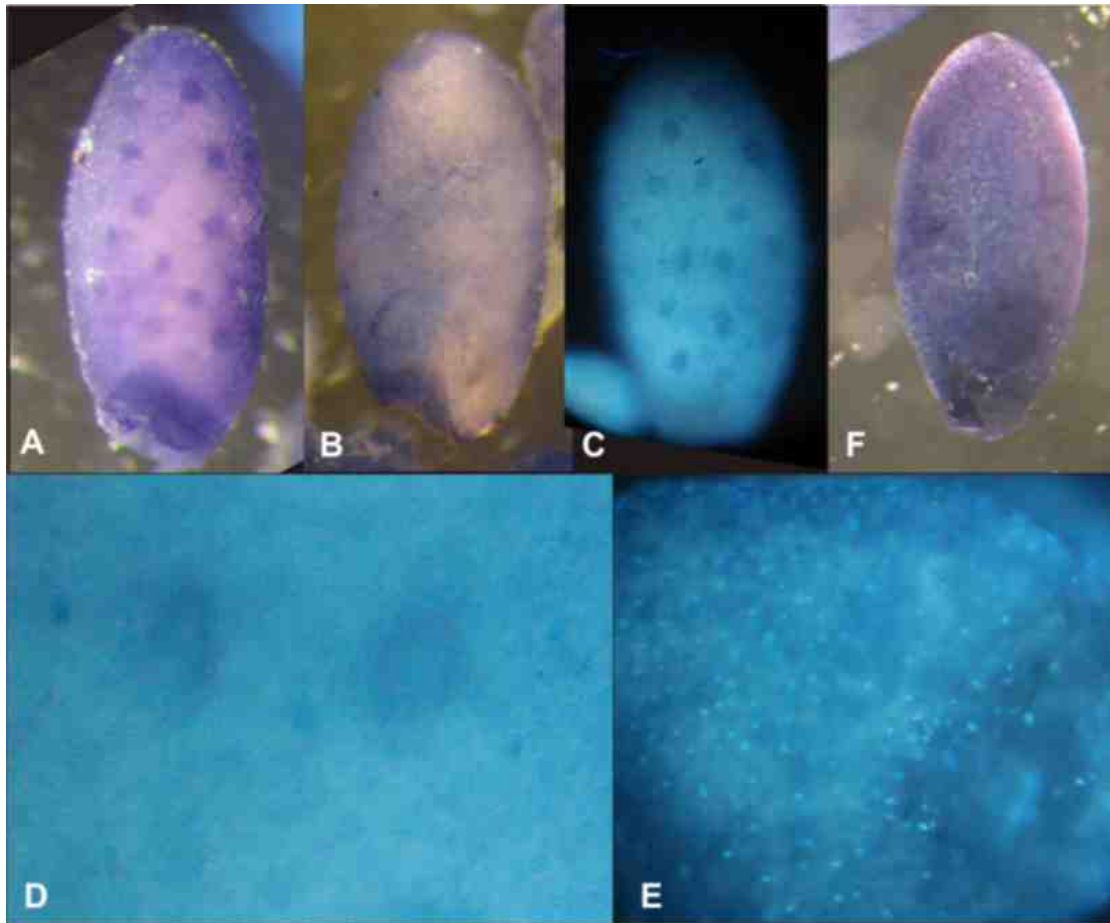


Fig.27. **(A)** y **(C)** el transcripto materno de dorsal se almacena en el oocito en forma de cúmulos cuando aún no se observan núcleos en superficie. **(B)** y **(E)** cuando los núcleos alcanzan la periferia el transcripto se libera y rodea los núcleos. **(E)** es una magnificación de B teñido con DAPI además de la sonda donde se observa la distribución del mensajero alrededor de los núcleos y entre los cúmulos de vitelo y **(D)** es una magnificación de C donde se observan los cúmulos de mensajero teñidos con la sonda y no se observan núcleos en superficie. **(F)** Control con sonda *sense* para el mensajero de *dorsal*. **C, D** y **E** son tinciones dobles con sondas con digoxigenina para ARN y DAPI para marcar los núcleos.

3.1.2. ARNi Parental

A partir de la técnica de RNAi parental hemos estudiado el efecto de la pérdida de función de *dorsal* en embriones de *R. prolixus*.

Para ello se inyectaron hembras adultas vírgenes usando como blanco del ARNdc los ARNm tanto de los ovarios como embrionarios. Estas hembras produjeron huevos de forma regular capaces de soportar el desarrollo embrionario. Sin embargo en la mayoría de los casos esta prueba resultó en un desarrollo embrionario anormal, mostrando severos defectos en el patronamiento. Salvo algunas excepciones en la mayoría de los individuos fue imposible reconocer algún tipo de estructura embrionaria. Aun así, se identificaron cuatro fenotipos distintos que serían efecto de los distintos grados de penetrancia.

De los 123 huevos disectados sólo el 3% lograron completar su desarrollo normalmente dando ninfas 1 completamente normales, el 45% formó masas de células pigmentadas (Fig.28 A), el 27% mostró formas similares a las observadas en los mutantes nulos para *dorsal* de *D. melanogaster* (Fig.28 B), pudiendo tratarse de embriones completamente dorsalizados aunque a diferencia de *D. melanogaster* no hay estructuras cuticulares que permitan inferir una dorsalización; en el 18% de los huevos el desarrollo se detuvo tempranamente y no se observó la presencia de tejidos embrionarios. Sólo en un 7% de las muestras analizadas la cabeza se habría diferenciado parcialmente, mostrando la presencia de ocelos y apéndices indiferenciados (Fig. 28 C), sugiriendo que la cabeza podría poseer un patrón de formación en parte independiente de la formación del eje D-V (tabla 2)

La pérdida de función de *dorsal* se ha estudiado únicamente en dos especies de holometábolos *D. melanogaster* (Govind y Steward, 1991) y *T. castaneum* (Nunes da Fonseca et al 2008).

puesta	n de huevos	anembrionados	células pigmentadas	cabeza/apéndices	cilíndrico	wt	deshidratados
1	3	3					
2	3			1	1	1	
3	9	1	2		3	3	
4	13	2	4	3	4		2
5	22	8	9	2	3		
6	73	8	40	3	22		
total	123	22	55	9	33	4	2

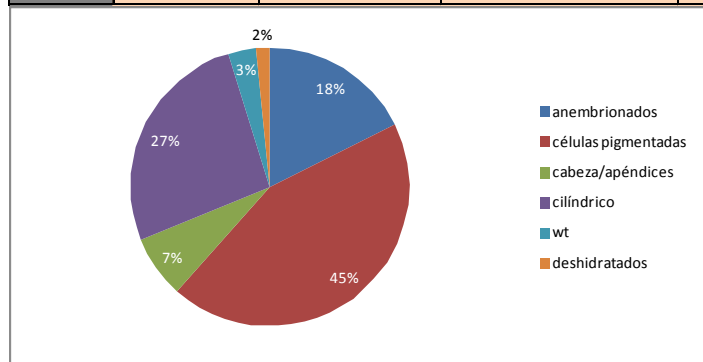


Tabla 2. Puestas y fenotipos encontrados en número de individuos, a la izquierda los porcentajes de individuos que portaban cada fenotipo

En *D. melanogaster* provoca la dorsalización del embrión, en donde todas las células embrionarias siguen una vía de desarrollo dorsal, por lo que el embrión carece de todos los elementos de patrón lateral y ventral, mientras que en *T. castaneum* lleva a embriones que carecen de todo tipo de signos de polaridad dorsoventral, en los que se infiere la dorsalización a partir de la expresión superpuesta de genes específicos de las regiones ventral (mesodermo) y ventrolateral (neuroectodermo) que quedan reducidas o desaparecen, sugiriendo la pérdida de los destinos ventral y ventrolateral en el embrión como consecuencia de la desaparición de *dorsal*. En *R. prolixus* el embrión carece de estructuras cuticulares que nos permitan diferenciar las zonas ventral y dorsal como notáramos previamente y la falta de sondas de genes específicos de la zona ventral hizo que no fuera posible determinar una dorsalización. Además por el tipo de desarrollo embrionario de *R. prolixus* y al actuar tan tempranamente la interferencia el desarrollo se vio interrumpido antes de la formación de cualquier estructura en la mayoría de los casos teniendo un posible efecto durante la gastrulación temprana y la formación de la banda germinal (Fig. 10 I-N), de allí la formación de las masas de células pigmentadas aparentemente no diferenciadas

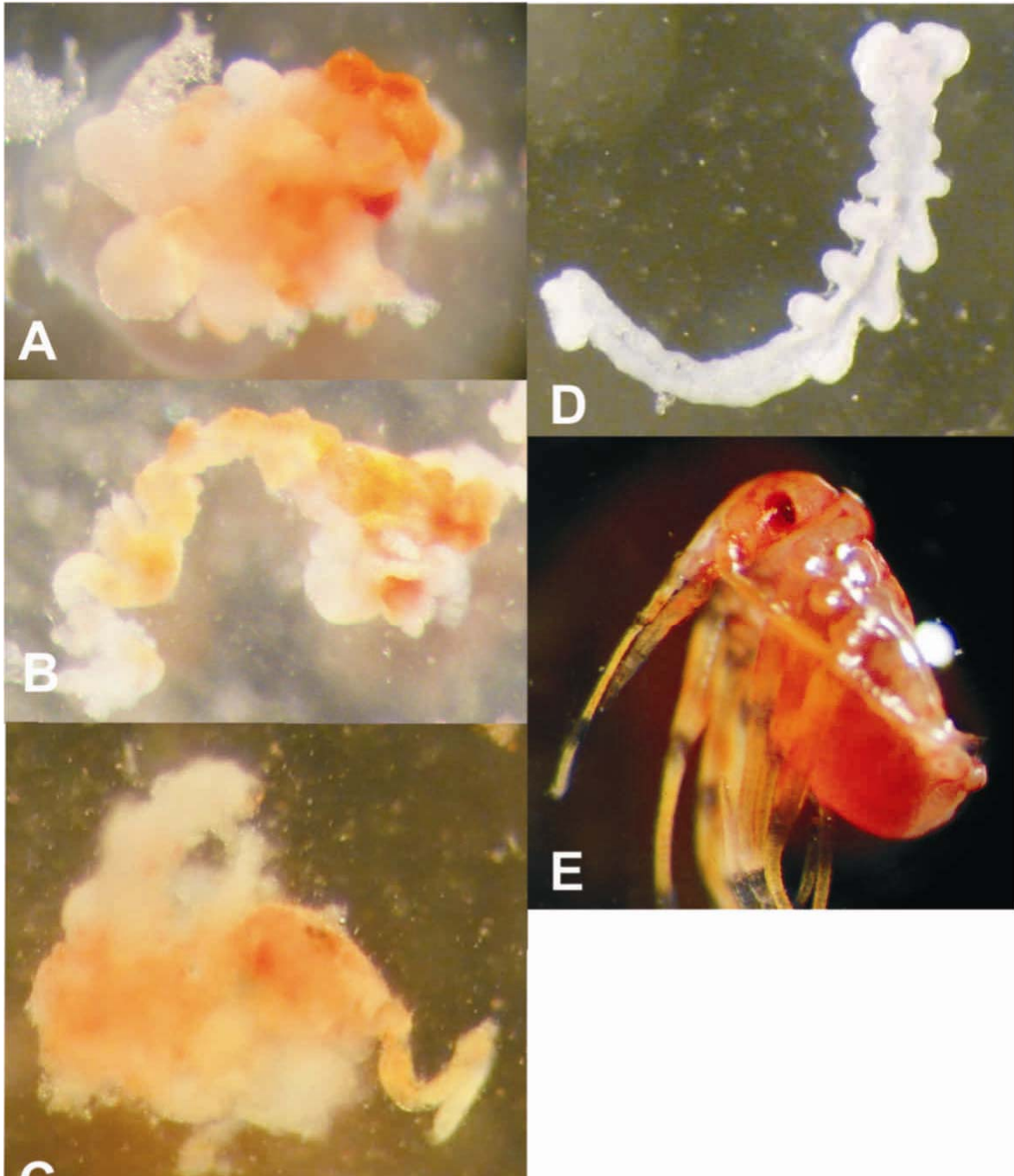


Fig. 28 (A) Masa de células pigmentadas. **(B)** Cilíndrico (recuerda al fenotipo nulo de dorsal en *D melanogaster*). **(C)** Cabeza/Apéndices. **(D)** y **(E)** fenotipos salvajes BG extendida y N1 próxima a eclosionar

3.2. Toll

3.2.1. Hibridación in situ

Hasta el momento la expresión del transcripto de *toll* se ha estudiado en *D. melanogaster*, *Clogmia albipunctata* (Diptera) y *T. castaneum* (Maxton-Kuchenmeister *et al* 1999), en los dos primeros por tratarse de dípteros y poseer un tipo de desarrollo de tipo de banda germinal larga, la expresión es muy similar entre ellos, sin embargo *T. castaneum* posee desarrollo embrionario de banda germinal corta, al igual que *R. prolixus*.

