

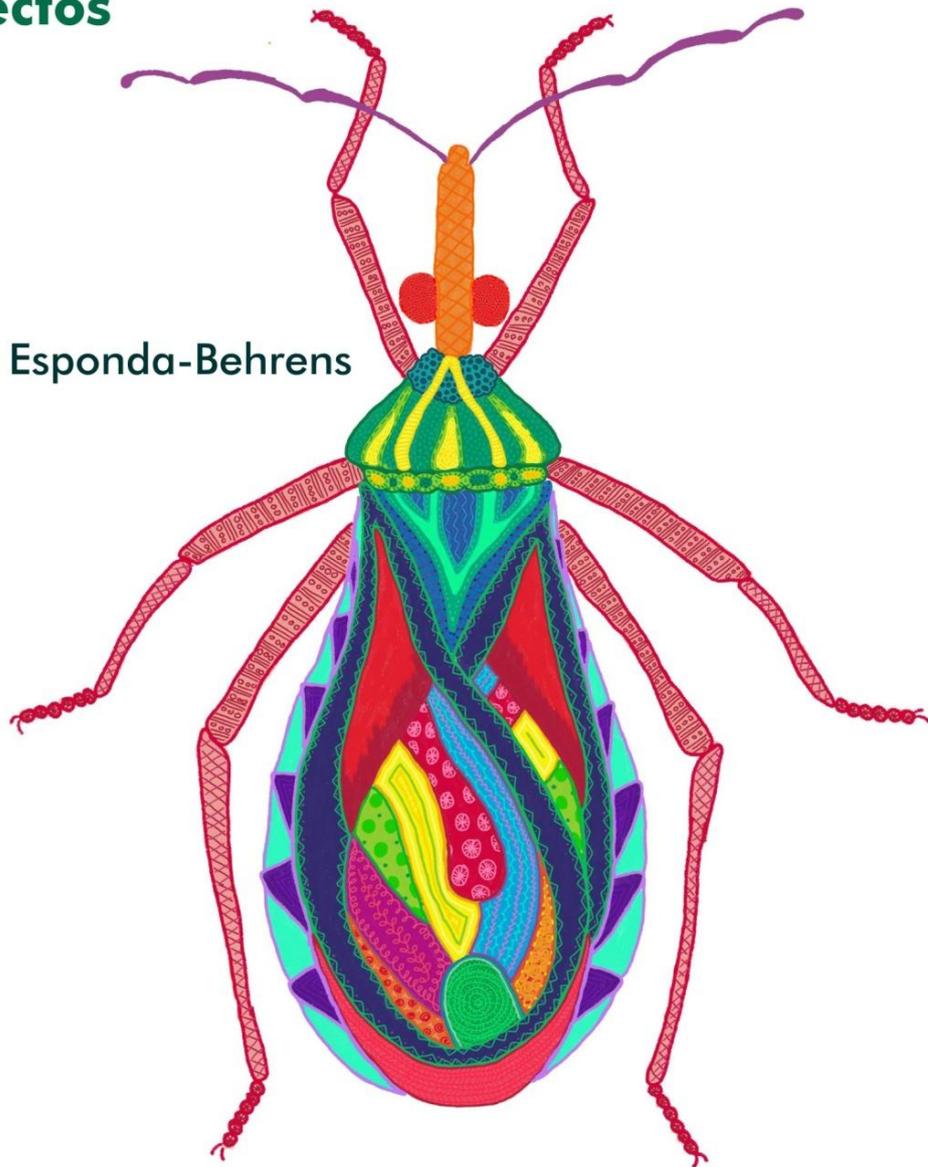


Facultad de Cs. Naturales y Museo
Universidad Nacional de La Plata



Estudios funcionales comparados de la evolución de la segmentación en insectos

Natalia I. Esponda-Behrens
2013



Director
Dr. Rolando Rivera-Pomar
CREG-FCE-UNLP

Co-director
Dr. Javier Muzón
ILPLA-FCNyM-UNLP

“... a reduccionist chooses a suitable model organism such as Drosophila melanogaster on which to work and considers variation to interfere with experiments and to obscure fundamental elements of ontogeny. An evolutionary biologist, however, delights in the differences and more likely than not is an expert on the systematics, ecology, behavior, zoogeography, paleontology, and/or phylogeny of the organisms on which he or she works.”

Heming, 2003

Abreviaturas

αDig-AP: anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado con Fosfasata Alcalina
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN copia
AEL: postpuesta
ANT-C: complejo Antennapedia
A-P: eje anteroposterior
Arg: arginina
ARN: ácido ribonucleico
ARNdc: ácido ribonucleico doble cadena
ARNi: interferencia de ARN
ARNm: ARN mensajero
BG: banda germinal
BLAST: *basic local alignment search tool*
BX-C: complejo Bithorax
cad^{ARNi}: ARNi de *cad*
CDS: *coding DNA sequence*
CRE: *cis-regulatory elements*
dAEL: días postpuesta
DAPI: 4',6'-diamino-2-fenilindol
D-V: eje dorsoventral
D-P: eje distal-proximal
e.g.: *exempli gratia*
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EGTA: etilen glicol ácido tetraacético
EST: *expressed sequence tags*
dNTP: trifosfato deoxirribonucleotido
DMSO: dimetilsulfoxido
dH2O: agua destilada
ETOH: etanol
EvoDevo: *evolution and development*
Fig.: figura
Fw: *foward* (aplicado a los *primers*)
GRN: *gene regulatory networks*
H1, H2, H3: hélices 1, 2 y 3 del HD, respectivamente
HAc.: ácido acético
hAEL: horas postpuesta
HAR: *human accelerated regions*
HD: homeodominio
HGT: *horizontal gene transfer*
HOM-C: Complejo Homeótico
i.e.: *id est*
lncRNA: *long non coding RNA*
KOH: hidróxido de potasio
LUCA: *last universal common ancestor*
M: molar
M1: Metionina 1
miRNA: *micro RNA*
mM: milimolar
μM: micromolar
μl: microlitros
METOH: metanol
NBT/BCIP: nitro-blue tetrazolium cloro/5-bromo-4-cloro-3'-indolyfosfato p-toluidino
NCBI: *national center for biotechnology information*
O.N.: *over night*

ORF: *open reading frame*
pb: par de bases nucleotídicas
PCR: *polimerase chain reaction*
PBS: *phosphate buffer saline*
PBT: PBS con detergente Tween 20
PFA: paraformaldehído
PS: parasegmento
RACE: *rapid amplification of ADNc ends*
rNTP: trifosfato de ribonucleótido
R-OH: alcohol (inespecífico)
Rv: *reverse* (aplicado a los *primers*)
Scr^{ARNi}: ARNi de *scr*
SSC: *buffer salino sodio-citrato*
T°a : temperatura de *anealing*
T°_{Taq} : temperatura de trabajo de la Taq
TF: *transcription factor*
Trp: triptófano
U: unidades enzimáticas
Vf : volumen final
Vol.: volumen
WMISH: *whole mount in situ hybridization*
wt: *wild type*

Genes:

cad: *caudal*
scr: *sex combs reduced*
pb: *proboscipedia*
lab: *labial*
antp: *antennapedia*
dfd: *deformed*
ubx: *ultrabithorax*
abdA: *abdominal A*
abdB: *abdominal B*
en: *engrailed*
eve: *even skipped*
hb: *hunchback*
Kr: *Krüppel*
bcd: *bicoid*
otd: *orthodenticle*
nos: *nanos*
kni: *knirps*
gt: *giant*
run: *runt*
odd: *odd skipped*
prd: *paired*
slp: *sloppy paired*
wnt: *wingless related*
fgf: *fibroblast growth factor*
hh: *hedgehog*
wg: *wingless*
ftz: *fushi tarazu*
zen: *zerknült*
z2: *zerknült 2*
exd: *extradenticle*
dll: *distal-less*
btd: *buttonhead*
ems: *empty spiracles*
cnc: *cap'n collar*
col: *collier*
croc: *crocodile*
kn: *knot*

Resumen

La presente tesis comprende una revisión del desarrollo de *Rhodnius prolixus* (Stähl, 1859); anotación de genes del desarrollo temprano y estudios de expresión y funcionales de dos de esos genes. El objetivo general ha sido aportar datos que contribuyan a establecer redes génicas como blanco de la evolución de la forma en los insectos. Los objetivos específicos fueron: Identificar y anotar en el genoma de *R.prolixus* genes ortólogos a los genes *HOX* de *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830); caracterizar el *cluster HOX* y determinar la función de genes *HOX* mediante genómica funcional.

Se identificaron 70 genes, la mayoría de ellos correspondientes al grupo de TF con homeobox. Se analizaron, curaron y anotaron 26 secuencias; incluyendo a los ocho *HOX* canónicos. Se logró demostrar que los genes *HOX* de *R.prolixus* están agrupados en un *cluster* y se plantean cinco agrupamientos probables.

Los ensayos funcionales se realizaron usando un gen *HOX –scr–* y un activador *HOX –caudal–* involucrado en el establecimiento del eje anteroposterior. Para ello, se pusieron a punto las técnicas de hibridación *in situ* de embriones completos –WMISH– y de ARNi parental. La expresión de *scr* mostró un patrón acorde a lo esperado en relación a las observaciones hechas en otros insectos. La ARNi mostró variantes en comparación con especies relacionadas, pero se ajusta muy bien a lo esperado. La expresión de *caudal* muestra las siguientes similitudes con respecto a otras especies estudiadas: (1) actúa tempranamente como gen de efecto materno, (2) se expresa en la región posterior del huevo en estado de blastodermo, (3) los efectos de la ARNi son semejantes a los encontrados en otros insectos de banda germinal corta. Sin embargo, en estados de banda germinal, los resultados de expresión difieren respecto a otras observaciones, esto puede estar en relación con mecanismos de señalización aún no descritos para este gen.

Abstract

This thesis deals with the embryology of the *Rhodnius prolixus* (Stähl, 1859), the establishment of functional techniques in this new developmental model (whole mount *in situ* hybridization –WMISH– and parental RNAi), the annotation of early developmental genes, and the functional assay for two of those genes, *sex combs-reduced* (*Rp-scr*) and *caudal* (*Rp-cad*). The aim of the investigation is to contribute to define and understand the basic components of developmental genetic networks that are target of evolutionary processes that shape insect morphology. The goals are to identify and annotate orthologs to the *HOX* genes of *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) in the *R. prolixus* genome, characterize the *HOX* cluster and determine the *HOX* function in *R. prolixus* by means of functional genomics.

Seventy genes were identified, mostly homeobox-containing transcription factors. Twenty six sequences were analysed in detail, cloned and annotated, including the eight canonical *HOX*. The results showed that the *HOX* genes of *R. prolixus* are clustered and five plausible organizations were proposed.

The functional assays were performed by using the *HOX* gene *Rp-scr* and the activator *Rp-cad*, involved in the anteroposterior axis patterning. *Rp-scr* expression was similar to other insects. *Rp-scr* RNAi showed some variants compared to related species, but it was in agreement with its known function, which was relevant to validate the techniques developed. *Rp-cad* expression showed that (1) it function early as a maternal gene, (2) it is expressed in the posterior of the egg in blastoderm stage, (3) the RNAi effects shows a posterior-to-anterior effect. In the germband stage, the expression suggests a long distance signalling mechanism at work.

Índice

Introducción	1
A.- Presentación.....	1
B.- <i>Rhodnius prolixus</i> como modelo de estudios del desarrollo	2
C.- Objetivos y logros	3
D.- Criterios de escritura.....	4
Capítulo 1 - De Haeckel a la genómica funcional	5
A.- Marco histórico	6
B.- Marco teórico: Competencias e intereses de la EvoDevo	8
C.- Tipos de desarrollo embrionario en los insectos.....	12
D.- El desarrollo embrionario de insectos de banda germinal corta	16
E.- Evolución genómica	20
E.1.- Evolución genómica y EvoDevo: duplicación génica	24
E.2.- Evolución genómica y EvoDevo: Los genes homeobox	25
E.3.- Evolución genómica y EvoDevo: <i>clustering HOX</i>	27
E.4.- Evolución genómica y EvoDevo: mutaciones en <i>cis</i> y cambio morfológico.....	31
F.- Capacidad evolutiva	37
G.- Ajuste fenotípico	40
H.- ¿Existe la evolución lamarckiana?.....	42
I.- Es lo mismo pero no es igual: de qué hablamos cuando hablamos de homología	44
J.- La evolución del desarrollo en insectos	48
J.1.- Desarrollo de los insectos: estados pre-filotípicos	48
J.2.- Patrones moleculares y desarrollo temprano en insectos	51
J.2.1.- Estados prefilotípicos	51
J.2.2.- Estado filotípico (segmentación y banda germinal)	54
J.3.- Formas larval y adulta: estados post-filotípicos	61
J.4.- Patrones moleculares en estados embrionarios medios	62
J.5.- Algunas discusiones sobre las estructuras torácicas adultas	71
J.6.- Algunas discusiones sobre las estructuras cefálicas adultas	78
K.- En resumen	87
Capítulo 2 - Anotación de TF en <i>Rhodnius prolixus</i>	89
A.- Introducción	90
B.- Materiales y métodos.....	90
B.1.- El proceso de identificación y anotación de genes por la vía bioinformática	90
B.2.- Reconstrucción teórica de secuencias grandes: <i>cluster HOX</i>	92
C.- Resultados	96
C.1.- Identificación y anotación de genes	96
C.2.- Observaciones sobre el genoma de <i>Rhodnius prolixus</i>	115
C.2.1.- Estado y calidad del genoma secuenciado de <i>Rhodnius prolixus</i>	115
C.2.2.- Dos casos testigo: <i>proboscipedia</i> y <i>abdominalB</i>	117
C.3.- Aproximación al <i>cluster Hox</i> de <i>Rhodnius prolixus</i>	120
C.3.1.- Completud, conectividad y calidad de los <i>supercontigs</i> que contienen genes asignables al <i>cluster HOX</i>	121
C.3.2.- Cinco hipótesis sobre el ordenamiento del <i>cluster HOX</i> de <i>Rhodnius prolixus</i>	125
D.- Discusión	128
Capítulo 3 – La biología del desarrollo de <i>Rhodnius prolixus</i>	132
A.- Introducción	133
B.- Materiales y métodos.....	134

B.1.- Mantenimiento y manipulación de la colonia de <i>Rhodnius prolixus</i>	134
B.2.- Manipulación de huevos y embriones.....	135
B.3.- Tinciones y toma de imágenes	138
C.- Resultados	138
C.1.- El desarrollo de <i>Rhodnius prolixus</i>	138
C.2.- Foco sobre las estructuras cefálicas	145
D.- Discusión	150
Capítulo 4 - Análisis funcionales y de expresión	154
A.- Introducción	155
B.- Materiales y métodos.....	155
B.1.- Amplificación, clonación y secuenciación.....	158
B.2.- WMISH y preparación de sondas	158
B3.- ARNi y generación de ARNdc.....	158
B4.- Preparados cuticulares	159
B5.- Microscopía y toma de imágenes	159
C.- Resultados	159
C.1.- Validación de los métodos <i>in silico</i> – secuenciación y clonación	159
C.2.- Análisis de eficiencia de la ARNi basado en los resultados de <i>cad</i> y <i>scr</i>	165
C.3.- Ensayos de expresión: <i>scr</i> -WMISH	167
C.4.- Ensayos funcionales: <i>scr</i> ^{ARNi}	169
C.4.1.- Fenotipo normal e interferido de peines tibiales	169
C.4.2.- Fenotipo labial normal e interferido.....	170
C.5.- Ensayos de expresión: <i>cad</i> -WMISH	174
C.5.1.- Tinción de ovarias	174
C.5.2.- Tinción de huevos completos	175
C.5.3.- Tinción de bandas germinales disectadas	177
C.6.- Ensayos funcionales: <i>cad</i> ^{ARNi}	177
C.6.1.- Terminalia en larvas salvajes y en fenotipos de interferencia.....	177
C.6.2.- Embriones salvajes e interferidos.....	179
C.6.3.- ¿Fenotipos extremos o fenotipos extra?.....	186
D.- Discusión	188
Consideraciones finales	199
En resumen.....	204
Perspectivas futuras	205
Gracias	206
Bibliografía	207
ANEXO I: Protocolos, soluciones, instrumental y mantenimiento de la colonia	216
ANEXO II: Alineamientos de referencia para la anotación de genes	230
ANEXO III: Información adicional sobre genes anotados	244
ANEXO IV: Otros genes anotados.....	247
ANEXO V.1: <i>pb</i> según ensamblado versión 1.0	251
ANEXO V.2: <i>abdB</i> según trazas y ensamblado versión 1.0	255
ANEXO VI: unión de <i>supercontigs</i> C8957+1041.....	257
ANEXO VII: Estructuras cefálicas.....	260

Introducción

A.- Presentación

El presente trabajo comprende una revisión del desarrollo de *Rhodnius prolixus* (Stähl, 1859) (Hemiptera, Reduviidae) (**Fig.I.1**), identificación y análisis *in silico* de genes del desarrollo temprano, principalmente factores de transcripción con homeobox –TF, del inglés *transcription factors*–; estudios de expresión y funcionales de dos de esos genes y estudios regulatorios parciales de uno de ellos. *R.prolixus* es una vinchuca del norte de Suramérica que ha sido usada desde hace un siglo como modelo de estudios embriológicos y que tiene interés sanitario, ya que es vector de la enfermedad de Chagas-Mazza.



Fig.I.1. *Rhodnius prolixus*. Adulto a punto de alimentarse. Imagen extraída de <http://www.bc.edu/schools/cas/biology/research/infect/chagas.html>

Existen dos modos principales de abordar los estudios del desarrollo de los animales. Uno de ellos se basa en tratar de entender cómo ocurren los procesos que conducen a la formación de un organismo multicelular complejo, adulto, a partir de una célula huevo; es decir, las causas próximas. El otro, consiste en observar esos mismos eventos en diferentes organismos con distintos grados de relación filogenética, con miras a comprender procesos evolutivos y contribuir a nuestro conocimiento sobre esas mismas relaciones filogenéticas; es decir, las causas últimas.

Desde las dos últimas décadas del siglo XX, los estudios comparados provenientes del campo del desarrollo con una perspectiva evolucionista, han adquirido nueva relevancia. Durante este breve lapso, hubo una explosión de trabajos sobre genética del desarrollo, que dio impulso a un campo denominado EvoDevo, término resultado de la contracción de la expresión inglesa *evolution and development*.

El crecimiento de este campo aporta datos a algunas discusiones teóricas fundamentales dentro del marco evolutivo –por ejemplo, respecto a si las diferencias entre los mecanismos macro y microevolutivos se deben a una cuestión de escalas o si son procesos cualitativamente distintos–. Sin embargo, este abordaje no es nuevo y sus orígenes se remontan a los tiempos en que Charles Darwin y Alfred Wallace publicaron las bases de la actual teoría evolutiva.

Los datos presentados en este trabajo pueden ser utilizados tanto en el estudio de las redes y procesos del desarrollo de *R.prolixus*, como en estudios comparativos en el marco de la EvoDevo –mis intereses personales se inclinan hacia el segundo caso–. El cuerpo de datos de la EvoDevo es relativamente nuevo en la historia de la Biología, sin embargo su desarrollo sería muy extenso para una introducción. Por ese motivo, el primer capítulo consiste en una revisión bibliográfica, donde expongo los marcos histórico y teórico de la EvoDevo y el estado de los conocimientos actuales sobre las relaciones entre evolución, desarrollo de los insectos, morfología adulta y genoma. Los siguientes capítulos contienen los aspectos experimentales del trabajo de tesis, separados en tres módulos: anotación de secuencias; descripción del desarrollo de *R.prolixus* y estudios funcionales. Finalmente, se presenta una discusión general, conclusiones y perspectivas.

B.- *Rhodnius prolixus* como modelo de estudios del desarrollo

Rhodnius prolixus es un hemíptero, presenta un desarrollo hemimetábolo donde su estado larval es semejante al adulto; las principales diferencias consisten –además del tamaño– en que el último tiene alas y genitalia desarrolladas. Es relativamente fácil de criar en laboratorio y tiene un ciclo de vida más corto que los observados en otras especies de la familia Reduviidae –en condiciones óptimas, se puede reducir a unos 4 o 5 meses– (Fig.I.2).

Su posición en la filogenia de los insectos es intermedia entre los grupos más basales y los holometábolos. Por ello, el modelo hemíptero es interesante para estudios de la forma: al no pasar por un estado pupal, se puede observar la formación de estructuras semejantes a las que estarán presentes en el adulto, entre ellas los apéndices. En *Drosophila melanogaster*, como en otros holometábolos, es imposible

realizar este tipo de estudios directos, ya que el adulto se reconstruye a partir de unas pocas células provenientes de los discos imaginales larvales.

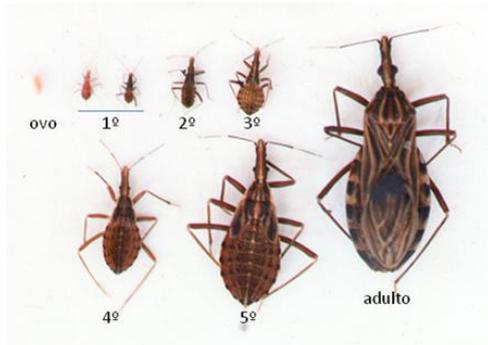


Fig.I.2. Estados de *Rhodnius prolixus*.

Imagen extraída de

http://rhodnius.iq.ufrj.br/English/index.php?option=com_contentandview=articleandid=1:rhodnius-prolixus

Una ventaja adicional de *R.prolixus* es que su genoma ha sido secuenciado, proceso que ocurrió de manera paralela al desarrollo del presente trabajo. El Centro Regional de Estudios Genómicos –CREG–, forma parte del consorcio de secuenciación genómica, por lo que tuve oportunidad de presenciar todas las etapas, desde la ausencia inicial de datos hasta el ensamblado final. Otro modelo hemíptero, *Oncopeltus fasciatus* (Dallas, 1852), ha sido muy usado para estudios del desarrollo; sin embargo, *O.fasciatus* no cuenta actualmente con datos de secuencia genómica.

El ensamblado final de un genoma nunca llega al punto de resolución de los cromosomas reales, debido a limitaciones de la técnica. La información, incluso la más completa, permanece dispersa en miles de *supercontigs* o *scaffolds*. En el caso de *R.prolixus*, la máxima resolución lograda es de aproximadamente 50.000 *supercontigs*.

C.- Objetivos y logros

Los estudios presentados aquí comparten el objetivo general de aportar datos que contribuyan a establecer redes génicas como blanco de la evolución de la forma en los insectos. Los objetivos específicos fueron los siguientes:

1. Identificar y anotar en el genoma de *R.prolixus* genes ortólogos a los genes *HOX* de *D.melanogaster*.
2. Caracterizar el *cluster HOX* de *R.prolixus*
3. Determinar la función de genes *HOX* en *R.prolixus* mediante genómica funcional; concretamente, ensayos de expresión y de interferencia de ARN –ARNi–.

El primer objetivo fue ampliamente superado, ya que se identificaron alrededor de 70 genes, la mayoría de ellos correspondientes al grupo de TF con homeodominio. De estas 70 secuencias, 28 están analizadas, curadas y anotadas; incluyendo a los ocho *HOX* canónicos. Cinco genes *HOX* y algunos otros TF están clonados y listos para usarse en estudios funcionales futuros. También queda demostrado que los genes *HOX* de *R. prolixus* están agrupados en un *cluster* y se presentan cinco agrupamientos probables.

Además, se establecieron las condiciones de trabajo para las técnicas de hibridación *in situ* de embriones completos (WMISH, del inglés *whole mount in situ hybridization*) y de ARNi parental. Los ensayos funcionales se realizaron usando el gen *HOX sex combs reduced* –*scr*– y el activador *HOX caudal* –*cad*– involucrado en el establecimiento del eje anteroposterior –A-P–.

D.- Criterios de escritura

Opté por la castellanización de la mayor parte de los términos, y los traduje del inglés tanto como fue posible. Sin embargo, en muchos casos es difícil encontrar equivalentes en castellano, o su traducción es tan infrecuente que dificulta la comprensión; por eso algunos términos, se mantienen en el inglés original. En algunos casos, la expresión castellana aparece acompañada de su expresión inglesa para evitar ambigüedades. La mayoría de las siglas se mantienen tal como se encuentran habitualmente en la literatura en inglés.

El formato de las citas bibliográficas corresponde al de la revista *Developmental Biology*.

Las secciones de “Materiales y métodos” y “Resultados” tienen un tono neutro, sin embargo recurro al uso de la primera persona en las discusiones y comentarios a modo de discusión, y en aquellas situaciones que, de otro modo, debería referirme a mí misma en tercera persona.

Cada capítulo de análisis y experimentos tiene una estructura interna que consiste en una introducción específica, materiales y métodos, resultados y discusión. Dada la diversidad metodológica y temática, consideré así se facilitaría la lectura, ya que aumenta la proximidad e inmediatez de las referencias dentro de cada unidad de texto.

Capítulo 1

De Haeckel a la Genómica funcional



A.- Marco histórico

Ernst Haeckel –especializado en invertebrados– y Carl Gegenbaur –especializado en vertebrados–, contribuyeron a crear una morfología evolutiva, en lo que **Olsson et al. (2010)** llaman la pre-historia de la EvoDevo. Haeckel usó el término “desarrollo” a distintos niveles: desarrollo del individuo, desarrollo en el tiempo evolutivo y desarrollo de formas en el registro fósil. Puso énfasis en este paralelismo tripartito a nivel filético –paleontológico–, bióntico –individual– y sistemático; sobre el cual desarrolló su “ley fundamental del desarrollo orgánico”, o “ley biogenética” (**Haeckel, 1866; Olsson et al.; 2010**), basada en la idea de la recapitulación (**Fig.1.1**).

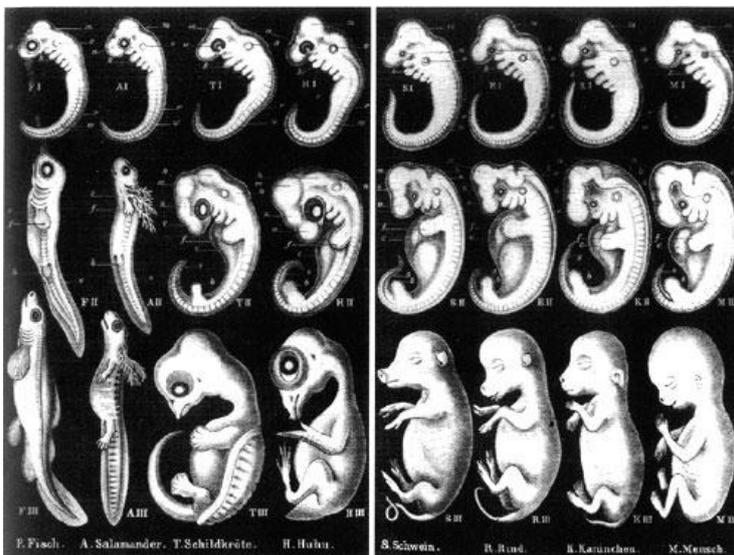


Fig.1.1. Embriones de vertebrados. Dibujos tradicionales de Haeckel, comparando embriones de vertebrados. (Fig. extraída de **Haeckel, 1874**)

A pesar de estas raíces profundas de los estudios embriológicos dentro la teoría evolutiva, la Síntesis Moderna –preponderante en el pensamiento evolucionista del siglo XX– ha prescindido de las observaciones del campo del desarrollo. Esta síntesis se basó principalmente en la fusión de los conceptos provenientes del darwinismo y de la genética mendeliana –que explica el mecanismo de la herencia– y de poblaciones –que explicaría los cambios observados en tiempo evolutivo–. No se prestó tanta atención a otras ramas de la genética, como la genética del desarrollo, y esto tuvo implicancia en las discusiones que se suscitaron más adelante –entre los años '40 y los '80– respecto a los mecanismos evolutivos; especialmente en lo referente a gradualismo *versus* equilibrio puntuado. Tradicionalmente, se considera que ha habido una separación histórica entre la biología evolutiva y la del desarrollo (**Hall, 2003a;**

Love and Raff, 2003; Olsson et al., 2010). Thomas Morgan se presenta como ejemplo de biólogo que se dedicó a estudios del desarrollo y estudios genéticos, y que sin embargo sostuvo la idea de que ambos campos debían permanecer separados. Así, la literatura predominante sostiene que hubo un gran hiato, durante el siglo pasado, en el que las dos disciplinas corrieron por distintas vías.

Hay desacuerdos acerca de en qué momento surge la EvoDevo como cuerpo teórico moderno. Para algunos, aparece como resultado del ímpetu dado por la publicación de **Stephen J. Gould (1977)**, “Ontogenia y filogenia”; para otros, con el descubrimiento de los genes *HOX* (**Lewis, 1978; Gehring, 1985**), mientras que para otros, con los trabajos de John T. Bonner sobre los orígenes de la multicelularidad (**Bonner, 1955**). Sin embargo, **Hall (2003a)** propone remontarse a los tiempos del propio Darwin, cuyo trabajo impulsó la aparición de los primeros estudios en el campo. Hall establece una línea que incluye a C. Darwin; E. Haeckel; Richard Goldschmidt; Gavin Raylands de Beer y S. J. Gould.

Olsson et al. (2010) consideran que esta línea argumental está centrada en el mundo anglo-americano. Ellos revisan los antecedentes de la EvoDevo –ocurridos en gran parte durante los años de la “Cortina de Hierro”– y destacan los trabajos de algunos científicos del Este durante ese período; algunos de estos trabajos tienen paralelos occidentales más conocidos. También traen a la memoria a científicos de Occidente que han hecho aportes importantes y no han sido suficientemente reconocidos. Entre ellos destacan, empezando por el propio Haeckel, a Carl Gegenbaur, Fritz Müller, Wilhelm His, “los hermanos Hertwig” (Oscar y Richard), Aleksej Sewertzoff, Ivan Schmalhausen, Nikolai Timoféeff-Ressovsky, G.R. de Beer, Victor Franz, Rupert Riedl y Pere Alberch.

Eldredge y Gould (1972) formalizaron un concepto teórico que constituyó quizá el primer desafío que puso seriamente en jaque a la mirada estrictamente gradualista. Si bien puntos de vista saltacionistas –como el de Goldschmidt– no estuvieron ausentes, han sido siempre perspectivas marginales; expuestas a críticas ácidas. Pero la postulación del concepto de “equilibrio puntuado” formalizó una base teórica que logró aceptación en buena parte de la comunidad científica. Paleontólogos y embriólogos han tenido habitualmente miradas que se alejan del gradualismo, más cercano a la sistemática y a la genética de poblaciones. Hasta ese momento, se consideraba que

los argumentos planteados por los paleontólogos se debían básicamente a las discontinuidades del registro fósil. De los argumentos planteados por los embriólogos, se creía que provenían de monstruosidades sin perspectiva evolutiva y, en conjunto, los datos provenientes de ambas disciplinas eran considerados como excepciones de poca relevancia.

Algunos datos “excepcionales” empiezan a encontrar su lugar en la teoría general a partir del planteo de que las velocidades evolutivas son discontinuas y los mecanismos que están en la base de la escala microevolutiva difieren de aquellos que subyacen en la escala macroevolutiva. Desde el descubrimiento de las mutaciones homeóticas, éstas han constituido una posibilidad inquietante como fuente de cambio discontinuo. En los 40 años transcurridos desde la publicación de Eldredge y Gould, se ha discutido sobre posibles mecanismos, y algunas de esas discusiones se reseñan en este trabajo.

Más allá de las diferencias respecto a la perspectiva histórica, la literatura del campo de la EvoDevo muestra un acuerdo general respecto a su carácter marginal en relación con el grueso de la Teoría Sintética. Es común encontrar un reclamo en este sentido, de revisar la actual teoría e incorporar formalmente tanto los avances hechos en el pensamiento evolucionista desde los comienzos del siglo XX, como aquellos provenientes de la EvoDevo y del emergente campo de la EcoEvoDevo. Este último posee una mirada más holística que intenta integrar la EvoDevo con aspectos ecológicos y poblacionales –genéticos e históricos–, pero en este caso, los factores poblacionales no son considerados desde la perspectiva tradicional de la teoría sintética, sino en relación con sus efectos sobre el desarrollo (Hall, 2003a; Love and Raff, 2003; Olsson *et al.*, 2010).

B.- Marco teórico: Competencias e intereses de la EvoDevo

La EvoDevo es multidimensional, varias disciplinas aportan datos: embriología comparada, morfología, genética, biología del desarrollo, sistemática filogenética, teoría evolutiva y paleontología. La sistemática filogenética nos permite determinar la dirección en la que están evolucionando las características del desarrollo, conocer los tiempos de divergencia, inferir tasas de evolución y homologías –o al revés, determinar que algo aparentemente homólogo no lo es en realidad–. Los fósiles proveen datos de

vital importancia sobre el estado de caracteres basales en linajes extintos o características morfológicas que son homólogas a aquellas de clados actuales. Este conocimiento es crucial cuando tratamos de determinar homología y reconstruir la evolución de caracteres genómicos y del desarrollo. Pero la mayoría de los estudios se restringen a la forma, ya que el ADN sólo está preservado en fósiles de hasta 100 mil años de antigüedad. A la hora de hacer inferencias, una de nuestras opciones es explotar los datos genéticos y del desarrollo provenientes de sistemas modelo en la reconstrucción de posibles ancestros. Con estos datos se hicieron logros importantes en relación con la modularidad y las redes génicas centrales involucradas en los procesos. La alternativa a la extrapolación de sistemas modelo es el uso de miembros de taxa basales actuales como aproximación a los puntos de ramificación más antiguos en la evolución de los metazoos (Raff, 2000; 2007).

La Biología Evolutiva moderna se ha centrado en el rol de la selección natural, que opera sobre el organismo desde el exterior. Según este enfoque, la variación parece irrestricta y la microevolución parece suficiente para explicar la macroevolución. Sin embargo, los procesos del desarrollo son emergentes y no predecibles sobre la base de las propiedades de los genes y las células. Al comenzar desde una ontogenia particular, algunos fenotipos serán posibles y otros no; los mecanismos del desarrollo son clave para los cambios evolutivos a pequeña y a gran escala. Uno de los problemas de la evolución de la forma corporal es cómo se establecen las escalas y proporciones y cómo se vinculan las distintas partes del cuerpo. Las restricciones potenciales en los sistemas covariantes o interactivos durante el desarrollo, establecen las limitaciones que éste impone sobre la micro y macroevolución de la forma corporal.

La EvoDevo nos permite apreciar aquello que es común y continuo entre conceptos aparentemente divergentes que incluyen homología, reversiones, rudimentos, vestigios y atavismos. Los mecanismos del desarrollo pueden estar conservados entre taxa cuando la estructura normalmente formada por estos mecanismos está incompleta –como en rudimentos y vestigios– o cuando aparece sólo en algunos individuos –como en los atavismos–. Por otro lado, distintos mecanismos del desarrollo pueden producir caracteres homólogos (Hall 2003a,b).

Las principales preguntas de la actual EvoDevo tienen profundas raíces históricas. Hall (2000) destaca la siguiente lista:

- Origen y evolución del desarrollo embrionario en sí mismo
- Producción de novedades evolutivas mediante modificación del desarrollo
- Rol de la plasticidad adaptativa del desarrollo en la historia evolutiva
- Impacto de la ecología en el desarrollo para modular los cambios evolutivos
- Bases del desarrollo de la homología y la homoplasia

Según esto, la EvoDevo no está restringida a los aspectos genéticos: no todos los mecanismos del desarrollo se basan en los genes (**West-Eberhard, 2005a,b; Gerhart y Kirschner, 2007; Jablonka, 2007; Kiefer 2007; Olsson et al., 2010**). Es crucial descubrir características que participen en la construcción del desarrollo que restringen la variación y afectan la manera en que la selección opera sobre los organismos. Todavía no está claro de qué manera el fenotipo es mapeado por el genotipo. Sabemos que las redes y cascadas génicas –módulos genéticos– vinculan el genotipo con las unidades morfogenéticas –capas germinales, campos embrionarios, módulos celulares–; mientras que los procesos, tales como las inducciones, interacciones de tejido e integración funcional, vinculan las unidades morfogenéticas al fenotipo. De este modo, se abre la caja negra entre un genotipo y los fenotipos –los múltiples estados de la historia de vida de los organismos, a partir de un único genotipo– (**Raff, 2000; Abouheif y Wray, 2002; Hall 2003a; Nahmad et al., 2008; Tomkins y Moczek, 2009**).

El tema unificador emergente es que los sistemas del desarrollo están compuestos de módulos genéticos discretos que interactúan entre sí. Estos módulos incluyen elementos individuales de un sistema de desarrollo, tales como un apéndice. Una estructura modular genera restricción porque algunas interacciones entre módulos pueden ser difíciles de acoplar. Paradójicamente, la modularidad también permite importantes cambios evolutivos porque muchas interacciones intermodulares pueden estar disociadas en el tiempo –heterocronía–, o de otras formas que permitan patrones del desarrollo viables pero modificados (**Raff, 2000; Frankel et al., 2012**). El concepto de heterocronía –alteración en la sincronización del desarrollo, como factor de transformación evolutiva de la forma– tiene sus orígenes en los trabajos de Haeckel, fue retomado por Goldschmidt, elaborado por de Beer y enfatizado por Gould, como un asunto fundamental. La heterotropía –alteración en la localización espacial de uno

o más procesos del desarrollo— es otro mecanismo importante en este sentido (**Gould, 1977; Hall 2003a**).

Los sistemas experimentales en los que se puede establecer un vínculo entre unidades microevolutivas y patrones de desarrollo, son esenciales para vincular desarrollo, fenotipo y selección. Los mecanismos genéticos responsables de tales disociaciones probablemente están en la estructura combinatorial de los promotores eucariotas, que permiten la modificación de la expresión y la cooptación para nuevas funciones. La disociación intermodular no es todavía bien comprendida: nos encontramos con la sorpresa de que distintas vías del desarrollo pueden converger en salidas similares. La modularidad es una característica de la vida multicelular, y los módulos en sí mismos pueden evolucionar. En este contexto, los módulos individuales del desarrollo deben haber surgido inicialmente por integración laxa de procesos genéticos que regulaban eventos separados. Luego, a medida que evolucionó una ontogenia más compleja, pueden haber surgido módulos más individualizados por empaquetamiento de elementos (**Raff, 2000**).

En Arthropoda, el plan corporal segmentado es un rasgo característico de todo el *phylum*. Todos los grupos pasan por un estado de banda germinal que, al menos a nivel morfológico, está muy conservado y es conocido como estado filotípico (**Sander y Schmidt-Ott, 2004; Peel et al., 2005; Raff, 1999**). El proceso de formación de unidades metaméricas y la especificación de esos segmentos está bajo el control de tres grupos de genes. El primer grupo consiste en 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**). Las mutaciones en esos genes causan cambios dramáticos en el patrón embrionario. El segundo grupo consiste en genes de segmentación, que determinan el número y la polaridad correcta de unidades metaméricas (**Rivera Pomar y Jäckle, 1996**), y el tercer grupo comprende los genes selectores homeóticos que especifican la identidad de los segmentos (**Mlodzik y Gehring, 1987; Mann y Morata, 2000**).

Según los primeros resultados de genética del desarrollo en sistemas modelo como *D.melanogaster*, se puede inferir que cualquier mutación que afecte los eventos centrales del desarrollo debe ser deletérea. Por lo tanto, parece lógico suponer que el desarrollo en sí mismo debería haber evolucionado muy lentamente y que la variación

esperable es mínima. Sin embargo, la realidad no es para nada así; el desarrollo evoluciona con mucha libertad y permite que existan ontogenias altamente divergentes entre organismos muy relacionados (Raff, 2000). Las divergencias antes del estado filotípico indican que las redes génicas previas soportan variación. Una vez atravesado el estado filotípico, los patrones comienzan a divergir nuevamente, posiblemente debido a la selección direccional para ciclos de vida distintos.

En cambio, los genes que funcionan al tope de la cascada de segmentación durante el estado filotípico, tienen funciones y patrones de expresión similares en *taxa* relacionados; constituyen un *cassette* regulatorio evolutivamente conservado. Una expectativa es que los estudios comparativos puedan revelar qué aspectos de la maquinaria de segmentación son ancestrales para Arthropoda (Sander y Schmidt-Ott, 2004; Peel *et al.*, 2005). La Fig.1.2. esquematiza esta situación.

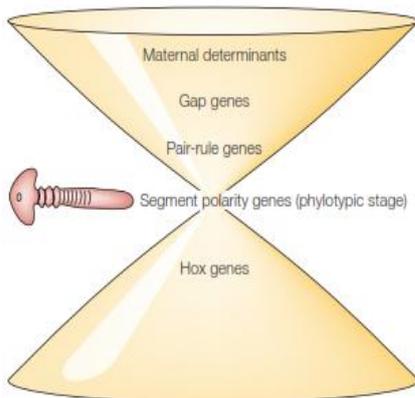


Fig.1.2. Conservación de la cascada de segmentación en el *phylum* Arthropoda. El “reloj de arena” representa el grado de conservación de los genes que funcionan en los pasos sucesivos de la cascada de segmentación. La determinación de ejes por gradientes maternos ha divergido significativamente entre los grupos de Arthropoda. Los homólogos de los genes *gap* están presentes, pero sus funciones son variables. La determinación de patrones por medio de genes *pair-rule* ha sido descrita en muchas especies, pero no está claro

si es una característica ancestral o si es producto de evolución convergente. El estado más conservado es aquel en el cual las uniones de segmentos están definidas por la interacción de genes de polaridad de segmentos. La expresión de esos genes coincide con el estado filotípico de Arthropoda, la banda germinal. Luego, una vez que los genes *HOX* intervienen para dar identidad dentro del eje A-P, los distintos grupos divergen nuevamente (Fig. extraída de Peel *et al.*, 2005).

C.- Tipos de desarrollo embrionario en los insectos

En términos muy generales, el desarrollo embrionario de un insecto se puede desglosar en las siguientes etapas (Heming, 2003):

1. clivaje (divisiones nucleares sincrónicas)
2. formación del blastodermo
3. formación de la banda germinal
4. anatrepsis, gastrulación y elongación de la banda germinal

5. segmentación y formación de apéndices
6. organogénesis
7. katatrepsis, cierre dorsal y diferenciación
8. eclosión

En la mayoría de los insectos, la embriogénesis comienza con una serie de divisiones nucleares sin división celular que dan lugar a un sincicio. Las divisiones iniciales ocurren en la región central del huevo y luego los núcleos migran hacia la superficie. Una vez culminada esta etapa, pueden ocurrir dos situaciones: que la formación de células se produzca inmediatamente, en cuyo caso tendremos un blastodermo celular, o que este proceso se retrase, en cuyo caso tendremos un estado intermedio de blastodermo sincicial –más tarde o más temprano, la celularización se produce en todos los casos–. El blastodermo celular consiste en una monocapa de células superficiales que rodean el vitelo del huevo. Luego, una parte de estas células se diferencia para formar el rudimento embrionario o banda germinal, y las células restantes pasarán a formar las membranas extraembrionarias. Pasado el estado de blastodermo, pueden desarrollarse distintos mecanismos que difieren especialmente respecto a cuándo y cómo se produce la segmentación de la banda germinal (**Johansen y Butt, 1941; Davis y Patel, 2002; Heming, 2003**).

Existen distintos tipos de desarrollo de la banda germinal (**Fig.1.3**). **Krause (1939)** propone una clasificación de tres tipos que consistía en banda germinal corta, intermedia y larga. Esta diferenciación hace referencia al número de segmentos especificados en la banda germinal previa a la gastrulación.

En la banda germinal corta, sólo los tres primeros segmentos cefálicos prenatales, son especificados en estados previos a la gastrulación. Estos tres segmentos constituyen el número inicial mínimo. Los restantes, se agregan con posterioridad, desde una región terminal, llamada “zona de crecimiento”. En la banda germinal larga, todos los segmentos son especificados de manera temprana y simultánea, y ocupan espacios proporcionalmente similares a los de la futura larva (**Johansen y Butt 1941; Heming 2003; Davis y Patel, 2002; Liu y Kaufman 2004a, b; Peel et al., 2005**). Básicamente, la segmentación de banda germinal larga implica sólo subdivisión del blastodermo en segmentos para producir el cuerpo completo. La segmentación de banda corta implica una subdivisión inicial que produce los segmentos anteriores y una

fase tardía con crecimiento terminal y establecimiento del patrón corporal (Liu y Kaufman 2005a).

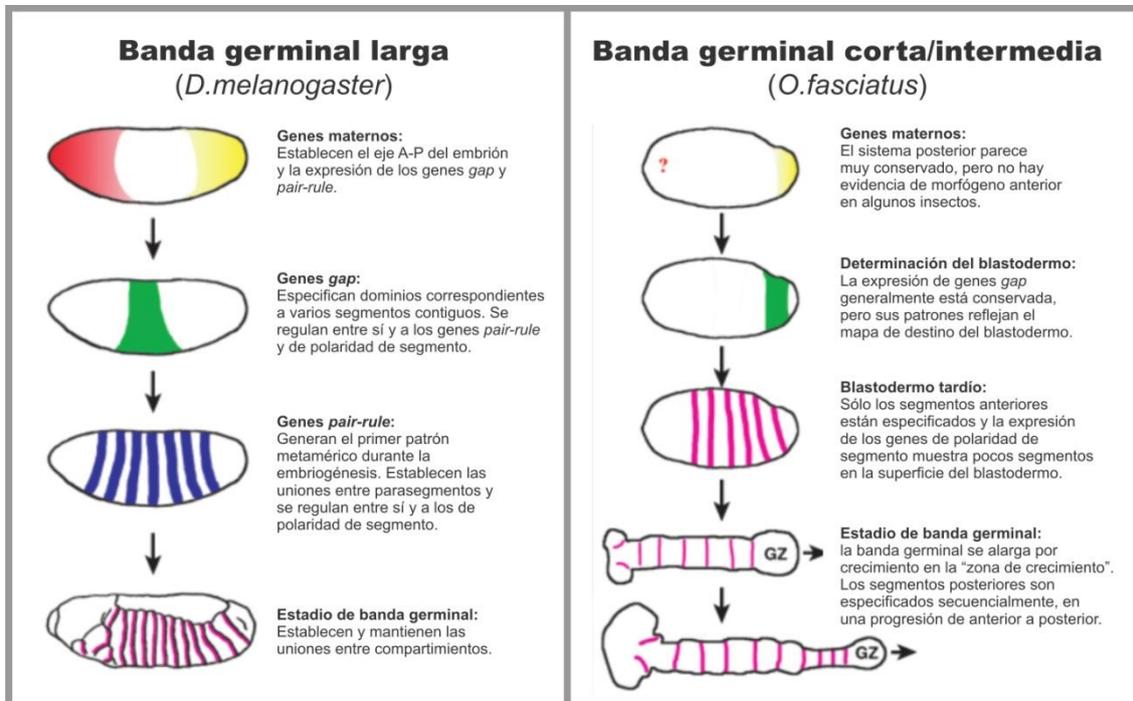


Fig.1.3. Comparación de la formación de la banda germinal larga y la corta. Los genes maternos de *D.melanogaster* establecen los ejes embrionarios y regulan la expresión y posición de los genes *gap downstream*. Cada uno de los genes *gap* se expresa en una región del blastodermo que corresponde a varios segmentos *contiguos*. Los genes *gap* activan y reprimen a los genes *pair-rule*, que se expresan con una periodicidad de dos segmentos y establecen el patrón metamérico del embrión. Luego, los genes de polaridad de segmento definen y mantienen a cada unidad metamérica como un compartimiento separado. De este modo, la cascada de segmentación de *D.melanogaster* divide al blastodermo en regiones cada vez más finas. En los embriones de banda germinal corta, sólo los segmentos anteriores están especificados en el mapa de destino celular del blastodermo, mientras que los restantes aparecen secuencialmente durante el estado de banda germinal (Fig. extraída de Liu y Kaufman, 2005a).

Las bandas germinales corta y larga representan los extremos de un continuo, y los insectos con banda germinal intermedia se ubican en algún punto entre esos extremos. Se considera que la banda germinal larga es derivada y cualitativamente diferente de la banda germinal corta (Davis y Patel, 2002; Liu y Kaufman, 2004a, b; 2005a). En cambio, las diferencias entre la banda germinal corta y la intermedia se consideran más cuantitativas que cualitativas, por ese motivo, muchos trabajos las

consideran como variaciones de un mismo tipo y se refieren a ambas como “corta” (Liu y Kaufman, 2004a, b); este trabajo toma esa postura.

La diferencia entre los tipos corto y largo puede caracterizarse, en parte, como un cambio heterocrónico entre los procesos de segmentación y determinación del patrón en relación con la gastrulación. La tendencia a una mayor “prefabricación” en los embriones de banda larga es un tema que aparece al comparar varios insectos y sus modos de ovogénesis (Fig.1.4). Es común que los insectos con banda larga muestren una capacidad reducida para regular respuestas a perturbaciones; probablemente esto se asocie al hecho de que se desarrollan mucho más rápido. Una diferencia relacionada es que los eventos moleculares de determinación del patrón tienden a ocurrir más temprano en relación con los eventos embriológicos (Davis y Patel, 2002).

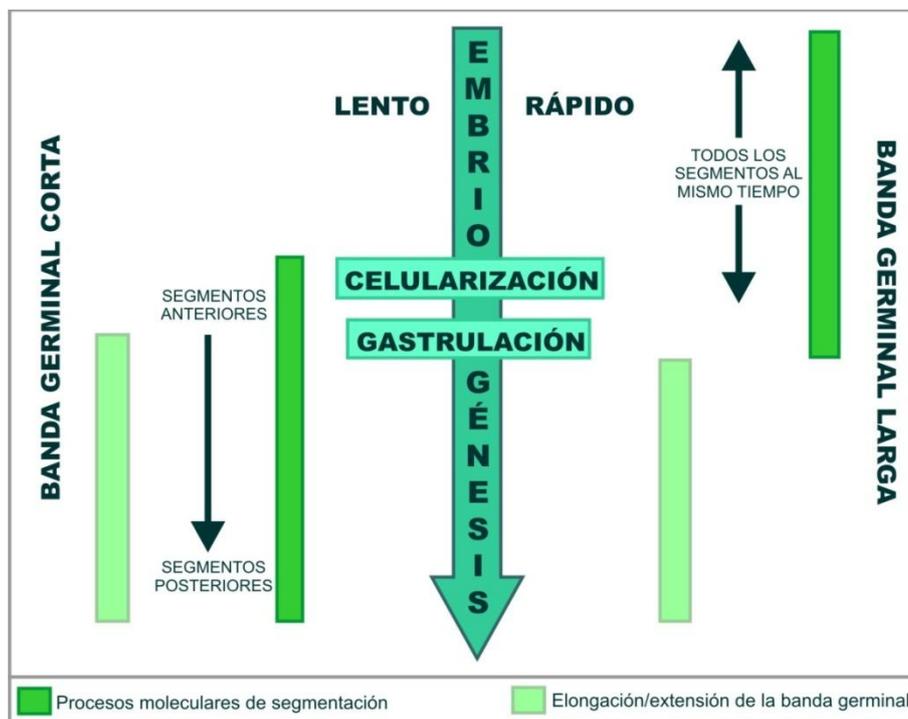


Fig.1.4. Sincronización relativa de la celularización, gastrulación, especificación de segmentos y elongación en las embriogénesis de banda germinal corta y larga. (Fig. extraída de Davis y Patel, 2002).

Krause (1939) también hizo una clasificación de los embriones en relación con la porción del huevo que la banda germinal ocupa inicialmente (Fig.1.5). Desde este punto de vista, los dividió en grandes y pequeños. Es común que exista una correlación entre embrión pequeño y banda corta/intermedia por un lado, y embrión

grande y banda germinal larga por otro. Por este motivo, habitualmente los términos se confunden y se usan indistintamente. Sin embargo, la clasificación inicial de Krause era clara; en este trabajo se sigue ese criterio original.

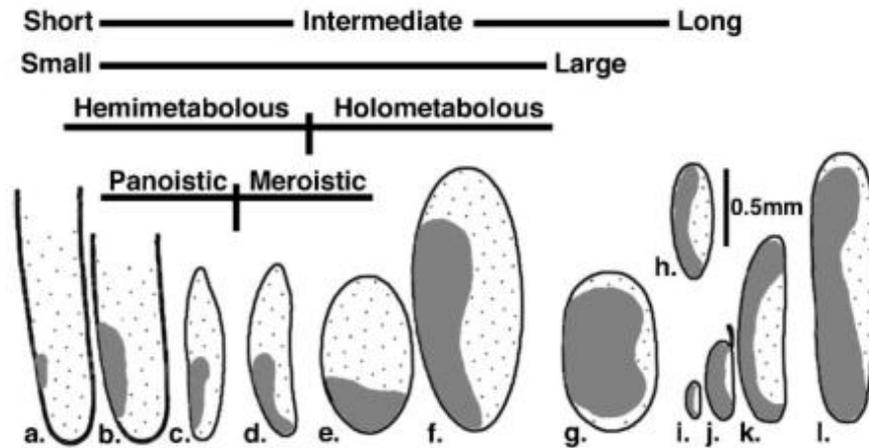


Fig.1.5. Bandas germinales cortas/largas vs. pequeñas/grandes. Los huevos de insectos están dibujados a escala y representan vistas laterales con la región anterior hacia arriba. El área cubierta por el primordio de banda germinal está sombreada en gris. **A.** *Oecanthus* sp. –Orthoptera–; **B.** *Acheta* sp. –Orthoptera–; **C.** *Platycnemis* sp. –Odonata–; **D.** *Euscelis* sp. –Hemiptera–; **E.** *Atrachya* sp. –Coleoptera–; **F.** *Leptinotarsa* sp. –Coleoptera–; **G.** *Bombyx* sp. –Lepidoptera–; **H.** *Bruchidius* sp. –Coleoptera–; **I.** *Smittia* sp. –Diptera–; **J.** *D.melanogaster* –Diptera–; **K.** *Calliphora* sp. –Diptera–; **L.** *Apis* sp. –Hymenoptera– (Fig. extraída de **Davis y Patel, 2002**).

D.- El desarrollo embrionario de insectos de banda germinal corta¹

Los eventos morfogénicos que ocurren en cada uno de los dos tipos de desarrollo, son muy diferentes. La mayor parte de estudios del desarrollo en Insecta se basa en

¹ Existe una convención respecto a la forma en que deben presentarse las imágenes de embriones, basada en la preponderancia de trabajos realizados en *D.melanogaster*. Sin embargo, la vista lateral de los embriones de banda germinal corta/intermedia no es informativa. Por lo tanto, las vistas usadas aquí tienen la orientación de preferencia en trabajos de desarrollo de embriones de banda corta; es decir, vistas ventrales del embrión, con el eje A-P orientado verticalmente. Por otra parte, dado que los ejes embrionarios y del huevo no son coincidentes durante todo el desarrollo; salvo que se aclare lo contrario, nos referimos por defecto a los ejes embrionarios; excepto en los estados de blastodermo, en los cuales aún no hay diferenciación del rudimento.

D.melanogaster, que ha sido el modelo por excelencia. Las descripciones de su desarrollo están muy difundidas (**Campos-Ortega y Hartenstein, 1985**). En esta tesis haré referencias al modelo de embriogénesis de *D.melanogaster*, pero me centraré en la descripción de la embriogénesis de banda germinal corta/intermedia, que es la considerada basal, que tiene complejidades y características propias y es el modo de desarrollo de *R.prolixus*².

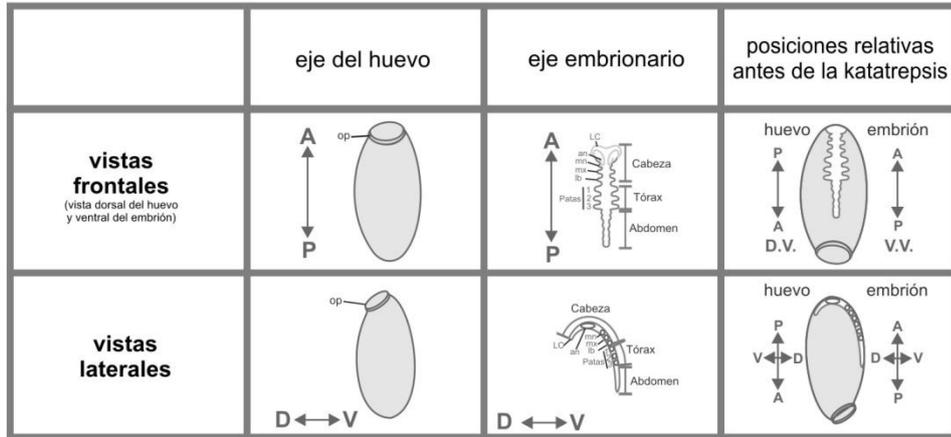
En los insectos con banda germinal corta e intermedia, el embrión propiamente dicho comienza como una masa celular localizada en el polo posterior del huevo. Estos embriones adquieren sus segmentos de manera secuencial, adicionándolos a través de una zona de crecimiento terminal (**Johannsen y Butt, 1941; Heming, 2003; Liu y Kaufman, 2005a**). La identidad de los segmentos también se adquiere secuencialmente.

El desarrollo de banda corta implica un continuo cambio de forma y dos reposicionamientos. La elongación de la banda germinal, la gastrulación y la blastocinesis ocurren simultáneamente (**Johannsen y Butt, 1941; Heming, 2003; Panfilio et al., 2006**). La **Fig.1.6** esquematiza los principales aspectos, utilizando a *Rhodnius prolixus* como ejemplo.

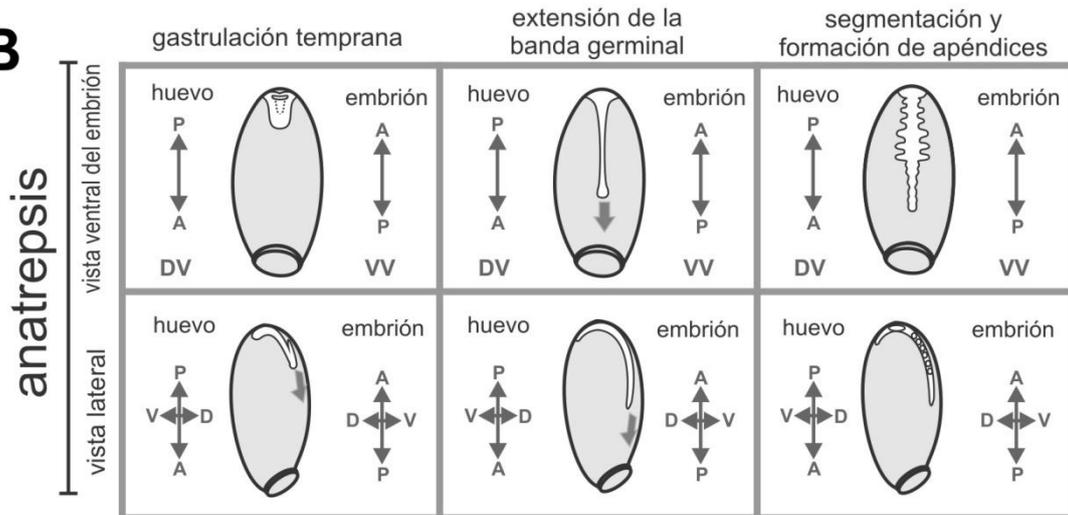
En estado de blastodermo se establecen los dominios de expresión de los genes tempranos encargados de establecer el eje A-P y los segmentos iniciales. Una vez que se produce la celularización del blastodermo, algunas células se diferencian para formar el embrión y otras, las membranas extraembrionarias. Las células que formarán el embrión migran hacia el polo posterior del huevo. Esta migración ocurre de tal modo que el orden establecido molecularmente se mantiene en la zona superficial del blastodermo. Sin embargo, a medida que se forma el rudimento germinal, se invagina en el polo posterior del huevo. Las células ingresan en la invaginación, iniciando una gastrulación muy temprana y se produce un efecto de inversión, ya que el blastodermo “se da vuelta como un guante”.

² Aquí se describen las generalidades más destacables; para una descripción más detallada del proceso, ver el capítulo sobre el desarrollo de *R.prolixus*.

A



B



C

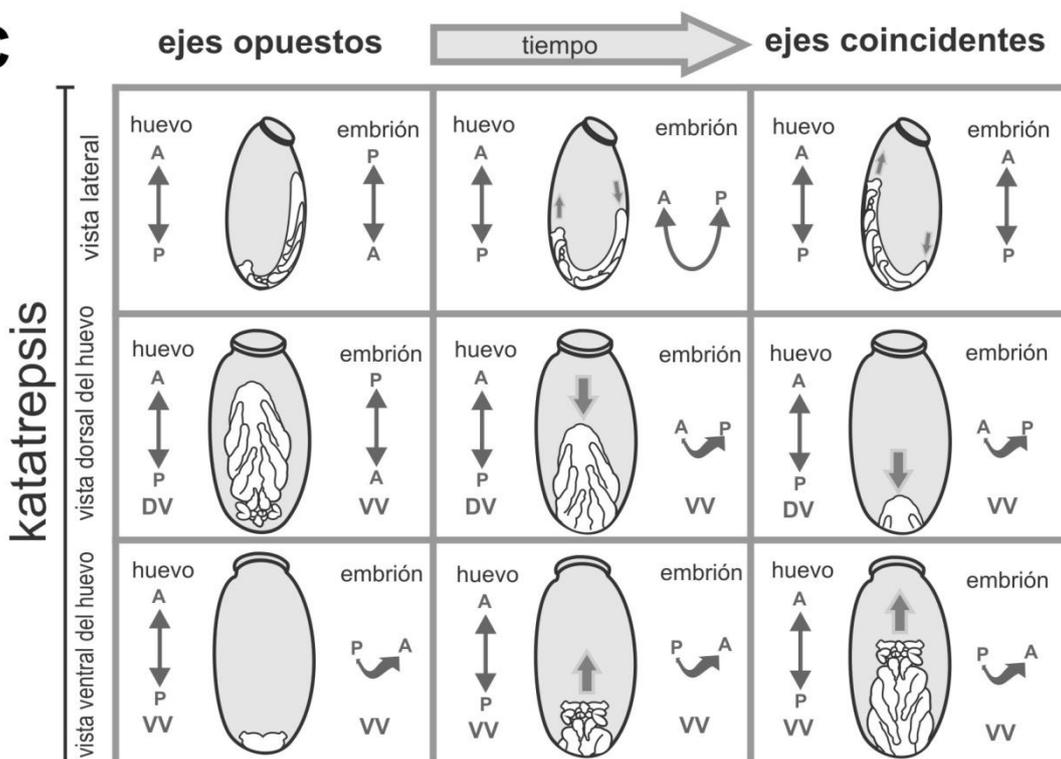


Fig.1.6. Blastocinesis y situaciones posicionales relativas del huevo y el embrión. Esquematación de las posiciones en función del tiempo. Las flechas gris oscuro a los lados del esquema del huevo indican ejes; las flechas gris claro dentro del esquema del huevo indican la dirección del movimiento. Durante los primeros días del desarrollo, los ejes A-P y D-V del embrión y del huevo están invertidos, tal como se detalla en **A**. **B**, La anatrepsis –primera etapa de blastocinesis– ocurre junto con la gastrulación y la elongación de la banda germinal. Las células que formarán el embrión se concentran en el polo posterior del huevo y se invaginan en una estructura tipo bolsillo. Esta estructura continúa creciendo longitudinalmente por el extremo invaginado en dirección al polo anterior y sobre la cara dorsal del huevo. El extremo que se elonga corresponde al polo posterior del embrión. De este modo, el polo anterior queda ubicado en la zona posterior del huevo, mientras que el margen posterior avanza hacia la zona anterior del huevo, donde se encuentra el opérculo. Asimismo, la región ventral del embrión crece sobre la cara dorsal del huevo, mientras que la pared dorsal del embrión queda en contacto con la mayor parte del vitelo, orientada hacia la cara ventral del huevo. **C**, La segunda etapa de blastocinesis, la katatrepsis, consiste en una reorientación. El margen anterior del embrión se desplaza y avanza desde el polo posterior del huevo hacia el anterior, sobre la cara ventral. En una vista lateral, el trayecto tiene forma de “U”. Cuando la katatrepsis culmina, los ejes del huevo y del embrión, tanto el A-P como el D-V, quedan en perfecta coincidencia. **op**, opérculo; **an**, antena; **mn**, mandíbulas; **mx**, maxilas; **lb**, apéndices labiales; **LC**, lóbulos cefálicos; **VD**, vista dorsal; **VV**, vista ventral; **A**, anterior; **P**, posterior; **D**, dorsal; **V**, ventral.

El rudimento recién formado mantiene el orden correcto de sus dominios de expresión, pero invertido. De este modo, los ejes del huevo y el embrión no son coincidentes en el estado de banda germinal. La **Fig.1.6A** esquematiza los ejes de la banda germinal, el huevo y sus posiciones relativas en *R.prolixus*.

El embrión crece desde el polo posterior por adición en una zona de crecimiento terminal. Dado que el extremo anterior de la banda germinal permanece fijo, el extremo posterior se acerca al polo anterior del huevo a medida que crece. Los eventos de invaginación y elongación de la banda germinal implican al mismo tiempo a la gastrulación y a la primera fase blastocinética, llamada anatrepsis (**Fig.1.6B**). La anatrepsis produce una inversión de los ejes longitudinales y también de los ejes dorsoventrales, ya que la parte ventral del embrión queda orientada hacia la región dorsal del huevo.

Más tarde, una vez que la extensión de la banda germinal se completa, ocurre la segunda fase blastocinética mediante la cual se establece la orientación definitiva y

coincidente de ejes embrionarios y del huevo. Esta segunda fase se denomina katatrepsis y consiste en el desplazamiento del embrión, avanzando por su extremo anterior, hacia el polo anterior del huevo. El desplazamiento ocurre sobre la cara ventral de embrión y huevo. Visto lateralmente, el trayecto tiene forma de “U” (Fig.1.6C); (Mellanby, 1935; Johannsen y Butt, 1941; Kelly y Huebner, 1989; Heming, 2003; Panfilio *et al.*, 2006).

E.- Evolución genómica

Desde que se descubrió la estructura del ADN –hace sólo 60 años– hasta la actualidad, nuestra comprensión y nuestra mirada sobre la organización genómica han cambiado mucho. Inicialmente se creyó que el ADN intergénico era irrelevante –ADN basura– y de muchos transcritos se presumía que eran “ruido”. Las mutaciones sinónimas han sido asumidas como neutrales evolutivamente y el lugar que un gen ocupa en un genoma ha sido considerado irrelevante. Pero estas asunciones fueron producto de nuestra falta de entendimiento, más que un de conocimiento profundo sobre la función genómica y su evolución (Hurst, 2013). Actualmente empezamos a comprender que la selección natural podría actuar sobre un proceso de transcripción y no sobre su producto, que muchas mutaciones silenciosas dentro de la región codificante –CDS, del inglés *coding DNA sequences*– tienen efecto sobre los procesos pre-traduccionales; sabemos que los sitios regulatorios pueden estar dentro de las CDS o en lugares muy distantes, incluso en otros cromosomas; que los caracteres que afectan la estructura nuclear, tienen efecto sobre la actividad de otros genes nucleares y no nucleares; que se producen grandes cantidades de transcritos cortos y péptidos con diversas funciones –que no tienen las características de lo que consideramos tradicionalmente como un gen pero que son biológicamente activos y muy importantes–; que las células tienen capacidad para relevar información ambiental, responder de manera plástica y que tienen mecanismos de memoria para sostener la respuesta durante su vida y transmitir la información a sus células hijas mediante herencia epigenética (Kiefer, 2007; Hoekstra *et al.*, 2007; Hurst, 2013).

En el reino animal, existe una gran conservación de secuencias codificantes. Los animales surgidos en el Cámbrico debieron compartir una dotación génica semejante (Ohno, 1996). De otro modo –incluso asumiendo una tasa mutacional generosa y en

ausencia de interferencia negativa por selección natural– no se explica la radiación sufrida en ese período, que implica la emergencia prácticamente simultánea de todos los *phyla* actuales. La disparidad morfológica debió basarse en usos diferenciales de esa dotación génica conservada y compartida. En un ratón, el 23% de las secuencias codificantes son compartidas con los procariotas –implicadas en metabolismo biosíntesis; replicación, traducción y transcripción; componentes y transportadores de membranas–, otro 29% se comparte con eucariotas no animales –citoesqueletos, proteínas motoras, contráctiles, asociadas a la fagocitosis, dinámica de cromosomas, etc.– y otro 27% se comparte con animales no cordados –señalización, adhesión y otras proteínas asociadas a la multicelularidad, procesos fisiológicos y del desarrollo– (**Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002**). El hecho de que estos genes estén tan difundidos, implica que debieron surgir antes de la explosión de biodiversidad verificada en el Cámbrico. A este grupo de genes compartidos, **Gerhart y Kirschner (2007)** lo llaman, desde un punto de vista funcional, Componentes Centrales Conservados (*conserved core components*) y **Ohno (1996)**, desde una mirada filogenética, lo llama Genoma Pananimal Cámbrico.

Antes y después de esa dotación inicial, los nuevos genes se pudieron generar por diversos mecanismos. El modelo tradicional se basa especialmente en la duplicación génica y dos posibles consecuencias. En el modelo desarrollado por **Kimura (1983)**, la selección purificadora contra las mutaciones deletéreas se relaja en una o ambas copias. Mutaciones que normalmente serían eliminadas, se pueden acumular en uno o ambos *loci*. Luego, bajo ciertas condiciones, algunos de los alelos mutantes pueden ser beneficiosos. A este modelo se lo llama “de Espera”, porque requiere tiempo para alcanzar el momento de la diferenciación funcional (**Long et al., 2003**). Por otra parte, el Modelo Inmediato postula que la evolución adaptativa actúa inmediatamente sobre los nuevos genes, y que éstos evolucionan mucho más rápido que sus ortólogos parentales –al menos un orden de magnitud en el caso de *jingwei*, un gen de un grupo de *Drosophila* africanas– y esto es válido tanto para regiones codificantes como regulatorias.

Ranz y Parsch (2012) y **Long et al. (2003)** listan una serie de mecanismos como generadores de nuevos genes (**Fig.1.7**):

Entremezclado de exones (*exon shuffling*): dos o más exones –o un exón duplicado– se pueden combinar para generar una nueva estructura exón-intrón. Se conocen dos mecanismos que conducen a la recombinación ectópica de exones: la recombinación ilegítima, y las inserciones de exón mediadas por retroposición. Análisis genómicos a gran escala realizados por estos autores, muestran que la distribución intrónica no es aleatoria y que este hecho, probablemente es una marca del entremezclado.

Duplicación génica: según el modelo clásico, la copia duplicada puede evolucionar por adquisición de nuevas funciones.

Retroposición: crea duplicados en nuevas posiciones genómicas mediante transcripción reversa. Generalmente no retropone la región reguladora, sino que suele reclutar una nueva región, o se convierte en un pseudogen.

Elementos móviles: se integran a regiones génicas y generan nuevas funciones.

Fusión y fisión génica: genes adyacentes pueden fusionarse, por delección o mutación del codón de terminación de transcripción. De otra forma, un gen se puede dividir, aunque no está tan claro cómo es el mecanismo que puede llevar a eso.

Origen de novo: la aparición completa a partir de regiones no codificantes es un fenómeno raro, pero se han documentado casos en que se generaron porciones *de novo*.

Mecanismos combinados: e.g., *jingwei* es el primer gen bien estudiado en este sentido, combina el entremezclado de exones, retroposición y duplicación génica.

Transferencia génica horizontal: (HGT, del inglés *horizontal gene transfer*) si bien hay acuerdo en que las transferencias horizontales han tenido un rol muy importante; existen diversas posturas acerca de si ocurrieron sólo tempranamente en la evolución de los eucariotas o si han tenido continuidad. Cada una de las hipótesis al respecto tiene implicancia directa sobre nuestra percepción de la evolución eucariota y la composición genómica (Katz, 2002) y algunas de ellas pueden poner en cuestión el origen de los genes compartidos: ¿se deben a un origen común o se comparten por adquisición lateral posterior? En un extremo del espectro, la “hipótesis del *annealing* genético” propone que las transferencias horizontales están restringidas a eventos tempranos en la evolución eucariota. En el otro extremo, la Hipótesis “Eres lo que comes” considera que ocurren de manera continua (Katz, 2002).

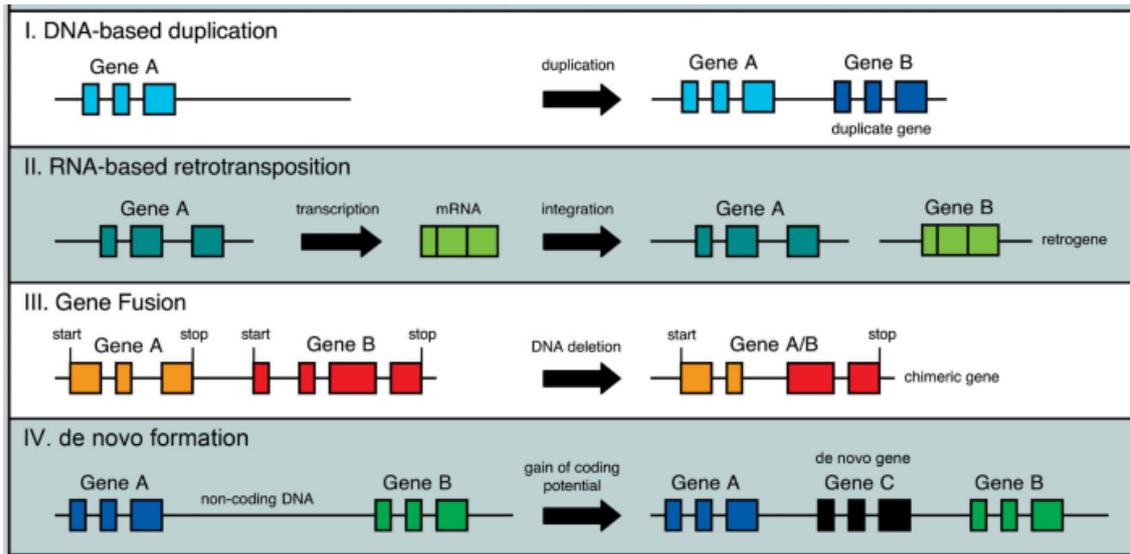


Fig.1.7. Mecanismos de creación de nuevos genes. Los diagramas esquematizan algunos de los principales mecanismos de creación de genes. Los exones se muestran como barras sólidas, y los intrones y regiones intergénicas se muestran como líneas. (Fig. extraída de **Ranz y Parsch, 2012**)

De esta lista de mecanismos, el más interesante por sus implicancias en nuestra forma de interpretar a la evolución eucariota y la herencia de los organismos sexuales, es sin duda la HGT. Su ocurrencia natural recién se comenzó a estudiar en los últimos 15 años. Una de las mayores cuestiones que presenta, es la validez de los árboles de la vida: el resultado de incorporar la HGT a la estructura de las relaciones filogenéticas requiere una reestructuración sustancial de nuestro pensamiento.

De hecho, hasta 1982, había dos conceptos para explicar la universalidad del código genético: el modelo estereoquímico postulaba que las interacciones químicas entre tripletes y aminoácidos era determinante y el modelo de Crick, aceptaba que el código genético era arbitrario, pero que estaba unificado debido a que toda la vida evolucionó a partir de un LUCA (*last universal common ancestor*). Una tercera posibilidad es que el código esté unificado debido a una intensa presión selectiva para permitir el intercambio de material genético en la frontera entre especies. Es decir, la HGT debe ser tan penetrante e integral en los procesos evolutivos que los mecanismos que le permiten operar, fueron seleccionados positivamente. Se sabe que al menos la arginina y el triptófano se agregaron al código después de que la vida se hubiera diversificado en dos grupos de arqueobacterias y varios grupos bacterianos y

eucariotas. Algunos genes –e.g., ribosomales– podrían ser muy antiguos y compartidos por un origen común, mientras que otros –Arg, Trp– pertenecen a una clase de genes jóvenes cuya universalidad se debe a la HGT (Syvanen, 2012). Si asumimos que los eucariotas son quimeras, podemos expandir los parámetros para construir hipótesis. Desde este punto de vista, la homología de secuencia de dos genes puede establecer un origen común, pero no establece un ancestro común para todas las unidades biológicas que los portan.

E.1.- Evolución genómica y EvoDevo: duplicación génica

Se acepta en general que los principales genes del desarrollo se comparten por ancestría y que –como se dijo– estuvieron presentes en un ancestro animal precámbrico previo a la aparición de la bilateralidad (Ohno, 1996; Gerhart y Kirschner, 2007). Muchos TF, como los *HOX*, se duplicaron repetidas veces y adquirieron nuevas funciones (Peterson y Davidson 2000; García-Fernández, 2005; Ryan *et al.*, 2007; Chourrout *et al.*, 2006). Los genes producidos de esta forma se llaman parálogos; es decir, tienen homología dentro del mismo genoma. Así se habría establecido un juego de genes esenciales que pudo estar presente –más o menos completo– en un animal con un plan corporal poco diferenciado, segmentado o no (Ohno, 1996). Luego, en la radiación que llamamos “explosión cámbrica”, la diversidad de formas no se habría generado por grandes innovaciones a nivel de secuencias codificantes, sino por cambios regulatorios y combinatoriales –heterocrónicos y heterotrópicos– de las proteínas expresadas (Stern, 2000; Popadić *et al.*, 1998; Carroll 2008).

Makino *et al.* (2009) analizaron grupos de genes duplicados y de copia única y su distribución entre genes del desarrollo y otros. Encontraron que entre los genes del desarrollo, hay mayor proporción de genes esenciales³, independientemente de su cantidad de copias. En el otro grupo, los de copia única eran más esenciales que los duplicados. Sus estudios indican que existe una correlación positiva entre la divergencia de parálogos y la esencialidad de los duplicados; es decir, a mayor similitud de secuencia entre los duplicados, mayor es la propensión a una compensación funcional mutua.

³ Un gen se considera esencial si su remoción resulta en un fenotipo letal o estéril.

Una organización modular puede permitir que nuevos alelos funcionen en distintos *backgrounds* genéticos. Por otra parte, la redundancia observada para muchos genes eucariotas, hace que los organismos sean robustos ante la pérdida de función –aunque es improbable que cualquier gen sea estrictamente redundante–. Estos mecanismos de interacción y redundancia reducen la carga genética, de manera que la selección para la robustez de los individuos al ambiente o a las perturbaciones génicas, tiene como efecto secundario un incremento en las oportunidades para una futura adaptación evolutiva, es decir aumenta la Capacidad Evolutiva (*evolvability*)⁴ (Barton y Partridge, 2000).

Los genes duplicados pueden ser un paso inicial en el incremento de complejidad morfológica y del circuito regulatorio. No hay evidencia rigurosa que conecte la pérdida o ganancia de genes *HOX* o complejos de ellos con cambios morfológicos específicos en diferentes linajes, pero hay correlaciones importantes. La propiedad de las proteínas Hox de trabajar como un sistema laxamente coordinado, frecuentemente con patrones solapantes, parece haber fomentado su capacidad de contribuir al cambio morfológico durante la evolución (Lemons y McGinnis, 2006).

E.2.- Evolución genómica y EvoDevo: Los genes homeobox

La formación y especificación de unidades metaméricas está bajo el control de tres grupos de genes. La mayoría de ellos son TF y las mutaciones que los afectan causan cambios dramáticos en el patrón embrionario. Los genes de efecto materno definen las coordenadas espaciales a lo largo de los ejes embrionarios; los genes de segmentación determinan el número y la polaridad correctos de segmentos y los genes selectores homeóticos especifican la identidad de los segmentos (Mlodzik y Gehring, 1987; Mann y Morata, 2000).

Los genes selectores homeóticos forman un grupo muy conservado, cuyas proteínas tienen un motivo de unión al ADN llamado homeodominio (Fig.1.8A). Se descubrieron en casos en que la ausencia o desregulación del producto génico causaba mutaciones homeóticas en *D.melanogaster*. Se las denominó homeóticas porque provocan cambios fenotípicos en los que un segmento determinado cambia su identidad, semejando otro segmento ya existente (*homeos* = igual; Fig.1.8B). Si bien todos los

⁴ Este concepto se discute más adelante.

genes homeóticos contienen un homeobox, no todas las proteínas que contienen dicho motivo tienen función homeótica, aunque sí tienen funciones regulatorias.

En muchos organismos estos genes están agrupados en complejos ordenados de manera similar al orden en que se expresan a lo largo del eje A-P, fenómeno conocido como colinealidad (**Fig.1.8C**). En *D.melanogaster*, las dos agrupaciones de genes homeóticos más importantes son el complejo Antennapedia (ANT-C), que regula la cabeza y los segmentos torácicos anteriores, y el complejo Bithorax (BX-C), que regula los segmentos torácicos posteriores y abdominales. Entre los dos, incluyen los productos de ocho genes que, en conjunto, se conocen como Complejo Homeótico (HOM-C; **Fig.1.8D**). En Insecta, la relación entre genes y tagmosis es la siguiente: cuatro genes especifican la identidad de segmentos gnatales [*labial (lab)*, *proboscipedia (pb)*, *deformed (dfd)*, y *sex combs reduced (scr)*], dos genes tienen su principal acción en el tórax [*antennapedia (antp)* y *ultrabithorax (ubx)*] y dos en el abdomen *abdominal-A (abd-A)* y *abdominal-B (Abd-B)*] (**Popadić et al., 1998**).

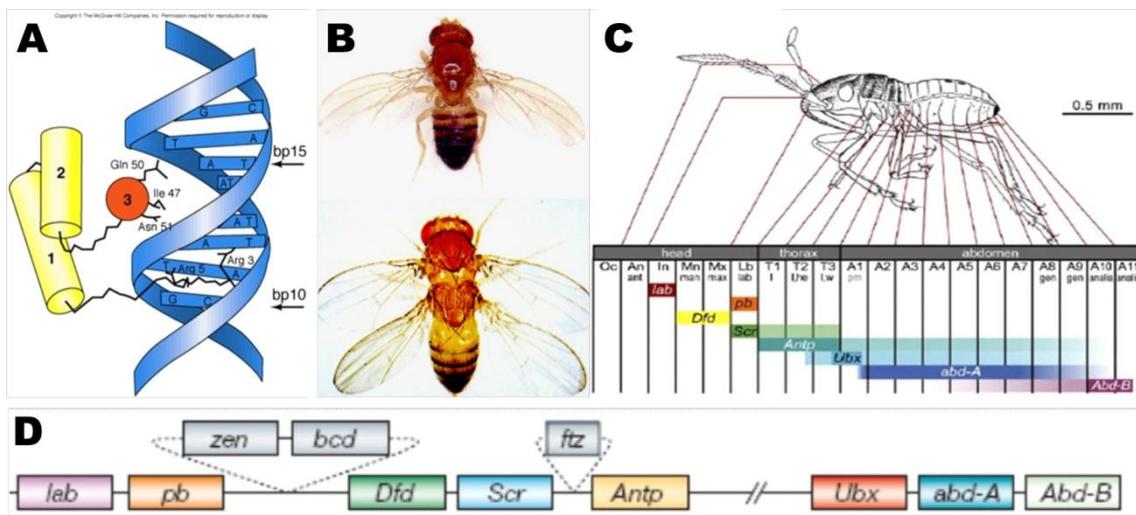


Fig.1.8. Genes HOX. **A.** Estructura del homeodominio y su relación con las bases en el ADN (MacGraw-Hill Corporation©). **B.** *D.melanogaster* salvaje y mutante homeótico para *ultrabithorax*, con transformación T3 → T2; (Fig. extraída de **Lawrence, 1992**). **C.** Colinealidad de genes HOX en *O.fasciatus* (Fig. extraída de **Angelini et al., 2005**). **D.** Cluster HOX de *D.melanogaster*, en gris se muestran tres genes con homeodominio que están dentro del complejo pero funcionalmente no son HOX (Fig. extraída de **Pearson et al., 2005**).