Se ha observado que en *R. prolixus* el transcripto de *toll* es de origen materno al menos en un principio, al igual que ocurre en dípteros (*C. albipunctata* y *D. melanogaster*) y en coleópteros (*T. castaneum*).

Esta afirmación se deriva de la marcación de las sondas para ARN en ovariolas durante la oogénesis temprana, donde el transcripto de *toll* se acumula en el trofario y en el extremo anterior del oocito en formación (Fig. 29).

Una vez fecundado el oocito, el transcripto materno se almacena de la misma forma que se ha observado para *dorsal*, formando cúmulos en la superficie, previo a la migración de los núcleos a la periferia (Fig. 30 A).

Avanzando en el desarrollo el mensajero muestra una distribución ubicua en el citoplasma rodeando los núcleos para luego desaparecer completamente (Fig. 32 B).

En *D. melanogaster* Toll es una proteína integral de membrana y se ha observado que su mensajero (de origen materno) se encuentra asociado a ribosomas unidos a membrana, de allí que ni el mensajero ni la proteína difunden, este hecho es importante en el establecimiento y mantenimiento de la asimetría espacial en el embrión (Hashimoto *et al* 1991).

El producto materno de *toll* es activado en un patrón dorsoventral en el blastodermo sincicial luego de la fertilización (Hashimoto *et al*, 1988) (Anderson y Nüsellein-Volhard, 1985) la asimetría dorsoventral se establece a partir de la interacción del ligando Spätzle que se encuentra en el espacio perivitelino

desencadenando una cadena de reacción que llevará a la inclusión de Dorsal en el núcleo con niveles máximos en la zona ventral (Gay y Keith,1991).

En contraste, en *T. castaneum* el transcripto de *toll* se observa en niveles apenas detectables durante la oogénesis temprana y luego desaparece completamente de manera similar a lo descrito aquí para *R. prolixus*, pero en el estadio de blastodermo temprano se acumula en un patrón restringido formando un gradiente dorsoventral, sugiriendo que a la expresión materna casi indetectable se agrega una expresión zigótica, dando como resultado una forma distinta de establecimiento del patrón dorsoventral posiblemente por sobreexpresión del receptor por el ligando de *toll* estableciendo un feedback-loop positivo y una inhibición lateral (Maxton-Kuchenmeister *et al* 1999). La expresión zigótica no se ha detectado en *R. prolixus* al menos con el método usado, por lo tanto no se pudo determinar si existe tal expresión y al igual que *dorsal*, no se ha observado expresión de *toll* en la zona de crecimiento, donde, como dijimos antes, la asimetría D-V se sigue estableciendo mediante mecanismos desconocidos hasta el momento.

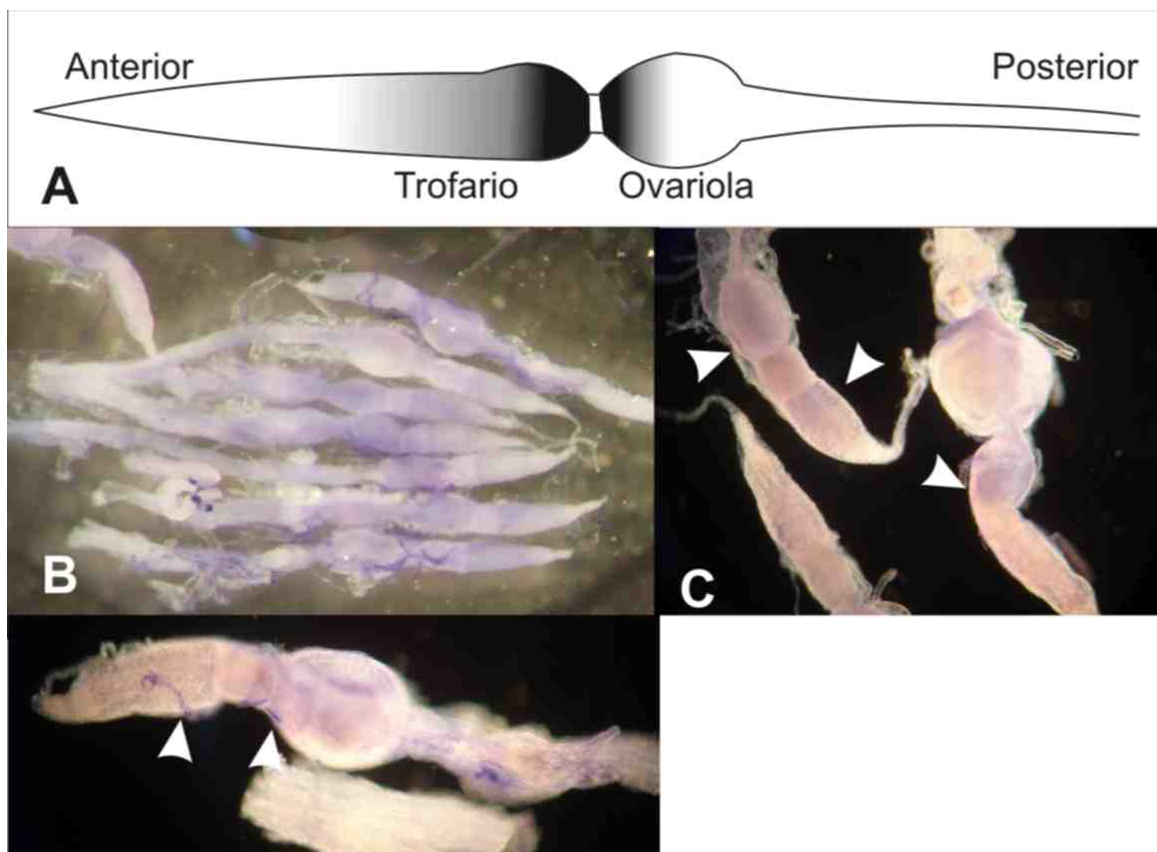


Fig 29. (A) Esquema de una ovariola mostrando el patrón de expresión de *toll*. **(B)** Hibridación in situ de ovariolas de hembras en estado reproductivo. **(C)** y **(D)** Detalle de las ovariolas, las cabezas de flecha muestran la acumulación de tinción en la zona del trofario y región anterior del oocito en formación

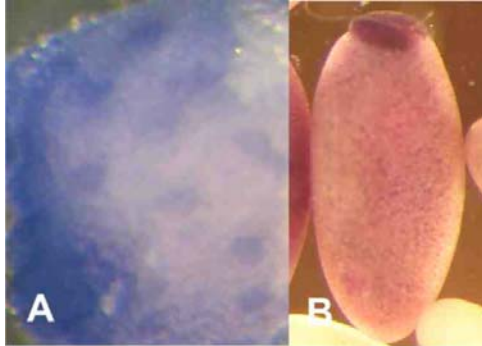


Fig. 30 Tinción con sonda de ARN con digoxigenina, al igual que en dorsal primero se almacena en cúmulos **(A)** y luego se libera al citoplasma rodeando los núcleos **(B)**

3.2.2. RNAi Parental

Con el fin de comprobar cuál es el rol de *toll* durante el desarrollo embrionario se desarrollaron sondas doble cadena de ARN, utilizando la técnica de ARNi

Para tal fin se inyectaron 12 hembras vírgenes con 0,5 μg ; 0,3 μg ; 0,2 μg de ARNdc en tres experimentos independientes. Luego de ser inyectados los insectos fueron alimentados para inducir la oogénesis.

La inyección de 0.5 μg resultó en la mortandad del 100% de los adultos. Dado que *toll* es un integrante crucial en la cascada de señalización que lleva a la respuesta inmune innata este resultado no fue inesperado (Medzhitov, 2001; Hoffman y Reichhart, 1997; Lemaitre *et al*, 1996), por lo que se optó por inyectar una menor concentración de ARNdc y dejar en recipientes estériles a la hembras inyectadas durante dos días para luego ser alimentadas induciendo la oogénesis. Dado el foco de esta tesis en el eje D-V no se profundizó en este aspecto de la función de toll.

Las menores concentraciones de ARNdc resultaron en fenocopias con distinto grado de penetrancia.

Se analizaron 19 puestas con un total de 332 huevos analizados de los cuales el 16% resultó en huevos más cortos de lo normal, al realizar la disección de estos huevos se observó que el desarrollo embrionario había comenzado parcialmente llegando en algunos casos a formar bandas germinales, ninguno de estos huevos llegó a eclosionar (Fig. 31 C), el resto de los huevos mostraron una morfología normal, sin embargo sólo el

1% eclosionó. Los embriones contenidos en estos huevos de morfología normal si mostraron distintos grados de malformación, en general en estadios tempranos del desarrollo donde directamente no se formó el embrión o se formaron masas de células pigmentadas sin estructuras reconocibles (Fig.31 B). Sólo un 23% de los huevos disectados alcanzó un estadio de desarrollo avanzado, pero en todos ellos se observó un patrón de segmentación deficiente tanto en el tórax como en el abdomen, y los apéndices bucales también presentaron malformaciones (Fig.31 A).

En la tabla a continuación se detalla el número de individuos que presentaron los diferentes fenotipos en cada puesta (Tabla 3)

puesta	n de huevos	anembrionados	células pigmentadas	avanzados	cortos	wt	deshidratados
1	33		23	7	13	1	2
2	15		2	13			
3	20		6	14	3		
4	12			12			
5	12		5	7	2		
6	20	12	3	5			
7	10	10					
8	6	6					
9	6		6		2		
10	2		1				
11	7		3	1			
12	2	2		4			
13	7	1	5			1	
14	16	3	12			1	
15	17	4	13				
16	19	10	6	3			
17	5	1	4				
18	69	10	55	4	14		
19	54	8	40	6	20		
total	332	67	184	76	54	3	2

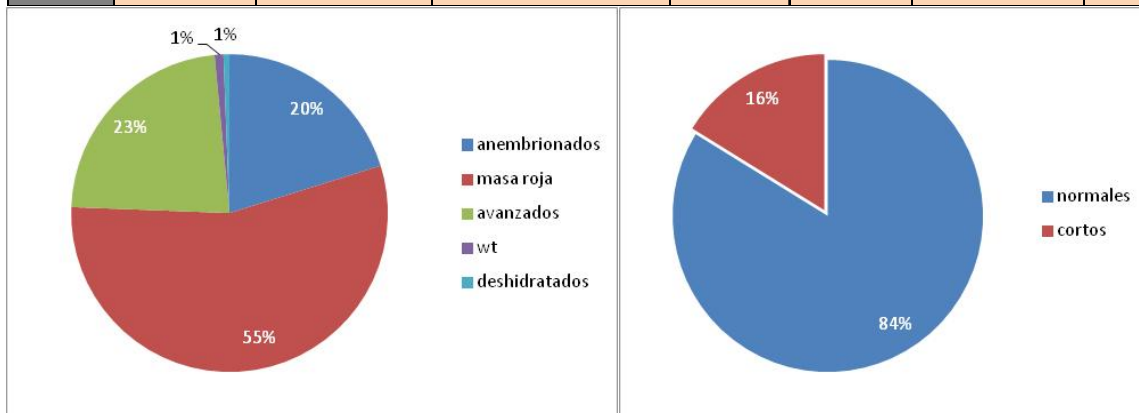


Tabla 3. Puestas y fenotipos encontrados en número de individuos, abajo a la izquierda los porcentajes de individuos que portaban cada fenotipo. Abajo a la derecha porcentaje sobre el total de huevos analizados de huevos más cortos.

En otros insectos la pérdida de función de *toll* lleva a la dorsalización del embrión como en *D. melanogaster* o *C. albipunctata* e inclusive en *T. castaneum*, aunque en este último el fenotipo de dorsalización fue muy suave tal vez debido a una baja penetrancia del fenotipo (Maxton-Kuchenmeister *et al*, 1999; Nunes da Fonseca *et al* 2008; Schneider *et al*, 1991).

En *R. prolixus* a partir de lo observado en los fenotipos se evidencia que la función de *toll* es muy temprana en el desarrollo de allí la ausencia de estructuras embrionarias en la mayoría de los huevos interferidos.

No es extraña la alteración del patrón de segmentación ya que disponemos de evidencia de la existencia de un diálogo cruzado entre los ejes A-P y D-V inclusive en vertebrados (De Robertis, 2008). En *D. melanogaster* se ha observado que los mutantes para genes maternos que establecen el eje D-V, entre ellos *toll* generan cambios posicionales en la expresión anteroposterior de genes, evidenciando que los componentes regulatorios del sistema anteroposterior se encuentran normalmente organizados bajo la acción del sistema de polaridad dorsoventral (Carrol *et. al.*, 1987). Efectos similares se han descrito en *T. castaneum* (Linch y Roth, 2011; Kotkamp *et al*, 2010) y en *A. melífera* (Wilson y Dearden, 2011). La aparición de huevos más cortos probablemente tenga que ver con alguna interacción de este tipo, sin embargo este fenotipo recuerda al fenotipo producto de la deslocalización del mensajero *gürken* en *D. melanogaster* provocando una reorientación del eje D-V orientando la vía Toll-dorsal en el embrión temprano, particularmente por la alteración de la morfología del huevo afectando el corion el cual es formado por las células foliculares.

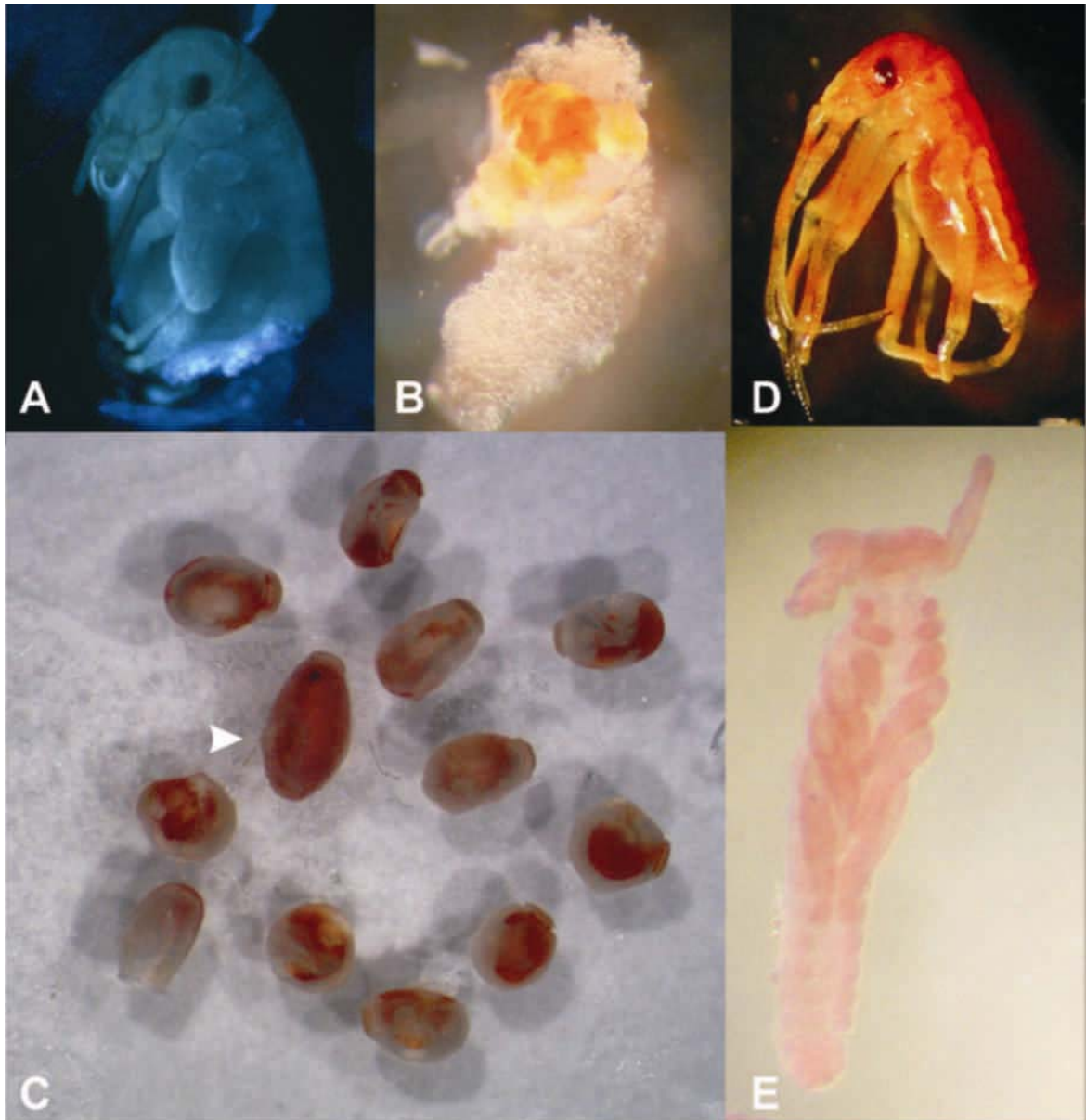


Fig. 31. (A) Embrión producto de la interferencia para el transcripto de *toll*, nótese la malformación de apéndices tanto cefálicos como torácicos y la alteración del patrón de segmentación. (B) Masa de células pigmentadas. (C) Huevos más cortos, la flecha blanca marca el huevo salvaje. (D) y (E) embriones con fenotipo salvaje, estadio avanzado y banda germinal respectivamente.

3.3. Decapentaplegic

3.3.1. Hibridación in situ

Para estudiar la expresión de *dpp* en *R. prolixus* se sintetizaron *primers* específicos con parte de la secuencia del fago T7 en extremo 5' para generar sondas *antisense* y *sense* marcadas con digoxigenina como se describió previamente.

Este ensayo se llevó a cabo en embriones en estadio de blastodermo y al momento de la gastrulación, banda germinal temprana y tardía, así como embriones próximos a eclosionar.

En *R. prolixus* la expresión de *dpp* comienza unos instantes antes de la gastrulación y la anatrepsis (que en este embrión ocurren conjuntamente) en el extremo posterior del huevo (Fig.32 A) sin distinción de lados dorsal o ventral como puede observarse en la figura 32 B. Luego la expresión de *dpp* desaparece hasta la formación de los apéndices en el estadio de banda germinal.

En las bandas germinales tempranas *dpp* se expresa únicamente en los apéndices tanto cefálicos como torácicos (Fig.32 D) que en este momento apenas sobresalen de las paredes del cuerpo, en principio se expresaría en todo el apéndice y a medida que éstos se elongan la marcación se hace más distal y aparentemente sólo en ectodermo (Fig. 32 F). Ya en estadios más avanzados de la banda germinal la expresión de *dpp* pareciera darse en anillos muy tenues en el apéndice (Fig.32 E y G). En los embriones próximos a la eclosión no se identificó ningún tipo de marcación.

El patrón de expresión observado en *R. prolixus* es muy similar a lo observado en *O. fasciatus*, otro hemíptero y similar también a lo observado en las bandas germinales de *T. castaneum*.

La expresión de *dpp* durante el desarrollo embrionario se ha estudiado en varios artrópodos mayormente insectos además de *D. melanogaster*, como *T. castaneum*, *S. americana* (Ortóptera), *S. gregaria* (Ortóptera), *G. marginata* (Myriapoda) y *O. fasciatus* (Hemiptera) (Irish y Gelbart, 1987; Sanchez Salazar *et al*, 1996; Neufeld y Gelbart, 1995; Dearden, 2001; Prpic, 2004; Angelini y Kaufman, 2005).

En *D. melanogaster* la expresión de *dpp* es necesaria en niveles máximos para la expresión de *zen*, también participa en la subdivisión del ectodermo dorsal en el

embrión temprano y en la inducción del mesodermo lateral. El dominio de *dpp* en el blastodermo abarca las membranas extraembrionarias y regiones más laterales que darán origen al ectodermo y neuroectodermo, en los discos imaginales que darán origen a los apéndices se expresa en una línea distal-proximal que va desde el lado dorsal al ventral.

Esta expresión difiere a lo observado en insectos más basales en donde la expresión de *dpp* pareciera tener un rol menos global en el patronamiento D-V. En cuanto a la formación de los apéndices la expresión de *dpp* también es diferente dándose en un patrón de bandas, tal vez esta diferencia se deba a que en el resto de los insectos estudiados los apéndices se forman directamente a partir de primordios embrionarios y no a partir de discos imaginales, la formación del patrón P-D en *D. melanogaster* sería un estado derivado en relación al desarrollo de los apéndices a partir de los discos imaginales, situación que se evidencia desde la secuencia de *dpp* donde en *D. melanogaster* la zona del prodominio es más larga como si parte de la secuencia de información se hubiera insertado en el linaje de *Drosophila sp.*

La función de *dpp* siempre se ha encontrado involucrada en el patronamiento D-V del embrión puntualmente en los límites dorso-laterales sugiriendo que este rol se ha conservado en los insectos hemimetábolos, sin embargo a partir de los estudios realizados en estos insectos queda claro que se necesitan análisis adicionales en especies más basales para discernir las funciones ancestrales de *dpp*.

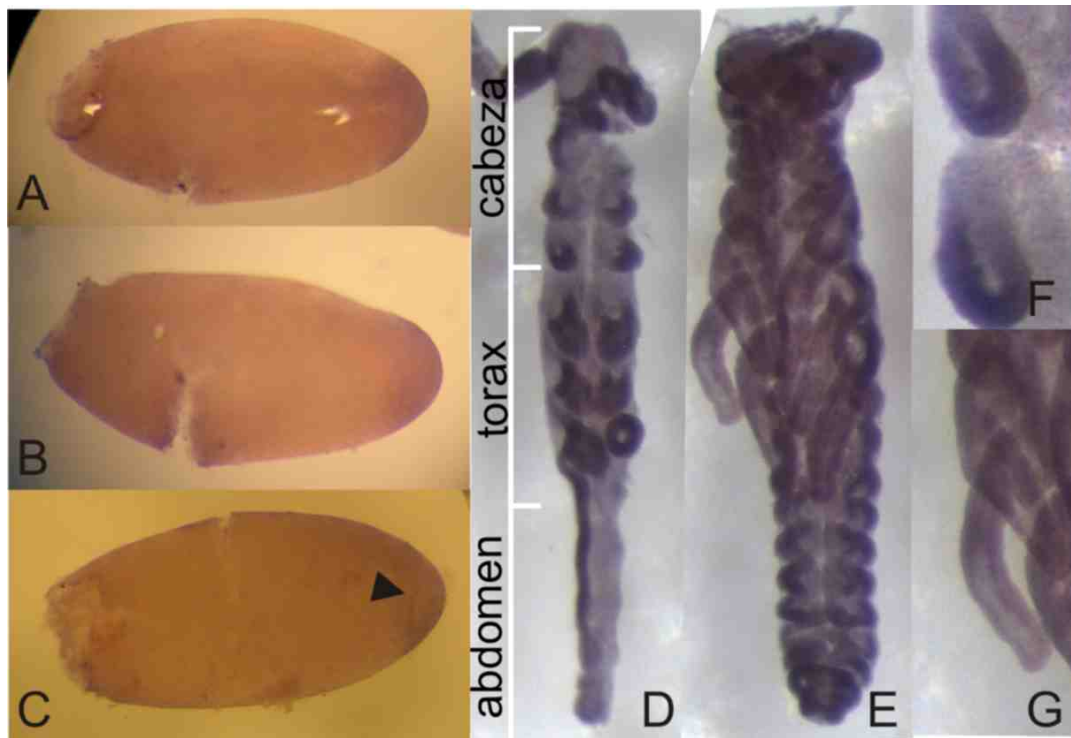


Fig 32. (A), (B), (C) son hibridaciones *in situ* en embriones en estadio de blastodermo, hacia la izquierda es anterior y a la derecha posterior. (A) Vista dorsal del huevo, donde se observa expresión de dpp en el extremo posterior. (B) Vista lateral de A, no se observan diferencias de expresión entre lados dorsal y ventral. (C) Vista dorsal de otro huevo donde se observa el comienzo de la gastrulación, la flecha negra indica el margen de invaginación. (D) Banda germinal temprana en donde se observa expresión de dpp en todos los apéndices. (E) Banda germinal tardía donde se observa la expresión de dpp en los apéndices torácicos como bandas muy sutiles. (F) y (G) son ampliaciones de D y E respectivamente.