El homeodominio (HD) está codificado por una secuencia de 180pb conocida como homeobox. Tiene un alto contenido en residuos básicos, las proteínas que lo contienen

son nucleares y se unen a secuencias específicas en el ADN. En proteínas quiméricas, la especificidad de unión está dada por el HD, asimismo, el HD aislado se une al ADN de la misma forma que la proteína completa (Gehring *et al.*, 1994). Presenta un brazo N-terminal extendido y tres α -hélices. La disposición de las hélices 2 y 3 (H2 y H3) es similar a la del motivo hélice-giro-hélice (HTH: *helix-turn-helix*) que aparece en reguladores génicos de procariontes y que es característico de los factores de transcripción que se unen al ADN en el surco mayor (Fig.1.8A; Gilbert, 2000; Laughon and Scott, 1984). Cuando se produce la unión, el brazo N-terminal encaja en el surco menor mientras que la H3 se introduce en el surco mayor; ésta es la hélice de reconocimiento y es aquí donde los aminoácidos hacen contacto con las bases del ADN.

En el ADN blanco, hay una región central TAAT que está conservada prácticamente en todos los sitios reconocidos por homeodominios. La T del extremo 5' parece ser crítica en este reconocimiento, ya que su mutación destruye la unión en todos los casos estudiados. El par de bases que sigue al motivo TAAT es importante en la distinción entre sitios de reconocimiento similares. El número de secuencias que reconoce una proteína con HD es muy pequeño; de manera que, además del homeodominio, otras regiones de la proteína son críticas para la función (Gilbert, 2000). Las preferencias de secuencia en 5' y 3' respecto de TAAT, son especificadas por los residuos en N- y C-terminales al HD, respectivamente (Phelan *et al.*, 1994). Los residuos que contactan el ADN en el surco mayor con TAAT (I-47, Q-50, N-51 y M-54) son invariantes entre las proteínas HOX analizadas y están en la H3. Otros residuos conservados (R-31, Y-25, W-48, R-53 y K-57) hacen contacto con el esqueleto azúcar-fosfato. En cambio, los residuos que contactan con el ADN en el surco menor son variables (Pellerin *et al.*, 1994).

E.3.- Evolución genómica y EvoDevo: *clustering HOX*

En algunos animales, los genes *HOX* están agrupados en *clusters* y ordenados sobre el cromosoma de manera colineal con sus dominios de expresión y función sobre el eje embrionario. Lo más cercano al estilo colineal se encuentra en el anfibio *Branchiostoma floridae* (Hubbs, 1922). En los primeros estudios se vio que los agrupamientos aparecían tanto en *D.melanogaster* como en *Mus musculus* (Fig.1.9).

Una vez que se realizó el primer alineamiento de *clusters* de vertebrados e invertebrados, se asumió que todas las otras especies animales podrían contener un *cluster* de genes *HOX*. Muchas publicaciones subsiguientes reportaron la existencia de un *cluster* *HOX*, cuando en realidad sólo se tenían genes aislados, o incluso fragmentos (Duboule, 2007). De hecho, la idea de que la mayoría de los animales conserva *clusters* colineales y de que ésta es una de sus más importantes propiedades, es una sobresimplificación. Los nuevos datos revelan que hay diversidad en el número de genes, su organización y sus patrones de expresión. Lo cierto es que los genes *HOX* pueden trabajar como un sistema de establecimiento axial incluso cuando están dispersos en el genoma (Brown *et al.*, 2001; Lemons y McGinnis, 2006).

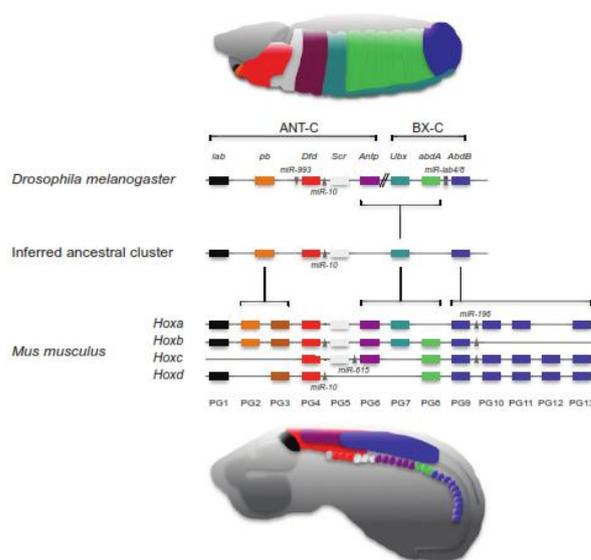


Fig.1.9. Alineamiento de *clusters* *HOX* de *D.melanogaster* y *M.musculus*. Los genes *HOX* de *D.melanogaster* están agrupados en dos complejos: ANT-C y BX-C. Los dominios de expresión en el eje A-P son colineales con el orden en el cromosoma. Los genes *HOX* de *M.musculus* son similares a los de *D.melanogaster* y su organización en el cromosoma también es colineal. El ratón tiene cuatro *clusters* debido a cuatro rondas de duplicación; en cada uno de los agrupamientos, algunas copias se han perdido y otras se han duplicado. Las comparaciones hechas entre los *clusters* de distintos *phyla* se usan para deducir un *cluster* *HOX* ancestral para los bilaterios. **PG**: grupos parálogos.

(Fig. extraída de Mallo y Alonso, 2013)

Duboule (2007) propone la siguiente clasificación de *clusters* *HOX*: (1) organizados –tipo O, como los prototípicos vertebrados–; (2) desorganizados –tipo D, como los de los erizos de mar–; (3) discontinuos –tipo S [*split*], como el HOM-C de *D.melanogaster*–; y (4) atomizados –tipo A, como los del urocordado *Oikopleura*–, donde los genes están dispersos por todo el genoma. Este autor propone que el *cluster* ancestral debió ser de tipo D y que fue blanco de evolución bidireccional, tanto

hacia la fragmentación como hacia la consolidación. Es difícil imaginar por qué o cómo un *cluster* génico grande con unos diez genes en diferentes orientaciones y algunas repeticiones, podría transformarse en un *cluster* compacto con los mismos diez genes, codificados por la misma cadena de ADN y sin repeticiones. Este proceso de consolidación debe haber representado un valor agregado en términos evolutivos. Las explicaciones posibles consisten en integrar las funciones de genes simples en un modo de operación más global, según la cual los *clusters HOX* deberían ser considerados como "metagenes". La aparición de secuencias reguladoras globales externas también podría favorecer el agrupamiento.

Mallo y Alonso (2013) listan una serie de mecanismos que están involucrados en la regulación de los *HOX*. Entre ellos se encuentran varias formas de regulación transcripcional en el espacio y el tiempo –el componente cromatínico, la adición de marcas asociadas a cromatina activa e inactiva, la conformación 3D de la cromatina, ARN largos no codificantes [lncRNA]–, post-transcripcional –procesamiento del ARN, miRNA– y traduccional. Según ellos, las redes regulatorias interconectadas incrementan la robustez del programa de expresión *HOX*, asegurando los patrones espacio-temporales correctos, independientemente de la variación molecular interna y de las fluctuaciones ambientales externas. En este contexto tan rico en regulación a nivel cromatínico, la agrupación en *clusters* colineales facilita la transcripción secuencial y ordenada.

Los genes *paraHOX* también pueden estar en *clusters* colineales –los *paraHOX* constituyen otro grupo de TF con homeodominio, muy relacionados con los *HOX*–. El *cluster paraHOX* incluye tres genes que están presentes en la mayoría de los bilaterios estudiados (**Fig.1.10**): *gsx*, *xlox* (= *pdx*) y *cdx*. En *D.melanogaster* no se ha encontrado homólogo de *xlox*; *gsx* y *cdx* son homólogos de *gsh* y *cad*, respectivamente. El descubrimiento de que existe un *cluster paraHOX* impacta sobre cómo entendemos el *cluster HOX*: en vez de pensarlo evolucionando aisladamente como un único *cluster* génico que surgió por sucesivas duplicaciones de un gen ancestral *urHOX*, parece más probable que haya existido un *cluster protoHOX* ancestral que dio origen a ambos *clusters* mediante duplicaciones o fragmentación. La hipótesis *protoHOX* se basa también en el hecho de que los *paraHOX* aparecen entremezclados con los *HOX* en los árboles filogenéticos, y que el *cluster paraHOX* también exhibe el fenómeno de

colinealidad (Brooke *et al.*, 1998; García-Fernández, 2005; Chourrout *et al.*, 2006; Garstang y Ferrier, 2013).

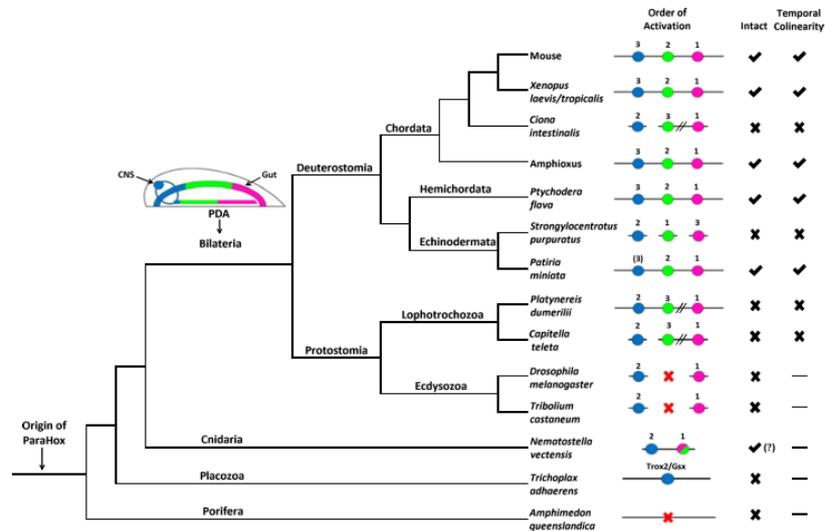


Fig.1.10. Filogenia animal con la correlación entre la integridad del *cluster paraHOX* y la colinealidad. El *cluster paraHOX* se originó antes de la divergencia de Porifera. La organización del *cluster paraHOX* de cada especie se muestra con una línea continua uniendo los genes cuando hay ligamiento. Las líneas diagonales dobles representan genes localizados en los mismos cromosomas pero ubicados a gran distancia. Las cruces rojas representan pérdida de uno o más *paraHOX*. Los círculos representan a los tres genes: *gsx* –azul–, *xlox* –verde– y *cdx* –magenta–. Los números indican el orden en que los genes se activan y expresan. **PDA:** ancestro protostomado-deuterostomado (Fig. extraída de Garstang y Ferrier, 2013).

El proceso de consolidación en *clusters* es intrínsecamente direccional por al menos dos razones: (1) El potencial funcional de una serie coordinada de reguladores es mucho mayor que el de una unidad transcripcional única ya que proporciona posibilidades más integradas, incluyendo efectos de dosis y redundancia. (2) Es concebible que regiones intensificadoras remotas puedan fomentar la aparición de nuevos controles regulatorios sobre el mismo sitio debido a factores transcripcionales generales o específicos, a una accesibilidad incrementada o a una arquitectura cromosómica particular, proceso llamado "*priming* regulatorio". En otras palabras, la consolidación de *clusters* puede ilustrar la evolución de una estructura metagénica y sus metarregulaciones *cis* asociadas (Duboule, 2007).

E.4.- Evolución genómica y EvoDevo: mutaciones en *cis* y cambio morfológico

Se considera que las mutaciones regulatorias hacen una contribución cualitativamente distinta a la evolución fenotípica, en relación con las codificantes. Los argumentos en su favor pueden dividirse en dos categorías básicas.

Por un lado, se propone que es más probable que ciertas diferencias fenotípicas se adquieran por mutaciones en elementos *cis*-regulatorios –CRE, del inglés *cis-regulatory elements*– y no por mutaciones en regiones codificantes. El punto crucial de este argumento es que la transcripción es un proceso dinámico que puede ser finamente sintonizado para demandas funcionales dependientes del contexto, mientras que los cambios estructurales son generalmente más estáticos.

Por otro lado, se propone que la selección natural opera de distinta manera en mutaciones *cis*-regulatorias; debido a dos de sus propiedades de organización y función (**Wray, 2007**):

- ♦ **Codominancia.** Mientras que las codificantes suelen ser recesivas, las mutaciones en regiones *cis*-regulatorias suelen ser codominantes. La selección natural puede operar sobre los heterocigotas, y no se requiere deriva para alcanzar frecuencias alélicas que expongan a los homocigotas.

- ♦ **Organización modular.** La mutación en un módulo puede afectar sólo una parte del perfil total de transcripción.

En el marco de la hipótesis *cis*-regulatoria, planteada inicialmente por **Stern (2000)**, **Carroll (2008)** desarrolla ocho principios sobre los cuales fundamenta una propuesta de teoría de evolución morfológica:

1.- Pleiotropía en mosaico: como la misma proteína puede dirigir el desarrollo de partes muy distintas del cuerpo, también puede provocar diferencias en la anatomía de diferentes especies. Es probable que las mutaciones que alteran la función o actividad de tales proteínas tengan muchos efectos dispersos y potencialmente negativos, por lo que sus secuencias codificantes deben estar bajo restricciones evolutivas. El uso de un mismo gen para varias funciones sugiere que en el curso de la evolución hubo expansión de función más que duplicación.

2.- Complejidad genética ancestral: La distribución filogenética de genes esenciales sugiere que estuvieron presentes en el ancestro de los bilaterios, en el Precámbrico.

La conservación de secuencias indica que hay restricciones funcionales que están operando desde hace más de 500 millones de años de diversificación.

3.- Equivalencia funcional de parálogos y ortólogos distantes: Las propiedades bioquímicas de las proteínas y sus interacciones con receptores, cofactores, etc., han divergido muy poco, como lo muestra la conservación funcional.

4.- Homología profunda: La formación y diferenciación de muchas estructuras como ojos, apéndices y corazones, están gobernadas por grupos similares de genes y algunos circuitos regulatorios profundamente conservados. La existencia de señales regulatorias comunes, actuando en una manera similar en el desarrollo de estructuras que no están relacionadas directamente por ancestría común –i.e., no homólogas–, han sido referidas como “homología profunda” (*deep homology*).

5.- Duplicaciones infrecuentes de los genes esenciales: La duplicación génica no es necesaria para la novedad morfológica, como se creyó antes. Hay evidencia de que las duplicaciones de algunos genes *toolkit* son seleccionadas en contra a causa de los efectos dependientes de dosis sobre los procesos del desarrollo. El ancestro de Arthropoda tenía dos genes *HOX* más que algunos grupos actuales (ver más adelante). La estabilidad en el número de *HOX* en Arthropoda y Tetrapoda, y el rol central de esos genes en el desarrollo y evolución de apéndices es una clara evidencia de que la duplicación génica no es un requerimiento para nuevas funciones y que la mayoría de los cambios evolutivos han ocurrido por mutación en genes previamente existentes. Una explicación razonable puede ser que la aneuploidía de genes regulatorios no es bien tolerada por efectos de dosis. En suma, la duplicación ha ocurrido, pero no es un proceso necesario ni tan frecuente.

6.- Heterotropía: La correspondencia entre cambios heterotrópicos en la expresión génica, desarrollo y morfología, combinada con los roles conocidos de esos genes en *taxa* modelo, evidencia que los cambios en la morfología generalmente resultan de cambios en la regulación espacio-temporal de expresión génica durante el desarrollo.

7.- Modularidad de los CRE: Los genes esenciales y pleiotrópicos se caracterizan por tener regiones regulatorias *cis* largas, complejas y modulares. La organización de los CRE, que gobiernan la expresión en distintos tiempos y lugares durante el desarrollo, tiene implicancias para la evolución de la forma: las mutaciones en un CRE tendrán poco o ningún efecto pleiotrópico y los múltiples CRE son evidencia de que la función

génica se ha expandido y diversificado sin duplicación de regiones codificantes (e.g., Frankel *et al.*, 2011; 2012).

8.- Redes regulatorias amplias: Las proteínas regulatorias individuales controlan de unos pocos a cientos de CRE blanco. Esto es pleiotropismo en una escala enorme. Stark *et al.* (2007), estimaron un promedio de 124 blancos para cada uno de 67 TF analizados. Cada interacción TF-CRE requiere secuencias específicas en los CRE de cada gen blanco.

Las Redes Génicas Regulatorias –GRN, del inglés *gene regulatory networks*– tienen una estructura modular, inherentemente jerárquica en la que se destacan cuatro clases de componentes (Davidson y Erwin, 2006):

- ♦ subcircuitos evolutivamente inflexibles que determinan funciones *upstream* esenciales en la construcción de determinadas partes del cuerpo, son los procesos centrales (*kernel*) de la GRN;
- ♦ pequeños subcircuitos, los conectores (*plug-ins*) de la GRN, que han sido cooptados repetidamente para diversos procesos del desarrollo;
- ♦ interruptores que activan o desactivan subcircuitos para funcionar en un contexto dado y que por lo tanto funcionan como dispositivos de señal/respuesta de la GRN; y
- ♦ baterías génicas de diferenciación.

Los procesos centrales tienen cinco propiedades: (a) son subcircuitos consistentes en genes regulatorios –TF–; (b) ejecutan funciones de determinación del patrón; (c) están destinados a ciertas funciones y no se usan en cualquier parte durante el desarrollo –aunque los genes individuales sí pueden ser usados en distintos contextos–; (d) tienen una estructura en la que los productos de muchos genes regulatorios son necesarios para la función de cada módulo *cis* del proceso central –cableado recursivo o repetitivo *recursive wiring*– y finalmente, (e) la interferencia en la función de cualquier gen del proceso central, destruye también la función central y probablemente produce el fenotipo catastrófico de pérdida de la parte del cuerpo.

Sobre estas bases, se establece la hipótesis *cis*-regulatoria desarrollada por Stern (2000), que podría resumirse en dos pilares fundamentales: la forma evoluciona alterando la expresión de proteínas funcionalmente conservadas y tales cambios ocurren a través de mutaciones regulatorias en *cis*- en genes reguladores del

desarrollo con efectos pleiotrópicos en mosaico, y de sus genes blanco dentro de las redes regulatorias.

Hoekstra et al., (2007) sostienen que el entusiasmo de la EvoDevo por los cambios *cis*-regulatorios es prematuro e infundado, y que es poco probable que el rol de las mutaciones estructurales sea trivial. Destacan que la EvoDevo enfatiza la importancia de la evolución *cis* para cambios anatómicos pero que desestima los aspectos relacionados con el comportamiento, la fisiología, la bioquímica y el metabolismo. La omisión de los caracteres fisiológicos, desconoce mucha información sobre su evolución adaptativa, que usualmente involucra cambios en regiones codificantes.

Por otra parte, plantean que la diferenciación entre mutación estructural y regulatoria tiene límites difusos: de un modo general, prácticamente todos los genes regulan algo. Se preguntan si las mutaciones *dentro* de un gen deberían clasificarse como regulatorias o estructurales. Una sustitución de un aminoácido puede producir cambios en la regulación génica. Así como los elementos *cis*, muchos TF son modulares en su estructura, y se sabe que cambios en sus regiones codificantes pueden afectar la expresión de genes *downstream*. Por eso, prefieren abstenerse de clasificar a los genes como regulatorios o estructurales y a las mutaciones según su localización física.

Quienes cuestionan la hipótesis *cis*-regulatoria, plantean que hay varias maneras de evitar los efectos pleiotrópicos. La primera y más obvia retoma la idea de la duplicación génica seguida de divergencia y formación de parálogos. También el *splicing* alternativo y el reclutamiento de exones podrían eliminar los efectos pleiotrópicos. Según **Hoekstra et al. (2007)**, la hipótesis *cis*-regulatoria se basaría en la eliminación de alternativas. **Lynch y Coney (2000)** calculan una duplicación fijada por gen cada 100 millones de años. Esta es una tasa mutacional baja por gen, pero no por genoma. Con una tasa de entre 0,002 y 0,02 duplicados por gen por cada millón de años, en un genoma moderado de 15.000 genes, habría 60 a 600 duplicaciones por cada millón de años. Sostienen que los polimorfismos en el número de copias están bien documentados y prácticamente cada gen puede ser considerado como una duplicación o quimera a partir de un gen ancestral.

En mi opinión, estos argumentos son resultado de la forma en que se aplican las herramientas estadísticas. Las medias tienden a homogeneizar situaciones muy

diversas y la interpretación puede variar si se modifica la metodología. Al menos para los genes reguladores maestros compartidos por los animales, la formación de familias génicas mediante parálogos, debió producirse muy temprano; si consideramos que se comparten por ancestría. Es más, aún cuando se compartieran por HGT, también estos eventos deben haber ocurrido más o menos tempranamente. Es decir, los datos actuales sobre proteína muestran poca divergencia funcional y de regiones conservadas entre especies cercanas, en comparación con otros eventos, como cambios regulatorios y reordenamientos cromosómicos. Las altas tasas de duplicación calculadas por **Lynch y Coney (2000)**, que resultan de promedios, probablemente no estén reflejando la distribución temporal y de clases de los distintos tipos de eventos. Está claro que existen excepciones, como el caso del gen *HOX3*, que tiene una historia compleja en Arthropoda.

En **1975, King y Wilson** determinaron 99% de identidad entre el ADN humano y de chimpancés y concluyeron que un número relativamente pequeño de cambios en sistemas regulatorios puede explicar la mayor parte de las diferencias. Sin embargo, también se han identificado proteínas de evolución rápida, que podrían estar involucradas en la evolución de los homínidos. **Bustamante et al., (2005)** identificaron algunos TF de evolución rápida. Esto contradice la opinión de que la pleiotropía evita los cambios a nivel de aminoácido en los TF. Este estudio determinó que las HAR *–human accelerated regions–* en su mayoría implican cambios en 1) regiones no codificantes, 2) regiones *contiguas* a regiones codificantes y 3) si son regiones codificantes, en general son TF.

Se proponen también varios ejemplos de sustituciones de aminoácido que están claramente involucrados en la adopción de un nuevo modo de vida, esto es, la ocupación de un nuevo nicho adaptativo; por ejemplo, cambios en hemoglobina que les permiten a ciertas aves migrar sobre cadenas montañosas, proteínas anticongelamiento en peces que les permiten vivir en aguas frías y ARNasa pancreática en monos, asociada a incrementos en el herbivorismo. El estudio de “genes de especiación” está en su infancia, sólo un grupo de genes que contribuyen a la aislación reproductiva han sido identificados. Como sea, está claro que los cambios *cis* por sí solos no pueden causar la aislación postcigótica (**Hoekstra et al., 2007**).

Carrol (2008) considera que la evolución proteica no es suficiente para establecer nuevos vínculos entre GRN. Los casos conocidos de evolución de secuencia codificante deben ser sopesados con las escalas de tiempo y las distancias taxonómicas implicadas, y a la luz de la equivalencia funcional. Cierta divergencia en la actividad a estas escalas de tiempo no debería sorprender; de hecho, es la frecuencia de equivalencia funcional lo que se destaca.

En la jerarquía más baja de la GRN, las baterías de diferenciación génica son más lábiles y sufren una continua renovación. Los cambios internos ocurren de varias maneras –estructurales; cooptación de nuevos genes, pérdida–. Estas baterías de diferenciación residen en la periferia de las GRN del desarrollo y se expresan en los estados finales de un proceso: reciben instrucciones, en vez de generarlas. Las asociaciones *cis*-regulatorias que pueden ser consideradas como interruptores señal/respuesta, regulando otros subcircuitos de la red, parecen ser responsables de muchos tipos de cambio evolutivo en los procesos del desarrollo (**Davidson y Erwin, 2006**). Este punto de articulación interna de las GRN es central en las consideraciones sobre capacidad evolutiva que se ven el próximo apartado (**Kirschner y Gerhart, 1998**). Los cambios en distintos tipos de componentes pueden tener efectos cualitativamente muy distintos. Es más, emerge una relación entre la clase de componente de la red en la que los cambios pueden ocurrir y el nivel taxonómico de los efectos morfogenéticos (**Fig.1.11**).

Los cambios más frecuentes y menos restrictos ocurren en las regiones periféricas de la GRN; son los que se observan en muchos procesos de especiación y dan cuenta de muchas propiedades adaptativas del organismo –tegumento, enzimas digestivas, ubicación de estructuras sensoriales, etc.–. En el otro extremo, los procesos centrales especifican el dominio de cada parte del cuerpo en el sistema espacial coordinado del embrión post-gastrular –el estado filotípico–; los cambios allí son prohibitivos, so pena de catástrofe del desarrollo. Esos procesos centrales deben haberse establecido temprano, durante la diversificación inicial de los bilaterios y retienen su carácter desde entonces. Una vez formados y operando, deben haberse hecho refractarios al cambio.

Los cambios en la arquitectura corporal entre y dentro del *phylum* se han producido por cambios en distintos niveles de las GRN con consecuencias muy distintas. El

ensamblaje de los procesos centrales durante el cámbrico, es la base de la conservación filética de los *baupläne*. Por lo tanto, la posición de los cambios adaptativos posteriores es forzada hacia niveles menores en la jerarquía de la GRN. El resultado es lo que llamamos restricciones en el desarrollo o restricciones filogenéticas (Davidson y Erwin, 2006).



Fig.1.11. Cambios en la GRN y sus consecuencias evolutivas. La columna izquierda muestra los cambios en los componentes de las redes; la derecha muestra las consecuencias evolutivas esperadas, que difieren en su nivel taxonómico (Fig. extraída de Davidson y Erwin, 2006).

F.- Capacidad evolutiva (*evolvability*)

El término capacidad evolutiva surge con la genética de poblaciones, como una medida adimensional de la variación genética cuantitativa. Se lo usa en dos sentidos diferentes: para referir la variación actual y sus consecuencias inmediatas, o para la capacidad de acumular variación y sus consecuencias a largo plazo (Barton y Partridge, 2000; Brookfield 2009). Kirschner y Gerhart (1998) incorporan el concepto a la biología molecular y del desarrollo. Definen la capacidad evolutiva como la capacidad para generar variación fenotípica heredable y seleccionable. Esta capacidad puede tener dos componentes: reducir la letalidad potencial de las mutaciones y reducir el número de mutaciones necesarias para producir nuevos fenotipos (Barton y Partridge, 2000).

La capacidad evolutiva se observa en las grandes estrategias del desarrollo, particularmente en el uso conservado de una organización compartimental durante el estado filotípico. La conservación del estado filotípico ha sido explicada como resultado de restricciones impuestas por el *bauplän* y las redes regulatorias que lo definen (Sander y Schmidt-Ott, 2004; Peel et al., 2005). Una postura alternativa considera que esta explicación es parcial, y que los planes corporales han sobrevivido porque proveen una función que está bajo continua selección: las muchas diversificaciones ofrecidas por su capacidad evolutiva.

Kirschner y Gerhart (1998) sugieren que un *bauplän* filotípico es un grupo conservado de reacciones espacialmente ordenadas, que son seleccionadas constantemente para la diversidad de historias de vida que soportan, incluyendo tanto los estados tempranos de nutrición y protección embrionaria, como las formas adultas. La adquisición de nuevas funciones viene acompañada de nuevas restricciones, con las cuales disminuyen las probabilidades de variación fenotípica viable. Entonces algunos procesos estarían conservados, no tanto por restricciones sobre sí mismos, como por el hecho de que des-restringen la variación fenotípica en otros procesos y así facilitan el cambio evolutivo.

Una pregunta que se desprende de esto, es si existe una selección para la capacidad evolutiva. Esta cuestión es importante, porque la capacidad evolutiva confiere beneficios futuros, más que presentes. Según el modelo estándar de genética poblacional, la evolución adaptativa ocurre por introducción secuencial de mutaciones ventajosas en las poblaciones. Las trayectorias del cambio evolutivo están gobernadas por la mutación, selección y deriva génica en una población, y los cambios selectivos son dirigidos por el *fitness* relativo de los genotipos y los alelos. Es el actual *fitness* más que cualquier futuro potencial, lo que determina las posibilidades evolutivas. La falta de previsión de la selección natural fija el alelo con mayor *fitness*, incluso si el genotipo resultante representa un callejón sin salida. Si la capacidad evolutiva representa un potencial evolutivo a largo plazo, la selección individual puede destruirla (Brookfield, 2009).

Kirschner y Gerhart (1998) consideran que a nivel de individuo, muchos procesos que contribuyen al *fitness* implican plasticidad fenotípica. En tal caso, el alelo con mayor *fitness* entre todos los disponibles, es aquel que tiende a incrementar la

variabilidad, de manera que los individuos estarían estabilizados para los efectos letales de la mutación. En consecuencia, la población podría acarrearse más variación no letal, que estaría disponible para nuevas combinaciones. Así, la capacidad evolutiva se vería aumentada y podría haber provisto ventajas a nivel de clado cuando ocurrieron radiaciones rápidas.

La selección individual puede llevar a una especie a una incapacidad para responder adaptativamente a los cambios futuros. Entonces, si la capacidad de los linajes para impedir la extinción es variable –y aquellos que permanecen evolucionables tienen menor probabilidad de extinción–, la capacidad evolutiva podría mantenerse estable en muchos linajes a través de la selección a niveles superiores (**Brookfield, 2009**).

Luego, se suman conceptos desarrollados por **West-Eberhart (2005a,b)** sobre plasticidad fenotípica y se plantea una “teoría de la variación facilitada” que destaca la importancia de los cambios regulatorios, pero se enfoca en los blancos de esa regulación. Una vez que aparecen los cambios, impactan sobre aquello que es regulado, especificando nuevas combinaciones, cantidades y estados funcionales; de modo que se genera un nuevo carácter sobre el que actúa la selección natural.

Los cuatro principales eventos evolutivos precámbricos –aparición de los procariontes; de los eucariotes, de la multicelularidad y de animales con ejes corporales– se asocian a componentes centrales conservados, entre los cuales están los genes del desarrollo. Ante la conservación, el pensamiento tradicional es que hay restricciones al cambio. **Gerhart y Kirschner (2007)** proponen revisar esta idea y se preguntan cuáles son las propiedades de los animales que les permiten generar variación fenotípica en grandes cantidades. Ellos creen que este proceso está facilitado o des-restringido debido a una serie de factores, como un acople regulatorio débil, procesos exploratorios, robustez y acomodabilidad y compartimentalización.

En el acople regulatorio débil, la señal y la respuesta interactúan indirectamente a través de un intermediario o conector (**Davidson y Erwin, 2006**). La respuesta puede ser mucho más compleja que la señal y es capaz de iniciarse *per se*, pero se auto-inhibe. La señal sólo actúa para desencadenar el proceso; de manera que señal y respuesta no necesitan coevolucionar. Este tipo de acople permite la elección de vías alternativas de desarrollo en función de las señales ambientales. Si esta capacidad de

generar grandes diferencias fenotípicas existe normalmente en un individuo –e.g., diferencias entre macho y hembra o polifenismos–, como estados alternos auto-inhibidos, y cada estado puede ser determinado por una señal simple, entonces se pueden dar grandes cambios evolutivos con cambios génicos pequeños.

Los procesos exploratorios se basan en la variación y selección fisiológica –e.g., formación del citoesqueleto, conexiones neuronales, inmunidad, comportamiento–. La compartimentalización facilita el uso de procesos centrales en distintas combinaciones, mientras decrecen sus chances de interferencia –pleiotropía– (Gerhart y Kirschner, 2007).

G.- Ajuste fenotípico (*Phenotypic accomodation*)

Dependiendo del efecto sobre el *fitness*, se pueden seleccionar mecanismos que estabilizan el fenotipo ante el ambiente cambiante, o una respuesta plástica en la que distintos estados fenotípicos son adaptativos para distintos ambientes. La estabilización fisiológica del fenotipo es la homeostasis; mientras que durante el desarrollo, la estabilización se puede producir por canalización –capacidad de retomar la ruta inicial luego de un disturbio– o por robustez –capacidad de tolerar o ser insensible al cambio–. En cambio, la plasticidad implica que el fenotipo cambia con las condiciones. Es un subproducto de la físico-química del desarrollo y en consecuencia, puede evolucionar en dos direcciones: su eliminación y la estabilización del fenotipo, o la explotación de sus posibilidades. La plasticidad fenotípica puede ser continua, en cuyo caso se la llama norma de reacción; o discontinua, en cuyo caso se la llama polifenismo –no requiere polimorfismo genético–. Los polifenismos se pueden generar por discontinuidades ambientales, en cuyo caso afectan a un grupo de individuos; o por selección de diferentes vías de desarrollo, en cuyo caso afectan a uno o pocos individuos (Nijhout, 2003).

Los mecanismos que llevan a la robustez, así como los que llevan a la plasticidad, permiten que los procesos centrales se usen en nuevas combinaciones para producir nuevos caracteres y reducen la letalidad debida a variación genética. Así, menos variación genética es eliminada de la población y se mantiene disponible (Gerhart y Kirschner, 2007).

El ajuste fenotípico es una innovación adaptativa debida a plasticidad en el desarrollo y puede referirse a morfología, fisiología o comportamiento, involucrando varios niveles. Para ilustrar el concepto, **West-Eberhart (2005 a,b)** refiere a una cabra con parálisis en sus patas delanteras, que alcanzó el año de vida saltando sobre sus patas traseras. Esta acomodación en el comportamiento tuvo consecuencias a nivel morfológico, con importantes cambios de forma óseos y musculares, e incluso la aparición de un nuevo grupo de tendones. La nueva morfología no surgió de cambios genéticos, sino de una expresión reorganizada de capacidades que ya existían. Desde el punto de vista evolutivo, estas características pueden facilitar el origen de novedades adaptativas. Independientemente de qué disparó el mecanismo, éste controló una novedad morfológica compleja, coordinada y modular definida por una respuesta integrada del fenotipo a un nuevo inductor (*input*). El cambio morfológico fue mediado por el comportamiento. Algunas de las nuevas características se asemejan a las novedades evolutivas de los mamíferos bípedos: su tórax comprimido y el isquion elongado recuerdan al canguro, el esternón recuerda al orangután –que, como la cabra, tampoco tiene una cola como soporte–. Este caso fue descrito por **Slijper (1942)**, en un tiempo en que los instrumentos de observación y documentación no tenían las posibilidades actuales. Sería interesante revisar este trabajo, pero lamentablemente no he podido acceder a él. **Taylor (1987)** cuestiona los resultados sobre la base de que una cabra con tales características no hubiera podido sobrevivir en condiciones naturales. Ese punto es indiscutible, sin embargo, considero que el asunto relevante es determinar si tal reorganización del plan corporal es efectivamente posible. Las modificaciones a nivel óseo parecen probables en cierta medida, pero la supuesta generación de un nuevo grupo de tendones es algo verdaderamente sorprendente, de ser cierto.

El modelo general para una teoría evolutiva que incorpora la plasticidad fenotípica, implica: (1) Aparición de un nuevo input que afecta a uno –si la causa es genética– o varios individuos –si la causa es ambiental–. (2) Los individuos con capacidad de respuesta expresan un nuevo fenotipo, sin cambio genético. (3) Propagación inicial, dada por la continuidad del inductor. (4) Ajuste genético; si existe variabilidad en la sensibilidad y respuesta al inductor, habrá cambio en las frecuencias génicas.

Según **West-Eberhard (2005a,b)**, no hay conflicto entre este modelo y la visión estándar de la evolución adaptativa que comprende variación, selección y cambio de frecuencia génica. Pero el análisis incluye pasos del proceso que usualmente quedan afuera; pasos con implicancias importantes, por ejemplo, el hecho de que no importa si la inducción original es mutacional o ambiental; y el hecho de que los caracteres inducidos ambientalmente –y sostenidos en el tiempo– pueden propagarse sin selección positiva.

El “ajuste genético” difiere respecto al concepto de “asimilación” de **Waddington (1953)** en que considera el cambio genético tanto en forma como en frecuencia y sobre todo, no implica la evolución de un control genético incrementado sobre el carácter, sino que al contrario, puede consistir en una mayor relajación sobre esos caracteres en el establecimiento de un polifenismo con expresión condicional adaptativa de formas alternativas. Los caracteres formados de esta manera no son realmente nuevos, pero la combinación que los hace distintivos respecto a sus ancestros sí lo es, y los componentes quedan *de novo* sujetos a selección bajo nuevas condiciones. West-Eberhard no considera que el ajuste fenotípico solo, sin cambio genético, pueda llevar a adaptación evolutiva, porque ésta no sería una evolución darwiniana: la condición darwiniana del efecto de *fitness* no está dada si la dispersión del carácter sólo se debe al inductor.

H.- ¿Existe la evolución lamarckiana?

Jablonka (2007), toma este concepto de plasticidad fenotípica pero se inclina por ideas menos darwinianas. Plantea –contra una tradición “gen-céntrica”– que los aspectos determinísticos del desarrollo sólo corresponden a algunas situaciones particulares, pero que en la mayoría de los casos, los procesos están facilitados más que determinados y que sólo en condiciones experimentales altamente estructuradas y controladas, se puede considerar como determinante a un solo componente o interacción. Lista los siguientes tipos de inductores implicados en el desarrollo y la herencia de un carácter: genéticos; epigenéticos –circuitos metabólicos, herencia estructural, marcaje de la cromatina y ARN heredable–; inductores ambientales y fisiológicos en el desarrollo; ambiente externo; construcción transgeneracional del nicho ecológico; aprendizaje y nichos sociales. En suma, los caracteres variables

heredables en todas sus dimensiones deben ser considerados como unidades evolutivas y no sólo los genes.

Müller y Newman (1999) sostienen que las homologías⁵, entendidas como unidades naturales en la construcción del plan corporal, se generan mediante pasos que involucran todos esos eventos. Es decir, que los módulos surgen como consecuencia de cambio darwiniano y no darwiniano. No niegan la importancia de los genes pero enfatizan que la evolución genética ocurre en un contexto más amplio y determinante. Sostienen que los factores no genéticos afectan la evolución morfológica de dos maneras. Una es generativa –provoca la aparición de nuevas estructuras– y la otra es organizacional –causa la integración de estructuras en ensamblajes fijados–.

Proponen que la evolución de la vida tuvo una fase pre-mendeliana, donde las propiedades físico-químicas de los materiales influyeron sobre la generación de forma y el autoensamblaje –e.g., formación de lumen, compartimentalización, formación de capas, etc.–. Esas formas primitivas no necesitaron programas de desarrollo, sino que se autoacomodaban espontáneamente en función de sus propiedades termodinámicas. Luego fueron cooptadas por el genoma, que aseguró su heredabilidad y una relación más determinística. En una segunda fase, mendeliana, más de estos fenómenos no genéticos se siguieron agregando, ya no sólo incluyendo las propiedades de los materiales, sino también la organización jerárquica de las interacciones del desarrollo y la dinámica de redes inductoras. En esta segunda fase, las innovaciones morfológicas pueden aparecer como subproductos de un sistema del desarrollo afectado. La variación continua de un parámetro puede llevar a resultados fenotípicos discontinuos, resultantes de cambiar o traspasar ciertos umbrales –distancia entre inductores, concentración de morfógeno, etc.–. Luego, la generación de módulos consiste en la integración de los nuevos elementos: genes, desarrollo y estructura se hacen cada vez más interdependientes. La fase final es la autonomización, se caracteriza por la creciente independencia de las entidades de construcción: la homología se puede preservar mientras los constituyentes

⁵ Más adelante se reseñan algunas discusiones sobre qué significa homología. Estos autores le dan un tratamiento semejante al de módulos del desarrollo.

subyacentes, genéticos, moleculares y del desarrollo, derivan y se desacoplan (Müller y Newman, 1999).

I.- Es lo mismo pero no es igual: de qué hablamos cuando hablamos de homología

En la literatura del desarrollo, la similitud de función es usada muchas veces para identificar genes y estructuras como “homólogos”, basándose sólo en patrones de expresión. En realidad, estructuras en las que se expresan genes “funcionalmente homólogos”, pueden o no ser evolutivamente homólogas. Las redes del desarrollo y la morfología adulta pueden estar desacopladas a nivel de determinación de patrones. La función puede estar conservada incluso cuando la secuencia varía. La variación genotípica a veces no coincide con la variación funcional y recíprocamente, pequeños cambios de secuencia pueden resultar en grandes cambios de función. Así, aunque los cambios mutacionales son necesarios para el cambio fenotípico, no están relacionados de manera simple (Kirschner y Gerhart, 1998). Esta complejidad, hace que sea riesgoso asignar homología a estructuras adultas, basada sólo en datos comparativos de genética del desarrollo (Peel, 2008).

La “homología profunda”⁶ describe una situación en la que los genes son homólogos, pero las estructuras en las que ellos se expresan no lo son. Un ejemplo es la expresión de genes *pax* y los receptores de luz en diversos *phyla*. Es claro que genes homólogos pueden generar estructuras no homólogas; por este motivo, el concepto de “homología profunda” debería evitarse (Meyer, 1999). Y viceversa, hay muchos ejemplos de estructuras homólogas que surgen por distintos procesos del desarrollo. La producción de caracteres homólogos mediante procesos divergentes evidencia que los procesos del desarrollo pueden evolucionar sin afectar el carácter producido. El genotipo y el fenotipo pueden desacoplarse durante la evolución de caracteres homólogos y homoplásicos; un proceso conocido como “deriva fenogenética” o “deriva del sistema de desarrollo” (Hall, 2003b). Estos hechos resaltan

⁶ Distintos autores usan los términos “homología parcial” y “profunda” de maneras diferentes. Aquí elijo el término “profunda” en el sentido descrito por Carrol en el apartado E.4., donde se comparten procesos y las estructuras son similares, pero no hay homología real, y “parcial”, para el caso inverso, en que estructuras homólogas son establecidas por procesos divergentes.

la cuestión sobre si puede existir la “homología parcial” allí donde las estructuras son homólogas, pero los genes que se expresan en los precursores no lo son. Aparentemente sí: genes, GRN y mecanismos del desarrollo no-homólogos pueden generar estructuras que típicamente son consideradas como homólogas. Si la base genética fuera considerada necesaria, entonces muchas estructuras deberían dejar de considerarse homólogas (Meyer, 1999).

En palabras de Wake (1999) “homología”, nuestra palabra para identidad o similitud (*sameness*), es necesariamente un concepto parcial respecto a características que cambian. La palabra data de épocas pre-evolutivas y representa el idealismo del siglo XVIII. Se la considera desde dos principales perspectivas: los sistemáticos se enfocan en la ancestría común de los *taxa*, mientras que los morfólogos se enfocan en la similitud y desarrollo de estructuras individuales presuntamente homólogas. Aparece una dicotomía: los primeros consideran la homología dependiendo estrictamente de un análisis cladístico; los segundos, la ven como explicación del mantenimiento de identidad de estructuras durante la evolución. Para Raff (1999), los filogenetistas asumen que los procesos naturales como la evolución operan de un modo parsimonioso, siguiendo una línea de pequeños cambios, donde las formas más relacionadas son más similares que las más distantes, y las homologías en el desarrollo son más fácilmente demostrables en formas relacionadas. Las características homólogas entre dos organismos relacionados deberían aparecer por procesos similares y deberían poder reconocerse fácilmente por criterios ontogenéticos. Sin embargo, la idea de que la homología surge de una continuidad informativa sugiere una mirada gradualista en la que el cambio fenotípico mapea de manera lineal con el cambio genómico. Muchos caracteres no muestran esta linealidad, según hemos visto desde el punto de vista de los desacoples en las GRN y de la plasticidad fenotípica.

Los mecanismos del desarrollo se pueden conservar incluso cuando la estructura no se forma. En un análisis filogenético, las reversiones se consideran homoplasias, pero si algo está en el mismo lugar, tiene la misma forma, se desarrolla de la misma manera y se relaciona igual con sus circundantes, un morfólogo insistirá en que se trata de homología; homología latente en este caso (Wake, 1999).

Muchas novedades evolutivas deben tener homologías en las especies ancestrales si son producidas por reformulaciones del patrón ontogénico. Innovaciones como las derivadas de heterotropía, pueden existir en la morfología ancestral como estructuras homónimas en las especies descendientes (**West-Eberhard, 2005**). La modularidad ocurre en muchos niveles de la organización biológica y puede producir homología serial o iterativa. El sistema *HOX* es un ejemplo. Podemos construir árboles de genes, seguir cambios entre parálogos y ortólogos, y empezar a entender cómo la iteración y la evolución han producido un sistema de señalización genética que es central en el diseño animal. Por otra parte, la homología de secuencia de dos genes puede establecer su ancestría común, pero eso no establece un ancestro común para todas las unidades biológicas que lo portan, especialmente si tenemos en cuenta la posible ocurrencia de reclutamientos repetidos por HGT (**Syvanen, 2012**).

Las [reversiones / rudimentos / vestigios / atavismos]⁷ evidencian el potencial genético no expresado que es retenido, y cómo los programas del desarrollo persisten luego de que una particular estructura se pierde. Los atavismos filéticos aparecen en especies cuya evolución se caracteriza por frecuentes reversiones de caracteres ancestrales (**Hall, 1995**). Cuando podemos identificar un fenómeno como homología latente, nos acercamos a entender cómo se relaciona la homoplasia con la homología por un lado y con la producción de variabilidad por el otro. El hecho de que los genes, sus productos, los procesos celulares y del desarrollo, e incluso partes de los organismos puedan ser considerados homólogos, da testimonio de la homología, pero sobre todo de las posibilidades sin fin que se nos aparecen como homoplasias (**Wake, 1999**).

Meyer (1999) y **Hall (2003b)** se preguntan si homología y homoplasia representan una dicotomía o un continuo de procesos biológicos (**Fig.1.12**). Reconocen tres clases de homoplasia en relación a si usan vías del desarrollo similares o divergentes: convergencia por un lado, paralelismo por otro y, finalmente [reversiones / rudimentos / vestigios / atavismos], que no son sinónimos pero tienen relaciones cercanas. Las dos últimas clases usan procesos del desarrollo semejantes. Dado que los caracteres homoplásicos pueden tener procesos del desarrollo compartidos con caracteres normalmente clasificados como homólogos, esto los lleva a preguntar si es posible

⁷ **Hall (2003b)** los agrupa en una sola clase, por ese motivo los anoto entre corchetes.

encontrar una base común entre las aproximaciones filogenéticas y las del desarrollo. Hall propone un continuo entre homología, [reversiones / rudimentos / vestigios / atavismos] y paralelismos, dejando la convergencia como la única clase de homoplasia.

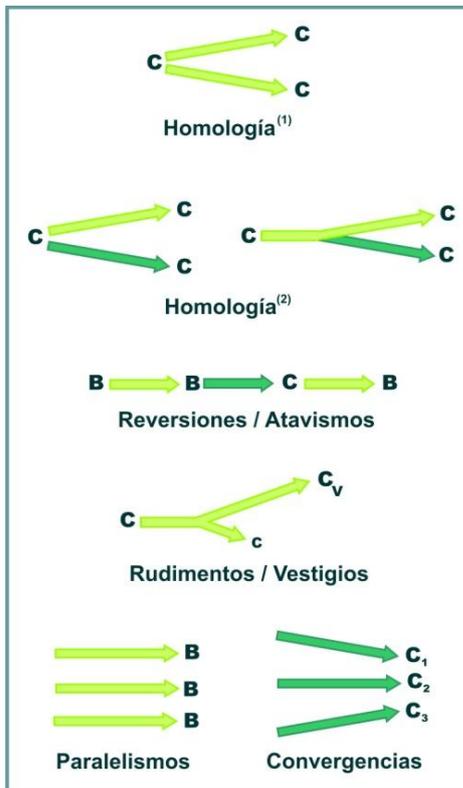


Fig.1.12. Representación diagramática de las categorías de similitud. Las flechas claras indican vías del desarrollo compartidas. Las oscuras, muestran divergencia en los mecanismos del desarrollo. **Homología⁽¹⁾**: C es un carácter homólogo y surge por mecanismos del desarrollo compartidos. **Homología⁽²⁾**: C es homólogo y surge por mecanismos divergentes. La divergencia puede involucrar la vía completa –izquierda– o parte de ella –derecha–. **Reversiones/atavismos**: el carácter B es una reversión –ocurre en todos los individuos– o un atavismo –ocurre sólo en uno–. **Rudimentos/vestigios**: C_v es un vestigio –encontrado en adultos– de carácter C; c es un rudimento –embrionario– del carácter C totalmente formado en los *taxa* ancestral y hermano; c comparte sólo una parte temprana de las vías del desarrollo. **Paralelismo**: B aparece en linajes relacionados pero no en el ancestro común, y surge por mecanismos del desarrollo similares. **Convergencia**: C₁, C₂ y C₃ son caracteres similares, producidos por distintos procesos del desarrollo, en linajes distantes (Fig. extraída de Hall, 2003b).

relacionados pero no en el ancestro común, y surge por mecanismos del desarrollo similares. **Convergencia**: C₁, C₂ y C₃ son caracteres similares, producidos por distintos procesos del desarrollo, en linajes distantes (Fig. extraída de Hall, 2003b).

Hall (2003b) considera que las definiciones tradicionales de homoplasia son insatisfactorias tanto desde el punto de vista filogenético como desde el desarrollo, ya que no están unificadas ni por una historia evolutiva independiente, ni por diferencias en los mecanismos del desarrollo que forman el carácter en los distintos *taxa*. Usando el criterio del desarrollo para separar homología y homoplasia, propone una categorización donde:

- homologías, reversiones, rudimentos, vestigios y atavismos reflejan cambios evolutivos de los que se espera que compartan procesos
- paralelismo refleja procesos del desarrollo que pueden haber divergido

c).- convergencia refleja procesos diferentes del desarrollo

Este esquema, sin embargo, se basa en la idea tradicional de herencia vertical. No queda claro qué lugar ocuparían en esta caracterización las homoplasias debidas a HGT; probablemente sería necesario crear una cuarta categoría para ellos.

J.- La evolución del desarrollo en insectos

J.1.- Desarrollo de los insectos: estados pre-filotípicos

Hay un acuerdo general respecto a que la banda germinal larga es derivada, pero no está claro si el tipo ancestral fue una banda germinal corta o intermedia. Odonata –un orden basal de Pterygota–, suele tener banda germinal intermedia. Los miembros de Archaeognatha y Zygentoma (ex Thysanura) tienen una banda germinal extremadamente pequeña, donde la gastrulación parece ocurrir en los segmentos anteriores de la cabeza. Los crustáceos, probablemente los más relacionados a Insecta, pese a no ser un grupo monofilético (**Fig.1.13**), se desarrollan en un modo que recuerda a la embriogénesis de banda corta (**Davis y Patel, 2002**). La larva nauplio está formada por los tres segmentos anteriores; algunos autores llaman “naupliares” a los tres segmentos homólogos iniciales del embrión de insectos (**Peel et al., 2005**). Los embriones de banda germinal corta crecen a través de una zona de crecimiento, cuyo alcance y universalidad están pendientes de determinar; ya que algunas observaciones sugieren que los reordenamientos celulares podrían tener una función importante en la elongación (**Davis y Patel, 2002**).

Sabemos mucho más sobre los estados derivados de la línea evolutiva de Insecta, que sobre el punto en el que comienza. La (**Fig.1.14**) presenta un cladograma mostrando la forma predominante en los órdenes de Insecta. Conocemos detalles finos acerca del desarrollo de *D.melanogaster* a nivel morfológico y genético, pero sabemos bastante poco sobre otros insectos, menos aún sobre especies basales de Insecta. Es importante entender cómo y por qué los insectos ancestrales de banda germinal corta evolucionaron hacia formas de banda germinal larga. Si tenemos una conjetura razonable sobre cómo un insecto ancestral de banda germinal corta segmentaba su cuerpo, podemos ubicar filogenéticamente y ordenar temporalmente los cambios ocurridos. Fundamentalmente, la gran cuestión de banda germinal corta *versus* larga se puede dividir en dos aspectos: cómo se establece el patrón del

blastodermo en cada caso y cómo se especifican los segmentos posteriores en la banda corta (Liu y Kaufman, 2005a).

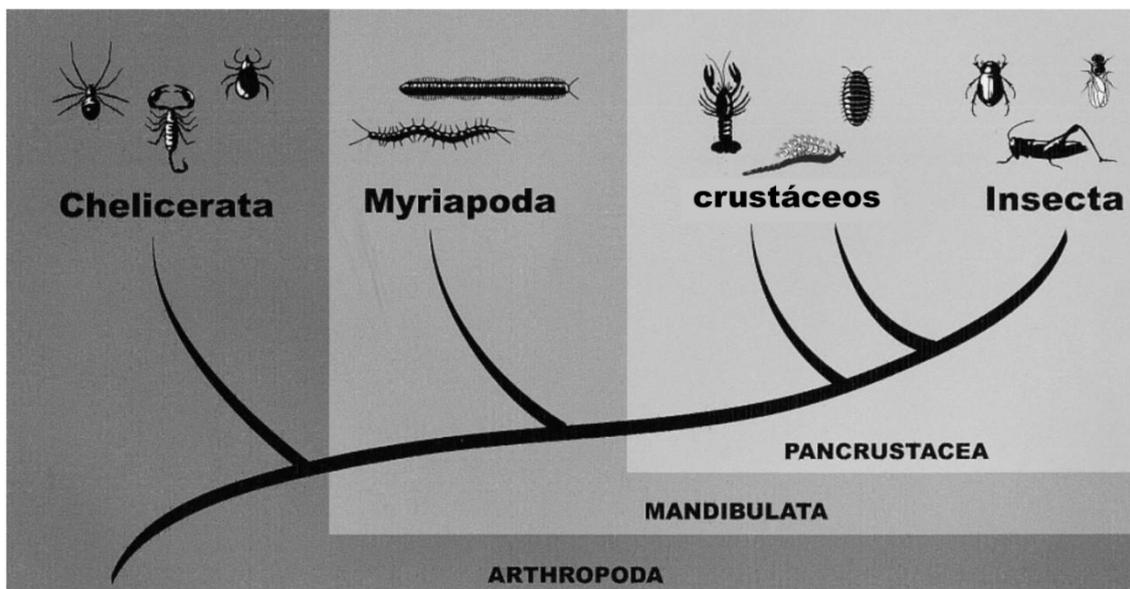


Fig.1.13. Filogenia de las clases de Arthropoda. Insectos y crustáceos se agrupan como un taxón. El modelo Pancrustacea (Zrzavý y Štys, 1997) implica que el grupo crustáceo es parafilético. Aquí se mantiene el agrupamiento tradicional de Pancrustacea con Myriapoda como Mandibulata (Giribet et al., 2001). Estas tres clases, junto con Chelicerata componen el phylum Arthropoda (Fig. extraída de Hughes y Kaufman, 2002).

Las filogenias actuales sugieren que la banda germinal larga en Holometabola es producto de evolución convergente (Savard et al., 2006). Los cuatro órdenes principales de holometábolos en cuanto a biodiversidad, contienen especies con embriogénesis de banda germinal larga. Sin embargo, Lepidoptera, Coleoptera e Hymenoptera también incluyen especies que han retenido –o re-evolucionado, en el caso de avispas parasíticas– distintos grados de segmentación secuencial (Peel, 2008; Davis y Patel, 2002). A esto se suma que el tipo de banda germinal generalmente no refleja los mecanismos moleculares de determinación del patrón. En Coleoptera, la comparación de datos de expresión muestra que los mecanismos moleculares están mucho más conservados de lo que sugiere la diversidad de tipos germinales. Por otra parte, al comparar a *D.melanogaster* y *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) –una avispa parasítica–, ambas con banda germinal larga, encontramos mecanismos moleculares bien distintos en el establecimiento del eje A-P:

D.melanogaster utiliza a Bicoid como morfógeno anterior y represor de Caudal, que es un morfógeno posterior; pero el gen *bicoid* (*bcd*) es una novedad evolutiva propia de los dípteros ciclorrafos. *N.vitripennis* captura al mensajero de *caudal* anclándolo al polo posterior para generar el gradiente proteico (Hsia y McGinnis, 2003; Olesnick y McGinnis, 2007).

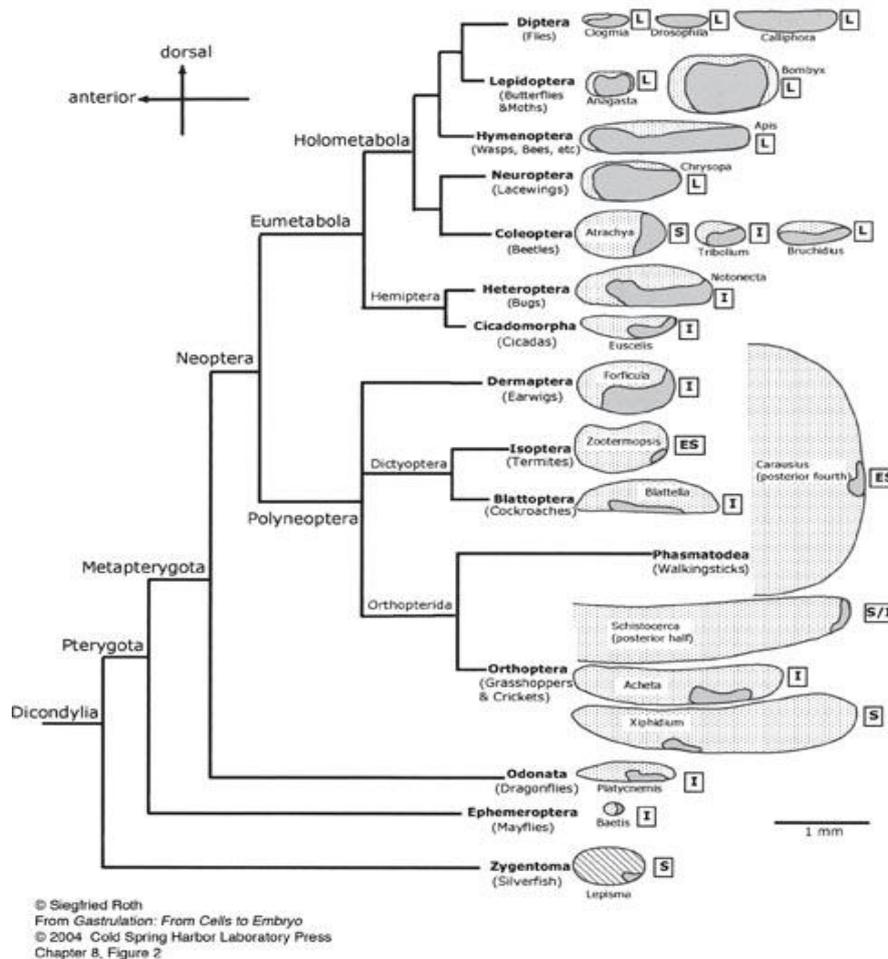


Fig.1.14. Filogenia de los órdenes de Insecta y su relación con los tipos de banda germinal observados en especies de cada uno. Los huevos están representados a escala; la región clara señala el vitelo y la zona más oscura señala la banda germinal corta, intermedia o larga; grande o pequeña y su posición relativa (Fig. extraída de Roth, 2004).

Se considera que el factor ecológico ha sido importante para la evolución repetida de la banda germinal larga y que las transiciones deben haber ocurrido en respuesta a la selección para incrementar la velocidad de la embriogénesis. Por un lado, la celularización es especialmente retrasada en Holometabola, y el sincicio permite que

los gradientes de morfógenos se formen más rápidamente, prescindiendo de señalización intercelular compleja. Por otro, la asignación de células a segmentos tiene una dinámica temporal diferente entre los dos tipos de desarrollo (Peel, 2008).

J.2.- Patrones moleculares y desarrollo temprano en insectos

J.2.1.- Estados prefilotípicos

Liu y Kaufman (2005a) plantean un árbol de preguntas que sirve como guía para la deconstrucción del problema sobre la especificación de banda germinal corta vs. larga. Se destacan dos preguntas centrales: cómo se determina el patrón en el blastodermo en esos dos modos de segmentación y cómo se especifican los segmentos posteriores en los insectos de banda germinal corta.

En *D.melanogaster*, una cascada jerárquica de genes divide secuencialmente el embrión en territorios cada vez más pequeños, resultantes en un patrón repetitivo de segmentos a lo largo del eje anteroposterior. Los productos génicos provistos maternalmente activan a los genes *gap*, que son cigóticos. Cuando se activa la siguiente clase de genes, los *pair-rule*, aparece el primer indicio de un patrón repetitivo. En un ambiente celular, la difusión de TF es menos común; por lo tanto es poco probable que un mecanismo de este tipo funcione en la zona de crecimiento en artrópodos de banda germinal corta (Damen, 2007). Sin embargo, se sabe que existe cierto grado de difusión de TF en entornos celulares (Maizel et al., 1999; Spatazza et al., 2013).

En el blastodermo de *D.melanogaster* existe un sistema anterior que determina la cabeza y el tórax, mientras que un sistema posterior determina el abdomen. Esto es significativo, ya que en los insectos de banda germinal corta, cabeza y tórax se determinan juntos. El morfógeno anterior es el gen *bicoid* –bcd–; pero este gen sólo está presente en dípteros ciclorrafos. En *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797), *orthodenticle* –otd– cumple una función de determinante anterior, actúa con *hunchback* –hb– y juntos tienen una función semejante a la de *bcd*. En los grupos estudiados que tienen un sistema anterior, hay variaciones sobre cuál es el morfógeno y de qué manera actúa; e.g., en *Anopheles gambiae* (Giles, 1902), *otd* no es materno como sí lo es en *T.castaneum* (Peel et al., 2005; Peel, 2008; Rosenberg et al., 2009; Mito et al., 2010).

A diferencia de lo que ocurre con el sistema anterior, el mecanismo posterior parece estar ampliamente conservado; usa dos genes: *caudal* –*cad*– y *nanos* –*nos*–. *nos* se localiza posteriormente y funciona en la determinación axial primaria mediante represión posterior del *hb* materno; *i.e.*, no actúa como un instructivo posterior, sino como uno permisivo. La represión de *hb* por *nos* parece estar conservada entre los insectos. En *D.melanogaster*, el ARN de *cad* es cargado maternalmente y está bajo control traduccional del sistema materno anterior, que establece un gradiente proteico y determina el patrón abdominal por activación de los genes *gap* abdominales *knirps* –*kni*– y *giant* –*gt*– (Rivera-Pomar *et al.*, 1995; 1996; Dubnau y Struhl, 1996). En todos los órdenes de insectos examinados hasta ahora, *caudal* se expresa en regiones posteriores del embrión, mostrando expresión y función conservadas. La expresión anterior de *hb* es un evento crucial en la determinación del eje A-P. El nexo entre los dos sistemas está en el establecimiento de ese gradiente: ambos lo generan de manera independiente (Liu y Kaufman 2005a; Peel *et al.*, 2005; Rosenberg *et al.*, 2009).

En insectos basales el sistema posterior por sí solo establece el gradiente *hb*, que es activado por *caudal*, con represión en la región posterior mediada por *nos*. Los datos funcionales de *T.castaneum* y *Gryllus bimaculatus* (De Geer, 1773) muestran que *cad* se expresa en la banda germinal temprana en un amplio gradiente de posterior a anterior, solapándose con la expresión de *hb* y *Krüppel* –*Kr*–. En ambas especies, la *cad*^{ARNi} resulta en fenotipos drásticos, con embriones que pierden todas las regiones del cuerpo, excepto la parte anterior de la cabeza. Estos datos sugieren que los insectos ancestrales de banda germinal corta pueden haber usado el sistema posterior para controlar la expresión de los genes *gap*. Aunque en *D.melanogaster*, el sistema posterior no puede establecer el eje completo por sí solo, éste puede ser el resultado de un cambio evolutivo reciente en moscas hacia una mayor dependencia del sistema anterior (Liu y Kaufman, 2005a; Peel *et al.*, 2005).

Los que siguen en la jerarquía de determinantes topológicos del embrión temprano son los genes *gap*, que deben su nombre a los fenotipos de pérdida de función en *D.melanogaster*. Cuando estos genes fallan en su expresión, la mosca muestra un cuerpo con “agujeros” –*i.e.*, regiones faltantes– en el eje anteroposterior. Los *gap* son cigóticos y tienen dos funciones: regular a los *pair-rule* y a los *HOX*. En otros insectos,

los patrones de expresión indican conservación. El escenario de ARNi es más complejo: parecen conservar la función de regular a los *HOX*, pero no siempre muestran un fenotipo *gap*; los segmentos se forman pero adquieren identidad anormal. No está claro tampoco el límite entre las diferencias reales y las de interpretación: dado que unos segmentos tienen identidad anormal, mientras otros son eliminados, no es fácil identificar cuáles se pierden en realidad (Peel *et al.*, 2005).

En *D.melanogaster*, los genes *gap* son responsables de la subdivisión temprana del blastodermo (Rivera-Pomar y Jäckle, 1996). Cada uno se expresa en uno o dos dominios amplios correspondientes a varios segmentos *contiguos*. Los bordes de esos dominios son establecidos por regulación cruzada entre los mismos genes. Para que esta interacción se pueda dar, es importante el sincicio. Los ortólogos en insectos de banda germinal corta, muestran dominios de expresión *contiguos* conservados, sobre el eje anteroposterior, pero en apariencia anteriores respecto a *D.melanogaster*.

Las ARNi en *G.bimaculatus*, *T.castaneum* y *O.fasciatus* resultan tanto en pérdida de segmentos como en transformaciones homeóticas, debidas a cambios en los patrones de expresión *HOX*. Los efectos de la interferencia se expanden en sentido posterior mucho más allá del dominio de expresión de los genes *gap* depletados, a diferencia de lo que ocurre en *D.melanogaster*. Esas funciones a gran escala parecen estar relacionadas con la segmentación secuencial (Damen, 2007). La regulación de los *HOX* puede haber sido su función ancestral. En cambio, en insectos de banda germinal corta, la expresión de algunos genes *pair-rule* está controlada por ortólogos de genes *gap*, pero no se ubica necesariamente en el mismo dominio, sino que las bandas que aparecen afectadas son posteriores al dominio correspondiente, según se ha visto en *T.castaneum* (Cerny *et al.*, 2005) y en *G.bimaculatus* (Mito *et al.*, 2006).

Si se juntan la mutua represión de los genes *gap* con el modelo sólo posterior para la regulación de *hb*, surge un mecanismo para la activación ordenada de genes durante la embriogénesis de banda germinal corta. Liu y Kaufman (2005a) proponen un modelo de des-represión secuencial (Fig.1.15):

En *T.castaneum*, *G.bimaculatus* y *Schistocerca sp.*, *caudal* se expresa en un amplio dominio posterior temprano. En estado de blastodermo o en la banda germinal muy temprana, el *caudal* anteriorizado activa a *hb* y *Kr*, pero la traducción de *hb* es bloqueada por *nos* en la región posterior. *cad* también puede activar a *kni* y *gt*, pero su

expresión es impedida por *hb* y *Kr*. A medida que la banda germinal se alarga, la región posterior recién formada crecerá hasta quedar fuera de la influencia de los genes anteriores, permitiendo a *kni* y *gt* expresarse. Los dominios de *hb* y *Kr* están representados en la banda germinal muy temprana de varios insectos de banda germinal corta, de modo que se expresan en tiempo y espacio correctos para reprimir a los genes *gap* posteriores. Sin embargo, si éste es el mecanismo usado, queda por definir la cuestión de cómo se establecen los límites posteriores de los genes *gap* anteriores. Por ejemplo, qué podría apagar la transcripción de *hb* para permitir la expresión de *kni*. Además, no ha sido bien estudiado el rol preciso de los genes *gap* posteriores en insectos de banda germinal corta. Con todo, este mecanismo es atractivo porque da una explicación mecanística para la inducción secuencial de los genes *gap* posteriores, acoplada al crecimiento posterior (Liu y Kaufman, 2005a).

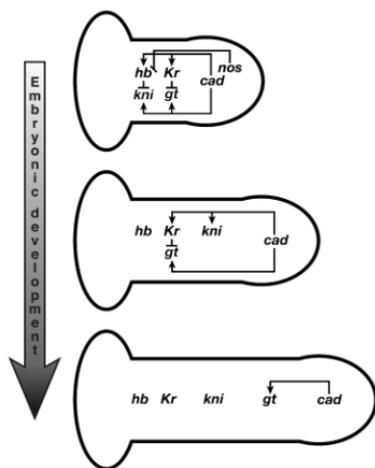


Fig.1.15. Modelo de activación secuencial de genes *gap* mediada por Caudal en insectos de banda germinal corta. La figura representa la transición de estados tempranos a tardíos en la elongación de la banda germinal. Luego de la formación del primordio, Caudal activa los genes *gap* anteriores *hb* y *Kr* mientras Nos impide la traducción de *hb* en la región posterior. La activación en la región anterior de *kni* y *gt* es impedida por Hb y Kr. A medida que la banda germinal se alarga, Caudal puede activar primero a *kni* y después a *gt*, a medida que estas regiones se alejan de la influencia de Hb y Kr (Fig. extraída de Liu y Kaufman, 2005a).

J.2.2.- Estado filotípico (segmentación y banda germinal)

El proceso de segmentación posterior en insectos de banda germinal corta, se puede dividir en crecimiento y determinación del patrón. El crecimiento ha sido descrito como elongación, extensión, crecimiento o proliferación; términos que según Davis y Patel (2002) son expresiones convenientemente ambiguas, que enmascaran el hecho de que en realidad se sabe muy poco sobre cómo crece esta región.

En *G.bimaculatus* se vio que la región abdominal tiene altos niveles de mitosis durante el crecimiento posterior. En algunos crustáceos se encontraron teloblastos,

pero en insectos no hay evidencia de células de este tipo. Hay cierta evidencia en contra de la proliferación celular, por ejemplo, en *T.castaneum*, *O.fasciatus* y *Schistocerca americana* (Drury, 1773) no se ha encontrado ninguna región discreta con células en mitosis. Por otra parte, buscar mitosis incrementada no necesariamente revela la proliferación incrementada. Es posible que la mitosis en la zona de crecimiento esté acompañada de cambios en el *timing* del ciclo celular, enmascarando la posible proliferación. Otra fuente de elongación puede darse por movimientos morfogénicos de la zona posterior. Por ejemplo, en *Schistocerca sp.*, la banda germinal se hace más delgada a medida que se estira, mientras que en *T.castaneum* y *O.fasciatus*, la zona comienza como un engrosamiento de células que decrece en tamaño durante la elongación. Los procesos de proliferación y rearrreglos no son excluyentes (Liu y Kaufman, 2005a).

Por otra parte, los efectos de la *cad*^{ARNi} en *T.castaneum* y en *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) –Branchiopoda– sugieren que *cad* puede jugar un rol ancestral organizando la zona de crecimiento posterior. Los homólogos de *cad* se expresan en las zonas de crecimiento de ambas especies durante la elongación; y la depleción del gen resulta en cuerpos muy truncados. En embriones *wt*, *even-skipped* –*eve*– se expresa en la región posterior en bandas conforme se van generando los nuevos segmentos, pero en los embriones *cad*^{ARNi}, la expresión de *eve* está interrumpida. Los genes *pair-rule* como *eve*, marcan la transición de un patrón no periódico a uno periódico; *i.e.*, son los primeros genes que se activan en un patrón repetitivo. Delimitan los parasegmentos –PS– y definen los dominios que expresarán los genes de polaridad de segmentos. Los PS son las unidades genéticas fundamentales del embrión artropodiano, desfasados en relación con los segmentos definitivos. Son entidades funcionales del desarrollo (Lawrence et al., 1987; Peel et al., 2005; Damen, 2007; Rosenberg, 2009).

En artrópodos no insectos, los ortólogos de los *pair-rule* también parecen estar entre los genes que se activan periódicamente, aunque hay variación en los patrones en que aparecen. El patrón canónico consiste en una periodicidad de dos segmentos. En los insectos, este patrón parece conservado en los holometábolos, aunque se observan algunas variantes. En otros grupos de artrópodos hay datos de expresión pero no funcionales. En la araña *Cupiennius salei* (Keyserling, 1877), la expresión

parece segmentaria mientras que en el ácaro *Tetranychus sp.*, el patrón ocurre cada dos segmentos. En Myriapoda parece ser doble para algunos ortólogos y simple para otros. Actualmente, no hay datos claros acerca de si el patrón canónico doble es derivado o basal (Liu y Kaufman 2005a, b; Peel et al., 2005; Damen, 2007).

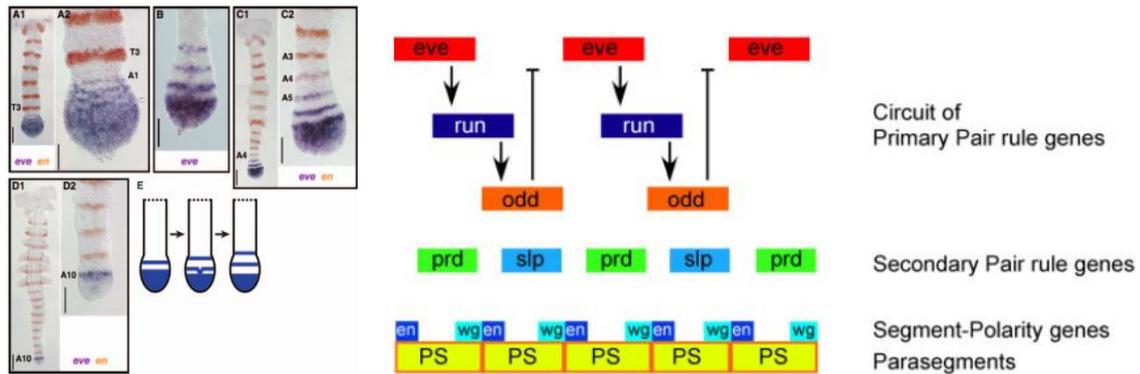


Fig.1.16. Segmentación de la banda germinal. A-E. Embriones de *O.fasciatus* teñidos con *eve* –violeta– y *engrailed* –*en*, naranja– (Fig. extraída de Liu y Kaufman, 2005b). **A1.** Banda germinal temprana con acumulación de *eve* en la zona de crecimiento, se señala el segmento T3. **A2.** Ampliación de A1. **B.** Estado medio teñido sólo con *eve*; la región media de la banda permanece asociada a la zona de crecimiento. **C1.** Estado medio; la expresión de *eve* se mantiene en la zona de crecimiento y en tres bandas de los tres segmentos recién formados. **C2.** Ampliación de C1. **D1.** Banda germinal en estado avanzado de elongación, *eve* se restringe a la última banda. **D2.** Ampliación de D1. **E.** Esquema mostrando la aparición y maduración progresiva de las bandas de *eve*. **F.** Circuito *pair-rule* propuesto por Choe et al. (2006) para *T.castaneum*. Los patrones de expresión repetitivos son generados por un circuito de tres genes *pair-rule*: *eve*, *run* y *odd*. *eve* activa a *run* y éste a *odd*. *odd* reprime a *eve*, generando una caída consecuyente en la expresión de *run* y de *odd*. La ausencia de *odd* permite que se restablezca la expresión de *eve*, generando un patrón repetitivo. El circuito también regula a los genes *downstream prd* y *slp*. Los genes *pair-rule* definen las bandas en las que se expresarán los genes de polaridad de segmentos y donde se definen las uniones entre PS (Fig. extraída de Damen, 2007). Las barras representan 200µm para A1,C1 y D1; y 100µm para A2, C2 y D2.

Los genes *pair-rule* actúan en dos diferentes niveles en *T.castaneum*: hay primarios y secundarios, de manera que la jerarquía funcional está conservada respecto a *D.melanogaster*. En *D.melanogaster*, los *pair-rule* son regulados por distintas combinaciones de genes *gap* y maternos; el sistema utiliza *enhancers* y promotores diferentes para los distintos dominios. En la araña *C.salei* también se detectaron dos niveles jerárquicos en genes *pair-rule*. Para insectos de banda germinal corta, Choe et

al. (2006) proponen un circuito que describe las interacciones de los genes *pair-rule* en *T.castaneum*. Tres genes se regulan entre sí: *eve* es necesario para activar a *run* –*run*–, que es necesario para activar a *odd skipped* –*odd*–. *odd* reprime a *eve*, de manera que la expresión de *eve* queda discontinuada en un amplio dominio en la zona de crecimiento, resultando en un patrón repetitivo bandeado. La caída de *eve*, genera caída de *run* y luego de *odd*, cuya ausencia permite nuevamente la expresión de *eve* (**Fig.1.16**). Estos genes también regulan dos blancos *downstream* que son *paired* –*prd*– y *sloppy paired* –*slp*–. Este circuito *pair-rule* define los segmentos secuencialmente, en una periodicidad de doble segmento en *T.castaneum*. La activación secuencial de los genes del circuito *pair-rule* explica la expresión génica periódica en un tejido celularizado como la zona de crecimiento.

Sarrazin et al., (2012) generaron un *T.castaneum* transgénico en el que todas las células del embrión en desarrollo tienen marca fluorescente. También desarrollaron métodos de cultivo fuera del huevo. Esto les permitió establecer marcos referenciales para la observación y generar videos para determinar los patrones de movimiento celular. Al mismo tiempo, compararon expresión génica en distintos momentos en un mismo embrión en cultivo, eliminando la variabilidad entre individuos. Así, determinaron la periodicidad de ondas de expresión génica y demostraron que en esta escala de tiempo, los movimientos celulares no dan cuenta de los cambios en la expresión génica. De hecho, es la expresión la que se mueve con respecto a las células (**Fig.1.17**). Observaron que una célula dada sufre ciclos de alta y baja expresión génica en el tiempo, lo que constituye un genuino oscilador molecular que genera un patrón de doble segmento. La periodicidad inicial compromete unidades bisegmentarias como en *D.melanogaster*, pero el mecanismo es oscilatorio como en los vertebrados. El *feedback* entre *eve*, *run* y *odd* es el principal candidato para esta función (**Roth y Panfilio, 2012**).

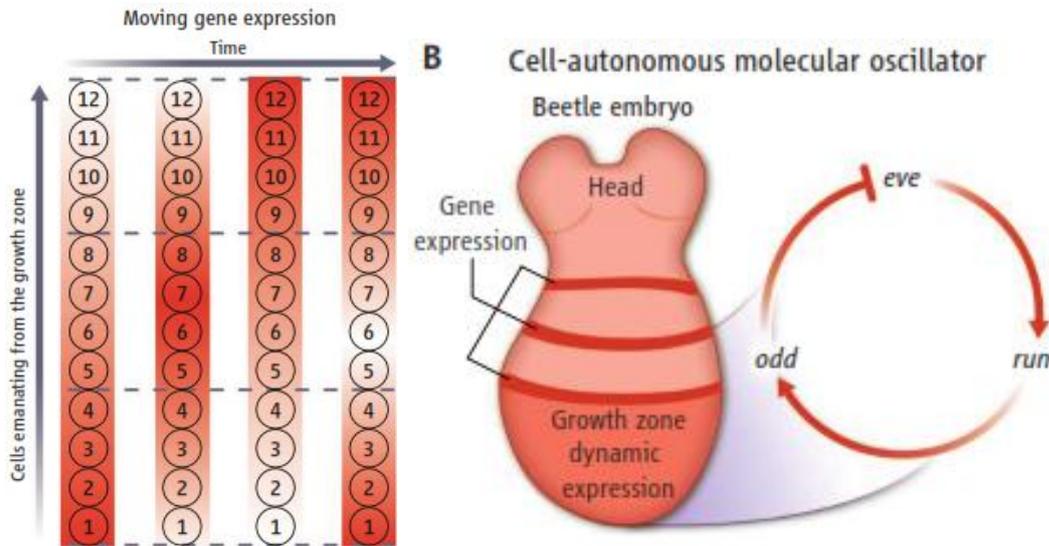


Fig.1.17. Expresión génica dinámica en la zona de crecimiento de *T.castaneum*. **A.** en Vertebrata y algunos Arthropoda, los altos niveles de expresión atraviesan los tejidos en ondas secuenciales, de manera que la expresión fluctúa en cada célula –el naranja oscuro indica altos niveles y el claro, bajos niveles–. **B.** esquema de un embrión de *T.castaneum* con tres bandas donde se expresa *odd*. La zona de crecimiento contiene un oscilador autónomo, que comprende a los TF *Eve*, *Run* y *Odd* (Fig. extraída de [Roth y Panfilio, 2012](#)).

La formulación original de un reloj molecular y un modelo de un frente de onda –*wavefront*– postulaba un oscilador controlado por un gradiente en continuo movimiento dentro del cual la oscilación persiste y fuera del cual se congela. [El-Sherif et al. \(2012\)](#) muestran que incluso un gradiente estático suave puede generar una expresión bandeada. Esto podría explicar la formación de las primeras tres bandas de *eve* en el blastodermo de *T.castaneum*, en ausencia de elongación posterior –aunque no excluyen la posibilidad de una onda de avance en retracción continua en la fase de blastodermo–. La progresión de anterior a posterior de *Tc-eve* refleja un reloj de segmentación subyacente que funciona en el blastodermo y en la banda germinal.

En la segmentación de arañas se observó participación de la vía Notch/Delta, que comprende una señalización célula-célula. La vía Notch/Delta se encuentra en todos los metazoos y tiene participación en varios procesos importantes; entre ellos, en la somitogénesis de los vertebrados. Notch es un receptor transmembrana que se cliva cuando se le une alguno de sus ligandos, Delta o Serrate –que también son proteínas transmembrana, pero ubicadas en células adyacentes–. La porción intracelular de Notch migra hacia el núcleo y regula la expresión génica. El gen *notch* se expresa

ubicuamente en la zona de crecimiento. *delta* se expresa en líneas que progresan dinámicamente en dirección anterior, de manera similar a los genes *pair-rule*. La ARNi sobre los componentes de esta vía resulta en severos fenotipos de segmentación (Damen, 2007; Roth y Panfilio 2012).

Aparentemente, en Myriapoda también actúa esta vía; pero no en *D.melanogaster* y presumiblemente tampoco en *T.castaneum*. No está claro qué ocurre en Crustacea y en otros insectos de banda germinal corta. En arañas y miriápodos, los patrones de expresión y fenotipos de falta de función son similares a los de vertebrados (Liu y Kaufman 2005b; Damen, 2007). Estos descubrimientos indican que es necesario estudiar otros homólogos asociados a la vía, como *wingless-related –wnt–* y *fibroblast growth factor –fgf–*. Hay algunos datos que señalan a *wnt* como necesario en la segmentación de *O.fasciatus* y *G.bimaculatus*; aparentemente, en insectos hemimetábolos, la señalización Wnt/ β -catenina está implicada en el crecimiento posterior y la segmentación, regulando la expresión de *cad* (Peel et al., 2005; Mito et al., 2010).

Sobre la base de estas observaciones, Damen (2007) propone un escenario para una posible transición evolutiva en la segmentación de los artrópodos (Fig.1.18). El ancestro común de todos los artrópodos –urartrópodo– debió tener segmentación secuencial. Probablemente, la segmentación incluía tanto los mecanismos de genes *pair-rule*, como Notch/Delta. El circuito descubierto en *T.castaneum*, permite explicar cómo los genes pueden interactuar entre sí en un ambiente celular y cómo esto puede generar patrones repetitivos. El uso de la señalización Notch/Delta parece más adecuado a tejidos celularizados y podría controlar el circuito de genes *pair-rule* en artrópodos de banda germinal corta. Según esto, los ortólogos *pair-rule* podrían haber estado interactuando entre sí y con la señalización Notch/Delta. En el linaje que lleva a los insectos, el circuito de genes *pair-rule*, podría haberse hecho cada vez más independiente de la señalización Notch/Delta, mientras que la influencia de los *gap* pudo ir en aumento. Eventualmente, la influencia de la señalización Notch/Delta debe haberse reducido hasta que los genes *pair-rule* estuvieron sólo bajo el control de los *gap* y de sí mismos. Esta condición entonces pudo permitir la transición a la banda germinal larga, determinada en estados sinciciales y que no funciona como un circuito. La transición pudo estar facilitada al independizarse de una señalización célula-célula.

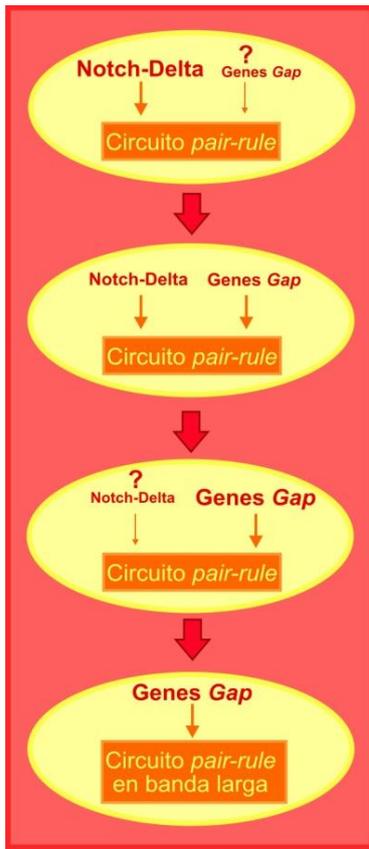


Fig.1.18. Modelo de transición evolutiva de la regulación de genes *pair-rule* en la segmentación. Se presume que el urbilaterio usaba tanto la señalización Notch/Delta como la red de genes *pair-rule*, quizá de manera similar al circuito propuesto para *T.castaneum*. En el linaje que lleva a Insecta, la influencia de la señalización Notch/Delta se redujo, al tiempo que los ortólogos de los genes *gap* adquirieron más importancia en el control de los genes *pair-rule*. En la banda germinal sincicial de *D.melanogaster*, los genes *pair-rule* están completamente bajo el control de los genes *gap* (Modificada a partir de **Damen, 2007**).

La vía Notch/Delta es muy usada en los metazoos y ha sido reclutada independientemente para distintos procesos muchas veces. Sin embargo, en la mayoría de los casos, actúa en algún lugar al final de la cascada de especificación de unión de poblaciones celulares. El rol de la señalización Notch/Delta en la segmentación de la araña y en la somitogénesis de vertebrados es fundamentalmente diferente en este sentido, ya que en ambos casos está al comienzo de la cascada. Este es un carácter único, y provee un argumento fuerte para el origen común del mecanismo.

Una vez establecidos los territorios, los genes de polaridad de segmento definen y mantienen las uniones entre parasegmentos mediante un circuito autorregulatorio. Las interacciones regulatorias cruzadas de los genes de polaridad de segmento consisten en moléculas señal y en TF. *hedgehog* –*hh*, anterior– y *wingless* –*wg*, posterior– se expresan en los lindes parasegmentales y codifican moléculas señal que son transmitidas al otro lado de la unión, de este modo definen y mantienen poblaciones celulares mutuamente excluyentes (**Liu y Kaufman 2005b; Peel et al., 2005**). Los

patrones de expresión están muy conservados para los grupos actuales de Arthropoda. Esto sugiere que la función también; sin embargo, hasta el momento sólo hay datos funcionales en insectos. Así, el nivel más bajo en la cascada de segmentación y la organización en parasegmentos parecen estar conservados (Damen, 2007).

J.3.- Formas larval y adulta: estados post-filotípicos

Los artrópodos tienen un plan de organización común y al mismo tiempo diverso. Esta diversidad es determinada por la integración de la tagmisis y la disponibilidad y plasticidad de apéndices pares. Las filogenias actuales sugieren que los crustáceos son un grupo parafilético con respecto a Insecta (Fig.1.13; Carapelli *et al.*, 2007; Peel, 2008). En Insecta (Fig.1.19) el patrón común de los adultos es semejante; comparten el mismo número de segmentos apendiculares, pero tienen una enorme diversidad morfológica (Akam, 2000; Panganiban *et al.*, 1997; Rogers *et al.*, 2002; Angelini y Kaufman, 2005).

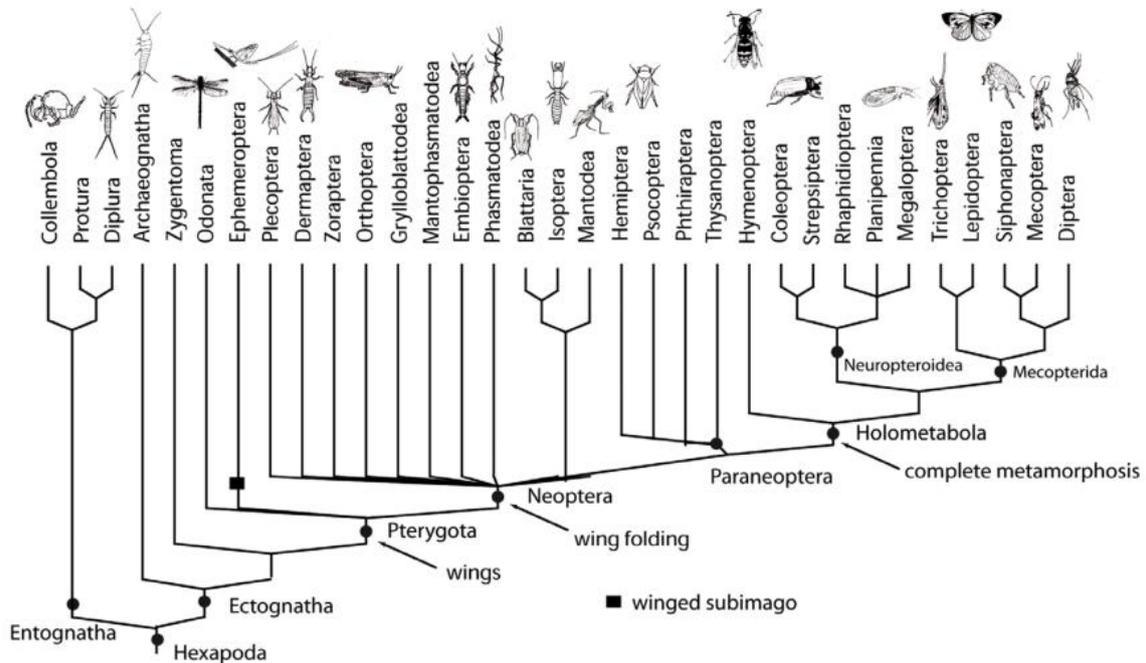


Fig.1.19. Filogenia de Insecta. Se señalan los eventos más importantes en la aparición de grupos sucesivamente más derivados. La monofilia de Entognatha es discutible: se ha encontrado evidencia fósil de que la condición apareció más de una vez independientemente, y de que el grupo es parafilético (Fig. extraída de Hadrys *et al.*, 2012).

Un aspecto que es necesario tener en cuenta a la hora de analizar la diversidad de los insectos es su desarrollo post-embrionario. Existen dos tipos generales: el exopterigota se caracteriza por el desarrollo externo de los esbozos alares (Hemimetabolía *sensu lato*) y el endopterigota, que se caracteriza por el desarrollo interno de los esbozos alares y la aparición de un nuevo estado pupal (Holometabolía). Los holometábolos sufren una metamorfosis completa de larvas a adultos. Se considera que éste es un carácter derivado que apareció una vez durante la evolución de los insectos. Los exopterigotas, en cambio, han retenido la condición ancestral de sufrir metamorfosis, semejantes al adulto (Brusca y Brusca, 2003; Peel, 2008). El estudio de estos últimos permite la observación directa de estructuras apendiculares en el embrión, y por lo tanto, se espera que brinde información sobre el origen del vuelo y de las estructuras asociadas a éste; así como de la diversidad morfológica.

J.4.- Patrones moleculares en estados embrionarios medios

Se considera que la organización modular de los artrópodos ha facilitado la divergencia de los planes corporales en general y la de segmentos individuales en particular. Para estudiar la evolución morfológica es necesario identificar los potenciales genes candidatos a controlar el desarrollo de una estructura en un organismo. A la hora de pensar en la evolución de la forma adulta, el foco principal se pone sobre los genes selectores homeóticos *-HOX-*. Aunque los *HOX* aparecen como primera opción para estudiar la evolución morfológica, está claro que hay muchos genes que controlan el desarrollo de distintas características cuyo efecto puede variar de mínimo a drástico (Popadić *et al.*, 1998; Davidson y Erwin, 2006; Carroll, 2005, 2008; Hughes y Kaufman, 2002).

El término homeosis fue acuñado por Bateson para describir variaciones dramáticas en que una cosa ha sido cambiada por otra (Dietrich, 2000). Goldschmidt (1940), presentó su teoría sobre las macromutaciones del desarrollo, más conocida por la expresión “monstruos esperanzados”, donde describió dos mutantes de *D.melanogaster*: *podoptera* –con transformación de ala a pata– y *tetraltera* –con transformación de ala a halterio–. El *corpus* teórico presentado en su libro “Las bases materiales de la evolución”, ponía en cuestión el pensamiento gradualista neodarwiniano. Desde entonces hasta su muerte en 1958, Goldschmidt trató de

convencer a los biólogos de que “la evolución no es sólo un problema genético estadístico, sino también sobre las potencialidades de desarrollo del organismo” (**Goldschmidt et al., 1951**). Sus ideas fueron rechazadas, consideradas como un saltacionismo extremo. Sin embargo, la evidencia experimental muestra que los cambios genéticos individuales pueden tener vastos efectos, sin condenar al organismo a un callejón sin salida. Los cambios que confieren valor adaptativo y afectan un solo gen, no son tan raros y tienden a “ganar” cuando compiten con mutaciones de pequeños efectos (**Dietrich, 2000; Chouard, 2010**).

Los genes *HOX* están presentes en múltiples copias en Cnidaria y en Bilateria (**Lemons y McGinnis, 2006**). Son parte del genoma pananimal, es decir, pertenecen a un grupo de genes esenciales que debieron estar presentes en los ancestros animales previos a la explosión cámbrica (**Ohno, 1996; Carroll, 2008; García-Fernández, 2005**). Todas las clases actuales de Arthropoda, e incluso los onicóforos, tienen homólogos de los ocho genes *HOX* canónicos. Esto implica la existencia de un complejo homeótico de ocho genes anterior a la radiación del clado onicóforos/artrópodos (**Popadić et al., 1998**).

García-Bellido (1975) propuso que los *loci* homeóticos representan un grupo de “genes selectores” que controlan un subgrupo de genes subordinados –“efectores”–, los cuales codifican las proteínas requeridas en el proceso de diferenciación. Si se piensa el embrión como compuesto por módulos individuales pero interactuantes –i.e., segmentos–, los genes selectores podrían cambiar la identidad de un módulo particular sin afectar a los módulos vecinos. En consecuencia, teóricamente, el cambio morfológico podría ocurrir sin efectos deletéreos en la viabilidad.

Se han hecho experimentos cruzados entre especies para determinar la funcionalidad de *HOX* ortólogos y se vio que causan defectos similares cuando se expresan ectópicamente, y que pueden rescatar mutantes homeóticos. Por esta razón, generalmente se cree que la evolución morfológica en los artrópodos fue gobernada por cambios regulatorios más que a nivel de la estructura proteica (**Davidson y Erwin, 2006; Carroll, 2005; 2008**).

Los cuatro grupos actuales de Arthropoda tienen planes corporales con una tagmatización clara. Insecta tiene cabeza, tórax y abdomen; Myriapoda se caracteriza por una cabeza y un tronco homónimo; los crustáceos tienen mucha diversidad

morfológica, pero básicamente todos los grupos (Maxillopoda, Branchiopoda, Malacostraca, Remipedia, Cephalocarida) están divididos en cabeza, tórax y abdomen y Chelicerata tiene un cefalotórax y un abdomen. **Popadić et al., (1998)** comparan la expresión de los ocho *HOX* canónicos en tres insectos: *D.melanogaster*, *O.fasciatus* –Hemiptera– y *Thermobia domestica* (Packard, 1873) –Archaeognatha–; representando un grupo derivado, uno intermedio y uno basal respectivamente. De manera general, destacan casos en los que se encuentra conservación –*lab* y *dfd*– y casos en los que encuentran variaciones correlacionadas con cambio morfológico –*scr* y *pb*–. Volveremos sobre este punto en el apartado referido a estructuras cefálicas.

Hughes y Kaufman (2002) presentan una reseña de los datos de expresión –de mensajero y proteína– y pérdida de función conocidos hasta ese momento para todo el *phylum* Arthropoda. Aquí expongo un resumen de los datos que ellos recabaron y un diagrama de barras enfocado principalmente en la expresión ectodérmica en el estado de banda germinal. **Hadrys et al. (2012)** brindan nuevos datos de secuencia; su trabajo es importante porque agrega información sobre la presencia y composición de genes *HOX* en el clado Insecta, incluyendo grupos basales –no insectos– poco estudiados; sin embargo, los datos son de muy baja calidad, ya que se refieren a pequeñas regiones dentro del homeodominio, que en muchos casos no superan los 25 residuos. El grado de resolución es tan bajo, que no logran discernir entre *antp* y *scr* –en mi tesina de graduación (**Esponda-Behrens, 2008**), presento un análisis sobre las regiones que permiten diferenciar ambos genes–. En los alineamientos que Hadrys et al. presentan, *fushi tarazu* –*ftz*–, *lab* y *dfd* se observan como los más variables respecto a la secuencia de *D.melanogaster*.

La revisión hecha por **Hughes y Kaufman (2002)** considera 10 genes *HOX*, ya que incluye no sólo a los ocho canónicos, sino también a *HOX3* y a *ftz*, cuyas funciones han variado a lo largo de la evolución, pero que habrían tenido inicialmente función *HOX*.

lab: es el gen de expresión más anterior en todos los artrópodos estudiados –aunque en Myriapoda y Chelicerata comparte esta característica con *HOX3*–. En Chelicerata se extiende ampliamente en 5 segmentos, y en Myriapoda en 2; mientras que en Insecta y Crustacea sólo se expresa en el segmento intercalar. La función parece ser bastante variable, presumiblemente contribuye al desarrollo de múltiples

apéndices en Chelicerata, controla el segundo par de antenas en Crustacea y tiene un rol ambiguo en el segmento sin apéndices en Myriapoda e Insecta. En Diptera, parece tener un rol adicional en el proceso embrionario de involución de la cabeza. Aunque la expresión parece cada vez más restringida en la región posterior en los artrópodos mandibulados, el módulo del desarrollo al que instruye el gen es variable.

pb: es posible que el urartrópodo haya tenido un amplio dominio de expresión –como ocurre en Chelicerata– que luego se restringió a 4 segmentos en el ancestro mandibulado –como se ve en Myriapoda–. En *Porcellio scaber* (Latreille, 1804) –Malacostraca– la expresión está restringida al segmento intercalar, mientras que en Insecta, la expresión se confina hacia los segmentos maxilar y labial.

HOX3: tiene una historia evolutiva compleja (**Fig.1.20**) con numerosos cambios; eso se refleja en los varios nombres que tiene. Por fuera de Insecta, se lo llama *HOX3*, en insectos no dípteros se lo llama *zerknüllt* –zen– y en *D.melanogaster* tiene tres copias: *bicoid*, *zen* y *z2*. Esta historia incluye dos cambios funcionales muy importantes. Primero hubo un cambio de una función tipo *HOX* determinando identidad de segmentos –*HOX3*–, a un rol en el ectodermo extraembrionario –*zen*, este gen está implicado en la retracción de las membranas extraembrionarias y por ende en la blastocinesis de embriones de banda germinal corta (**Panfilio, 2008**)–. Después, tras un evento de duplicación, la copia divergió hacia el morfógeno anterior materno *bcd*. La posición filogenética de la primera transición parece estar en algún punto entre Crustacea e Insecta. El *HOX3* de *Lithobius sp.* –un ciempiés– se expresa en los segmentos intercalar y mandibular; y no en tejidos extraembrionarios. El segundo cambio aparece en Muscomorpha –Diptera–.

dfd: en Chelicerata el dominio de expresión es amplio, se asume que ese es el estado ancestral. Luego, a lo largo de la evolución artropodiana, el dominio se restringe de 4 segmentos –en Chelicerata– a 3 –en Myriapoda– y luego a dos o menos en Pancrustacea.

lab, *pb*, *HOX3* y *dfd* muestran una tendencia a restringir su expresión. Estos dominios más pequeños y con menor superposición crean un número mayor de códigos *HOX* en los segmentos cefálicos de un insecto que en el cefalotórax de una araña. Esto pudo haber sido un pre-requisito para la diversificación de los apéndices gnatales en Insecta.

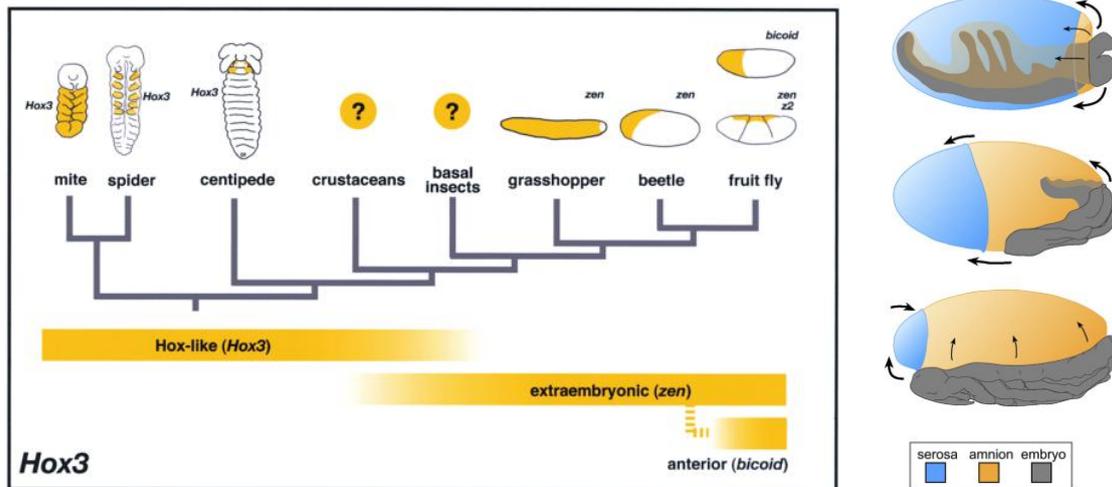


Fig.1.20. HOX3. A. Funciones cambiantes de *HOX3* en Arthropoda. En Chelicerata y Myriapoda *HOX3* tiene patrones de expresión típicos de una función tipo *HOX*. En Insecta, los homólogos de *HOX3* llamados *zen* y *z2*, se expresan en las membranas extraembrionarias. En Cyclorrapha, Diptera, hay un homólogo adicional llamado *bcd*, que es de origen materno y cuya función es la de un morfógeno anterior (Fig. extraída de [Hughes y Kaufman, 2002](#)). **B.** Katatrepsis de *O.fasciatus*, se muestra una etapa temprana, una media y una tardía. El segundo movimiento blastocinético se produce por retracción de la serosa; el cierre dorsal se produce por retracción del amnios. *Zen* es fundamental para que estas funciones se desarrollen correctamente, aunque aún no está clara su función en el proceso (Fig. extraída de [Panfilio, 2008](#)).

scr: es el único *HOX* que se expresa tanto en la cabeza como en el tórax de *D.melanogaster*. Como estos dos tagmas tienen morfologías muy diferentes, *scr* tiene un grupo de funciones muy variadas e interesantes. No tiene una variación tan grande en los dominios de expresión como los anteriores; generalmente se expresa en dos o tres segmentos, más o menos en el mismo lugar. Pero parece que su función ha sido muy dinámica y que puede haber estado involucrado en varias innovaciones evolutivas de Arthropoda, incluyendo los maxilipedios de *P.scaber* y las estructuras protorácicas de los insectos. *scr* ha sido muy estudiado como candidato a generar importantes cambios morfológicos y tiene particularidades muy interesantes; por ese motivo, es el gen *HOX* elegido para iniciar estudios funcionales en esta tesis. En el próximo apartado agregaré algunos aspectos de particular interés.

ftz: también es muy versátil tanto en expresión como en función ([Fig.1.21](#)). En Chilopoda –ciempiés– parece tener tres roles diferentes: de segmentación, tipo *HOX* y en la neurogénesis. Ha cambiado drásticamente su rol en el desarrollo así como su

función bioquímica. Analizando los homólogos en diferentes especies, se observa una serie en la que se aprecian cambios en expresión, secuencia y función. La transición de *ftz* de un rol tipo *HOX* a uno de segmentación pudo ocurrir a través de un intermediario que cumplió ambos roles. El cambio de función, dirigido por cambios de expresión, también estuvo acompañado por cambios de secuencia en los que se adquirieron o deterioraron motivos proteicos. La presencia del motivo YPWM –que le permite interactuar con Extradenticle– está correlacionada con la capacidad de actuar como *HOX*. Por otra parte, la capacidad de actuar como un gen de segmentación se asocia a la presencia del motivo LXXLL, que colabora en la interacción con el cofactor Ftz-F1. Según la expresión en garrapatas y ciempiés, el rol ancestral de *ftz* fue el de un *HOX*. Los datos de secuencia sugieren que tiene un homólogo en Annelida –*lox5*– y puede ser muy antiguo. Además, la expresión en ciempiés incluye un dominio en la zona de crecimiento y bandas emergentes durante el proceso de formación de segmentos. Según los análisis de secuencia, el motivo LXXLL se adquirió en algún momento entre los insectos más derivados. El YPWM se perdió en Holometabola (Alonso *et al.* 2001; Löhr *et al.*, 2001). *ftz* no se encontró en *R.prolixus* y, según Hadrys *et al.*, 2012, tampoco en Protura, Ephemeroptera, Odonata, Orthoptera, Blattodea, Hemiptera y Lepidoptera; además de otros grupos para los cuales no se han hecho búsquedas.

antp: parece que puede haber tenido un rol determinando el tronco en artrópodos basales, pero luego su dominio de expresión se restringió. El dominio localizado en el medio del embrión parece estar asociado con nuevos tipos de tagmatización: el tórax de los insectos, el pereion de *P.scaber* y la batería de maxilipedios de en *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) –un cangrejo de río–. La principal diferencia en la expresión en *Schistocerca sp.* y *T.domestica* vs. *D.melanogaster* es que en la mosca hay una modulación de la expresión más compleja.

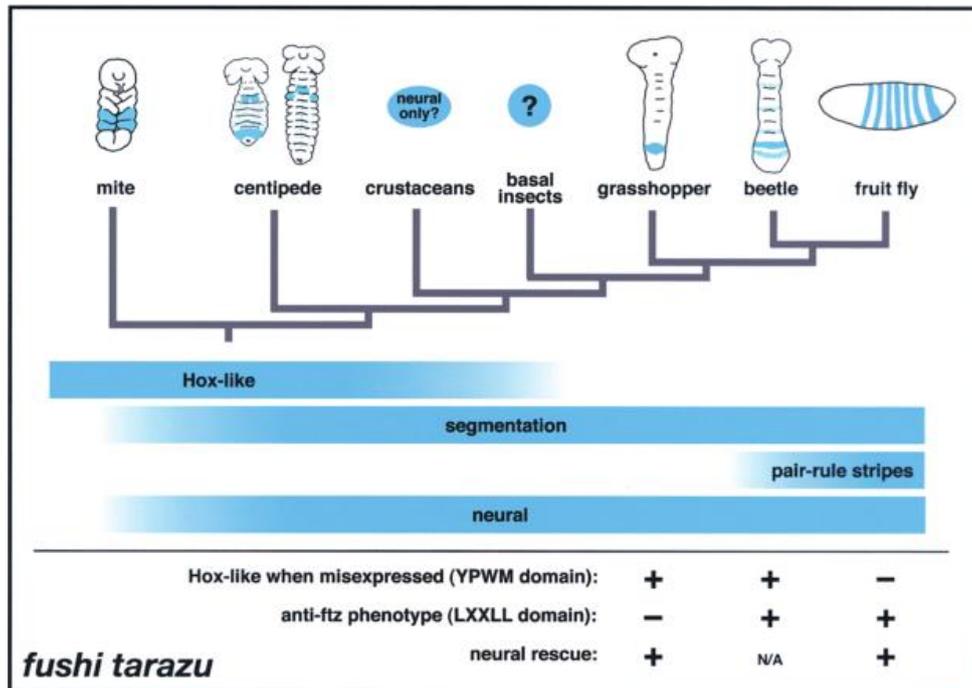


Fig.1.21. Cambios de función de *ftz* en Arthropoda. En Chelicerata se expresa como un gen *HOX*. En Myriapoda tiene tres dominios de expresión, que parecen representar tres diferentes funciones durante el desarrollo –se ilustran un estado temprano y uno tardío–: expresión en la zona de crecimiento –segmentación–, expresión en maxila2 y maxilipedio –*HOX-like*– y expresión en precursores neurales. La expresión se ha analizado sólo en una especie de Crustacea, una lapa, donde se la vio sólo en el sistema nervioso en desarrollo. No se ha analizado en especies basales de insectos. en *Schistocerca sp.*, *ftz* se expresa en la zona de crecimiento, de lo cual se infiere un rol en la segmentación. En *T.castaneum* se expresa en bandas pares que emergen de la zona de crecimiento. En *D.melanogaster*, en bandas pares en todo el embrión. Posiblemente, el rol tipo *HOX* se abandonó en algún momento en el linaje entre Crustacea y los insectos basales. Aparentemente, la pérdida de la función *HOX* está acompañada de la pérdida del motivo YPWM, mientras que la adquisición de la función de segmentación dependiente del cofactor Ftz-F1 se relaciona con la ganancia del motivo LXXLL; (Fig. extraída de **Hughes y Kaufman, 2002**).

ubx: en muchos insectos se expresa en el abdomen, de manera similar a *D.melanogaster*. En saltamontes la expresión se extiende adelante hacia el segmento T3 y se expresa en las patas; aparentemente, está asociado a la diferenciación de las patas saltadoras. Esto es particularmente interesante, porque se consideraba, según lo que ocurre en *D.melanogaster*, que *ubx* suprime la formación de apéndices abdominales mediante la represión de *distal-less* –*dll*–. Luego se vio que en orugas –larvas de lepidópteros– de la mariposa *Precis sp.* hay parches en los que *ubx* no se

expresa donde se forman las espúreas –apéndices abdominales–; pero en el gusano de seda *Manduca sexta* (Linnaeus, 1763), *ubx* y *dll* se solapan. Más tarde se observó que en otras especies tampoco tiene un rol represor sobre *dll*. Otro cambio estudiado en la mariposa *Precis sp.* es la supuesta función supresora de alas, que se había establecido para *ubx* sobre la base de las observaciones en *D.melanogaster*, donde provoca la transformación de alas a halterios (Kerridge y Morata, 1982). Un trabajo reciente en *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) –Coleoptera–, muestra que la depleción combinada de *ubx* y *abdA*, provoca un fenotipo donde se expresan estructuras abdominales dorsolaterales con aspecto de alas ectópicas (Ohde et al., 2013).

abdA: *abdA*, así como *ubx*, es importante especificando la identidad abdominal. Habitualmente ambos genes se estudian juntos, de hecho los estudios de patrones proteicos suelen usar anticuerpos de reacción cruzada, de manera que no se diferencian. En muchas especies se coexpresan y es posible que tengan cierta redundancia. Sin embargo, *abdA* puede tener dominios de expresión y funciones únicos y diferentes a los de *ubx*.

abdB: en *D.melanogaster*, funciona como un “2en1”. Tiene dos isoformas reguladas por distintos *enhancers* y con funciones separadas, llamadas “m” –morfogenética– y “r” –regulatoria–. Está asociado con la genitalia de *D.melanogaster*, *Schistocerca sp.*, *Artemia sp.*, *C.salei*, e incluso de ratón. Se ha propuesto que esta función es muy antigua. De aquí se desprenden preguntas interesantes: ¿cómo se expresa *abdB* en especies donde la genitalia es anterior, como los milpiés –Diplopoda–? ¿Esta ubicación diferente de la genitalia se correlaciona con un patrón diferente de *abdB* o es otro gen el que ha adquirido la función de regular esas estructuras? Con esta cuestión en mente, es interesante notar que en la araña *C.salei*, *abdB* se expresa en la región posterior del embrión, pero también muestra varios puntos de expresión en los primordios de los poros genitales, que se ubican en el segundo segmento del abdomen –Op2– (Akam, 1998; Damen y Tautz, 1999).

Esta reseña está basada en Hughes y Kaufman (2002). La Fig.1.22 esquematiza los planes corporales de las cuatro Clases y un diagrama de barras de los patrones de expresión *HOX* en cada grupo.

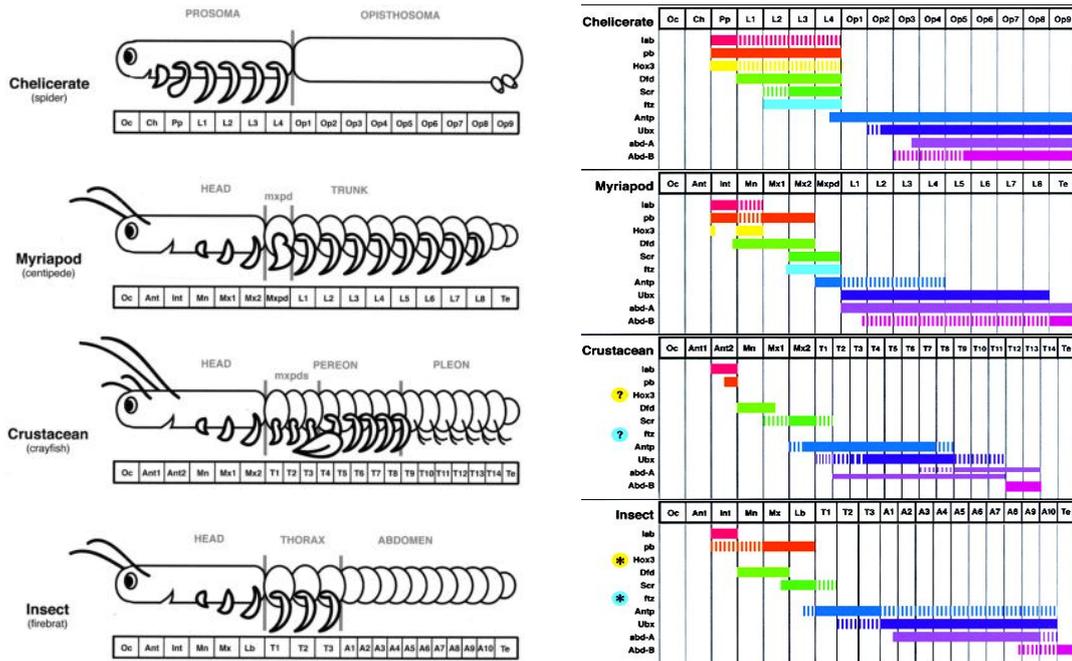
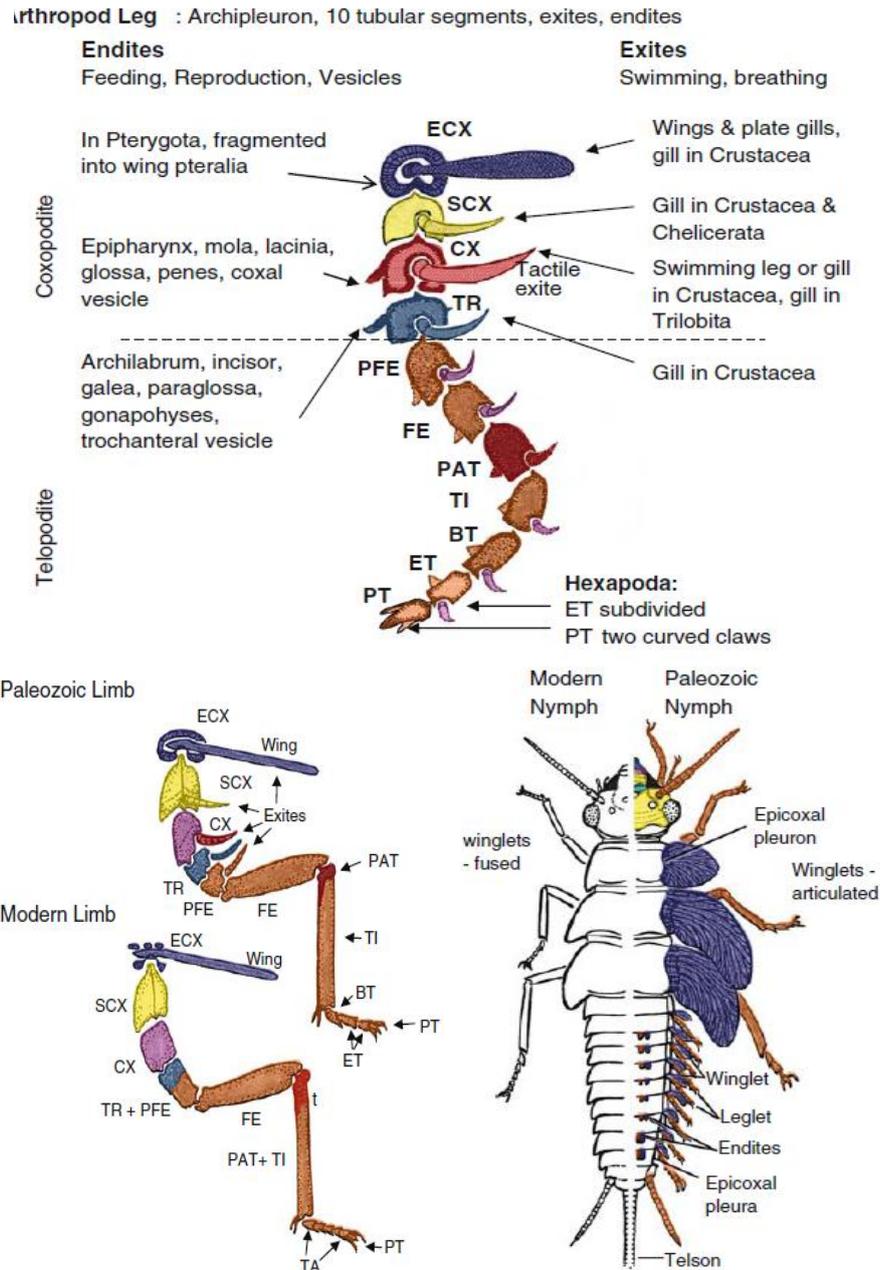


Fig.1.22. Planes corporales de Arthropoda y expresión HOX. **A.** Tagmosis básica e identidad de los segmentos en los cuatro grupos actuales. Chelicerata tiene dos tagmas: cefalotórax –prosoma– y abdomen –opistosoma–. Chilopoda –ciempiés–, en representación de Myriapoda, tiene una cabeza, un segmento con maxilipedios y un tronco –otros grupos de Myriapoda carecen de maxilipedios–. Los maxilipedios son patas modificadas para la alimentación, que en este esquema se dibujan como un tagma separado para remarcar su estatus único. En Crustacea también es común la presencia de uno a tres pares de maxilipedios; la Clase está representada por un cangrejo de río (*crayfish*) *P.clarkii* –Malacostraca–, que tiene una cabeza, tres pares de maxilipedios, un pereion y un pleon. Es importante destacar que en Crustacea existe una diversidad muy grande en lo referente a la tagmosis. Los insectos tienen tres tagmas: cabeza, tórax y abdomen. La ubicación del estomodeo en cada Clase se indica en la figura como una boca sonriente, según su localización en el embrión. **B.** Expresión HOX en Arthropoda, esquema comparativo simplificado. Las barras sólidas indican expresión fuerte y las discontinuas indican expresión débil, variable o transitoria. Los signos de interrogación para HOX3 y ftz indican que las funciones de esos genes en Crustacea son inciertas. En Insecta, los homólogos de esos genes tienen roles altamente divergentes, por ese motivo no se esquematizan. En Crustacea se muestran dos tipos de expresión de abdA; la barra superior representa la expresión en *Porcellio scaber* y *P.clarkii*, la inferior representa la expresión en *Artemia franciscana* –Branchiopoda–. Abreviaturas: **oc**, ocular; **ch**, quelícero; **pp**, pedipalpo; **L1-L8**, patas; **Op1-Op9**, segmentos opistosomales; **ant1**, antenal I; **Ant2**, antenal II; **T1-T14**, tronco/tórax 1-14; **Mx**, maxilar; **Lb**, labial; **A1-A10**, abdomen 1-10; (Fig. extraída de Hughes y Kaufman 2002).

J.5.- Algunas discusiones sobre las estructuras torácicas adultas

Hay dos teorías principales respecto a la evolución de las alas: el origen paranotal y el origen apendicular a partir de exitas (**Fig.1.23**). La teoría paranotal propone que las alas evolucionaron de extensiones de los tergos torácicos, llamados lóbulos paranotales (**Hamilton, 1971; Quartau, 1986; Snodgrass, 1935**). En contraste, la teoría del origen apendicular propone que evolucionaron como modificaciones a partir de estructuras apendiculares preexistentes, que posiblemente primero se modificaron en branquias y luego se convirtieron en alas (**Kukalová-Peck, 1991; Wigglesworth, 1973**). Esta última teoría ha sido soportada por datos moleculares. Los genes con funciones específicas en alas se expresan también en epipoditos branquiales en dos crustáceos (**Averof y Cohen, 1997; Grimaldi y Engel, 2005; Kukalová-Peck, 2008; Chesebro et al., 2009**).

Fig.1.23. Estructura de apéndices y fundamentos del origen apendicular de las alas en Pterygota (Insecta). **A.** Plan básico de un apéndice artrópodo polirramoso. Los apéndices de los distintos segmentos son homólogos seriales y se pueden derivar de un único apéndice polirramoso generalizado mediante reducciones, fusiones, subsegmentaciones y otras modificaciones. Las exitas y enditas –ramas internas y externas–, se localizan a lo largo del eje. En Arthropoda, la epicoxa siempre forma parte de la pleura. En la cabeza, todos los apéndices articulan con la subcoxa; en el tórax, la subcoxa es cilíndrica o aplanada y está internalizada en la pleura; en el abdomen, subcoxa, coxa y trocánter integran la pleura. Las exitas son lóbulos que evaginan de la membrana entre los poditos; las enditas son similares pero evaginan sólo de un podito. La reducción y fusión de estas ramas es muy frecuente. **B.** Diferencias entre las patas torácicas en insectos alados actuales y paleozoicos. Las patas de Insecta –y Arthropoda– tienen un máximo de 11 segmentos articulados con musculatura propia. En insectos paleozoicos, el primer podito está aplanado en la epipleura, articulado al tergo y encapsula la epicoxa aplanada de la exita alar. La subcoxa compone la pared pleural. La pata libre tiene forma de Z y contiene 9 poditos cilíndricos articulados, empezando por la coxa. En las articulaciones, algunos poditos –patela, basitarso, eutarso y pretarso– están muy modificados. Retienen un máximo de cuatro exitas en los poditos proximales. En las patas modernas sólo 6 o 7 poditos son visibles: la epipleura y el ala tienen el aspecto de una expansión tergal con una base articulada; el trocánter, el prefémur y la patela están fusionados a otros



(Fig.1.26, continuación) segmentos; el basitarso y el eutarso subsegmentado tienen el aspecto de un único segmento tarsal subdividido en varios artejos. Las exitas en su mayoría se han perdido en grupos terrestres. **C.** Diferencias entre las larvas pterigotas paleozoicas generalizadas y las actuales. Los fósiles muestran apéndices en todos los segmentos, serialmente homólogos y homónomos, con los mismos poditos y ramas. Todas las alas y alitas –winglets– son seriales, totalmente articuladas y móviles. Las epicoxas están fusionadas al cráneo en la cabeza, articuladas al tergo y fragmentadas en alas en el tórax, y fusionadas al tergo en el abdomen –las alitas abdominales originalmente están articuladas, luego fusionadas o reducidas–. En las larvas modernas, las alitas y su articulación están secundariamente fusionadas al tergo; los apéndices son mucho menos similares entre sí y no parecen homólogos seriales. **ECX**, epicoxa; **SCX**, subcoxa; **TR**, trocánter; **PFE**, prefémur; **PAT**, patela; **BT**, basitarso; **ET**, eutarso; **TA**, tarso; (Fig. extraída de **Kukalová-Peck, 2008**)

El análisis del desarrollo de tales estructuras puede aportar información. Ya que no se espera que se formen apéndices *de novo*, la existencia de una zonación y patrones semejantes a los que participan en la formación de apéndices pueden contribuir como datos adicionales en favor de la segunda hipótesis. Estos eventos no pueden estudiarse en modelos como *D.melanogaster*, cuyas estructuras adultas se forman a partir de discos imaginales, pero sí pueden estudiarse en pterigotas no-holometábolos.

Por supuesto, sólo con estos datos tampoco podemos descartar posibles eventos de reclutamiento de GRN pre-existentes para la nueva función. Una posibilidad inquietante es la planteada por **West-Eberhard (2005a)** sobre estructuras sexuales tipo apendiculares en moscas sépsidas, en cuyos machos se forma un nuevo apéndice en el cuarto esternito. Según su interpretación, la estructura se forma *de novo* a partir de cerdas esternales móviles y ha evolucionado independientemente en varios géneros. En especies menos especializadas, los machos tienen cerdas que refriegan contra la hembra durante el cortejo. En los casos más elaborados, los lóbulos esternales son largos, articulados, y capaces de movimiento tipo apendicular. Consisten en un nuevo apéndice completo con segmentos, musculatura y nerviación. En *Themira biloba* (Andersson, 1975), que tiene un grado intermedio de especialización, los lóbulos se desarrollan a partir de un *cluster* de histoblastos abdominales y no desde discos imaginales. En ellos, se expresan algunos genes *–engrailed (en)*, *extradenticle (exd)* y *Notch*– que también se expresan en el desarrollo de los apéndices genitales de *D.melanogaster*. El mecanismo es semejante al usado para determinar el coxopodito, pero no hay expresión de *distal-less –dll–*, que señale la posible presencia de un telopodito (**Bowsher y Nijhout, 2007; 2009**). Desde la perspectiva de West-Eberhard, la flexibilidad fenotípica ha jugado un rol importante en la evolución de esta estructura, donde los movimientos comportamentales tomaron la delantera. Ella se pregunta si los apéndices locomotores como las patas y alas pueden haber aparecido por un proceso similar a éste; y si así fuera, en qué momento de la evolución apendicular, los genes asociados al desarrollo de tales estructuras habrán sido cooptados para nuevas funciones (**West-Eberhard, 2005a,b**).

Una mirada más conservadora sobre la aparición de estas estructuras, implica considerar que cada segmento mantiene de manera latente la posibilidad de desarrollar apéndices y que la aparición de éstos puede atribuirse a algún evento de

reversión o similar. De hecho, algunos experimentos funcionales y de expresión señalan aspectos interesantes sobre los segmentos no-alados, los genes *HOX* y la posibilidad de revertir estructuras (**Fig.1.24**). Mientras que todos los insectos modernos carecen de alas en el protórax, el registro fósil muestra que los insectos paleozoicos, tienen apéndices tipo ala en todos los segmentos torácicos. Un evento importante en la evolución del grupo fue la represión de esas alas (**Kukalová-Peck, 1987**). Mediante experimentos funcionales en la chinche *O.fasciatus* (**Fig.1.24A**) y en la cucaracha *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (**Fig.1.24B**), se hallaron estructuras semejantes a alas vestigiales en la región lateral del pronoto –región dorsal del protórax– (**Chesebro et al., 2009; Hrycaj et al., 2010**). **Passalacqua et al. (2010)** compararon los patrones proteicos de expresión de SCR en etapas tempranas y tardías, en varios órdenes de insectos (**Fig.1.24C**) y su relación con los cambios de forma. Por otro lado, se observó que las ornamentaciones de ciertos Membracidae (**Fig.1.24D**) –Hemiptera, Auchenorrhyncha– se originan durante el desarrollo utilizando vías y procesos compartidos con la formación de alas (**Fig.1.24E; Prud'homme et al., 2011; Moczek, 2011**). En el abdomen, los insectos paleozoicos, tienen alitas –winglets– (**Kukalová-Peck, 2008**). **Ohde et al. (2013)** depletaron *ubx* y *abdA* en *T.castaneum*, y obtuvieron fenotipos con alitas abdominales dorsolaterales.

El gen *scr* está involucrado en los casos asociados al protórax. La función de este gen como supresor de alas en *D.melanogaster* se conoce desde hace un tiempo, ya que se observó que una combinación de alelos hipomórficos y nulos de *scr* –*scr^δ* en *trans* y *scr^{Wnv5}*– puede producir un fenotipo que permite la supervivencia larval y la formación de estructuras adultas, con alas rudimentarias en el protórax (**Rogers et al., 1997**). Algo similar se vio en *T.castaneum* (**Beeman et al., 1989**). Sobre la base de esta evidencia, los autores sugieren que esta expresión dorsal en T1 podría explicar la supresión de alas protorácicas en los insectos actuales. Sin embargo, como *scr* se expresa del mismo modo en el pescadito de cobre *T.domestica*, el rol original de esta expresión parece haber precedido a la función supresora (**Popadić et al., 1998**).

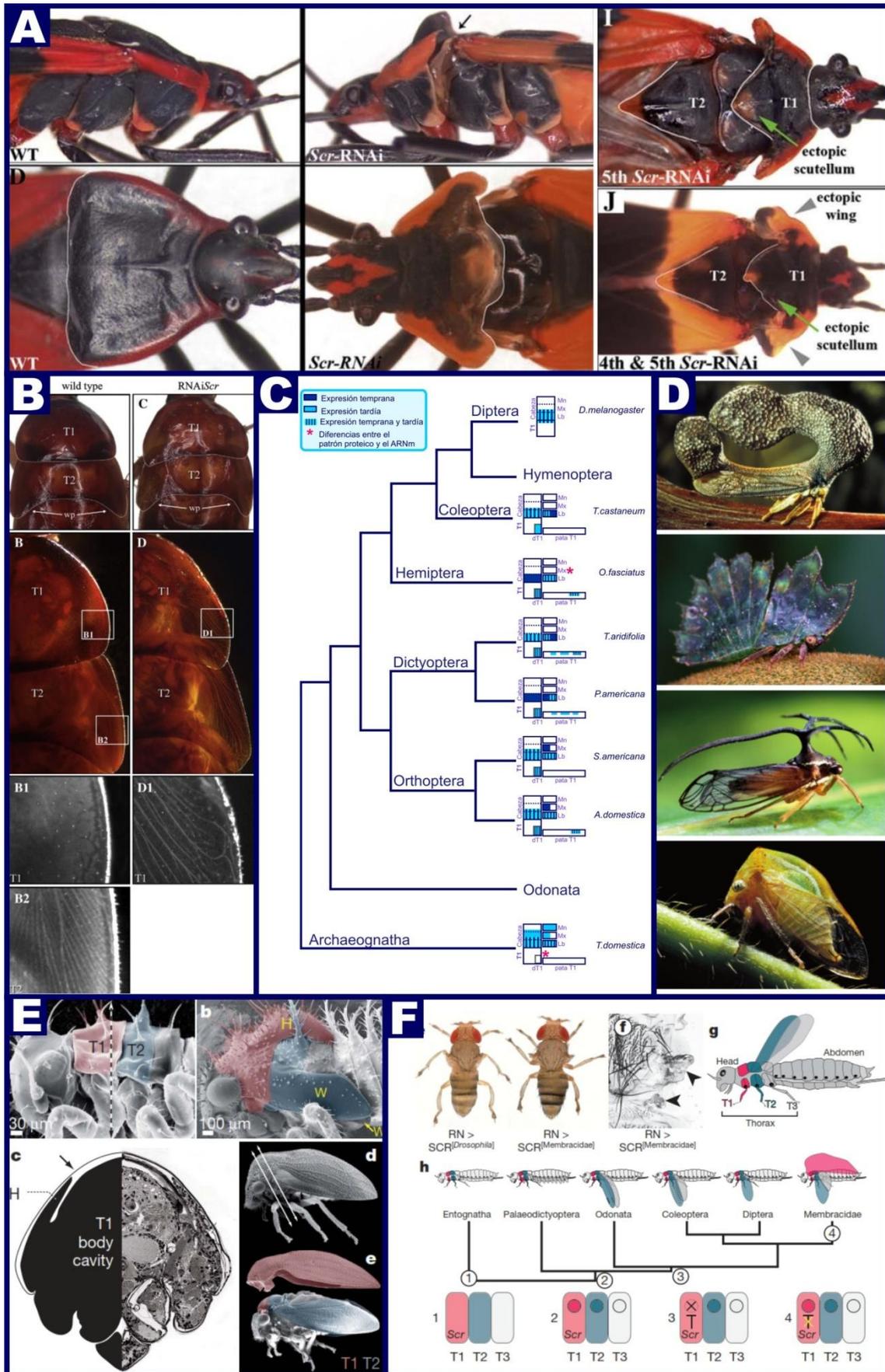


Fig.1.24. Estructuras protorácicas de origen alar y gen *scr*. **A.** Los experimentos de *scr*^{ARNi} en larvas de *O.fasciatus* generaron fenotipos muy afectados en el protórax. Se comparan especímenes *wt* –columna izquierda– con los fenotipos de interferencia –columna central– en vistas lateral y dorsal –filas superior e inferior, respectivamente–. En los especímenes *wt*, el pronoto cubre completamente el segmento T1 y se imbrica sobre la región anterior de T2; en los fenotipos de interferencia, el pronoto está reducido en la región posterior, su borde se hace sinuoso y se eleva, dejando regiones expuestas del pro y del mesotórax. La tercera columna muestra dos fenotipos drásticos interferidos sólo en el 5° estado –arriba–, y en 4° y 5° estados –abajo–. En el primer caso, el pronoto tiene un cambio parcial de identidad hacia T2, que se evidencia por la formación de un escutelo ectópico –flecha verde–. El segundo caso muestra una transformación casi completa hacia T2, evidenciada por la presencia de un escutelo ectópico bien formado –flecha verde– y alas ectópicas en el protórax –flechas grises; (Fig. extraída de [Chesebro et al., 2009](#)). **B.** En *P.americana* se han hecho experimentos similares con resultados similares. La serie compara un espécimen *wt* y uno de interferencia en larvas de 7° estado, con sucesivos niveles de detalle. En el espécimen *wt*, existe una marcada diferencia morfológica entre las expansiones del pronoto en T1 y las pterotecas de T2, que se evidencia en la venación de las futuras alas tegminosas. El espécimen interferido presenta una venación que indica transformación de T1 a T2 (Fig. extraída de [Hrycaj et al., 2010](#)). **C.** Filogenia de insectos mostrando los patrones de expresión de la proteína SCR en distintos órdenes. El rectángulo largo a la izquierda representa la región medio-ventral de la cabeza y el primer segmento torácico. Los rectángulos pequeños a la derecha representan los apéndices asociados a esos segmentos. Los dominios azules representan expresión temprana y los turquesas representan expresión tardía durante el desarrollo. Los dominios rayados indican ambos tipos de expresión. Los asteriscos rojos señalan regiones donde los patrones proteicos de SCR difieren de los patrones de expresión de ARNm (Fig. extraída de [Passalacqua et al., 2010](#)). **D.** Ornamentaciones en Membracidae (Hemiptera, Auchenorrhyncha). De arriba hacia abajo, *Cladonota benitezi*, *Nassunia binotata*, *Umbelligerus peruviansis* y una larva de una especie Cicadomorpha (Fig. extraída de [Moczek, 2011](#)). **E.** Las ornamentaciones –*helmet*– dorsales son de origen par y apendicular. Se muestra una imagen de microscopía electrónica (SEM) de larvas de *Pubilia modesta* en estados 1 y 5, mostrando las alas en T2 en celeste y la ornamentación en T1 en rosa. Abajo se muestra una sección de T1 del primer estado larval y su esquema –izquierda–; la cutícula externa cubre el primordio de la ornamentación –flecha–. Luego se muestran imágenes SEM de un adulto de *P.modesta*, intacto y disectado. **F.** *scr* y evolución de apéndices de T1. La sobreexpresión en discos imaginales de *D.melanogaster* de los *scr*^{*D.melanogaster*} y *scr*^{membrácido} impide la formación de alas y halterios. Se presenta una filogenia de Insecta, mostrando la relación entre *scr* y el programa de desarrollo de apéndices en T1, pasando de no-relación a represión y luego a pérdida secundaria en Membracidae (Fig. extraída de [Prud'homme, 2011](#)). **mn**, mandíbula; **mx**, maxila; **lb**, labio; **dT1**, región dorsal del primer segmento torácico; **T1-T2**, primer y segundo segmento torácico; **W**, alas; **H**, ornamentación.

Algo parecido ocurre con los peines tibiales, cuyo desarrollo en Hemiptera y Holometabola está asociado a la expresión de *scr* en la pata de T1, en la región en la que se formará el peine. En grillos también aparece la expresión, sin embargo los ortópteros no tienen peines tibiales, por lo tanto el dominio de expresión debe haber precedido a la función (Rogers *et al.*, 1997; Popadić *et al.*, 1998).

Los experimentos de Hrycaj *et al.* (2010) muestran que en la cucaracha *P.americana*, el ala ectópica que se forma en T1 al depletar *scr*, se origina en la región lateral posterior tergal de la placa protorácica. Passalacqua *et al.* (2010) hicieron una comparación espacio-temporal de expresión proteica que incluyó a *Thermobia domestica* (Archaeognatha), *Acheta sp.*, *Schistocerca sp.* (Orthoptera); *Periplaneta americana*, *Tenodera sp.* (Blattodea), *O.fasciatus* (Hemiptera), *T.castaneum* (Coleoptera) y *D.melanogaster* (Diptera). Encontraron que la expresión proteica de SCR ocurre en la región lateral-dorsal del protórax en las especies aladas estudiadas en los estados tardíos de la embriogénesis. Estos datos son más consistentes con la hipótesis paranotal; sin embargo, no descartan la teoría apendicular. Si bien las alas aparecen como expansiones laterales del pronoto, queda por determinar el origen celular de esos tejidos. Hrycaj *et al.* (2010) proponen que así como se puede inferir un origen paranotal, también es probable un escenario en el que los exopoditos fueron internalizados en un crustáceo y que en el ancestro de los Pterygota modernos migró dorsalmente hacia su posición actual.

Tradicionalmente, los escudos *-helmet-* y ornamentaciones de Membracidae se han interpretado como expansiones del pronoto (Moczek, 2011). Los experimentos realizados en membrácidos por Prud'homme *et al.*, (2011) muestran un origen par del escudo; los autores sostienen que se trata de un homólogo serial de las alas. Afirman esto sobre la base de datos moleculares y morfológicos *-articulación, musculatura, venación-*, todos semejantes a los de las alas. También sostienen que se trata de una estructura dorsal de origen apendicular, ya que durante su crecimiento se expresan genes involucrados en determinar el eje próximo-distal de los apéndices *-dll y homothorax (hth)-*. Los autores proponen que la evolución de *scr* en relación a la supresión de alas pasó de no relación a represión y luego a una pérdida secundaria de la función en el linaje que lleva a los membrácidos (Fig.1.24F).

Así, los análisis comparativos muestran que la conservación en la expresión y función de *scr* varía según el clado y el segmento que se analice. Entre los insectos, la expresión cefálica aparece muy conservada; mientras que la expresión y funciones en el segmento T1 se correlacionan con una amplia variedad de novedades evolutivas. Asimismo, estos análisis muestran que la expansión de la expresión precede a la adquisición de novedades morfológicas (Rogers *et al.*, 1997; Popadić *et al.*, 1998). Los patrones proteicos muestran que la expresión inicial en Insecta pudo estar más restringida a la cabeza y que la tendencia evolutiva en el grupo es hacia una mayor expresión en el protórax en Pterygota y hacia una mayor posteriorización del borde anterior. En las patas de T1, la expresión es altamente variable incluso entre especies relacionadas (Passalacqua *et al.*, 2010).

J.6.- Algunas discusiones sobre las estructuras cefálicas adultas

Los segmentos de la cabeza de Insecta son difíciles de determinar porque algunos de ellos no están bien definidos. En general, se consideran seis o siete, que pueden ser: labral⁸, ocular, antenal, intercalar, mandibular, maxilar y labial (Fig.1.25). El estatus de los 3 segmentos gnatales no se pone en duda; en cambio, los anteriores están en debate. Los análisis tradicionales se basan en la morfología y el sistema nervioso, y se han propuesto más de una docena de hipótesis sobre la conformación de la cabeza (Posnien *et al.*, 2010). Los tres primeros segmentos coinciden con los tres mínimos de la banda germinal y son llamados naupliares por algunos autores (Peel *et al.*, 2005). Los segmentos anteriores al intercalar tienen características únicas; sus patrones de determinación molecular temprana excluyen a los genes *pair-rule* y a los *HOX*, aunque sí mantienen la expresión de genes de polaridad de segmento. La expresión de *engrailed* –*en*– evidencia seis segmentos⁹, excepto en la cabeza de *D.melanogaster* que también lo expresa en la región de cípeo-labro. En

⁸ Labral o pre-antenal, si se lo considera como un segmento. Muchos trabajos se refieren a la primera región como acron, homóloga del prostomio de Annelida, que no tiene origen segmentario.

⁹ El primero sería el ocular. Estos segmentos se demuestran sin ambigüedad, pero no descartan la presencia de un séptimo segmento.

Crustacea se observaron los mismos seis segmentos. (Cohen y Jürgens 1990; Schmidt-Ott y Technau 1992; Schmidt-Ott *et al.*, 1994; Rogers y Kaufman 1996).

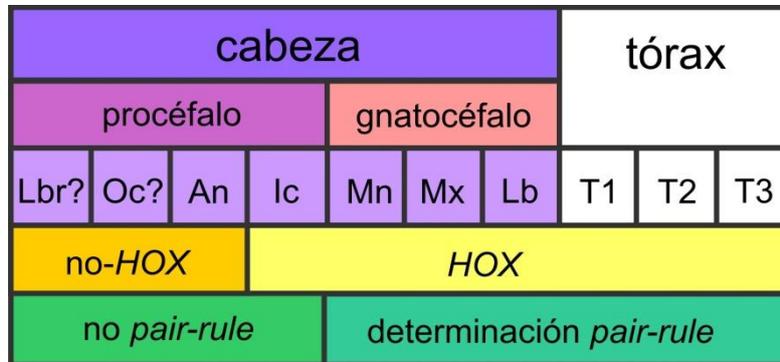


Fig.1.25. Subdivisión esquemática de la cabeza de Insecta. El gnatocéfalo está determinado por el sistema *pair-rule*, al igual que el tronco. El segmento intercalar es más anterior de los que son determinados por genes *HOX*. Los mecanismos de determinación del procéfalo no se encuentran todavía bien comprendidos (Fig. extraída de Posnien *et al.*, 2010).

Por fuera de los insectos, en el clado Arthropoda, entender la organización y las homologías de las estructuras cefálicas es un prerequisite para cualquier estudio evolutivo de esta región. Para interpretar y entender los cambios entre las distintas clases, necesitamos un “mapa común” de la región cefálica: entender el número y la identidad de los segmentos en los grupos. Una segunda cuestión igualmente importante es comprender si esos segmentos son homólogos. Estos asuntos han sido muy debatidos por más de un siglo (Popadić *et al.*, 1998).

La principal dificultad consiste en homologar los segmentos de Chelicerata con los de Mandibulata (Fig.1.26). Tradicionalmente, sobre la base de la innervación, se sugiere que el deutocerebro –la porción media del cerebro– se ha perdido en Chelicerata. Esto podría implicar que el segmento normalmente asociado al deutocerebro también se ha perdido, *i.e.*, el antenal. En consecuencia, el siguiente segmento, el queliceral, debería corresponder al intercalar de Insecta y antenal-II de Crustacea. Una segunda hipótesis considera que no existe tal pérdida y por lo tanto el segmento queliceral/deutocerebral es homólogo al segmento antenal/antenal-I de Insecta/Crustacea (Telford y Thomas, 1998).

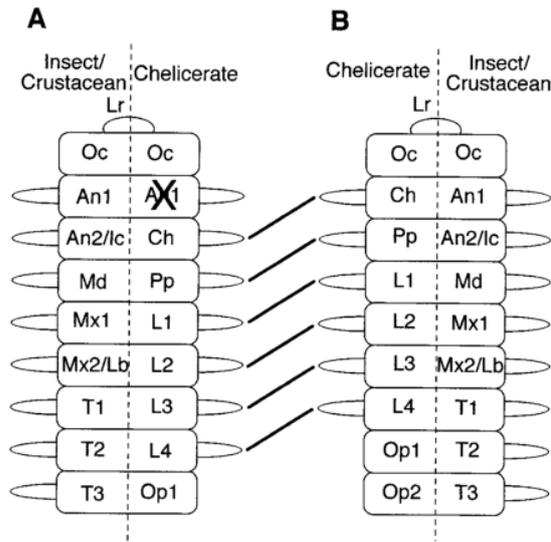


Fig.1.26. Dos hipótesis sobre la homología de segmentos cefálicos entre Chelicerata e Insecta/Crustacea.

A. El segmento deuterocerebral / antenal se perdió en Chelicerata. Esta teoría supone que los quelíceros son homólogos al segundo segmento antenal de Crustacea y al intercalar de Insecta. **B.** El segmento deuterocerebral está presente y es homólogo al antenal-I/antenal. Las líneas entre los dos modelos enfatizan el cambio en el registro de segmentos. **Lbr**, labro; **Oc**, ocular; **Ch**,

quelicerado; **An1-2**, antenal 1 y 2; **lc**, Intercalar; **Mn**, mandibular; **Pp**, pedipalpar; **Mx1-2**, maxilar 1 y 2; **Lb**, labial; **T1-T3**, Segmentos torácicos 1 a 3; **L1-4**, Patas 1 a 4; **Op1-2**, opistosomales 1 y 2 (Fig. extraída de **Telford y Thomas, 1998**).

Las publicaciones que se han usado como referencia en este trabajo difieren en ese aspecto –e.g., **Popadić et al., (1998)** utilizan la primera hipótesis. **Telford y Thomas, (1998)** analizan la expresión de *engrailed* y de genes *HOX* en el ácaro, *Archezogozetes longisetosus*. *en* no les permite hacer inferencias, pero la expresión *HOX*, según ellos, es compatible con la segunda hipótesis (**Fig.1.27**). Es interesante notar dos aspectos adicionales sobre *dll*¹⁰: el labro lo expresa en los dos grupos, señalando hacia un posible origen apendicular; y la mandíbula no lo expresa –esto no es extraño dado que los telopoditos están ausentes en la mandíbula, donde toda la estructura es de origen gnatobásico–. El trabajo comparativo sobre genes *HOX* hecho por **Hughes y Kaufman (2002)** utiliza el segundo alineamiento. Es importante recordar que los patrones de expresión *HOX* son variables especialmente en lo que respecta a retracciones dentro del eje anteroposterior; usarlos como referencia para determinar homología es inseguro y puede dar lugar a explicaciones tautológicas.

¹⁰ El gen *distal-less* –*dll*– se expresa en los telopoditos de los apéndices y está asociado a su crecimiento en el eje proximal-distal

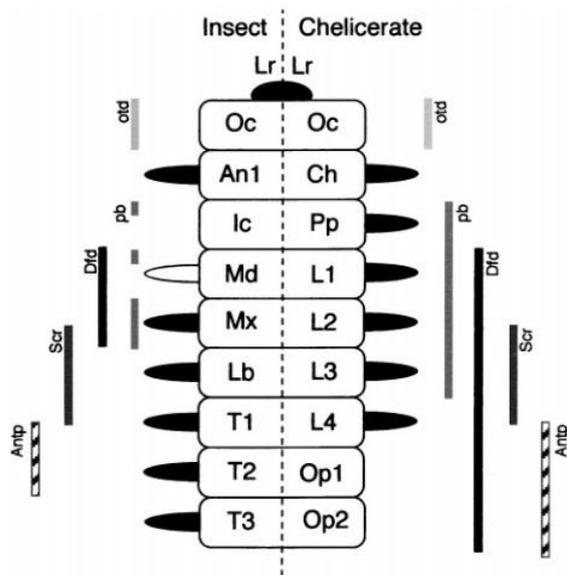


Fig.1.27. Homologías entre los segmentos anteriores de Insecta y Chelicerata según los patrones de expresión HOX.

El borde posterior de *otd* y los límites anteriores de *dfd*, *scr* y *antp* son idénticos en Insecta y Chelicerata. El borde anterior de *pb* se conserva en algunos Insecta. Los apéndices con expresión de *dll* se colorean oscuros. **Lbr**, labro; **Oc**, ocular; **Ch**, quelicerar; **An1-2**, antena 1 y 2; **Ic**, Intercalar; **Mn**, mandibular; **Pp**, pedipalpar; **Mx1-2**, maxilar 1 y 2; **Lb**, labial; **T1-T3**, Segmentos torácicos 1 a 3; **L1-4**, Patas 1 a 4; **Op1-2**, opistosomales 1 y 2 (Fig. extraída de **Telford y Thomas, 1998**).

Los patrones de expresión de varios genes cefálicos se han estudiado ampliamente en *D.melanogaster* (**Fig.1.28A,B**) y *T.castaneum* (**Fig.1.28B,C**). El trabajo de **Birkan et al., (2011)** suma información sobre *O.fasciatus* (**Fig.1.28D**). Los genes *buttonhead* –*btd*–, *empty spiracles* –*ems*– y *orthodenticle* –*otd*– tienen patrones de expresión y fenotipos de pérdida de función que se solapan parcialmente en *D.melanogaster* (**Cohen y Jürgens, 1990**), se los conoce como “genes gap cefálicos”. En *T.castaneum* y *O.fasciatus*, la expresión y función son muy diferentes y no tienen fenotipos “gap cefálicos” (**Schinko et al., 2008; Birkan et al., 2011**); *otd* se expresa ampliamente y parece tener funciones complejas, *ems* tiene una expresión temprana limitada. **Economou y Telford (2009)** analizaron la expresión de *cap'n collar* –*cnc*–, *collier* –*col*– y *crocodile* –*croc*– en *T.castaneum*; los patrones de expresión son más similares entre el gorgojo y la chinche, que respecto a la mosca. *croc* se expresa en las regiones que rodean al estomodeo en los tres insectos estudiados. La expresión de *croc* fragmenta la expresión de *lab* en el segmento intercalar en *D.melanogaster*, pero no en *T.castaneum*. Los autores se apoyan en los resultados de expresión y morfogénesis para sostener que la hipofaringe es una estructura asociada al segmento mandibular y no al intercalar. Los resultados en *O.fasciatus* son semejantes.

También se observan algunas pequeñas diferencias entre *O.fasciatus* por un lado y *T.castaneum* y *D.melanogaster* por otro, atribuibles a patrones compartidos por los

holometábolos. Las características de *O.fasciatus* pueden representar un estado más basal, o una apomorfía de los hemípteros asociada al alargamiento de las piezas bucales (Birkan *et al.*, 2011). Janssen *et al.* (2011) analizaron la expresión de genes cefálicos en el milpiés *Glomeris marginata* (Villers, 1789) (Diplopoda; Fig.1.28E); sus estudios confirman la mayoría de las hipótesis planteadas por Birkan *et al.*, (2011) sobre reconstrucción de estados basales y demuestran roles muy conservados para *col*, *cnc* y posiblemente para *croc* entre los artrópodos mandibulados.

Haas *et al.* (2001) comparan tres modelos de la posible estructura de la cabeza (Fig.1.29A,B). Sobre la base de cada uno de ellos, hacen predicciones sobre patrones de expresión y concluyen que el modelo llamado L-/Bent-Y es el más coincidente con sus resultados. Según este modelo, la cabeza está formada sólo por seis segmentos, y la estructura labral corresponde en realidad al segmento intercalar. Visto lateralmente, el eje embrionario se curva formando una L cuyo punto de articulación está en el segmento intercalar. En una vista ventral, los segmentos ocular y antenal quedan divididos en las regiones derecha e izquierda, quedando en la línea media el segmento intercalar y sus estructuras asociadas –estomodeo y labro–. El labro es considerado por estos autores como una estructura apendicular, basándose en que expresa *dll*. En un trabajo posterior, Posnien y Bucher (2010) proponen el modelo “*bend and zipper*” basado en experimentos funcionales (Fig.1.29C). La interferencia del gen *labial* de *T.castaneum* afectó al segmento intercalar y porciones laterales de la región cefálica, pero no afectó a la región dorsal ni al labro, ni produjo efectos homeóticos sobre éste; de modo que se comporta como una estructura independiente del segmento intercalar.

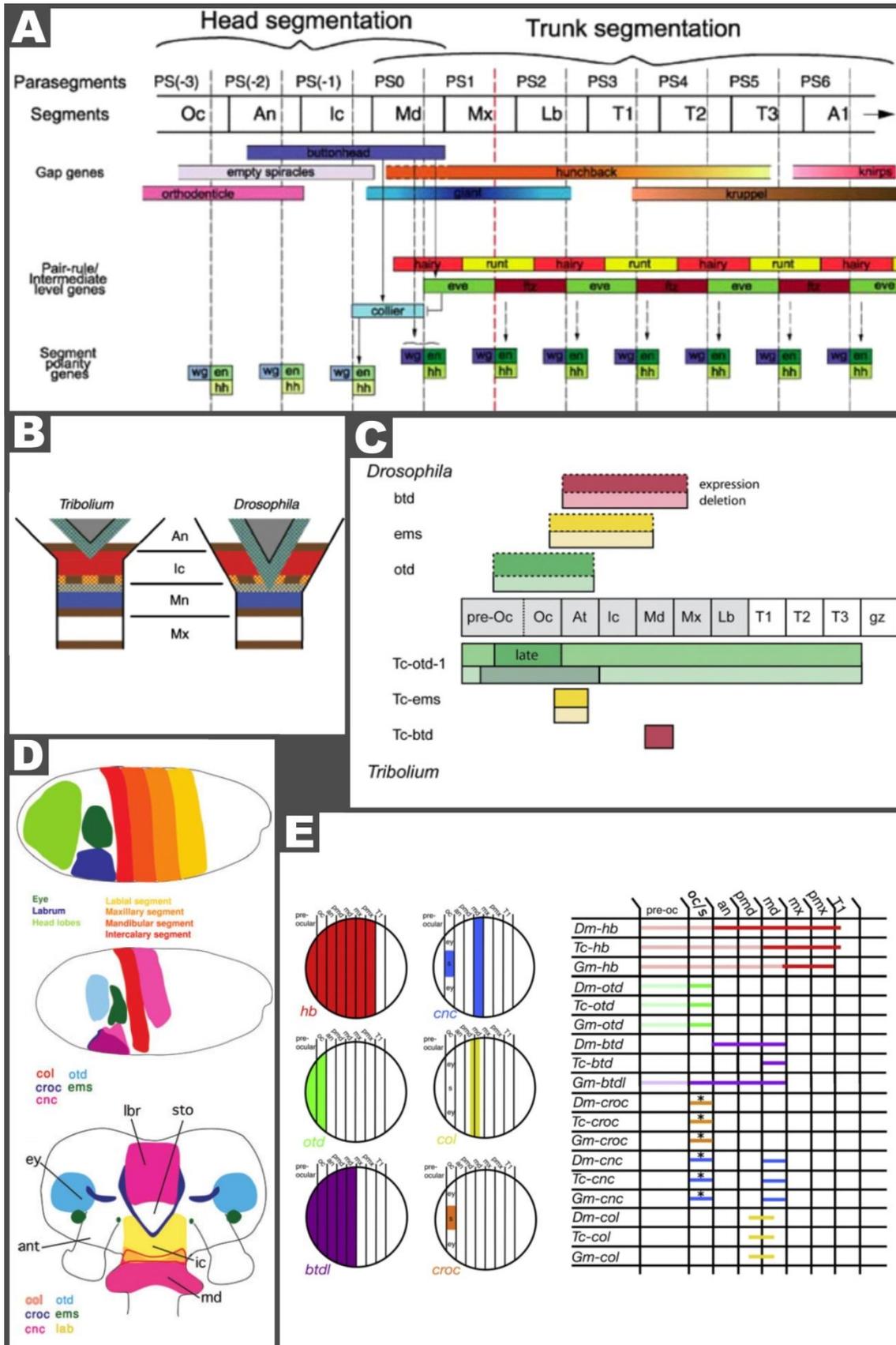


Fig.1.28. Segmentación cefálica y patrones de expresión. **A.** Patrones de expresión en *D.melanogaster*. Los genes *pair-rule* y *gap* no se expresan en los segmentos/parasegmentos anteriores; sí lo hacen los genes de polaridad de segmento. En el PS0, determinado por *collier*, hay cierto grado de solapamiento en la expresión de genes de ambas regiones. **B.** Patrones de expresión de *cnc* (azul), *croc* (verde), *knot* (amarillo), *lab* (rojo) y *en* (marrón) en relación al estomodeo (gris); en *T.castaneum* y *D.melanogaster*. Las dos especies tienen el mismo patrón de expresión, pero en *D.melanogaster* el estomodeo y su expresión asociada tienen una expresión más posterior respecto al registro de segmentos, fragmentando el segmento Ic y la expresión de *lab* (Fig. extraída de [Economou y Telford, 2009](#)) **C.** Dominios de expresión y delección de genes cefálicos en *T.castaneum* y *D.melanogaster*. Las barras superiores con color más intenso indican expresión; las claras e inferiores indican delección en fenotipos ARNi o mutantes. La expresión de *D.melanogaster* corresponde a embriones de estado 5, que muestran patrones de expresión y delección solapantes. Los ortólogos de *T.castaneum* se expresan en el mismo orden pero sin solapamiento significativo. Los dominios de delección de *Tc-ems* se restringen a la parte posterior del segmento ocular y anterior del antenal; *Tc-btd* no es necesario para el desarrollo cefálico. *Tc-otd1* tiene un dominio de expresión temprano que luego se retrae (verde oscuro); la función temprana afecta al blastodermo entero y la tardía a la región cefálica (Fig. extraída de [Schinko et al., 2008](#)). **D.** Expresión de genes cefálicos en *O.fasciatus*. Arriba: mapa de destino de las regiones cefálicas en el blastodermo. Centro: expresión de genes cefálicos en el blastodermo. Abajo: expresión de genes cefálicos en una banda germinal tardía. La región anterior está a la izquierda en los blastodermos y arriba en la banda germinal (Fig. extraída de [Birkan et al., 2011](#)). **E.** Comparación de la expresión de genes cefálicos de *Glomeris marginata* (Diplopoda, Myriapoda) con *D.melanogaster* y *T.castaneum*. Los círculos representan la expresión de los genes cefálicos en *G.marginata*. La tabla muestra esquemas de barras comparando la expresión en *G.marginata*, *D.melanogaster* y *T.castaneum*. Las barras claras indican pérdida de expresión en estados tardíos. Los asteriscos para *croc* y *cnc* indican expresión en el estomodeo y no en la región ocular (Fig. extraída de [Janssen et al., 2011](#)). **Lbr**, labro; **Oc**, ocular; **An**, antenal; **Ic**, Intercalar; **Mn**, mandibular; **Mx**, maxilar; **Lb**, labial; **T1-T3**, Segmentos torácicos 1 a 3; **A1**, Segmento abdominal 1; **PS**, parasegmento; **gz**, zona de crecimiento.

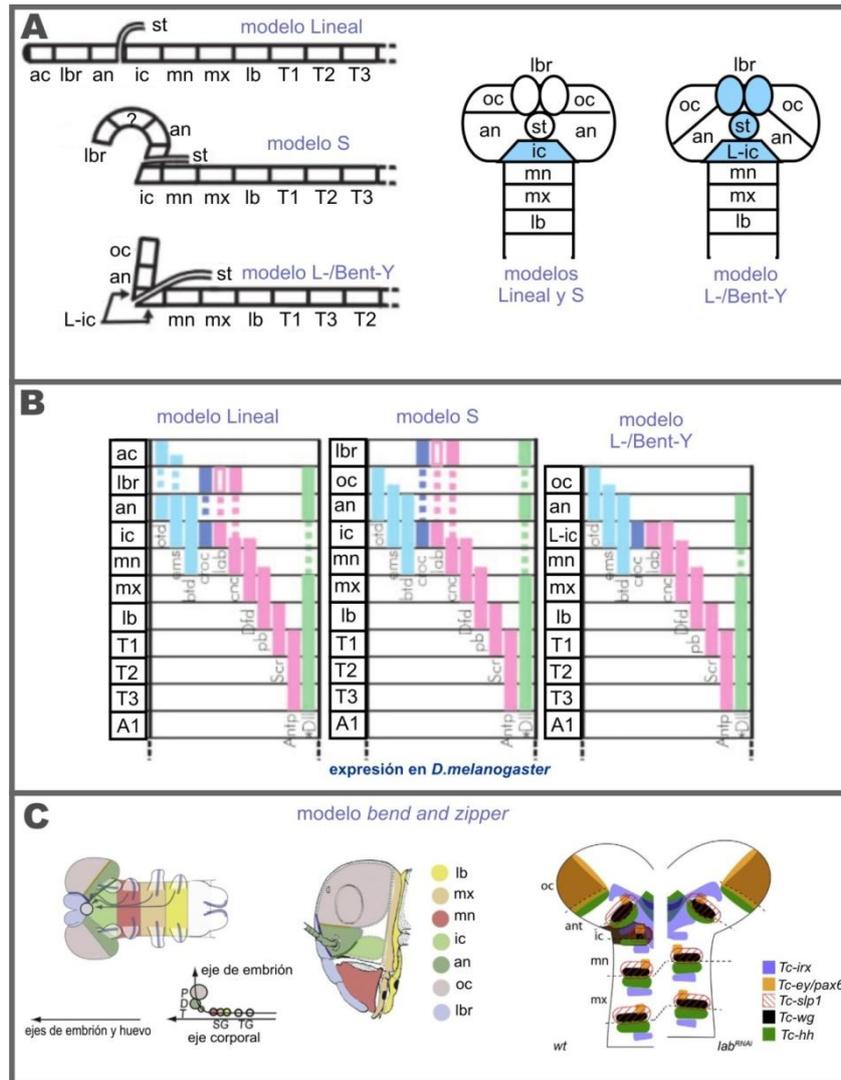


Fig.1.29. Modelos de organización cefálica, basados en patrones génicos. A. Esquema comparativo de los modelos Lineal, S y L-/Bent-Y, en vistas laterales –izquierda– y ventrales –derecha–. **B.** Patrones de expresión génica, comparando los tres modelos en *D.melanogaster*. El ordenamiento propuesto por el modelo L-/Bent-Y es el que implica menor discontinuidad en la expresión de la mayoría de los genes analizados (Fig. extraída de Haas *et al.*, 2001). **C.** Modelo “*bend and zipper*” en *T.castaneum*. Izquierda: Las líneas azules en la banda germinal indican la expresión de *Tc-wg*. En estados avanzados, los apéndices gnatales rodean el estomodeo, migrando hacia la región anterior. Durante la migración fragmentan el segmento intercalar y empujan los fragmentos hacia los lados. Las líneas hipotéticas de migración se indican con flechas. En el esquema de la cabeza adulta, se esquematiza la contribución relativa de cada segmento según lo observado en la embriogénesis de *T.castaneum*. Las líneas punteadas señalan los límites entre territorios deducidos según el modelo; las regiones en blanco son de origen indeterminado. Abajo se esquematizan los distintos ejes. Derecha: Representación esquemática de la ARNi de *lab*. La región perdida está marcada en marrón en el *wt*. Las líneas punteadas corresponden a uniones de parasegmentos (Fig. extraída de Posnien y Bucher, 2010).

Las partes bucales en Insecta están compuestas por los apéndices de los 3 últimos segmentos cefálicos y son increíblemente diversas (**Fig.1.30**). En general hay dos tipos básicos: el masticador y el suctopicator. El tipo masticador es ancestral y es característico de la mayoría de insectos basales – Archaeognatha, Zygentoma, Odonata, Orthoptera, Dictyoptera y otros–. Mientras los apéndices gnatales tienen su función separada y una morfología distinta en la mandíbula, las maxilas y el labio son estructuralmente muy similares. En contraste, en el suctopicator, los apéndices gnatales presentan una gran variedad estructural. En el caso de los heterópteros, las mandíbulas y maxilas son las que se parecen estructuralmente, mientras que el labio se diferencia de ellas (**Popadić et al., 1998**).

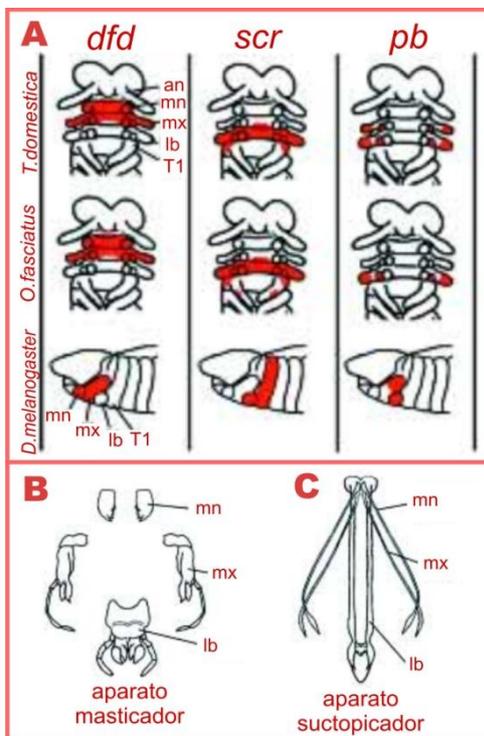


Fig.1.30. Segmentos gnatocefálicos y apéndices bucales. A. Patrones de expresión *HOX* en los segmentos gnatocefálicos de *T.domestica* (Archaeognatha), *O.fasciatus* (Hemiptera) y *D.melanogaster* (Diptera). B. Esquema de las partes bucales de un aparato masticador. C. Esquema de las partes bucales de un aparato suctopicator (Fig. extraída de **Popadić et al., 1998**).

En *D.melanogaster* y *T.castaneum* los mutantes *pb* muestran transformaciones de las partes bucales a pata, sugiriendo que el gen es importante especificando la morfología de los palpos. Por eso, *pb* es un excelente candidato para estudiar la evolución de las partes bucales. En el pescadito de cobre *T.domestica*, *pb* se expresa principalmente en los segmentos maxilar y labial. Este patrón es consistente con el hecho de que se forman estructuras similares entre sí y distintas al labio. En *O.fasciatus*, *pb* se expresa sólo en el segmento labial. Esta reducción en el dominio de

expresión se correlaciona muy bien con el cambio morfológico. *scr* actúa también sobre el labio controlando su fusión, esto es lo que le da identidad y lo diferencia de los demás apéndices gnatales –esta característica del clado Insecta provoca el cambio de nombre del apéndice, de “maxilas II” a “labio”– (Popadić *et al.*, 1998).

K.- En resumen

En este primer capítulo, quise realizar una revisión de los temas centrales que debemos tener en cuenta a la hora de pensar el desarrollo en un marco comparativo y evolucionista. Introduje el marco histórico de la EvoDevo y una descripción general del marco teórico de la disciplina. Luego, desglosé algunos de los temas más importantes en relación con Arthropoda y especialmente con Insecta. Explicué los tipos de desarrollo dentro del grupo y me detuve en el modo basal y menos difundido de banda germinal corta, cuya comprensión es central para interpretar los resultados de este trabajo.

Luego introduje algunas discusiones respecto a la evolución genómica y el rol que algunos de esos procesos han tenido para la evolución de genes implicados en el desarrollo, especialmente los *HOX*, su aparición y organización. También reseñé el rol de las regiones no codificantes, con un énfasis en la Hipótesis *cis*-regulatoria y sobre cómo las GRN y su estructura pueden incidir sobre la evolución de la forma en distintos niveles jerárquicos.

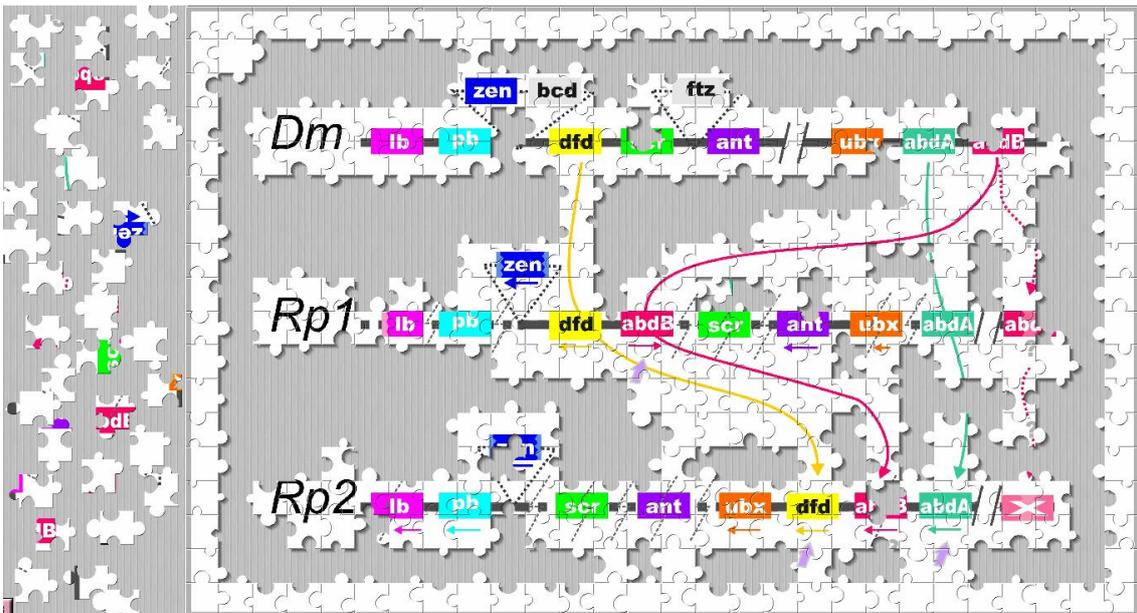
Resumí algunas miradas sobre la capacidad de los clados de acumular variación seleccionable a largo plazo, las relaciones entre genotipo y fenotipo, y la preponderancia de los aspectos genéticos en relación con la plasticidad fenotípica y otros tipos de herencia no-genética. También presenté varios puntos de vista sobre la homología y la homoplasia, especialmente en relación con las distintas interpretaciones que pueden darse desde campos diferentes, centrándome en la sistemática y la biología del desarrollo.