3.3.2. ARNi parental

Utilizando la técnica de ARNi parental se estudió la pérdida de función de *dpp* en embriones de *R. prolixus*, para tal fin se inyectaron ocho hembras vírgenes con 0.5 µg, 0.3 µg y 0.2 µg de ARNdc en tres experimentos diferentes y luego de la inyección se les permitió alimentarse para inducir la oogénesis.

En los tres casos se obtuvo fenotipos con distintos grados de penetrancia pero en su mayoría el desarrollo embrionario resultó ser anormal mostrando severos defectos en el patronamiento del embrión.

De los 203 huevos disectados sólo el 9% logró completar el desarrollo y eclosionó dando ninfas I completamente normales, el 7% alcanzó un grado de desarrollo similar al de banda germinal en elongación pero severamente afectado en el patronamiento dorsoventral (Fig. 33 B), el 4% carecía de un patronamiento D-V reconocible formando tiras de tejido embrionario indiferenciado (Fig. 33 C) el 52% formó masas de tejido embrionario muy pigmentado en el extremo posterior del huevo, en algunos casos estas masas desarrollaron algún tipo de apéndice indiferenciado (Fig. 33 A y D), suponemos que este fenotipo es el resultado de una incapacidad del primordio embrionario para invaginarse y formar la banda germinal. Normalmente en el extremo posterior del huevo las células se condensan para invaginarse y formar la banda germinal, aparentemente en estos embriones las células se condensan pero no pueden invaginarse y como resultado de esto los procesos embrionarios posteriores no se inician. Finalmente en el 22% de los casos el desarrollo se detuvo muy temprano no llegándose a formar ninguna estructura embrionaria (Tabla 4).

Como notáramos anteriormente a diferencia de lo que ocurre en *D. melanogaster* no existen características cuticulares que nos permitan diferenciar los lados ventral y dorsal por lo que en *R. prolixus* no ha sido posible determinar ventralización o dorsalización. Éstos resultados se condicen con lo observado en *O. fasciatus*, sin embargo difieren de lo observado en *D. melanogaster* y *T. castaneum*. En *D. melanogaster* la pérdida de función de *dpp* lleva a la pérdida de la amnioserosa y la epidermis dorsal, tomando la identidad de neuroectodermo. También se generan anomalías en la cabeza y zona caudal (Irish y Gelbart 1987).

Por otro lado la pérdida de función de *dpp* en *T. castaneum* por la técnica de ARNi ha tenido poca expresividad aunque se ha observado la falta de las células más dorsales en los estadios de desarrollo más avanzados y no completan el cierre dorsal, en los casos con mayor penetrancia mostraron anomalías durante los estadios tempranos (Ober y Jockusch 2006). Esta divergencia en la aparente función de *dpp* en estas especies podría deberse a las distintas formas de desarrollo embrionario en los que *dpp* tendría territorios de expresión distintos

puesta	n de huevos	anembrionados	células pigmentadas	cilíndrico	banda germinal	wt	deshidratado
1	8		7		1		
2	8	1	5	1			
3	19		16		3		
4	5	1			1		3
5	4	1	1				2
6	4	1	2		1		
7	9		2	1	1		4
8	8	7			1		
9	12	10			2		
10	6	1	4			1	
11	7		7				
12	5		5				
13	14		14				
14	5		5				
15	7		7				
16	12	7				5	
17	16	6	9	1			
18	54	10	21	6	5	12	
total	203	45	105	9	15	18	9

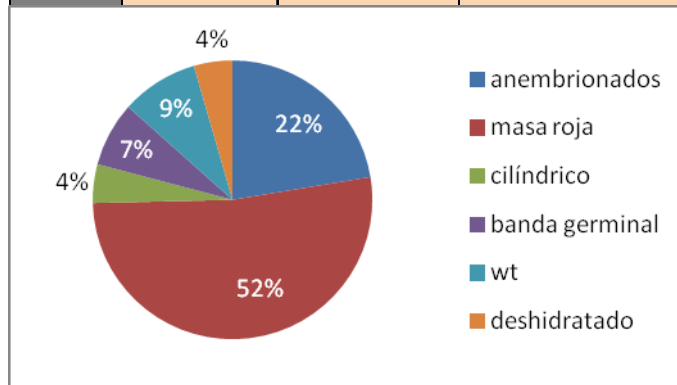


Tabla 4. Puestas y fenotipos encontrados en número de individuos, a la izquierda los porcentajes de individuos que portaban cada fenotipo

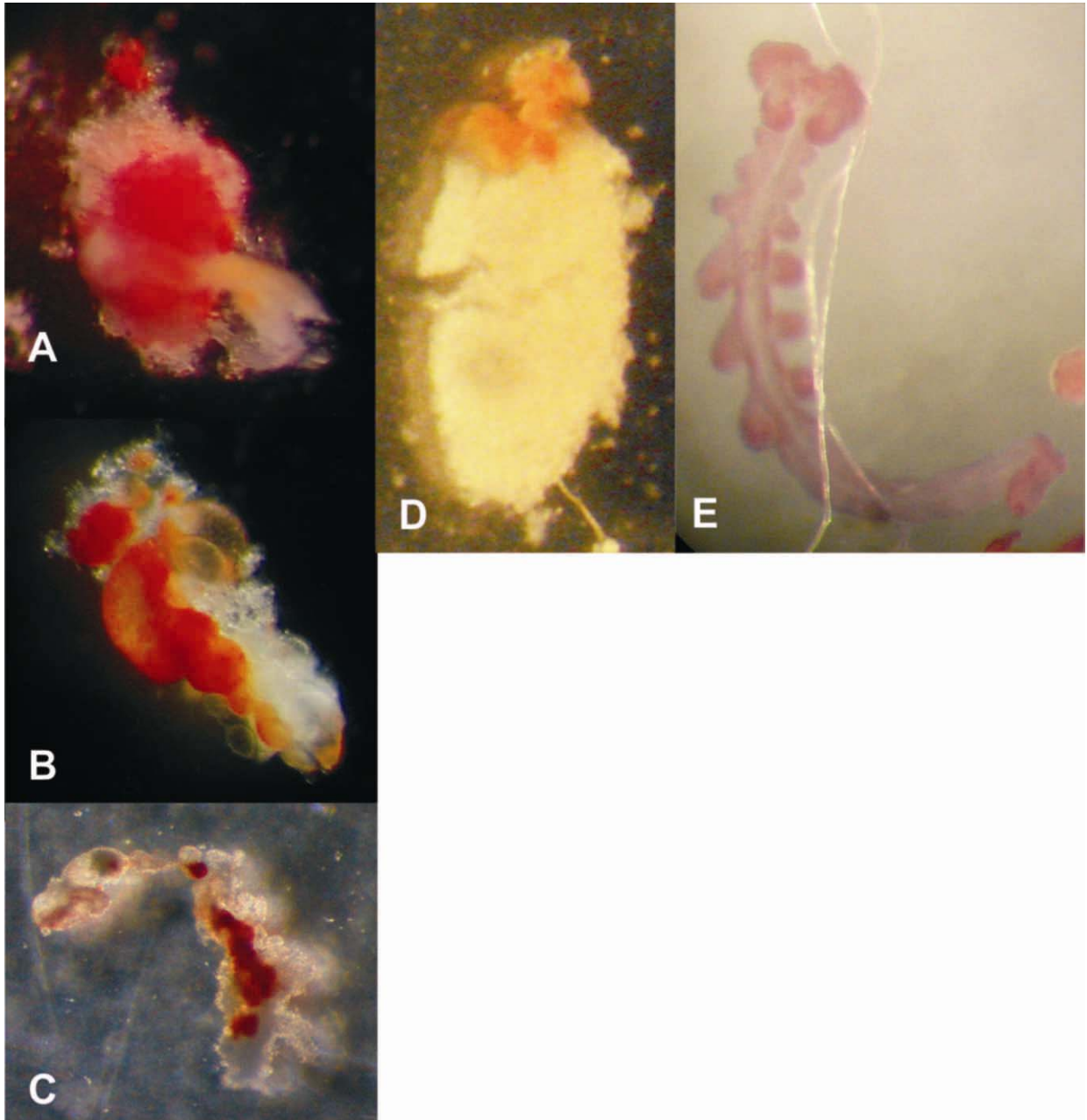


Fig. 33. (A) Masa de células pigmentadas con algún tipo de apéndices indiferenciados. (B) Símil banda germinal en elongación. (C) Cilíndrico, tiras de tejido embrionario indiferenciado que recuerda al fenotipo de mutantes negativos de *D. melanogaster*. (D) Posición de la masa de células pigmentadas con respecto al huevo. Siempre de posición posterior. (E) Fenotipo salvaje en estadio de banda germinal elongada

Conclusión

4. Conclusión

En esta tesis nos hemos propuesto estudiar algunos de los genes que participan en el establecimiento del eje D-V en *R. prolixus*, desde su búsqueda, secuenciación, estudiar sus patrones de expresión y la modificación de los patrones espaciotemporales de expresión a partir de cambios inducidos en la actividad génica por medio de la técnica de ARNi, con el fin de estudiar los procesos que llevan a la formación del eje D-V y entender de qué manera estas redes regulatorias han cambiado en respuesta a los diferentes modos de desarrollo y cómo se han modificado a lo largo de la evolución.

Para este fin fue necesario realizar un detallado estudio de los procesos morfogénicos que llevan a la formación del embrión. Si bien dichos procesos se estudiaron con anterioridad en *R. prolixus* (Mellanby, 1935 y Kelly y Huebner, 1989) dichos trabajos eran insuficientes a los fines del presente trabajo ya que mostraban el desarrollo de *R. prolixus* de manera estática.

Los genes aquí estudiados se expresan tempranamente y son aportados al embrión por la madre en el oocito antes de la fecundación por lo que creemos que los movimientos de blastokinesis que ocurren durante el desarrollo embrionario están relacionados con el establecimiento de los ejes. Sin embargo esta es sólo una hipótesis ya que actualmente no hay una explicación al porqué ocurren estos movimientos y cual es su fin en el desarrollo embrionario (Panfilio *et al*, 2010).

En *R. prolixus* hemos encontrado secuencias homólogas de algunos de los principales miembros de la vía de establecimiento del eje D-V. Adicionalmente a partir del análisis bioinformático del genoma de *R. prolixus* hemos podido plantear hipótesis sobre las secuencias completas de los genes con sus zonas de regulación, distribución de intrones y exones y motivos característicos de cada una de las proteínas

A partir de las mismas observamos que si bien las secuencias de estos genes se encuentran parcialmente conservadas con respecto a las secuencias homólogas en *D. melanogaster*, las mismas poseen características que tienen que ver con la regulación de la vida media de los productos génicos (tales como dominios PEST) que podrían ser resultado de las diferentes formas de desarrollo embrionario como pudimos observar en las secuencias de *toll* y *dpp*.