Con estas cuestiones en mente, realicé una revisión de lo que se sabe actualmente sobre la evolución y desarrollo de Insecta –y algunos aspectos de Arthropoda–. La mirada está hecha eminentemente desde la EvoDevo y la biología del desarrollo, pero en un intento de establecer un puente de diálogo con discusiones que vienen del campo de la sistemática.

Sin duda, esta revisión pudo haber sido más sintética o más detallada. Espero haber logrado un buen equilibrio entre la descripción de los temas que considero importantes para la disciplina y el diálogo entre disciplinas, estimulantes para mí y necesarios en el marco de la tesis.

Capítulo 2

Anotación de factores de transcripción en el genoma de *Rhodnius prolixus*



A.- Introducción

Este trabajo se centró en la búsqueda de genes involucrados en el desarrollo temprano, especialmente genes *HOX* y otros factores de transcripción (TF) con homeodominio.

Algunos de los genes identificados fueron testeados experimentalmente mediante amplificación, clonado y secuenciación. También se hicieron ensayos de función y expresión mediante técnicas de hibridación *in situ* y genética reversa. Los resultados experimentales –que se presentan capítulos posteriores– fueron acordes a lo esperado, validando así los métodos de búsqueda informática.

Si se tienen en cuenta los antecedentes provenientes de diversas especies, podemos esperar que los genes *HOX* estén organizados en un *cluster* más o menos compacto en *Rhodnius prolixus* así como ocurre en muchos organismos estudiados. Un objetivo de este trabajo fue determinar la organización de los genes *HOX* y, en caso de haberlo, caracterizar el *cluster HOX* para la especie en estudio.

Los **ANEXOS II – VI** Contienen información adicional de esta sección.

B.- Materiales y métodos

Las aproximaciones *in silico* se realizan utilizando datos de secuencia y programas *ad hoc*, generalmente disponibles en la web, pero el curado de la secuencia incluye instancias de trabajo casi artesanal respecto a su observación y montaje. Muchas veces es necesario tomar decisiones que requieren la formación previa de un criterio. En este apartado, me detengo explicando algunas de esas instancias, ya que considero que el conocimiento de la metodología es fundamental para la comprensión de los resultados y su discusión.

B.1.- El proceso de identificación y anotación de genes por la vía bioinformática

Los métodos de identificación *de novo* de genes en una especie son muy variables; en ocasiones requieren largas etapas experimentales que implican la búsqueda a partir de presencia, modificaciones, errores o ausencia de función. En el caso del desarrollo temprano de insectos, existe la ventaja de contar con información proveniente de otras especies, que permite usar métodos comparativos. Si bien los

datos de secuencia disponibles no son tan abundantes como sería deseable, constituyen un buen punto de partida cuando se trata de genes conservados.

En estos casos, se procede a obtener y alinear las secuencias proteicas de los ortólogos disponibles y elegir las regiones que, por un lado, estén muy conservadas y por otro, sean perfectamente diferenciables de secuencias similares de otros genes. Las regiones conservadas elegidas se usan para realizar la búsqueda en el organismo de interés; para ello se usan las variantes del algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990), que utiliza la matriz BLOSUM62.

El CREG forma parte del Consorcio de Secuenciación del Genoma de *Rhodnius prolixus* y este trabajo se realizó durante el proceso de secuenciación, por lo tanto tuve oportunidad de observar las distintas etapas:

- ♦ ausencia inicial de datos,
- ♦ datos parciales disponibles en las “trazas” (*traces*: Bases de Datos disponibles en la web de NCBI, que contienen las secuencias genómicas parciales, de longitud entre 300pb y 900pb aproximadamente)
- ♦ datos provenientes de EST (*Expressed Sequence Tags*)
- ♦ ensamblados parciales del genoma
- ♦ ensamblado final

En cada una de estas etapas el trabajo tiene sus particularidades, pero en todas, la base es la similitud de las secuencias, su discriminación respecto de posibles secuencias semejantes, y el ensamblado del gen, que suele estar repartido en distintos exones y/o *contigs*.

Una vez que el ensamblado final está disponible, se procede a la anotación de los genes. Este trabajo implica un estudio más exhaustivo de los distintos ortólogos del gen en todos los organismos relacionados en los que se conoce, a fin de poder determinar todas las regiones y motivos conservados de la secuencia proteica. Es decir, para la búsqueda inicial del gen alcanza con identificar una región conservada, pero para el armado final –que siempre es una aproximación hasta tanto se cuente con evidencia experimental– la mayor certeza a nivel de CDS (*Coding DNA Sequences*), se logra identificando los motivos proteicos que se espera que estén presentes.

En la práctica, el máximo nivel certeza se obtiene cuando las regiones N-terminal y C-terminal están conservadas y, si hay más de un exón, cuando las zonas de

empalme de exones contienen regiones conservadas a ambos lados del intrón. En caso de haber varios exones, existe el riesgo de perder información de exones muy pequeños y/o exones de secuencia variable. Este vacío de información sólo puede salvarse experimentalmente.

Luego de establecer los motivos conservados, se hacen búsquedas BLAST en la base de datos disponible (En este caso y actualmente, *online* en la página web de Vector Base –<http://vectorbase-cap.ensemblgenomes.org/>–; anteriormente en las trazas disponibles en la página web de NCBI –<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>– o en la versiones preliminares de ensamblado, descargadas localmente). Como resultado de tales búsquedas, se detecta/n la/s secuencia/s de interés en el genoma y se descargan los archivos fasta “.fa” correspondientes a la secuencia completa del *supercontig* que la contiene y los archivos “.gff” que contienen las predicciones para la región de interés. Estas predicciones están automatizadas y responden a motivos de secuencia relacionados con regiones estructurales de los genes; es decir, similitud con secuencias promotoras, terminadoras, sitios de *splicing*, etc. El trabajo que corresponde a los/as operadores/as consiste en analizar la composición de la secuencia como se describió en los párrafos precedentes y confirmar las predicciones, modificarlas y/o realizar predicciones *de novo* en caso de que no pre-existan. Esta etapa del trabajo se realizó usando el *software* Artemis 14.0.0 (Rutherford *et al.*, 2000).

Dado que los TF estudiados en este trabajo contienen en su mayoría la región homeodominio muy conservada, en algunas ocasiones las identificaciones se hicieron por un método inverso; es decir, se hicieron búsquedas generales para homeodominios, se rescataron todas las predicciones resultantes –aún cuando los *e-values* fueran malos–, luego, mediante BLAST, se asignó una identificación preliminar a cada homeodominio y se procedió a comparar la secuencia con sus correspondientes ortólogas de modo de ratificar o rectificar la predicción original.

Una vez que los análisis y comparaciones nos revelan que la secuencia ensamblada contiene las regiones necesarias y suficientes, se procede a la carga de los datos y envío a la entidad correspondiente –en este caso al Portal de la Comunidad de Anotación de Vector-Base– para su futura liberación al público. Puede ocurrir que no sea posible obtener la secuencia completa, ya que el proceso de

ensamblado genómico no está exento de grandes pérdidas de información. En estos casos, se envían datos parciales con su correspondiente nota aclaratoria.

B.2.- Reconstrucción teórica de secuencias grandes: *cluster HOX*

Las búsquedas iniciales se realizaron sobre las trazas del genoma y EST, y luego sobre las distintas etapas de ensamblado. *R.prolixus* parece tener una gran cantidad de repeticiones dispersas por todo el genoma (**Fig.2.1A**), en muchos casos mayores a los 900pb. Si se tiene en cuenta que la secuenciación genómica tiene como unidad informativa a las trazas, cuyos tamaños de secuencia están generalmente entre los 350pb y 900pb, se comprende la dificultad que estas repeticiones implican a la hora de armar *contigs*.

Esta situación se puso en evidencia al intentar generar pequeños *contigs* a partir de las trazas, cuando éstas eran las únicas secuencias disponibles. En esos casos, las extensiones de las secuencias se hacían mediante búsquedas por *trace*-BLAST, simulando la técnica de *walking* (**Fig.2.1B**, esquema de regiones no-repetitivas); es decir, usando el extremo de una traza como punto de partida para una búsqueda por *trace*-BLAST y así poder obtener otras trazas que compartieran un extremo pero luego se extendieran más allá en un sentido u otro.

Al alcanzar una repetición, aparecían numerosísimas trazas que en un extremo tenían una coincidencia muy buena pero en el otro extremo eran todas diferentes entre sí. Esta situación permite identificarlas como repeticiones dispersas (**Fig.2.1B**, esquema de repeticiones cortas). En los casos en que su longitud es menor al tamaño medio de las trazas, se puede saltar la dificultad y continuar con el ensamblado, pero cuando esa longitud es superada, las propias características de iteración y dispersión provocan redundancias y no es posible tener un punto de referencia que permita tomar decisiones fiables. Entiendo que la abundante presencia de zonas de incertidumbre (zonas "N") en el ensamblado actual, es un reflejo de esta situación. (**Fig.2.1B**, esquema de repeticiones largas).

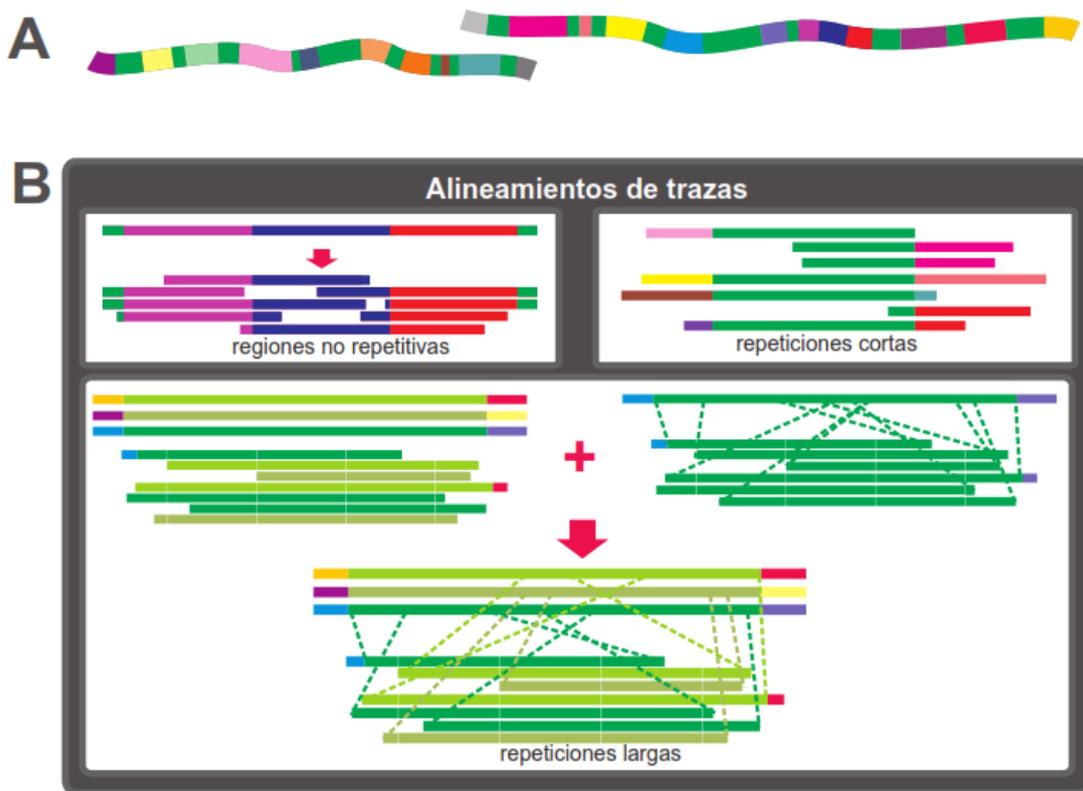


Fig.2.1. Walking in silico y secuencias repetitivas dispersas por el genoma. La figura muestra una representación esquemática de la técnica de *walking* llevada a cabo *in silico* y las diferentes situaciones que se presentaron. **A.** Esquemática de dos diferentes regiones genómicas teóricas, donde el color verde representa zonas de repeticiones dispersas y/o en tándem, mientras el resto de los colores representan secuencias de copia única. **B.** representación de tres posibles situaciones que se presentan al intentar reconstruir las secuencias de A, a partir del solapamiento y empalme de secuencias cortas. El primer cuadro muestra el caso en que las secuencias son de copia única y por lo tanto se puede hacer una reconstrucción de la secuencia original con un alto grado de confianza. El segundo cuadro muestra el caso en que se presentan repeticiones dispersas cortas, que no superan la longitud media de las trazas; si bien la zona repetida tiene altos niveles de similitud, los extremos permiten discriminar los distintos grupos de secuencia y realizar *contigs* relativamente de buena calidad. El último cuadro muestra la dificultad insalvable que presentan las repeticiones dispersas largas y/o en tándem, las cuales suman dos problemáticas: el alineamiento de secuencias similares pero con distinto origen –representadas en distintos tonos de verde– más las superposiciones de las secuencias consigo mismas, debidas a los tándems.

Uno de los principales objetivos de esta tesis consiste en caracterizar el *cluster HOX*, tarea iniciada tempranamente ensamblando las trazas, tal como se describió. Cuando estuvo disponible la versión final del genoma, el *cluster HOX* permanecía

disperso en una serie de *supercontigs*, por eso el primer intento consistió en analizar los extremos de los *supercontigs* para determinar si era posible asociar algunos de ellos entre sí por solapamiento. Para comparar las secuencias de los extremos se usaron los algoritmos “ClustalW Multiple Alignment” y “CAP *contig* assembly program” provistos por el paquete BioEdit (Hall, T.; 1999) y un método gráfico diseñado *ad hoc* (Fig.2.2). Este último se usó simplemente como una guía para pensar posibilidades de ensamblado: debido a que los alineamientos de secuencia no arrojaron resultados importantes que asociaran *supercontigs* entre sí, y considerando las vastas regiones de incertidumbre incluidas en ellos, existía la posibilidad de que éstas coincidieran como una especie de rompecabezas; es decir, que las zonas “N” en un *supercontig* pudieran ser suplidas por regiones de secuencia de otro adyacente y viceversa.



Fig.2.2. Método gráfico para establecer posibles asociaciones entre *supercontigs*. Cada uno de los *supercontigs* conteniendo genes asignables al *cluster HOX* fue binarizado y graficado como barras claras (con regiones de secuencia) y oscuras (con regiones de incertidumbre), manteniendo las longitudes relativas entre y dentro de *contigs*. Luego esas barras se compararon longitudinalmente de a pares buscando posibles complementariedades. En cada caso, se esperaba encontrar uno de tres posibles resultados: inclusión de un *contig* dentro de otro; solapamiento entre dos *contigs* o falta de coincidencias. En la figura, las regiones claras se muestran en distintos colores, indicando que se trata de diferentes *contigs*.

Para una mejor comprensión, la Fig.2.2 muestra las situaciones consideradas. Cada *supercontig* está representado como una barra de longitud relativa determinada por la longitud de la secuencia, de modo que las proporciones entre los distintos

supercontigs se mantienen. Las regiones en negro a lo largo de esa misma barra indican las regiones “N”, también manteniendo las proporciones. Es decir, la secuencia está convertida en un código binario siendo “1” las regiones informativas y “0” las no informativas. Luego, esa secuencia binarizada está esquematizada gráficamente, semejando un código de barras. Esas barras comparadas como piezas de un rompecabezas permiten establecer la existencia o no de complementariedades entre ellas. Tal como muestra la figura, se consideraron el solapamiento y la inclusión como alternativas de asociación.

C.- Resultados

C.1.- Identificación y anotación de genes

Este trabajo se centró principalmente en los genes *HOX* de *R.prolixus*, pero también se identificaron otros factores de transcripción involucrados en el desarrollo. En las secuencias que aparecen a continuación, las regiones resaltadas en gris indican regiones y pequeños motivos conservados basados en los alineamientos. El HD está subrayado en verde y el motivo YPWM, en caso de haber, está subrayado en azul. Los pares de aminoácidos resaltados en verde indican unión de exones. El **ANEXO II** presenta los principales alineamientos utilizados como referencia para determinar los límites y nivel de completud del gen. El **ANEXO III** presentan tablas con información respecto a ubicación, longitud, cantidad de exones, regiones esperadas y obtenidas y otros datos que dan indicio de la calidad estimada para la secuencia obtenida.

A los efectos de ensamblar la secuencia, se consideraron conservados los motivos compartidos con otra especie, ya fuera más cercana como *Acyrtosiphon pisum* (Harris, 1776) y *Oncopeltus fasciatus* o más lejana como *Tribolium castaneum*. Estos indicadores dan la aproximación con el mayor grado de precisión posible en términos teóricos respecto a la calidad de la secuencia.

A continuación se listan los genes anotados, mostrando las secuencias proteicas y los esquemas de estructura (**Fig. 2.3 a 2.25**)¹¹.

¹¹ Los esquemas no están a escala debido a la diversidad de órdenes de magnitud de las secuencias; las distancias mostradas son orientativas. Respecto a los bloques que representan los exones, se mantuvieron las relaciones, dentro de las posibilidades de la esquematización.

C.1.1.- Genes anotados

Ortólogo del gen *labial* (*Rp-lab*): contiene la secuencia proteica de 341 residuos:

```

MMTMNVGMYGTYAQGPEPFGVDYEATGQYFDNESHQHLMSGYDQYQEYHELPAANGKHGEYYP
   10      20      30      40      50      60
GQDVITSNGLSYTNLDYNYPCAKGDVYHQERNLHIHGQDYLDNFQEIIEHYHHHHHHMQSV
   70      80      90     100     110     120
SHPVQEMHYGPTVKEEILHQFPQQSHLGHSHHQHFESGLGQQQFAAQTAQQQSRLHH
   130     140     150     160     170     180
SQQQQQQQPSVPTYKWMQVQRNVKPSGALLNNTGRNTNFTNKQLTELEKEFHFNKYLTR
   190     200     210     220     230     240
ARRIEIASALQNETOVKIWFONRRMKOKKRMKEGLLPGSVSSSVIQDGGQSTSGASASGT
   250     260     270     280     290     300
SAVCLQALGNSSTNSPSTTVHQDHLHLGMSTTSEDSRESQL
   310     320     330     340
    
```



Fig.2.3. Estructura de *Rp-lab*. Está repartido en dos exones de 625pb y 401pb respectivamente, ubicados en los marcos de lectura (ORF, del inglés *Open Reading Frames*) -1 y -2 del *supercontig* GL563154, separados por un intrón de casi 116kb (115868pb). El primer exón contiene el motivo YPWM –a veces YKWM– típico de los genes HOX y el segundo contiene el HD completo.

No se descarta la existencia de un tercer exón intermedio, ya que en los ortólogos usados como referencia, la región que separa el motivo “YKWM” (subrayado azul) del homeodominio (subrayado verde) suele ser más larga y contiene el motivo PNSNSSCLGNNT. En *R. prolixus*, no fue posible encontrarla en ninguna de las bases de datos disponibles.

Ortólogo del gen *proboscipedia* (*Rp-pb*): contiene la secuencia proteica de 702 residuos:

```

MRGKQPQQPTSQQQQQPQPQPHGPQTQQQEHVVDDQHEPDDDDDEGEEEEYLLKAGRNP
   10      20      30      40      50      60
GGGPDEMGGVPPGPPPHQPVPSHQGFWMASAVSAAATGMGDMIPGESGFISSQPSMAEF
   70      80      90     100     110     120
ILPHHMTAGDMSPPSPGQPQPSYPQPMDDQQAVQEYYPWMKEKKTARKSNQENGLPRRLRT
   130     140     150     160     170     180
AYTNTOLLELEKEFHFNKYLCRPRRIEIAASLDLTERQVQVWFONRRMKHKROTLSKQGE
   190     200     210     220     230     240
EGDEKEPGKAGKGDKGLLGHDETSKSKSCQNCLELPPGMLGEHLTSRTNNNNNNNSTSYNNN
   250     260     270     280     290     300
SNASSGASSVTSTTSSFEKLEEDSRSNESRVLTSPGLLPVKRPNEVVVKTEGTGISMCASS
   310     320     330     340     350     360
PGNNKKLCKDTRLISPEIAIKGALTPASTPGTPGTAGTSPLEMPGQYVVQARRGSPTAAT
   370     380     390     400     410     420
    
```

```

AIATATASVTAVL430PNPSVNNLVQVVRCAAP440NNFSPPPPQQRHPVNAEYRMAQYRQQFTRE450
YTTQQRVYPNS460DYRQONPASRPNMGHPPRARQGYQQG470OYQQYCONVYNGYNQEYYNQRQY480
490 500 510 520 530 540
QYDSDYP550GSTNYGSYHGYNSEVMAHETNTTNNSTTVGNTGY560YQENYQHVDYSPGKPPPTQP570
610 620 630 640 650 660
GYYEIGHQGG670EASNVPNHYGVS680SPDPF690PSNQHG700TASVMT710PPNS720VRTD730SS740S750GEYYNSL760HH770
FYNAEQQQ780NNPQH790ASE800NSNS810SSDFN820FLTN830LANDFAPEYY840QLS850
670 680 690 700

```



Fig.2.4. Estructura de *Rp-pb*. Está repartido en tres exones de 511pb, 143pb y 1455pb respectivamente, en los ORF -2, -1 y -3 del *supercontig* GL563154, separados por dos intrones de ~129Kb (128677pb) y ~5Kb (5152pb). El primer exón contiene el motivo YPWM y el HD está repartido entre el 2° y 3° exón. Coincide con dos diferentes predicciones (RPTMP08240, RPTMP08242), que contemplaban separadamente las regiones N- y C-terminal.

Ortólogo del gen *deformed* (*Rp-dfd*): contiene la secuencia proteica de 402 residuos:

```

MSSFLMN10SPSYHHQAVLV20DPKFPPT30EEYSQSNYI40TSDFFGHHHHHHHHVHHPTATAPPNG50
AAPNYGPSAYGQQQPTQHHHASAQP60HHAASQQHQYLGHHQYSSNYQYYPLPSQDVHGLST70
TADGQPPPPPTLLQAPCP80PPQTHEDSPKSSSPGQGH90QHLQGPDDSDHDTLDEDELLLMDDNS100
130 140 150 160 170 180
SPLTIDESSES190GD200RVIY210PWMR220KIHVA230Y240NGTYQPGMEPKRQRTAYTRHQILELEKEFHFNK250
YLTRRRRIEIAHTLCLSER260OIKIWFQ270NR280RMKFKKDNKLPNTKNVRRKNGQAPPVKKSSRA290
RGGNGGGSERRRSQDILGTTTGNISEDGHTASVLGGNELGSNTPGQQHSLSSAAAAYPPP300
310 320 330 340 350 360
PSLAALGHHLTPLQPATLHAACGPLHQPPISIKNSDYGLTAL370
380 390 400

```

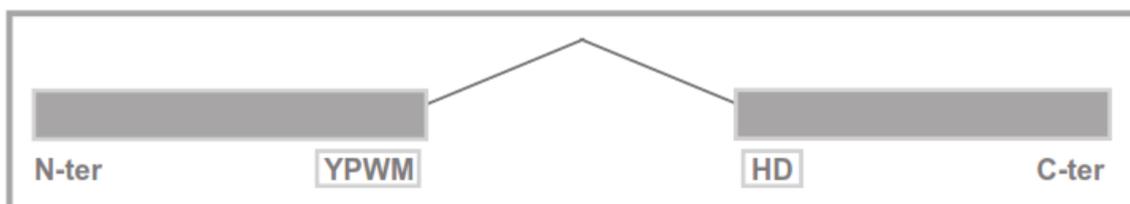


Fig.2.5. Estructura de *Rp-dfd*. Está distribuido en dos exones de 619pb y 590pb respectivamente, en los ORF -1 y -3 del *supercontig* GL563083, separados por un intrón de ~43Kb (43.315pb). El primer exón contiene el motivo YPWM y el segundo contiene el HD completo.

Ortólogo del gen *sex combs reduced (Rp-scr)*¹²: contiene la secuencia proteica de 338 residuos:

```

MSSYQFVNSLASCYQQGAGGGQRSASPVEQHGHPQSPASEEYYSNVNYPGGCYSPQQYPG
 10      20      30      40      50      60
QYMQQSPSAMMDYTQLHTAAQQHQRLATHLQPLAGHHGVSPGAVSPILKNNNTTVTNLS
 70      80      90     100     110     120
NSTSCKFADSAASAAGGAANGLGSPQDLTTTSVPGRTSPPLVKTSLHSPSNPSSRTPSS
130     140     150     160     170     180
GVQPASHTSSSPASSTSSSTSPGGGGGGGGSGGGSTSSAKTPAGNPPQIYPWMKRVHLGQS
190     200     210     220     230     240
*****
TIVNANGETKRORTSYTRYOTLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFONRR
 10      20      30      40      50      60
MKWKKENKMASMNVIPYHYHMSQPYANPYQFTHLTT
 70      80      90

```



Fig.2.6. Estructura de *Rp-scr*. Está distribuido en dos exones. El primer exón es de 724pb y se encuentra en el ORF+2 del *supercontig* GL557615. El segundo tiene 293pb y está en el ORF-3 del *supercontig* GL546178. El primer exón contiene el motivo YPWM y el segundo contiene el HD completo. El intrón de longitud desconocida (mayor a 11kb) se indica con línea de puntos.

Cada exón está en un *supercontig* diferente, por este motivo, la longitud de la región intrónica no se pudo determinar. Asimismo, dada la imposibilidad de hacer el *splicing* teórico debido a las limitaciones del *software*, en la secuencia anotada se pierde un residuo Serina correspondiente a la región de empalme. Aquí se muestra como una S subrayada y en rojo. Los asteriscos señalan la partición de la secuencia.

Ortólogo del gen *antennapedia (Rp-antp)*: contiene la secuencia proteica de 324 residuos:

```

MSSYFANSYMPDLRNGGVVSAEHPHQQHYYGAAVVVQGNEDPTACDPTVLRQGI PPHHYG
 10      20      30      40      50      60
GPPTAGQPFPQGMPYPRFPYDRMDIRAAGYYQNMDYRADSEPGSMAGGGGGGGGHMNQAN
 70      80      90     100     110     120
GHQTPVVYASCKLQAAVNGIGGPESPPEMEMSHHPPGHQGHQHHMAPHQHHAQNAQSA
130     140     150     160     170     180
QPPPPNQQHMMYNSQPPPQAPAHHPQQVQVQPPPNQQAANNNNNSNLPSPLYPWMRSQ
190     200     210     220     230     240

```

¹² La secuencia de *scr* se dedujo en el marco de mi tesina de graduación (Esponda-Behrens, 2008), donde hice un exhaustivo análisis. La etapa de anotación y los ensayos experimentales se hicieron en el marco del presente trabajo.

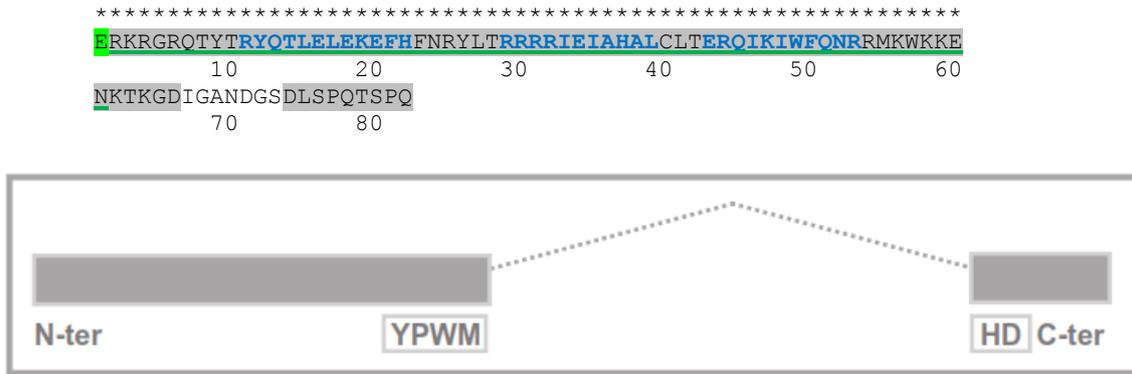


Fig. 2.7. Estructura de *Rp-antp*. Está distribuido en dos exones. El primer exón es de 726pb y se encuentra en el ORF -3 del *supercontig* GL546322. El segundo tiene 249pb y está en el ORF+3 del *supercontig* GL563182. El primer exón contiene el motivo YPWM y el segundo contiene el HD completo. El intrón de longitud desconocida se indica con línea de puntos.

Cada exón está en un *supercontig* diferente, por este motivo, la longitud de la región intrónica no se pudo determinar.

Ortólogo del gen *ultrabithorax (Rp-ubx)*: contiene la secuencia proteica de 311 residuos:

```

MNSYFEQTGFYGSHHHQS TTAHHHDQTAAAYRFPLGLGMSPYASSQHSHHHSLHQSRPP
      10      20      30      40      50      60
QDSPYDASVAAACKLYSSNENQTSVNYSTTAKPDCSKTEGGAPAHQNGYAAVVAAAANK
      70      80      90      100     110     120
DVWQSASAASTPSSSTNPLVRPSACTPDTRYLGDTAGGSPGSASRTSSSSLAPASWNQCSI
      130     140     150     160     170     180
NTAAQPPVGTQLHQQAGNHTFYPWMAIAVEFFVLGANGLRRRGRQTYTRYOTLELEKEE
      190     200     210     220     230     240
HTNHYLTRRRRIEMAHALCLTEROIKIWFONRRMKLKKKEIQAIKELNEQEKQAQAQAAA
      250     260     270     280     290     300
AAALVAQQQDH
      310
  
```



Fig.2.8. Estructura de *Rp-ubx*. Está distribuido en dos exones de 628pb y 308pb respectivamente, en los ORF -2 y -1 del *supercontig* GL563083, separados por un intrón de ~433Kb (433.342pb). El primer exón contiene el motivo YPWM y el segundo contiene el HD completo.

Ortólogo del gen *abdominalA* (*Rp-abdA*): contiene la secuencia proteica de 350 residuos:

```

MSKFIIIDSM LPKYHQYHHQLLN PVIITSSSSDSSAVNYSSTASANN SSSSSSSPPPSLV
 10      20      30      40      50      60
SSASRMYPYVHHHGGQQAGLAAFAAGSPATMGAFSSPSSALAAVVDAATGGDKSCRYTGN
 70      80      90     100     110     120
VPTPDSMVNYSLHHQNGASAAVSVAASASMAAAAQFYHQAAAASADPLSSCTTQVANAAT
130     140     150     160     170     180
GQPMPDIPRYPWMSI TDWMSPFDRVVC GMLPGPNGCPRRRGRQTYTRFQLELEKEFHFN
190     200     210     220     230     240
HYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRMRMKLKKELRAVKEINEQARREREEQDRMNKE
250     260     270     280     290     300
KQAKLEQQAAAGVQAPPPGAHHVLHDPHKLMSGLDKGGDLLKAVVTKVPT
310     320     330     340     350

```



Fig.2.9. Estructura de *Rp-abdA*. Está repartido en tres exones de 589pb, 33pb y 431pb respectivamente, el primero contiene el motivo YPWM y el tercero contiene el HD completo. Los dos primeros exones (gris claro) no figuran en el genoma pero sí en las trazas y en las primeras versiones del ensamblado. Por este motivo, sólo se anotó el tercer exón –con la correspondiente aclaración–, presente en el *supercontig* GL563083. Los intrones de longitud desconocida se indican con línea de puntos.

Ortólogo del gen *abdominalB* (*Rp-abdB*): contiene la secuencia proteica de 367 residuos:

```

MMNGNISYEEQPVLPPPTLTPIKTSPTSSTPVTSSSASSTSPVASQTGPLHIPAKRLGYE
 10      20      30      40      50      60
CVEPAGPGVIRHAHGSQPWNYSVDTHHASPFDQYAQPTYYNIPDSRDRKSGLFWNPA
 70      80      90     100     110     120
SATGQDYKYTSTMTPGTSTPEPPVSTCHQSFSQSWCNYVPYTTASRHHVDGHHQSSVPYLS
130     140     150     160     170     180
PADRRRVSAMVESTPFTHDTYNPLRNYPAPFPVSTPYPPPG
190     200     210     220
*****
AASLTGVNMSSMGVSNPLEWTGQVT VRKKRKPYSKFQLELEKEFLFNAYVSKOKRWEL
 10      20      30      40      50      60
ARNLNLTERQVKIWFQNRMRMKNNQRQAAQQNNNNNSANANHHGGGAGAGGAAVGT
 70      80      90     100     110     120
HHGAAAHHVVTAHHPATNGALKHHQ
130     140

```



Fig.2.10. Estructura de *Rp-abdB*. Está repartido en dos exones de 666pb y 351pb respectivamente, separados por un intrón de longitud desconocida. En base a las trazas y primer ensamblado se pudo determinar una posible secuencia completa para el gen, sin embargo en la versión 2.0 sólo se encuentra el primer exón, que fue el único anotado. El exón faltante se esquematiza con un gris más claro. No se encontró motivo YPWM en este ni en sus ortólogos en *Nasonia vitripennis* y *T.castaneum*. El intrón de longitud desconocida se indica con línea de puntos.

La anotación de *abdominal B* tuvo sus particularidades, debido a que se encontraron informaciones incongruentes. Más adelante, en la sección **C.2.2** se discute el caso con mayor detalle.

Ortólogo del gen *caudal (Rp-cad)*: contiene la secuencia proteica de 237 residuos:

```

MYYPQYNVYKPGWYGPTNGYCTSNVQHATAQGSTFCMH EEQAAWAGQLLQTNATIPSH
   10           20           30           40           50           60
LHHHVNHNASGPPASLANPTANNPPVTELWEDQTVLTATS AVTSALSTSPSLQQGAQLHN
   70           80           90          100          110          120
TCSAQIVDHHIRAQPPRS PF EWMKKPSYQSQPN PCKTRTKDKYRVVYTDHQRLELEKEFH
  130          140          150          160          170          180
YSRYITIRKAE L ATLLGLSERGVKIWFONRRAKERKQMKKREELIHKEKMQQLAML
  190          200          210          220          230
    
```

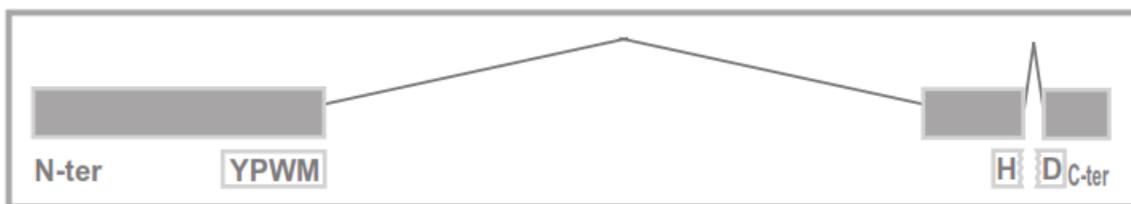


Fig.2.11. Estructura de *Rp-cad*. Está distribuido en tres exones de 463pb, 146pb y 105pb respectivamente; todos en el ORF+3 presente en el *supercontig* GL562574 y separados por intrones de ~82Kb (81.957pb) y 648pb. El primer exón contiene un motivo YPWM modificado y el HD está repartido en los dos últimos exones.

Resulta difícil determinar teóricamente si esta secuencia está completa, ya que, más allá de la región conservada central que contiene el HD y sus flancos, no se encontraron motivos conservados importantes en los extremos amino y carboxilo. Es

más, faltan dos pequeños motivos del N-terminal –MVSYYXXXMY está muy modificado: M--YYXXXXXY; PXITVSGS(E/D)(I/M)SSPG está ausente–, pero estos motivos no están presentes en todas las secuencias comparadas. El primer consenso también tiene variaciones en *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) y *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758). El segundo consenso está ausente en *A.mellifera* y *B.mori*. Por otra parte, los tres exones contienen parte de la región central conservada y son identificados por el BLAST como *caudal* (o su ortólogo en vertebrados *CDX-1*), incluso si se los analiza por separado. No se descarta la existencia de exones adicionales o alternativos en el amino terminal. Tampoco se descarta un posible exón adicional en el carboxilo terminal, ya que algunos de los ortólogos tienen extremos más largos. Finalmente, los datos experimentales expuestos más adelante, agregan evidencia de actividad *caudal*.

Ortólogo del gen *apterous1* (*Rp-apt1*): contiene la secuencia proteica de 171 residuos:

```

ENCAGCHSRITDRFYLLAVDRQWHVGCQCSECKLSLDTEVTCYSRHGNIYCKHDYYRLF
      10      20      30      40      50      60
GVRRCSRCGTGISSTELVMRARGEVFLHCFACCTCGVLLTKGDMFGMRAGSVYCRPHYE
      70      80      90      100     110     120
LLPPPDIVDRPISPAWAAKGRPKR
      130     140
*****
DLNAESYLDVAFGPGT PGLGSANGSHHQRTKRMRTSFKHHQLRTMKS YFQINHN PDAKDL
      10      20      30      40      50      60
KOLSOKTGLPKRVLQVWFONARAKWRRLVKQEGNGGGGSIKGEKLGETALDGYHHGGAL
      70      80      90      100     110     120
GPHGASPTHYLS P S P L E C S S
      130     140

```

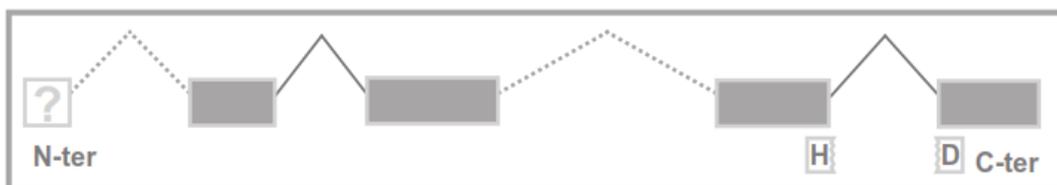


Fig.2.12. Estructura de *Rp-apt1*. Está distribuido en al menos cuatro exones de 172pb, 264pb, 224pb y 198pb; los dos primeros ubicados en los ORF +3, +1 del *supercontig* GL563109 y separados por un intrón de 14.131pb; y los dos últimos en los ORF -2 y -3 del *supercontig* GL561001, separados por un intrón de 26.801pb. El bloque blanco con un signo de interrogación simboliza un exón teórico no encontrado en el genoma. Los intrones de longitud desconocida se indican con línea de puntos.

La secuencia está repartida en al menos dos *supercontigs* diferentes; probablemente en tres, ya que la región coincidente con la M1 no se encontró. La primera parte estaba contenida en la predicción RPTMP03945; sin embargo esta predicción no se ajustaba a lo esperado, ya que implicaba inicio y fin de transcripción no coincidentes con *apterous1*. El final de transcripción probable está en el segundo *supercontig*, en el cuarto exón descrito.

Ortólogo del gen *apterous2 (Rp-apt2)*: contiene la secuencia proteica de 130 residuos:

```

MIHGGDVTSSMESLSYDSSATSPSMPQQRTKRMRTSFKHHQLRTMKSYFAINQNPDAKDI
    10          20          30          40          50          60
KOLAOKTGLSKRVLVWFONARAKWRRNLMRQEGGNTVTCPPQPPPLIVTETVTSLEDLHH
    70          80          90          100         110         120
QQGLSFADIY
    130
  
```

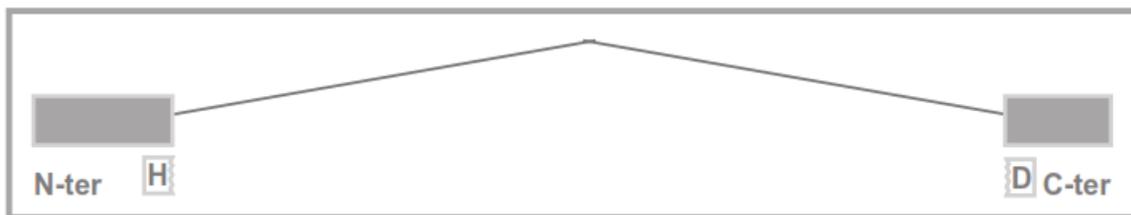


Fig.2.13. Estructura de *Rp-apt2*. Está distribuido en dos exones de 225pb y 168pb respectivamente, en el ORF -1 del *supercontig* GL561501, separados por un intrón de ~3,7Kb (3.690pb). El HD está repartido entre los dos exones.

Ortólogo del gen *six1/sine oculis (Rp-six1/so)*: contiene la secuencia proteica de 196 residuos:

```

MLGSHHSPTTGVLPSPFGFTQEQVACVCEVLQQAGNMDRLGRFLWSPACEKLHNNESVLK
    10          20          30          40          50          60
AKAMVAFHRGNFKELYRILESHQFSPHNHAKLQALWLKAHYVEAEKLRGRPLGAVGKYRV
    70          80          90          100         110         120
RRKFPLPRTIWDGEETS YCFKEKRSRSLRDWYAHNPYPSPREKRELAEATGLTTTQVSNW
    130         140         150         160         170         180
FKNRRQRDRAAEHKDG
    190
  
```

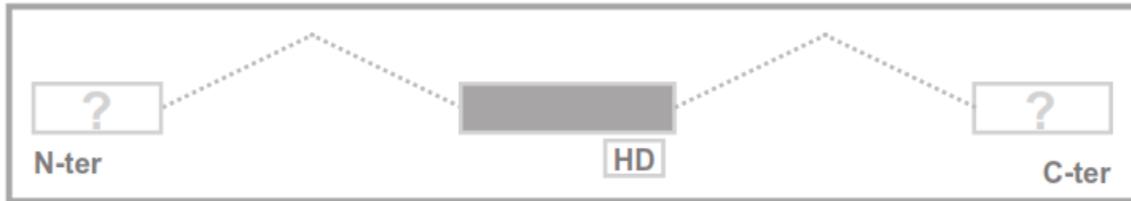


Fig.2.14. Estructura de *Rp-six1*. El gen contiene una gran región central conservada comprendida por el homeodominio y sus adyacencias. Esta región coincide con el único exón encontrado en el *supercontig* GL562733, de 587pb. Sin embargo, de la comparación con ortólogos de otros insectos –*T.castaneum*, *A.mellifera*, *D.melanogaster*– se desprende que probablemente falten sendas regiones N y C-terminales no conservadas, que sólo se podrán determinar experimentalmente y están representadas por bloques blancos con signos de interrogación. El HD se encuentra completo en el único exón anotado.

Ortólogo del gen *six3/optix*: contiene la secuencia proteica de 231 residuos:

```

MALGLGTSLPPPHPLPAPMFALPTLNFTVSQVAAVCETLEESGDIERLARFLWSLPVAHP
  10      20      30      40      50      60
NINELNKNEAVLRARAIVSYHSGNFREMYSILEHHKFTKDSHGKQLQAMWLEAHYQEAELI
  70      80      90     100     110     120
RGRPLGPVDKYRVRKFFLPRTIWDGEQKTHCFKERTRSLLREWYLODPYPNPTKKRELA
 130     140     150     160     170     180
QATGLPTQVGNWFKNRRQRDRAAAAKNSYYEKILTAAETLALTNKPNGV
 190     200     210     220     230
  
```



Fig.2.15. Estructura de *Rp-six3/optix*. Está distribuido en dos exones de 626pb y 70pb respectivamente, en los ORF +1 y +2 del *supercontig* GL563033, separados por un intrón de ~1Kb (1.147pb). Aparentemente está completo, aunque el C-terminal no conservado no permite establecerlo con certeza; el segundo exón se mantuvo en base a la sugerencia del *software*.

Ortólogo del gen *six4*: contiene la secuencia proteica de 198 residuos:

```

QVAARYKSEFGKRGVSTFPEQVSTVCDALQQSGDCEKLARFLWSLPPNELLRGHEAVLRA
  10      20      30      40      50      60
RALVAYHRGAFHELYAILESHVFDQRYHNELQQMWFKAHYREAEKIRGRPLGAVDKYRLR
  70      80      90     100     110     120
KKYPLPKTIWDGEETVYCFKEKSRNALKECYERNRYPTPDEKRALAKRTGLTLTQVSNWF
 130     140     150     160     170     180
KNRRQRDRTPOQRRLVTC
 190
  
```



Fig.2.16. Estructura de *Rp-six4*. Está distribuida en dos exones de 257pb y 337pb respectivamente, en los ORF +2 y +1 del *supercontig* GL562865, separados por un intrón de ~7Kb (7.346pb). Los extremos N y C-terminales no son conservados, pero en los ortólogos comparados son extensos, por lo tanto es posible que existan al menos dos exones adicionales.

Ortólogo del gen *homothorax (Rp-hth)*: contiene la secuencia proteica de 412 residuos:

```

PHLNHGLHYFPFGNHVSPASNHVMGAVPDVHKKRDKDSIYGHPLFPLLALIFEKCELATCT
    10      20      30      40      50      60
PRDPGVAGGDVCSSESFNEDIAIFSKQIRQEKPYIADPEVDSLMVQAIQVLRFHLLLELE
    70      80      90     100     110     120
KVHELCDNFCHRYISCLKGKMPIDLVIDERESSKPLAELGTPANGNDGRSNADSTSHTDG
    130     140     150     160     170     180
ASTPDVRPPSSLSYPGHGNEVDVRSPGSGGTPGPLSQVSASQQLDHSDPGKWCGRREWPS
    190     200     210     220     230     240
PAEARAASDAARRGVLYSSVFLGSPGDASNASIGSGEGTGEEDDESNGKKNQKRGIFPK
    250     260     270     280     290     300
VATNILRAWLFOHLTHPYPSEDOKKQLAODTGLTILOVNNWFINARRRIVOPMIDQSNRA
    310     320     330     340     350     360
VYSPHAGPSGAYSPEAAGMGYMMDGQMMHRPGDPAFHSEYHYPPQYYGHHL
    370     380     390     400     410
    
```



Fig.2.17. Estructura de *Rp-hth*. Está distribuido en once exones de 119pb, 142pb, 51pb, 51pb, 195pb, 130pb, 108pb, 149pb, 77pb, 59pb, y 158pb respectivamente, en los ORF -1, -1, -1, -2, -2, -2, -2, -3, -2, -3, -1 del *supercontig* GL562732, separados por intrones de ~16Kb, ~12Kb, ~18Kb, ~2Kb, ~30Kb, ~49Kb, ~19Kb, ~22Kb, ~105Kb y ~5Kb. El gen está prácticamente completo, con una amplia región conservada completa, incluyendo el extremo C-terminal. Falta una región N-terminal que no fue posible encontrar y está representada mediante un bloque blanco con un signo de interrogación. El HD está repartido en tres exones.

Ortólogo del gen *extradenticle (Rp-exd)*: contiene la secuencia proteica de 385 residuos:

```

MDDQNRMMHPVPGQVGMPLPQGYGMQPVDPNHGAPATPDQETRKQDIGEILQQIMNITDQS
  10      20      30      40      50      60
LDEAQAARKHTLNCHRMKPSLFSVLCEIKEKTVLSLRNTQEEEEPPDPQLMRLDNMLIAEGV
  70      80      90     100     110     120
AGPEKGGVSAAAAAASAAAASGOVQDNAIEHSDYRAKLAQIRQIYHQELEKYEQA CNEFT
 130     140     150     160     170     180
THVMNLLREQSRTRPITPKIEIERMVQI IHKKFSSIQMLKQSTCEAVMILRSRFLDARRK
 190     200     210     220     230     240
RRNFSKQASEILNEYFYSHLSNPYPSEEAKEELARKCSITVSOVSNWFGNKRIYKKNIG
 250     260     270     280     290     300
KAQEEANLYAAKKAAGASPYSMGPGSQGTATPMMSPAPPGAPQDSMGYSIGINGGDYSS
 310     320     330     340     350     360
PMSAAQT PYS DGS LGYE GMH QSLSP
 370     380
  
```



Fig.2.18. Estructura de *Rp-exd*. Está distribuido en 9 exones de 200pb, 73pb, 249pb, 191pb, 136pb, 97pb, 152pb, 45pb y 15pb, respectivamente, en los ORF+1, +2, +3, +2, +1,+3, +2, +2 y +3 del *supercontig* GL563079, separados por intrones de 476pb, 709.106pb, 4.451pb, 6.752pb, 1.232pb, 4.376pb, 366pb y 38.629pb.

Ortólogo del gen *sloppy paired (Rp-slp)*: contiene la secuencia proteica de 317 residuos:

```

MVKMETQPQPISGRTPPKSFSISSLPETA SRPPSPVSDCPPNSFSETSDAE SDDLVTGG
  10      20      30      40      50      60
STPPPLDCSTKLKRDDDKPEEKKKNEKPPYSYNALIMMAIRQSPEKRLTLNGIYEYIMTN
  70      80      90     100     110     120
FPYYRDNKQGWQNSIRHNLNLNKCFCVKVPRHYDDPGKGNWMLDASSEDVFIGGTTGKLR
 130     140     150     160     170     180
RRSTAASRSLAFAFKRSVVLGGLYPPFP GAPLYGFLQQLYCAPLYPRYAPYPSPYSTAAA
 190     200     210     220     230     240
VSTIPQIPKPAPTHGFSVERLLSPGESTRAALYPNYELYAALRHQTPPTAASTGVVNGEP
 250     260     270     280     290     300
RPSTLYKPVTVLARPAS
 310
  
```



Fig.2.19. Estructura de *Rp-slp*. Está contenido en un exón único de 954pb, en el ORF -1 del *supercontig* GL562486.

Ortólogo del gen *cut* (*Rp-cut*): contiene la secuencia proteica de 1.157 residuos, más 255pb correspondientes al N-terminal:

```

ISQLLEDVQRLQNSIGKIQENSANQIARLEEELEHKRQHTCRLEARLEAQKDYNELKRQ
 10      20      30      40      50      60
VSNLRGEDMCKQEPEKCPSELAKPPPSITPSEVQSKKIYLISRSDS SDVPTLHNVETFG
 70      80      90     100     110     120
SFLGEEIVANWRRSVERTIVSQSARPTPPPNTWPGQYEGRLKIKGTSKVKSEEPRE RDGD
130     140     150     160     170     180
KGS PAGEDVPLVNGT SRLN NNVL P AGGPLNLNDVIKSPFRFDDRSPFRLEDPGCMVGRFGE
190     200     210     220     230     240
SLIPKGDPMEARLQEMLRYNMDKYANQNLDTLSTIARRVRELLSIHNVGQRLF AKYVVLGLS
250     260     270     280     290     300
QGTVSELLSKPKPDKL TEKGRDSYRKM HAWACDENAVLLKSLIPKKGKDSGGGVSVLA
310     320     330     340     350     360
GRGAEAE MTEERIAHILSEASHMMK PQHPEDTHSNDDSKSPNHP OSSESPLGRDNSQNR
370     380     390     400     410     420
LKKYENDDISQEQV VRIYQ EELAKLMGR RLEDQPPFGIVFP HFLSSGGSGEDVRIAMDAY
430     440     450     460     470     480
QRELAKLNAGPPG PLHHP LAALHAQSLQAAHNGIAQDLSLPKPIKREKSATGSSDDDK
490     500     510     520     530     540
EDQRHGSGS AFSLVRPKMEFGK LNEVLEIGSPLGNVILPPEDVGN GSGAAAVSPLQMA
550     560     570     580     590     600
SITNALISQPPSQHHHSPQRPLKAVLPPI TQQQFDQFNNLNTEEIVQQLSQFSISQRLF
610     620     630     640     650     660
GESVLGLSQGSVSDLLARPKPWHMLTQKGREPFIRMKMFLEDENAVHKLVASQYKIAPEK
670     680     690     700     710     720
LMRTGGYGINPSSSRPARSWFGMMEL LAWSKTISLQQFLRSYLHNSGMHIAQQHTPAPP
730     740     750     760     770     780
PVSPLTPPDVKKCILPPQGSQSTACHTPVSMQQYPGAPAALKSLPQVSPSVYEMAAL TQ
790     800     810     820     830     840
DLDTQSITTKIKEALLANNIGQKIFGEAVLGLSQGSVSELLSKPKPWHMLSIKGREPFIR
850     860     870     880     890     900
MQLWLSDSNNIDK LQAIKTERRELNKR RRGSGQODNSDTSSNDTSEFYHSGGAGSPPS
910     920     930     940     950     960
AKKHRVFFSEEQKEALRLAFALDPYPSL ATIEFLANELSLVSR TITNWFHNRMLKQSP
970     980     990     1000    1010    1020
QGELSREGQSGFDPVQFRILLSQRLGLPLPFPAPFFHSTAE LSGAMSRGELGSEFEET
1030    1040    1050    1060    1070    1080
ESQAGSEDSFSGMTESSSRVNPEPRASRRKPAAPQVWNPDWQQQEPEVIINGVCVMRTED
1090    1100    1110    1120    1130    1140
FDREGREETVRVEPTPV
1150

```

Se encontró esta región correspondiente al gen *cut*, coincidente con una predicción, con grandes regiones conservadas, pero incompleta. La zona codificante está flanqueada a ambos lados por regiones de incertidumbre y, por motivos que explico a continuación, considero que hay un error en el ensamblado y que esa región está ubicada en el lugar correcto, pero invertida.

Falta el extremo N-terminal con zonas conservadas y muy probablemente falta una región C-terminal. Esta última, en la mayoría de los ortólogos analizados, termina con

el motivo W D/E Y¹³. En el genoma ensamblado de *Rhodnius*, no se encontró esta secuencia cerca de la zona codificante y, por tratarse de una secuencia tan chica, no es posible predecirla sin mayores datos. Es bastante probable que caiga en una de las regiones de incertidumbre que flanquean la zona.

Respecto al extremo N-terminal, se hizo una segunda búsqueda y se encontró un N-terminal muy conservado, posiblemente completo, muy similar al de *A.pisum*. Sin embargo, está ubicado en la cadena y sentido opuestos. Mientras que la mayor parte del gen se encuentra en la cadena (-), el N-terminal se encontró en la cadena (+) y ubicado *upstream* respecto del resto, es decir, del modo que se muestra en la Fig.2.20, debajo de la estructura génica. La secuencia identificada como N-ter, no coincide con ninguna predicción y es la siguiente:

```

MDIHGMQSMDWLFKKERIYLLAQFWQQRATLAEKEVSALKEQLAVASSGQAGPDAKMAS
      10          20          30          40          50          60
QLSQGSDEVITRSSI EELLSAKDKE
      70          80
  
```

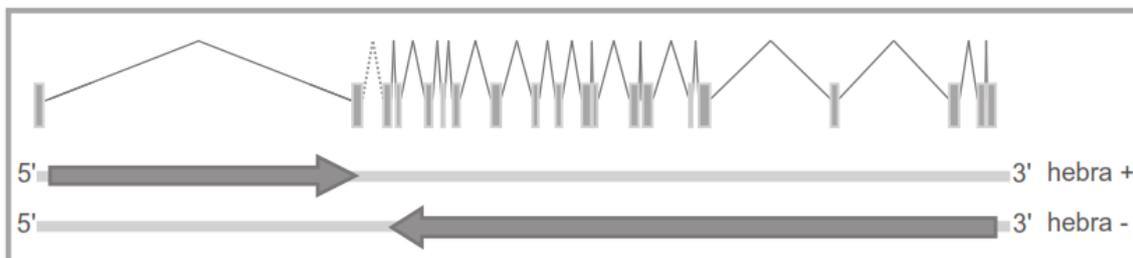


Fig.2.20. Estructura de *Rp-ct*. Está contenido en 20 exones de 81pb, 174pb, 185pb, 134pb, 180pb, 87pb, 187pb, 272pb, 170pb, 155pb, 236pb, 105pb, 231pb, 256pb, 56pb, 305pb, 189pb, 266pb, 185pb y 242pb; separados por intrones de ~125,6kb, N pb, 125pb, 669pb, 255pb, 243pb, 855pb, 835pb, 488pb, 576pb, 48pb, 903pb, 111pb, ~1kb, 166pb, ~3,3kb, ~3kb, 519pb y 45pb. Los exones ubicados en la cadena minus se corresponden con una predicción. Todas las secuencias encontradas están en el *supercontig* GL563077, comprendiendo una zona total de ~180,4kb. El intrón de longitud desconocida se indica con línea de puntos.

¹³ En *Acyrtosiphon pisum*, un áfido, que es la especie más cercana de la cual tenemos datos, el final no está conservado; sin embargo, por tratarse de una secuencia teórica, es posible que esto se deba a un error en la predicción.

Ortólogo del gen *PBX/knotted 1 homeobox 2 (Rp-pknox2)*: contiene la secuencia proteica de 434 residuos:

```

MQENSIAMVSPDNIVGTQAGNNIGQDQAVFEADKRAVYKHPLFPLLALLFERCEQATQL
 10      20      30      40      50      60
AETPNSESEFNMDIQAFVQHQERDRKPFVNDAAEIDGLMIKAIQVLRIRHLLLEKVVQELCK
 70      80      90     100     110     120
DFCNRYITALKGKMQSENLLRSDYAAGYLENNNNNSSHSSDSNSPTVFTPHSPHNLQVSP
130     140     150     160     170     180
VGWSGLMGAGGTTGGTPQQAIVAVQHPTAPLSPVCPSPAPAAIHGSTPLSQIGANPCPPP
190     200     210     220     230     240
SHDSSILQGLSATSGGSCDEDDDPLGSRKKQKRGVLPKQATSIMRSWLFQHLVHPYPTE
250     260     270     280     290     300
DEKROIAAOTDLTLLOVNNWFINARRRILOPMLDASTPSDSCNGANTKQSNANKKNKSCN
310     320     330     340     350     360
GTKTSTHRYWSDMSRISVDSTCAFILISNFNYIIGVVRDILLFEIIPDEYLEVWPNN
370     380     390     400     410     420
WPITKRSRSLFDPL
430
  
```



Fig.2.21. Estructura de *Rp-pknox2*. Está en el *supercontig* GL562716 y contiene 8 exones de 119pb; 172pb; 240pb; 214pb; 137pb; 142pb; 129pb y 152pb, separados por intrones de 91pb, 540pb; 1,4kb; 367pb; 90pb; 478pb y 7,8kb.

La predicción muestra dos alternativas de splicing, ambas probables. Las regiones modificadas afectan zonas no conservadas, en este caso muestro una de las posibles isoformas, que considero más probable. En los alineamientos de ortólogos, el extremo C-terminal más allá de la región conservada tiene una extensión de entre 40 y 100 residuos, y contiene el pequeño motivo R F/Y W. Esta región falta en la isoforma de la predicción 2. Sin embargo, la isoforma 1 también presenta una inconsistencia, en este caso por exceso. Se eliminó un primer exón teórico que parece ser innecesario y se respetó como M1 aquella correspondiente al segundo exón (coincidente con la predicción 2), ya que el inicio MQE aparece conservado en la mayoría de los ortólogos observados.

Ortólogo del gen *wingless1* (*Rp-wg1*): contiene la secuencia proteica de 393 residuos:

```

MWSTLVLLTCFYFTLVFCGGHSQNRHRPGRGRGSNWWGIAKAGEPNNLLPLAPGMLYMDP
 10      20      30      40      50      60
TAQSSLRRKQRRILVRENPGVLVAVSKGANMAITECQYQFKDRRWCSTRNFLRGKNLFGK
 70      80      90     100     110     120
IVDRGCRETAFIYAITSAAVTHAVARACAEGSIESCTCDYSHQSKGAPKSSSASTAAVHG
130     140     150     160     170     180
VRDWEWGGCSDNIGFGFKFSREFVDTGERGRSLREKMNLHNNEAGRAHVASQMRQECKCH
190     200     210     220     230     240
GMSGSCTVKTCWMRLPPFRLVGDNLKDRFDGASRVMVSNAGSLRATGGRKSRYNFQPKPY
250     260     270     280     290     300
NPDHKPPGVKDLVYLEPSPLFCERNPRLGIQGTGRQCNATSQVVEGCDLMCCGRGYRTQ
310     320     330     340     350     360
EVVVVERCSCAFHWCCEVKCKLCRTKKTIIHTCL
370     380     390
  
```



Fig.2.22. Estructura de *Rp-wg1*. Está distribuida en 4 exones de 110pb, 263pb, 308pb y 501pb, respectivamente, en los ORF -2, -3, -2 y -1 en el *supercontig* GL562503, separados por intrones de 2.042pb, 31.909pb y 1.345pb.

Ortólogo del gen *wingless2* (*Rp-wg2*): contiene la secuencia proteica de 330 residuos:

```

LTNSFPTNITLHAGTTEKERECQKMSFLRDKORQLCALNENFIHAVSNGVRLAIEECQYQF
 10      20      30      40      50      60
SMIRWNCSTFNNSTSIFGAVTTIKSRETAFVYAVSSAGVAYAVTRACSRGELTECNCDNR
 70      80      90     100     110     120
VRLRKPRKHWQGGCSEDIHFGEKFSRDFVDSQENSETAEGLMNLHNNEAGRELIIRSGMQ
130     140     150     160     170     180
RVCKCHGMSGSCSVRVCWRRLPSFRQVGDLLSARFEGATEVRMVDKRRKRVKLRRAASKG
190     200     210     220     230     240
LKQPNSTELVYLEESPDYCERNETLGLILGTHGRICNRGSPGVDGCRLLCCGRGYQTRVRD
250     260     270     280     290     300
VEEKCKCRFVWCCNVLCEVCRFRKEEHVCN
310     320     330
  
```

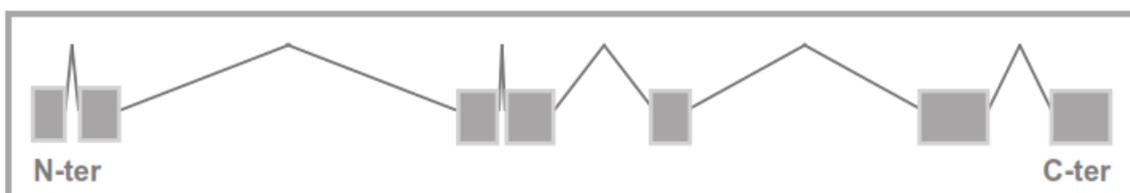


Fig.2.23. Estructura de *Rp-wg2*. Está distribuida en 7 exones de 33pb, 96pb, 121pb 161pb, 108pb, 300pb y 174pb, respectivamente, en los ORF +1, +2, +3,+3,+1, +1, +2 en el *supercontig* GL563069, separados por intrones de 496pb, 3.526pb, 171pb, 1.306pb, 2.613pb y 967pb.

Ortólogo del gen *forkhead1 (Rp-fkh1)*: contiene la secuencia proteica de 300 residuos:

```

NLLDVTDPYADCGDYYSRLKLDVNAIDYQVDLLVAVCTDQNHFGATVKPLDLMTMLSQKL
   10         20         30         40         50         60
YSDTVGSAMTNVNMSPMTSTYNINSMPCVSMNSSPQAGSFSTNMLGPHTGMGMSAMNG
   70         80         90        100        110        120
NCMSSSSMGYGNMNTVSNCMNINAYQMSTGLQNREAIGETVSPSSVAALQRARTDKSYRR
  130        140        150        160        170        180
SYTHAKPPYSYISLITMAIQNSPTKMLTLSEIYQFIMDLFFPYRQNQRWQNSIRHLSLF
  190        200        210        220        230        240
NDCFVKVPRTPDKPGKGSFWTLHPDSEYVQNIYRSTNDVYNSCTVISYMHKIVIESKFD
  250        260        270        280        290        300
    
```



Fig.2.24. Estructura de *Rp-fkh1*. Está distribuida en 4 exones de 31pb, 124pb, 644pb y 104pb, respectivamente, en los ORF +2, +1, +1 y +2 en el *supercontig* GL563045, separados por intrones de 28.481pb, 123pb y 5.452pb.

Hasta el momento, se respetó la predicción existente, se determinó la identidad de la secuencia mediante BLAST y no se hicieron ajustes adicionales.

Ortólogo del gen *forkhead2 (Rp-fkh2)*: contiene la secuencia proteica de 194 residuos:

```

MRVEREPEPVYPRYEKPPYSYIALIAMAISSPEQRLTLSEIYRYIIIEHFPYYRENKQG
   10         20         30         40         50         60
WQNSIRHNLSLNDCFVKVPRERGDGGGKGSYWTLDPVAANNMFERGNRYRRRPKKHRDLL
   70         80         90        100        110        120
PQMNIEHSPYDHVSRSSVITSSSKPNIITIEISTDPANKVTLTTSQSPVNDKKITVFSIE
  130        140        150        160        170        180
NLIKSSSEAIKTEQ
  190
    
```

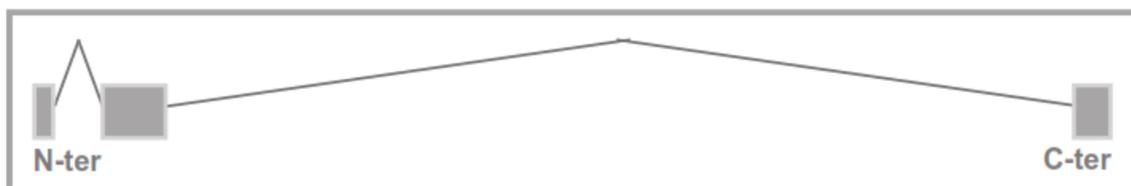


Fig.2.25. Estructura de *Rp-fkh2*. Está distribuida en 3 exones de 3pb, 363pb y 219pb, respectivamente, en los ORF -1, -2 y -2 en el *supercontig* GL563091, separados por intrones de 437pb y 6.495pb.

Por el momento, se respetó la predicción existente, se determinó la identidad de la secuencia mediante BLAST y no se hicieron ajustes adicionales.

Otros tres genes anotados no están directamente relacionados con este trabajo: ***araucan (ara)***, ***tailup (tup)*** y ***latrophilin3*** (ver detalles en el **ANEXO IV**).

Muchos de los posibles genes aún no han sido procesados para la anotación. Se han identificado secuencias totales o parciales de factores de transcripción similares a:

even skipped (eve) y ***engrailed (en)***: aparecen en este grupo debido a su estructura. Lo mismo ocurre con ***ortodenticle (otd)***; que coincide con la predicción RPTMP08830, con dos alternativas de transcripción. Estos tres genes fueron anotados por el Dr. Andrés Lavore.

HOX3/zerknült (zen): sólo se encontró un exón que contiene la región central con el homeodominio conservado; los extremos N- y C-terminales no tienen motivos conservados; no hay transcritos, EST ni predicciones, por lo tanto no es posible hacer una aproximación a la secuencia completa. *zen* pertenece al grupo estudiado por la Dra. Lucía Pagola y fue analizado por ella en su tesis doctoral (**Pagola, 2012**). En este trabajo aparece por su estructura con HD y por su presencia dentro del *cluster HOX*.

polycomb: dos exones con motivos conservados pertenecen a este gen.

notch: es un gen que codifica una proteína muy grande y conservada, habitualmente repartida en muchos exones. Hasta el momento, hay 12 exones identificados de la región N-terminal, correspondiente a aproximadamente la mitad de la proteína.

delta: también se trata de una proteína grande, se encontraron 3 exones correspondientes a este gen. Notch, Polycomb y Delta no son proteínas con homeodominio pero son importantes genes del desarrollo, por eso despiertan interés; especialmente como posibles partícipes del reloj molecular que determina la segmentación secuencial.

retinal homeobox-like (rx-like): existen predicciones que resultan muy similares a ***rx1-like*** y ***rx2-like***.

aristalless (al): una secuencia identificada como *aristalless* corresponde a una región C-terminal y contiene sólo parte del HD. Por otro lado, se encontró un exón muy similar a *aristalless* en otro *supercontig*. No hay predicción sobre esta región y no se encontró un posible N-terminal en una búsqueda rápida. El BLAST lo identifica como ***aristalless-related***, ***ebx*** o ***rx***. En base a su ubicación parece probable que se trate de parte de *rx*, de un exón alternativo o de una duplicación del mismo.

paired-like o similar a *rx*: coincidiendo con una predicción.

caudal2: se identificó una secuencia con homeobox en la trazas, el BLAST la señala como similar a *cdx*, aunque su similitud es menor que la del gen identificado como *caudal* en esta tesis. En el genoma ensamblado no está presente esta secuencia.

ceh19: se encontró un posible Ortólogo. En ese mismo *supercontig* se encontraron también varias predicciones para proteínas transmembrana que no son de interés para este trabajo.

barH-like: se encontraron dos posibles regiones para un ortólogo de *barH*.

gastrulation brain homeobox protein (gbx) / unplugged (unpg): se encontraron dos exones para una región homeodominio muy similares a *gbx*.

diencephalon/mesencephalon homeobox protein 1-B-like: se encontró una proteína que inicialmente fue identificada como *paired related*, pero luego se extendió la secuencia, y resultó ser muy similar a una proteína predicha y no caracterizada en muchos organismos. En este caso, el *software* la predijo como dos proteínas distintas, quedando el homeobox repartido entre ambas. La secuencia más similar y la única con nombre asignado pertenece al áfido *Acyrtosiphon pisum*.

E75a: es un gen de regla par en *O.fasciatus* y se encontró una secuencia muy similar en *R.prolixus*.

paired mesoderm 2B: una secuencia con homeobox coincide con una predicción. También se encontraron secuencias similares a varios diferentes genes tipo **Lim**; una secuencia similar a **Unc-4 (paired-type)**. Se encontraron predicciones para **H2.0-like**, y para una proteína predicha en varios otros organismos pero generalmente no caracterizada que puede ser **pit1/ptx**.

Mediante búsquedas de pequeñas regiones similares a las hélices 1, 2 o 3 (H1, H2, H3) del HD, se detectaron algunas secuencias cortas; entre ellas exones muy similares a **maleless**, **otp (orthopedia)**, **rabconectina**, **pou domain/drifter/cf-1a**, **ventral veins lacking**, **slouch**, **zag-1**, **alpha-fetoprotein enhancer binding protein/zfh4**, **arrowhead/lim** y algunas de identificación muy dudosa, que podrían corresponder a **ceh16**, **extra extra**, **HOX13**, **HOX2**, **nanog**, **NK-like**, **nobox (new born ovary Homeodomain-protein)** y homeoboxes predichos para otros organismos pero

aún no descriptos. **precursor de β -N-acetilglucosaminidasa (NAG2)** tiene un motivo similar a H3 de un homeodominio, por este motivo apareció en la búsqueda.

Y, finalmente, un homeobox al cual no se le encontró un posible ortólogo en artrópodos pero que aparece como similar a **MAB-5** del Nematode *Pristionchus pacificus* y a genes *HOX* de cordados, especialmente a **HOXB7** de vertebrados. Esta proteína también aparece como transcripto predicho en su correspondiente base de datos; posiblemente se trate de una duplicación propia del grupo a partir de un *HOX* canónico.

C.2.- Observaciones sobre el genoma de *Rhodnius prolixus*

En primer lugar, un punto interesante a destacar como particularidad del genoma de *R.prolixus*, es que las regiones codificantes están muy dispersas y distantes entre sí. Tal es así, que no es raro encontrar intrones de cientos de kilobases, como puede verse en los genes detallados en apartados anteriores. Destacado esto, lo que sigue son observaciones respecto al resultado de la secuenciación genómica, la técnica y sus limitaciones.

C.2.1.- Estado del genoma secuenciado de *Rhodnius prolixus*

La versión final del genoma (versión 2.0) consta de aproximadamente 50.000 *supercontigs* de longitudes muy heterogéneas que varían en sus órdenes de magnitud. Entre los *supercontigs* analizados para el armado del *cluster HOX*, el *supercontig#8957* (GL546322)¹⁴, tiene 13.911pb –i.e., ~13Kb– y el *supercontig#17962* (GL563083) tiene 2.647.901pb –i.e., ~2Mb–.

Dentro de cada uno, existen vastas regiones de incertidumbre, es decir, donde la secuencia no se pudo determinar y permanece como incógnita –regiones “N”–. Considerando que el C¹⁵ estimado es 6, entiendo que estos vacíos informativos

¹⁴ La versión final del genoma estuvo disponible para consultas locales para miembros del consorcio antes de ser publicada en la web de la comunidad de anotación. Para esta segunda instancia, los *supercontigs* fueron renombrados con una nomenclatura diferente.

¹⁵ El número C es un indicador de la cantidad de rondas de secuenciación o grado de redundancia con que está secuenciado el genoma. Esto se hace con el fin de asegurar que todas las moléculas estén representadas en el producto final. Para el caso de un C=6, una

responden a las dificultades de ensamblado producidas por las repeticiones dispersas. Sin embargo, es necesario también notar que en la práctica, algunas secuencias están representadas en bajo número. Pude detectar esta situación trabajando con las trazas genómicas e intentando extender los *supercontigs* a partir de estas unidades informativas. Encontré dos situaciones: incertidumbre producida por las repeticiones –es decir, un exceso de resultados muy dispares y la imposibilidad de discriminarlos– y vacíos informativos en el origen –es decir, ausencia total de secuencias para la extensión en un punto dado–.

Las regiones de secuencia indeterminada constituyen una parte importante del genoma publicado. Como ejemplo, la **Tabla 2.1** muestra el cálculo de porcentajes que éstas representan dentro de los *contigs* analizados para el armado del *cluster HOX*.

El mapeo físico complementa los datos de secuencia; por lo tanto, pese a que se generan ambigüedades de muchas kilobases, se puede tener confianza respecto a la localización y distancia relativa de secuencias. Asociado a estos inconvenientes aparece un artefacto que aparece en algunos casos, y es que las regiones pueden estar ubicadas en el lugar correcto pero invertidas dentro del *contig*, como se ve en *Rp-cut* y *Rp-tailup* donde hay exones con orientaciones dispares y que pueden estar ordenados correctamente o no.

Tabla 2.1. Porcentajes de incertidumbre en los *supercontigs* asignados al *cluster HOX*

<i>supercontig</i>	longitud total (pb)	\sum zonasN (pb)	%(N)
1739	1.437.800	396.494	27,58
18033	2.335.302	484.145	20,73
12472	66.899	2.025	3,03
897	109.229	1.337	1,22
8957	13.911	0	0
18061	2.472.897	565.130	22,85
17962	2.633.007	665.530	25,28
10784	15.318	0	0
total	9.084.363	2.114.661	23,28

secuencia de copia única debería aparecer un promedio de 6 veces, o, lo que es lo mismo, al menos seis trazas deberían contenerla. Esto no significa que las secuencias estén sobre-representadas en el genoma publicado, ya que éste es producido por el ensamblado de las unidades informativas que son las trazas.

Según se vio en los *contigs* asociados al *cluster HOX*, la longitud media de aquellos que aparecieron en las primeras versiones es menor a la longitud de los *supercontigs* finales. En etapas tempranas se obtuvieron 8 *contigs* con longitudes de entre 9,4Kb y 1,4Mb; mientras que en las etapas finales las longitudes oscilaron entre 13Kb y 2Mb, también distribuidas en 8 *contigs*¹⁶. Esto es acorde con lo que se esperaría en sucesivas etapas de ajustes del ensamblado; sin embargo, no necesariamente implica que se haya aumentado notoriamente la conectividad entre *supercontigs*, tal como se deduce de la cantidad de los mismos, que permanece constante.

Existen discordancias entre las distintas etapas, en las cuales los genes aparecen asociados u ordenados de manera diferente. Sumado a esto, hay diferencias que sugieren pérdida de información en el ensamblado final. En el apartado siguiente se describen dos casos testigo detectados al intentar reconstruir el *cluster*, que ejemplifican este supuesto.

C.2.2.- Dos casos testigo: *proboscipedia* y *abdominalB*

Dos casos interesantes de destacar son los de *proboscipedia* y *abdominalB*, los cuales parecen sugerir pérdida de información en el último ensamblado. En el caso de ***proboscipedia*** (Fig.2.26A), la versión 1.0 sugería la existencia de variantes de *splicing* para el primer exón, que no aparecen en el ensamblado final. Las comparaciones de secuencia entre los exones alternativos mostraron mutaciones silenciosas y dos cambios en los residuos 62 y 63 de DQ por IK. Un análisis más detallado de la secuencia se puede ver en al **ANEXO V.1**.

En el caso de ***abdominalB*** la situación es más compleja; algunos datos se presentan en el **ANEXO V.2** y los resultados se resumen la **Fig.2.26B** y en la **Tabla 2.2**.

1.- La búsqueda de *abdB* en la versión 1.0 resultó en el hallazgo de cuatro secuencias adjudicables al gen. Se trataba de dos regiones N-terminales y dos con el homeodominio. Un *supercontig* grande (#153 de dicha versión) contenía una región N-terminal y una con HD. Las dos restantes estaban repartidas en dos *contigs*, uno

¹⁶ Inicialmente eran 9 contigs, pero aquí se consideran 8 por los motivos explicados en el apartado **C.3.1** y en el **ANEXO VI**.

muy pequeño (#9317, N-terminal 2) y otro mediano (#675, HD2). Inicialmente se consideró que podía tratarse de una duplicación del gen; aunque en ninguno de los dos casos podía armarse la secuencia completa:

El ORF que aparecía en C#153, permitía un correcto *splicing*, pero carecía de la M1, ya que la región N-terminal se perdía en una región de incertidumbre (“N”).

El ORF que estaba repartido entre los *contigs* C#9317 y C#675 tenía sus extremos aparentemente completos, pero no permitía un *splicing* que mantuviera el ORF y en esa región se perdía el motivo conservado NPLEWTGQV además de los residuos previos a la H1. Aparentemente, faltaba un exón intermedio. La región N-terminal terminaba abruptamente junto con el *contig* sin que se encontraran sitios de *stop* ni candidatos para *splicing*; por lo tanto, el *contig* #9317 se extendió usando información de las trazas y así se logró encontrar un posible sitio de corte y empalme. Aún así, seguía faltando la región conectora con el HD que debería estar en un exón *contiguo*.

2.- Un análisis posterior comparando el extremo extendido del *contig* #9317 con la zona codificante del *contig* #153 permitió incluir con bastante certeza al primer *contig* dentro del segundo. A partir de ese momento, la hipótesis de una duplicación pasó a segundo plano y consideré que estaba en presencia de un gen de copia única con dos exones alternativos para el HD. Los N-terminales se consideraron como uno solo y su repetición como un artefacto del ensamblado.

Sin embargo, en caso de existir duplicación y de haber poca divergencia entre los duplicados, es evidente que el solapamiento entre los *contigs* #153 y #9317, justo dentro de la región codificante, podría ser forzado como consecuencia de la similitud.

Para el caso del *contig* #675, se encontró cierta semejanza con #153, pero no es posible *contigüarlos* ni incorporar C#675 en C#153. La semejanza aparece en el extremo –ocurre solo para un extremo– y sentido opuestos a los esperados. C#675 y C#153 comparten regiones pero, tienen partes que se superponen y partes que no (**Fig.2.26C**). Es tan probable que estén mal armados como que no: las partes que se superponen pueden ser las repeticiones dispersas y abundantes. No es posible conocer la ubicación relativa del HD2, y en base a eso si se lo puede considerar como un exón funcional o no.

3.- Del mismo modo y tal como se ve en el **ANEXO V.2**, si se rearma *abdB* sólo a partir de las secuencias de las trazas, el resultado es un gen con un N-terminal semejante a los de la versión 1.0 y un HD semejante a la primera variante (HD1, C#153). Esto también podría deberse a una superposición de secuencias diferentes, pero muy similares, una situación semejante a la que se da en el caso de las repeticiones.

Por otra parte, la segunda variante (C#675) para el exón con HD no logra completar los requisitos para secuencia de *abdB* y requiere un exón intermedio, lo cual implicaría un patrón de *splicing* diferente. Sumando estos hechos considero que no se debe desechar definitivamente la hipótesis de la duplicación aunque la opción más parsimoniosa parece ser la de copia única. Según se considere el caso, la variante que presenta un HD incompleto podría responder a un patrón de *splicing* diferente, a una forma modificada de la proteína, a una región no codificante (pseudogen o molde para ARN regulatorio) o bien podría no existir y ser un artefacto. Es necesario recordar que en *D.melanogaster* el gen tiene dos variantes con funciones muy distintas –"m" y "r"–; los resultados de *R.prolixus* pueden estar reflejando una situación semejante.

4.- Para sumar complejidad a la disparidad de datos, la versión 2.0 del genoma ensamblado sólo presenta un exón correspondiente al N-terminal, coincidente con los anteriores, y no hay ningún exón correspondiente al HD. El resultado más parecido que se encuentra en el genoma es el HD de *abdA*. La secuencia correspondiente se muestra en el apartado sobre genes anotados.

Tabla 2.2. Comparación de exones de *abdB* en las distintas etapas de secuenciación

	variante 1*		variante 2**	
	N-ter***	HD	N-ter	HD
trazas	–	SI	SI	–
v 1.0 –bruto	SI	SI	SI	SI
v 1.0 –revisada	–	SI	SI	SI
v 2.0	–	–	SI	–

* (C#153 / versión 1.0)

** (C#9317 y #675 / versión 1.0)

*** Dado que el N-ter1 deriva de unir dos *contigs* y N-ter2 deriva sólo de uno (aunque extendido), se consideró al segundo como unidad de referencia. Para comparar los HD, se tomó como referencia aquel que genera la secuencia mínima completa

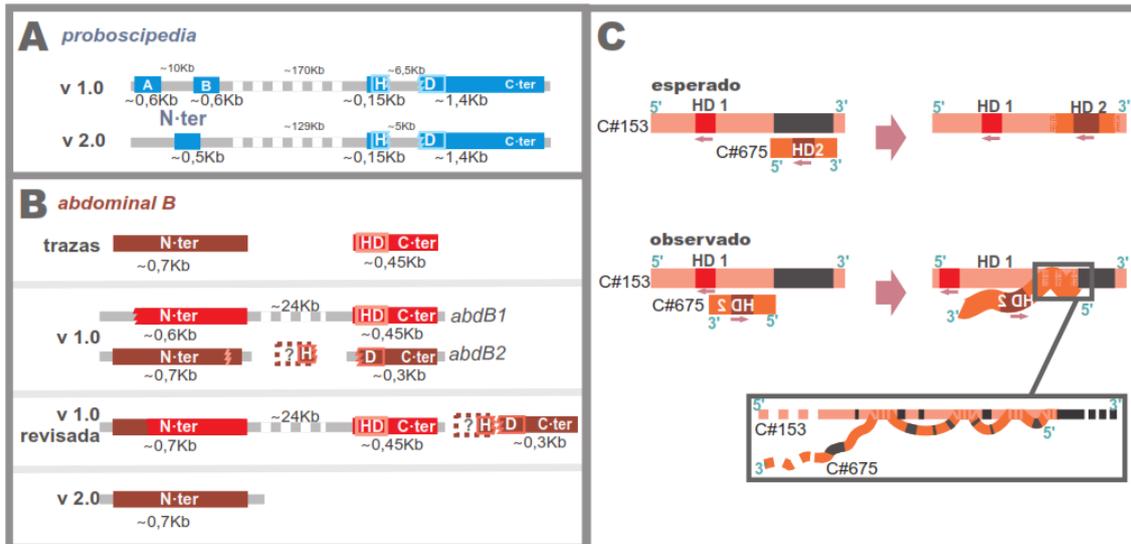


Fig.2.26. *proboscipedia* y *abdominalB*. Se muestran las discordancias encontradas en distintas instancias de secuenciación. **A.** En la versión 1.0 *pb* parecía tener dos exones alternativos para el N-terminal mientras que en la versión 2.0 sólo se observa uno. **B.** La interpretación sobre la estructura de *abdB* varía según se tenga en cuenta información de las trazas, de la versión 1.0 o de la versión 2.0. Asimismo, un análisis más profundo de las secuencias de la versión 1.0 permiten una reinterpretación también diferente. **C.** Se esquematizan las razones del fracaso en el intento de ensamblar los *contigs* #153 y #675. Se esperaba encontrar secuencias coincidentes que permitieran incluir a C#675 en C#153. En cambio, se encontraron algunas similitudes, pero sin continuidad y en un sentido opuesto al esperado; es probable que la similitudes se deban a repeticiones dispersas.