Para esta tesis se han desarrollado protocolos para el análisis funcional del genoma tales como hibridación *in situ* y ARNi parental para *R. prolixus*. A partir de estos experimentos se ha observado que tanto *dorsal* como *toll* se acumulan como transcritos maternos en el oocito en forma de cúmulos sobre toda la superficie del huevo. Cuando los núcleos migran a la periferia del huevo para formar el blastodermo el ARN se liberaría al citoplasma rodeando los núcleos e intercalándose entre las células de vitelo y desaparecen completamente al momento de la gastrulación.

Debido a que no se ha realizado una inmunohistoquímica no ha sido posible la observación de la distribución de la proteína no pudiendo establecer la formación de un gradiente de proteína Dorsal.

No se ha detectado la expresión de estos transcritos en la zona de crecimiento de la banda germinal, sin embargo a partir de algunos estudios realizados en *T. castaneum* pareciera ser que el establecimiento del eje D-V en los nuevos segmentos tiene que ver con la expresión de *toll* durante el estadio de blastodermo que lleva a la especificación de todo el mesodermo y luego de la gastrulación el patronamiento D-V recaería en un sistema autoregulado que requiere la señal de *toll* para una apropiada orientación en relación al eje A-P (Da Fonseca *et al* 2008). Se ha hipotetizado que este sistema de autorregulación estaría a cargo de una vía de señalización de BMP (que en *D. melanogaster* se encuentran involucradas en dorsalización) y EGF (implicadas en *D. melanogaster* en ventralización) (Van der Zee *et al* 2006). Sin embargo los roles de estas vías en *T. castaneum* aún no han sido determinadas quedando pendiente la pregunta de qué manera se establece la asimetría D-V en los segmentos en formación. Tampoco se ha podido determinar una expresión zigótica de *toll* como aparentemente ocurre en *T. castaneum*.

Con respecto a la expresión de *dpp* se ha observado un patrón de expresión en los apéndices tanto cefálicos como torácicos que difiere de lo observado en *D. melanogaster* y que tendría que ver con el origen de los apéndices en insectos de banda germinal corta, donde los mismos se forman a partir de primordios en las paredes del cuerpo y no a partir de discos imaginales. Sin embargo la función de *dpp* en cuanto al patronamiento D-V del embrión estaría conservado en los insectos hemimetábolos ya que estos resultados se condicen con hallazgos en otros insectos de banda germinal corta.

Una comparación de los patrones de expresión de cada uno de los genes con la expresión en otros insectos estudiados se muestra en la tabla 5. La comparación se

habría limitado a las escasas especies disponibles por lo que los resultados mostrados en la sección anterior cobran especial relevancia para futuros estudios evolutivos.

En cuanto a los resultados obtenidos en los ensayos de ARNi, como todos los experimentos se han llevado a cabo sobre la expresión de genes de acción temprana sobre el embrión afectando la gastrulación y que son los disparadores de la diferenciación celular, es esperable la presencia de formas altamente aberrantes donde no es posible diferenciar estructuras embrionarias y a su vez estos fenotipos tempranos podrían enmascarar efectos más tardíos.

Con respecto a la aparición en algunos casos de ocelos, algunas estructuras cefálicas y apéndices indiferenciados podría tener que ver con que el primordio embrionario, el conjunto de células que luego formará el resto del embrión se encuentra en la posición que formará posteriormente la cabeza y como el establecimiento de los ejes se da al mismo tiempo puede que parte de la diferenciación de éstas células haya ocurrido a pesar del impedimento para establecer el eje D-V y el desarrollo posterior se ve totalmente impedido o quizás la cabeza posea un patrón de formación en parte independiente de la formación del eje D-V.

La alteración del patrón de segmentación en las interferencias de *toll* muestra un diálogo cruzado entre los ejes D-V y A-P sumando evidencia a la idea de que el establecimiento de los ejes no es en absoluto independiente uno del otro.

Con respecto a la posibilidad de que *toll* sea parte del establecimiento del sistema terminal es necesario la realización de nuevos experimentos no sólo en *R. prolixus* sino en otros insectos basales. Cabe destacar que hasta el momento no se han hallado en las trazas del genoma de *R. prolixus*, secuencias que puedan homologarse a *gürken*.

Se ha propuesto un modelo en el cual ante la ausencia del sistema terminal el oocito temprano en el ovario de *D. melanogaster* adoptaría una forma semicircular provocando la reorientación del eje D-V (Fig. 34) (Roth y Schüpbach, 1994). Ante estas evidencias y sabiendo que no existen homólogos a *gürken* fuera de los dípteros más evolucionados, podemos plantear que estaría *toll* cumpliendo alguna función en el establecimiento del sistema terminal. Los fenotipos observados en huevos permiten considerar esta hipótesis.

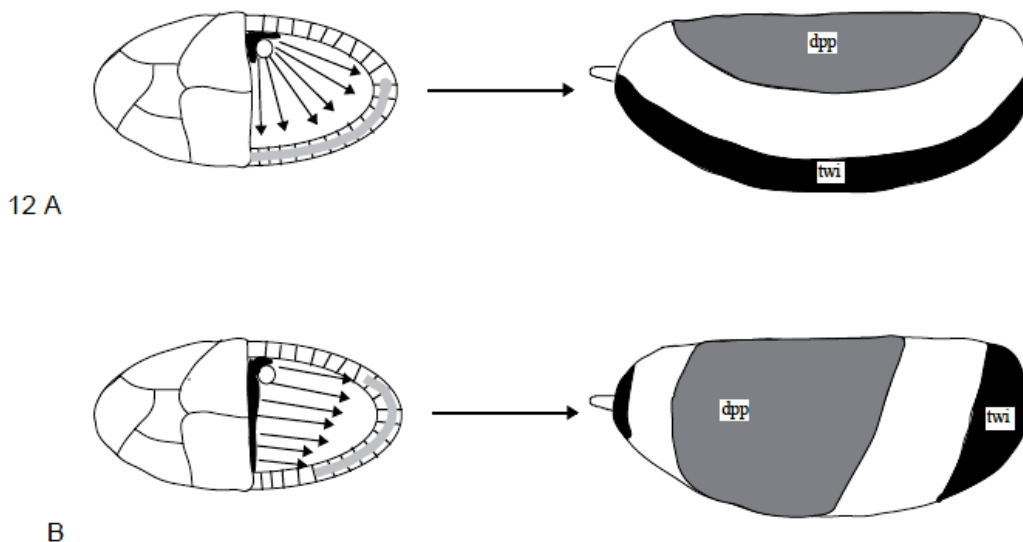


Fig. 34. Modelo de la relación entre la localización del mensajero de gürken y la orientación del embrión en el eje dorsoventral. Las flechas que irradian desde el mensajero de gürken representan la inhibición del sistema de formación de patrón en el epitelio folicular. Este patrón de formación define el dominio que posteriormente orienta la vía toll-dorsal en el embrión temprano. En ausencia del patrón dorsoventral el huevo toma una forma semicircular . **(A)** Wild type; **(B)** deslocalización del mensajero de gürken y sus efectos en el patronamiento dorsoventral (Tomado de Roth y Schüpbach, 1994)

El rol de *toll* en el establecimiento del eje D-V se ha identificado sólo en insectos, mientras que su rol principal y altamente conservado en los Metazoa tiene que ver con la inmunidad innata.

Además la función de *toll* en el establecimiento del eje D-V sólo se ha observado en insectos holometábolos (*D. melanogaster* y *T. castaneum*) y en la presente tesis en *R. prolixus*, existiendo algunas evidencias preliminares en *N. vitripennis* (Hymenoptera) y *O. fasciatus* (Lynch y Roth, 2011) en los que la vía de señalización a través de *toll* tiene un papel crucial. Por lo que es interesante preguntarse en qué momento se ha reclutado a *toll* en el establecimiento del eje D-V y a quien o que vía se ha reemplazado.

A partir del conjunto de evidencia resultado de estudios en distintos insectos pareciera que aún cuando los genes que participan en el establecimiento del eje D-V están conservados, sus interacciones regulatorias difieren entre insectos, lo cual es consistente con una rápida evolución en las vías que llevan a la formación del eje.

La dinámica de los genes que regulan el eje D-V cambiaría en función de las diferentes formas de desarrollo temprano y conocer de qué manera se regulan los gradientes de formación proveerá un gran avance en la comprensión de cómo las redes

regulatorias génicas pueden evolucionar y al entendimiento de los mecanismos de evolución.

Perspectivas futuras

Debido a la escasa información con que se cuenta sobre los genes que establecen el eje dorsoventral, hacen de ésta un área de estudio de interés. En los últimos años se ha comenzado a estudiar estos genes en algunas especies de insectos cuyos genomas ya han sido secuenciados, pero su estudio funcional es difícil por ser genes que se expresan en lapsos de tiempo estrechos y tempranamente. El abordaje en insectos cuyos genomas aún no han sido secuenciados es aún más complejo. Como se ha podido observar en el presente estudio las regiones de homología entre secuencias son escasas y acotadas lo que dificulta su búsqueda.

Un interés asociado a esta red es que el mismo *cassette* de genes que establecen el eje dorsoventral tiene un rol fundamental en la respuesta inmune innata, tanto en invertebrados como vertebrados. En el caso particular de *R. prolixus* siendo éste transmisor del mal de chagas, presente en todo Latinoamérica, ahondar en este tema podría resultar de gran interés para aplicaciones futuras en el control de esta plaga.

Los insectos presentan una gran variabilidad producto de una rápida evolución lo que los constituye una fuente ideal para estudiar de que manera las redes génicas se modifican frente a diferentes necesidades, Es así que ha nacido un proyecto cuyo fin es el secuenciamiento de al menos cinco mil genomas de insectos y artrópodos relacionados (<http://arthropodgenomes.org/wiki/i5K>) con el fin de alcanzar un entendimiento mayor sobre la evolución y filogenia de los artrópodos.

Especie-gen	Patrón de expresión
Dm-dpp	Durante el estadio de blastodermo <i>dpp</i> se expresa en niveles máximos en la superficie dorsal en membranas extraembrionarias y regiones más laterales. En discos imaginales se expresa en una línea P-D que va desde el lado dorsal al ventral
Tc-dpp	Durante el estadio de blastodermo se expresa bien anterior en la serosa, esta expresión desaparece cuando el embrión condensa. En la banda germinal temprana se expresa en los bordes laterales dando origen a las células ectodermales del embrión. También en la zona de la boca y en una probable región mesodermal en la zona de crecimiento. En la BG extendida se expresa en el ectodermo dorsal, labio, apéndices antenales, bucales y torácicos. Posteriormente la expresión queda restringida al extremo distal de los apéndices.
Sg-dpp	Se expresa en primer lugar formando un círculo de células que delimitan el margen del primordio embrionario, luego en las células marginales de la serosa que migran sobre el embrión. En la BG se expresa en forma de U en el extremo posterior y difusamente en los lóbulos cefálicos, segmentos torácicos y bucales además de las células que formarán las regiones dorsales del embrión En los apéndices forma anillos de expresión débil a distintos niveles sobre el eje P-D.
Gm-dpp	Se expresa en el extremo distal de los apéndices, neuroectodermo dorsal, porción ventral en línea media ventral. SNC en centros ópticos del cerebro en desarrollo, tejido que formará el corazón, estomodeo y débilmente en proctodeo.
Of-dpp	En primer lugar se expresa en el blastodermo en la zona donde se invaginará la BG. Una vez formada la banda germinal se expresa en todo el primordio de los apéndices y luego se condensa en el extremo de los apéndices torácicos y a medida que elongada se forman anillos de expresión cerca del extremo distal del miembro.
Rp-dpp	En el estadio de blastodermo se expresa en el extremo posterior donde se invaginará la banda germinal. En BG temprana se expresa en todo el primordio de apéndices antenales, bucales y torácicos. Una vez que los miembros se han elongado se forman anillos de expresión débiles a distintos niveles sobre el eje P-D
Dm-toll	Luego de la fertilización el producto materno de <i>toll</i> se activa de manera asimétrica por acción de <i>spätzle</i> estableciendo un gradiente
Ca-toll	Igual que en <i>D. melanogaster</i>
Tc-toll	Durante la oogénesis temprana se expresa en niveles apenas detectables. Posteriormente la expresión desaparece y durante el estadio de blastodermo temprano la expresión reaparece formando un gradiente dorsoventral, se cree que a la expresión materna se suma una expresión zigótica de <i>toll</i> . No hay expresión en la zona de crecimiento
Sg-toll	Sin datos
Gm-toll	Sin datos
Of-toll	Sin datos
Rp-toll	Inicialmente se almacenaría en forma de cúmulos en el preblastodermo y posteriormente, cuando los núcleos alcanzan la periferia, el mensajero se libera al citoplasma rodeando los núcleos. No se ha observado expresión de mensajero en estadios posteriores ni en zona de crecimiento
Dm-dl	En el presblastodermo el producto materno de dorsal se expresa uniformemente en toda la circunferencia del oocito. Al momento de la gastrulación la expresión decae considerablemente. Luego de la fertilización la proteína se acumula en los núcleos sobre el lado ventral del embrión formando un gradiente
Tc-dl	La expresión temprana es similar a <i>D. melanogaster</i> mientras que la proteína sólo se acumula en la serosa. No se ha observado expresión posterior en embriones avanzados
Sg-dl	Sin datos
Gm-dl	Sin datos
Of-dl	Sin datos
Rp-dl	Inicialmente se almacenaría en forma de cúmulos en el preblastodermo y posteriormente, cuando los núcleos alcanzan la periferia, el mensajero se libera al citoplasma rodeando los núcleos. No se ha observado expresión de mensajero en estadios posteriores ni en zona de crecimiento