C.3.- Aproximación al *cluster Hox* de *Rhodnius prolixus*

En muchos vertebrados e invertebrados los genes *HOX* están organizados en un *cluster*. Típicamente, están ordenados de manera colineal respecto a su expresión espacial a lo largo del eje anteroposterior. Dentro de cada grupo animal puede haber variaciones, reordenamientos y fraccionamientos. En este trabajo, la hipótesis inicial es que *R. prolixus* tiene un *cluster HOX* con un ordenamiento canónico: *lb*, *pb*, *dfd*, *scr*, *antp*, *ubx*, *abdA*, *abdB*; sin descartar la posibilidad de que estén intercalados otros genes –en *D. melanogaster*, *bcd*, *zen* y *ftz* están dentro del complejo–.

Mediante el análisis de secuencias, queda demostrada la existencia de un *cluster HOX+zen* en *R. prolixus*. Si bien no fue posible determinar la disposición exacta de los genes dentro del mismo, la secuenciación muestra claramente que aparecen asociados en los *contigs*, siendo *scr* el único para el cual no se encontró ninguna conexión. Es preciso destacar que los *contigs* que contienen a *scr* son muy pequeños

y probablemente esta disociación sea artificial. La **Fig.2.27** muestra una comparación de la composición del *cluster HOX* de *D.melanogaster* y dos posibles alternativas para el *cluster* de *R.prolixus*; la primera (*Rp1*) corresponde a la hipótesis “C2” planteada en este trabajo y la segunda, resume las hipótesis “A” y “C1”, todas ellas explicadas en el apartado C.3.2 de este capítulo.

Presumiblemente, el *cluster* está entero. Si bien no es posible determinarlo con certeza, los resultados comparados de las distintas versiones, sugieren asociación de todos los genes –excepto *scr*–, por lo cual es razonable suponer que no hay fragmentación.

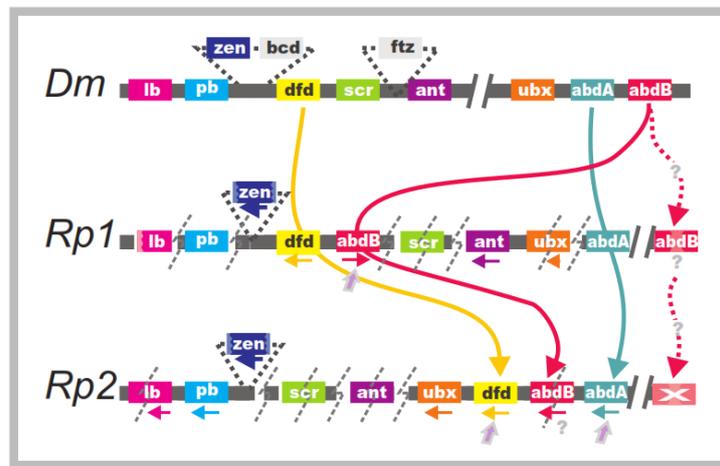


Fig.2.27. Cluster HOX de *D.melanogaster* y *R.prolixus*. La figura muestra la composición del *cluster HOX* de *D.melanogaster* (*Dm*) y dos posibles conformaciones del *cluster* de *R.prolixus* (*Rp1* y *Rp2*), derivadas de dos instancias diferentes en el proceso de secuenciación genómica. Las flechas horizontales indican la orientación del gen dentro de su respectivo *contig*; las flechas grises oblicuas señalan aquellos genes que presentan una ubicación diferente a la canónica esperada.

C.3.1.- Completud, conectividad y calidad de los *supercontigs* que contienen genes asignables al *cluster HOX*

Todos los genes *HOX* de *Rhodnius prolixus*, cuyas secuencias se detallaron en el apartado correspondiente de este capítulo, están identificados con buena resolución. Una secuencia identificada como *zen* apareció en la misma posición relativa respecto a *D.melanogaster*. El gen *bicoid* es una adquisición de la rama Cyclorrapha (Diptera), por lo tanto no aparece en la vinchuca –aún así, se hizo la búsqueda, cuyo resultado fue nulo y acorde a lo esperado–. El gen *fushi tarazu*, no fue identificado en ninguna

instancia, ni con ningún método. Parece probable que no esté presente en *R.prolixus*. Esto concuerda con las afirmaciones de Carroll (2005, 2008) sobre una tendencia a perder copias más que a ganarlas, y con la aparente ausencia del gen en otras especies de Insecta, según Hadrys et al. (2012).

También se detectó una secuencia no identificada semejante a homeobox cercana a *abdA*. Posiblemente se trate de un pseudogen o una secuencia regulatoria, debido a que se la halló repartida en tres “exones”, cada uno de ellos conteniendo partes del HD, pero con marcos de lectura desfasados e insuficientes para construir un homeodominio completo.

Durante la primera etapa de secuenciación, el trabajo consistió en armar *contigs* a partir de las trazas, pero los *softwares* disponibles no permitieron salvar los inconvenientes presentados por las repeticiones –ver el apartado metodológico–. Luego se usaron con las sucesivas versiones del genoma ensamblado analizando la distribución de los genes *HOX* en los *contigs* y *supercontigs* disponibles. Una vez que estuvo disponible la versión final del genoma (2.0), se hicieron los análisis de conectividad entre *contigs*, descritos en el apartado metodológico B.2 y en la Fig.2.2.

Los *contigs* #8957 y #1041 se pudieron asociar utilizando información de secuencia. Se trata en ambos casos de *contigs* muy pequeños. Cada uno de ellos contiene una secuencia correspondiente al mismo exón de *antp* codificando idéntica secuencia proteica. Inicialmente se consideró que se trataba de alternativas de *splicing* que afectaban la región reguladora. Sin embargo, la comparación mediante el algoritmo CAP –*Contig assembly program*– de BioEdit reveló que ambos *contigs* tenían sendas zonas solapantes incluyendo la región codificante. Por este motivo, aquí se consideran los datos provenientes de sólo de #8957 y el otro se desestima. El ANEXO VI muestra la secuencia resultante del ensamblado de ambos y una imagen de la zona de solapamiento.

Mediante el método gráfico, se obtuvo una posible complementariedad entre los *supercontigs* #17939 y #18033. Las coincidencias no son perfectas y no están avaladas por datos de secuencia, pero es muy factible la asociación sugerida, ya que de ser cierta, une dos exones de un mismo gen en la orientación correcta (Fig.2.28.A). Una de las expectativas era incluir los cuatro *supercontigs* muy pequeños dentro de

otros mayores. Sin embargo, los datos disponibles resultaron insuficientes para postular asociaciones fundamentadas. De este modo, los dos exones de *scr* permanecen inconexos entre sí y respecto al resto de los genes (**Fig.2.28.B**).

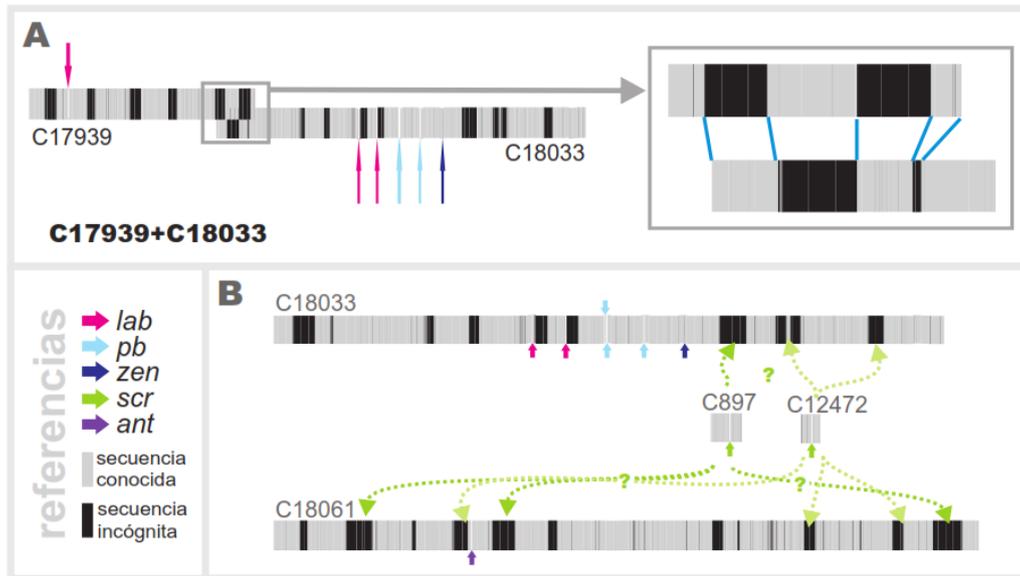


Fig.2.28. Ensayos de conectividad de exones a través del método gráfico. **A.** Se observa una posible compatibilidad entre los extremos de los *supercontigs* #17939 y #18033. La coincidencia no es perfecta, pero la posible asociación se solventa por la presencia de exones de un mismo gen (*pb*). **B.** En otros casos, como el de *scr*, si bien la asociación es factible, no es posible establecer una aproximación con este método.

Es muy probable que el *contig*#8957 esté incluido en el *contig*#18061, ya que ambos contienen exones de *antp*; asimismo, el *contig*#10784 debe estar incluido muy probablemente en el *contig*#17962, ya que ambos contienen exones de *abdB* pero ninguno de los dos casos se pudo comprobar –el cuadro completo de distribución de genes y *contigs* se muestra en la **Fig.2.29**.

La realidad es que todavía no es posible determinar la composición exacta del *cluster HOX* de *R.prolixus*, pero se alcanzó el máximo límite de resolución posible según la información con que se dispone. En una primera instancia, las etapas tempranas y finales de secuenciación arrojan resultados con diferencias respecto a las posibles asociaciones entre genes del *cluster*. A continuación se plantean hipótesis respecto a la organización del *cluster* en *R.prolixus*.

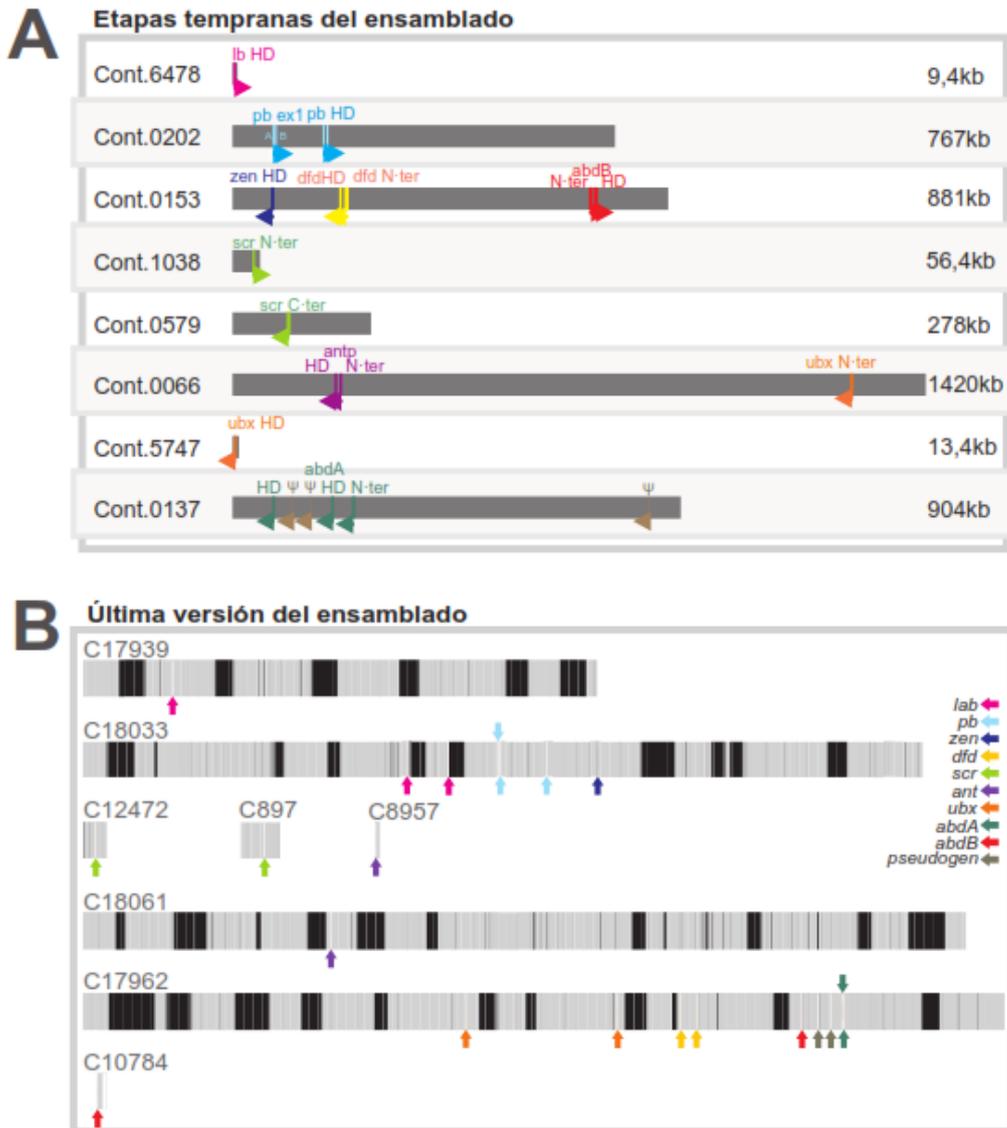


Fig.2.29. Comparación de dos estados diferentes de la secuenciación del genoma de *R. prolixus*. **A.** En la etapa inicial de ensamblado genómico, se pudieron establecer las primeras asociaciones que indicaban la presencia de un *cluster HOX*. En esta primera etapa, se hicieron análisis aproximativos determinando la distribución y orientación de los genes. Las barras grises representan los *contigs*, manteniendo las proporciones relativas entre ellos. Las barras y puntas de flecha de colores señalan la posición de los genes dentro de los *contigs*. El tamaño relativo de las secuencias codificantes está sobre-representado con el fin de que permanezcan visibles. **B.** en la última versión del ensamblado, se hicieron análisis más exhaustivos, determinando regiones de secuencia conocida (gris) y regiones de secuencia incógnita (negro). En este caso, se mantuvo la proporción de los exones dentro de los *contigs*, por este motivo quedan fuera de escala y se los señala mediante flechas externas. La longitud de cada uno de estos *contigs* de consignó en la **Tabla 2.1**. El código de colores de los genes se señala en la figura y es el mismo que se mantiene durante toda la tesis.

C.3.2.- Cinco hipótesis sobre el ordenamiento del *cluster HOX* de *Rhodnius prolixus*

Las etapas tempranas y finales de secuenciación arrojan diferencias respecto a las posibles asociaciones entre genes del *cluster* tal como se explicó en el apartado anterior. Ninguno de los dos casos permite ordenar las secuencias de modo que la disposición génica coincida exactamente con el orden esperado según *D.melanogaster* (Fig.2.27).

Partiendo de la información disponible y considerando distintos bloques determinados por los *contigs* que las contienen, se propone una serie de ordenamientos posibles para el *cluster* de *R.prolixus*. La Tabla 2.3 muestra una comparación de los resultados de las dos últimas versiones de ensamblado y algunas hipótesis sobre la composición del *cluster HOX* de *R.prolixus*, esquematizadas en la Fig.2.30. Se presentan las opciones más parsimoniosas y probables basadas en los resultados de secuenciación.

Tabla 2.3. Aproximaciones al *cluster HOX* de *R.prolixus*.

versión anterior		última versión		posible orden del cluster											
contig	orden	contig	orden	A		B		C							
–	–	I	<i>lb</i> (C-ter)	a	<i>lb</i> <i>pb</i> <i>zen</i>	a	<i>lb</i> <i>pb</i> <i>zen</i> <i>dfd</i> <i>abdB</i> <i>abdA</i>	a	<i>lb</i> <i>pb</i> <i>zen</i>						
1	<i>lb</i> (N-ter)	II	<i>lb</i> (N-ter) <i>pb</i> <i>zen</i> (inc)							b	<i>scr</i>	b	<i>ubx</i> <i>antp</i>	b	(1) <i>antp</i> <i>ubx</i>
2	<i>pb</i>														
3	<i>zen</i> (inc) <i>dfd</i> <i>abdB2</i>	IV	<i>scr</i> (N-ter)	b	<i>scr</i>	b	<i>ubx</i> <i>antp</i>	b	(2) <i>antp</i> <i>ubx</i>						
5	<i>scr</i> (N-ter)									V	<i>antp</i> (C-ter)	c	<i>antp</i> <i>ubx</i> <i>dfd</i> <i>abdB</i> <i>abdA</i>	c	<i>scr</i>
6	<i>antp</i> <i>ubx</i> (C-ter)	VI	<i>antp</i> (N-ter)	c	<i>antp</i> <i>ubx</i> <i>dfd</i> <i>abdB</i> <i>abdA</i>	c	<i>scr</i>	d	<i>abdA</i> <i>abdB</i>						
7	<i>ubx</i> (N-ter)									VII	<i>ubx</i> <i>dfd</i> <i>abdB</i> <i>abdA</i>	c	<i>antp</i> <i>ubx</i> <i>dfd</i> <i>abdB</i> <i>abdA</i>	c	<i>scr</i>
8	<i>abdA</i>	VII	<i>ubx</i> <i>dfd</i> <i>abdB</i> <i>abdA</i>	c	<i>antp</i> <i>ubx</i> <i>dfd</i> <i>abdB</i> <i>abdA</i>	c	<i>scr</i>	d	<i>abdA</i> <i>abdB</i>						
9	<i>abdB</i>									VII	<i>ubx</i> <i>dfd</i> <i>abdB</i> <i>abdA</i>	c	<i>antp</i> <i>ubx</i> <i>dfd</i> <i>abdB</i> <i>abdA</i>	c	<i>scr</i>
–	–	VII	<i>ubx</i> <i>dfd</i> <i>abdB</i> <i>abdA</i>	c	<i>antp</i> <i>ubx</i> <i>dfd</i> <i>abdB</i> <i>abdA</i>	c	<i>scr</i>	d	<i>abdA</i> <i>abdB</i>						

Todas las hipótesis presentadas –excepto C2– asumen un evento de inversión del bloque *abdA-abdB*. A partir de eso, se detallan los reordenamientos adicionales.

La **hipótesis A** toma como referencia la última versión del ensamblado, y se complementa con los resultados del ensamblado anterior. Tiene un ordenamiento muy similar al canónico, excepto por la posición de *dfd*, que se explicaría por una translocación. Dado que el último ensamblado se considera de mejor calidad que el anterior –aunque hay pérdida de información–, parece el ordenamiento más probable.

La **hipótesis B**, al contrario, toma como referencia el ensamblado antiguo y lo complementa con la información proveniente del último. Si bien *a priori* el *cluster* parece mucho más desordenado, el nuevo orden se explica fácilmente por una inversión del bloque [*scr-antp-ubx-abdA-abdB*] y mantiene el orden tradicional de *zen-dfd*. Pese a estar basada en el ensamblado antiguo, resulta más parsimoniosa ya que es la que requiere menos eventos de reorganización.

La **hipótesis C** abre una serie de otras opciones, basándose en la posibilidad de que *abdB2* no sea un artefacto del primer ensamblado, sino una duplicación real. Los mayores *gaps* informativos se encuentran alrededor de *scr* y *zen*. En el primer caso porque *scr* no está asociado a otros genes en ninguno de los dos ensambles y no es posible darle una ubicación teórica más o menos firme. En el segundo, porque al estar incompleta la secuencia del gen, no puedo establecer límites certeros y posibles asociaciones con otros genes; de haber exones en otros *contigs*, no lo sabremos hasta tener nuevos datos experimentales. En la hipótesis C, las hileras de color gris más claro en la **Tabla 2.3** intentan representar esta situación: las regiones faltantes de *zen* podrían –o no– estar asociadas a los *contigs* pequeños –como los de *scr* que están sueltos–. **C1:** El ordenamiento de los bloques [a, b(1), c y d] se basó en el primer ensamblado, considerando el orden [*zen-dfd-abdB2*] pero teniendo en cuenta el *gap* informativo posterior a *zen*, es decir [*zen-(gap)-dfd-abdB2*] y dentro del *gap* podrían estar *scr* y [*antp-ubx*] –uno o ambos–. La organización [*lb-pb-zen-scr-antp-ubx-dfd-abdB2-abdB-abdA*] se explica por un evento adicional que implica la translocación del bloque [*scr-antp-ubx*]; este arreglo es el menos parsimonioso de todos los considerados para el grupo C, ya que requiere 4 eventos de reordenamiento, sin embargo es coherente con el orden [*ubx-dfd-abdB*] surgido del ensamblado, por eso

está considerado en el análisis. **C2:** El ordenamiento [a, c, b(2), d] mantiene el orden inicial y contempla la translocación de uno de los *abdB* luego de la duplicación: [*lb-pb-zen-dfd-abdB2-scr-antp-ubx-abdB-abdA*]. **C3:** Finalmente, una posibilidad que resulta en un orden [*zen-dfd-abdB*] coherente con la versión antigua, implica la inversión del bloque completo [b(2)+d]=[*scr-antp-ubx-abdA-abdB-abdB*].

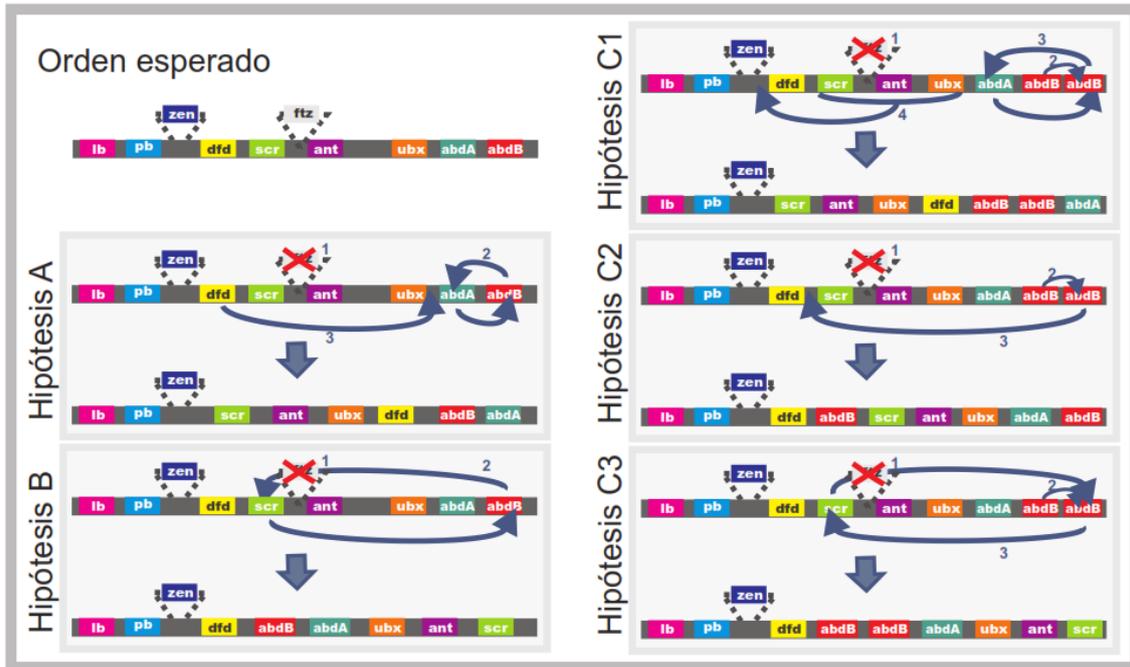


Fig.2.30. Cinco hipótesis sobre la composición del *cluster HOX* de *R.prolixus*. La figura compara el orden esperado y cinco posibles configuraciones del *cluster* basados en los datos de secuenciación. La justificación de cada hipótesis se encuentra en el cuerpo del texto. Las flechas indican los reordenamientos implicados en cada caso.

Finalmente, en lo tocante a *scr* –único gen que permanece sin asociar– en caso de haber encontrado genes adicionales en los mismos *contigs*, éstos podrían haber dado indicios sobre su ubicación, pero tampoco en esta búsqueda dio resultado. Por lo tanto, *scr* es el único gen *HOX* del cual no es posible afirmar que esté incluido en el *cluster HOX*. Está graficado en el sitio más probable según la hipótesis de colinealidad, pero dada su desconexión actual, podría estar translocado a un sitio lejano.

D.- Discusión

En el marco de este trabajo, logré identificar, caracterizar y anotar 26 genes. Entre éstos, se encuentran los ocho genes *HOX* canónicos y una serie de factores de transcripción con estructura HD, identificados en otros insectos –principalmente en *D. melanogaster*– como TF involucrados en el desarrollo.

Si bien estas secuencias son teóricas y deben corroborarse con datos experimentales, algunos de estos genes –*proboscipedia*, *deformed*, *sex combs reduced*, *antennapedia*, *ultrabithorax*, *abdominalA*, *abdominalB*, *extradenticle*, *sloppy paired*, *cut*– parecen estar completos, ya que tienen extremos N- y C-terminales conservados y, en caso de tener intrones, también están conservadas las secuencias involucradas en el empalme. En el caso de *abdominalA* y *abdominalB*, las secuencias se completaron con información de las trazas pero en la secuenciación genómica aparecen incompletas. Un segundo grupo de genes –*labial*, *caudal*, *apterous2*, *six3*, *pknox2*, *wingless1*– contiene secuencias que podrían estar completas, sin embargo, debido a que parte de ellas guardan menor grado de conservación, será necesario tener evidencia experimental antes de confiar totalmente en la información actual. De un tercer grupo –*apterous1*, *six1*, *six4*, *homothorax*, *latrophilin3*, *tailup*, *wingless2*, *araucan*, *forkhead1*–, puedo decir con certeza que están incompletos, ya que en todos –excepto *six1*– falta identificar la M1. En el caso de *six1* también es esperable que la secuencia sea más larga, ya que parecen cumplirse los requisitos cualitativos pero no los cuantitativos. En general para este grupo, se encontraron exones presentes en las trazas y ausentes en la versión 2.0; pero también hubo casos en los que las regiones conservadas teóricamente faltantes no se pudieron encontrar en ninguna base de datos.

Adicionalmente, aunque no están caracterizadas ni anotadas, se detectaron secuencias de proteínas homeodominio pertenecientes a familias y funciones más distantes y que podrían corresponder a unos 45 genes diferentes; algunos de ellos tampoco están caracterizados ni tienen nombre en otros insectos –incluida *D. melanogaster*–. Encontré una secuencia similar a *MAB-5/HOXB7* que no aparece en artrópodos, por lo tanto, puede tratarse de una contaminación, de una duplicación propia de *R. prolixus* (con posterior derivación y/o pérdida de función), de una

secuencia no codificante, o de una proteína que existe pero no ha sido detectada en otros artrópodos. La hipótesis de la contaminación parece poco probable, ya que no se trata de una secuencia de origen humano, de simbiontes procariotas, ni de *Tripanosoma cruzi*; más bien está asociada a cordados en general y a un nematode.

En resumen, hice un *screening in silico* de los TF con HD presentes en *R.prolixus* y he logrado hallar aproximadamente 70 de ellos; este número representa una porción importante en el *pool* de genes reguladores conocidos en relación con otros organismos. Habiendo usado distintos métodos de búsqueda y en distintas etapas de la secuenciación, puedo estar casi segura de haber detectado una gran mayoría de las secuencias HD que contienen H1 y/o H3 más o menos conservadas (*i.e.*, las secuencias aminoacídicas ELEKE y WFQNR, respectivamente) y que están presentes en alguna versión del genoma secuenciado. Al menos con las herramientas actuales, todas las nuevas búsquedas arrojan resultados redundantes. Por supuesto, siempre es posible hacer búsquedas más degeneradas, especialmente para aquellos TF más derivados en su secuencia HD.

La materia básica sobre la que realicé estos análisis es la secuencia genómica de *R.prolixus* en sus diferentes estados de procesamiento. Durante el proceso de secuenciación tuve la oportunidad de observar los progresos en cuanto a cantidad y calidad de la información, por este motivo, dediqué parte del trabajo a la comparación, análisis y cualificación de la información disponible. Observé que la información inicial se ha compactado notablemente en el proceso. Parte de esto puede ser consecuencia de eliminar redundancias y mejorar la calidad, pero no hay duda de que también hay pérdida de información.

El trabajo con las secuencias mostró que las trazas genómicas proporcionan una fuente insustituible, ya que allí se alberga –aunque desordenada– la totalidad de la información genómica obtenida. El proceso de ensamblado implica la formación de *contigs* y conlleva la eliminación de las secuencias que no se pueden asociar a los mismos; por lo tanto consiste en un paso en el cual se aumenta el orden pero también se pierde gran cantidad de información. Esta información organizada está distribuida en aproximadamente 50.000 *supercontigs*. La magnitud cromosómica no es posible de alcanzar con las técnicas actuales.

Trabajando con las trazas e intentando extender los *contigs* a partir de ellas, he detectado gran cantidad de secuencias repetitivas dispersas que dificultan el ensamblado. Por otra parte, también encontré vacíos informativos (*i.e.*, $C \geq \#trazas \geq 0$). Entiendo que la gran cantidad de zonas de incertidumbre abundantes en número y tamaño –zonas “N”–, encontradas en el ensamblado genómico, es un reflejo de esta situación. Sumado a esto, se observó que en *R.prolixus*, las regiones codificantes están muy dispersas y distantes entre sí. Tal es así, que no es raro encontrar intrones de cientos de kilobases; como puede verse en los genes caracterizados y el *cluster* identificado, pese a consistir en una clara asociación de genes *HOX*, resultó ser muy laxo.

La situación actual del ensamblado de *R.prolixus* podría compararse con un rompecabezas cuya imagen es muy homogénea en vastas regiones y al cual le faltan piezas, por lo tanto, se puede vislumbrar el conjunto parcialmente armado pero fragmentado; con grupos de fichas encastradas, algunas de manera dudosa y otras incluso sueltas.

Por otra parte, el hecho de que existan discordancias dignas de destacar entre ambas versiones del ensamblado, también es un reflejo de las dificultades debidas tanto a las características intrínsecas del genoma como a la calidad de la información almacenada. Los ejemplos provenientes de *pb*, *abdA*, *abdB* y las distintas asociaciones dentro del *cluster* muestran claramente que la segunda versión del ensamblado no es necesariamente mejor que la primera. Si bien en la segunda hay un aumento en la conectividad y en la longitud de los *contigs*, las mejoras en este sentido no son drásticas y, por otra parte, la pérdida de información es evidente. También es necesario destacar que hay alguna ganancia, como ocurre para el caso de *labial*, pero en los casos estudiados la relación pérdida / ganancia es mayor. Por otra parte, la más parsimoniosa entre las hipótesis de conformación del *cluster HOX* es la hipótesis B, basada en la versión 1.0, esto hace pensar en la posibilidad de que, al menos para la región, la primera versión sea de mayor calidad. Esta última inferencia a su vez, nos insta a mantener –aunque sea en segundo plano– la posibilidad de una duplicación o de *splicing* alternativo para *abdB*.

Basándome en todas estas consideraciones, propongo 5 hipótesis para la conformación del *cluster HOX* de *R.prolixus*, que representan las mejores aproximaciones que puedo hacer con la información disponible. La hipótesis B consiste en una inversión del bloque [*scr-antp-ubx-abdA-abdB*], está basada en la versión 1.0 pero considera a *abdB* como un gen de copia única, aunque no descarta la posibilidad del *splicing* alternativo. Para todos los casos considerados, el gen *ftz* se considera ausente en este genoma.

Independientemente del orden definitivo del *cluster HOX*, considero que queda demostrada la asociación de los genes agrupados en *supercontigs*. Es decir, queda demostrada la existencia de un *cluster HOX* en *R.prolixus*. Más aún, es muy probable que el *cluster* esté entero, sin particiones. Baso esta suposición en el hecho de que todos los genes –excepto *scr*– están asociados a uno o más genes en una u otra versión, o en ambas: *lb* y *pb* que aparecen sueltos en la primera versión están asociados entre sí y con *zen* en la segunda; algo similar ocurre con *abdA* y *abdB* que aparecen asociados entre sí y con *dfd* y *ubx* en la segunda versión; por otra parte, *antp*, que aparece suelto en la segunda versión, está asociado a *ubx* en la primera. Estas asociaciones indican una clara cercanía que no se puede opacar por la imposibilidad de conocer el orden definitivo: es evidente que en un conjunto de datos tan grande como es el genoma, la probabilidad de que estas asociaciones predichas se den azarosamente por artefacto, es desestimable.

scr, única secuencia que no se pudo asociar a otras, podría marcar un punto de inflexión dentro del complejo. Lamentablemente, los datos de secuencia provenientes de estos *supercontigs* tan pequeños no proveyeron indicios adicionales. A los efectos de pensar la conformación del *cluster*, le asigné a *scr* ubicaciones acordes a lo esperado, sin embargo está claro que no hay otro sustento teórico más que la información de otras especies y la expectativa de colinealidad. En realidad, y en base a la información actual, es perfectamente probable que *scr* esté translocado en otra región e incluso en otro cromosoma. Aún considerando el caso de que *scr* esté translocado y ajeno al *cluster*, la asociación [*zen-dfd-abdB*] y de estos tres con los cuatro restantes, nos induce a descartar una posible partición del *cluster*.

Capítulo 3

La biología del desarrollo de *Rhodnius prolixus*



A.- Introducción

El desarrollo de *Rhodnius prolixus* fue inicialmente descrito por Mellanby (1934, 1935). Ella realizó una descripción increíblemente minuciosa del proceso, que es una base fundamental para esta redescipción. Mellanby trabajó con secciones seriales de tejido y realizó un trabajo de reconstrucción detallado y de una precisión admirable. En el momento en que hizo esta primera descripción, contaba con el microscopio óptico común y las técnicas histológicas tradicionales. Las figuras de su trabajo consisten en gráficos de interpretación de los cortes histológicos y de sus reconstrucciones tridimensionales. No hay imágenes fotográficas. Los resultados y gráficos son muy confiables, sin embargo, las limitaciones técnicas propias de la época hacen que sea necesario hacer un repaso de la información provista por ella. Algunos de los fenómenos que describió, no se observaron en este estudio.

Por otra parte, las condiciones de trabajo usadas por Mellanby son diferentes a las usadas aquí, particularmente en lo referente a la temperatura de cría, que en este caso fue establecida para determinar un tiempo de desarrollo aproximado de 14 días, mientras que Mellanby trabajó con un tiempo aproximado de 29 días. Esto hizo que fuera necesario redefinir la línea temporal para la interpretación de los resultados. La escala temporal permaneció aproximadamente lineal; aunque se observó gran variabilidad entre individuos.

Más cerca en el tiempo, Kelly and Huebner (1989) realizaron una descripción general del desarrollo de *R.prolixus*. Ellos usaron principalmente microscopio electrónico de barrido. Se trata también de un excelente trabajo de referencia, con preparados de gran calidad y con imágenes de buen nivel de detalle. Sin embargo, este artículo tiene algunas limitaciones en función de los objetivos del presente trabajo. Por un lado, se trata de una descripción general, la estructura de la banda germinal no está detallada morfológicamente ni en sus variaciones temporales. Por otra parte, la información tridimensional proveniente del microscopio de barrido, si bien es muy interesante, es sólo superficial. La interpretación del embrión, del huevo y de las relaciones embrión–huevo en insectos de banda germinal corta son de por sí muy difíciles de comprender para quien no está familiarizado con el tema. Utilizando sólo vistas de la superficie del huevo, la información se hace mucho más críptica.

Por estos motivos, fue necesario hacer un repaso utilizando microscopía de fluorescencia y microscopía confocal que permiten tener una nueva mirada del proceso, con calidad de imagen y detalle –eliminando en buena medida el “efecto operador/dibujante” debido a la falta de fotografías–. Se registran fenómenos descritos por Mellanby que no se ven en el trabajo de Kelly y Huebner. De este modo, sumo, discuto y contrasto mis observaciones con las anteriores.

La descripción del desarrollo temprano –de estados de blastodermo y BG– se realizó en colaboración con la Dra. Lucía Pagola y parte del material fotográfico fue aportado también por el Dr. Andrés Lavore, en el marco de sus respectivas tesis doctorales ([Pagola, 2012](#); [Lavore, 2012](#)).

B.- Materiales y métodos

B.1.- Mantenimiento y manipulación de la colonia de *Rhodnius prolixus*

Debido a que *R.prolixus* es una vinchuca exótica y es un vector de *Tripanosoma cruzi*, requiere ciertos cuidados especiales en su manipulación que se detallan en el **ANEXO I**. Los ejemplares usados en este trabajo provienen de dos fuentes: la colonia establecida para el Consorcio de Secuenciación del Genoma de *R.prolixus* y el Servicio Nacional de Chagas (Punilla, Pcia. de Córdoba).

Los ejemplares se mantienen en frascos plásticos sin tapa, cerrados por una malla fina a través de la cual pueden pasar sus estiletes y alimentarse. Dentro del frasco los ejemplares deben estar en un número no mayor a 50 individuos, separados según su estado larval, con tiras de papel plegadas que simulan las grietas que habitan habitualmente. Además, estos papeles sirven como sustrato para la puesta de huevos y su colecta.

Las condiciones de cría se establecieron a 28°C, con un período luz/oscuridad de 12Hs./12Hs., a humedad constante de 50%. En estas condiciones un huevo se desarrolla en aproximadamente 14 días, los estados larvales duran unos 20-30 días y el tiempo de generación es de unos 4 a 5 meses. Las mudas y las puestas requieren alimentación previa. La alimentación se hace utilizando aves de corral vivas, tal como se detalla en el anexo correspondiente.

B.2.- Manipulación de huevos y embriones

Los huevos de *R. prolixus* son pequeños, de un color rosa pálido que se oscurece a medida que el embrión crece y se pigmenta. Su tamaño medio aproximado es de 1mm de diámetro x 2mm de largo (**Fig.3.1A**). Son ovalados, con una región cóncava en la cara ventral y un opérculo circular en el polo anterior, a través del cual la larva emerge al momento de la eclosión. Tienen un corion grueso, con una textura porosa y de una consistencia semirrígida, similar a la de un plástico blando. Es decir, es lo bastante flexible como para ceder a la presión en lugar de quebrarse por métodos mecánicos y lo bastante duro como para no desgastarse o perforarse fácilmente (**Fig.3.1B**).

En el momento de la puesta quedan adheridos a la superficie mediante una sustancia cementante; sin embargo, una vez colectados y separados del sustrato, son resbaladizos debido a su forma y superficie. Esto genera dos inconvenientes; uno de ellos relacionado con la seguridad sanitaria, por lo cual es necesario extremar las precauciones al momento de la manipulación y el segundo relacionado con la dificultad técnica en sí misma.

La manipulación es laboriosa debido a que tanto la decorionación como la separación del vitelo¹⁷ se hacen una por una, manualmente¹⁸, ya que no existen técnicas químicas de separación del corion ni del vitelo (**Mellanby, 1934, 1935; Kelly y Huebner, 1989**). Son diferentes los métodos para la obtención de huevos enteros y de bandas germinales. En ambos casos, disección y fijación son pasos simultáneos. En el curso de este trabajo se pusieron a punto las condiciones de manipulación, por ese motivo se hacen algunos comentarios al respecto.

Fijación y disección de huevos enteros: El desarrollo se detiene mediante un congelamiento en N₂ líquido durante 1 a 3 hs. y se exponen los huevos a calor seco O.N. a 60°C. La extracción del corion mediante disección se realiza bajo lupa estereoscópica, utilizando un *slide* con superficie cóncava y un medio líquido, preferentemente 4%PFA o, alternativamente 1X PBS. La disección consiste en la

¹⁷ Es necesario recordar que en insectos de banda germinal corta/intermedia, el vitelo ocupa aproximadamente el 90% del volumen del huevo en los estados tempranos.

¹⁸ Se ensayaron sobre *R. prolixus* los protocolos usados para *D. melanogaster* y *O. fasciatus* sin ningún resultado. Asimismo, la acción de una serie de agentes químicos sobre el corion de *R. prolixus* tampoco logró debilitarlo por adelgazamiento o rotura.

extracción del opérculo y la posterior eliminación del corion utilizando pinzas de disección.

El vitelo de *R.prolixus* tiene una consistencia blanda-arenosa y se desgrana fácilmente. Es muy difícil mantener su forma. Si se intenta rasgar el corion longitudinalmente, éste tiende a enrollarse de modo que se introduce en el vitelo y lo destroza con su borde cortante (**Fig.3.1C**). Es necesario quitar primero el opérculo mediante una suave presión en la zona de la costura y luego, con pinzas muy finas, romper y sacar pequeños fragmentos de corion en el sentido de la superficie más circular, como si se pelara una naranja (**Fig.3.1D**). Aún así, sin un tratamiento previo es casi imposible obtener huevos cuyo vitelo no se haya destruido. Las etapas de calentamiento y congelamiento permiten mantener la forma. Las membranas se despegan del corion –es probable que esto se deba a una leve deshidratación y su consecuente contracción, ya que se observó deshidratación evidente a tiempos mayores–. En el caso de las hibridaciones *in situ*, el congelamiento afecta la posterior aplicación del protocolo; por lo tanto sólo se realizó la etapa de calentamiento.

Fijación y disección de bandas germinales: Se procede a la disección bajo lupa de los huevos frescos, eliminando el opérculo y luego ejerciendo presión sobre el corion, desde la región posterior hacia la anterior. Esto se realiza en medio líquido, preferentemente 4%PFA o, alternativamente en MetOH. Una vez que el contenido del huevo se vacía en el medio líquido, se procede a la separación del vitelo usando pinzas y otras herramientas de disección. Algunos comentarios sobre la técnica:

- ♦ Se ejerce presión suave en la parte posterior del huevo, de modo que su contenido comienza a salir (**Fig.3.1E**). Debido a que la región cefálica se encuentra adherida al corion en el polo posterior, es necesario tener especial cuidado hasta que estas estructuras se desprenden. Una vez que el contenido del huevo se vació en el medio líquido, se procede a separar el vitelo de la banda germinal (**Fig.3.1F**). Para ello se utilizan pinzas finas y otras herramientas de disección. Las corrientes suaves de agua generadas por la pipeta también pueden ayudar a separar el vitelo circundante.

- ♦ Debido a que la limpieza del embrión se realiza en medio líquido y en pequeño volumen, el efecto de capilaridad y la tensión superficial del líquido juegan un papel importante, ya que los movimientos de las herramientas de disección generan

corrientes internas que arrastran al embrión y provocan un efecto de “escape” del mismo. Por otra parte, la práctica en la disección hace que podamos usar en nuestro beneficio estos efectos, por ejemplo para trasladar los embriones evitando que queden pegados a la pinza metálica y se arruinen: el efecto de la capilaridad genera una corriente ascendente entre las puntas de la pinza y arrastra al embrión rodeado del volumen acuoso, evitando así que se deshidrate y que se fragmente (**Fig.3.1G**). Este procedimiento es mejor que manejarlos con pipeta, ya que son propensos a quedar pegados en las paredes del *tip*.

♦ Se ensayaron diferentes tipos de medio líquido, eligiendo condiciones de baja tensión superficial (entre los mejores, se encuentran el PBS, el PFA y el MetOH). También se ensayaron sustancias orgánicas y detergentes con el fin de determinar si estas disolvían el vitelo pero no se logró tal objetivo. El PBS 1X reduce la tensión superficial por su salinidad, pero es inferior respecto a los fijadores. El MetOH es el de preferencia a los efectos de la disección, ya que facilita el trabajo, debido a su bajísima tensión y a la mayor facilidad de eliminar el vitelo; por otra parte, mejora mucho la calidad de las hibridaciones *in situ*, ya que disminuye el ruido y aumenta el contraste. Sin embargo, su efecto fijador es insuficiente para dar robustez a las bandas germinales, que son frágiles y acintadas. Más precisamente, las hace quebradizas. Al culminar el protocolo de tinción, los embriones están destrozados. El PFA al 4%, en cambio, da resultados con mayor ruido y obliga a hacer las disecciones a mayor velocidad ya que, a medida que transcurre el tiempo, el vitelo se adhiere al embrión y se hace más difícil obtener bandas germinales limpias. Sin embargo, tiene la ventaja de otorgar gran robustez y flexibilidad a los embriones para soportar todo el proceso de hibridación; por ese motivo, ha sido el fijador de elección en nuestros experimentos.

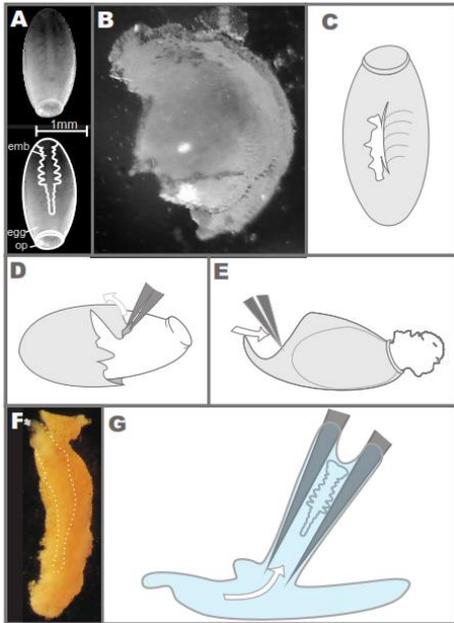


Fig.3.1. Manipulación de huevos y embriones. **A**, Apariencia e interpretación de un huevo embrionado de *R. prolixus*. **B**, Aspecto del corion y su sección transversal. **C**, efectos de la rotura longitudinal del corion. **D**, Método de decorionación de blastodermos enteros. **E**, Método de decorionación para bandas germinales. **F**, Aspecto de una banda germinal rodeada de vitelo luego de ser decorionada por el método mostrado en E. La flecha indica la región cefálica y la línea de puntos ayuda a identificar su localización. **G**, Consecuencias del efecto capilar, útiles para la manipulación de embriones.

B.3.- Tinciones y toma de imágenes

Las tinciones DAPI se hicieron agregando el colorante directamente al tubo *ependorf* con los embriones. Las fotografías fueron tomadas con microscopio de fluorescencia Leica DM 1000, utilizando una cámara de CCD, Cool SNAP-Proof color (Media Cybernetics).

C.- Resultados

C.1.- El desarrollo de *Rhodnius prolixus*

Las primeras divisiones nucleares ocurren internamente en el huevo y no son observables debido a la densidad del vitelo. Según la línea temporal escalada con la de Mellanby, deberían iniciarse aproximadamente 6hs. luego de la puesta (hAEL, del inglés *after egg laying*; Fig.3.2A). Aproximadamente 12hAEL los núcleos comienzan a migrar a la superficie y allí continúan dividiéndose hasta aproximadamente 24hAEL (Fig.3.2B); el huevo permanece sincicial, el vitelo ahora se ubica en la región central del huevo y el citoplasma queda concentrado cerca de los núcleos. Las divisiones ocurren en ondas, empezando desde el extremo anterior del huevo –donde está el opérculo– y avanzando hacia el polo posterior. La Fig.3.2B ha sido desglosada para ilustrar mejor esta situación; Fig.3.2B1 muestra una imagen de una tinción DAPI; en

Fig.3.2B2 se realizó una zonación aproximada de los núcleos mitóticos en distintas fases; finalmente, la **Fig.3.2B3** muestra un detalle de los núcleos mitóticos.

Luego de algunos ciclos de divisiones mitóticas –al menos tres, según **Mellanby, 1934**–, en el blastodermo comienzan a diferenciarse dos tipos nucleares –**Kelly and Huebner 1989**–: aquellos que formarán parte de las membranas extraembrionarias dejan de dividirse muy pronto y permanecen regularmente distribuidos en toda la superficie, con una ubicación constante hasta etapas más avanzadas. Por otro lado, los núcleos que formarán el embrión propiamente dicho son de menor tamaño y de ubicación cambiante, ya que continúan dividiéndose, migran y sufren gastrulación. A partir de las 24hAEL puede notarse esta diferenciación en la región ventral del huevo (**Fig.3.2C**; vista general en **3.2C1**, detalle en **3.2C2**) y a las 30hAEL aproximadamente la diferenciación se ha extendido a toda la superficie del huevo y ambos tipos de núcleos se ven regularmente distribuidos (**Fig.3.2D**, detalle en **3.2D1**, vista general en **3.2D2**).

Entre las 30 y 36 hAEL se producen movimientos dinámicos que marcan el comienzo de la gastrulación y provocarán la formación del rudimento embrionario localizado en el polo posterior del huevo. La gastrulación consiste en la invaginación de las células embrionarias desde el polo posterior hacia la región anterior, con la concomitante migración de las células superficiales hacia la zona de invaginación. El inicio de la gastrulación coincide con la primera etapa de la blastocinesis, llamada anatrepsis, que consiste en la inversión del eje A-P embrionario respecto al eje del huevo.

A medida que el rudimento se forma, empieza a alargarse de modo que, simultáneamente con la gastrulación, se inicia la extensión de la banda germinal (**Panfilio y Roth, 2010; Heming 2003**). La **Fig.3.2E-J** muestra el proceso como una sucesión cronológicamente ordenada, en vistas dorsales, ventrales y detalles. Las vistas dorsales de **E-G** corresponden a los mismos huevos que las vistas ventrales **H-J**, respectivamente. En el polo posterior del huevo se forma una evaginación que se pliega desde la región ventral hacia la dorsal (**Fig.3.2E**). El pliegue se aplasta sobre la superficie del huevo (**Fig.3.2F**) y acciona como un margen de avance que continúa aplastándose sobre la superficie; se produce una invaginación tipo bolsillo por la cual el pliegue se introduce en el vitelo en dirección al polo anterior del huevo (**Fig.3.2G**).

Este pliegue es el primordio de la banda germinal y su margen de avance corresponde al extremo posterior de la misma. En la cara ventral se observa una región con forma de U invertida donde se concentran las células del rudimento embrionario en tránsito hacia el polo posterior del huevo (**Fig.3.2H**). Esta región se acorta concentrándose en dicho polo (**Fig.3.2I,J**). Una vez que se ha producido la invaginación, la banda germinal invaginada migra hacia el polo anterior sobre la región dorsal, inmersa en el vitelo; mientras que en la región ventral del huevo más células embrionarias continúan migrando hacia el polo posterior. La **Fig.3.2K-M** resume esquemáticamente el proceso descrito, mostrando ejes, línea temporal y dirección de movimientos en vistas ventrales (**Fig.3.2K**), dorsales (**Fig.3.2L**) y laterales (**Fig.3.2M**) del huevo.

La región invaginada se extiende rápidamente hacia el extremo anterior del huevo (**Fig.3.3A, B**). El margen de avance corresponde al extremo posterior de la banda germinal y crece a través de una zona de crecimiento (**Fig.3.3C**) hasta formar una estructura delgada y alargada (**Fig.3.3D**). Luego, comienzan a aparecer los apéndices como emergencias pares laterales. A las 48hAEL el embrión posee regiones cefálica, torácica y abdominal diferenciadas (**Fig.3.3E,F**). La mayor parte del embrión plano yace sobre la cara dorsal del huevo (**Fig.3.3E1**), mientras que lateralmente se observa como una delgada línea (**Fig.3.3E2**) y en la cara ventral del huevo sólo se visualizan los lóbulos cefálicos en el polo posterior (**Fig.3.3E3**). Los segmentos cefálicos permanecen dispuestos laxamente a lo largo del eje longitudinal, de manera que su aspecto dista mucho del que tendrán al final del proceso (**Fig.3.3F,G**). A 60hAEL, los lóbulos cefálicos están más desarrollados, la región cefálica es un poco más compacta y los apéndices se han alargado, especialmente antenas y patas (**Fig.3.3H**). Según **Mellanby (1935)**, en este momento hay apéndices transitorios abdominales y premandibulares. Pero tales estructuras no se pudieron observar en este trabajo.

La banda germinal crece y adquiere forma a medida que se alarga y se introduce en el vitelo. Una vez que los primeros 6 segmentos abdominales se diferenciaron, las antenas son prominentes, el estomodeo es evidente y las mandíbulas y maxilas son menores que el labio –que permanece separado– (**Fig.3.3I,J**). Los apéndices torácicos son más largos que los cefálicos; el labro se fusiona. La anatrepsis continúa hasta que el embrión completo queda inmerso en el vitelo, con excepción del extremo anterior –

i.e., los lóbulos cefálicos—. A las 66hAEL la banda germinal alcanza su máxima longitud, que es mayor a la del huevo, de modo que se pliega sobre el eje longitudinal.

En este momento finaliza la anatrepsis y comienza la intertrepsis, es decir, el lapso que transcurre entre este momento y el comienzo de la katatrepsis, entre las 72 y 96hAEL. El embrión se ensancha y se acorta –retracción de la banda germinal–, particularmente en la región abdominal se hace más robusto. El extremo posterior se ubica a la altura del tercio anterior del huevo y alcanza los 10 segmentos; los apéndices se alargan y se ventralizan; los primeros tres segmentos cefálicos están a 90° respecto al resto del cuerpo, apuntando hacia el polo posterior del huevo (**Fig.3.3K**).

El día 5 (120hAEL) ocurre la katatrepsis (**Fig.3.3L**), el embrión se mueve debido a una continua contracción de la serosa, que lo tracciona (**Panfilio, 2008, 2009, Panfilio y Roth, 2010**) y su posición en relación al huevo cambia 180° de modo que la cabeza se ubica en la parte anterior del mismo. La katatrepsis de *R.prolixus* es muy veloz y difícil de documentar, ya que es raro encontrar huevos en pleno proceso. Mientras se produce, los apéndices continúan alargándose y ocurren varios eventos de morfogénesis cefálica, descritos más adelante en el apartado **C.2**. Cuando la katatrepsis concluye, los ejes del embrión y el huevo son coincidentes, tanto el anteroposterior como el dorsoventral. El embrión continúa creciendo lateralmente hacia la región dorsal; sus lados –traccionados por el amnios– rodean el vitelo y lo envuelven (**Panfilio, 2008, 2009, Panfilio y Roth, 2010**). El octavo día AEL el vitelo está totalmente confinado y se produce el cierre dorsal, es decir la fusión dorsal de los bordes laterales del embrión plano para producir un embrión cilíndrico. Entre los días 8 y 14 hay muy poco cambio morfológico externo, pero en cambio ocurre la mayor parte de los procesos organogénicos; se trata de la embriogénesis tardía que no se trata en este trabajo.

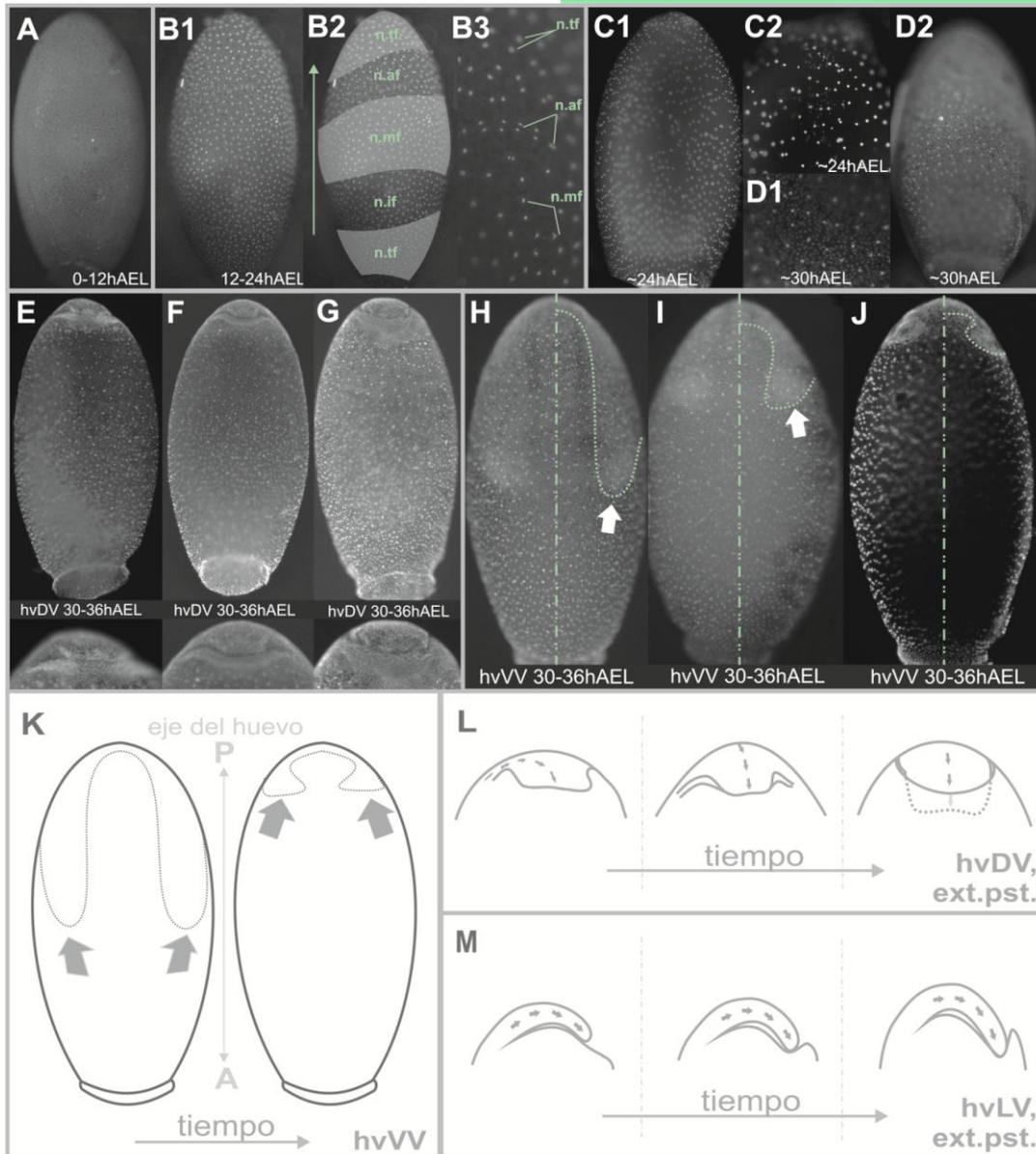
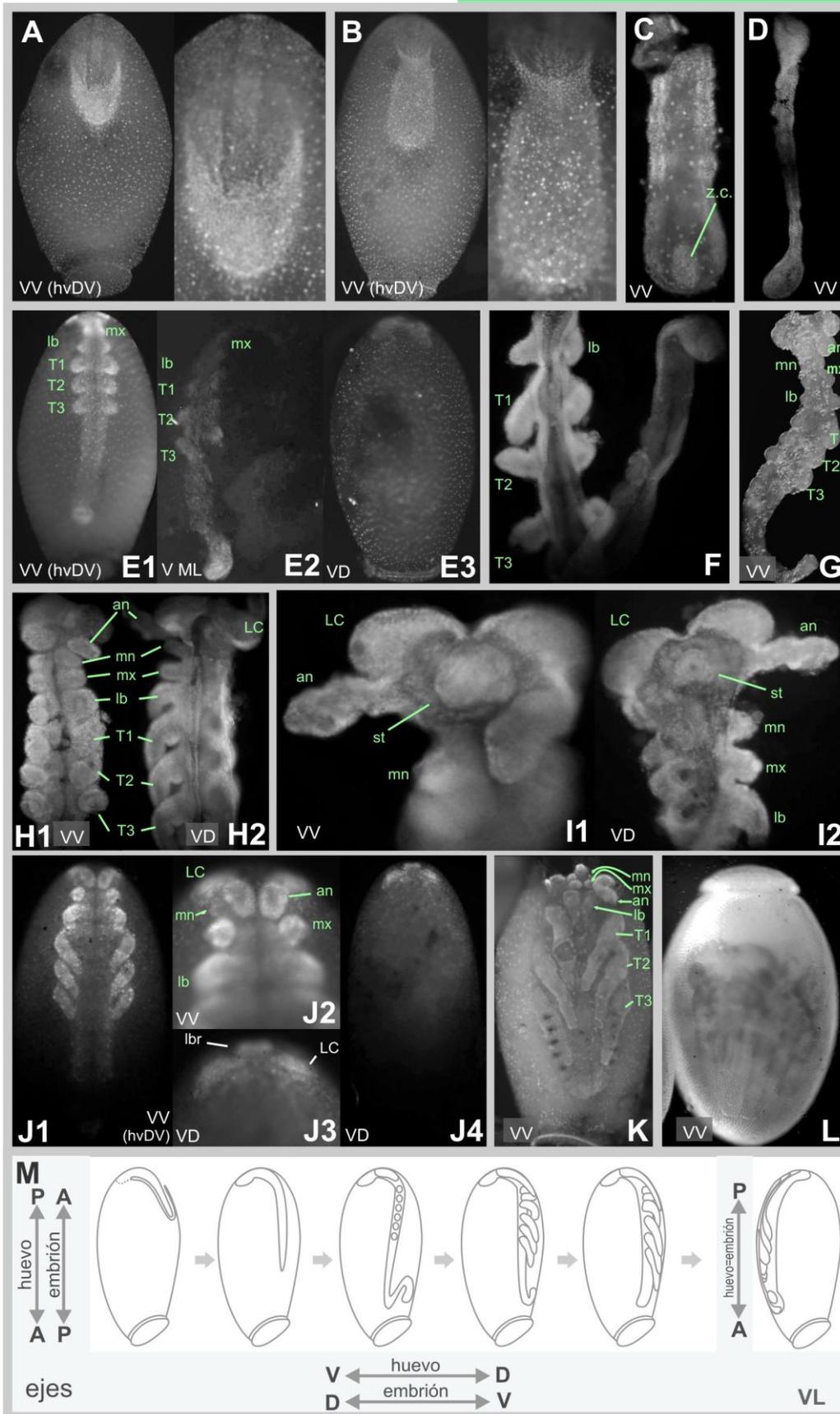


Fig.3.2. Desarrollo temprano de *R. prolixus*. Formación de blastodermo y comienzo de la gastrulación. Tinción DAPI de huevos decorionados. **A**, Las primeras divisiones nucleares ocurren internamente en el huevo y no son observables debido a la densidad del vitelo (el punto brillante que se observa es un artefacto). **B**, Aproximadamente 12hAEL los núcleos son visibles en la superficie y continúan dividiéndose hasta aproximadamente 24hAEL. Las divisiones ocurren en ondas, empezando desde el extremo anterior del huevo. **B1** tinción DAPI; **B2** zonación aproximada de los núcleos mitóticos en distintas fases, la flecha indica la dirección de la onda mitótica; **B3** detalle de los núcleos mitóticos. **C**, ~24hAEL se observan dos tipos nucleares diferenciados; los de mayor tamaño formarán parte de la serosa y los de menor tamaño formarán el embrión propiamente dicho. (vista general en **1C1**, detalle en **1C2**). **D**, A ~30hAEL la diferenciación se ha extendido a toda la superficie del huevo y ambos tipos de núcleos se ven regularmente distribuidos (detalle en **1D1**, vista general en **1D2**). **E-J**, Comienzo de la gastrulación. **E-G**, Vista dorsal del huevo y detalle del extremo posterior. **E**, un pliegue formado en el extremo posterior avanza desde la superficie ventral hacia la dorsal, se aplasta

sobre ella (**F**), acciona como margen de avance y se introduce en el vitelo por una invaginación tipo bolsillo, avanzando hacia el extremo anterior (**G**). **H-J**, vistas ventrales del huevo durante los estados correspondientes a **E-G**; ventralmente, los núcleos pequeños se concentran en dos franjas mediolaterales (**H**) y migran hacia el polo posterior del huevo (**I, J**). **K-M**, Resumen esquemático del comienzo de la gastrulación. **K**, Secuencia de la vista ventral del huevo; la línea de puntos marca la zona de concentración de núcleos del rudimento germinal en formación, las flechas indican el sentido de migración de núcleos; se indica el eje A-P del huevo y el sentido de la línea de tiempo. **L**, Secuencia de la vista dorsal del extremo posterior del huevo. Las flechitas grises indican el sentido del movimiento. La línea de puntos señala el margen posterior del rudimento inmerso en el vitelo. **M**, Secuencia de una vista lateral del proceso; las flechitas grises indican el sentido del movimiento. En todos los casos, el extremo posterior del huevo está localizado en la parte superior de la imagen. **n.tf**, núcleos telofásicos; **n.af**, núcleos anafásicos; **n.mf**, núcleos metafásicos; **n.if**, núcleos interfásicos; **hvVV**, vista ventral del huevo; **hvdV**, vista dorsal del huevo; **hvlV**, vista lateral del huevo; **hAEL** horas pospuesta; **ext.pst.**, extremo posterior del huevo.

Fig.3.3. Desarrollo temprano de *R. prolixus*. Formación y morfología de la banda germinal. **A**, La región invaginada se extiende en dirección al extremo anterior del huevo y continúa creciendo (**B**). **C**, El margen de avance corresponde al extremo posterior del embrión propiamente dicho y crece hasta formar una estructura delgada y alargada. Se señala un acúmulo de células que puede atribuirse a la zona de crecimiento. **D**, banda germinal disectada (reconstrucción por montaje de dos fotos de microscopio confocal). **E**, La mayor parte del embrión yace sobre la cara dorsal del huevo (**E1**), mientras que lateralmente se observa como una delgada línea (**E2**) y en la cara ventral del huevo sólo se visualizan los lóbulos cefálicos (**E3**). **F**, imagen parcial de una banda germinal disectada, se observan los tres apéndices torácicos y los labiales. El abdomen está plegado a la mitad del eje A-P, de modo que tanto el extremo posterior como el anterior están en la parte superior de la foto; se puede notar que el embrión es plano y acintado. **G**, banda germinal media disectada, el tagma cefálico tiene aproximadamente la misma longitud que el tórax. **H**, banda germinal en un estado más avanzado, que se evidencia en su mayor compactación anteroposterior y en la longitud de los apéndices. **I**, vistas ventral (**I1**) y dorsal (**I2**) de la región cefálica de una banda germinal. **J**, banda germinal extendida al final de la anatrepsis, en el momento previo a la retracción (**J1**, vista ventral; **J2**, detalle de la región cefálica, vista ventral; **J3**, detalle de región cefálica, vista dorsal; **J4**, vista dorsal). **K**, banda germinal en proceso de retracción, en el momento previo a la katatrepsis. **L**, embrión al final de la katatrepsis, dentro de un huevo corionado. **M**, esquematización del proceso de formación de la BG en una vista lateral. La mayoría de las fotos corresponden a tinciones DAPI en microscopio de fluorescencia, excepto D que es de microscopio confocal y G y L, que son fotos de lupa. **z.c.**, zona de crecimiento; **an**, antenas; **mn**, mandíbulas; **mx**, maxilas; **lb**, apéndices labiales; **st**, estomodeo; **Cl-L**, clipeo y labro; **CL**,



(Fig.3.3, continuación) lóbulos cefálicos; **T1-T3**, apéndices/segmentos torácicos 1-3; **VD**, vista dorsal; **VV**, vista ventral; **V ML**; vista medio-lateral; **hvDV**, vista dorsal del huevo; **A**, anterior; **P**, posterior; **D**, dorsal; **V**, ventral. A diferencia de la Fig. 3.2, las vistas se refieren al embrión y no al huevo.

C.2.- Foco sobre las estructuras cefálicas

La conformación final de la cabeza se adquiere principalmente durante la intertrepsis y comienzo de la katatrepsis (**Fig.3.4**). En la banda germinal media (~3dAEL; **Fig.3.4A**) los segmentos cefálicos están dispuestos de manera lineal y secuencial. Los apéndices aparecen como estructuras laterales, excepto el futuro labro¹⁹. En el extremo anterior está la región que dará origen al cípeo y al labro –que aparenta ser una estructura par, ya que tiene una hendidura media–, más o menos a la misma altura se encuentran los lóbulos cefálicos. Luego está el segmento antenal, aproximadamente a la misma altura que el estomodeo. Según **Mellanby (1935)**, el estomodeo es anterior respecto a las antenas; luego la posición relativa cambia y junto al estomodeo aparecen dos apéndices transitorios premandibulares, que no se observaron en este trabajo. Luego, y ahora sí en forma inequívocamente secuencial, están los segmentos mandibular, maxilar y labial. En la banda germinal tardía (~4dAEL; **Fig.3.4B**), cuando el embrión ya está pigmentado, todos los apéndices están ventralizados y crecen paralelos al eje A-P. Todos son aún robustos y cortos. Las mandíbulas y maxilas cubren el estomodeo y a su vez, quedan prácticamente ocultas bajo la estructura cípeo-labral y las antenas –que han crecido ventralmente en sentido posterior–. El labro aparece ahora totalmente fusionado, como una estructura redondeada y poco prominente. Sólo los apéndices labiales se asoman todavía claramente por debajo de las antenas. La región donde se formarán los ojos aparece con mayor pigmentación. También el estomodeo está más pigmentado que el resto del embrión, pero sólo puede verse en vistas dorsales, ya que ventralmente queda oculto por los apéndices. Dorsalmente, prácticamente todo lo que se observa corresponde a las capas meso y endodérmicas, que quedarán internalizadas cuando ocurra el cierre dorsal.

A los ~5dAEL (**Fig.3.4C**), cuando el embrión está a punto de iniciar la katatrepsis, las mandíbulas y maxilas se aproximan al estomodeo, rodeándolo; los apéndices labiales aparecen muy juntos en la línea media, debajo de las maxilas. Todo esto está oculto por las antenas y el labro, que ha crecido y tiene forma triangular. En ninguno

¹⁹ Existe discusión respecto al origen apendicular o no del labro. En este trabajo, y en coincidencia con **Mellanby (1935a,b)**, encontramos que se origina como una estructura bífida. Por ese motivo, nos inclinamos por la hipótesis apendicular y le damos ese tratamiento.

de los apéndices cefálicos se observa pigmentación. Las antenas se diferencian de todos los apéndices del embrión por su morfología, ya que no tienen una forma cónica alargada, sino que su ancho es regular en toda su longitud, excepto en el extremo distal, donde se ensanchan y tienen forma redondeada. Dorsalmente, se observan los lóbulos cefálicos que han crecido en esa dirección. Una hendidura media vertical muy marcada por la pigmentación coincide con la futura sutura epicraneal. Los ojos en formación están mejor delimitados por la pigmentación y tienen una posición laterodorsal. Esta región de la cabeza es la única de origen ectodérmico que se observa en una vista dorsal. El estomodeo está ahora totalmente oculto debajo de los lóbulos cefálicos desarrollados. El límite observable entre la capa germinal externa y las internas corresponde, probablemente, al futuro surco occipital o al post-occipital.

Este es el último momento en que la mandíbulas y maxilas son visibles. Los eventos que ocurren entre este momento y la conformación final del aparato suctopizador típico de los hemípteros son muy rápidos y es muy difícil detallar el proceso. Otros autores que han estudiado el tema coinciden en la dificultad para observar y registrar los eventos (**Mellanby 1935; Heming 2003**). Según estudios de la embriogénesis de *O. fasciatus* (**Newcomer, 1948**) y estudios comparativos en hemípteros adultos (**Butt, 1943; Parsons, 1974**), los palpos maxilares y labiales quedan reducidos a unas pocas sensilas, el labio se extiende como un pico tri-segmentado, las mandíbulas y las lacinias maxilares se transforman en cuatro estiletes coadaptados entre sí a lo largo para formar un fascículo encerrado en el labio. Los estiletes maxilares forman internamente dos canales, uno alimenticio y otro salival. Lateralmente están dispuestas las mandíbulas. Junto a las bases de los estiletes mandibulares, hay un par de placas locales, que se cree que tienen origen hipofaríngeo (**Butt, 1943; Parsons, 1974; Heming, 2003**).

Durante el desarrollo, se produce una invaginación de las mandíbulas y de las lacinias maxilares. Allí se formarán las glándulas salivales. Cada uno de ellos se enrolla 2,5 veces dentro de la cabeza y forman cutícula a lo largo de todo el estilete internalizado. Al momento de la eclosión, los estiletes y sus vainas se desenrollan, protruyen y se acomodan en el surco labial. Proximalmente, la mandíbula articula con un apodema de la cabeza, cercano a la antena (**Newcomer, 1948; Heming, 2003**). El

ANEXO VII muestra figuras de la cabeza de un insecto con aparato bucal masticador generalizado y de hemípteros, con aparato succionador.

La katatrepsis es un evento muy rápido. En el momento en que el embrión aparece con sus ejes coincidentes con los del huevo (~7dAEL, **Fig.3.4D**), la cabeza ya tiene un aspecto semejante al que tendrá al momento de la eclosión, con una posición opistognata. Durante ese lapso, el rostro se alargó en sentido ventral y posterior, se produjo la invaginación de mandíbulas y maxilas; crecieron y se fusionaron los apéndices labiales, con un surco dorsal donde se alojarán los estiletes. El clípeo y las antenas continuaron alargándose en sentido ventral y posterior, de modo que el eje A-P se pliega a la altura de la cabeza, dejando las caras ventrales internalizadas respecto al pliegue y las caras dorsales ubicadas hacia el exterior. Las estructuras anteriores quedan orientadas y creciendo en sentido posterior. En esta posición, el extremo anterior del embrión es el vértex. Pese a todo esto, las antenas y el anteclípeo todavía se encuentran casi a la misma altura de los ojos. Las regiones laterales del tronco crecen en sentido medial, formando los tergos –paredes segmentales dorsales– del tórax y el abdomen. Los tejidos mesodérmicos y endodérmicos –que hasta ahora tenían una posición dorsal–, comienzan a quedar internalizados a medida que las paredes del embrión crecen y tienden a juntarse en la línea media dorsal. Estos tejidos son los que mantienen un contacto estrecho con el vitelo, mientras que las regiones externas de origen ectodérmico, desde muy temprano quedan separadas del vitelo por el amnios.

A medida que sigue creciendo (~10dAEL, **Fig.3.4E**), el rostro se alarga todavía más, de modo que el anteclípeo y las regiones proximales del labio y las antenas, parecen estar a la misma altura entre sí, y claramente anteriores respecto a los ojos, si se coloca el embrión en una posición prognata. El labio es una estructura robusta, pero permanece oculto detrás del labro, las antenas y las patas. Los ojos han adquirido mayor grado de desarrollo, tienen ya su morfología general, facetas, y una pigmentación de color rojo intenso. A esta altura del desarrollo, se ha completado el cierre dorsal (**Fig.3.4F**) y ya no hay restos visibles de vitelo, que ha quedado encerrado entre las paredes internas del embrión.

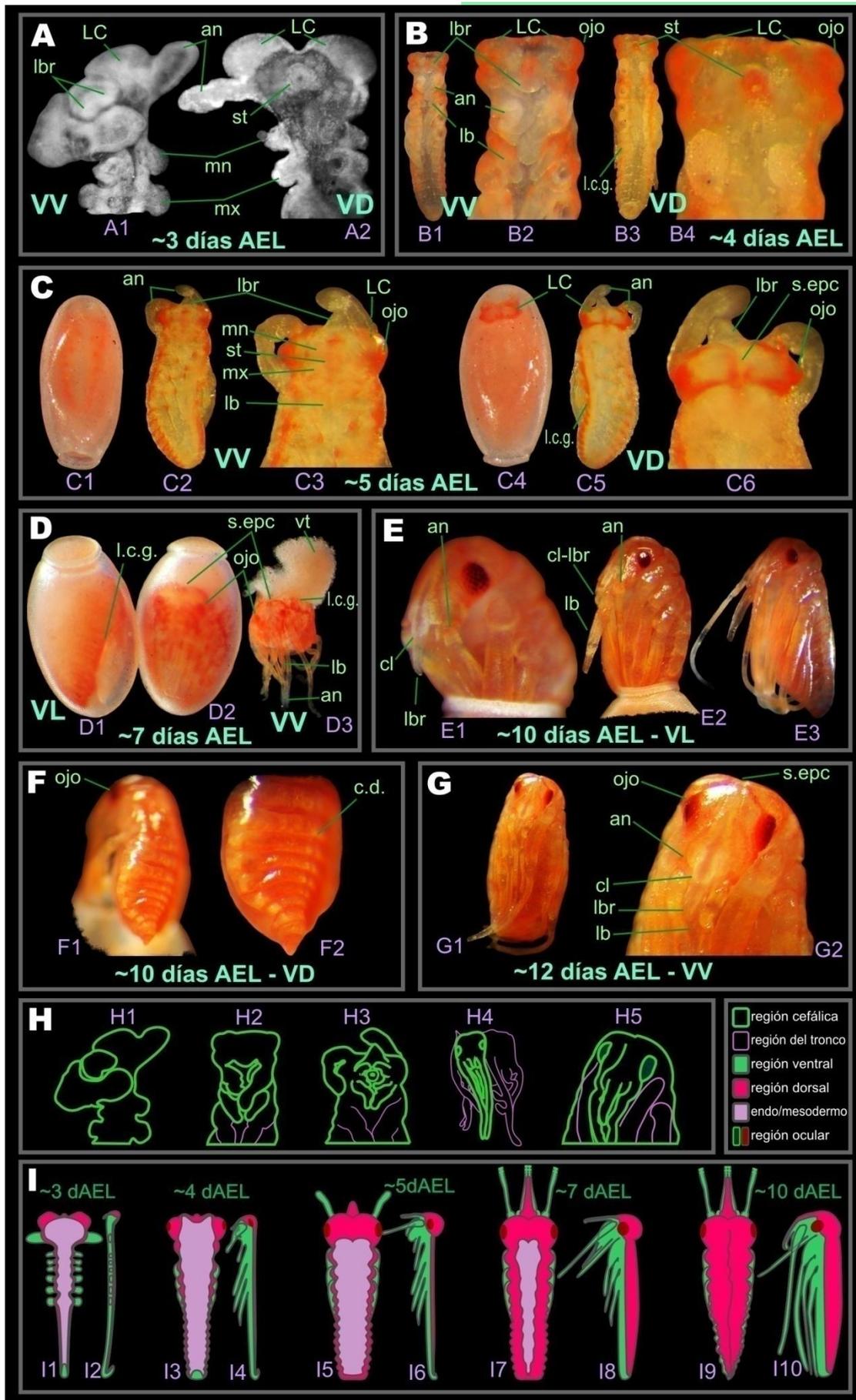
Los cambios externos en las estructuras cefálicas, durante los días siguientes (~12dAEL, **Fig.3.4G**) hasta el momento de la eclosión son mínimos. Continúa muy

lentamente el reacomodamiento de las estructuras cefálicas, aumenta el grado de plegamiento del eje A-P, los lóbulos cefálicos crecen y se hacen visibles en una vista ventral, y los surcos de la cabeza aparecen más marcados. Las antenas, además de su morfología característica, presentan una línea oscura longitudinal, con aspecto filamentoso.

La **Fig.3.4H** muestra una interpretación de las figuras A1, B2, C3, D3 y G2, donde se destacan las estructuras cefálicas, que no son fáciles de distinguir en las fotos para un ojo poco entrenado. En el caso de C3 y H3, especialmente, se trata del momento crucial previo a la internalización de los futuros estiletes. La foto mostrada en C3 es la mejor que he podido obtener en este trabajo, el labro y las antenas están retirados hacia atrás descubriendo la región del rostro.

La **Fig.3.4I** muestra interpretaciones dorsales y laterales del embrión en las distintas etapas, discriminando los tejidos epiteliales de los meso o endodérmicos, que serán internalizados cuando el cierre dorsal se complete. También se muestra la relación aproximada de regiones ventrales y dorsales epidérmicas. Todos los apéndices se consideraron ventrales, excepto el labro.

Fig.3.4. Desarrollo de las estructuras cefálicas. **A.** Embrión de 3 días AEL. Los segmentos cefálicos están dispuestos a lo largo del eje A-P. Los apéndices son pares y laterales en su mayoría. El labro está en la línea media y tiene aspecto par. **B.** Embrión de 4 días AEL. Los apéndices están alargados y comienzan a ubicarse sobre la zona medio-ventral. El labro se observa como una estructura impar. Las antenas y los apéndices gnatales se han acercado, de manera que las mandíbulas y maxilas ya no son tan visibles. Aparece la pigmentación temprana y se distingue la zona donde se formarán los ojos. **C.** Embrión de 5 días AEL. Es el momento previo a la katatrepsis. La banda germinal alcanzó su mayor longitud y está en retracción; todos los segmentos abdominales son visibles. Las patas y antenas se han alargado, pero todavía no alcanzaron la longitud definitiva y tienen un aspecto robusto. El labro tiene forma triangular. Las mandíbulas y maxilas son muy difíciles de ver, están ocultas por el labro y las antenas, que permanecen sin pigmentar. Los futuros ojos están mejor delimitados y dorsalizados; prácticamente no se ven en vistas ventrales. La zona de la sutura epicraneal también se diferencia claramente. Hasta este momento del desarrollo, las vistas ventrales del embrión consisten en estructuras de origen ectodérmico y las dorsales son de origen meso o



(Fig.3.4. continuación) endodérmico. Los límites entre las capas germinales se encuentran en las regiones laterales del embrión, excepto en la porción anterior, donde los lóbulos cefálicos están dorsalizados. La pigmentación es lo suficientemente intensa como para que el corion deje traslucir el embrión. **D.** Embrión de 7 días AEL. La katatrepsis está finalizando y se ha iniciado el cierre dorsal, encapsulando el vitelo remanente dentro del embrión. Dorsalmente, se observan los futuros tergos creciendo hacia la línea media. Los apéndices continuaron alargándose y comienzan a adquirir su aspecto definitivo. El rostro también se alargó, reposicionando los ojos de manera que ahora se ven en vistas ventrales. **E.** Embrión de 10 días AEL. Externamente, el embrión tiene un aspecto muy similar al que tendrá al momento de la eclosión. Los ojos se observan como estructuras bien formadas, laterales, muy pigmentados y con facetas claramente distinguibles. Todo el embrión tiene brillo, debido a que se inició la formación de una epicutícula muy delgada. **F.** Embrión de 10 días AEL con el cierre dorsal completado; se observa la cicatriz en la zona de unión. **G.** Embrión de 12 días AEL, muy próximo a la eclosión. Externamente no se diferencia de un embrión a término, los procesos organogénicos finales están ocurriendo internamente. La cabeza tiene una posición bien opistognata y todo el cuerpo es compacto y ovoide, lo que le permitirá hacer la presión necesaria para abrir el opérculo. **H.** Esquematación de vistas ventrales. Se indican en verde las estructuras de origen cefálico y en violeta las restantes. H1-H5 corresponden a las imágenes A1, B2, C3, D3 y G2, respectivamente. **I.** Esquematación de las distintas etapas en vistas dorsales y laterales, enfatizando el origen ectodérmico (magenta) vs. endo/mesodérmico (lavanda) de las regiones observadas y una delimitación aproximada de las regiones ventrales (verde) vs. dorsales (magenta). **lbr**; labro; **s.epc.**; sutura epicraneal; **an**, antenas; **mn**, mandíbulas; **mx**, maxilas; **lb**, apéndices labiales; **cl**, clípeo; **st**, estomodeo; **LC**, lóbulos cefálicos; **vt**, vitelo; **l.c.g.**, límite entre capas germinales; **VD**, vista dorsal; **VV**, vista ventral; **V ML**, vista medio-lateral; **A**, anterior; **P**, posterior; **D**, dorsal; **V**, ventral; **AEL**, pos-puesta (*after egg laying*); **dAEL**, días pospuesta.

D.- Discusión

Se registraron y revisaron los principales eventos del desarrollo temprano de *R. prolixus*. Además, se agregaron esquemas basados en observaciones propias. Si bien todo esquema es una interpretación, los que presento aquí son acordes con la bibliografía existente tanto para *R. prolixus* como para otras especies con desarrollo semejante. No he encontrado en esta bibliografía una esquematización clara y detallada de los complejos movimientos que ocurren durante el desarrollo de banda

germinal corta. Una notable excepción son los trabajos realizados recientemente por **Panfilio (2008, 2009)**, pero ella se focaliza en lo referente a las membranas extraembrionarias. Por este motivo, espero que los esquemas presentados aquí sean un interesante aporte en este sentido.

Este tipo de desarrollo implica muchos cambios morfológicos y no es fácil de comprender, pero puede resumirse básicamente en banda germinal temprana, media y tardía; y embrión tardío. La **Fig.3.5** resume y esquematiza los procesos relatados. La **Fig.3.5A** muestra los cambios morfológicos externos que sufre un embrión de banda corta/intermedia en las primeras etapas de su desarrollo. Inicialmente, la masa de células crece longitudinalmente formando un embrión plano y alargado, sin apéndices ni segmentación distinguibles (**Fig.3.5A-1**). Una vez alcanzada cierta longitud, los apéndices comienzan a hacerse visibles como estructuras pares; laterales o ventrolaterales. En este momento, es posible distinguir la tagmatización y parte de la segmentación del embrión (**Fig.3.5A-2**). El embrión plano continúa creciendo en tamaño; se hace más robusto y los apéndices se alargan aunque permanecen con una morfología poco diferenciada (**Fig.3.5A-3**). Posteriormente, el embrión modifica su posición dentro del huevo mediante la katatrepsis. Los apéndices embrionarios adquieren su forma, localización y tamaño definitivos. A continuación, los bordes laterales del embrión crecen y se fusionan dorsalmente rodeando el vitelo remanente, en un proceso llamado Cierre Dorsal, de modo que la región antes dorsal ahora se ubica internamente en el embrión tubular. La **Fig.3.5A-4** muestra una vista ventral, una ventro-lateral con los apéndices desplegados y una dorsal, donde se observa un embrión con un aspecto externo muy semejante al que tendrá al momento de eclosionar –en el caso de *R. prolixus*, esto implica la fusión del labio en una estructura única, media, con forma de vaina–. Las mandíbulas y maxilas, convertidas en estiletes, están envueltas por esta vaina formando el típico aparato bucal succionador de los hemípteros (vista medio-lateral de **Fig.3.5A-4**). En este momento culmina la primera etapa del desarrollo, conocida como desarrollo temprano y comienza la organogénesis –desarrollo tardío–. La **Fig.3.5B** muestra los principales eventos sobre una línea temporal.

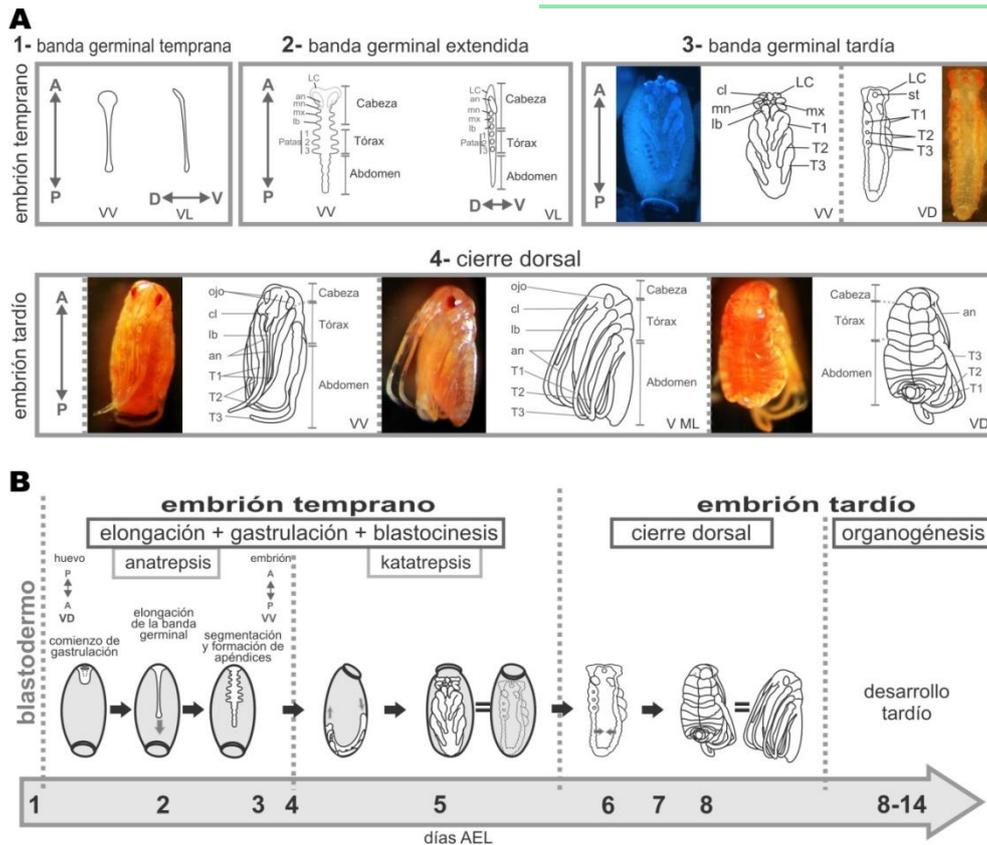


Fig.3.5. Desarrollo temprano de *R. prolixus*. Resumen de los principales hitos. **A**, los cambios morfológicos externos que sufre un embrión de banda corta en las primeras etapas de su desarrollo, pueden resumirse como banda germinal temprana, media y tardía, y embrión tardío (cierre dorsal). Inicialmente, la masa de células crece longitudinalmente formando un embrión plano y alargado, sin apéndices ni segmentación distinguibles (**A-1**). Una vez alcanzada cierta longitud, los apéndices se hacen visibles como estructuras pares laterales. En este momento, es posible distinguir la tagmatización y parte de la segmentación del embrión (**A-2**). El embrión plano continúa creciendo en tamaño; se hace más robusto y los apéndices se alargan aunque permanecen con una morfología poco diferenciada (**A-3**). **A-4**, vistas ventral, ventro-lateral y dorsal; se observa un embrión con un aspecto externo muy semejante al que tendrá al momento de eclosionar. La vista ventro-lateral tiene los apéndices desplegados, mostrando el labio como una estructura única, medial. Las mandíbulas y maxilas, convertidas en estiletes, están envueltas por esta vaina formando el típico aparato bucal sucto-picador de los hemípteros. **B**, se muestran los principales eventos sobre una línea temporal; las flechas dentro del huevo indican los movimientos blastocinéticos. **an**, antenas; **mn**, mandíbulas; **mx**, maxilas; **lb**, apéndices labiales; **cl**, clípeo; **st**, estomodeo; **LC**, lóbulos cefálicos; **VD**, vista dorsal; **VV**, vista ventral; **V ML**, vista medio-lateral; **A**, anterior; **P**, posterior; **D**, dorsal; **V**, ventral.

Finalmente, según se señaló en el capítulo 1, algunos autores plantean que aún está pendiente de definirse el alcance y universalidad de la zona de crecimiento de la

banda germinal ya que aparentemente los reordenamientos celulares podrían tener una función importante en la elongación. Mis observaciones no son concluyentes en este sentido, ya que no he realizado un seguimiento del linaje celular que permita confeccionar un mapa de destino ni de la actividad de división. Esto tampoco se ha realizado en otros insectos fuera de *D.melanogaster* y *Tribolium castaneum*, y es un campo pendiente del desarrollo. Sin embargo, las imágenes muestran una zona muy marcada de células pequeñas y aglomeradas en la región de la presunta zona de crecimiento, en estados tempranos de la elongación de la banda germinal. Sumado a esto, los efectos de la *cad*^{ARNi} –que presento en el próximo capítulo– señalan hacia una falta de actividad mitótica en la zona de crecimiento, ya que parece poco probable que la banda extendida se pueda generar sólo a partir de reordenamientos de las células que conforman las regiones cefálicas observadas en los fenotipos más extremos.

Capítulo 4

Análisis funcionales y de expresión



A.- Introducción

Este Capítulo se centra en los aspectos experimentales; especialmente aquellos relacionados con la expresión y los fenotipos de pérdida de función de dos TF de interés: *scr* –un gen *HOX* canónico– y *cad* –un gen tradicionalmente asociado al establecimiento del eje A-P–. La proteína Cad está entre los reguladores maestros de los genes *HOX*, pero también hay indicios de que ella misma puede tener función *HOX* en el último segmento de *D.melanogaster* (Moreno y Morata, 1999).

Una porción importante de este trabajo consistió en establecer las condiciones óptimas para las técnicas a utilizar. Los aspectos técnicos resultantes se detallan en la sección Materiales y Métodos. Sin embargo, en el apartado de Resultados se hace un comentario general al respecto. La puesta a punto, se realizó en colaboración con la Dra. Lucía Pagola, (Pagola, 2012). Los protocolos detallados y el instrumental se encuentran en el ANEXO I.

B.- Materiales y métodos

B.1.- Amplificación, clonación y secuenciación

Para la obtención de secuencias específicas, se usaron búsquedas por PCR con *primers* degenerados y análisis *in silico*. La mayoría de las búsquedas experimentales habían sido iniciadas en el curso de mi trabajo de graduación (Esponda-Behrens, 2008). El método de búsqueda *in silico* tiene fundamento similar. Inicialmente, usando la base de datos de trazas genómicas, se buscaron una a una las todas variantes más relevantes de motivos cortos de H1 y H3. Luego se extendió la búsqueda a pequeños motivos conservados ajenos al HD. Cada una de las trazas resultantes se identificó mediante BLAST y se extendió con los métodos explicados en la Parte I, referida al trabajo *in silico*.

Se diseñaron *primers* específicos para todos los genes *HOX* y algunos otros TF, según se muestra en la Tabla 4.1. Para todas las secuencias se usaron versiones con y sin el *tag* T7, según los objetivos puntuales de cada amplificación. En la mayoría de los casos, el diseño se basó en los resultados arrojados por el *software online* Primer3, disponible en <http://simgene.com/Primer3>; en todos los casos, se hizo una selección y corrección manual posterior.

Tabla 4.1. Primers utilizados para amplificar genes con HD.

primer	secuencia	Blanco
G4T7forw	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GGCCATTACGGCCGGGG	Rp- <i>scr</i> Forward c/T7 p/ARNi
G4wmish	GGCCATTACGGCCGGGG	Rp- <i>scr</i> Forward sin T7 para molde de sonda ISH
G4T7rev	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> CCGCCTCCACCGCCACCG	Rp- <i>scr</i> Reverse c/T7 p/ARNi
RpT7abdA-F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GATGCAGCTACTGGTGGTGA	DAATGGD en Rp-abdA: c/T7 p/ARNi
RpT7abdA-R	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> TCCAATTTGCGCTGTTTCTC	EKQAKLE en Rp-abdA: c/T7 p/ARNi
RpT7abdB-F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> TCAAACCTGGCCATTACACA	QTGPLH en Rp-abdB: c/T7 p/ARNi
RpT7abdB-R	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> CCAATTCCTCGTTTCTGT	QKRWEL en Rp-abdB: c/T7 p/ARNi
RpT7antp-F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> AGGCCGACAAACCTATACCA	GRQTYTR en Rp- <i>antp</i> : c/T7 p/ARNi
RpT7antp-R	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> TCAATTGAGCGGAAGTCTGC	QTSPQ— en Rp- <i>antp</i> : c/T7 p/ARNi
T7cad-F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> CGACTGGAAGTGGAGAAGGA	RLELEKE en Rp- <i>cad</i> : c/T7 p/ARNi
cad-Sonda-F	CGACTGGAAGTGGAGAAGGA	RLELEKE en Rp- <i>cad</i> para molde de sonda ISH
T7cad-R	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> CATTGCCAACTGTTGCATCT	KMQQLAM EN Rp- <i>cad</i> : c/T7 p/ARNi
RpT7dfd-F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GATACCAACCGGAATGGAG	YQPGME en Rp- <i>dfd</i> : c/T7 p/ARNi
RpT7dfd-R	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> TAAGCGGTGAGTCCGTAGT	YGLTAL en Rp- <i>dfd</i> : c/T7 p/ARNi
RpT7lb-F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GCTGGTAGTCCAGGAGCT	AGSPGA en Rp-lb: c/T7 p/ARNi
RpT7lb-R	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GCTGCGATTCCCTACTATC	DSRESQ en Rp-lb: c/T7 p/ARNi
RpT7pb-F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GCAGGCCAAGAAGAATTGAG	NCELPPG en Rp-pb: c/T7 p/ARNi
RpT7pb-R	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> CCAGGTGGGAGTTCACAGTT	CRPRRIE en Rp-pb: c/T7 p/ARNi
RpT7UbxF	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> TCCATTGGGTTGGGTATGT	PLGLGM en Rp-Ubx: c/T7 p/ARNi
RpT7UbxR	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> CCGTGTTGATACTGCACTGG	QCSINT en Rp-Ubx: c/T7 p/ARNi
RpT7apt-F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GCGCACATCATTTAAACATCA	RTSFKHH en Rp- <i>apterous</i> : c/T7 p/ARNi
RpT7apt-R	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> CTTGACGCATCAGATTTCCGC	RNLMRQ en Rp- <i>apterous</i> : c/T7 p/ARNi
RpT7en-F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GAAACAGTTTGCCAGCTTG	ETVWPAW en Rp-en: c/T7 p/ARNi
RpT7en-R	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> TGTAGAGTCTTGGGCCATC	MAQGLY en Rp-en: c/T7 p/ARNi
T7eve-F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> TCCTTATCCGGCGTATTACC	PYPAYY en Rp-eve: c/T7 p/ARNi
T7eve-R	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GGCTGGAAGAGCTTCTGTG	HKKLFQ en Rp-eve: c/T7 p/ARNi
RpT7soF	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GAGCGAAAGCTATGGTTGCAT	AKAMVA en Rp-so: c/T7 p/ARNi
RpT7soR	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GCAGCTCTATCCCTTTGTGC	RQRDRAA en Rp-so: c/T7 p/ARNi
ARNiAMPI FWD	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GAACTGGATCTCAACAG	regiones codificantes de gen de resistencia a ampicilina (β -lactamasa)
ARNiAMPI REV	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GATCTTCACCTAGATC	

Las amplificaciones se realizaron utilizando las condiciones de trabajo indicadas en las **Tablas 4.2** (programa de PCR), **4.3** (mix) y **4.4** (temperaturas de *annealing* que se determinaron experimentalmente para cada caso).

Tabla 4.2. Programa de PCR:

n° ciclos	Pasos
1	94°C x 5min
30	94°C x 30seg → Ta° x 30seg → T _{Taq} ° x 1min
1	T _{Taq} ° x 5min

Ta°= T° *annealing* según se indica para cada muestra en la tabla de abajo.

T_{Taq}°= T° óptima de extensión para la Taq en uso, generalmente 74°C (o 72°C)

Tabla 4.3. MIX PCR

reactivo	cant por cada 10µl
H2O	6,89µl
buffer 10X	1 µl
ClMg (25mM)	0,6 µl
dNTP mix (10mM)	0,2 µl
primer F [10µM]	0,5 µl
primer R [10µM]	0,5 µl
muestra [~300ng/µl]	0,25 µl
Taq (InbioHighway)	0,06 µl

Tabla 4.4. T° y Tamaños para C/muestra

muestra	Ta°	tamaño esperado del amplicón
<i>scr</i>		~830pb
<i>dfd</i>	54°C	~620pb
<i>so</i>	54,5°C	~430pb
<i>lb</i>	53°C	~450pb
<i>antp</i>	53,5°C	~280pb
<i>ubx</i>	54,5°C	~490pb
para las muestras restantes no se ha determinado una Ta° óptima		

Previamente se preparó ADNc con el SMART™ ADNc Library Construction Kit (Clontech). Se usaron dos tipos de ARN, uno proveniente de una muestra conteniendo distintos estadios –huevos, larvas y adultos, machos y hembras, alimentados y sin alimentar– y una segunda muestra conteniendo sólo huevos de 0 a 3 días.

Las amplificaciones se hicieron a partir del ADNc –en algunos casos en que no había intrones también se usó ADN total como molde–. Los productos de PCR se clonaron en pGEM-T; se realizaron transformaciones y cultivos. Se eligieron colonias, se chequearon por PCR, se hicieron minipreps y purificaciones. Los clones seleccionados se secuenciaron en MACROGEN y se conservaron alícuotas de *stock*. Para los casos en que no se pudieron determinar las condiciones óptimas, en el apartado C (Resultados) se detallan algunas de las condiciones ensayadas, según cada secuencia.

Los controles negativos de las PCR se hicieron con agua milli-Q en lugar del molde.

B.2.- WMISH y preparación de sondas

Se hicieron tinciones para *scr* y *caudal*. Se usaron los *primers forward* sin T7 y los *reverse* con T7 de la **Tabla 4.1** para generar los moldes de la sonda. Las sondas se prepararon a partir de los productos de PCR usando el RNA labeling kit de Böeringer.

Las hibridaciones se basaron en el protocolo de Böeringer Genius kit (**Tautz and Pfeile, 1898**). Esta versión está adaptada a partir de la versión de Martin Klinger, (Gergen Lab 7/91; Göttingen) para *D.melanogaster*, algunas de las modificaciones agregadas para el tratamiento de hemípteros se basaron en **Liu y Kaufman (2004a)**. Como control negativo se usó sonda *sense*.

B3.- ARNi y generación de ARNdc

Se prepararon moldes mediante PCR usando *primers* específicos con adaptadores en 5' conteniendo la parte principal del promotor T7. Los productos de PCR se usaron como molde de transcripción, de modo que se generaron las cadenas *sense* y *antisense* en una misma reacción. Se hicieron controles de calidad y cuantificaciones en gel de agarosa 1% con BrEt.

Una vez generado el ARNdc, inmediatamente se procede a la microinyección de hembras adultas, preferentemente vírgenes. No deben estar alimentadas, para que no estén en período fértil y para que no haya presión hacia el exterior –con consecuente pérdida de hemolinfa, arrastrando el ARN a través de la herida–. Es preferible inyectar el menor volumen posible, entre 1 y 5µl. Con 1µg final de ARN se lograron buenos resultados. La microinyección se realiza en el abdomen, entre 4° y 5° o 5° y 6° esternito abdominal, en la región medio-lateral para no dañar órganos, la aguja se coloca en un ángulo muy agudo y orientada desde atrás hacia adelante, paralela y cercana a la zona pleural. Esta forma es la que ha resultado menos lesiva y con menor mortandad (**Fig.4.1**). A los dos días pos-inyección la herida suele estar cicatrizada y ha disminuido el *stress*, de modo que es posible alimentarlas y colocar machos en el frasco para que comience la oviposición de huevos fecundados.

Como control negativo, se usó ARNdc de β -*lactamasa* (**Araujo et al., 2007**), gen de resistencia a ampicilina ausente en eucariotas.



Fig.4.1. Inyección de ARNdc en hembras adultas. La hembra se sostiene entre los dedos índice y pulgar, y se introduce la aguja para la microinyección entre los segmentos 4º y 5º o entre el 5º y 6º.

B4.- Preparados cuticulares

Las larvas se fijaron durante 2-3hs. en etanol absoluto, luego se las sumergió en KOH1%, O.N. o hasta completarse degradación de los tejidos blandos. Una vez que las cutículas estuvieron vacías, se hizo una deshidratación en una escala ascendente de etanol y luego en xilol durante 30-45 minutos. Finalmente, fueron montadas en portaobjetos con bálsamo de Canadá.

B5.- Microscopía y toma de imágenes

Las fotomicrografías de embriones WMISH fueron tomadas en Microscopio óptico Leica (DM1000 con Cámara DFC 290) y en lupa Leica (Leica MZFLIII), usando una cámara Sony H2. Las fotomicrografías de preparados cuticulares fueron tomadas en lupa (Leica MZFLIII) y en microscopio confocal Zeiss (Carl Zeiss Laser Systems LSM 510) utilizando la autofluorescencia propia del exoesqueleto en el rango de 505-530nm.

C.- Resultados

C.1.- Validación de los métodos *in silico* – secuenciación y clonación

Las amplificaciones para los genes *scr*, *lb*, *dfd*, *antp*, *ubx*, *cad* y *so/six1* dieron como resultado un fragmento de tamaño esperado y cuya secuencia correspondía al gen. Los clones con estas secuencias se usaron como molde para interferencia y sondas.

Para los genes *pb*, *abdA*, *abdB*, *eve*, *en* y *apt*, los fragmentos obtenidos tuvieron diferencias de tamaño, no se obtuvo un fragmento único, o no se obtuvo ningún fragmento. Algunos de ellos se secuenciaron y los resultados confirmaron que no pertenecían al gen en cuestión. En el caso de *apt* se detectó *a posteriori* un error, mediante el cual se buscó un artefacto producto de dos genes muy semejantes –*apt1*

y *apt2*–. Para las secuencias restantes, el hecho de que no se hayan podido amplificar puede deberse a condiciones de reacción, características de los *primers* o errores en los empalmes teóricos. Es digno de destacar que 4 de las 5 secuencias renuentes a la amplificación tienen sitios teóricos de *splicing*.

C.1.1.- *labial*

Se amplificó una secuencia de 409pb, correspondiente a la región sombreada:

```
MMTMNVGMYGTYAQGEPPFGVDYEATGQYFDNESHQHLSGYDQYQYHELPANGKHGEYYPGQDVIITSNGL
SYTNLDYNYPCAKGDVYHQERNLHIHGQDYLDNFQEI EHYHHHHHHMQSVSHPVQEMHYGPTVKEEILHQ
QPQQSHLGHHSHQHOFESGLQGQFQAAQTAQQSRLHHSQQQQQQQPSVPTYKWMQVKNRNVKPSGA
LLNNTGRTNFTNKQLTELEKEFHFNKYLTRARRIEIASALQLNETQVKIWFQNRMRKQKRMKEGLLPGS
VSSSVIQDQGSTSGASASGTSVAVCLQALGNSSTNSPTTVHQDHLHLGMSTTSEDSRESQL
```

C.1.2.- *proboscipedia*

Se diseñaron *primers* para amplificar una región de 229pb correspondientes a la secuencia sombreada. Se probaron condiciones de reacción estándar a $T_a = 52^\circ\text{C}$. Se obtuvieron dos bandas, una por encima y otra por debajo del tamaño esperado –el producto de PCR debe tener un tamaño de ~270pb, ya que se suman 40pb de los T7 agregados–. Se envió a secuenciar la banda de menor tamaño y se vio que no correspondía a *pb*.

```
MRGKQPQQPTSQQQQQPQPQPHGPQTQQQEHVVDQQHEPDDDDDEGEEEEYLLKAGRNPAGGGPDEMGVV
VPPGPPPHQQFVPSHQGFWMSAVSAAATGMGDMIPGESGFISSQPSMAEFILPHHMTAGDMSPPGQPQP
SYPQPMDDQQAVQYEPWMKEKKTARKSNQQENGLPRRLRTAYTNTQLLELEKEFHFNKYLCRPRRIEIAA
SLDLTERQVKVWFQNRMRKHKRQTLSKQGEEGDEKEPGGKAGKGDKGLLGHDETSKKSQCNCELPPGMLG
EHLTSRTNNNNNNSTSYNNNSNASSGASSVTSTTSSFEKLEEDSRSNESRVLTSPGLLPVKRPNEVVVKT
ETGISMCASSPGNNKKLCKDTRLISPEIAIKGALTPASTPGTPTAGTSPLEMPGQYVVQARRGSPTAAT
AIATATASVTAVLPNPSVNNLVQVVRCAAPNNFSPPPPQQRHPVNAEYRMAQYRQQFTREYTTQORVYPN
SDYRQQNPASRPNGMHPPRARQGYQQGQYQQYCNVYNGYNQEYYNQRQYQYDSYPGSTNYGSHGYN
EVMAHETNTTNNSTTVGNTGYQENYQHVDYSPGKPPPTQPGYIEIGHQGEASVNPVNHYGVSPPDFPSN
QHGGTASVMTPPNSVRTDSSSGEYNSLHHFYNAEQQNNPQHASSENSSSDFNFLTNLANDFAPEYYQ
LS
```

C.1.3.- *deformed*

La región secuenciada de *dfd* se envió al Genbank (JX089964). Se amplificó una región de 577pb, correspondiente a la región sombreada:

MSSFLMNSPSYHHQAVLVDPKFPPTTEEYSQSNYITSDFFGHHHHHHHHVHHPATATAPPNGAAPNYGPSAY
GQQQPTQHHHSAQPHHAASQQHQYLGHHQYSSNYQYYPLPSQDVHGLSTTADGQPPPPPTLLQAPCPPQ
THEDSPKSSSPGQGHQGPDDSDHDTLDEDELLMDDNSSPLTIDESSESGDRVIYPWMRKIHVAVNGT
YQPGMEPKRQRTAYTRHQILELEKEFHFNKYLTRRRRIEIAHTLCLSERQIKIWFQNRMRKFKKDNKLPN
TKNVRKNGQAPPVKKSSRARGNGGGSERRRSQDILGTTTGNISEDGHTASVLGGNELGSNTPGQQHSL
SSAAAAYPPPPSLAALGHHLTPLQPATLHAACGPLHQPPISIKNSDYGLTAL

C.1.4.- *sex combs reduced*

La secuencia completa de *scr* se envió al Genbank (FJ694871). Se amplificó una región de 828pb, correspondiente a la región sombreada:

MSSYQFVNSLASCYQQGAGGGQSRGASPVQHGHPQSPASEYYSNVNYPGGCYSPOQYPGQYMQQSPSAM
MDYTQLHTAAQQHQRLATHLQPLARHHGVPSPGAVSPIKNNNTTVTNLSNSTSCKFADSAAAASAAGGAA
NGLGSPQDLTTTTSVPGRTSPPLVKTSLSHSPSNPSSRTPSSGVQPASHTSSSPASSTSSSTSPGGGGGGG
GSGGGSTSSAKTPAGNPPQIYPWMKRVHLGQSTVNANGETKRQRTSYTRYQTTLELEKEFHFNRYLTRRRR
IEIAHALCLTERQIKIWFQNRMRKWKKENKMASMNVIPIYHYHMSQPYANPYQFTHLTT

C.1.5.- *antennapedia*

La región secuenciada de *antp* se envió al Genbank (HQ329079). Se amplificó una región de 238pb, correspondiente a la secuencia sombreada:

MSSYFANSYMPDLRNGGVVSAEHPHQHHYGAAVVPQGNEDPTACDPTVLRQGIPPHHYGGPPTAGQPPQ
GMPYPRFFPPYDRMDIRAAGYYQNDYRADSPGSMAGGGGGGGGHHMNQANGHQTPVVYASCKLQAAVNGN
IGGPESPPMEMSHHPPGHPPGHQHHMAPHQHHAQNAQSAQPPPNQQHMMYNSQPPQAPAHHPQQQV
QQPPPNQQAQNNNNNNNSNLPSPLYPWMRSQFERKRGRQTYTRYQTTLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHA
LCLTERQIKIWFQNRMRKWKKENKTKGDIGANDGSDLSPQTSPO

C.1.6.- *ultrabithorax*

Se amplificó una región de 446pb, correspondiente a la secuencia sombreada:

MNSYFEQTGFYGSHHHQSTTAAHHHDQTAAAYRFPGLGMSPYASSQHHHHHSLHQRPPQDSPYDASVA
AACKLYSSSNENQTSVNYSTTAKPDCSKTEGGAPAHQNGYAAVVAAAANKDVWQSASAASTPSSTNPLVR
PSACTPDTRYLGDTAGGSPGSASRTSSSSSLAPASWNQCSINTAAAQPPVGTQLHQAGNHTFYPWMAIAV
FFFVLGANGLRRRRGRQTYTRYQTTLELEKEFHNTNHYLTRRRRIEMAHALCLTERQIKIWFQNRMRKLLKKEI
QAIKELNEQEKQAQAQKAAAAAALVAQQQDH

C.1.7.- abdominalA

Se diseñaron *primers* para amplificar una región de aproximadamente 569 a 603pb correspondientes a la secuencia sombreada²⁰. Se probaron condiciones de reacción estándar a $T^{\circ}a=57^{\circ}C$; $54,2^{\circ}C$; $54^{\circ}C$; $52,8^{\circ}C$; $52,1^{\circ}C$; $50,9^{\circ}C$; $49,5^{\circ}C$; $48,1^{\circ}C$. También se modificaron las concentraciones de *primer* –aumentada hasta 10 veces– y de molde –aumentada 2,5 veces–. En todos los casos, se agregaron 5 ciclos iniciales a $T^{\circ}a=45^{\circ}C$, menos restrictiva. También se ensayaron los dos tipos de ADNc disponibles (temprano y total).

Sólo se obtuvo una banda muy tenue en condiciones de reacción de máxima concentración de molde e intermedia para *primers*, a $T^{\circ}a=50,9^{\circ}C$, usando el ADNc de todos los estadios. A partir de ese momento, se usó una $T^{\circ}a=51^{\circ}C$. Al repetir, no fue posible obtener la banda *de novo*, pero sí se logró reamplificar la banda previa. Sin embargo, la secuencia resultante no correspondía al gen.

```
MSKFIIDSMLPKYHQYHHQLLNPVITTTSSSSDSSAVNYSSSTASANNSSSSSSSSPPPSLVSSASRMYPYV
HHHHGQQAGLAAFAAGSPATMGAFSSPSSALAAVVDAAATGGDKSCRYTGNVPTPDSMVNYSLHHQNGASA
ASVSAASASMAAAAQFYHQAAAASADPLSSCTTQVANAATGQPMPDIPRYPWMSITDWMSPFDRVCGML
PGPNGCPRRRGRQTYTRFQTLLELEKEFHFNHYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRMRKLLKELRAV
KEINEQARREREEQDRMNKEKQAKLEQQAAAGVQAPPPGAHVHLHDPHKLMSGLDKGGDLLKAVVTKVPT
```

C.1.8.- abdominalB

Se diseñaron *primers* para amplificar una región de aproximadamente 635 a 711pb correspondientes a la secuencia sombreada²¹. Se realizaron PCR con las mismas variantes mencionadas para *abdA*, sin ningún resultado. Se agregaron además ensayos a $T^{\circ}a=50,9^{\circ}C$; $52,9^{\circ}C$; $53,5^{\circ}C$; $54,5^{\circ}C$; $55,1^{\circ}C$; $56,5^{\circ}C$; $58,6^{\circ}C$ y $59,9^{\circ}C$; estas reacciones se hicieron en condiciones de *hot start*, agregando la polimerasa luego de precalentar 5' a $95^{\circ}C$. En estos casos tampoco se obtuvo el fragmento buscado.

```
MMNGNISYEEQVLPPTLTPIKTSPTSSTPVTSSSASSTSPVASQTGPLHIPAKRLGYECVEPAGPGVI
RHAHHSQPWNYSVPDTHHASPFDQYAQPTYYNIPDSRDRKSGLFWNPASATGQDYKYTSTMTPGTSTE
PPVSTCHQSFSQSWCNYPYTTASRHHVDGHHQSSVPLYSPADRRVVSAMVESTPFTHDTYNPLRNYPAP
EPVPSTPYPPGAASLTGVNMSMGSNNPLEWTGQVTVRKKRKPYSKFQTLLELEKEFLFNAYVSKQKRW
```

²⁰ El tamaño es aproximado, ya que existe un intrón dentro de la zona y el empalme podría ser diferente al estimado.

²¹ Tamaño aproximado por las mismas razones que en el caso anterior.

ELARNLNLTERQVKIWFQNRMRMKNKKNQRQAAQQNNNNNSANANHHGGGAGAGGAAVGTHHGAAHH
VVTAAHHPATNGALKHHQ

C.1.9.- *caudal*

Se amplificó una región de 195pb, correspondiente a la secuencia sombreada:

MYYPQYNVYKPGWYGPTNGYCTSNVQHATAQGSTFCMHEEQAAWAGQLLQTNATIPSHLHHVNHNASG
PPASLANPTANNPPVTELWEDQTVLTATSAVTSALSTSPSLQQGAQLHNTCSAQIVDHHIRAQPPRSPFE
WMKKPSYQSQPNPGKTRTKDKYRVVYTDHQRLLELEKEFHYSRYITIRRKAELATLLGLSERQVKIWFQNR
RAKERKQMKKREELIHKEKMQQLAML

C.1.10.- *sine oculis/six1*

Se amplificó una región de 393pb, correspondiente a la secuencia sombreada:

MLGSHHSPTTGVLPSFGFTQEQQVACVCEVLQQAGNMDRLGRFLWSLPACEKLHNNEVSLKAKAMVAFHRG
NFKELYRILESHQFSPHNHAKLQALWLKAHYVEAEKLRGRPLGAVGKYRVRKFFPLPRTIWDGEETSICYF
KEKRSRVLRDWYAHNPYPSPREKRELAEATGLTTTQVSNWFKNRRQRDRAAEHKDG

C.1.11.- *even skipped*

Se diseñaron *primers* para amplificar un fragmento de 218pb, correspondiente a la región sombreada. Se usaron concentraciones estándar y con *primers* aumentados 2 veces. Se ensayaron $T^{\circ}a=48,1^{\circ}C$; $49,5^{\circ}C$; $50,9^{\circ}C$; $51,5^{\circ}C$; $53,5^{\circ}C$; $54,7^{\circ}C$; $57^{\circ}C$; $58,5^{\circ}C$ y $60^{\circ}C$. Las $T^{\circ}a = 48,1^{\circ}C$; $49,5^{\circ}C$ y $50,9^{\circ}C$ se repitieron usando Expand Long (mix de polimerasas diseñada para optimizar resultados). Finalmente, se repitió en condiciones *hot start* usando las $T^{\circ}a= 53,5^{\circ}C$; $55,1^{\circ}C$ y $56,5^{\circ}C$, con Taq (InbioHigway). Sólo se logró una banda muy tenue de tamaño cercano al buscado en condiciones de concentración estándar, $T^{\circ}a=55,1^{\circ}C$, *hot start*, Taq y usando como molde ADNc de huevos tempranos. Sin embargo, esta banda no se pudo reamplificar y la reacción *de novo* no se pudo repetir sobre ninguno de los tres moldes posibles –i.e., ADNc total; ADNc de huevos tempranos ni ADN genómico–.

El aislamiento de este gen era importante para su uso como marcador de segmentos, debido a que se trata –en *D.melanogaster*– de un gen de segmentación *pair-rule*; i.e., se expresa segmento de por medio.

LQVWFQNRMRKDKRQRMAMAWPYAVYTDPALAASLLQAAALHY PYPAYYPRYAPYPGGLSADCDGSASCR
CGIVNCVASGSAYPAQPSPPATTTTPATTAPSPLTSSTQHKKLFQPYKEEVLEIEQA

C.1.12.- *engrailed*

Se diseñó un par de *primers* con el fin de amplificar una zona de aproximadamente 330pb, la cual comprende al menos tres intrones, siendo la región interna desconocida pero calculada en aproximadamente 38 residuos. Se ensayaron T°a=48,1°C; 49,5°C; 50,9°C; 51,5°C; 53,5°C y; 54,7°C. Utilizando concentración doble de *primer* y ADNctot como molde, a T°a = 53,5°C se obtuvo un bandeo con una banda muy clara en la región esperada. Sin embargo, la reacción no fue repetible en todas las PCR. En dos casos en que se la obtuvo, estaba a muy baja concentración y no se pudo reamplificar.

LLKFSIENILRPEFGVKNVENLNSSTTTTTTAAEEKSTTANS ETVWPAWVYCTRYSDRPSSXXXXXXXXXX
 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXRYLTERRRQALASELGLNEAQIKIWFQNKRAKIKKASGSR
 NPLALQLMAQGLYNHSTVPMSDEECDENLTMNG

C.1.13.- *apterous*

Se diseñaron *primers* para amplificar una región de aproximadamente 177pb. En este caso, tampoco se pudo amplificar la región, pero la fuente de error es otra: Los *primers* se diseñaron en la etapa en que el genoma estaba en forma de trazas. Luego, el ensamblado y la anotación revelaron que existen dos versiones de *apt*, descritas en el capítulo 2, sección C.1.1. En base a la ubicación en los *contigs*, no hay lugar a dudas de que se confundieron los dos genes: la primera región –en negro–, donde hibrida el *primer forward* –subrayado–, corresponde a *apt1*, mientras que la segunda región –en verde–, donde hibrida el *primer reverse* –subrayado doble–, corresponde a *apt2*. Es más, la zona donde se ubica el *primer reverse* corresponde a una secuencia diferencial entre ambos genes, que es RRMLVKQ en *apt1*. La región MRTSFKHH es compartida por ambos genes, pero varía en su secuencia nucleotídica, siendo *apt1*: 5'-

GCGCACATCATTTAAACATCA-3' y *apt2*: 5'-GAGAACGTCCTTCAAACATCA-3'.
 ENCAGCHSRITDRFYLLAVDRQWHVGCLQCSECKLSLDTEVTCYSRHGNIYCKHDYRLLFGVRRCSRCGT
 GISSTELVMRARGEVFHLHCFACCTCGVLLTKGDMFGMRAGSVYCRPHYELLPPPDIIVDRPISPAAWAKG
 RPRKRDINAESYLDVAFGPGTFLGSAANGSHHQRTKRM MRTSFKHHQLRTMKS YFQINHNPDAKDLKQLSQ
 KTGLPKRV LQVWFQNARAKWRRLMRQEGGNTVTCPPPLIVTETVTSLEDLHHQGLSFADIY
 RRMLVKQ

C.2.- Análisis de eficiencia de las ARNi basado en los resultados de *cad* y *scr*

En los comienzos de este trabajo no había protocolos de hibridación *in situ* ni de ARNi propios de *Rhodnius prolixus*. Para el caso de las interferencias de ARN, se destacan las siguientes observaciones acerca de la eficiencia del ensayo. La Fig.4.2 muestra para cada gen, la cantidad de huevos por puesta, los porcentajes de fenotipos leves, intermedios y extremos, y su distribución en las puestas.

caudal: Se inyectaron 3 hembras y se analizaron las puestas sucesivas. El experimento se consideró concluido al morir la última hembra interferida, aproximadamente a los 45 días. La relación entre puestas y fenotipos se observa en la Tabla 4.5 y en la Fig.4.2, columna izquierda. La supervivencia de las hembras fue menor en las interferidas que en el control (-), también se redujo la puesta a medida que transcurrió el tiempo. Aparentemente, la *cad*^{ARNi} tiene un efecto deletéreo en los adultos y es posible que afecte algún aspecto de la ovogénesis. En la puesta nº5, hubo una sola hembra sobreviviente que puso 5 huevos, mientras que en el control (-), la supervivencia a ese mismo tiempo fue 100% con una puesta total de 74 –i.e., un promedio de 24,7huevos/hembra–. Los machos de ambos grupos –no interferidos– tuvieron una supervivencia del 100% hasta el final del experimento. Los fenotipos intermedios fueron amplia mayoría –5 y 6 suman casi el 75%–. Si se observan los gráficos que muestran la distribución de fenotipos por puesta, puede verse una correlación negativa entre número de puesta y preponderancia de fenotipos con mayor grado de aberración.

Tabla 4.5. Fenotipos de *cad*^{ARNi}.

fenotipos→ puestas ↓	1	2	3	4	5	6	9	10	11	12	tot	♀ sobrevivientes	
												<i>cad</i> ·i	ctrol(-)
1.-					10	3	1	4	4	7	29	3	3
2.-	1	1	6		32	14	4	1			59	3	3
3.-			1		18	8	1				28	2	3
4.-			1		8		4		1		14	1	3
5.-	1			1	3						5	1	3
6.-	1				1	7					9	1	2
tot	3	1	8	1	72	32	10	5	5	7	144	-	-

La mayoría de los huevos se analizaron al tiempo de eclosión o posterior, excepto la última puesta (n°6), que se analizó en estadios pre-eclosión (5 a 12 días AEL).

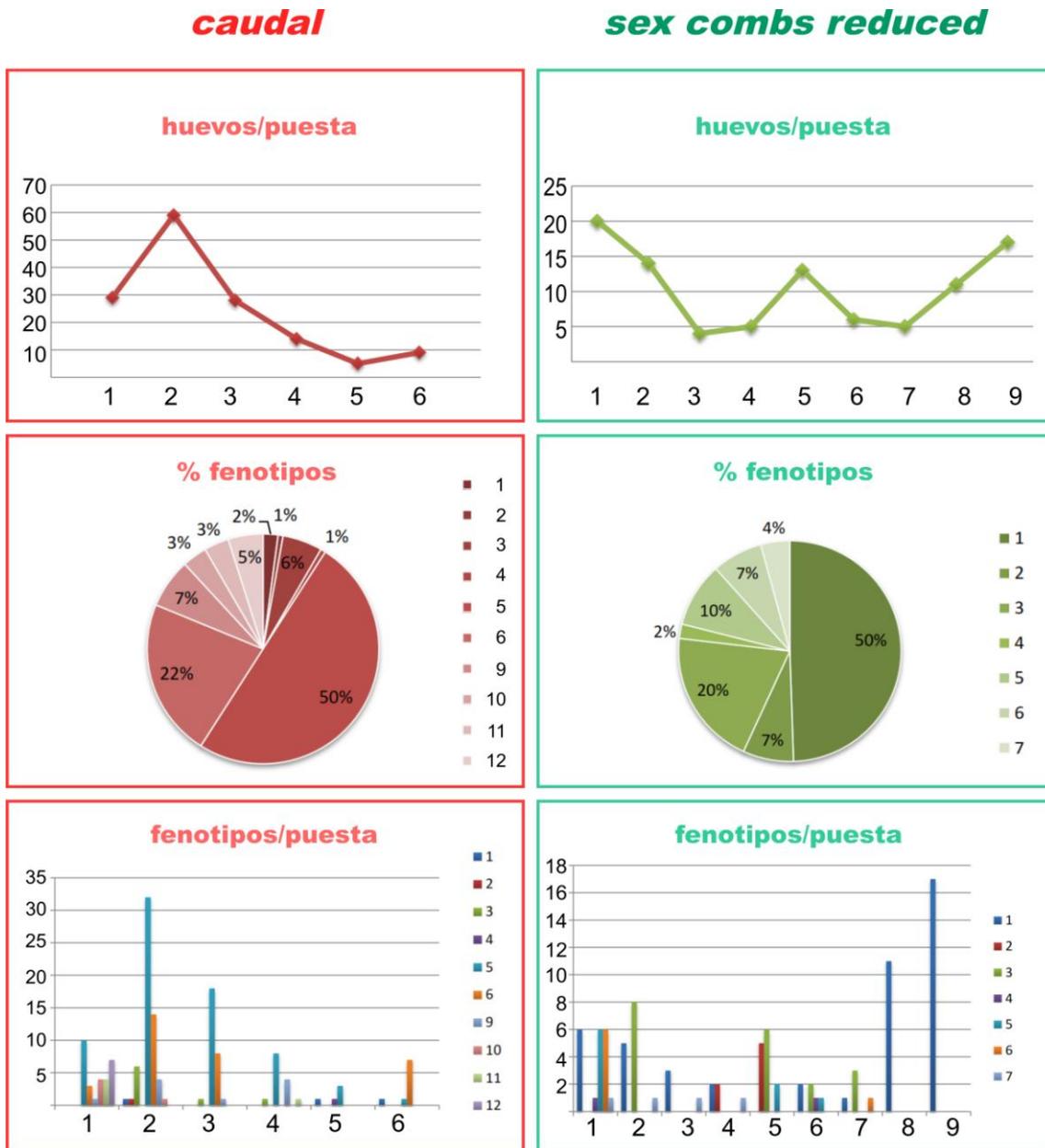


Fig.4.2. Respuestas a la ARNi de *caudal* y *scr*. Se relacionan diferentes factores de la respuesta a la ARNi en base a los resultados de la interferencia de *caudal* (columna izquierda) y *scr* (columna derecha). Primera fila: tamaño promedio de puesta por hembra. Segunda fila: proporciones de los distintos fenotipos obtenidos. Tercera fila: Relación entre la clase de fenotipo y su representación en cada puesta.

sex combs reduced: la distribución estuvo desplazada hacia los fenotipos más drásticos, que representaron casi el 50%. El tamaño de puesta se mantuvo

aproximadamente constante, pero no se registró la relación respecto al control negativo –en este caso, se evaluaron características cualitativas: la sobrevida de las hembras y el fenotipo de los huevos, pero no se hicieron registros cuantitativos del control negativo–. Los controles negativos y los resultados de *scr* muestran que el experimento en sí no afecta la puesta ni la sobrevida de las hembras, al menos no en un grado importante (Tabla 4.6; Fig.4.2, columna derecha).

Tabla 4.6. Fenotipos de *scr*^{ARNi}.

fenotipos →	abortivos			eclosionados			~wt	tot
puestas ↓	1	2	3	4	5	6	7	
1.-	6			1	6	6	1	20
2.-	5		8				1	14
3.-	3						1	4
4.-	2	2					1	5
5.-		5	6		2			13
6.-	2		2	1	1			6
7.-	1		3			1		5
8.-	11							11
9.-	17							17
tot	47	7	19	2	9	7	4	95
%	49,45	7,4	20	2,1	9,45	7,4	4,2	100

En los dos casos, *scr* y *cad*, la aparición de larvas 1 eclosionadas en las cuales se observan efectos, se dio principalmente en la primera puesta, de lo cual se deduce que el efecto de la interferencia aumenta en las puestas sucesivas.

C.3.- Ensayos de expresión: *scr*-WMISH

Las hibridaciones de embriones completos (Fig.4.3) mostraron que no se observan transcritos en estadios de blastodermo o banda germinal temprana (no se muestra). Luego de la elongación de la banda germinal (48 hs. AEL), se observa ARNm en los apéndices de los segmentos maxilar, labial y protórax (Fig.4.3A-B). En las maxilas se observa un grupo de células que expresan el gen, ubicadas en la mitad posterior del apéndice, en la región media (Fig.4.3C); una expresión similar se observó en dos ortópteros: el grillo *Acheta domestica* (Linnaeus, 1758) y la tucura *Schistocerca americana* (Passalacqua et al., 2010). En el segmento labial se observa una tinción muy fuerte en todo el apéndice, con regiones de diferente intensidad. Se destaca una

región de expresión intensa, transversal al eje del apéndice, en la región prospectiva de lo que será la zona media del apéndice ya desarrollado (**Fig.4.3D**). En el primer segmento torácico, se observa un punto muy marcado sobre el tercio distal-anterior de la pata 1 (**Fig.4.3E**) y tanto anterior como posteriormente al apéndice, se observa una tinción marcada en una región que puede pertenecer a la parte proximal del apéndice (**Fig.4.3E**).

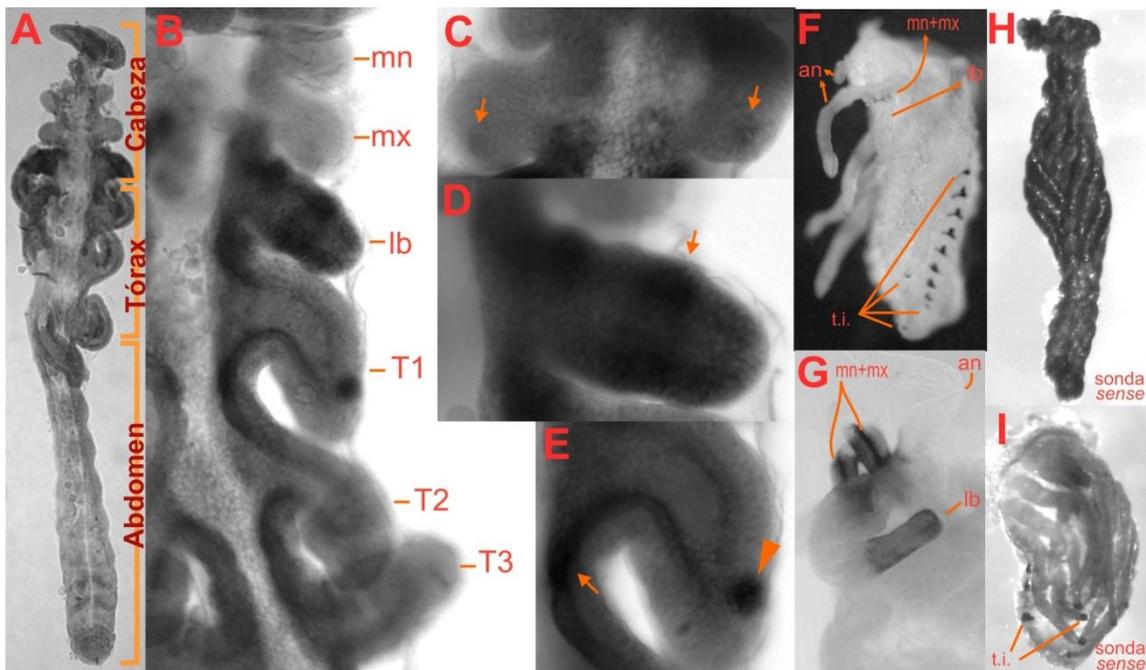


Fig.4.3. Patrón de expresión de *Rp-scr* por hibridación *in situ*. **A**, banda germinal extendida completa, se indican los tagmas. **B**, apéndices bucales y torácicos. **C**, detalle de las maxilas; las flechas señalan una pequeña región circular de tinción suave que se diferencia del resto del apéndice sin teñir. **D**, apéndice del segmento labial completamente teñido; la flecha naranja señala una banda transversal de tinción más intensa en la zona media. **E**, primer apéndice torácico (pata 1); la punta de flecha señala un *spot* intensamente teñido en el tercio distal. Se observa marcación entre los segmentos torácicos, especialmente los cercanos a la pata 1 (flechas). **F**, vista ventro-lateral de un embrión tardío; se observa tinción en los apéndices cefálicos. **G**, región cefálica de un embrión tardío, se observa tinción en mandíbulas y maxilas como así también en la región distal del labio. **H**, control negativo de una banda germinal teñida con sonda *sense*. **I**, control negativo de un embrión avanzado. Se observó tinción inespecífica en puntos laterales pares en los segmentos abdominales y en el extremo de los apéndices torácicos. Todas las imágenes corresponden a vistas ventrales (excepto F), con el extremo anterior ubicado hacia arriba. **A-E**, imágenes de microscopio; **F-I**, imágenes de lupa estereoscópica. **an**, antenas; **mn**, mandíbulas; **mx**, maxilas; **lb**, apéndices labiales; **T1**, **T2**, **T3**, patas 1, 2 y 3 respectivamente; **mn+mx**, mandíbulas y maxilas; **t.i.**, tinción inespecífica.

En estadios más avanzados, se observa una expresión marcada en el extremo del labio recién fusionado y en los estiletes en formación (**Fig.4.3F,G**); esto es similar a lo descrito para su ortólogo *cephalothorax* de *Tribolium castaneum* (**Curtis et al., 2001**). También se observó una señal abdominal segmentaria que parece ser inespecífica (**Fig.4.3F**), ya que aparece en los controles negativos (**Fig.4.3H,I**).

C.4.- Ensayos funcionales: *scr*^{ARNi}

Los fenotipos de interferencia mostraron una serie de mutantes con diferentes grados, que afectaron a los peines tibiales de la pata 1 de las larvas y a la correcta formación del estuche labial; este último fue afectado en su segmento distal. El 96% de los individuos interferidos fueron letales (76,85% en estado embrionario y 18,95% como larvas eclosionadas) y sólo el 4,2% mostró un fenotipo aparentemente normal (**Fig.4.4**).

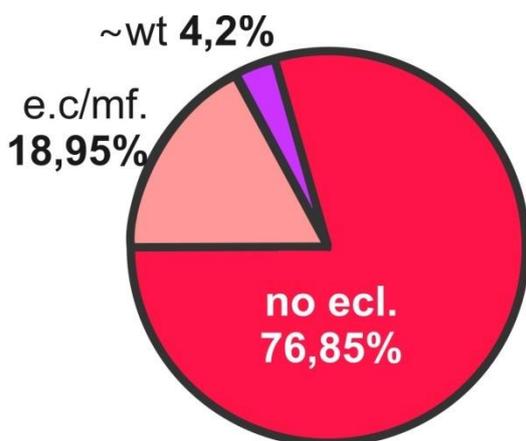


Fig.4.4. Porcentajes de fenotipos de interferencia. Gráfico de torta incluyendo todos los fenotipos resultantes de *scr*^{ARNi}; la mayoría resultaron letales. **e.c/mf.**, fenotipos eclosionados con malformaciones; **no ecl.**, fenotipos abortivos en etapa embrionaria; **wt**, fenotipos eclosionados con aspecto normal.

Los resultados que se muestran a continuación corresponden todos a larvas eclosionadas, ya que la deposición de la cutícula fue necesaria para realizar la observación y descripción de estructuras. El análisis de las mismas, estuvo asistido por la Dra. Cecilia Melo, especialista en sistemática de reducidos.

C.4.1.- Fenotipo normal e interferido de peines tibiales

Una característica distintiva de la pata 1 normal en los distintos estadios larvales y en el adulto, es la presencia de un peine tibial. En el caso de *R.prolixus*, este peine no está asociado al sexo, como sí ocurre en *D.melanogaster*. Un peine tibial normal está

formado por una fila de setas rígidas, todas ellas de la misma longitud y ubicadas en el ápice de la tibia. (Fig.4.5A,B).

Los fenotipos de interferencia de *scr* afectan notablemente estas estructuras. Los mutantes muestran diferentes grados de reducción de peines con setas separadas e irregulares (Fig.4.5C,D), hasta su ausencia completa (Fig.4.5E), de modo que se pierde la identidad de pata1.

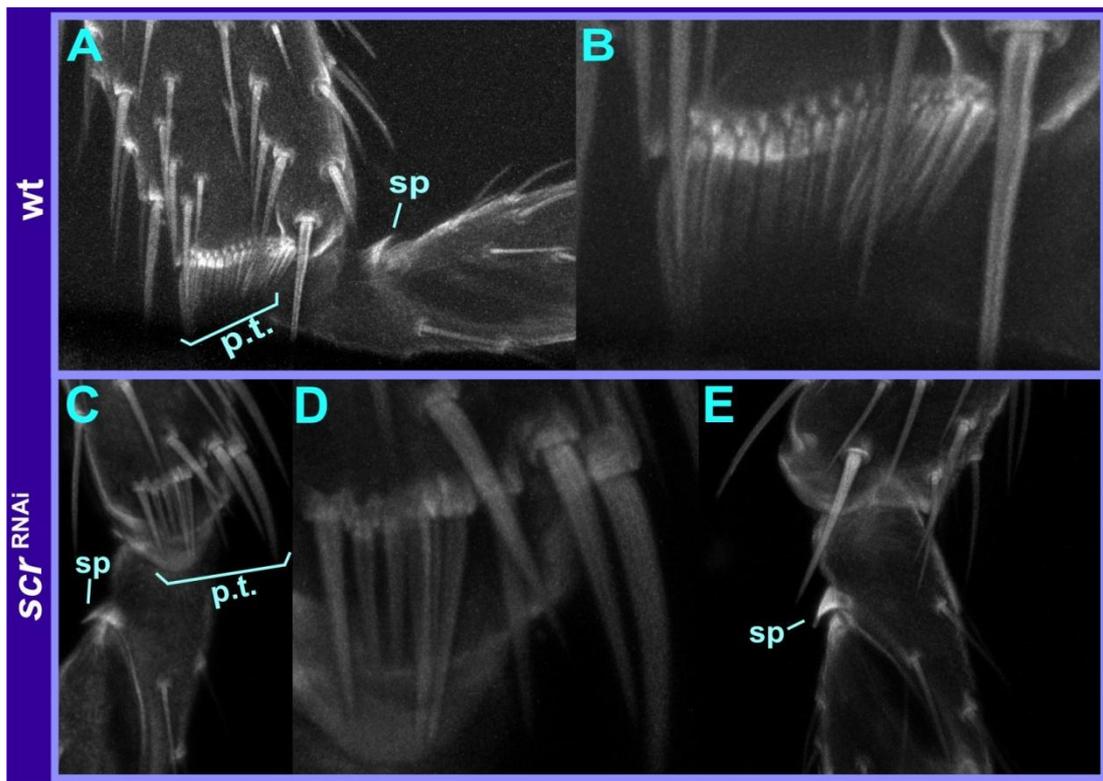


Fig.4.5. Peines tibiales. A, peine tibial normal en pata 1 de larva 1. B, detalle de A. C, peine tibial con malformación producido por interferencia de *Rp-scr*. D, detalle de C. E, peine tibial ausente en pata 1 de larva interferida. p.t., peine tibial; sp, espina del primer segmento tarsal.

C.4.2.- Fenotipo labial normal e interferido

La Fig.4.6 muestra el aspecto del primer estadio larval normal. En Fig.4.6A se observa una vista ventral; en Fig.4.6B se esquematizan el tórax y la cabeza. Cuando el aparato bucal suctopírador está en reposo, se pliega ventralmente, quedando el extremo distal orientado en sentido posterior –posición opistognata–, tal como se ve en Fig.4.6A-C. La Fig.4.6D muestra una vista dorsal de la cabeza, donde el aparato bucal fue desplegado hacia adelante. En la superficie dorsal-anterior de la región anteoocular hay tres escleritos elongados: el esclerito central corresponde al clípeo y los laterales a

las genas. El labro cubre la base del rostro y es una región triangular, anterior al clípeo. El labio (**Fig.4.6E-G**) es un apéndice impar, fusionado y dividido en tres segmentos (**Fig.4.6E**) que envuelve los estiletes –mandíbulas y maxilas–. La **Fig.4.6F** muestra una sección longitudinal del labio completo, alojando los estiletes en el surco y la **Fig.4.6G** esquematiza el extremo distal del labio con los estiletes descansado en el surco. Los tres segmentos tienen diferente longitud y cada uno de ellos lleva setas cortas y rectas, siendo más largas las del tercero. Las mandíbulas son apéndices serrados apicalmente y se usan para cortar la epidermis del hospedador; las maxilas son lanceoladas y penetran la piel en busca de vasos sanguíneos (**Fig.4.6H**). En los ensayos de pARNi, los controles negativos (**Fig.4.7A**) mostraron esta apariencia *wild type*.

En los fenotipos de interferencia se observó que la falta de *scr* afecta al segmento distal del labio (**Fig.4.7B**), de manera consistente con lo observado en la hibridación *in situ*. En las **Fig.4.7C-D** y **Fig.4.7E-L** se muestran vistas detalladas de los resultados de β -lac^{ARNi} y *Rp-scr*^{ARNi}, respectivamente. Los segmentos 1 (proximal) y 2 (medial) no se ven afectados (**Fig.4.7E,G,I**) y el tercero (distal) es el que muestra el fenotipo mutante, desde deformaciones sutiles (**Fig.4.7F,H**) a una completa transformación del labio a pata 1 (**Fig.4.7J-L**).

Los estiletes son normales pero están por fuera del labio, debido a que no pueden alojarse en el surco. Las transformaciones más frecuentes consisten en la adquisición de uñas (**Fig.4.7F,H,J**) –lo que de por sí otorga identidad de pata–.

Sin embargo, en los casos más notables, se observó la transformación clara de labio a pata 1. En estos casos, el segmento 3 no está fusionado, sino que permanece dividido a manera de un par de patas, con tibia, tarso bisegmentado y pretarso definido por uñas, esclerito parempodial, parempodio y placa unguítrictora (**Fig.4.7J**). Resulta muy llamativo el hecho de que la tibia muestra una estructura con características de peine tibial parcialmente formado (**Fig.4.7K** y detalle en **Fig.4.7L**), lo que le otorga identidad de pata 1. Es importante notar que en estos fenotipos, el peine tibial de la pata 1 torácica está ausente.

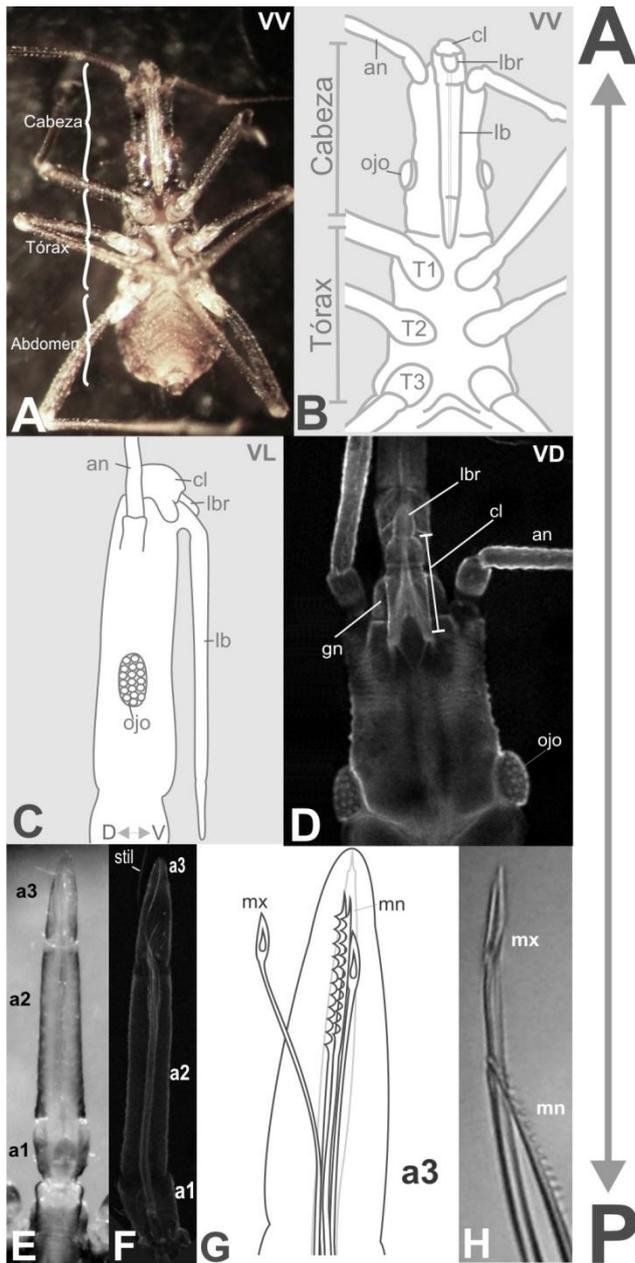


Fig.4.6. Larva 1 wt. Las estructuras bucales corresponden al típico aparato suctopizador de los hemípteros. **A**, vista ventral de una larva 1 wt; se señalan los límites de los tres tagmas. **B**, esquematización de una vista ventral de cabeza y tórax; las mandíbulas y maxilas son estiletes finos, no se ven a simple vista y yacen en un surco del labio, envueltos por éste. Nótese que cuando están en reposo, las piezas bucales están plegadas sobre el abdomen y orientadas hacia el extremo posterior de la larva; cípeo y labro también se pliegan ventralmente. **C**, esquematización de una vista lateral de la cabeza; se observa la orientación del labio, plegado en sentido ventral y posterior. **D**, vista dorsal de la cabeza –proyección de secuencias de planos confocales–; en esta imagen el cípeo, el labro y el labio están desplegados y orientados hacia el extremo anterior. **E**, vista dorsal de lupa de un labio desplegado. El labio está subdividido longitudinalmente en tres segmentos bien diferenciados (a1, a2 y a3 de proximal a distal). **F**, sección del labio mediante microscopía confocal; se observa el surco donde se ubican los estiletes. **G**, esquematización del extremo de las estructuras bucales. En el surco labial yacen cuatro estiletes de dos tipos: lanceolados (maxilas) y serrados (mandíbulas). **H**, mandíbula y maxila, imágenes de lupa. **an**, antenas; **mn**, mandíbulas; **mx**, maxilas; **lb**, labio; **cl**, cípeo; **lbr**, labro; **gn**, genas; **stil**, estiletes; **a1-a3**, segmentos 1 a 3 del labio; **T1- T3**, patas 1 a 3; **VV**, vista ventral; **VL**, vista lateral; **VD**, vista dorsal.

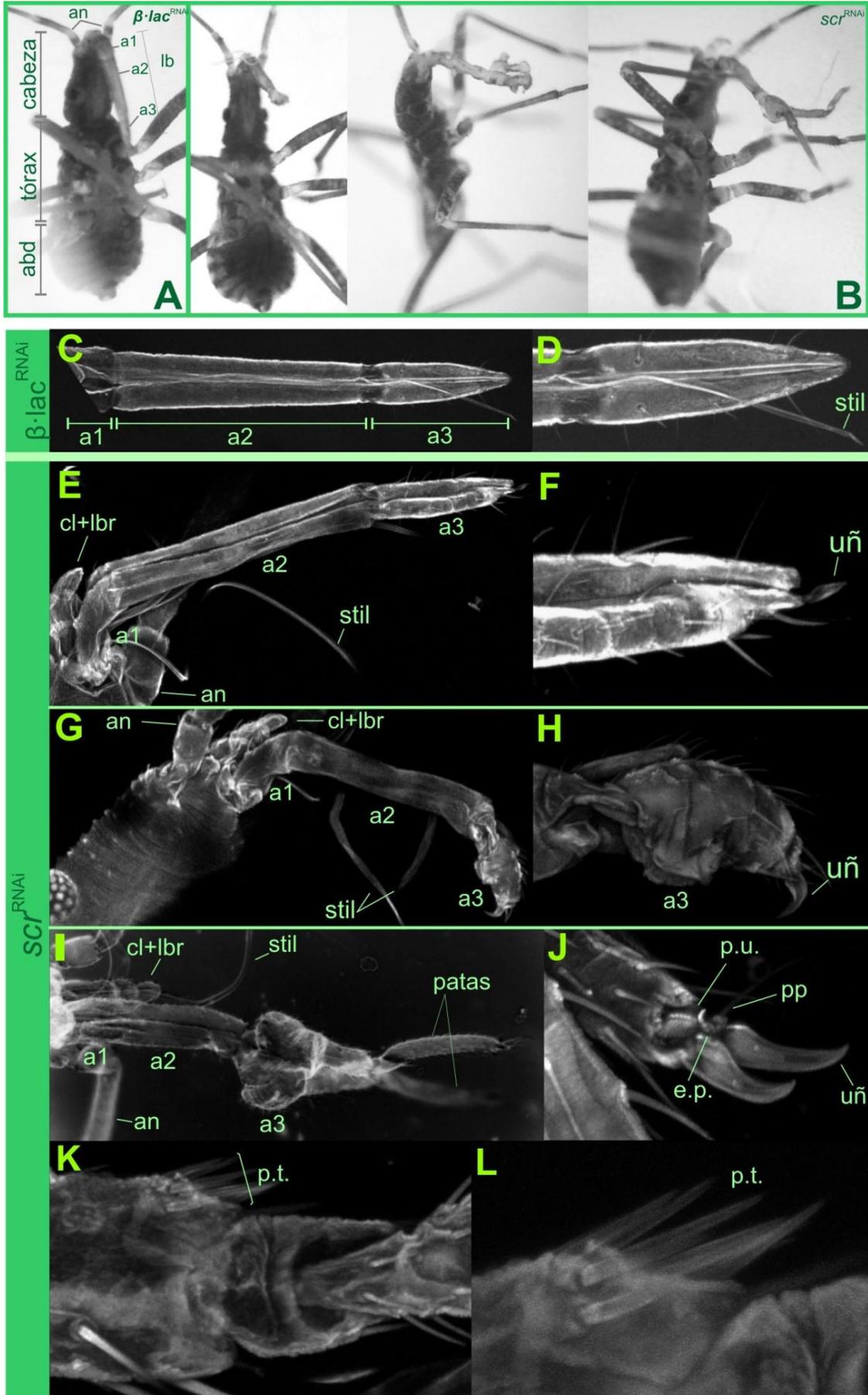


Fig.4.7. Fenotipos de *scr*^{ARNi}. **A**, larva 1 resultante de un control negativo (ARNi de *β-lactamasa*, *β-lac*^{ARNi}), con el mismo aspecto que una larva *wt*. **B**, larvas 1 resultantes de *Rp-scr*^{ARNi}. Se observa una serie con diferentes grados de malformación. **C**, labio de aspecto normal, resultado del control negativo. Se señalan los tres segmentos que componen la estructura. **D**, detalle del tercer segmento. **E-L**, serie de labios con malformaciones producidas por la interferencia de *scr*. Los efectos ocurren en el tercer segmento (distal). **E**, segmento 3 levemente deformado. **F**, detalle de E; se observa una uña terminal. **G**, evidente malformación del tercer segmento. **H**, detalle de G; se observa la pérdida de forma además de la presencia de uña. **I**, el tercer segmento se presenta como una estructura par no fusionada en el extremo distal, con el tamaño y la morfología de un par de patas. **J-L**, detalles de I. Estructuras terminales completamente formadas (**J**), articulación (**K**) y peine tibial que le otorga identidad de pata 1 (**L**). **abd**, abdomen; **an**, antenas; **stil**, estiletes; **lb**, labio; **cl**, clípeo; **lbr**, labro; **uñ**, uña; **p.u.**, placa unguitractora; **pp**, parempodio; **e.p.**, esclerito parempodial; **p.t.**, peine tibial; **a1- a3**, segmentos 1 a 3 del labio; **T1-T3**, patas 1 a 3; **VV**, vista ventral; **VL**, vista lateral; **VD**, vista dorsal.

C.5.- Ensayos de expresión: *cad*-WMISH

Sobre la base de los antecedentes para caudal y según el tipo de desarrollo, se espera observar un patrón temporo-espacial de expresión semejante al que se muestra en la **Fig.4.8A**. La expresión de los mensajeros se desplaza de manera concomitante y acorde con las células que los expresan.

C.5.1.- Tinción de ovariolas

En los organismos estudiados, *cad* pertenece al grupo de genes conocidos como “de efecto materno”, ya que los primeros mensajeros del huevo son producidos por la madre y cargados en éste. En el caso de *R.prolixus* esto también es así, ya que se observa tinción en las ovariolas en estadios previos a que el huevo comience a producir sus propios transcritos. La **Fig.4.8B** muestra una imagen de una porción de ovariola en la que se practicó una hibridación *in situ* para *cad*. Se muestran diferentes estadios incluyendo un huevo a punto de ser ovipuesto. Este último, funciona como un control negativo interno ya que el corion impide la penetración de la sonda. Las ovariolas son telotróficas; esto significa que los materiales son sintetizados por las células terminales del trofario y cargados en los ovocitos por un extremo. Según las observaciones en *caudal* y otros genes (**Pagola, 2012; Lavore, 2012**), esta carga ocurre a modo de pulsos, lo que se deduce del hecho de que los genes maternos estudiados aparecen como manchones antes de alcanzar sus localizaciones espacio-dependientes. En las ovariolas, se observan ovocitos en los que el mensajero está

concentrado localmente debido a un pulso reciente de carga y otros en los cuales la carga ha difundido. Los trofarios que expresan *caudal* muestran una distribución homogénea, excepto en una línea que probablemente esté asociada a los conductos de carga de materiales (**Fig.4.8C**).

C.5.2.- Tinción de huevos completos

Se repitieron 5 ensayos de tinción de huevos completos, abarcando períodos variables y que en total cubrieron desde las 0Hs. AEL hasta 4días AEL. En huevos no embrionados, puestos por hembras vírgenes, no se observó ninguna tinción (**Fig.4.8D**). Por otra parte, se hibridaron huevos puestos potencialmente embrionados en varios grupos y experimentos, abarcando períodos sucesivos.

En estados previos a la aparición de los núcleos en la superficie, no se observa distribución localizada de *cad* (**Fig.4.8E,F**). En los huevos en estadio de comienzo de gastrulación, se observa claramente una localización de *caudal* en la región posterior del huevo (**Fig.4.8G**). Lamentablemente, los huevos de este estadio, están deformados y muestran un estrangulamiento artificial producido por el corion durante el proceso de hibridación. Como efecto secundario de esta situación, la región anterior del huevo muestra más *background* que la posterior; sin embargo, se puede diferenciar muy claramente la tinción específica del ruido. De hecho, es digno de destacar que la región menos expuesta a la sonda es aquella que se ha teñido más intensamente y de manera específica. En vistas de microscopio de fluorescencia, con tinción DAPI, se observa claramente la distribución perinuclear de la sonda (**Fig.4.8H**) y su localización en gradiente (**Fig.4.8I**).

En huevos de 30-36 Hs. AEL, *i.e.*, cuando se inicia la invaginación de la banda germinal, se observa una zona un poco más oscura en la región posterior de la misma, que podría corresponder a una marcación *cad* (**Fig.4.8J**), sin embargo, como se verá a continuación, en bandas germinales disectadas no se detectó una expresión conspicua. En bandas germinales de huevos más avanzados, se observa una coloración muy tenue (**Fig.4.8K,L**), actualmente no es posible definir si se trata de una expresión suave o de *background*. Una observación curiosa y muy interesante, es que en huevos de esta edad -2 a 3 días AEL-; se mantiene cierto grado de expresión de *caudal* rodeando los núcleos de la serosa (**Fig.4.8M,N**).

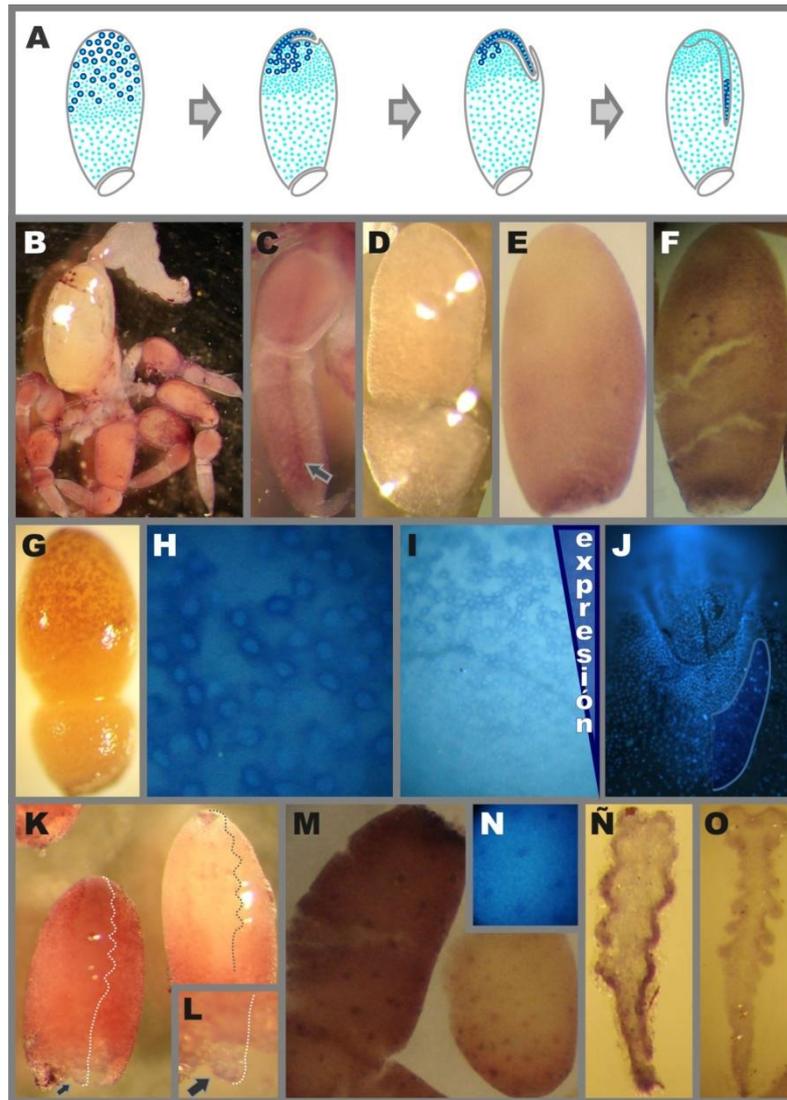


Fig.4.8. WMISH con sonda *cad* antisense. **A.** Esquemización de los resultados esperados para la hibridación de *cad*. **B.** Hibridación *in situ* de ovariolas. **C.** Detalle de ovariola, la flecha señala una línea más oscura en el eje A-P. **D.** hibridación sobre huevos no embrionados. **E.** Huevo en estadio previo a la emergencia de los núcleos en la superficie, sin tinción. **F.** Huevo en estadio previo a la emergencia de los núcleos en la superficie, con aparente tinción superficial no localizada. **G.** Huevo en estadio de blastodermo celular, con expresión posterior de *cad*. **H.** Detalle de la distribución perinuclear de la sonda. **I.** Detalle del gradiente de expresión. **J.** Comienzo de la gastrulación, en una mitad del embrión se destaca la zona terminal de la banda germinal en formación, que tiene una coloración levemente más oscura. **K.** Huevos en estado de banda germinal avanzada. Las líneas de puntos indican un borde lateral de la banda germinal localizada en el huevo. La flecha señala el extremo caudal expuesto de una banda germinal, con una coloración azulada muy tenue. **L.** Detalle de K. **M.** Huevos en estadio de banda germinal extendida, donde se observa expresión en la serosa. **N.** Detalle de L, bajo microscopio de fluorescencia y con tinción DAPI. **Ñ.** Banda germinal media. **O.** Banda germinal extendida.

C.5.3.- Tinción de bandas germinales disectadas

Tal como se dijo anteriormente, en bandas germinales se espera encontrar expresión caudal en la zona terminal. Sin embargo en este trabajo no se encontró una expresión clara en este sentido. Las zonas oscurecidas en las bandas germinales, tanto en regiones caudales como en los apéndices en formación, coinciden con los engrosamientos propios del embrión y pueden deberse a un consecuente aumento del ruido en esas zonas (Fig.4.8Ñ,O). Hasta el momento, los resultados parecen señalar una posible expresión expandida hacia regiones más anteriores, quedando libres de expresión sólo los primeros segmentos cefálicos.

C.6.- Ensayos funcionales: *cad*^{ARNi}

Tal como se explicó en el apartado C.2.1, los fenotipos de interferencia de *caudal* afectaron a las hembras inyectadas, aumentando la mortalidad y disminuyendo la fertilidad; ya que esto no ocurrió en los controles, debe considerarse como un resultado.

En los individuos de la descendencia, se observaron afecciones en escala creciente. Resultó letal en todos los casos; incluso los individuos con apariencia salvaje no sobrevivieron más allá de los dos días posteriores a la eclosión. De los individuos que lograron eclosionar, la mayoría mostró algún grado de afección en su terminalia. El 95% de los huevos fueron abortivos. En este gen, los embriones abortivos mostraron una serie fenotípica muy interesante, y que se puede analizar con independencia de las estructuras cuticulares; por ese motivo, el análisis se centró más en los embriones que en las larvas eclosionadas.

C.6.1.- Terminalia en larvas salvajes y en fenotipos de interferencia

Las larvas salvajes de *R.prolixus* tienen 11 segmentos abdominales, de los cuales sólo 10 son claramente diferenciables. La estructura terminal contiene la desembocadura del ano y el poro genital sobre la superficie ventral, está protegida por un pliegue del último segmento, cubierto de setas y con aspecto de opérculo (Fig.4.9A-D).

En larvas interferidas se observaron malformaciones y pérdida de los segmentos posteriores. Las larvas que alcanzaron el momento de la eclosión corresponden al

fenotipo número 12 de la **Tabla 4.5**. Sólo aparecieron en la primera puesta, que tuvo 11 de los 12 casos más leves (fenotipos n°11 y n°12).

Antes de hacer los preparados cuticulares, se vio una situación anómala en las larvas recién eclosionadas: un resto de vitelo asociado a la zona terminal. Estos restos vitelínicos no se observan en larvas normales. En los fenotipos de interferencia, el tamaño estuvo en relación directa con el grado de afección –fue mayor en aquellas con mayor pérdida de segmentos– (**Fig.4.9E,F**).

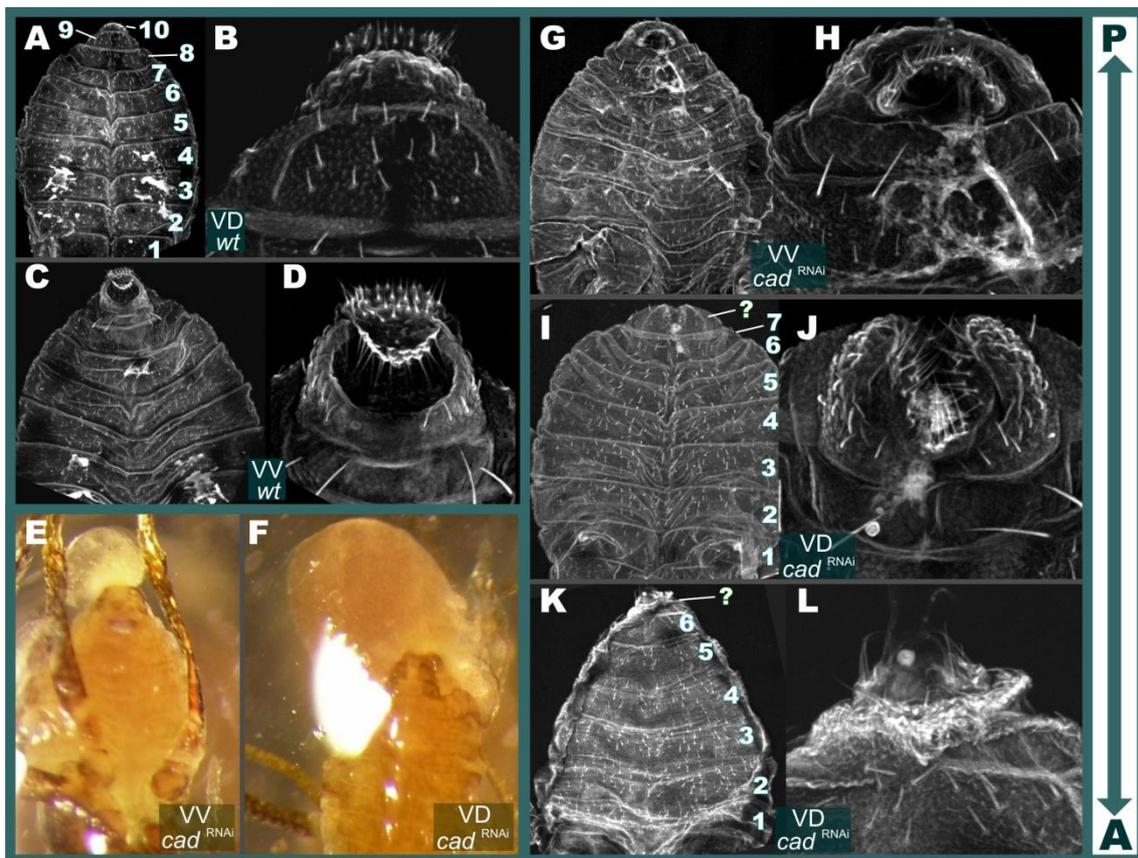


Fig.4.9. Larvas de primer estadio, normales e interferidas. **A.** Vista dorsal del abdomen de una larva *wt*. **B.** Detalle del extremo posterior visto dorsalmente. **C.** Vista ventral parcial del abdomen de una larva *wt*. **D.** Detalle de la región terminal de la larva *wt* vista ventralmente. **E.** Vista ventral del abdomen de una larva interferida recién eclosionada. Una pequeña porción de vitelo se encuentra asociada a la zona terminal. **F.** Vista dorsal del abdomen de una larva con mayor grado de defectos; el resto vitelínico es mayor y está asociado a varios segmentos. **G.** Vista ventral del abdomen de una larva interferida con el mínimo grado de malformación observado. **H.** Detalle de G. **I.** Vista dorsal de una larva con una clara malformación terminal y aparente pérdida de segmentos. **J.** Detalle de I. **K.** Vista ventral de una larva con evidente pérdida de segmentos y de morfología. **L.** Detalle de K. **VD**, vista dorsal; **VV**, vista ventral.

En los preparados cuticulares de larvas interferidas se observaron malformaciones terminales. El caso más leve consistió en la ausencia de la estructura terminal (**Fig.4.9G,H**). Un siguiente nivel consistió en una estructura terminal acortada, con pérdida de segmentos y con aspecto par (**Fig.4.9I,J**). En larvas más afectadas se observó pérdida de segmentos abdominales hasta la mitad del número normal, así como la total pérdida de forma del abdomen y de la terminalia (**Fig.4.9K,L**).

C.6.2.- Embriones salvajes e interferidos

El 95% de los huevos puestos por hembras interferidas, no lograron eclosionar. En todos los casos, se hicieron disecciones y se analizaron los embriones en el estadio en el cual el desarrollo quedó detenido. En rigor, la última puesta se analizó entre los días 5 y 12 AEL. Para este momento se espera que el desarrollo temprano esté concluido. El proceso que lleva a la eclosión depende de la presión interna ejercida por el propio embrión, y para que esto ocurra, es necesario un embrión completo que pueda accionar de manera efectiva sobre las paredes del corion. Todos los embriones de este último grupo tenían un nivel de malformación tal –como se ve en la **Tabla 4.5**, caen en las categorías fenotípicas 1 a 6– que es posible inferir que no hubieran eclosionado incluso llegados a término.