Tabla 5. Dm : *Drosophila melanogaster* (Diptera). **Ca**: *Clogmia albipunctata* (Diptera). **Tc**: *Tribolium castaneum* (Coleoptera). **Sg**: *Schistocerca gregaria* (Ortoptera). **Gm**: *Glomeris marginata* (Myriapoda). **Of**: *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera). **Rp**: *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). **dpp**: *decapentaplegic*. **dl**: *dorsal*

Bibliografía

Bibliografía

- Affolter, M. y Basler, K.** (2007). The Decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation. *Nat. Rev. Genet.* 8, 663–674.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Walter, P.** (2002) *Molecular Biology of the Cell* (4th edition) Garland Science, New York .p. 3027
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J.**(1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Andreson, K.V. y Lengyel, J.A.** (1979). Rates of synthesis of major classes of RNA in *Drosophila* embryos. *Dev Biol* 70, 217-231
- Anderson, K.V.; Jurgens, G., Nusslein-Volhard, C.** (1985). Establishment of dorsal–ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 42, 779–789.
- Angelini, D. R. y Kaufman, T. C.** (2005) Functional analyses in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera) support a role for Wnt signaling in body segmentation but not appendage development. *Dev. Biol.* 283, 409-423
- Angelini D.R. y Kaufman, T.C.**(2005). Insect appendages and comparative ontogenetics. *Dev Biol* 286, 57-77.
- Araujo, H y Bier, E** (2000) *sog* and *dpp* exert opposing maternal functions to modify toll signaling and pattern the dorsoventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development* 127, 3631-44
- Bergman, A; Stein,D; Geisler, R; Hagenmainer,S; Shmid, B; Fernandez, N; Shnell, B; Nüsslein Volhard, C** (1996) A gradient of cytoplasmic Cactus degradation establishes the nuclear localization gradient of the Dorsal morphogen in *Drosophila*. *Mech. Dev.*60,109-123
- Biemar, F.; Nix, D.A.; Piel, J.; Peterson, B.; Ronshaugen, M.; Sementchenko, V.; Bell, I.; Manak, J.R.; Levine, M.S.** (2006). Comprehensive identification of *Drosophila* dorsal-ventral patterning genes using a whole-genome tiling array. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(34), 12763--12768.
- Bienz, M.** (1994). Homeotic genes and positional signalling in the *Drosophila* viscera. *Trends Genet.* 10, 22-26.
- Bucher, G.; Scholten, J.; Klingler, M.** (2002) Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Curr. Biol* 12, R85-R86.
- Carrol, S.B.; Winslow, G.M.; Twombly, V.J.; Scott, M.P.** (1987) Genes that control dorsoventral polarity affect gene expression along the anteroposterior axis of the *Drosophila* embryo. *Development* 99, 327-332
- Chen, G., Handel, K. y Roth, S.,** (2000). The maternal NF- κ B/Dorsal gradient of *Tribolium castaneum*: dynamics of early dorsoventral patterning in a short- germ beetle. *Development* 127, 5145–5156.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- De Renzis, S.; Elemento, O.; Tavazione, S. y Wieshaus, E.F.** (2007) Unmasking activation of the zygotic genome using chromosomal deletions in the *Drosophila* embryo. *PLoS Biol* 5, e117.

- De Robertis, E.M. y Sasai, Y.** (1996) A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature*, 380, 37-40
- De Robertis, E.M** (2008) Evo-Devo: Variations on Ancestral Themes. *Cell* 132, 185-195
- Dearden, P.; Grbic, M.; Falciani, F. y Akam, M.** (2000). Maternal expression and early zygotic regulation of the *Hox 3/zen* gene in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Evolution and Development*, 2, 261-270.
- Dearden, P.K. y Akam, M.** (2001) Early embryo patterning in the grasshopper, *Schistocerca gregaria*: *wingless*, *decapentaplegic* and *caudal* expression. *Development* 128, 3435-3444
- Engstrom, Y.; Kadalayil, L.; Sun, S.C.; Samakovlis, C.; Hultmark, D. y Faye, I.** (1993) kappa B-like motifs regulate the induction of immune genes in *Drosophila*. *J Mol Biol* 232, 327-333.
- Falciani F, Hausdorf B, Schröder R, Akam M, Tautz D, Denell R y Brown S** (1996) Class 3 Hox genes in insects and the origin of zen. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 8479-8484
- Foe, V. E. y Alberts, B.M.** (1983). Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Sci* 61, 31-70
- François, V.; Solloway, M.; O'Neill, J. W.; Emery, J. y Bier, E.** (1994). Dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo depends on a putative negative growth factor encoded by the short gastrulation gene. *Genes Dev.* 8, 2602-2616.
- Gerhart, J.** (2000) Inversion of the chordate body axis: Are there alternatives? *PNAS* 97 (9), 4445-4448
- Gehring, W.J.** (2005) New perspectives on eye development and the evolution of eyes and photoreceptors. *J. Hered.* 96 (3) 171-184
- Gelbart, W. M.** (1989). The *decapentaplegic* gene: a TGF β homologue controlling pattern formation in *Drosophila*. *Development Supplement*, 65- 74.
- Gerttula, S; Jin, Y. S.; Anderson, K. V.** (1988) Zygotic expression and activity of the *Drosophila toll* gene, a gene required maternally for embryonic dorsal-ventral pattern formation. *Genetics* 119, 123-133
- Gilbert, S.** (2000) *Developmental Biology* (6th Edition) Ed. Sinauer Associates, inc . p256
- Gitelman I** (1997) Twist protein in mouse embryogenesis. *Dev Biol* 189, 205-214
- Goltsen, Y; Fuse, N; Frasch, M; Zinzen, RP; Lanzaro, G y Levin, M.** (2007). Evolution of the dorsal-ventral patterning network in the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Development* 134, 2415-2424.
- Govind, S. y Steward, R.** (1991). Dorsoventral pattern formation in *Drosophila*: signal transduction and nuclear targeting. *Trends Genet.* 7, 119- 125.
- Handel, K., Grünfelder, C.G., Roth, S., y Sander, K.** (2000). Tribolium embryogenesis: a SEM study of cell shapes and movements from blastoderm to serosal closure. *Dev. Genes Evol.* 210, 167-179.
- Handel, K.; Basal, A.; Fan, X y Roth, S.** (2005) Tribolium castaneum twist: gastrulation and mesoderm formation in a short-germ beetle. *Dev Genes Evol.* 215, 13-31
- Harfe BD, Gomes AV, Kenyon C, Liu J, Krause M y Fire A** (1998) Analysis of a *Caenorhabditis elegans* Twist homolog identifies conserved and divergent aspects of mesodermal patterning. *Genes Dev* 12, 2623-2635
- Harrison, M.M.; Botchan, M.R. y Cline, T.W.** (2010) Grainyhead and Zelda compete for binding to the promoters of the earliest-expressed *Drosophila* genes. *Dev Biol* 345, 248-255

- Harrison, M.M.; Li, X-Y.; Kaplan, T.; Botchan, M.R. y Eisen, M.B.** (2011) Zelda binding in the early *Drosophila melanogaster* embryo marks regions subsequently activated at the maternal-to-zigotic transition. *PLoS Genet* 7(10), e1002266.
- Hashimoto, C.; Hudson, K.L. y Anderson, K.V.** (1988) The *toll* gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279
- Hashimoto, C.; Gerttula, S. y Anderson, K. V.**(1991) Plasma membrane localization of the Toll protein in the syncytial *Drosophila* embryo: importance of transmembrane signaling for dorsal-ventral pattern formation . *Development* 111, 1021-1028
- Hecht, P. M. y Anderson, K. V.** (1993). Genetic characterization of *tube* and *pelle*, genes required for signaling between Toll and *dorsal* in the specification of the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Genetics* 135, 405-417
- Heming, B.S.** (2003) Insect Development and Evolution. *Ithaca and London. Cornell University Press.*
- Hoffman, J.A. and Reichhart, J.M.** (1997) *Drosophila* immunity. *Trends Cell Biol.* 7, 309-316
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, Wincker P, Clark AG, Ribeiro JM, Wides R et al.** (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 129-149
- Hopwood ND, Pluck A, Gurdon JB** (1989) A *Xenopus* mRNA related to *Drosophila* twist is expressed in response to induction in the mesoderm and the neural crest. *Cell* 59, 893-903
- Hughes, C. y Kaufman, T.** (2000). RNAi analysis of *deformed*, *proboscipedia* and *sex combs reduced* in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*: novel roles for Hox genes in the Hemipteran head. *Development* 127, 3683-3694
- Ip, Y. T.; R. E. Park, D.; Kosman, E.; Bier y M. Levine.** (1992b). The *dorsal* gradient morphogen regulates stripes of *rhomboid* expression in the presumptive neuroectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 6, 1728- 1739
- Irish, V.F. y Gelbart, W.M.**(1987). The *decapentaplegic* gene is required for dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 1, 868-879.
- Jazwinska, A.; Rushlow, C. y Roth, S.** (1999a). The role of *brinker* in mediating the graded response to Dpp in early *Drosophila* embryos. *Development* 126, 3323-3334.
- Jazwinska, A.; Kirov, N.; Wiechaus, E.; Roth, S. y Rushlow, C.** (1999b). The *Drosophila* gene *brinker* reveals a novel mechanism of Dpp target gene regulation. *Cell* 96, 563-573.
- Kelly, G. y Huebner, E.** (1989) Embryonic development of the hemipteran insect *Rhodnius prolixus*, *Journal of Morphology* 199, 175-196.-
- Keith, F. J y Gay, N. J.**(1990) The *Drosophila* membrane receptor Toll can function to promote cellular adhesion. *EMBO J.* 9,4299-4306
- Kicheva, A. y Gonzalez-Gaitan, M.** (2008). The *decapentaplegic* morphogen gradient: a precise definition. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 137-143.
- Kingsley D.M.** (1994) The TGF- β superfamily: New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8,133-146
- Kosman, D.; Ip, Y. T.; Levine, M. y Arora, K.** (1991). Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the *Drosophila* embryo. *Science* 254, 118-122.