El arresto del desarrollo es parcial, dependiendo de qué factores se tengan en cuenta. Por un lado, la katatrepsis no ocurre en estos embriones. Por otro lado, las estructuras correspondientes a cada segmento se desarrollan en grados variables. Aquellos apéndices y estructuras cercanos a los últimos segmentos generados muestran mayor malformación que los lejanos, y en algunos casos están ausentes. Los procesos de pigmentación y formación de la cutícula, continúan de manera normal. De hecho, en este sentido se observaron las mayores diferencias entre los embriones de las puestas analizadas antes y después del día 14. Aquellos embriones analizados en etapas pre-eclosión, se encontraron sin epicutícula formada, con la consistencia típica de las bandas germinales avanzadas y con la pigmentación intensa y heterogénea característica de los estadios de desarrollo intermedio. En cambio, en los embriones analizados en etapas posteriores, se observó pigmentación homogénea y epicutícula fina, blanda y traslúcida, típica de las etapas “peri-eclosivas”. Además,

dependiendo del tiempo transcurrido entre el día 14AEL y el momento de la disección, se observó degradación creciente de los tejidos.

En todos los casos, las afecciones tuvieron una zonación con dirección y sentido fuertemente marcados sobre el eje A-P y desde posterior hacia anterior, de modo que los segmentos anteriores estaban menos afectados que los posteriores. Para cualquier caso, si un segmento está afectado, los segmentos posteriores a éste tienen un grado de afección mayor. Por ejemplo, si el tercer segmento torácico está afectado, todos los segmentos abdominales están ausentes o son muy aberrantes. Por este motivo, los agrupamientos fenotípicos utilizados, hacen referencia a las estructuras posteriores observables. Si escribo “tórax reducido”, queda implícito en esta denominación que los segmentos abdominales no están presentes. En adelante, se dará por sobreentendido, para cada clase, que todos los segmentos y apéndices posteriores al que da nombre al grupo, están ausentes o no se pueden identificar como tales. El análisis general reveló –en todos los casos en que las estructuras se pudieron identificar con cierto grado de certeza–, que no se dan fenotipos similares a los “*gap*”. Bajo esta premisa, el orden de aparición se usó como criterio de identificación de estructuras cuando la morfología resultó insuficiente. Para evitar razonamientos tautológicos, las estructuras identificadas con este criterio no se utilizaron al momento de discutir la organización cefálica.

Se estableció una serie de clases de malformación creciente: con apariencia normal (fenotipo n°11); con abdomen reducido o ausente (fenotipos n°9 y 10), tórax reducido o ausente (fenotipos n°6 a 8), región cefálica (fenotipo n°5); estadios pre-gastrulatorios (fenotipos n°1 a 4). Tal como se observó en tablas y gráficos de la sección **C.2.1** de este capítulo, el 72% de los individuos analizados cayó entre las clases 5 y 8, es decir, consistieron en estructuras cefálicas sin tórax o con un tórax incompleto.

La **Fig.4.10** muestra una serie fenotípica donde se observan los acortamientos en los embriones que no lograron eclosionar. Todos estos especímenes en estados pre-eclosionales, son muy frágiles y no es sencillo manipularlos para determinar sus estructuras; los apéndices largos aparecen enmarañados y poco diferenciados.

Algunos embriones tenían un aspecto casi normal, bien formado; sin embargo, el conteo del número de segmentos abdominales revela un acortamiento notorio (**Fig.4.10A**). El siguiente nivel, corresponde a embriones que no sólo han perdido

segmentos, sino que también tienen malformación de los segmentos abdominales presentes y un claro aspecto de deformación general (**Fig.4.10B**). En este caso y los siguientes, los segmentos no se pueden identificar claramente, ya que se pierde la morfología, y sólo se pueden deducir por medio de los apéndices presentes. Otros, parecen haber perdido totalmente el abdomen, aunque conservan un tórax aparentemente completo (**Fig.4.10C**). En este caso y los siguientes, además de tenerse en cuenta la morfología general y la ubicación, las patas fueron identificadas como tales por la presencia de uñas; las antenas, por la presencia de la línea filamentosa, longitudinal y oscura; y el labio, por su morfología robusta y más corta. El siguiente nivel de acortamiento implica pérdida de segmentos torácicos, la **Fig.4.10D** muestra un espécimen en el cual sólo se puede identificar un par de patas, mientras que todas las estructuras cefálicas están presentes. Curiosamente, no se observaron casos en los que apareciera un labio diferenciado y ninguna estructura torácica; en cambio se encontraron muchos casos de estructuras cefálicas incompletas (**Fig.4.10E-G**). La **Fig.4.10E** muestra un espécimen cuya edad corresponde a la de un embrión a término. Los ojos, el surco epicraneal, el clipeo, el labro y las antenas tienen un aspecto casi normal. Posteriormente se observan unas estructuras con aspecto apendicular indiferenciado y enrollado; no es posible determinar si se trata de uno o dos pares de estructuras. Podría tratarse de apéndices labiales que no se diferenciaron, o estiletos que no lograron invaginarse. Muchos especímenes reducidos a estructuras cefálicas, no presentaron partes bucales visibles (**Fig.4.10F**); en la mayoría de los casos, según la morfología, las estructuras apendiculares visibles se pudieron identificar como antenas o labro.

Los dos últimos especímenes de la **Fig.4.10** tienen la edad correspondiente a los embriones llegados a término. En el primer caso (**Fig.4.10G**), el labro se observa perfectamente desarrollado, pero no hay antenas presentes. En el último caso (**Fig.4.10H**), se observan apéndices indiferenciados largos, a los cuales se les asigna la identidad presunta de antenas debido a su longitud y a la ausencia de otros apéndices posteriores. Sin embargo, no está claro si debajo de ellos hay una estructura asignable al labro. Tampoco es clara la identidad de antenas, salvo por la longitud, son apéndices muy indiferenciados.

La **Fig.4.10I** muestra un espécimen *wt* como referencia.

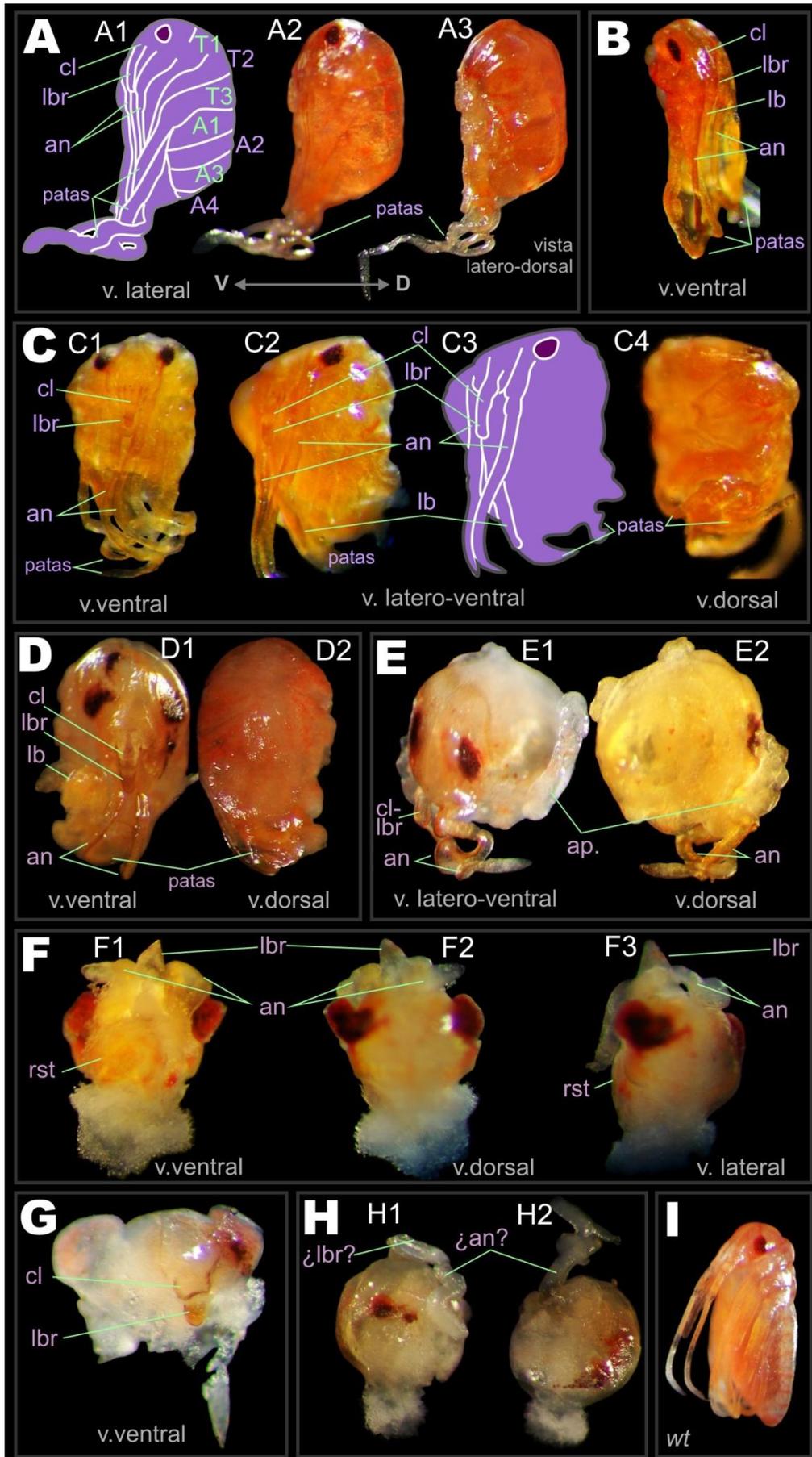


Fig.4.10. Fenotipos embrionarios de *cad*^{ARNi}. El efecto general consiste en pérdida de segmentos desde la región posterior hacia la anterior. **A.** Pérdida de segmentos abdominales. El aspecto general del embrión es normal, pero hay un acortamiento notorio en el abdomen. **B.** Pérdida y malformación de segmentos abdominales. El embrión pierde su aspecto general normal. **C.** Pérdida completa del abdomen. El aspecto de la cabeza y el tórax es casi normal. Las estructura apendiculares y los ojos están bien formados. **D.** Pérdida de segmentos torácicos. Se observa sólo un par de patas. Todas las estructura cefálicas están bien formadas, excepto los ojos, que presentan dispersión de facetas. **E.** Pérdida de todos los segmentos torácicos. Clípeo, labro, antenas y ojos están relativamente bien formados. Se observan unas masas con aspecto de apéndices indiferenciados, que probablemente correspondan a apéndices gnatocefálicos malformados. **F.** En los casos de mayor acortamiento, se observan tres tipos de estructuras: el labro, las antenas y los ojos; todos ellos en estados inmaduros del desarrollo. **G.** Un espécimen muestra ojos, clípeo y labro bien desarrollados. **H.** Especimen con pérdida total de forma. Se observan facetas oculares dispersas y estructuras con aspecto apendicular indiferenciado, posiblemente correspondientes a antenas. No es posible determinar si hay rudimento labral presente o no. **I.** Especimen *wt*. **an**, antena; **ap**, apéndice; **cl**, clípeo; **lb**, labio; **lbr**, labro; **mn/mx**, mandíbula/maxila; **r.i.a.**, rudimento de intestino anterior; **rst**, rostro; **s.epc**, surco epicraneal; **vt**, vitelo; **A1-A4**, segmentos abdominales 1 a 4; **T1-T3**, segmentos torácicos 1-3.

Dada la gran proporción de fenotipos que correspondieron solo a estructuras cefálicas, se hizo un análisis más detallado de las mismas. La **Fig.4.11** muestra un grupo de especímenes en estadios medios del desarrollo, de entre 5 y 12dAEL. Todos los especímenes analizados, sin importar la edad, se encontraron en una posición semejante a la de los embriones de ~5dAEL, es decir, previo a la katatrepsis (**Fig.4.11A**).

La **Fig.4.11B** muestra la relación existente entre estos embriones y el vitelo. En embriones *wt*, sólo las regiones meso/endodérmicas están en estrecho contacto con éste. Como puede verse en estos fenotipos de *cad*^{ARNi}, la región terminal del embrión con aspecto de “gorguera”, es la única que permanece en íntimo contacto con el vitelo. Esto, sumado a su falta de pigmentación y aspecto tubular, dan indicio de que se trata de tejidos que corresponden a las futuras regiones internas del embrión. Esta masa de tejido indiferenciado, por su localización, podría tener continuidad con el estomodeo. En el desarrollo de insectos de banda corta, la gastrulación genera el ectodermo y el mesodermo, mientras que la capa endodérmica se forma por crecimiento de dos

masas celulares, surgidas en la región anterior a continuación del estomodeo y en la región posterior, junto al proctodeo (**ANEXO VIII**). Por estos motivos, a esa masa indiferenciada de tejido, le asigné la identidad putativa de rudimento del intestino anterior.

En la mayoría de los casos, sobre la base de la morfología y la pigmentación, es posible identificar con claridad algunas estructuras que permiten orientar el embrión. La región que corresponde al futuro surco epicraneal se destaca en este sentido, ya que se observa incluso en los casos en que se ha perdido toda otra referencia. La mayor parte de los embriones presentan bien diferenciada la zona correspondiente a la futura placa frontal, al cípeo y al labro. Los ojos también suelen conservarse. Finalmente, las antenas pueden estar un poco más pigmentadas de lo que se observa en embriones *wild type* de su misma edad, pero conservan su ubicación y morfología externa. En todos los casos, me refiero a la morfología inmadura correspondiente al estado de desarrollo en que se encuentra el espécimen.

La **Fig.4.11C** muestra un espécimen de ~8dAEL, donde el sutura epicraneal es visible pero ha perdido su pigmentación temprana, los ojos comienzan a desarrollarse y las antenas se han alargado. El rostro está alargado ventralmente y se observa al menos un par de apéndices adicionales, segmentados. Aparentemente son dos pares. Según **Mellanby (1935)**, las maxilas se segmentan y se observa el palpo en un estadio temprano, pero no en estadios avanzados como éste. Concretamente, las estructuras que se observan aquí, tienen el aspecto de palpos maxilares de un aparato masticador. A esta altura del desarrollo normal hemíptero, las mandíbulas y maxilas están internalizadas y enrolladas.

En la **Fig.4.11D** se muestran varias vistas de un espécimen con una composición similar, pero más temprano (~5dAEL); se puede ver el rostro bien desarrollado, prominente, además de los ojos, las antenas y el labro. Se observa una estructura adicional de aspecto apendicular. Curiosamente, éste no es el único caso en que aparecen estructuras impares, mediales y en la región prominente del rostro. Se le asignó la identidad de mandíbula, exclusivamente debido a su localización. No existe ningún dato adicional para la asignación de identidad.

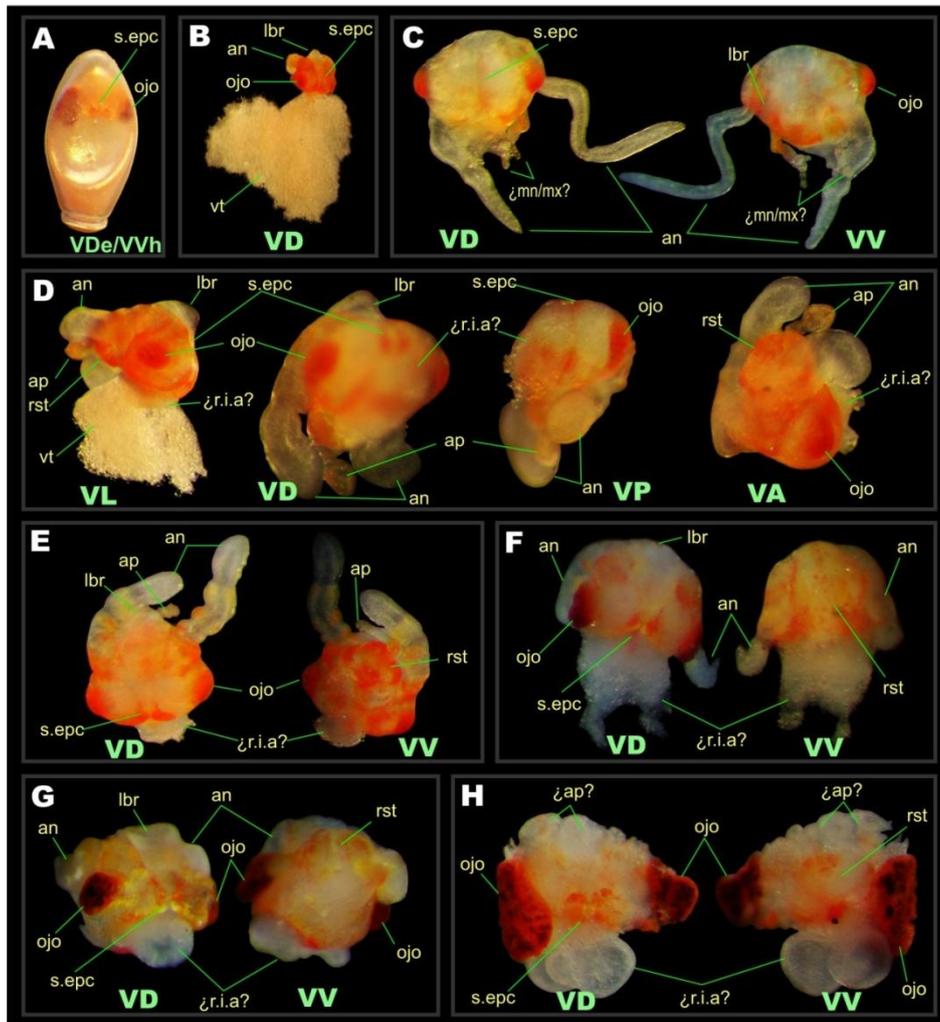


Fig.4.11. Fenotipos cad^{ARNi} ; detalle de estructuras cefálicas. Especímenes en estadios medios del desarrollo, entre los días 5 y 12AEL. **A.** Ubicación dentro del huevo. Ninguno de ellos sufrió katatrepsis. **B.** Relación entre el embrión acortado y el vitelo. **C.** Especímen con antenas y apéndices gnatocefálicos no invaginados. Las estructuras que se observan están segmentadas en varios posibles segmentos y tienen aspecto de palpos maxilares de un aparato masticador. **D.** Especímen con menor grado de maduración. Se observa el rostro alargado y un apéndice impar en la región media, posterior a las antenas. **E.** En gran parte de los especímenes de este grupo, el rostro no llega a hacerse tan prominente. Las antenas adquieren una pigmentación temprana y aspecto segmentado. **F.** Especímen con desarrollo heterocrónico de los ojos. No se observa ninguna estructura apendicular posterior a las antenas. El rostro no está desarrollado. **G.** Especímen con reducción de las estructuras apendiculares. Conserva cierto grado de forma, de manera que todavía es posible asignar identidad putativa a las estructuras. **H.** Especímen con mayor grado de malformación. Sólo los ojos tienen una identidad clara, pese a estar deformados. **an**, antena; **ap**, apéndice; **lbr**, labro; **mn/mx**, mandíbula/maxila; **r.i.a.**, rudimento de intestino anterior; **rst**, rostro; **s.epc**, surco epicraneal; **vt**, vitelo; **VA**, vista anterior; **VD**, Vista dorsal; **VDe/VVh**, vista dorsal del embrión y ventral del huevo; **VL**, vista lateral; **VP**, vista posterior; **VV**, vista ventral.

Las **Fig.4.11E,F** muestran dos heterocronías comunes en estos fenotipos, en los que antenas y/u ojos parecen más avanzados en el desarrollo, mientras la pigmentación del surco epicraneal, la morfología del labro y la falta de epicutícula indican una edad mucho menor. Por un lado, se observa una pigmentación temprana en las antenas (**Fig.4.11E**), también aquí aparece un apéndice impar adicional, cercano a la línea media pero el desarrollo del rostro es menor. Por otro lado, en la **Fig.4.11F** las antenas no están tan pigmentadas y en cambio, los ojos tienen el aspecto de un embrión avanzado. En embriones con el rostro aplanado y los ojos tan dorsalizados, la primera sensación visual, nos provoca un equívoco respecto a la dirección del eje D-V; el surco epicraneal es de gran ayuda para la orientación en estos casos.

En el caso mostrado en la **Fig.4.11G**, el rostro está más desarrollado, y hay una importante reducción de estructuras apendiculares, tanto de las antenas como del labro. Un aspecto interesante a destacar es que en embriones en que los apéndices anteriores están muy reducidos y los ojos se desarrollan tempranamente, éstos aparecen “saltones”, como botones. En casos en que la morfología está menos delimitada, todavía se observa la pigmentación del surco epicraneal, que permite definir la región dorsal (**Fig.4.11H**). Los ojos pueden aparecer deformes, desbalanceados, pero conservan su posición respecto al surco. Se observan unas saliencias blanquecinas que parecen corresponder a rudimentos apendiculares muy reducidos.

C.6.3.- ¿Fenotipos extremos o fenotipos extra?

Un fenotipo interesante de destacar, el más extremo entre aquellos que alcanzaron algún grado de morfogénesis, consistió en la aparición de estructuras oculares ectópicas (**Fig.4.12**), con una variación muy amplia en su grado de desarrollo. En los fenotipos menos llamativos, se observaron unas pocas facetas oculares (**Fig.4.12A**) que pasan casi desapercibidas. Aunque no se realizaron estadísticas, parece haber una correlación entre la pérdida de estructuras asignables a apéndices y el aumento de facetas oculares (**Fig.4.12B, C**), aunque esta correlación no es estricta. En los casos más sorprendentes, se observó un ojo supernumerario perfectamente formado

(Fig.4.12D). Algunos ejemplares, por otra parte, resultaron en una desorganización total de los ojos, con facetas dispersas en toda la superficie (Fig.4.12E).

En los casos en que fue posible determinar ejes, principalmente tomando como referencia el surco epicraneal, se vio que las estructuras supernumerarias, aparecían recurrentemente en la región opuesta al surco, aproximadamente donde deberían estar las estructuras bucales.

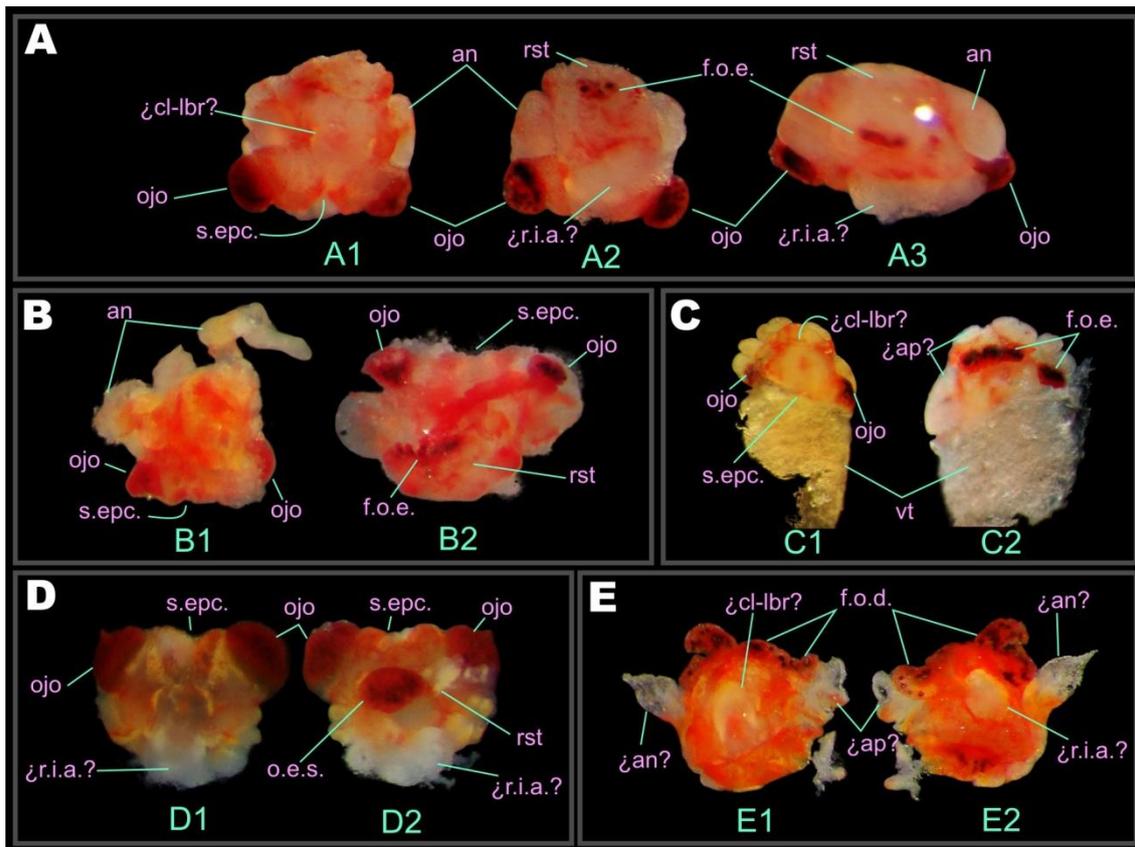


Fig.4.12. Fenotipos cad^{ARNi} ; foco sobre los ojos. **A.** Facetas oculares ectópicas; vista anterior (A1), posterior (A2) y ventral (A3). **B.** Agrupamiento lineal de facetas oculares ectópicas en el rostro; vista anterior (B1) y ventral (B2). **C.** Varios agrupamientos de facetas oculares ectópicas y pérdida de morfología de apéndices; vista anterior (C1) y ventral (C2). **D.** Ojo supernumerario con morfología externa “normal”, ubicado en la región donde deberían estar las estructuras bucales. Vista dorsal (D1) y ventral (D2). **E.** Facetas oculares dispersas, con pérdida de morfología de todas las estructuras. Los ejes de las vistas E1 y E2 son muy difíciles de definir. **an**, antena; **ap**, apéndice; **cl-lbr**; cípeo y labro; **f.o.d.**; facetas oculares dispersas; **f.o.e.**, facetas oculares ectópicas; **o.e.s.**, ojo ectópico supernumerario; **r.i.a.**; rudimento del intestino anterior; **rst**, rostrum; **s.epc**, surco epicraneal; **vt**, vitelo.

D.- Discusión

La amplificación y secuenciación de regiones génicas de interés contribuyó a mostrar que los métodos *in silico* utilizados son confiables. En los casos en que no se logró la amplificación, parece haber dificultades técnicas más que asociadas a predicciones incorrectas. En los casos en que las predicciones no fueron exactas, el propio análisis teórico permitió realizar correcciones. De 13 secuencias deducidas, 7 se pudieron amplificar con buena calidad, en una de ellas se detectó y se corrigió un error de predicción. Las cinco restantes incluyen a los dos genes que presentan casos problemáticos descritos en el capítulo sobre análisis *in silico*; además cuatro de ellas contienen sitios de *splicing*, un hecho que podría estar asociado a errores en el empalme teórico. Será necesario ajustar las condiciones experimentales para estos casos, para determinar si las secuencias son válidas. Dado que hay conservación en los alineamientos con ortólogos, lo esperable es encontrar errores menores. La comparación en los efectos entre los dos ensayos de interferencia mostró que la técnica no produce efectos en las hembras inyectadas *per se*, ya que en uno de los dos casos (*scr*), éstas tuvieron similares niveles de fertilidad y expectativa de vida respecto al control. De esto se deduce que de haber efectos en la viabilidad, éstos deben considerarse como parte del efecto de la interferencia.

Por otra parte, los fenotipos se revelaron como un continuo de formas menos aberrantes a formas más aberrantes, donde las menos aberrantes –aquellas que llegaron a eclosionar– aparecieron exclusivamente en la primera puesta. El efecto de la técnica aumenta paulatinamente en el tiempo y se sostiene durante la vida fértil de las hembras. Sin embargo, los fenotipos leves obtenidos en las primeras puestas resultan muy informativos para determinar efectos a nivel larval, que de otro modo no llegarían a verse.

La preponderancia de fenotipos más o menos drásticos, debería considerarse como una función del tiempo y también como una relación entre la cantidad de ARNdc inyectado y el rol del gen como TF. En este sentido, el gen *dorsal* (Pagola, 2012) aporta información adicional, ya que por participar en la inmunidad de los insectos adultos presentó efectos secundarios deletéreos que llevaron a la muerte de los adultos antes del momento de la puesta. En ese caso, la calibración exacta de la dosis inyectada fue de particular importancia para obtener descendencia.

Los ensayos de expresión de *scr* resultaron coherentes con las observaciones hechas en otros insectos para ese gen, con una expresión general conservada, y algunas variantes dentro de los segmentos involucrados. Se considera que las primeras mantienen la identidad de segmentos y estructuras, mientras que las últimas pueden ser las responsables de las diferencias morfológicas entre unos grupos y otros.

La *scr*^{ARNi} mostró una función correlacionada con la expresión de mensajero en embriones *wt*; el fenotipo se observa claramente en los segmentos labial y T1. El fenotipo de pérdida de peines en las patas protorácicas es la condición *sine qua non* para aseverar que se trata del gen *scr*, y se mantiene en la vinchuca. El estudio en un insecto hemimetábolo permite ver al mismo tiempo la determinación de la identidad de segmento –que corresponde a la función embrionaria de la *D.melanogaster*– y la determinación de la morfología de estructuras –que en la mosca corresponde a etapas post-embrionarias–.

La ausencia de peines en las patas T1 puede interpretarse como una transformación de la identidad del segmento, de T1→T2. Esto estaría en concordancia con lo observado en *Oncopeltus fasciatus* y *P.americana*, donde la supresión en estadios post-embrionales –larvas de 4° y 5° estadios– de *scr* induce la formación de esbozos alares en el segmento T1 (**Chesebro et al., 2009; Hrycaj et al., 2010**), lo que también implica una transformación a T2.

En el último segmento cefálico, ocurre una transformación de labio a pata. Esto también se observó en otros insectos (**Pattatucci et al., 1991; Rogers et al., 1997; Popadić et al., 1998; Hughes y Kaufman, 2000; Curtis et al., 2001**). De los tres segmentos del labio, sólo el distal está afectado, en concordancia con el patrón y el *timing* en la expresión del mensajero. En la banda germinal temprana, todo el apéndice labial expresa *scr* intensamente, mientras que en embriones más tardíos (~10dAEL), la expresión es sólo distal. Incluso en las larvas más aberrantes, los segmentos 1 –proximal– y 2 –medial–, son normales. Parece que *Rp-scr* está involucrado en dos eventos separados: una función temprana responsable de la identidad del segmento y una función posterior –dada por la expresión distal sostenida hasta etapas avanzadas–, determina la morfología final de los apéndices.

El rol de *scr* fue bien estudiado y establecido en *D.melanogaster*, donde interactúa con *pb* para establecer la parte distal de la identidad labial (**Pattatucci et al., 1991**; **Rogers et al., 1997**). Sin embargo, en *D.melanogaster*, *scr* tiene una regulación diferente. Durante la embriogénesis, *scr* reprime a *pb*, mientras que en los eventos post-embrionarios, en discos imaginales, lo activa. En otros insectos, *scr* afecta la formación del apéndice completo, como en *T.castaneum* y *O.fasciatus*. En *T.castaneum* también afecta la formación de estructuras cercanas involucradas en la unión entre la cabeza y el tórax (**Curtis et al., 2001**). En *O.fasciatus*, la falta de *scr* provoca una conversión del labio a un apéndice con características intermedias entre pata y antena, e involucra a todos los segmentos del apéndice (**Hughes y Kaufman, 2000**). El fenotipo de *Rp-scr^{ARNi}* se parece más al de *pb* en *O.fasciatus*.

Hughes y Kaufman (2000) proponen funciones separadas y coordinadas para estos genes, ya que cuando actúan solos, cada uno parece especificar identidad de pata; sin embargo, no son redundantes porque su depleción provoca fenotipos diferentes, mientras que cuando los dos están presentes, la identidad pasa a ser “labio”. Basándose en estas observaciones, ellos infieren que *scr* puede tener distintas funciones entre los insectos.

Una observación interesante, es el hecho de que se forma un peine tibial en la pata que sustituye el tercer segmento labial, indicando que se trata de una pata con identidad protorácica. Esto parece indicar que hay una transformación de Md/Mx/Lb/T1/T2 → Md/Mx/T1/T2/T2 (**Fig.4.13**), implicando un cambio de identidad de dos segmentos, e indicando que, al menos en *R.prolixus*, la regulación podría ser más similar a la de *D.melanogaster*, sin la separación entre eventos embrionarios y post-embrionarios. Aunque esto puede ser sorprendente, **Lavore et al. (2012)** observaron una situación semejante para el gen *giant*, donde hubo mayores similitudes con respecto a *D.melanogaster*, que con respecto a *O.fasciatus*.

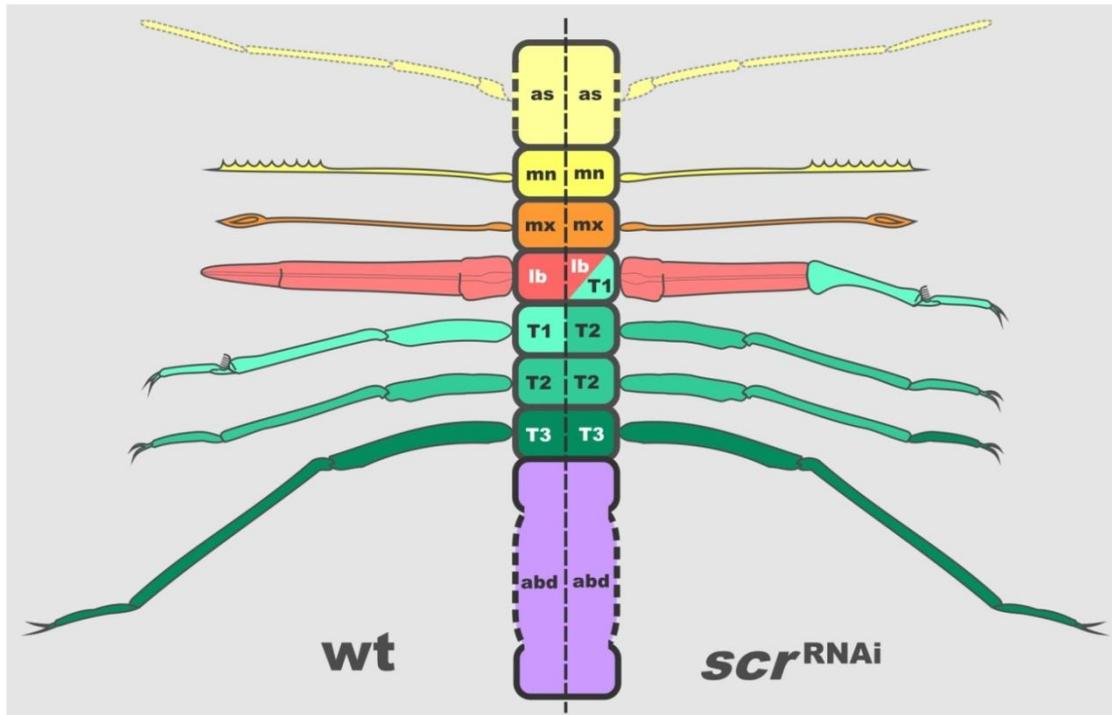


Fig.4.13. Esquematación del corrimiento del patrón observado mediante ARNi de *scr*. A la izquierda se ilustra la distribución normal de segmentos. A la derecha, los resultados obtenidos a partir de la *scr*^{ARNi}. El segmento labial muestra una identidad parcialmente transformada a primer segmento torácico (T1), y T1 se ha convertido en segundo (T2) dando lugar a una repetición de éste último. **as**, segmentos anteriores; **mn**, segmento mandibular; **mx**, segmento maxilar; **lb**, segmento labial; **T1- T3** segmentos torácicos 1 a 3; **abd**, segmentos abdominales.

En el caso del gen *caudal* se espera observar un patrón temporo-espacial de expresión semejante al que se mostró en la Fig.4.8A. La expresión de los mensajeros se desplaza de manera concomitante y acorde con las células que los expresan. Por lo tanto, en las etapas de blastodermo se espera encontrar el mensajero de *caudal* en la región posterior del huevo. A medida que la banda germinal se invagina en el vitelo, se espera encontrar a *caudal* en la zona posterior de ésta, en una localización aproximadamente coincidente con la zona de crecimiento.

Los experimentos muestran que la producción inicial del mensajero ocurre en el trofario y que es cargado en los huevos en formación, por lo que se lo puede considerar dentro del grupo de genes de efecto materno. Según las tinciones realizadas en huevos no embrionados, se puede deducir que la vida media de los mensajeros maternos es corta, ya que no se vio hibridación en este grupo.

La localización superficial de *caudal* está correlacionada de manera directa con la migración de núcleos a la superficie; la expresión del mensajero tiene una distribución claramente perinuclear en la región posterior, con un pequeño gradiente en la región media del huevo. El comportamiento tardío de la expresión del gen no se pudo determinar con precisión. Las marcaciones que se observan en las bandas germinales avanzadas son muy tenues y en las bandas medias son muy extendidas. Ninguno de estos dos casos se ajusta exactamente a lo esperado, pero tampoco es contradictorio.

Un dato curioso, que no muestro como resultado porque no he podido determinar si se trata de un resultado o de un artefacto, es que en algunos huevos de 2-3dAEL la expresión de la serosa apareció claramente más fuerte en la región anterior del huevo. Como se explicó en secciones previas, esta región es la que queda más expuesta a la sonda debido a las limitaciones de la decoración de huevos completos, por ese motivo es probable que la mayor intensidad se deba a ese hecho. Sin embargo, en caso de no ser un artefacto, es posible interpretar que en *R.prolixus* la señalización *caudal* puede estar actuando desde el exterior del huevo y no desde el extremo posterior de la banda germinal. Es importante recordar que desde que comienza la gastrulación hasta que comienza la katarépsis, los ejes del huevo y el embrión están invertidos, por lo que la expresión anterior en el huevo permanece posterior respecto al embrión (**Fig.4.14**).



Fig.4.14. Resultados observados y esperados para la expresión de *cad* en la banda germinal. Según los antecedentes en especies relacionadas, se espera encontrar expresión de caudal en la zona terminal de la banda germinal. Los experimentos muestran patrones de expresión más extendidos hacia la región anterior en la banda germinal. También se observó expresión en la serosa, en la región anterior del huevo; indicando un posible mecanismo de señalización externa y difusión.

En este caso, *caudal* no estaría actuando de manera directa, sino por un mecanismo de transporte como el que se ha descrito para otras proteínas con homeodominio. [Maizel et al. \(1999\)](#) describen un mecanismo de exportación nuclear, secreción y señalización a distancia para la proteína Engrailed; luego se han descubierto mecanismos semejantes para varias proteínas con HD de vertebrados ([Fig.4.15; Saptazza et al., 2013](#)). Los consensos para la internalización (I/V-X-I/V-W-F-X-N-R/K-R-X-K-X-K/R-X-X) y para la secreción (X-X-L/I-X-L-X-E-R/S-X-I/V) son relativamente laxos y están presentes en la proteína Caudal de *R.prolixus* –la secuencia mostrada a continuación es parcial–:

Rp-cad LELEKEFHYSRYITIRRKAEELATL **L****G****S****E****R****Q****K****I****W****F****Q****N****R****R****A****K****E****R****K****Q****M****K****K****R****E****L****I****H****K****E****K****M****Q**

Parece perfectamente probable que *Rp-Cad* utilice un mecanismo semejante.

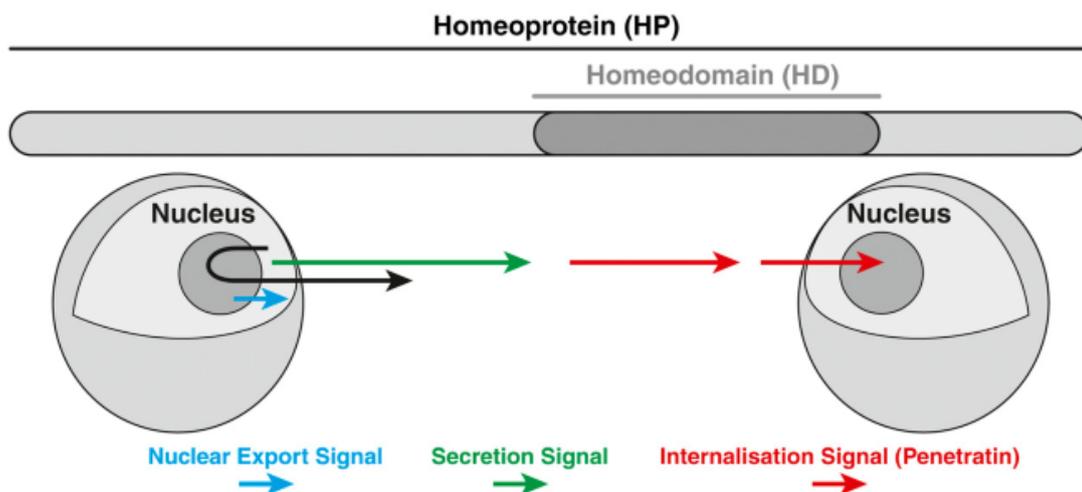


Fig.4.15. Mecanismo de señalización a distancia utilizado por proteínas con HD. Representación esquemática del proceso. Figura extraída de [Spatazza et al. 2013](#).

Por otra parte, en las bandas germinales medias como la de la [Fig.4.8Ñ](#), es llamativo que la coloración coincida con los engrosamientos del embrión, pero también es digno de destacar que los segmentos anteriores no muestran tinción. Una expresión extendida de *caudal* no es incompatible con el modelo de des-represión secuencial, que parece aplicarse bien a otros insectos de banda germinal corta; ya que en esos modelos el represor es *nos*, mientras que *cad* funciona como activador.

La depleción de *cad* muestra que sus efectos en *R.prolixus* se extienden todo a lo largo del eje A-P. Este efecto parece coherente con las expresiones observadas y con el modelo de des-represión secuencial.

En embriones interferidos, el arresto del desarrollo es parcial, dependiendo de qué factores se tengan en cuenta. Por un lado, la katatrepsis no ocurre en estos embriones. Con los datos actuales no es posible saber si esto es consecuencia secundaria de las malformaciones del embrión o si existen efectos adicionales sobre las membranas responsables de los movimientos embrionarios. La más parsimoniosa, sin embargo, es la primera opción, ya que las membranas traccionan de los bordes de la banda germinal para producir los movimientos; No es raro que el mecanismo requiera una banda germinal normal.

Por otro lado, tanto en los casos analizados en este trabajo, como en **Lavore et al., (2012)**, se vio que los cambios en la pigmentación, la formación de la cutícula y la maduración morfológica de las estructuras presentes, continuaron de manera independiente al arresto del desarrollo relacionado con el acortamiento embrionario. De estas observaciones se puede inferir que la suspensión de los eventos asociados a la formación de segmentos, no afecta la ocurrencia de los eventos madurativos.

La gran mayoría de los especímenes con el mayor grado de acortamiento y la menor pérdida de morfología, estuvo conformada por embriones consistentes en una región cefálica, con ojos, estructuras semejantes a esbozos del labro y las antenas, una estructura que parece corresponder al rudimento del intestino anterior y un eje D-V definido. Esto concuerda con los tres segmentos anteriores de una cabeza de 7 segmentos –labral, ocular, antenal, intercalar, mandibular, maxilar, labial– y de este modo, la estructura embrionaria mínima, estaría representada por los tres segmentos de una banda germinal corta. También concuerda con una cabeza de seis segmentos –ocular, antenal, intercalar, mandibular, maxilar, labial–. Si consideramos al labro como una estructura apendicular del segmento intercalar, se mantienen los tres segmentos iniciales. Por ese motivo, traté de determinar el tipo de estructuras presentes y su posible orden.

Una característica llamativa de estos especímenes obtenidos por *cad*^{ARNi}, es que no encontré situaciones en las que el labio estuviera presente como último segmento identificable. Se observaron estructuras apendiculares posteriores a las antenas, pero

con características que no corresponden exactamente a ninguno de los apéndices bucales. Puede tratarse de apéndices mandibulares y maxilares malformados y/o que fallaron en internalizarse y enrollarse. También es posible que haya apéndices internalizados y que lo que se observa corresponda al segmento labial, con un desarrollo arrestado. La apariencia impar en algunos ejemplares puede deberse a una imparidad real (**Fig.4.16A**) o a diferencias en el grado de internalización entre las estructuras derecha e izquierda (**Fig.4.16B**).

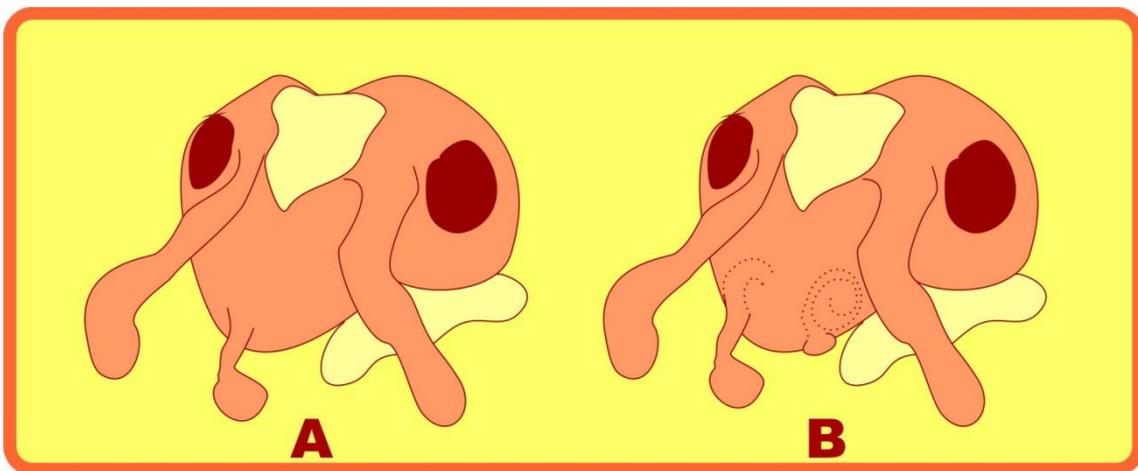


Fig.4.16. Interpretaciones sobre la observación de estructuras apendiculares impares en fenotipos de cad^{ARNi} . La estructuras impares observadas pueden deberse a distintos grados de desarrollo en los apéndices de un mismo segmento (**A**) o a diferentes grados de internalización de los mismos (**B**).

Una de mis expectativas en este trabajo era aportar datos en relación a la conformación de la cabeza de los insectos. Por un lado, las observaciones sobre la morfología temprana del esbozo labral, coinciden con otras observaciones según las cuales se trata de una estructura inicialmente par, con posible origen apendicular. En relación a si se trata de estructuras anteriores o anteriorizadas –tal como se discutió en la capítulo 1– la pérdida secuencial de segmentos posteriores ocurrida en los fenotipos cad^{ARNi} , puede ofrecernos algunos indicios en este sentido. La mayoría de los especímenes que presentan sólo regiones muy anteriores con estructuras asignables a apéndices, tienen tanto las estructuras que corresponden al futuro labro como a las presuntas antenas. En unos pocos casos, no hay ninguna estructura con aspecto de esbozo apendicular y en otros pocos casos, hay varias de ellas, con altos

grados de malformación que impiden asignarles identidad putativa. De los 144 especímenes analizados, 2 embriones parecen tener sólo estructuras similares a antenas y no es posible determinar si hay un labro (**Fig.4.10H**). Por otra parte, sólo un embrión parece tener un labro bien formado y sin antenas (**Fig.4.10G**). Ninguna de las dos situaciones es concluyente, sin embargo, me inclino por el segundo caso, que señala al labro como anterior respecto a las antenas y estaría en concordancia con el modelo “*Bend and zipper*” o con los modelos lineal y S (**Posnien y Bucher, 2010; Haas et al., 2001**). Esta opinión se fundamenta en que en el espécimen de la **Fig.4.10G**, las estructuras presentes están bien formadas y las antenas –que deberían estar a los lados del clípeo– están claramente ausentes. En el caso mostrado en la **Fig.4.10H**, no es posible determinar con certeza las identidades ni el número de estructuras presentes.

Si consideramos al labro como apendicular y tomamos en cuenta las observaciones de **Mellanby (1935)**, que afirma la existencia de apéndices transitorios originados en el segmento intercalar, deberíamos considerar al labro como una estructura genuinamente anterior, ya que no esperamos encontrar dos pares de apéndices en ningún segmento. Sin embargo, no he logrado observar tales apéndices transitorios. Estos apéndices correspondientes al segmento intercalar, de existir, podrían no reducirse totalmente; existe una hipótesis sobre el origen hipofaríngeo de las placas locales en hemípteros –dos placas que se encuentran a los lados del anteclípeo– (**Parsons, 1974**). Existe también una discusión sobre el posible origen apendicular de la hipofaringe (**Kukalova-Peck, 1987**). Esta hipótesis sugiere que dado que las glándulas salivales desembocan en la base de la hipofaringe, y que estas glándulas derivan de glándulas coxales, la base de la hipofaringe podría homologarse a la región coxal de los apéndices del segmento intercalar. Si así fuera, el labro quedaría descartado como estructura, sea apendicular o no, del segmento intercalar. Sería interesante poner a prueba estas hipótesis, aunque por el momento mis observaciones no ayudan a dirimir las. En cambio, sí creo que apoyan los modelos que señalan al labro como una estructura par y anterior a las antenas.

Los ojos plantean un desafío intelectual particularmente interesante. Los casos de desorganización absoluta son los que menos sorprenden. En cambio, encontré varias situaciones curiosas:

- ♦ des-sincronización madurativa respecto al resto de las estructuras
- ♦ son las únicas estructuras anteriores que presentan malformación evidente en embriones con menor grado de acortamiento
- ♦ embriones con fenotipo extremo de acortamiento, muestran tres ojos aparentemente bien formados, y con una localización constante
- ♦ el ojo supernumerario se localiza aproximadamente donde debería estar el estomodeo.

Según el modelo de des-represión secuencial, en ausencia de crecimiento de la banda germinal, los genes *gap* permanecen inactivos y por lo tanto no se establece la topología determinada por éstos y por los genes que están más abajo en la jerarquía de diferenciación. De este modo toda la región puede tener una identidad establecida por *default* en ausencia de señal. Esta identidad parece ser la del segmento ocular. La distribución equidistante de las tres estructuras oculares presentes podría estar dada por algún tipo de diferenciación dependiente de la distancia a la señal y/o con zonas de inhibición, tal como ocurre con muchas estructuras repetidas que se expresan en patrones ordenados. Tal es el caso de los estomas regularmente distribuidos en la epidermis foliar, los propios ommatidios dentro del ojo, o ciertos ciclos florales más complejos, ordenados según la serie de Fibonacci. Este tipo de ordenamiento se produce durante el desarrollo por reacciones de inducción o inhibición dadas por gradientes morfogénos de corto alcance; la distancia en relación a la fuente induce distinta diferenciación y a un nivel más general se generan patrones de mosaico. La distribución de estructuras oculares, parece responder a este tipo de ordenamiento.

La mayoría de los casos en que aparece un ojo ectópico, tienen los esbozos de labro y antenas. El ojo supernumerario no reemplaza estructuras apendiculares, ya que coexiste con ellas en la mayoría de los casos en que aparece. El ejemplar que se ve en la **Fig.4.12D** parece no tener esbozos de labro y antenas, por lo tanto, parece que el segmento ocular es el único presente. Esto indicaría al segmento ocular como anterior, en concordancia con la hipótesis “*L/BentY*”, según la cual el segmento ocular es el primero, la cabeza está formada por seis segmentos, y la estructura labral pertenece al segmento intercalar (**Haas et al., 2001**).

En cualquier caso, está claro que la expresión de los genes implicados en el desarrollo del ojo, no es afectada por la depleción de caudal. La tendencia a

desarrollar facetas oculares supernumerarias incluso en fenotipos intermedios, indica una posible sobre-expresión de este grupo de genes. Esto me lleva a preguntar si en *R.prolixus*, los genes que determinan la formación del ojo –*six*, *eyeless*–, podrían estar actuando también como morfógenos anteriores.

Consideraciones finales

Los estudios embriológicos con una perspectiva evolucionista son tan antiguos como la propia teoría evolutiva. Sin embargo, durante una buena parte del tiempo transcurrido desde las publicaciones de Darwin y Wallace, los aportes provenientes de este campo permanecieron marginales. La embriología continuó haciendo sus aportes a la teoría general de la evolución, pero en muchas ocasiones, como reseñé en la introducción, los distintos enfoques generaron tensiones y distanciamientos, especialmente con los defensores del gradualismo a ultranza.

Desde fines del siglo XX, un campo en constante desarrollo conocido como EvoDevo está reconciliando las distintas miradas y restituyendo un papel de importancia para los estudios del desarrollo. Las principales preguntas de la EvoDevo tienen raíces históricas profundas. Entre las centrales, se destacan el origen y evolución del desarrollo embrionario en sí mismo, la generación de novedades evolutivas, la importancia de la plasticidad adaptativa, el impacto de la ecología en el desarrollo y las bases de la homología y la homoplasia. Así, la EvoDevo no se restringe al campo de la genética del desarrollo, sino que busca conectar el genotipo y todos los fenotipos que éste puede producir.

La evolución de Arthropoda desde el cámbrico medio ha implicado cambios antes y después del estado filotípico, pero no en el estado filotípico mismo –la banda germinal segmentada–, que es una colección espacialmente organizada de compartimientos auto-definidos, donde ocurren procesos de morfogénesis. La conservación de los *bauplane* por 350 millones de años es explicada por algunos autores invocando la restricción de un plan corporal muy ajustado, tanto que cualquier modificación es letal. Antes de este estado, el desarrollo involucra procesos altamente interdependientes, no compartimentalizados y por lo tanto, sensibles a los cambios. Otros autores consideran que los planes corporales han sobrevivido a causa de las muchas diversificaciones ofrecidas por su evolucionabilidad. Sugieren que la red de reacciones que caracteriza el *bauplan* del estado filotípico tiene pocas demandas sobre las reacciones en los estadios tempranos. El embrión temprano es consecuencia de polaridades maternas que se establecen por diversos mecanismos, una vez determinadas son auto-perpetuadas en el estado filotípico. Como la evolución del

huevo está vinculada a las especializaciones reproductivas en el ciclo vital del organismo, está bajo fuerte presión selectiva. Desde este punto de vista, un *bauplan* filotípico es un grupo conservado de reacciones espacialmente ordenadas, seleccionadas para las historias de vida que soportan. Esta corriente considera que algunos procesos están conservados, no tanto por restricciones sobre ellos mismos, como por el hecho de que liberan la variación fenotípica en otros procesos y así facilitan el cambio evolutivo.

La producción de novedades y cambios antes y después del estado filotípico, yace sobre modificaciones en la expresión, pero también puede involucrar la adquisición, modificación y pérdida de genes. Existen muchos mecanismos involucrados en la evolución de nuevos genes y genomas. El enfoque tradicional acuerda en que los principales genes del desarrollo se comparten por ancestría y que estuvieron presentes en un ancestro animal precámbrico, previo a la aparición de la bilateralidad, el *urbilaterio*. Durante la explosión cámbrica, la diversidad de formas se habría generado no tanto por innovaciones a nivel de secuencias codificantes, sino por cambios regulatorios y combinatoriales –heterocrónicos y heterotrópicos–.

Realicé, en colaboración, una **revisión del desarrollo de *R.prolixus*** utilizando técnicas modernas. No sólo presenté una descripción actualizada y enfocada en los aspectos de mayor interés para mi estudio, sino que además aporté imágenes que ayudan a comprender eventos complejos del desarrollo de insectos de banda corta/intermedia en general. De este modo, contribuyo a la comprensión de la forma más basal de desarrollo de Insecta.

Busqué y analicé muchas de las secuencias que deben haber estado presentes en el *urbilaterio*. El **análisis *in silico*** realizado aquí brindó una gran cantidad de información, parte de la cual fue validada por datos experimentales. Este trabajo abarcó las distintas etapas de secuenciación genómica y los avances en el estado de secuenciación permitieron refinar los datos continuamente. La participación en el proceso de secuenciación, me permitió tener acceso a las sucesivas bases de datos, de modo que pude complementar la información de distintas fuentes y evaluar la calidad de dicha información.

Entre las **secuencias codificantes que fueron identificadas**, curadas y anotadas, pude establecer tres grupos con diferente grado de certeza teórica respecto a su calidad y completud: teóricamente completas –extremos y sitios de empalme

conservados presentes–; teóricamente incompletas –extremos y sitios de empalme conservados ausentes–; y secuencias a determinar –carezco de datos suficientes para inclinarme por una u otra circunstancia–. Como resultado de un *screening* más general, logré identificar en total unos 70 TF, que es un número importante en el total de TF del grupo con homeodominio. Considero que he generado un gran cúmulo de datos que abren la posibilidad a muchos nuevos rumbos de investigación.

El trabajo con las bases de datos me permitió hacer un **análisis de calidad** de los mismos y sus cambios en el tiempo, así como algunas consideraciones generales respecto al genoma de *R.prolixus*. Encontré que la compactación de la información, al mismo tiempo que mejoró su conectividad, también implicó pérdida, por lo que en muchos casos es necesario acudir a los datos crudos, sin procesar. En lo que respecta al **genoma de *R.prolixus* y sus características intrínsecas**, tiene una gran cantidad de repeticiones largas dispersas y todas sus secuencias, en general, parecen estar muy dispersas, con sendas regiones no codificantes, intra e intergénicas.

En algunos animales, el orden de los genes homeóticos sobre el cromosoma es colineal con sus dominios de expresión y función sobre el eje embrionario. Tradicionalmente, desde que se hicieron alineamientos entre los **clusters HOX** de *D.melanogaster* y vertebrados –ranas, ratones–, se ha considerado que los *HOX* aparecen siempre en clusters colineales. Luego, la información genómica de otros organismos mostró que los genes *HOX* pueden ordenarse y agruparse de formas diversas, y que pueden estar dispersos. Los genes *HOX* de *R.prolixus* están agrupados en un *cluster*, probablemente sin particiones. No fue posible determinar de manera definitiva el ordenamiento, debido a los baches existentes en la secuenciación genómica; sin embargo se plantean agrupamientos probables.

Los genes analizados, si bien tienen gran variedad de secuencia, muestran una clara tendencia a conservar dominios. En muchos de los casos no se conoce la función del dominio ni la especificidad de los residuos que pueden aparecer modificados; sin embargo, en los casos en que la función es conocida –e.g., el homeodominio–, la secuencia se mantiene con rigurosidad. También observé algunas pocas situaciones –*lb*, *cad*, *cut*, *pknox2*, *ara*– en las que algunos módulos conservados dentro de la secuencia están presentes en unas especies y ausentes en otras. En la mayoría de estos casos, es muy probable que la secuencia esté incompleta. Si en

estudios futuros se confirmaran cambios en módulos conservados, sería de particular interés analizarlos funcionalmente.

Los **experimentos funcionales** realizados mantienen patrones de expresión generales, con algunas diferencias específicas, en relación con lo observado en otras especies. Los genes *cad* y *scr* son de jerarquías diferentes, pero ambos pueden ser considerados centrales dentro de las redes regulatorias:

- ◆ ejecutan funciones de determinación del patrón,
- ◆ están destinados a funciones específicas,
- ◆ los productos de otros genes regulatorios son necesarios para la función de cada módulo del proceso central y
- ◆ producen fenotipos catastróficos de pérdida de función.

Los ensayos funcionales mostraron fenotipos de interferencia coherentes con la expresión de los ARNm en los embriones *wt*. En ambos se obtuvo una serie fenotípica que permitió observar distintos efectos de pérdida de función. Este continuo de fenotipos resulta muy útil para establecer niveles de actividad en el espacio y en el tiempo, ya que se observan distintas manifestaciones a medida que el efecto de interferencia aumenta.

La *scr*^{ARNi} generó fenotipos semejantes a los observados en *D.melanogaster*, pero sin separación temporal de funciones embrionarias y post-embrionarias, tal como ocurre en *O.fasciatus*. La pérdida de peines tibiales en la pata protorácica, no se sostiene desde el punto de vista de la determinación de una estructura particular, ya que se pueden encontrar peines más o menos bien formados en las patas ectópicas del tercer segmento labial. Esto lleva a pensar que en realidad, debemos enfocarnos el cambio de la identidad del segmento. Este hallazgo es coherente con lo encontrado en *O.fasciatus* y *P.americana*, donde la *scr*^{ARNi} en etapas larvales avanzadas provocó una des-represión en la formación de las alas. En este caso, de manera similar a lo que ocurre con los peines, podemos ceñirnos a la actividad del gen sobre la estructura particular, inductora o represora; sin embargo, todo esto es consistente con la actividad *HOX* canónica sobre la identidad del segmento, más que con sus efectos sobre estructuras particulares. De este modo, interpreto que la ausencia de peines en las patas protorácicas y su presencia en las patas labiales ectópicas, debe explicarse en base a un desplazamiento de identidad, con cambios parciales de Lb→T1 y

T1→T2. Según mi apreciación, las larvas eclosionadas corresponden a los fenotipos menos drásticos y a los efectos más tardíos del gen en la morfogénesis.

Los embriones *cad*^{ARNi} indican una actividad muy marcada del gen como determinante de segmentación posterior en casi toda la longitud del embrión. Los fenotipos más extremos permitieron inferir que *caudal* actúa muy tempranamente sobre la banda germinal desde el inicio de la gastrulación, ya que aparentemente los únicos segmentos que no están afectados por la depleción del gen son los procefálicos. Este resultado es consistente con lo encontrado en otros insectos de banda germinal corta, como *T. castaneum* o *Gryllus bimaculatus*. El ARNm de *cad* en bandas germinales *wt* parece tener una expresión extendida, en relación a la observada en otras especies de banda germinal corta. A su vez, el efecto de *cad*^{ARNi} tan extendido en el eje A-P, es coherente con la hipótesis según la cual *nanos* y *caudal* actúan coordinadamente en la región terminal, provocando una des-represión secuencial de genes gap anteriores a medida que la banda germinal se alarga.

En relación a la conformación de la cabeza, las observaciones coinciden con otros trabajos según los cuales el labro comienza como una estructura par, manteniendo la idea de un posible origen apendicular. Respecto a si se trata de estructuras anteriores o anteriorizadas, no llegué a resultados concluyentes: en la mayoría de los casos, cuando el futuro labro está presente, también lo están las antenas, y viceversa. Dos embriones parecen tener sólo estructuras similares a antenas y un embrión parece tener un labro bien formado y sin antenas. Ninguna de estas dos situaciones parece concluyente. Por otra parte, los ojos son las únicas estructuras anteriores que presentan malformación evidente en embriones con menor acortamiento, mientras que algunos embriones con fenotipo extremo tienen tres ojos aparentemente bien formados y con una localización constante.

La mayoría de los especímenes con el mayor grado de acortamiento y la menor pérdida de morfología, consistió en una región cefálica con ojos, estructuras semejantes a esbozos del labro y las antenas, una estructura que parece corresponder al rudimento del intestino anterior y un eje D-V definido. Aparentemente, el embrión mínimo, estaría representado por tres segmentos, tal como los de una banda germinal corta.

En resumen

- ✓ Realicé una **descripción detallada del desarrollo de *R.prolixus*** desde el punto de vista de la biología del desarrollo, aporté imágenes que ayudan a la comprensión de los eventos complejos implicados en el desarrollo de insectos de banda corta así como una cronología de eventos necesaria para el estudio sistemático de patrones de expresión génica. A esto se suma una serie de esquemas interpretativos que en conjunto, componen el atlas más completo disponible actualmente para un insecto de banda germinal corta/intermedia.
- ✓ Logré **identificar y anotar a todos los genes *HOX*** y a una buena proporción de TF con homeodominio. Determiné la agrupación de los genes *HOX* en un *cluster* y arribé a 5 hipótesis probables para la formación del mismo. La anotación de varios genes *HOX* y otros TF fue corroborada experimentalmente.
- ✓ Establecí, en colaboración, **las técnicas necesarias para realizar ensayos funcionales**: ARNi parental y WMISH.
- ✓ Para dos **genes *HOX* determiné el patrón de expresión y los efectos que produce su ausencia**. En el caso de *scr*, el patrón de expresión y la función están conservados en términos generales, y muestran variantes específicas de especie, posiblemente relacionadas con la forma. Los hallazgos indican un funcionamiento más semejante al de *D.melanogaster* que al de especies relacionadas, como *O.fasciatus*. En el caso de *cad*, el patrón de expresión está conservado en estadios muy tempranos y es complejo en la etapa de banda germinal. Los ensayos de interferencia, en cambio, mostraron una clara actividad en la segmentación posterior. El gen actúa desde el comienzo de la gastrulación y tiene efectos en todo el futuro embrión, excepto –quizá– en los tres primeros segmentos cefálicos, que conforman la unidad mínima de una banda germinal corta.

Perspectivas futuras

El cúmulo de datos presentados en esta tesis abre caminos para entender los procesos del desarrollo en insectos de banda germinal intermedia y los procesos evolutivos inherentes. A fin de ejemplificar mencionaré sólo algunos.

He realizado una descripción de la morfogénesis completa, sería interesante profundizar en el desarrollo de las estructuras cefálicas. La identificación de numerosos genes y el desarrollo de ensayos funcionales permitirá estudiar la función en la formación de la cabeza de *so/six1*, *eyeless*, *otd*, *ems*, *buttonhead* y *collier*.

Los estudios funcionales en *scr* dejan pocas dudas respecto a la expresión y función en larvas eclosionadas. Sería interesante establecer un método para investigar el desarrollo de los estiletes y peines tibiales en estadios previos a la eclosión. Asimismo se deberían desarrollar métodos de estudio para la función génica en estadios larvarios, ya que en estas etapas se producen eventos importantes en la evolución de la forma. El estudio combinado de la identidad T1 –la ausencia de alas y la presencia de peines tibiales– contribuirá a reforzar mi hipótesis sobre la transformación T1 → T2.

En el caso de *cad* sería interesante realizar depleciones combinadas de este gen junto a posibles morfógenos anteriores, cuando fuesen identificados. Puede ser interesante estudiar la expresión de genes anteriores en los fenotipos extremos de *cad*, para discernir el origen y orden de los escasos segmentos anteriores.

Por otro lado, el conocimiento del genoma de *R.prolixus* nos permitirá identificar potenciales regiones regulatorias para cada gen con el fin de analizar experimentalmente los TF interactuantes, algo que aún no se ha hecho por fuera de *D.melanogaster*.

Finalmente queda una importante cantidad de trabajo por hacer, tal como el análisis de la expresión y función de todos los genes que he identificado en esta tesis con las herramientas desarrolladas.

Gracias

A Rolando, por haberme dado un lugar en su equipo, por confiar en mi trabajo, por darme libertad de acción y por la invaluable tarea cotidiana de docencia que hace desde su lugar de director (y unas 500.000 gracias más).

A Javier, por haberse aventurado en este universo lleno de monstruos inverosímiles. Los aportes de su mirada sistemática han sido imprescindibles para interpretar y discutir los resultados (y otras 500.000 gracias más).

A Lucía, porque hemos sido compañeras en los desvelos, frustraciones y alegrías durante años de trabajo ¡y seguimos siendo amigas incluso después de eso!

A Andrés, por haber compartido también charlas, discusiones, materiales.

Al Servicio Nacional de Chagas, Sede Punilla, y especialmente al Sr. Raúl, por el abastecimiento de vinchus. A Corita, por ayudarme a alimentarlas. A Cecilia, por sus conocimientos de sistemática de redúvidos. A Viki, por el vector. A todos los compañeros del CREG y en particular del Laboratorio 12, por el buen clima y el intercambio.

Al Cristina y Néstor; entre otras cosas, porque sus políticas de gobierno nos permiten trabajar y hacer ciencia en el país, y porque sus políticas de DDHH me permiten respirar. A las viejas y los compañeros y compañeras que siguen firmes, hacen que este mundo sea un poquito mejor y nos dignifican. A todas las mujeres que no se dieron por cautivas, y nos desmalezaron caminos a las mujeres del presente.

A los que me sostienen y me ayudan en mis batallas y laberintos. A mi vieja, a mi viejo, a Ale, Carli, Javi, Juanete. A Nacho. A Pablo. A Emma. A Leo y Viki. En fin, a los amigos, familia y compañeros de vida; sin ellos no podría haber llegado hasta acá.

Bibliografía

- ◆ Abouheif, E., and Wray, G. A., 2002. Evolution of the gene network underlying wing polyphenism in ants. *Science*, 297, 249–252.
- ◆ Akam, M., 1998. Hox genes: from master genes to micromanagers. *Curr. Biol.* 8(19), R676-678.
- ◆ Akam, M., 2000. Arthropods: developmental diversity within a (super) phylum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4438–41.
- ◆ Alonso, C. R., Maxton-Kuechenmeister, J., Akam, M., 2001. Evolution of Ftz protein function in insects. *Curr. Biol.* 11(18), 1473-1478.
- ◆ Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. and Lipman, D., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215,403-410. (BLAST)
- ◆ Angelini, D. R., Liu, P., Hughes, C. and Kaufman, T., 2005. Hox gene function and interaction in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera). *Dev Biol* 287(2), 440-455.
- ◆ Angelini, D. R. and Kaufman, T. C., 2005. Insect appendages and comparative ontogenetics. *Dev. Biol.* 286, 57–77.
- ◆ Araujo, R. N., Santosa, A., Pintoa, F.S., Gontijoa, N.F., Lehaneb, M.J. and Pereira, M.H., 2007. RNA Interference of the Salivary Gland Nitrophorin 2 in the Triatomine Bug *Rhodnius Prolixus* (Hemiptera : Reduviidae) by ARNdc Ingestion or Injection. *Insect Biochem.* 36(9), 683–693.
- ◆ Averof, M. and Cohen, S. M., 1997. Evolutionary origin of insect wings from ancestral gills. *Nature* 385(6617), 627-630.
- ◆ Barton, N. and Partridge, L., 2000. Limits to natural selection. *Bioessays* 22(12), 1075-1084.
- ◆ Beeman, R. W., Stuart, J.J., Haas, M.S., Denell, R.E., 1989. Genetic analysis of the homeotic gene complex (HOM-C) in the beetle *Tribolium castaneum*. *Dev Biol* 133(1), 196-209.
- ◆ Birkan, M., Schaeper, N.D. and Chipman, A.D., 2011. Early patterning and blastodermal fate map of the head in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. *Evol Dev* 13(5), 436-447.
- ◆ Bonner, J.T., 1955. *Cells and Societies*. Princeton, Princeton University Press.
- ◆ Bowsher, J. H. and Nijhout, H. F., 2007. Evolution of novel abdominal appendages in a sepsid fly from histoblasts, not imaginal discs. *Evol Dev* 9(4), 347-354.
- ◆ Bowsher, J. H. and Nijhout, H. F., 2009. Partial co-option of the appendage patterning pathway in the development of abdominal appendages in the sepsid fly *Themira biloba*. *Dev Genes Evol* 219(11-12), 577-587.
- ◆ Brooke, N. M., Garcia-Fernández, J. and Holland, P. W., 1998. The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster. *Nature* 392, 920–2.
- ◆ Brookfield, J. F., 2009. Evolution and evolvability: celebrating Darwin 200. *Biol Lett* 5(1), 44-46.
- ◆ Brown, S., Fellers J., Shippy T., Denell R., Stauber M., Schmidt-Ott U., 2001. A strategy for mapping bicoid on the phylogenetic tree. *Curr. Biol.* 11(2), R43-44.
- ◆ Brusca, R. C. and Brusca, G. J., 2003. *Invertebrates*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- ◆ Bustamante, C. D., Fledel-Alon, A., Williamson, S., Nielsen, R., Hubisz, M.T., Glanowski, S., Tanenbaum, D.M., White, T.J., Sninsky, J.J., Hernández, R.D., Civello, D., Adams, M.D., Cargill, M., Clark, A.G., 2005. Natural selection on protein-coding genes in the human genome. *Nature* 437(7062), 1153-1157.
- ◆ Butt, F. H., 1943. Comparative study of mouth parts of representative Hemiptera-Homoptera. *Cornell Univ. Agric. Eap. Stn. Mem.* 254. pp. 1-20.

- ◆ Campos-Ortega, J.A., and Hartenstein, V., 1985. The Embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag, Berlin.
- ◆ Carapelli, A., Liò, P., Nardi, F., van der Wath, E., Frati, F., 2007. Phylogenetic analysis of mitochondrial protein coding genes confirms the reciprocal paraphyly of Hexapoda and Crustacea. BMC Evol Biol 7 Suppl 2: S8.
- ◆ Carroll, S. B., 2005. Evolution at two levels: on genes and form. PLoS Biol 3(7), e245.
- ◆ Carroll, S. B., 2008. Evo-devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution. Cell 134(1), 25-36.
- ◆ Cerny A.C., Bucher G., Schröder R, Klingler M., 2005. Breakdown of abdominal patterning in the *Tribolium Krüppel* mutant jaws. Development 132, 5353–5363
- ◆ Chesebro, J., Hrycaj, S., Mahfooz, N., Popadić, A., 2009. Diverging functions of Scr between embryonic and post-embryonic development in a hemimetabolous insect, *Oncopeltus fasciatus*. Dev Biol 329(1), 142-151.
- ◆ Choe, C. P., Miller, S. C. and Brown, S. J. 2006 A pair-rule gene circuit defines segments sequentially in the short-germinsect *Tribolium castaneum*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 103, 6560–6564.
- ◆ Chouard, T., 2010. Evolution: Revenge of the hopeful monster. Nature 463(7283), 864-867.
- ◆ Chourrout, D. Delsuc, F., Chourrout, P., Edvardsen, R. B., Rentzsch, F., Renfer, E., Jensen, M. F., Zhu, B., de Jong, P., Steele, R. E., and Technau, U., 2006. Minimal ProtoHox cluster inferred from bilaterian and cnidarian Hox complements. Nature 442, 684–7.
- ◆ Cohen, S.M., Jürgens, G., 1990. Mediation of *Drosophila* head development by gap-like segmentation genes. Nature 346, 482–484.
- ◆ Curtis, C.D., Brisson, J.A, DeCamillis, M.A., Shippy, T.D., Brown, S.J. and Denell R.E., 2001. Molecular characterization of Cephalothorax, the *Tribolium* ortholog of Sex combs reduced. Genesis 30, 12–20.
- ◆ Damen, W. G. M., and Tautz, D., 1999. Abdominal-B expression in a spider suggests a general role for Abdominal-B in specifying the genital structure. J. Exp. Zool. 285, 85–91.
- ◆ Damen, W. G., 2007. Evolutionary conservation and divergence of the segmentation process in arthropods. Dev Dyn 236(6), 1379-1391.
- ◆ Davidson, E. H. and Erwin, D. H., 2006. Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. Science 311(5762), 796-800.
- ◆ Davis, G. K. and Patel, N. H., 2002. Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation. Annu Rev Entomol 47, 669-699.
- ◆ Dietrich, M. R., 2000. From Hopeful Monsters to Homeotic Effects: Richard Goldschmidt's Integration of Development, Evolution, and Genetics. Amer. Zool. 40,738–747.
- ◆ Dubnau, J. and Struhl, G., 1996. RNA recognition and translational regulation by a homeodomain protein. Nature 379(6567), 694-699.
- ◆ Duboule, D., 2007. The rise and fall of Hox gene clusters. Development 134(14), 2549-2560.
- ◆ Economou, A. D. and Telford, M. J., 2009. Comparative gene expression in the heads of *Drosophila melanogaster* and *Tribolium castaneum* and the segmental affinity of the *Drosophila* hypopharyngeal lobes. Evol Dev 11(1), 88-96.
- ◆ Eldredge, N., Gould, S.J., 1972. Punctuated equilibria: an alternative to phyletic gradualism. In: Schopf TJM, editor. Models in paleobiology. San Francisco: Freeman, Cooper and Co.; p. 82–115
- ◆ El-Sherif, E., Averof, M., and Brown., S.J., 2012. A segmentation clock operating in blastoderm and germband stages of *Tribolium* development. Development 139(23), 4341-4346.

- ◆ Esponda-Behrens, N.I., 2008. Búsqueda de Genes Homeobox en Hemípteros y Caracterización del Gen *scr* de la Vinchuca *Rhodnius prolixus*. Tesina de Grado, UNaM-FCEQyN / CREG-UNLP.
- ◆ Frankel, N., Erezylmaz, D. F., Mcgregor, A. P., Wang, S., Payre, F. and Stern, D. L., 2011. Morphological evolution caused by many subtle-effect substitutions in regulatory DNA. *Nature* 474, 598-603.
- ◆ Frankel, N., Wang, S. and Stern, D.L., 2012. Conserved regulatory architecture underlies parallel genetic changes and convergent phenotypic evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(51), 20975-20979.
- ◆ García-Bellido, A. (1975). Genetic control of the wing disc development in *Drosophila*. *Cell Patterning, Ciba Found. Symp.* 29, 161-178.
- ◆ Garcia-Fernández, J., 2005. The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nat. Rev. Genet.* 6, 881–92.
- ◆ Garstang, M. and Ferrier, D. E., 2013. Time is of the essence for *ParaHox* homeobox gene clustering. *BMC Biol* 11, 72.
- ◆ Gehring, W.; Qiu Qian,Y.; Billeter, M.; Furukubo-Tokunaga, K.; Schier, A.; Resendez-Pérez, D.; Affolter, M.; Otting, G. & Wüthrich, K., 1994. Homeodomain-DNA Recognition. *Cell* 78:211-223.
- ◆ Gehring, W.J., 1985. The Homeo Box: A key to the understanding of development? *Cell* 40, 3-5.
- ◆ Gerhart, J. and Kirschner, M., 2007. The theory of facilitated variation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 Suppl 1, 8582-8589.
- ◆ Gilbert, S., 2000. *Developmental Biology*. Ed. Sinauer Associates, inc., pp, 289-290.
- ◆ Giribet, G., Edgecombe, G.D., Wheeler, W.C., 2001. Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. *Nature* 413(6852), 157-161.
- ◆ Goldschmidt, R. 1940. *The material basis of evolution*. Yale University. Press, New Haven
- ◆ Goldschmidt, R., Hannah A. and Piternick, L., 1951. The podoptera effect in *Drosophila melanogaster*. *Univ. Cali. Pub. Zool.* 55,67–294; p.103.
- ◆ Gould S.J., 1977. *Ontogeny and phylogeny*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge.
- ◆ Grimaldi,D. and Engel,M.S., 2005. *Evolution of the Insects*.Cambridge University Press, Cambridge.
- ◆ Haas, M. S., Brown, S.J. and Beeman, R.W., 2001. Pondering the procephalon: the segmental origin of the labrum. *Dev Genes Evol* 211(2), 89-95.
- ◆ Hadrys, H., Simon, S., Kaune, B., Schmitt, O., Schöner, A., SchierwaterB., 2012. Isolation of Hox Cluster Genes from Insects Reveals an Accelerated Sequence Evolution Rate. *PLoS ONE* 7(6), e34682.
- ◆ Haeckel, E., 1866. *Generelle Morphologie der Organismen*. Georg Reimer, Berlin.
- ◆ Haeckel, E., 1874. *Antropogenie oder Entwicklungsgeschichte des Menschen*. Leipzig, Engelmann.
- ◆ Hall, B. K., 1995. Atavisms and atavistic mutations. *Nat Genet* 10(2), 126-127.
- ◆ Hall, B. K., 2000. Balfour, Garstang and de Beer: the first century of evolutionary morphology. *American Zoologist* 40, 718–728.
- ◆ Hall, B. K., 2003a. Evo-Devo: evolutionary developmental mechanisms. *Int J Dev Biol* 47(7-8), 491-495.
- ◆ Hall, B. K., 2003b. Descent with modification: the unity underlying homology and homoplasy as seen through an analysis of development and evolution. *Biol Rev Camb Philos Soc* 78(3), 409-433.

- ◆ Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41,95-98. (BioEdit)
- ◆ Hamilton, K.G.A., 1971. The insect wing Part I. Origin and development of wings from notal lobes. *J. Kans. Entomol. Soc.* 44, 421–433.
- ◆ Heming B.S., 2003. *Insect Development and evolution.* Cornell University Press. pp 1-4; 111-175; 185; 352-383.
- ◆ Hoekstra, H. E. and Coyne, J. A., 2007. The locus of evolution: evo devo and the genetics of adaptation. *Evolution* 61(5), 995-1016.
- ◆ Hrycaj, S., Chesebro, J. and Popadić, A. 2010. Functional analysis of Scr during embryonic and post-embryonic development in the cockroach, *Periplaneta americana*. *Dev Biol* 341(1), 324-334.
- ◆ Hsia, C. and McGinnis, W., 2003. Evolution of transcription factor function. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 199–206.
- ◆ Hughes, C. L. and Kaufman, T. C., 2000. RNAi analysis of Deformed, proboscipedia and Sex combs reduced in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*: novel roles for Hox genes in the hemipteran head. *Development* 127, 3683–94.
- ◆ Hughes, C. L. and Kaufman, T. C., 2002. Hox genes and the evolution of the arthropod body plan. *Evol Dev* 4(6), 459-499.
- ◆ Hurst, L. D., 2013. Open questions: a logic (or lack thereof) of genome organization. *BMC Biol* 11, 58.
- ◆ Jablonka, E., 2007. The developmental construction of heredity. *Dev Psychobiol* 49(8), 808-817.
- ◆ Janssen, R., Budd, G.E., and Damen, W.G.M., 2011. Gene expression suggests conserved mechanisms patterning the heads of insects and myriapods. *Dev Biol* 357(1), 64-72.
- ◆ Johannsen, O. and Butt, F., 1941. *Embryology of insects and myriapods (the development history of insects, centipedes and millepedes from egg disposition to hatching)*. Ed. McGraw-Hill Book Company, Inc., N.Y. and London, pp. 1-81 y 271-280.
- ◆ Katz, L. A., 2002. Lateral gene transfers and the evolution of eukaryotes: theories and data. *Int J Syst Evol Microbiol* 52(Pt 5), 1893-1900.
- ◆ Kelly, G. and Huebner, E., 1989. Embryonic development of the hemipteran insect *Rhodnius prolixus*. *Journal of Morphology* 199, 175–196.
- ◆ Kerridge, S., and Morata, G., 1982. Developmental effects of some newly induced Ultrabithorax alleles of *Drosophila*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 68, 21 1-234.
- ◆ Kiefer, J. C., 2007. Epigenetics in development. *Dev Dyn* 236(4), 1144-1156.
- ◆ Kimura, M., 1983. *The Neutral Theory of Molecular Evolution.* Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- ◆ King, M. C. and Wilson, A. C., 1975. Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science* 188(4184), 107-116.
- ◆ Kirschner, M. and Gerhart, J., 1998. Evolvability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15), 8420-8427.
- ◆ Krause G., 1939. Die Eitypen der Insekten. *Biol. Zentralbl.* 59,495–536.
- ◆ Kukalová-Peck, 1987. New Carboniferous Diplura, Monura, and Thysanura, the hexapod ground plan, and the role of thoracic lobes in the origin of wings (Insecta). *Canadian Journal of Zoology* 65, 2327-2345.
- ◆ Kukalova-Peck, J., 1991. Fossil history and the evolution of hexapod structures. In: Naumann, I.D. (Ed.), *The Insects of Australia: a Textbook for Students and Research Workers*, Vol. I. Cornell University Press, Ithica, New York, pp. 141–179.
- ◆ Kukalová-Peck, J., 2008. Phylogeny of Higher Taxa in Insecta: Finding Synapomorphies in the Extant Fauna and Separating Them from Homoplasies. *Evol. Biol.* 35, 4–51.