Kotkamp, K.; Klingler, M y Schoppmeier, M (2010) Apparent role of *Tribolium orthodenticle* in anteroposterior blastoderm patterning largely reflects novel functions in dorsoventral axis formation and cell survival. *Development* 137, 1853-1862

Lavore, A.; Pagola, L.; Esponda Behrens, N y Rivera Pomar, R (2012) The gap gene *giant* of *Rhodnius prolixus* is maternally expressed and required for proper head and abdomen formation. *Dev.Biol.* ;361(1):147-55

Lawrence, P. A. (1966). Gradients in the insect segment: the orientation of hairs in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. *J. exp. Biol.* 44, 607-620

Lemaitre, B; Nicolas, E.;Michaut, L.; Reichhart, J.M. y Hoffmann, J.A.(1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983

Leptin M (1991) twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev* 5,1568–1576

Liang, H.L.; Nien, C.Y.; Liu, H.Y.; Metzstein, M.M.; Kirov, N.; et al. (2008) The zinc finger protein Zelda is a key activator of the early zygotic genome in *Drosophila*. *Nature* 45, 400-403

Liu P.Z. y Kaufman, T.C. (2004). Hunchback is required for suppression of abdominal identity, and for proper germband growth and segmentation in the intermediate germband insect *Oncopeltus fasciatus*. *Development* 131, 1515-1527

Liu P.Z. y Kaufman, T.C. (2004). Krüppel is a gap gene in the intermediate germband insect *Oncopeltus fasciatus* and is required for development of both blastoderm and germband-derived segments. *Development* 131, 4567-4579

Liu P.Z. y Kaufman, T.C. (2005). *even-skipped* is not a pair-rule gene but has segmental and gap-like functions in *Oncopeltus fasciatus*, an intermediate germband insect. *Development* 132, 2081-2092

Lynch J.A. y Desplan C (2006) A method for parental RNA interference in the wasp *Nasonia vitripennis*. *Nat. protocols* 1,486-494

Lynch J.A. y Roth S. (2011). The evolution of dorsal-ventral patterning mechanisms in insects. *Genes Dev.* 25, 107-118

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

Massagué, J.; Attisano, L. y Wrana, J. L. (1994). The TGF- β family and its composite receptors. *Trends Cell Biol.* 4, 172-178

Maxton-Kuchenmeister, J.; Handel, K.; Schmidt-Ott, U.; Roth, S. and Jackle, H. (1999). Toll homologue expression in the beetle *Tribolium* suggests a different mode of dorsoventral patterning than in *Drosophila* embryos. *Mech. Dev.* 83, 107–114.

McKnight, S.L y Miller, O.L. Jr. (1976) Ultrastructural patterns of RNA synthesis during early embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Cell* 8, 305-319

Medzhitov, R (2001) Toll-Like receptors and innate immunity. *Nature Reviews.* 1, 135-145

Mellanby, H (1934). The early embryonic development of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Heteroptera). *Development.* 71-90

Mellanby, H (1935). The later embryology of *Rhodnius prolixus*. *Changes.* 313, 1-40

- Mellerick, D. M. y Nirenberg, M.** (1995). Dorsal-ventral patterning genes restrict NK-2 homeobox gene expression to the ventral half of the central nervous system of *Drosophila* embryos. *Dev. Biol.* 171, 306-316.
- Minami, M., Kinoshita, N., Kamoshida, Y., Tanimoto, H. y Tabata, T.** (1999). *brinker* is a target of Dpp in *Drosophila* that negatively regulates Dpp-dependent genes. *Nature* 398, 242-246.
- Miyawaki, K; Mito, T; Sarashina, I; Zhang, HJ; Shinmyo, Y; Ohuchi, H y Noji, S** (2004) Involvement of Wingless/Armadillo signaling in the posterior sequential segmentation in the cricket, *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera), as revealed by RNAi analysis. *Mech Dev* 121, 119-130
- Mizutani, C. M. y Bier, E.** (2008) Evo/Devo: The origins of BMP signalin in the neuroectoderm. *Nat Rev Genet.*; 9(9), 663-677.
- Mlodzik, M. y Gehring, W.** (1987) Expression of the *caudal* gene in the germ line of *Drosophila*: formation of an RNA and protein gradient during early embryogenesis. *Cell* 48, 465-478
- Morisato, D. y Anderson, K.** (1995) Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Annu. Rev. Genet.* 29, 371-99
- Moussian, B y Roth, S** (2005) Dorsoventral axis formation in the *Drosophila* embryo- Shaping and transducing a morphogen gradient. *Curr Biol* 15, R887-R889.
- Nien, C-Y.; Liang, H-L; Butcher, S.; Sun, Y.; Fu, S.; et al.** (2011) Temporal coordination of gene networks by Zelda in the early *Drosophila* embryo. *PLoS Genet.* 7(10), e1002339.
- Nunes da Fonseca R.; von Levetzow C.; Kalscheuer P.; Basal A.; van der Zee M. y Roth S.**(2008) Self-Regulatory Circuits in dorsoventral axis formation of the short-germ beetle *Tribolium castaneum*. *devcel.* 14 (4) 605-15
- Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E y Kluding H** (1984) Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Wilhelm Roux Arch Entwicklungsmech Org* 193,267-282
- Newfeld, S. J. y Gelbart, W. M.** (1995). Identification of two *Drosophila* TGF-beta family members in the grasshopper *Schistocerca americana*. *J. Mol. Evol.* 41, 155-160.
- Ober K.A. y Jockusch E.L.** (2006) The roles of *wingless* and *decapentaplegic* in axis and appendage development in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Dev Biol* 294, 391-405
- Ohde, T; Masumota , M, Yaguinuma, T y Niimi, T** (2009) Embryonic RNAi analysis in the firebrat, *Thermobia domestica*: Distalless is required to form caudal filament. *J Insect Biotechnol Sericology* 78, 99-105
- Osborne, P. y Dearden, P.K.** (2005). Non-radioactive in-situ hybridisation to honeybee embryos and ovaries. *Apidologie* 36, 113-118
- Padgett, R. W.; St Johnston, R. D. y Gelbart, W. M.** (1987). The *decapentaplegic* gene complex of *Drosophila* encodes a protein homologous to the transforming growth factor B, gene family. *Nature, Lond.* 325, 81-84.
- Pan D.J., Huang J.D. y Courey A.J.** (1991) Functional analysis of the *Drosophila twist* promoter reveals a dorsal-binding ventral activator region. *Genes Dev* 5,1892-1901
- Panfilio, K.A., Liu, P.Z., Akam, M. y Kaufman, T.C.** (2006) *Oncopeltus fasciatus zen* is essential for serosal tissue function in katatrepsis. *Dev.Biol.* 292, 226-243

- Panfilio, K.A.** (2008) Extraembryonic development in insects and the acrobatics of blastokinesis. *Dev.Biol.* 313, 471–491
- Panfilio, K.A.; Roth, S.**(2010) Epithelial reorganization events during late extraembryonic development in a hemimetabolous insect. *Dev.Biol.* 340, 100–115
- Piek, E; Heldin, C.H. y Dijke, P.T.** (1999) Specificity, diversity and regulation in TGF-B superfamily signalin. *The FASEB Journal.* 13, 2105-2124
- Prpic, N.M.**(2004) Homologs of *wingless* and *decapentaplegic* display a complex and dynamic expression profile during appendage development in the millipede *Glomeris marginata* (Myriapoda: Diplopoda). *Frontiers in Zoology*, 1, 6
- Ray, R. P., Arora, K., Nüsslein-Volhard, C. y Gelbart W. M.** (1991). The control of cell fate along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development* 113, 35-54.
- Richards, S; Gibbs, RA; Weinstock, GM; Brown, SJ; Denell, R; Beeman RW; Gibbs, R; Bucher, G; Friedrich,M; Grimmelikhuijzen, CJP, et al** (2008) The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* 452,949-955
- Rivera-Pomar, R. y Jäckle, H.** (1996) From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: filling in the gaps. *Trends Genet.* 12(11), 478-83
- Rogers, B.T.; Peterson, M.D. y Kaufman T.C.** (2002). The development and evolution of insect mouthparts as revealed by the expression patterns of gnathocephalic genes. *Evol Dev* 4, 96-110
- Roth,S. y Schüpbach, T.** (1994) The relationship between ovarian and embryonic dorsoventral patterning in *Drosophila*. *Development* 120, 2245-2257
- Roth, S., Hiromi, Y., Godt, D. y Nüsslein-Volhard, C.** (1991). *cactus*, a maternal gene required for proper formation of the dorsoventral morphogen gradient in *Drosophila* embryos. *Development* 112, 371-388.
- Roth, S.** (2003) The origin of Dorsoventral polarity in *Drosophila*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond* 358, 1317-1329
- Rusch, J. y Levine, M.** (1996). Threshold responses to the dorsal regulatory gradient and the subdivision of primary tissue territories in the *Drosophila* embryo. *Curr. Op. Genet. Dev.* 6, 416-423.
- Rusch, J y Levine, M** (1997) Regulation of a Dpp target gene in the *Drosophila* embryo. *Development* 124, 303-311
- Sanchez-Salazar, J.; Pletcher, M.T.; Bennett, R.L.; Brown, S.J.; Dandam- udi, T.J.; Denell, R.E. y Doctor, J.S.** (1996). The *Tribolium decapentaplegic* gene is similar in sequence, structure, and expression to the *Drosophila dpp* gene. *Dev. Genes Evol.* 206, 237–246.
- Sander, K.** (1976) Morphogenetic movements in insect embryogenesis. In P.A. Lawrence (ed): *Insect Devel- opment*. Oxford: Blackwell Scientific Publ., pp. 35-52.
- Sandmann, T., Girardot, C., Brehme, M., Tongprasit, W., Stolc, V., y Furlong, E.E.** (2007). A core transcriptional network for early mesoderm development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 21, 436–449.
- Schupbach, T y Roth, S** (1994). Dorsoventral patterning in *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 4, 502-507
- Seidel, F.** (1924) Embryonale Entwicklung von *Pyrrhocoris apterus* L., 'Zeits. f. Morph. u. Oekol. Tiere. 1, 429-506

- Shelton, C. A. y Wasserman, S. A.** (1993). *pelle* encodes a protein kinase required to establish dorsoventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 72, 515-525.
- Schenider, D.S.; Hudson, K.L. y Anderson, K.V.**(1991) Dominant and recessive mutations define functional domains of *toll*, a transmembrane protein required for dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 5, 797-807
- Simpson P** (1983) Maternal-zygotic gene interactions during formation of the dorsoventral pattern in *Drosophila* embryos. *Genetics* 105, 615–632
- Spring, J., Yanze, N., Middel, A.M., Stierwald, M., Groger, H., y Schmid, V.** (2000). The mesoderm specification factor twist in the life cycle of jellyfish. *Dev. Biol.* 228, 363–375.
- Steward, R.**(1987) Dorsal, an embryonic polarity gene in *Drosophila*, is homologous to the vertebrate proto-oncogene, c-rel. *Science, New Series*, 238 (4827) 692-694
- Stoven, S.; Ando, I.; Kadalayil, L.; Engstrom, Y. y Hultmark, D.** (2000) Activation of the *Drosophila* NF-kappaB factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage. *EMBO Rep* 1, 347–352.
- The International Aphid Genomics Consortium** (2010). Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Plos Biology* 8: e1000313.
- Thisse, B., Stoetzel, C., Gorostiza-Thisse, C. y Perrin-Schmitt, F** (1988) Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos. *EMBO J* 7,2175–2183
- Tomer, R; Denes, A.S.; Tessmar-Raible, R. y Arendt, D.** (2010) Profiling by image registration reveals common origin of annelid mushroom bodies and vertebrate pallium. *Cell.* 142 (5), 800-809
- Ursic-Bedoya, R;Buchhop, J yLowenberger, C**(2009).Cloning and characterization of Dorsal homologues in the hemipteran *Rhodnius prolixus*. *Insect Molecular Biology* 18(5), 681–689
- van der Biggelaar, J.A.M.; Edsinger-Gonzales, E. y Schram, F.R.** (2002) The improbability of dorso-ventral axis inversion during animal evolution, as presumed by Geoffroy Saint Hilaire. *Contributions to Zoology*, vol.81. <http://dpc.uba.uva.nl/ctz/vol71/nr01/art03>
- van der Zee, M., Berns, N., y Roth, S.** (2005). Distinct functions of the *Tribolium* zerknüllt genes in serosa specification and dorsal closure. *Curr. Biol.* 15, 624–636
- van der Zee, M.; Stockhammer, O; von Levetzow, C; da Fonseca, R. N. y Roth, S** (2006) Sog/Chordin is required for ventral-to-dorsal Dpp/BMP transport and head formation in a short germ insect. *Proc Natl Acad Sci* 103, 16307-16312
- van der Zee, M.; da Fonseca, R.N.; Roth, S.** (2008). TGFbeta signaling in *Tribolium*: vertebrate-like components in a beetle. *Dev. Genes Evol.* 218, 203–213.
- Wasserman, S.A.**(1993) A conserved signal transduction pathway regulating the activity of the rel-like Proteins Dorsal and NF-kB. *Mol. Biol. Cell* 4, 767-771
- Weinstock, G.M.; Robinson, G.E.; Gibbs, R.A.; Worley, K.C.; Evans, J.D.; Maleszka, R.; Robertson, H.M., Weaver, D.V.; Beye, M.; Bork, P.; et al** (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443, 931-949
- Whalen, A.M. y Steward,R** (1993) Dissociation of the Dorsal-Cactus complex and phosphorylation of the Dorsal protein correlate with the nuclear localization of Dorsal. *J. Cell Biol.* 123, 523-534

Werren, J.H.; Richards, S.; Desjardins, C.A.; Niehuis, O.; Gadau, J.; Cobourne, J.K.; Beukeboom, L.W.; Desplan, G.; Elsik C.G., Grimmelikhuijzen, C.J.P., et al (2010) Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* Species. *Science* 327, 343-348

Wilson, M.J y Dearden, P.K (2011) Diversity in insect axis formation: two *orthodenticle* genes and *hunchback* act in anterior patterning and influence dorsoventral organization in the honeybee (*Apis mellifera*). *Development* 138, 3497-3507

Zhang, Yong-Tao;Lander, Arthur D y Nie, Qing(2007) Computational analysis of BMP gradients in dorsal-ventral patterning of the zebrafish embryo. *J. Theor. Biol.* 248, 579-89

Anexo

1. Soluciones

10x PBS: 320g NaCl
8g KH₂PO₄
46g Na₂HPO₄

llevar a Vf= 4lts con dH₂O, llevar a pH7,4 con HCl.

PBTw: 1xPBS
0,1% Tween 20

mezclado por 15' y **AUTOCLAVADO OPCIONAL**

Solución Fijadora: [50mM EGTA-Na₂ (PM=380,35)+ 10%PFA en 1xPBS]. Para 50ml:
0,95g EGTA-Na₂ llevar a hervor en 40ml de H₂O, agregar
5ml PFA,

disolver, llevar a pH=7 con HCl, llevar a Vf con H₂O y filtrar con filtro Whatman 1MM, alicuotar de a 10ml y almacenar a -20°C.

Proteínasa K stock: 10 mg/ml en dH₂O, alícuotas de 100µl a -20°C.

Mezcla de detergente RIPA: [150mM NaCl,1% NP-40, 0,5% deoxicolato de sodio, 0,1% SDS, 50mM EDTA (PM= 372,24), 50mM Tris-HCl (PM= 157,59) pH8,0] . Para 50ml:

0,44g NaCl
0,93g EDTA
0,39g Tris-Hcl (o 833µl de Solución 3M)
5ml NP-40 (10%)
2,5ml deoxicolato de Na (10%)
0,5ml SDS (10%)

Llevar a Vf con H₂O.

Buffer Alcalino: [100 mM TRIS pH 9,5 (PM= 121,14)+ 100 mM NaCl (PM= 58,44) + 0,1% Tween-20]

Para 50ml (agregar en orden y llevar a Vf con H₂O):

(1M Tris: 0,121g/ml - para 10ml: 1,2114g Tris en 8ml de H₂O, llevar a pH con HCl y luego a Vf)

5ml 1M Tris pH9,5
0,29g NaCl
0,25ml 20%Tween-20

20x SSC: (según Maniatis, pág. 1870) = [3M NaCl; 0,3M Citrato de Na]

175,3g NaCl
88,2g Citrato de Na

Disolver en 800ml de H₂O.

Ajustar a pH 7,0 con una sn. de 14N de HCl (¡unas pocas gotas, no pasarse!).

Ajustar el volumen a 1lt con H₂O. Alicuotar.

Hybe: Solución de Hibridación (almacenar a -20°C); Vf=50ml

25ml formamida

12,5ml 20xSSC

1ml DNA de testículo de salmón sonicado
[10mg/ml] (-20°C; hervir 10' y enfriar en baño
de EtOH a -20°C.

250µl tRNA de levadura (tRNA de *Torula sp.*)
[20mg/ml] (alícuotas a -20°C)

25µl Heparina Stock [100mg/ml] (-20°C)

1ml 20% Tween-20 (concentración final: 0,1%)

por
competencia,
eliminan
inespecificidad
en la unión de la
sonda

Llevar a pH5.0 con HCl (o ácido cítrico)

Llevar a Vf: 50ml con dH₂O.

Hybe-B: [50% formamida; 5xSSC; 0,1%Tween-20]. Para 50ml:

25ml formamida

12,5ml 20xSSC

0,25ml 20% Twenn-20

Llevar a Vf con agua

Hybe-C: [50%formamida, 2xSSC, 0,1%Tween-20]. Para 50ml:

25ml formamida

5ml 20xSSC

0,25ml 20% Twenn-20

Llevar a Vf con agua

Solución de hibridación-anticuerpo: [PBTw, 2mg/ml albúmina de suero bovino

(BSA), 5% suero normal de cabra]

20µl 20% Tween-20

200µl BSA [10mg/ml]

50µl suero normal de cabra [100%]

Llevar a Vf= 2ml con H₂O.

2x Buffer carbonato: [120mM Na₂CO₃, 80mM NaHCO₃, pH 10,2] =

50ml ddH₂O

0,64g Na₂CO₃

3,36 NaHCO₃

Frizar alícuotas a -20°C.

Solución de Stop: [0,2M NaAc, 1% HAc., pH6,0] =

50ml H₂O bidestilada estéril
3,33ml 3M NaAc.
0,5ml HAc.

Líquido de montaje

6g **glicerol** (p.A.)
2.4 g **Mowiol** 4-88 (Calbiochem #475904)
6 ml **ddH₂O**
Agregar 12 ml de **Tris** pH 8.5 0.2 M.

- Agitar por 12-24 horas a temperatura ambiente. Dejar reposar por 2-3 horas (el mowiol nunca se disuelve completamente)
- Incubar a 50 grados por 10 min.
- Centrifugar a 5000g por 15 min.
- Hacer alícuotas y guardar a -20 C.

Nota: cuando se descongela asegurarse que la solución de Mowiol llegue a temperatura ambiente antes de montar el espécimen. Si no se van a formar burbujitas al tiempo de preparar la muestra.

Se puede agregar **0.1 % DABCO** (Diazobis(ciclo-octano)), que es lo que usa Molecular Probes en el líquido de montaje Slow-Fade. Es barato, se puede comprar en Aldrich (# D2,780-2).

2. Solución de problemas en la hibridación *in situ*

Una buena tinción y una buena morfología son casi mutuamente excluyentes. Las condiciones de hibridación (duración, pH, T^o) y el tratamiento con proteasas deben balancearse de modo tal que los embriones no se desintegren. Para facilitar el mantenimiento del balance preparar por anticipado grandes cantidades de PBTw, Solución Fijadora, Hybe, sondas, embriones y proteasa en alícuotas.

* **Si los embriones se disuelven** durante la hibridación, se desintegran o se pegotean durante los lavados después de la hibridación o durante la tinción:

- asegurarse de que la solución de hibridación esté a pH5, a 70°C los embriones se desintegran si el pH es 7,5.
- variar el tratamiento con proteinasa K: muy bajas concentraciones provocan una señal débil y mucho fondo de tinción. Concentraciones demasiado altas causan pérdida de señal y mala morfología. Los resultados muy variables se pueden deber a variaciones de Temperatura ambiente., pH del PBTw, lote de la enzima, tiempo de almacenamiento previo de los embriones en EtOH (probar con 5µl de proteasa para embriones frescos), y contaminación con trazas de PFA.
- a 70°C no se debe hibridar un tiempo mayor a 12hs.
- importante: durante los lavados luego de la hibridación, rotar los embriones suavemente moviendo los tubos manualmente de tiempo en tiempo, no agitar en

agitador orbital; asegurarse de que los embriones no estén deformados por la tensión superficial cuando quedan atrapados entre burbujas de aire y plástico.

*** Mucho fondo / baja señal:**

- Preabsorción de anticuerpo primario

Cuando los anticuerpos no son suficientemente puros, puede haber fondo de tinción por uniones inespecíficas. Si esto ocurre, debe hacerse una preabsorción (por única vez, cuando se usan anticuerpos nuevos), usando embriones que se descartarán luego del tratamiento. Así se elimina todo aquello que se une al embrión de manera inespecífica.

Lavar 0,5ml de embriones preparados en PBTw (W W W W20 W20)

Agregar:

15ml PBTw

300µl suero de cabra (=2%; para bloquear y para estabilizar el anticuerpo)

7,5µl anticuerpo policlonal anti-Dig (p.ej. 1:2000)

150µl de 10% NaN₃ (=0,1%; antibiótico; alícuotas frizadas)

500µl embriones preparados

Rotar O.N. a 4°C o 4hs. a temperatura ambiente.

- Digestión con proteinasa K:

Si la tinción es insuficiente, es probable que sea necesario agregar este paso entre los pasos 5 y 6 de la hibridación

1.- incubar 5' en 1ml PBTw + 1µl de proteinasa K [10mg/ml]¹. (T°amb=25°C). Agitar los tubos x 4', dejar los embriones precipitar por 1'. Detener inmediatamente procediendo con el siguiente paso.

2.- R R con PBTw

3.- pos-fijar de nuevo con 500µl PBTw + 500µl de solución fijadora x 20' en agitación.

4.- R R W R con PBTw

- controles negativos: embriones con delección para el gen en cuestión para hibridación inespecífica y embriones sin sonda para la pureza del anticuerpo

- reducir la cantidad de sonda; comprobar la hidrólisis de la sonda; comprobar que la sonda reconozca solamente el inserto del vector.

- preabsorber muy bien el anti-Dig (3x si es necesario).

- incrementar la concentración de proteinasa, duración de hibridación o variar el pH del Hybe (pH 5 – 7)

- incrementar la T° durante la hibridación

- cuando están bajos los mRNAs que normalmente son abundantes, el tratamiento del PBTw con DEPC y el trabajo en condiciones estériles son importantes; los guantes no son necesarios si se tiene el cuidado de no tocar las regiones interiores del tubo

¹ Varía con la muestra, para **poner a punto el tiempo** correcto, colocar los embriones en una pequeña placa de Petri, en agitación y observarlos cada minuto, realizar una "curva de destrucción", la mitad del tiempo requerido para que empiecen a romperse es el tiempo de incubación.

- el tratamiento con RNAsa después de la hibridación no sirve: reduce la señal e incrementa el fondo de tinción (incluso a 5µg/ml)

* **formas precipitadas durante la reacción de tinción:**

- precipitados amorfos y descoloridos, si el buffer de tinción está contaminado con PBT.
- manchas amarillas/marrones a veces aparecen en tinciones O.N. El buffer de tinción debe prepararse fresco y la solución debe mezclarse cada vez que se agrega un componente.
- pequeños cristales azules en los embriones: guardar los embriones teñidos para el montaje solamente en EtOH 70º a Tºamb.

* **Los embriones se aglutinan en una gota de agua en el histoclear:**

- volver a ponerlos en EtOH, deshidratar mejor

* **Los embriones se contraen, arquean y oscurecen al contacto con el histoclear o el medio de montaje:**

- hacer el pasaje del EtOH al histoclear en pequeños pasos: usar histoclear premezclado en EtOH 10%, 20%, 50%, 100%.
- montaje: primero dispersar los embriones en el porta, luego agregar el medio de montaje a los lados, rodeándolos. Mezclar y distribuí suavemente inclinando el porta.

* **Histomount** (National Diagnostics, equivalente a Histoclear) **vs. Permout** (Fisher Scientific): en Permout los embriones son un poco menos transparentes, pero la óptica de Normarski es mucho mejor.

* Sondas de DNA: hacer la hibridación y prehibridación a 48ºC, hervir y enfriar la sonda antes de agregar a los embriones. Usar pH mayor para el Hybe (hasta 7).