- ◆ Laughon, A. and Scott, M. P., 1984. Sequence of a *Drosophila* segmentation gene: protein structure homology with DNA-binding proteins. *Nature* 310(5972), 25-31.
- ◆ Lavore 2012, Análisis genómico-funcional de la embriología de *Rhodnius prolixus* (Ståhl, 1859) (Hemiptera, Reduviidae). Tesis doctoral, CREG-UNLP.
- ◆ Lavore, A., Pagola, L., Esponda-Behrens, N. and Rivera-Pomar, R., 2012. The gap gene *giant* of *Rhodnius prolixus* is maternally expressed and required for proper head and abdomen formation. *Dev. Biol.* 361, 147–155.
- ◆ Lawrence P.A., Johnston P., Macdonald P., Struhl G., 1987. Borders of parasegments in *Drosophila* embryos are delimited by the *fushi tarazu* and *even-skipped* genes. *Nature* 328,440–442.
- ◆ Lawrence, P. A., 1992. *The Making of a Fly: the Genetics of Animal Design* Blackwell Scientific, Oxford, UK,.
- ◆ Lemons, D. and McGinnis, W., 2006. Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science* 313(5795), 1918-1922.
- ◆ Lewis, E.B., 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570.
- ◆ Liu, P. Z. and Kaufman, T. C., 2004a. *hunchback* is required for suppression of abdominal identity, and for proper germband growth and segmentation in the intermediate germband insect *Oncopeltus fasciatus*. *Development* 131(7), 1515-1527.
- ◆ Liu, P. Z. and Kaufman, T. C., 2004b. *Kruppel* 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(18), 4567-4579.
- ◆ Liu, P. Z. and Kaufman, T. C., 2005a. Short and long germ segmentation: unanswered questions in the evolution of a developmental mode. *Evol Dev* 7(6), 629-646.
- ◆ Liu, P. Z. and Kaufman, T. C., 2005b. *even-skipped* is not a pair-rule gene but has segmental and gap-like functions in *Oncopeltus fasciatus*, an intermediate germband insect. *Development* 132(9), 2081-2092.
- ◆ Löhr, U., Yussa, M. and Pick, L., 2001. *Drosophila fushi tarazu*. a gene on the border of homeotic function. *Curr. Biol.* 11(18), 1403-1412.
- ◆ Long, M., Betrán, E., Thornton, K. and Wang, W., 2003. The origin of new genes: glimpses from the young and old. *Nat Rev Genet* 4(11), 865-875.
- ◆ Love, A. C. and Raff, R. A., 2003. Knowing your ancestors: themes in the history of evo-devo. *Evol Dev* 5(4), 327-330.
- ◆ Lynch, M., and Conery, J.S., 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290,1151–1155.
- ◆ Maizel, A., Bensaude, O., Prochiantz, A. and Joliot, A., 1999. A short region of its homeodomain is necessary for Engrailed nuclear export and secretion. *Development* 126, 3183–3190.
- ◆ Makino, T., Hokamp, K. and McLysaght, A., 2009. The complex relationship of gene duplication and essentiality. *Trends Genet* 25(4), 152-155.
- ◆ Mallo, M. and Alonso, C. R., 2013. The regulation of Hox gene expression during animal development. *Development* 140(19), 3951-3963.
- ◆ Mann, R. S. and Morata, G., 2000. The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 243-271.
- ◆ Mellanby, H., 1934. The Early Embryonic Development of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Heteroptera). *Quart. Journ. Micr. Sci.* 78, 71-90.
- ◆ Mellanby, H., 1935. The Later Embryology of *Rhodnius prolixus*. *Changes.* 313, 1-42.

- ◆ Meyer, A., 1999. Homology and homoplasy: the retention of genetic programmes. Homology, Ed.Wiley, Chichester (Novartis Foundation Symposium 222), pp 141-157.
- ◆ Mito, T., Okamoto, H., Shinahara, W., Shinmyo, Y., Miyawaki, K., Ohuchi, H., Noji, S., 2006. *Krüppel* acts as a gap gene regulating expression of *hunchback* and *even-skipped* in the intermediate germ cricket *Gryllus bimaculatus*. Dev Biol. 294,471-481.
- ◆ Mito, T., Nakamura, T. and Noji, S., 2010. Evolution of insect development: to the hemimetabolous paradigm. Curr. Opin. Genet. Dev. 20, 355–61.
- ◆ Mlodzik, M. and Gehring, W. J., 1987. Expression of the *caudal* gene in the germ line of *Drosophila*: formation of an RNA and protein gradient during early embryogenesis. Cell 48(3), 465-478.
- ◆ Moczek, A. P., 2011. Evolutionary biology: the origins of novelty. Nature 473(7345), 34-35.
- ◆ Moreno, E. and Morata, G., 1999. Caudal is the Hox gene that specifies the most posterior Drosophila segment. Nature 400, 873–7.
- ◆ Morisato, D. and Anderson, K. V., 1995. Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. Annu Rev Genet 29, 371-399.
- ◆ Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature 420(6915): 520-562.
- ◆ Müller, G.B. and Newman, S.A., 1999. Generation, integration, autonomy: three steps in the evolution of homology. Homology, Ed.Wiley, Chichester (Novartis Foundation Symposium 222). pp 65-79.
- ◆ Nahmad, M., Glass, L. and Abouheif, E., 2008. The dynamics of developmental system drift in the gene network underlying wing polyphenism in ants: a mathematical model. 374, 360–374.
- ◆ Newcomer, W. S., 1948. Embryological development of the mouth parts and related structures of the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Dallas). J. Morphol. 82, 365-411.
- ◆ Nijhout, H. F., 2003. Development and evolution of adaptive polyphenisms. Evolution & Development 5, 9–18.
- ◆ Ohde, T., Yaginuma, T., Niimi, T., 2013. Insect Morphological Diversification Through the Modification of Wing Serial Homologs. Science 340, 495-498.
- ◆ Ohno, S., 1996. The notion of the Cambrian pananimalia genome. Proc Natl Acad Sci U S A 93(16), 8475-8478.
- ◆ Olesnicky, E. C., Brent, A.E., Tonnes, L., Walker, M., Pultz, M.A., Leaf D., and Desplan, C., 2006. A *caudal* mRNA gradient controls posterior development in the wasp *Nasonia*. Development 133(20), 3973-3982.
- ◆ Olesnicky, E. C. and Desplan, C., 2007. Distinct mechanisms for mRNA localization during embryonic axis specification in the wasp *Nasonia*. Dev Biol 306(1), 134-142.
- ◆ Olsson, L., Levit, G. S. and Hoßfeld, U., 2010. Evolutionary developmental biology: its concepts and history with a focus on Russian and German contributions. Naturwissenschaften 97(11), 951-969.
- ◆ Pagola, L., 2012, Análisis genómico y molecular de la embriología de *Rhodnius prolixus* (Stål,1859) (Hemiptera, Reduviidae) – Implicancias morfológico-evolutivas en insectos. Tesis doctoral CREG-UNLP.
- ◆ Panfilio, K. A., Liu, P.; Akam, M. and Kaufman, T., 2006. *Oncopeltus fasciatus zen* is essential for serosal tissue function in katatrepsis. Dev Biol 292(1), 226-243.
- ◆ Panfilio, K. A., 2008. Extraembryonic development in insects and the acrobatics of blastokinesis. Dev Biol 313(2), 471-491.
- ◆ Panfilio, K. A., 2009. Late extraembryonic morphogenesis and its *zen*(RNAi)-induced failure in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. Dev. Biol. 333, 297–311.

- ◆ Panfilio, K.A. & Roth, S., 2010. Epithelial reorganization events during late extraembryonic development in a hemimetabolous insect. *Dev. Biol.* 340, 100–115.
- ◆ Panganiban, G. Irvine, S.M., Lowe, C., Roehl, H., Corley, L.S., Sherbon, B., Grenier, J.K., Fallon, J.F., Kimble, J., Walker, M., Wray, G., Swalla, B.J., Martindale, M.Q. and Carroll, S.B., 1997. The origin and evolution of animal appendages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 5162–6.
- ◆ Parsons, M.C., 1974. The morphology and possible origin of the hemipteran loral lobes. *Can. J. Zool.* 52, 189-202.
- ◆ Passalacqua, K. D., Hrycaj, S., Mahfooz, N. and Popadic, A., 2010. Evolving expression patterns of the homeotic gene *Scr* in insects. *Int J Dev Biol* 54(5), 897-904.
- ◆ Pattatucci, A. M., Otteson, D. C. and Kaufman, T. C., 1991. A Functional and Structural Analysis of the *Sex combs reduced* Locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 149, 423-441.
- ◆ Pearson, J. C., Lemons, D. and McGinnis, W., 2005. Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat. Rev. Genet.* 6, 893–904.
- ◆ Peel, A. D., Chipman, A. D. and Akam, M., 2005. Arthropod segmentation: beyond the *Drosophila* paradigm. *Nat Rev Genet* 6(12), 905-916.
- ◆ Peel, A. D., 2008. The evolution of developmental gene networks: lessons from comparative studies on holometabolous insects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363(1496), 1539-1547.
- ◆ Pellerin, I., Schnabel, C., Catron, K. and Abate, C., 1994. Hox proteins have different affinities for a consensus DNA site that correlate with the positions of their genes on the *hox* cluster. *Mol Cell Biol* 14(7), 4532-4545.
- ◆ Peterson, K. J. and Davidson, E. H., 2000. Regulatory evolution and the origin of the bilaterians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4430–3.
- ◆ Phelan, M. L., Sadoul, R. and Featherstone, M., 1994. Functional differences between HOX proteins conferred by two residues in the homeodomain N-terminal arm. *Mol Cell Biol* 14(8), 5066-5075.
- ◆ Popadić, A., Abzhanov, A.; Rusch, D. and Kaufman, T., 1998. Understanding the genetic basis of morphological evolution: the role of homeotic genes in the diversification of the arthropod bauplan. *Int J Dev Biol* 42(3), 453-461.
- ◆ Posnien, N. and Bucher, G., 2010. Formation of the insect head involves lateral contribution of the intercalary segment, which depends on *Tc-labial* function. *Dev Biol* 338(1), 107-116.
- ◆ Posnien, N., Schinko, J. B., Kittelmann, S. and Bucher, G., 2010. Genetics, development and composition of the insect head – A beetle’s view. *Arthropod Struct. Dev.* 39, 399–410.
- ◆ Prud'homme, B., Minervino, C., Hocine, M., Cande, J.D., Aouane, A., Dufour, H.D., Kassner, V.A. and Gompel, N., 2011. Body plan innovation in treehoppers through the evolution of an extra wing-like appendage. *Nature* 473(7345), 83-86.
- ◆ Quartau, J.A., 1986. An overview of the paranotal theory on the origin of insect wings. *Publicações do instituto de Zoologia “Dr. Augusto Nobre”.* Faculdade de Ciências do Porto 194, 1–42.
- ◆ Raff, R.A., 1999. Larval homologies and radical evolutionary changes in early development. *Homology*, Ed.Wiley, Chichester (Novartis Foundation Symposium 222). pp 110-124.
- ◆ Raff, R.A., 2000. Evo-devo: the evolution of a new discipline. *Nat Rev Genet* 1(1), 74-79.
- ◆ Raff, R.A., 2007. Written in stone: fossils, genes and evo-devo. *Nat Rev Genet* 8(12), 911-920.
- ◆ Ranz, J. M. and Parsch, J., 2012. Newly evolved genes: moving from comparative genomics to functional studies in model systems. How important is genetic novelty for species adaptation and diversification? *Bioessays* 34(6), 477-483.

- ◆ Rivera-Pomar, R., Lu, X., Perrimon, N., Taubert, H., Jäckle, H., 1995. Activation of posterior gap gene expression in the *Drosophila* blastoderm. *Nature* 376(6537), 253-256.
- ◆ Rivera-Pomar, R. and Jackle, H., 1996. From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: filling in the gaps. *Trends Genet* 12(11), 478-483.
- ◆ Rivera-Pomar, R., Niessing, D., Schmidt-Ott, U., Gehring, W.J., Jäckle, H., 1996. RNA binding and translational suppression by *bicoid*. *Nature* 379(6567), 746-749.
- ◆ Rogers, B. T. and Kaufman, T. C., 1996. Structure of the insect head as revealed by the EN protein pattern in developing embryos. *Development* 122(11), 3419-3432.
- ◆ Rogers, B. T., Peterson, M. and Kaufman, T.C., 1997. Evolution of the insect body plan as revealed by the *Sex combs reduced* expression pattern. *Development* 124(1), 149-157.
- ◆ Rogers, B. T., Peterson, M. D. and 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.
- ◆ Rosenberg, M. I., Lynch, J. a & Desplan, C. Heads and tails: evolution of antero-posterior patterning in insects. *Biochim. Biophys. Acta* 1789, 333–42 (2009).
- ◆ Roth, S. and Panfilio, K. A., 2012. Making waves for segments. *Science* 336(6079), 306-307.
- ◆ Roth, S., 2004. *Gastrulation: from cells to embryo*. Cold Springs Harbor Laboratory Press. Fig.2, Cap.8.
- ◆ Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A. and Barrell, B., 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, 16, 944–945. (Artemis).
- ◆ Ryan, J. F. Mazza, M.E., Pang, K., Matus, D.Q., Baxevanis, A.D., Martindale, M.Q., Finnerty, J.R., 2007. Pre-bilaterian origins of the *Hox* cluster and the *Hox* code: evidence from the sea anemone, *Nematostella vectensis*. *PLoS One* 2, e153.
- ◆ Sander, K. and Schmidt-Ott, U., 2004. Evo-devo aspects of classical and molecular data in a historical perspective. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 302(1), 69-91.
- ◆ Sarrazin, A.F., Peel, A.D. and Averof, M., 2012. A segmentation clock with two-segment periodicity in insects. *Science* 336(6079), 338-341.
- ◆ Savard, J., Marques-Souza, H., Aranda, M., and Tautz, D., 2006. A segmentation gene in *Tribolium* produces a polycistronic mRNA that codes for multiple conserved peptides. *Cell* 126(3), 559-569.
- ◆ Schinko, J. B., Kreuzer, N., Offen, N., Posnien, N., Wimmer, E.A. and Bucher, G., 2008. Divergent functions of *orthodenticle*, empty spiracles and buttonhead in early head patterning of the beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera). *Dev Biol* 317(2), 600-613.
- ◆ Schmidt-Ott, U. and Technau, G. M., 1992. Expression of *en* and *wg* in the embryonic head and brain of *Drosophila* indicates a refolded band of seven segment remnants. *Development* 116(1), 111-125.
- ◆ Schmidt-Ott, U., González-Gaitán, M., Jäckle, H., Technau, G.M., 1994. Number, identity, and sequence of the *Drosophila* head segments as revealed by neural elements and their deletion patterns in mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(18), 8363-8367.
- ◆ Slijper, E. J., 1942. *Proc. Koninklijke Nederlandse Akademie Van Wetenschappen* 45, pp. 288–295, 407–415.
- ◆ Snodgrass, R.E., 1935. *Principles of Insect Morphology*. Ed. McGraw-Hill, New York.
- ◆ Spatazza, J., Di Lullo, E., Joliot, A., Dupont, E., Moya, K.L., and Prochiantz, A., 2013. Homeoprotein Signaling in Development , Health , and Disease: A Shaking of Dogmas Offers Challenges and Promises from Bench to Bed. *Pharmacol Rev* 65:90–104.
- ◆ Stark, A., Lin, M.F., Kheradpour, P., Pedersen, J.S., Parts, L., Carlson, J.W., Crosby, M.A., Rasmussen, M.D., Roy, S., Deoras, A.N., *et al.*, 2007. Discovery of functional elements in 12 *Drosophila* genomes using evolutionary signatures. *Nature* 450, 219–232.

- ◆ Stern, D. L., 2000. Evolutionary developmental biology and the problem of variation. *Evolution* 54(4), 1079-1091.
- ◆ Syvanen, M., 2012. Evolutionary implications of horizontal gene transfer. *Annu Rev Genet* 46, 341-358.
- ◆ Tautz, D. and Pfeifle, C., 1989. A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* 98, 81–85.
- ◆ Taylor, P.J., 1987. Historical versus selectionist explanations in evolutionary biology. *Cladistics* 3(1),1-13.
- ◆ Telford, M. J. and Thomas, R. H., 1998. Expression of homeobox genes shows chelicerate arthropods retain their deutocerebral segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18), 10671-10675.
- ◆ Tomkins, J. L. and Moczek, A. P., 2009. Patterns of threshold evolution in polyphenic insects under different developmental models. *Evolution*, 63, 459–468.
- ◆ Waddington CH., 1953. Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution* 7,118–126.
- ◆ Wake, D.B., 1999. Homoplasy, homology and the problem of 'sameness' in biology. *Homology*, Ed.Wiley, Chichester (Novartis Foundation Symposium 222). pp 24-46.
- ◆ West-Eberhard, M. J., 2005. Developmental plasticity and the origin of species differences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 Suppl 1, 6543-6549.
- ◆ West-Eberhard, M. J., 2005. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 304(6), 610-618.
- ◆ Wigglesworth, V. B., 1973. The role of the epidermal cells in moulding the surface pattern of the cuticle in *Rhodnius* (Hemiptera). *J Cell Sci* 12(3), 683-705.
- ◆ Wray, G. A., 2007. The evolutionary significance of cis-regulatory mutations. *Nat Rev Genet* 8(3), 206-216.
- ◆ Zrzavý, J., and Štys, P., 1997. The basic body plan of arthropods: insights from evolutionary morphology and developmental biology. *J. Evol. Bio.* 10, 353–367.

ANEXO I: Protocolos, soluciones, instrumental y mantenimiento de la colonia

Precipitación isopropanólica / Extracción fenólica

Extracción Fenólica:

1. Agregar 1 vol. de fenol. Mezclar muy bien.
2. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad
3. Rescatar la fase superior
4. Agregar 1 vol. de cloroformo. Mezclar muy bien.
5. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad
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 máxima velocidad.
5. Descartar el sobrenadante.
6. Realizar un lavado con 100µl de etanol 80°.
7. Centrifugar 5min. a máxima velocidad.
8. Secar a T^o_{amb} o a 37°C (no sobresecar).
9. Diluir en 3–5µl de agua.

TBE 5X para corridas electroforéticas (2 litros)

Disolver 108g de Tris y 55g de ácido bórico en 1800ml de H₂O. Agregar 40ml de 0,5M Na₂EDTA (pH8) y ajustar el volumen a 2 litros con H₂O. Almacenar a T^o_{amb}. Concentración de uso: 1X.

Elusión de geles

(Si bien este protocolo es muy rudimentario y el producto no tiene gran pureza, resultó más eficiente que otros procedimientos)

1. Disgregar el taco de agarosa mecánicamente
2. agregar TE (~200µl o 1vol. Equivalente al tamaño del taco; i.e. 100µl para 100mg)
3. poner a 37°C en agitación suave para permitir que el ADN difunda, tanto tiempo como sea posible (1 a varias horas; alternativamente, dejar O.N. a T^o_{amb} y al otro día poner 30' en agitación suave a 37°C.
4. centrifugar a máx. velocidad 15' a 30'
5. rescatar el sobrenadante (ADN en fase líquida)
6. hacer una extracción fenol-cloroformo

Preparación de bacterias quimiocompetentes

1. Estriar en LB–agar las bacterias (*Escherichia coli* cepas XL1-Blue o dH5α). Incubar O.N. a 37°C.
2. Inocular 10 colonias grandes (>2mm) en 250ml de medio en un erlenmeyer de 2 litros.
3. Crecer las bacterias a 18°C y 200–250rpm hasta alcanzar una D.O. de 0,75 a una longitud de onda de 600nm (ESTE ES EL PASO CRÍTICO), usualmente toma más de 24hs.
4. Poner el erlenmeyer en hielo durante 10 min.
5. Centrifugar 10 min. el cultivo a 2500g y 4°C.
6. Resuspender el *pellet* en 80ml de TB bien frío e incubar en agua bien fría por 10 min.
7. Repetir el paso 5.
8. Resuspender el *pellet* en 20ml de TB bien frío.
9. Agregar DMSO (dimetilsulfóxido) gota a gota con suave movimiento hasta 7% (1,5ml). Es importante no usar glicerol en este protocolo.
10. Incubar en agua bien fría por 10 minutos.
11. Alicuotar y congelar en N₂ líquido. Almacenar a -70°C.

Prueba de eficiencia: Transformar y plaquear, contar las colonias y calcular la cantidad de colonias/µg de plásmido usado.

Medio para bacterias competentes químicas:

10mM TB-PIPES; 15mM Cl_2Ca ; 250mM ClK. Ajustar a pH7 y autoclavar. Después, esterilizando por filtración, agregar 55mM Cl_2Mn y 10 $\mu\text{g/ml}$ Tetraciclina.

Transformación de bacterias quimiocompetentes²²

Preparar con antelación: medio LB líquido estéril y con antibiótico; placas de Petri con LB-agar; baño térmico a 42°C.

1. Derretir en hielo 50 μl de células quimiocompetentes.
2. Agregar 50 μl de bacterias a cada 2 μl de ligación o 1ng de plásmido y mezclar suavemente con la punta del tip.
3. Incubar 30 minutos en hielo.
4. Dar un choque térmico de 30seg. en un baño a 42°C.
5. Inmediatamente colocar en hielo durante 5min.
6. Agregar 950 μl de medio LB líquido a T°_{amb} y transferir a un tubo de cultivo de 15ml.
7. Incubar a 37°C a 225rpm durante 1-2hs.
8. Sembrar en placa (50 a 100 $\mu\text{l/placa}$).

Placas: precalentadas a 37°C. **Antibióticos:** tetraciclina [12,5 $\mu\text{g/ml}$]; ampicilina [50 $\mu\text{g/ml}$] para bacterias transformadas con pGEM[®]-T Easy Vector. **Sistema blanco/azul:** 10 μl de IPTG y 20 μl de X-Gal sobre la superficie solidificada, 1 hora antes de la siembra.

Medio LB para cultivo bacteriano: (1 litro)

10g NaCl; 10g Triptona; 5g Extracto de levadura y para medios sólidos 20g Agar. Agregar agua deionizada hasta 1 litro; ajustar a pH7 con NaOH 5M; autoclavar y una vez que se enfríe agregar el o los antibióticos, si es necesario.

Minipreparaciones con Buffer TELT y Lisozima

1. Centrifugar 1ml de cultivo a baja velocidad (3000rpm) durante 1min.
2. Remover el sobrenadante y resuspender el *pellet* en 100 μl de *buffer* TELT y 20 μl de lisozima [10ng/ μl].
3. Hervir la suspensión por 2 minutos e inmediatamente transferir a un baño de agua helada.
4. Centrifugar a 15000rpm por 10 min.
5. Retirar el *pellet* con un tip limpio y agregar 150 μl de isopropanol 100% al sobrenadante.
6. Centrifugar a 15000rpm por 10 minutos para precipitar el ADN.
7. Remover el sobrenadante y agregar 175 μl de etanol 70%.
8. Centrifugar 5min. a 15000rpm.
9. Remover el etanol y secar el *pellet* al aire o a 37°C.
10. Resuspender el ADN en 20 μl de H_2O con ARNasa.

Buffer TELT:

50mM Tris-HCl, pH 7,5; 62,5mM EDTA; 0,4% Triton100; 2,5M LiCl

Extracción de ADN total

- Extraer partes blandas de 1 a 4 animales (sin sistema digestivo para evitar contaminación)
- Agregar:
 - 500 μl buffer de homogeneización**
 - 25 μl 10%SDS**
 - 5 μl proteinasa K [10mg/ml]**
- Incubar a 37°C o 56°C x 4hs. A O.N. **Si hay sólo partes blandas, 1 a 2 Hs. SIN AGITACIÓN**
- Agregar **500 μl de fenol**. Mezclar por inversión varias veces o **rotar x 10 min [~30rpm]**. **NO EN VÓRTEX**.
- **Centrifugar 5'** a máxima velocidad.
- Rescatar **sobrenadante** con tip **P1000** para no romper el ADN

~~~~~O~~~~~

Si hay mucha **interfase** fenol/ADN, repetir 500 $\mu\text{l}$  fenol con el sobrenadante

<sup>22</sup> XL1-Blue son resistentes a tetraciclina, dh5 $\alpha$  no; por lo tanto el usos de este antibiótico depende de la cepa bacteriana usada.

~~~~~O~~~~~

- Al sobrenadante agregarle **500µl de cloroformo**. Rotar 10' [30rpm].
- **Centrifugar 5'** a máxima velocidad.
- Separar **sobrenadante** y agregar **1/10 vol de Ac.Na 3M + 1vol. EtOH 100%**. Mezclar despacio.
- **Incubar 10'**
- **Centrifugar 5'** al máximo.
- **Lavar** el precipitado **con EtOH 70°**
- **Secar** al aire (NO sobresecar)
- **Disolver** en 100µl de **TE** [10mM Tris; 0,1mMEDTA]

~~~~~O~~~~~

**Soluciones:**

**Buffer de Homogeneización:** [100mM Tris pH8 + 80mM EDTA pH8 (+ 160mM sacarosa, sólo para sacar ADN muy entero)]. Para 10ml: (llevar a Vf con agua)

|                     |              |
|---------------------|--------------|
| 2,5ml 0,4M Tris pH8 | (PM: 121,14) |
| 1,6ml 0,5M EDTA pH8 | (PM: 372,24) |
| (0,55g sacarosa)    | (PM: 342,3)  |

**TE de dilución final:** [10mM Tris + 0,1mM EDTA]. Para 10ml: (llevar a Vf con agua)

|                     |
|---------------------|
| 250µl 0,4M Tris pH8 |
| 2µl 0,5M EDTA pH8   |

**0,5M Tris:** 3,03g en 40ml H<sub>2</sub>O; llevar a pH8 con HCl y a Vf con H<sub>2</sub>O. (esto en Vf=60ml es 0,4M)

**0,5M EDTA:** 9,34g en 40ml H<sub>2</sub>O. Llevar a pH8 con NaOH. Llevar a Vf=50ml con H<sub>2</sub>O.

**Extracción de ARN total**

**Material estéril:** autoclavar tips y tubos tipo *ependorf*; agua milliQ y el *buffer* de lisis sin el β-mercaptoetanol. El material sólido, requiere mortero o algún mecanismo de desintegración; además, las pipetas deben estar bien limpias y pueden irradiarse con luz UV. Para control de calidad del ARN extraído, es preferible contar con elementos y *buffer* estériles para electroforesis, se los puede lavar con NaOH 1M y enjuagar con agua milliQ estéril y si es posible, autoclavarlos.

**Además**, es necesario disponer de hielo y una microcentrífuga enfriada a 4°C. Las mezclas que contienen alcoholes deben prepararse en el día, el β-mercaptoetanol debe agregarse al *buffer* de lisis autoclavado previamente. Ver soluciones al final.

1. Disolver la muestra en aproximadamente 1vol. de *buffer* de lisis. Disregarla bien.
2. Centrifugar a máxima velocidad durante 5min. a T<sup>o</sup><sub>amb</sub> para remover los restos. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
3. Colocar el tubo en hielo, agregar 1vol. de fenol saturado en *buffer* y mezclar. No habrá separación de fases en este punto. Agregar 1/5vol. de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y vortexear. Se separarán dos fases. Vortexear 3 a 4 veces más con una separación de 1 min. entre pasos, incubar el tubo en hielo en los intervalos. Centrifugar 30min. a máxima velocidad y 4°C. Rescatar la fase superior acuosa. Evite calentar el tubo con los dedos porque la interfase puede hacerse invisible.
4. Repetir 3 veces el paso anterior.
5. Agregar 1 a 2 µg de glicógeno (opcional, para los casos en que se espera recuperar cantidades escasas de ARN)<sup>23</sup>, y luego agregar 1vol. de etanol 96% y mezclar.
6. Centrifugar inmediatamente 10 min. a máxima velocidad y T<sup>o</sup><sub>amb</sub>. El precipitado puede no formar un *pellet*, quedando en cambio diseminado sobre la pared del tubo y siendo así casi invisible, incluso cuando hay co-precipitado adherido. Lavar el *pellet* una vez con 0,5ml de etanol 80%. Secar brevemente hasta que no se observe líquido en el tubo (no sobre-secar).
7. Disolver el *pellet* en 100µl de H<sub>2</sub>O milliQ fresca y estéril. Si no se disuelve completamente, remover los restos centrifugando 3 min. a máxima velocidad y T<sup>o</sup><sub>amb</sub>.
8. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo, agregar 1vol. de CILi 12M y enfriar la solución a -20°C durante 30 min. Centrifugar 15 min. a máxima velocidad y T<sup>o</sup><sub>amb</sub>.
9. Lavar el *pellet* una vez con 0,5ml de etanol 80% y secar como en el paso 6.
10. Resuspender en 50µl de H<sub>2</sub>O milliQ fresca y estéril.
11. Tomar una alícuota de 5µl para controlar la calidad del ARN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Conservar a -70°C.

<sup>23</sup> No se hizo en este trabajo.

**Soluciones:**

**Buffer de lisis:** 4M Tiocianato de Guanidina; 30mM Citrato de Sodio. Autoclavar y luego agregar 30mM  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 7.0 - 7.5

**Otras:** Fenol saturado en TE, pH 7.0 - 8.0; Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1); Etanol 96%; Etanol 80%; Cloruro de Litio 12M; H<sub>2</sub>O milliQ fresca y autoclavada; Hidróxido de Sodio 1M.

**Preparación de ADNc con SMART™ ADNc Library Construction Kit (Protocolo N° PT3000-1; Versión N° PR15738, Clontech)**

**REACTIVOS DEL KIT:**

•SMART IV™ Oligonucleotide (10  $\mu$ M):

5' – AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG – 3'

Sfi IA

•CDS III/ 3' Primer (10  $\mu$ M): 5' –ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-dT<sub>(30)</sub>VN – 3'

Sfi IB

V=A,G o C

•5' PCR Primer (10  $\mu$ M) : 5' – AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT – 3'

•PowerScript™ Reverse Transcriptase; • 5X First-Strand Buffer; • DTT (dithiothreitol; 20mM);

• Control Human Placental Total RNA (1  $\mu$ g/  $\mu$ l); • H<sub>2</sub>O deionizada

**REACTIVOS DEL KIT PARA LD-PCR: ADVANTAGE® 2 PCR ENZYME SYSTEM**

•50X Advantage 2 Polymerase Mix; • 10X Advantage 2 PCR Buffer; • 50X dNTP Mix (10 mM de cada dNTP); • Control ADN template (~0,2 ng/  $\mu$ l); • Control Primer Mix (10  $\mu$ M de c/u); • PCR – Grade Water

**REACTIVOS PARA LA DIGESTIÓN ENZIMÁTICA**

•Enzima Sfi I (20 U/ $\mu$ l); • 10X Buffer de Sfi I; • 100X BSA

**MATERIAL PARA EL FRACCIONAMIENTO DEL ADNc**

•CHROMA SPIN-400 Columns; • 1X Fractionation Buffer

**VECTOR:**  $\lambda$ TriplEx2**Síntesis de 1ª cadena:**

1. Para cada muestra, realizar la siguiente mezcla en tubos de reacción estériles de 0,5ml:

1 – 3  $\mu$ l Muestra de ARN (0,025 – 0,5 $\mu$ g de poliA<sup>+</sup> o 0,05 - 1 $\mu$ g de ARN total)

1  $\mu$ l SMART IV Oligonucleotide (10 $\mu$ M)

1  $\mu$ l CDS III/3' PCR Primer (10 $\mu$ M)

x  $\mu$ l H<sub>2</sub>O deionizada

5  $\mu$ l V<sub>f</sub>

2. Mezclar y dar un breve *spin* en una microcentrífuga.

3. Incubar a 72° en ciclador térmico durante 2min.

4. Enfriar en hielo durante 2min.

5. Dar un breve *spin* en una microcentrífuga.

6. Agregar a cada tubo:

2  $\mu$ l 5X First-Strand Buffer

1  $\mu$ l DTT (20mM)

1  $\mu$ l dNTP mix (10mM de cada uno)

1  $\mu$ l BD PowerScript Reverse Transcriptase

7. Mezclar suavemente por pipeteo y dar un breve *spin* en una microcentrífuga.

8. Incubar a 42°C durante 1 hora.

9. Poner el tubo en hielo para detener la síntesis de 1ª cadena.

10. Si continúa inmediatamente, trasvasar una alícuota de 2 $\mu$ l a un nuevo tubo de 0,5ml.

Poner en hielo y continuar con el paso siguiente.

11. La mezcla que no se usa, puede almacenarse a -20°C por más de 3 meses.

**Amplificación de ADNc por LD PCR:**

**Nota:** para determinar las condiciones de PCR se adoptó el mismo criterio que para el *kit* anterior.

1. Precalentar en ciclador térmico a 95°C.

**2. Combinar los siguientes componentes en el tubo de reacción (de 0,5ml):**

|       |                                   |
|-------|-----------------------------------|
| 2 µl  | ADNc de 1ª cadena                 |
| 80 µl | H <sub>2</sub> O deionizada       |
| 10 µl | 10X Advantage 2 PCR Buffer        |
| 2 µl  | 50X dNTP mix (10 mM de cada dNTP) |
| 2 µl  | 5' PCR Primer (10 µM)             |
| 2 µl  | CDS III /3' PCR Primer            |
| 2 µl  | 50X Advantage 2 Polymerase Mix    |

---

100 µl V<sub>f</sub>

**3. Mezclar el contenido agitando suavemente y dar un breve *spin* en una microcentrífuga.****4. Tapar y colocar en el ciclador térmico precalentado a 95°C.****5. Comenzar el ciclado térmico usando el programa GeneAmp 2400/9600:**

- 95°C                    20 seg.
- 22 ciclos:
  - 95°C                    5 seg.
  - 68°C                    6 min.

**6.** Cuando el ciclado se completa, analizar 5µl de producto de PCR, con un marcador de 1Kb en gel de 1.1% de agarosa. El ADNc de doble cadena aparece como un chorreado de 0.1 a 4 kb con algunas bandas brillantes correspondientes a ARNm abundantes (en algunos casos las bandas pueden faltar, especialmente cuando el ADNc es muy complejo).

**7. Proceda al siguiente paso o guarde a -20°C hasta su uso.**

**Nota:** el fabricante recomienda realizar una digestión con proteinasa K; sin embargo, en este trabajo se sustituyó este paso por una purificación con QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN; ver protocolo correspondiente.

**Digestión con *Sfi* I:****1. Colocar en un tubo de 0.5 ml:**

|       |                       |
|-------|-----------------------|
| 79 µl | ADNc purificado       |
| 10 µl | 10X <i>Sfi</i> Buffer |
| 10 µl | enzima <i>Sfi</i> I   |
| 1 µl  | 100X BSA              |

---

100 µl V<sub>f</sub>

**2. Mezclar bien. Incubar a 50°C durante 2hs.****3. Agregar 2µl de colorante xilen-cianol. Mezclar bien.****Fraccionamiento por tamaño del ADNc mediante CHROMA SPIN-400 (Clontech):**

**Preparar con anticipación:** etanol 95% enfriado a -20°C (500µl aproximadamente)

**1. Rotular 16 tubos de 1.5ml y ordenarlos en una gradilla.****2. Preparar la columna CHROMA SPIN-400 por goteo:**

- a. Sacar la columna de la heladera y mantenerla a T<sup>o</sup><sub>amb</sub> por más o menos 1hora. Invertirla varias veces para resuspender totalmente el gel de la matriz.
- b. Remover las burbujas de aire. Resuspender suavemente con pipeta de 1000µl; sin generar burbujas. Retirar la tapa inferior y dejar que gotee naturalmente. Unirla a un sostén anular.
- d. Dejar que el *buffer* almacenado gotee por gravedad hasta que se pueda ver que la superficie del gel se comba en la matriz. El tope de la columna debe quedar en la marca de 1ml de la pared de la columna.
- e. La tasa de flujo debe ser aproximadamente 1 gota/40-60 seg. El volumen de 1 gota debería ser de ~40µl. Si no es así, se debe resuspender la matriz y repetir el procedimiento.

**3.** Cuando el *buffer* de almacenamiento deja de gotear, agregar suavemente 700µl de *buffer* de columna y dejarlo gotear.

**4.** Cuando este *buffer* deja de gotear (~15-20 min), aplicar cuidadosamente ~100µl de mezcla de ADNc digerido con *Sfi* I y colorante en el centro de la superficie superior de la matriz.

**5. Dejar que la muestra se absorba totalmente.**

**6.** Enjuagar el tubo que contenía el ADNc con 100µl de *buffer* de columna y aplicar suavemente este material en la superficie de la matriz.

7. Dejar que el *buffer* drene hasta que no quede líquido sobre la resina. Cuando el goteo ha cesado, proceder al siguiente paso. En este momento, la capa de colorante debería tener varios milímetros dentro de la columna.

8. Poner la gradilla con los tubos colectores bajo la columna de manera que el primer tubo quede justo bajo el desagüe.

9. Agregar 600µl de *buffer* de columna e inmediatamente comenzar a coleccionar fracciones de una sola gota (~35µl/tubo) en los tubos numerados. Tapar la columna luego de que la fracción número 16 ha sido coleccionada.

10. Chequear el perfil de las fracciones antes de continuar. En un gel de agarosa 1.1% con BrEt, realizar una corrida de 3µl de cada fracción, con un marcador de PM de 1kb, a 150V durante 10 min. (Mayor tiempo de corrida dificultará la identificación de las bandas). Colectar las 3 a 4 primeras fracciones que contienen el ADNc con la distribución de tamaño deseada.

11. Agregar los siguientes reactivos al tubo con las 3-4 fracciones reunidas del ADNc:

|           |                            |
|-----------|----------------------------|
| 1/10 vol. | Acetato de Na (3M; pH 4.8) |
| 1.3µl     | glucógeno (20 mg/ml)       |
| 2.5 vol.  | 95% etanol (-20°C)         |

12. Mezclar con oscilaciones suaves.

13. Dejar el tubo a -20°C durante 1hs. (Opcional: se puede incubar a -20°C O.N., que tendrá mayor eficiencia de recuperación).

14. Centrifugar 20min a 14.000rpm y a T<sup>o</sup><sub>amb</sub>.

15. Remover cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta. No tocar el *pellet*.

16. Dar una breve centrifugada para coleccionar el líquido remanente.

17. Remover cuidadosamente todo el líquido y dejar que el *pellet* se seque al aire por ~10 min.

18. Resuspender en 7µl de H<sub>2</sub>O deionizada y mezclar suavemente. El ADNc digerido con *Sfi* I está ahora listo para proceder a la ligación con el vector λTriplEx2. Continuar o guardar a -20°C hasta el momento de la ligación.

Nota: en este punto de la construcción de la biblioteca génica, se detuvo el procedimiento, a la espera de materiales necesarios para continuar.

#### Soluciones:

**5X First-Strand Buffer (incluido en los kits):** 250 mM Tris-HCl (pH 8.3); 375 mM KCl; 30 mM MgCl<sub>2</sub>

**Buffer TE:** 10mM Tris (pH7.6); 1mM EDTA

### ARNi

#### Transcripción in vitro:

Mix en Vf 100ul:

- 1ug de molde (para muchos genes funciona bien con 0,25µg),
- 20µl buffer 5X para la polimerasa,
- 1 µl de T7pol,
- 1µl de inhibidor de RNAsa,
- 10µl de rNTPs (50mM)

Incubar 1 a 2 hs a 37°.

-----

Agregar DNAsa (2µl) ->15min.

-----

#### Extracción fenol-clorof-isoamílico:

F-C-I (25:24:1) -> 1vol - vortex- centrifugar- rescatar

C-I (24:1) -> 1 vol - vortex - centrif - rescatar

precipitación con 0,5vol AcNH<sub>4</sub> 7,5M + 2,5vol EtOH absoluto

-> -80° x 30'. centrif a máx. veloc.,

lavado con EtOH 70% - centrifugar

secar a 37° en campana estéril o en ambiente sin corriente de aire....

resuspender en 10µl de agua

-----

**Control de calidad en gel de agarosa 1%:** sembrar y correr inmediatamente con formamida (inactiva enzimas) y/o buffer de corrida estéril. Teñir con BrEt y determinar si hay una banda del tamaño adecuado o si hay degradación ("chorreado"). Cuantificar

**WMISH,<sup>24</sup>****Sondas de ARN (RNA labeling kit, Boeringer)**

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 isopropanol, pero tarda más en evaporar).

De Plásmido: Linearizar el plásmido (cortar con enzimas que generen extremos romos o 5' *overhangs*; hacer una restricción completa para impedir que se hagan transcritos en círculo rodante). Extracción fenólica y precipitación R-OH.

**R:** (*rinse*): enjuagar: sólo enjuagar los embriones con 1ml de sn. 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'

**Reacción** (es muy importante **respetar el orden** en que se ponen los reactivos):

- |                                                |                                                    |
|------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 1) dH <sub>2</sub> O para un Vf de 10µl        | ....                                               |
| 2) 10x buffer de transcripción                 | 1µl                                                |
| 3) NTP labeling mix para RNA                   | 1µl                                                |
| 4) Inhibidor de RNAsa (20U)                    | 1µl (mezclar)                                      |
| 5) Molde de ADN linearizado (0,5-1µg)          | .... lo óptimo 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 dH <sub>2</sub> O<br>25µl 2x buffer carbonato |

Incubar a 70°C por 30'

- |             |                |                    |
|-------------|----------------|--------------------|
| 10) agregar | Sn. 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 Sn.Hybe

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

Chequear la cantidad de sonda:

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

**Disección y fijación**

1.- lavar los huevos con agua y enjuagar bien con agua deionizada.

2.- Para la preparación de blastodermo, es necesario hervir los huevos por un minuto antes de proceder con la rotura del corion

3.-

<sup>24</sup> Protocolo basado en el Boeringer Genius kit, originalmente desarrollado por Diethard Tautz and Christine Pfeile. Esta versión es de CREG (Esponda-Behrens, Pagola, Rivera-Pomar), adaptada a partir de la versión de Martin Klinger, Gergen Lab 7/91; algunas de las modificaciones agregadas para el tratamiento de hemípteros se basaron en Liu y Kaufman (2004).

**Rhodnius:**

- 1) Desopercular y disectar manualmente con pinzas en PBS (la salinidad disminuye la tensión superficial y facilita la disección), alternativamente se puede usar MetOH, pero hay que rehidratar. Limpiar bien el vitelo antes de entrar en contacto con PFA.
- 2) Fijar 20" en Sn. Fijadora y luego deshidratar y conservar en MetOH hasta el momento de la tinción.

**Hibridación y tinción**

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

- 1.- descongelar sn. Fijadora 10' a 70°C. Enjuagar los embriones (que están en MetOH 100%) con 1ml de MetOH 100% y luego 500µl MetOH y 500µl PBT (agregando 1º el MetOH, luego el PBT, agitar)
- 2.- pos fijar en 500µl PBT + 500µl de sn. Fijadora x 20' en agitación
- 3.- R R W R con PBT
- 4.- incubar x 1Hs. en una mezcla de detergente RIPA.
- 5.- R R W R con PBT.  
Se eliminó un paso de digestión con proteinasa K porque se ha visto que no es necesaria en otros organismos; si la tinción resultara insuficiente, agregar este paso, especialmente para tinción de blastodermos.
- 6.- incubar en Buffer de Hibridación SIN sonda a 70°C por 30'. Esto se hace a fin de inactivar las fosfatasa endógenas.
- 7.- pre-hibridar a 60°C x 30' antes de la hibridación con sonda
- 8.- aspirar tanto Hybe como sea posible, agregar sonda/s<sup>25</sup> (~1µl C/u) diluida/s en ~30µl Hybe<sup>26</sup>. Hibridar 36Hs. a 60°C.

- 9.- agregar 500µl de Hybe-B (a T°amb). 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 Sn. de Hibridación-Anticuerpo por al menos 1Hs.

- 14.- incubar O.N. a 4°C con 1ml αDig-AP (1:2000), en agitación.

- 15.- **RESCATAR EL ANTICUERPO** αDig-AP para reutilizar (puede reusarse > 5veces/4 semanas). R R W10.

- 16.- W10 W10 W10 con PBTw.

- 17.- (Revelado de fosfatasa alcalina) R R W con Buffer Alcalino.

- 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 PBT.

- 20.- R con dH<sub>2</sub>O. Deshidratar los embriones en la siguiente escala de R-OH:

50% dH<sub>2</sub>O / 50% EtOH 70°

EtOH 70° - se pueden guardar a T°amb o continuar con **Montaje:**

50% EtOH 70° / 50% EtOH 100°

EtOH 100°

EtOH 100°

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

- 21.- 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

<sup>25</sup> Si se hace doble tinción, se agregan ambas sondas al mismo tiempo

<sup>26</sup> El volumen varía con el tamaño de los embriones, agregar una cantidad de Hybe suficiente para que los embriones queden cubiertos por el líquido.

lentamente, poner el cubre (24x56mm). Si se desea ver los embriones de ambos lados, montar entre dos cubreobjetos.

**Soluciones:**

**10x PBS:** 320g NaCl  
8g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
46g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

llevar a Vf= 4lts con dH<sub>2</sub>O, llevar a pH7,4 con HCl.

**PBT:** 1xPBS  
0,1% Tween 20

mezclado por 15' y **AUTOCLAVADO OPCIONAL**

**Sn.Fijadora:** [50mM EGTA-Na<sub>2</sub> (PM=380,35)+ 10%PFA en 1xPBS]. Para 50ml:  
0,95g EGTA-Na<sub>2</sub> llevar a hervor en 40ml de H<sub>2</sub>O, agregar  
5ml PFA,

mezclar, llevar a pH=7 con HCl, llevar a Vf con H<sub>2</sub>O.

filtrar con filtro Whatman, alícuotar de a 10ml y almacenar a -20°C.

**Proteinasa K stock:** 10 mg/ml en dH<sub>2</sub>O, alícuotas de 100µl a -20°C.

**Mezcla de detergente RIPA:** [150mM NaCl,1% NP-40, 0,5% deoxycholate 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 Sn. 3M)  
5ml NP-40 (10%)  
2,5ml deoxicolato de Na (10%)  
0,5ml SDS (10%)

Llevar a Vf con H<sub>2</sub>O.

**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 H<sub>2</sub>O):

(1M Tris: 0,121g/ml - para 10ml: 1,2114g Tris en 8ml de H<sub>2</sub>O, 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 H<sub>2</sub>O.

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

Ajustar el volumen a 1lt con H<sub>2</sub>O. Alícuotar. Autoclavar.

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

25ml formamida  
12,5ml 20xSSC  
1ml ADN de testículo de salmón sonificado [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 (Cc. final: 0,1%)

Llevar a pH5.0 con HCl (o ác. Cítrico)

Llevar a Vf: 50ml con dH<sub>2</sub>O.

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

25ml formamida  
 12,5ml 20xSSC  
 0,25ml 20%Tween-20

Llevar a Vf con agua

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

25ml formamida  
 5ml 20xSSC  
 0,25ml 20%Tween-20

Llevar a Vf con agua

**Sn. 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 H<sub>2</sub>O.

**2x Buffer carbonato:** [120mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 80mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 10,2] =

|       |                                 |
|-------|---------------------------------|
| 50ml  | H <sub>2</sub> O milliQ estéril |
| 0,64g | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> |
| 3,36  | NaHCO <sub>3</sub>              |

Frizar alícuotas a -20°C.

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

|        |                                 |
|--------|---------------------------------|
| 50ml   | H <sub>2</sub> O milliQ 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 ddH<sub>2</sub>O  
 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).

## Instrumental

Agitador: ELMI shaker S-3.16L

Agitador con regulación térmica: B. Braun Biotech International- Cheromat® BS-1

Agitador Magnético: Kika Labortechnik RCT basic

Balanza: Sartorius 1207MP2

Baños Térmicos: GFL (Gesellschaft Für Labortechnik m.b.h.) D3006 Burgwedel y LAUDA RK20

Bloque térmico: SCHÜTT Techne Dri-Block DB-3A

Cámara de luz UV: Stratagen, UV Stratalinker 1800

Cámara Fotográfica Digital: Kodak DC290 Zoom Digital Camera con filtro incorporado para BrEt.

Campana con luz UV: Herolab CleneCab

Centrífuga: Kontron Instruments Centrikon T-124; Rotores: Kontron A6.9 y A8.24

Cicladores Térmicos: Thermo Hybaid MBS 0.2S y Thermo Hybaid MBS 0.2G (Thermo Electron Corporation)

Climatizador (insectario): Electra Climatizador Split Mural

Estufa con período de Luz/Oscuridad: Memert

Filtro para H<sub>2</sub>O milliQ: Sartorius arium611

Flujo Laminar: Intermed Microflow Pathfinder

Freezer -20°C: Whirpool 260

Freezer -70°C (regulable hasta -100°C): Colora messtechnik GMBH UF85-300T

Fuentes de Poder: BIO-RAD Power PAC200 y Gibco BRL Electrophoresis - Life Technologies, Power Supply ST304

Horno microondas: Bosch MG600

Mezclador Térmico: Eppendorf Thermomixer Compact

Microcentrífugas: Eppendorf Centrifuge 5415D y Eppendorf Centrifuge 5417C

Pipetas: Gilson (P2, P10, P20, P100, P200, P1000) y Eppendorf (P10)

Sistema de Filtros Para dH<sub>2</sub>O: Hidrofiltros Neolife

Spinner: National Labnet Co. Mini Centrifuge C1200

Transiluminadores UV: Vetter GMBH Kontaktlampe Chroma43 y SIGMA Chemical Company T2202 (acoplado a cámara fotográfica)

Vórtex: Medas Vortex Genie y BenderandHobein A.G Vortex Genie™

## Manipulación de vinchucas en laboratorio

Los ejemplares de *R.prolixus* usados en este trabajo provienen de dos fuentes diferentes. En las primeras etapas, se utilizó y mantuvo la colonia establecida para el Consorcio de Secuenciación del Genoma de *R.prolixus*. Una vez que se concluyeron las etapas experimentales de la secuenciación, la colonia del laboratorio se mantuvo en un mínimo y en los casos en que fue necesario, se solicitó el envío de ejemplares al Servicio Nacional de Chagas (Punilla, Pcia de Córdoba). Esta segunda tiene mayor variabilidad poblacional, lo cual se observa en caracteres tales como pigmentación de los ojos y variación de tamaños en adultos, larvas y huevos.

Aquí me refiero exclusivamente a la cría de *R.prolixus* (Fig.IA). sin embargo, en las ocasiones en las que se mantienen ejemplares de otros triatominos en el laboratorio, las condiciones son similares.

### Condiciones de cría de la colonia de *Rhodnius prolixus*

Los ejemplares se mantienen en frascos plásticos de boca ancha, de paredes lisas, gruesas y traslúcidas; que permitan buena visión, fácil manejo y seguridad ante posibles roturas. Están cerrados por una malla fina a través de la cual las vinchucas pueden pasar el aparato bucal y alimentarse. La malla puede ser metálica o de tela. En nuestro caso, hemos encontrado muy práctica la trama de las medias de mujer, ajustadas por bandas elásticas y por la rosca de una tapa perforada (Fig.IB). Dentro del frasco plástico se colocan los ejemplares en un número no mayor a 50 individuos, separados según su estadio. Para generar un hábitat adecuado solo es necesario colocar dos o tres tiras de papel plegadas en “forma de acordeón” simulando las grietas y ranuras que estos animales habitan naturalmente. En el caso de los adultos además, estos papeles sirven como sustrato para la puesta de huevos y son un medio muy eficiente para la colecta de los mismos.

Las condiciones ambientales consisten en períodos luz/oscuridad de 12Hs.-12Hs. y 28°C de temperatura. La humedad ambiental se mantiene constante mediante la presencia de fuentes con agua para evaporación y es de aproximadamente 45-50%. En estas condiciones, un huevo se desarrolla en aproximadamente 14 días. Los distintos estadios larvales –5 en total– duran aproximadamente 20-30 días, lo cual lleva el tiempo de generación a unos 4 a 5 meses aproximadamente. Si bien en estos animales la muda es inducida por la alimentación y pueden pasar varios meses en un estadio si no se los alimenta, no es posible reducir los tiempos mínimos de cada estadio. Asimismo, la puesta de huevos es dependiente de la alimentación y ocurre aproximadamente una semana después de la misma.

Las larvas más jóvenes son las más difíciles de controlar debido a su pequeño tamaño (~1-2mm de longitud). Se mueven a gran velocidad, especialmente en épocas de calor. Cuando están sin alimentar son muy livianas y, aunque no tienen alas, pueden ser fácilmente transportadas por las corrientes de aire. Es especialmente importante tenerlas en bajo número, en frascos limpios donde no puedan ser confundidas con basuritas u ocultarse en exubias de larvas mayores. Es necesario ser muy cuidadosos en el manejo de todos los descartes y evitar manipularlas de no ser indispensable. En nuestro laboratorio preferimos mantener los primeros estadios (L1 a L3) en sus frascos de origen hasta que alcancen tamaños más cómodos para la manipulación. En aquellos casos en los que el diseño experimental demanda el manejo de larvas recién eclosionadas, es preferible guardar los huevos en bajo número ( $\leq 5$ ) en cajas de Petri pequeñas ( $\varnothing 7$ cm), aseguradas con cinta tipo Scotch, con pequeñas perforaciones para la circulación de aire y trabajar a bajas temperaturas al momento de la manipulación –se recomienda usar una superficie helada–, ya que el frío ralentiza su metabolismo. No hemos intentado usar  $\text{CO}_2$  para este fin, debido a que en insectos hematófagos estimula su conducta alimentaria.

También es importante evitar que los huevos alcancen el momento de la eclosión antes de ser separados de los adultos (*i.e.*, es necesario trasvasar a los adultos con regularidad, para que no se mezclen con las siguientes generaciones). Es habitual que las L1 estén sobre los adultos, confundándose debido a la coloración, por lo tanto, esta precaución también constituye una medida de seguridad, ya que los adultos sí son manipulados con regularidad y las pequeñas larvas L1 pueden no ser detectadas, debido a la diferencia de tamaño.

Los huevos son de color rosa pálido, ovalados y tienen un tamaño aproximado de 1mm de diámetro y 2mm de longitud (**Fig.IC**).

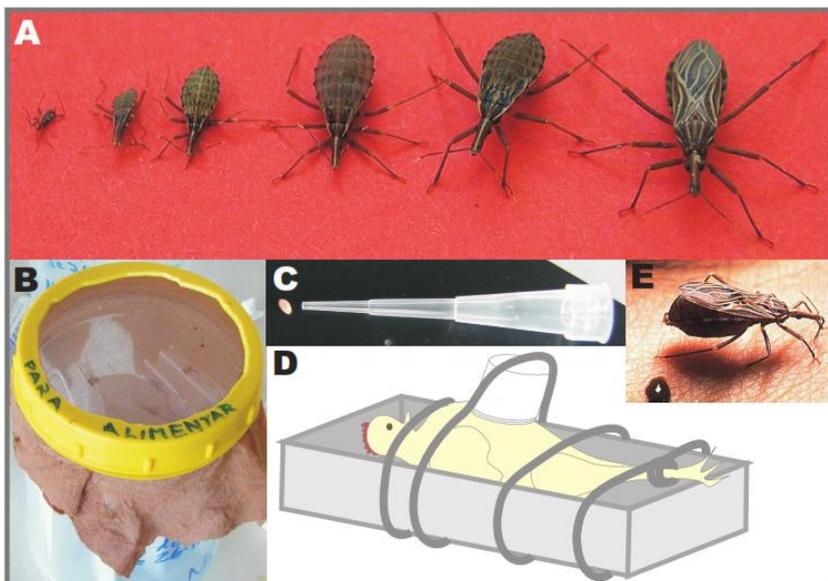
### **Alimentación de la colonia**

Para la alimentación usé animales vivos, ya que estas vinchucas son reacias a los alimentadores artificiales. En este caso usé gallinas, que tienen varias ventajas. En primer lugar, las aves no son susceptibles ni portadoras de la enfermedad de Chagas, lo cual es una ventaja para la seguridad sanitaria y el mantenimiento de una colonia libre de tripanosomas. En segundo lugar, tienen un tamaño óptimo para la manipulación y sus condiciones de cría son muy poco exigentes, excepto por el mantenimiento de la limpieza.

Al momento de la alimentación, la gallina es inmovilizada. Para ello se usan también trozos de medias de mujer que no producen lesiones al animal y se lo coloca en un cajón de madera de su mismo tamaño, con las alas y patas inmovilizadas. Asimismo, se trata de mantenerla en condiciones de oscuridad, ya que esto induce al sueño en las aves. La gallina queda así con la región ventral expuesta. Esta zona se mantiene con las plumas cortadas, para que resulte accesible a las vinchucas. El frasco conteniendo las vinchucas a

alimentar se coloca y se fija en posición invertida, manteniendo la tapa y la malla colocadas y en contacto con la piel de la gallina (**Fig.ID**). De este modo, las vinchucas bajan y atraviesan la malla con sus picos, succionando la sangre de la gallina. Este proceso tarda unos 15 a 30 minutos, dependiendo del tiempo que haya transcurrido desde la última alimentación. Si el tiempo es menor a 20 días, las vinchucas no se alimentarán –en el caso de los adultos, puede disminuirse a unos 15 días–. Una vez que las vinchucas se han alimentado, se hinchan de manera muy notable (**Fig.IE**), entonces se retira el frasco y se coloca el siguiente.

Para reducir al mínimo el *stress* de la gallina y mantener su buena salud, es importante que estas sesiones duren tiempos cortos (no alimentar más de cuatro o cinco frascos en una jornada) y espaciar las jornadas de alimentación de modo que la extracción de sangre no sea intensiva. En caso de tener una colonia grande, y/o con altos requerimientos alimentarios, es conveniente tener varias gallinas y rotar su uso<sup>27</sup>.



**Fig.I. Características de *R.prolixus* y su manejo en laboratorio.**

**A**, ejemplares de larvas 1 a 5 y adulto colocados en orden de edad creciente. **B**, imagen de un frasco plástico para cría. A través de la malla se observan los papeles plegados. **C**, imagen de un huevo junto a un tip de pipeta de 2-10µl, para mostrar su tamaño relativo. **D**, esquema de la estrategia de alimentación. **E**, imagen de una

vinchuca alimentándose, hinchada y prácticamente repleta. Sobre el margen inferior de la foto se observa la defecación que se produce durante la alimentación para eliminar el agua de la sangre ingerida, y que es la que contiene los tripanosomas si el animal es portador. Las imágenes **A** y **E** fueron tomadas respectivamente de [http://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Rhodnius\\_prolixus](http://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Rhodnius_prolixus) y de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypanosomosis.html>.

<sup>27</sup> El manejo de los animales que se usan como fuente de alimentación es siempre e inevitablemente violento y estresante, tanto para el animal como para el operario. Existen diferentes criterios para el manejo de animales en el laboratorio. Algunos de estos criterios se basan en un uso intensivo del animal y su sacrificio posterior. Sin embargo, el uso continuado que requieren nuestros experimentos implicaría una gran matanza. Nosotros consideramos que es preferible mantener en un mínimo el número de animales utilizados, elegimos animales de descarte de criaderos y tratamos de darles buenas condiciones de vida. Pese a los momentos de estrés durante la alimentación, mientras están a nuestro cargo, mejoran su peso, el estado de su plumaje y su carácter se domestica. Por ello, creemos que, si bien sería preferible evitar su uso, el manejo responsable puede ser relativamente poco agresivo.

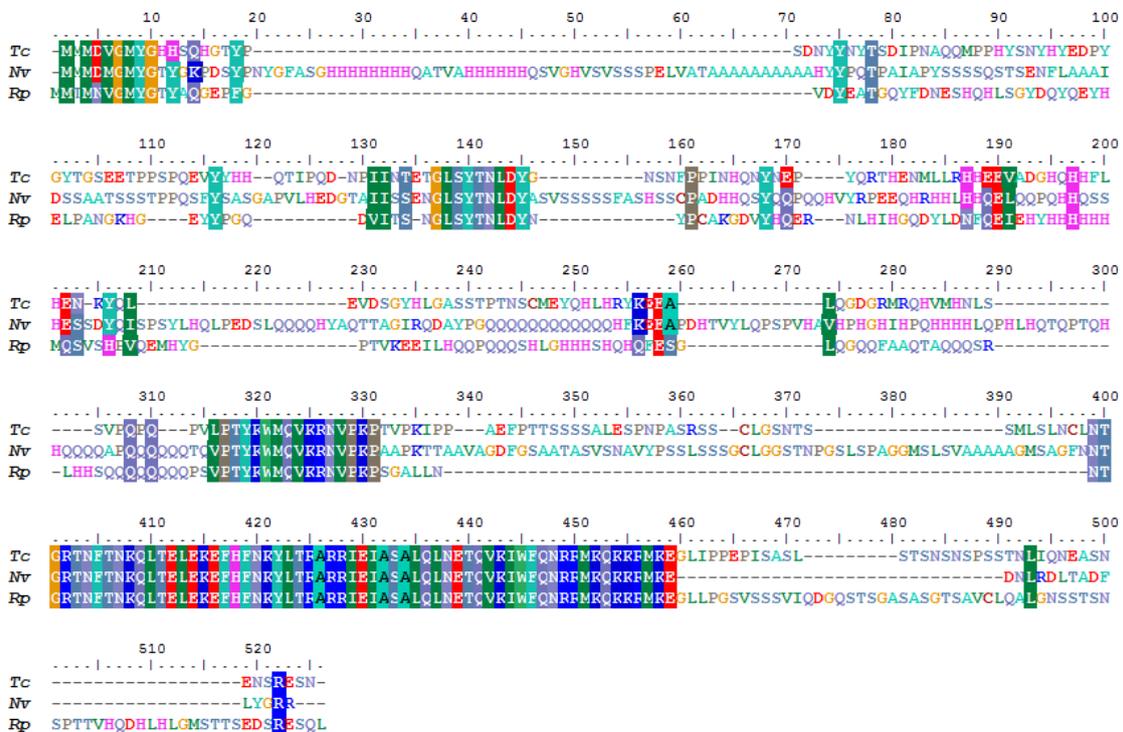
## ANEXO II: Alineamientos de referencia para la anotación de genes

Para cada caso, se hicieron alineamientos<sup>28</sup> de secuencias proteicas utilizando todas las secuencias disponibles en insectos y alineamientos eligiendo una o dos secuencias de especies más cercanas, eliminando especialmente a los dípteros. Los alineamientos con muchas secuencias sirven para detectar motivos muy conservados a nivel de grupo pero en las regiones más variables, los alineamientos restrictivos –es decir, de una o dos secuencias cercanas– permiten refinar la predicción de la secuencia de interés.

Éstos últimos son, en su mayoría, los que se presentan en este anexo.

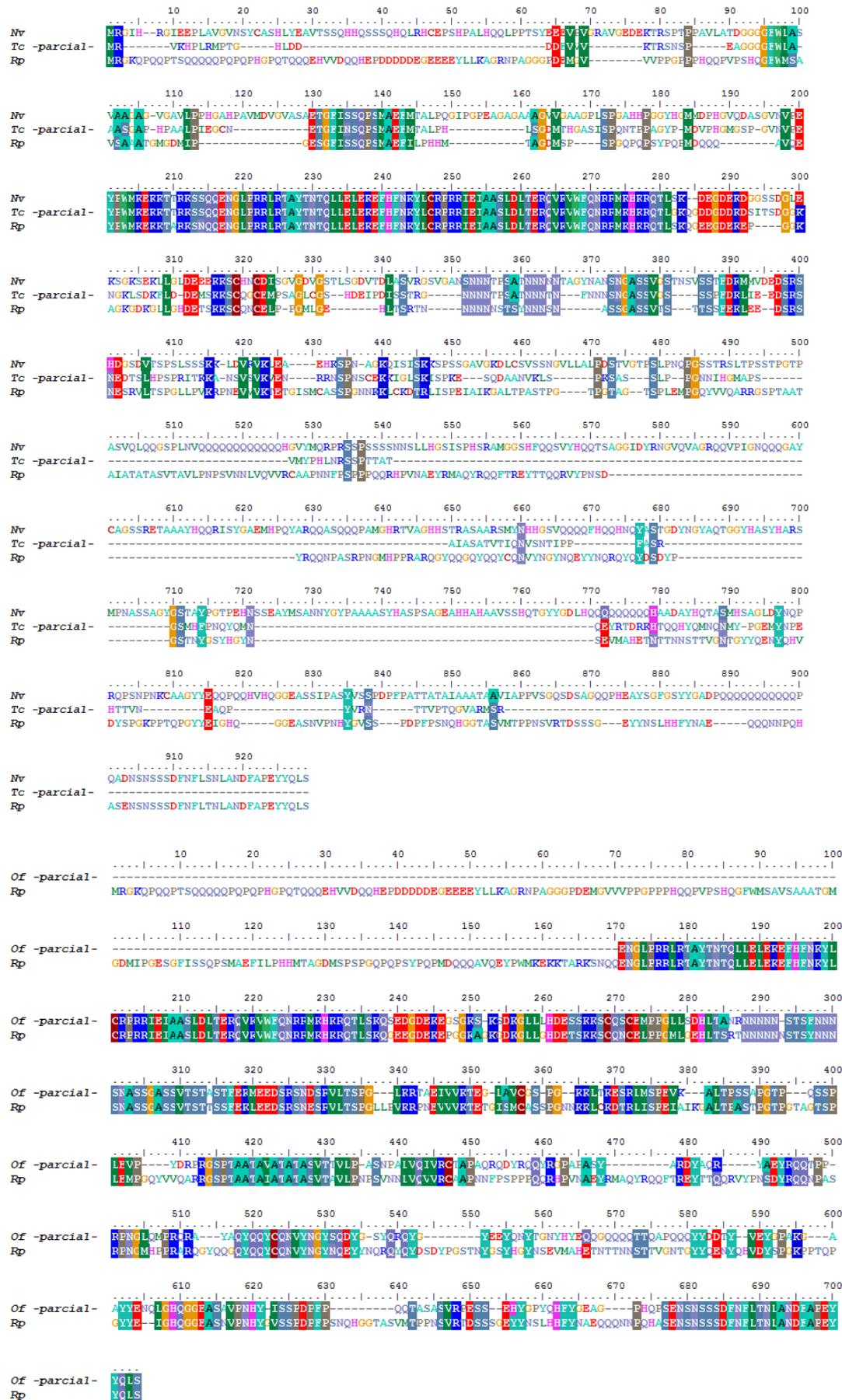
Las abreviaturas usadas para las secuencias son las siguientes: **Ag:** *Anopheles gambiae* (Diptera); **Am:** *Apis mellifera* (Hymenoptera); **Ap:** *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera); **Bm:** *Bombyx mori* (Lepidoptera); **Cf:** *Camponotus floridanus* (Hymenoptera); **Cq:** *Culex quinquefasciatus* (Diptera); **Dp:** *Danaus plexipus* (Lepidoptera); **Hs:** *Harpegnathos saltator* (Hymenoptera); **Nv:** *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera); **Of:** *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera); **Ph:** *Pediculus humanus* (Phthiraptera); **Pp:** *Papilio polytes* (Lepidoptera); **Rp:** *Rhodnius prolixus* (Hemiptera); **Tc:** *Tribolium castaneum* (Coleoptera).

### 1.- labial

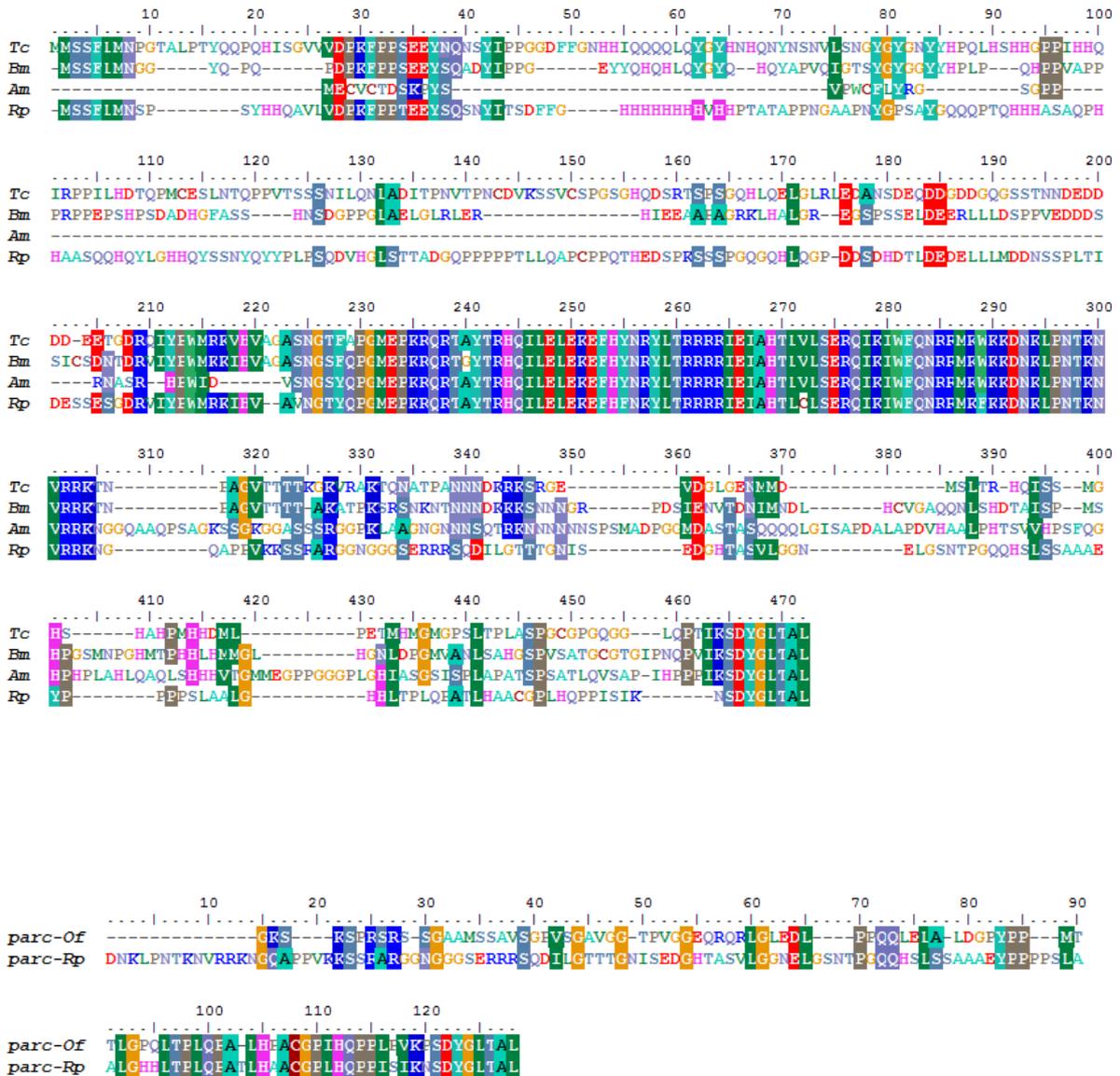


<sup>28</sup> Los alineamientos utilizados como referencia para predecir estructuras génicas se realizaron con el algoritmo *ClustalW Multiple Alignment* disponible en el software “BioEdit” que provee herramientas de bioinformática.

## 2.- proboscipedia



## 3.- deformed



## 4.- sex combs reduced

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
Dm-scr -----MDPDCFAMSSYQFVNSIASCYPQOMNPQQNHPGAGNSSAGGSGGGAGSSGGVV
Ag-scr -----MDANNFMSSYQFVNSIASCYPNNSQNTNSSP-----NTAGSQGS-----
Nv-scr MALALNLWVGSFLFYLLARSFVAIHGLVSTLICBALNFLSYSAMSSYQFVNSIASCYANAQAQQQQQQQ---QGPRGTAASPGEP
Am-scr -----MSSYQFVNSIASCYAGQQAAQQ-----PRATAISPGEP
Em-scr -----MNDLNYNAMSSYQFVNSIASCYBNQAPRGTG-----TPVBGTGHPGLP
Tc-scr -----MSSYQFVNSIASCYG---QQARDQ-----QSPGT
Rp-scr -----MSSYQFVNSIASCY-----QQ~GAGGQRSG~ASPVBQHGHP

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
Dm-scr PSQ-GTNGGQGSAGAATPGA-IDYFPAAAAYTPNLYPNTPCA-----BYANQAAYGGQ---NP-----LDVYTQLQP
Ag-scr -----QNDEYFPS-TYAPNIYPTEFQAHYSPQSYTPLAGAGATSVNSASTFGAVGGGHQSTLDVYTQLQP
Nv-scr -----LQAASPAAGD-YYNP-NTASTGYPTPCYSPQ-----BY-POHEYA-----TEAATMQHPAPT~CMIDYTQLQP
Am-scr -----LQAASPAAGD-YYNP-NAATTSYPAPCYSPQ-----BY-POHEYA-----TEASGMQHTAPT~CMIDYTQLQP
Em-scr -----TPGA-DYYNP-NAAASAYPNASYSPHQVGHYY-POHEYR-----TEASG-AHMQPQ~TMIDYTQLQP
Tc-scr -----D-YYNP-NANST-YPPACYSPHQVAPCY-POHEYA-----AEA?-GHGLQP~TMIDYTQLQP
Rp-scr QSP-----ASE-YYSN-----VNYPGGCYSPQYPGCYQQ-----SPSA-----MMDYTQLETAAQ

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
Dm-scr QRLLLQQQQQQQQQHAHAAAAVAAQQQQQLAQQQHPQQQQQQQQA-----NISCRYADPVTPGGSGGGVSGSNNNN
Ag-scr QKLLSQQQQ-----PQSALTSQ-----SCRYASE-----GPSTGTNVINNNNNNN
Nv-scr QERLSATATSQHNLHAAQQNQHQHLQQQQQL-----EPDPTSLLQAAVAAAAAAGASTSSCRYAES-----
Am-scr QERL-TAASLH-----QQQQHPQQQQHP~QAH-----CRYADS
Em-scr QRLG-STASHMHQHSN~PSPGALSPNLMSTPPSQATG-----ASCREADS
Tc-scr QRLAFTHLQSPN-----TQTEP-----SASCRYADS
Rp-scr QEQRLAFTHLQPLARHHGVPSPGAVSPILKNNNTTVNLSN-----STSCREADS

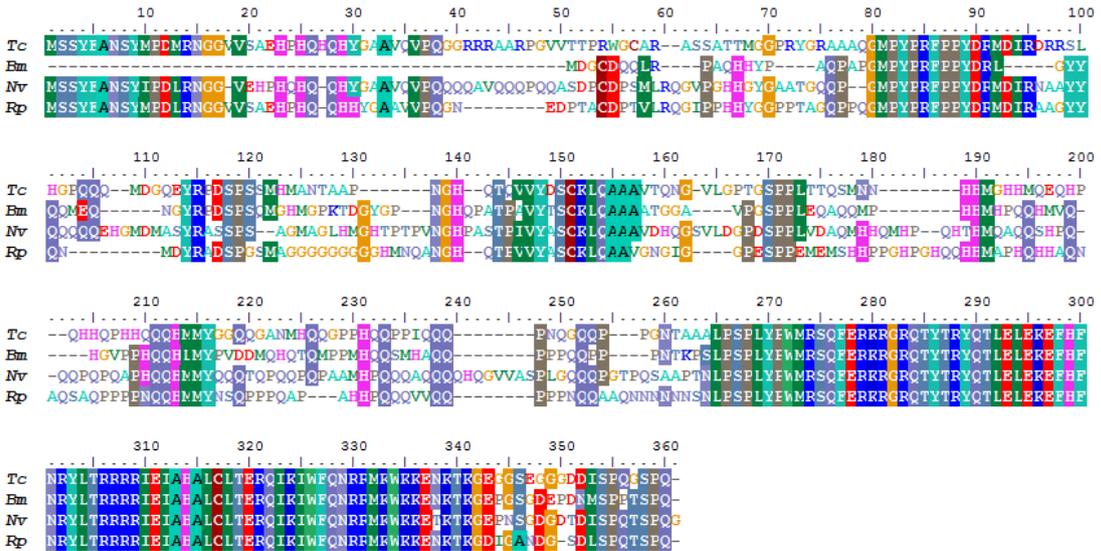
      280     290     300     310     320     330     340     350     360
Dm-scr NSANSNNNSQSLASPQDLST-----RDISP-KLSPSS-----VVESVARSLNKGVLGGSLAAAA-AAGLNNNHSGSGVSGPGNV
Ag-scr STTS-----PQDLSTASGSSGANDGNNRPEISPKLSPGSVVESVRSLKSGNPSTAVSSSSTNNNTSNISNR-----NQV
Nv-scr -VAS-----TNVASPQDLTTSTNA-----RN-SPAPGLPPGTSKAGVSGQLTSPAGGSSRSA-AAAASASSPPSGSGR
Am-scr -TSS-----TCVASEQDLTTST-S-----RN-SPTP-----LVAAA-AGTSKAVGTAGLTSPPGASS
Em-scr -TST-----TCVARRRLLELLHLGREEL-----PPG-----FGNVGGPNPSSGTRSTKLGLTTPIASPVBHKAN
Tc-scr -TSS-----TCVASPQDLSTNGAPP-----R-STPP-----LSTPSSSNATKSSGLTSPLSVSTSSP
Rp-scr AAASAAGGAANGLSPQDLTTTSVPG-----R-TSPP-----LVKTSLHSPSNPSSRTPSSGVQPASH

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
Dm-scr NVPMH-----SPGGDSDSSDSNEAGSSQNSG--NGRKK-----NPPQIYFWMRFVHLGQSTVNANGETTRRCRTSYTRYQTLE
Ag-scr NLPLA-----SPZEESASDDDSGTEGGSSQGGGSSSKKG-----FPPQIYFWMRFVHLGQSTVNANGETTRRCRTSYTRYQTLE
Nv-scr ~GGEGSTLTTASSASSEASSTSSTSSSTGNNSSNKNGSGS-----NPPQIYFWMRFVHLGQSTVNANGETTRRCRTSYTRYQTLE
Am-scr RPQEGSSALTTASSASSEASSTSSTSSSTGNNSSNKNGPTGN-----FPPRIYFWMRFVHLGQSTVNANGETTRRCRTSYTRYQTLE
Em-scr -----VNQNISSEASSTSSTSSSTGNDANNSSNNTKNSKSSANSQA-----NPPQIYFWMRFVHLGQSTVNANGETTRRCRTSYTRYQTLE
Tc-scr GK~PATSTASQNISSEASSTSSTSSSTEKAGTNNNSKSQSSS-----NPPQIYFWMRFVHLGQSTVNANGETTRRCRTSYTRYQTLE
Rp-scr TS-----SSEASSTSSTSSSTECGGGGGSCGSSTSSAKTPAGNPPQIYFWMRFVHLGQSTVNANGETTRRCRTSYTRYQTLE

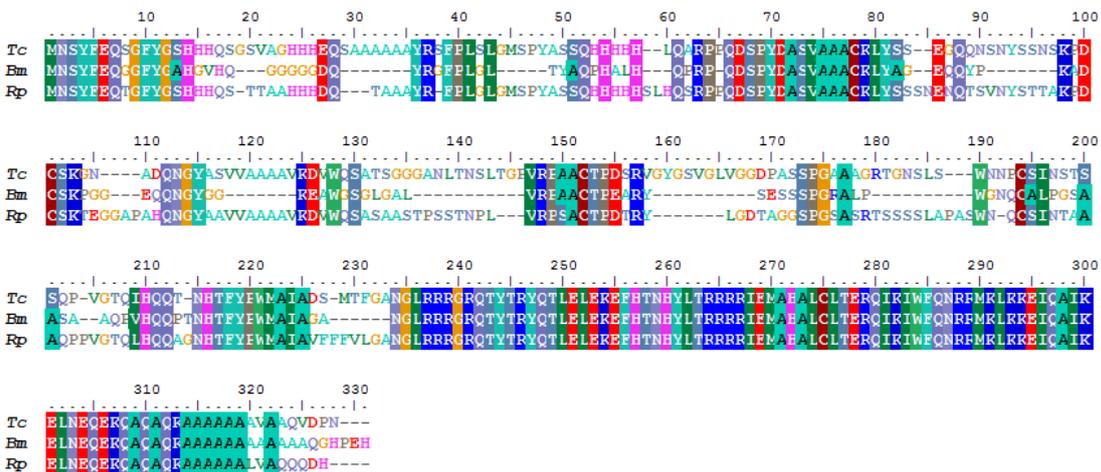
      460     470     480     490     500     510     520
Dm-scr LEREFFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRFMWKREHFMASMNIVPYHMSPYGHPY---QFDIHPSQEAHLSA
Ag-scr LEREFFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRFMWKREHFMASMNIVPYHMSPYGHPY---QFDIHPSQEAHLSA
Nv-scr LEREFFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRFMWKREHFMASMNIVPYHMSPYGHPY---QFPAHPSQEAHLAT
Am-scr LEREFFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRFMWKREHFMASMNIVPYHMSPYGHPY---QFPAHPSQEAHLAT
Em-scr LEREFFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRFMWKREHFMASMNIVPYHMSPYGHPY---QFDLHPSQEAHLSA
Tc-scr LEREFFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRFMWKREHFMASMNIVPYHMSPYGHPY---QFDLHPSQEAHLAT
Rp-scr LEREFFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRFMWKRENFMASMNIVPYH~Y-HS-QPYANPYQETHLLT

```

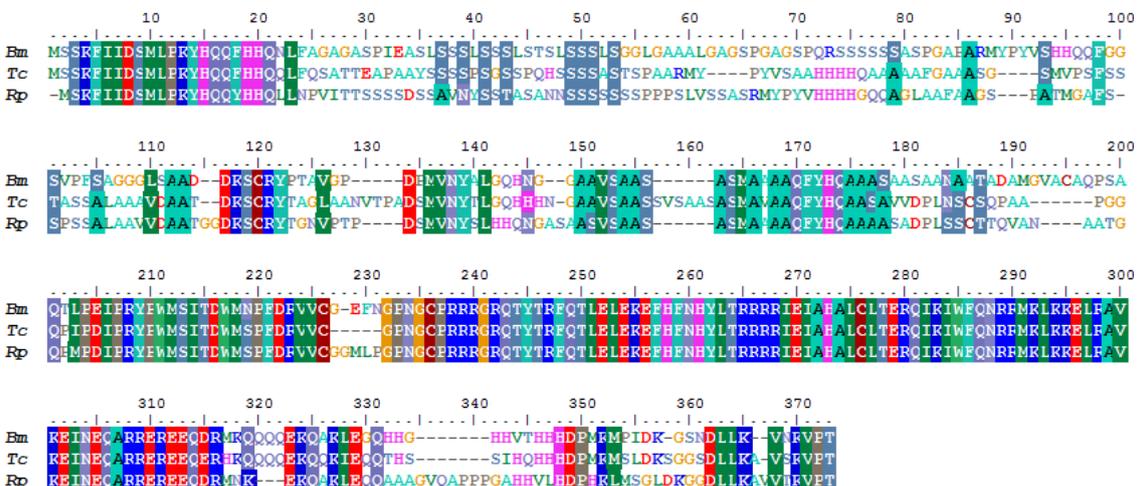
5.- antennapedia



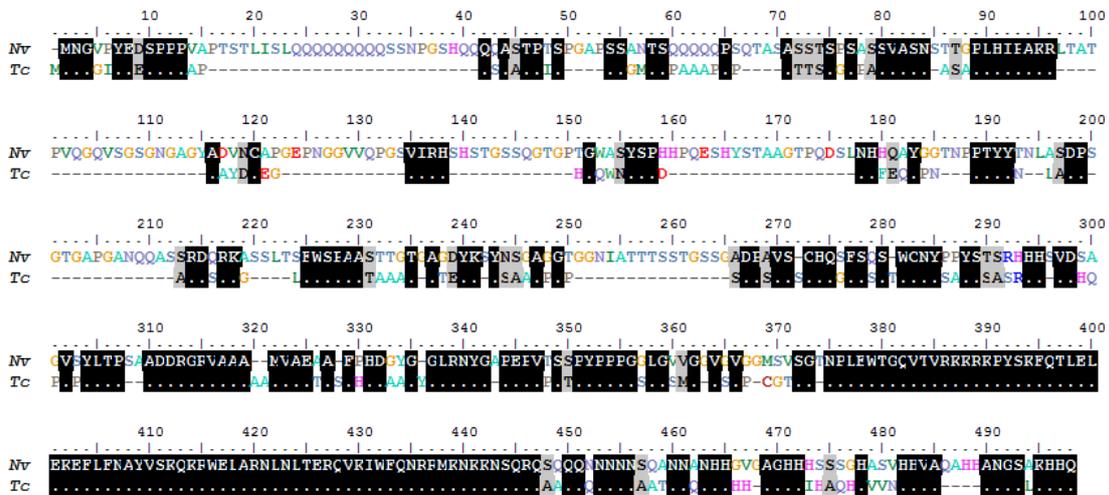
6.- ultrabithorax



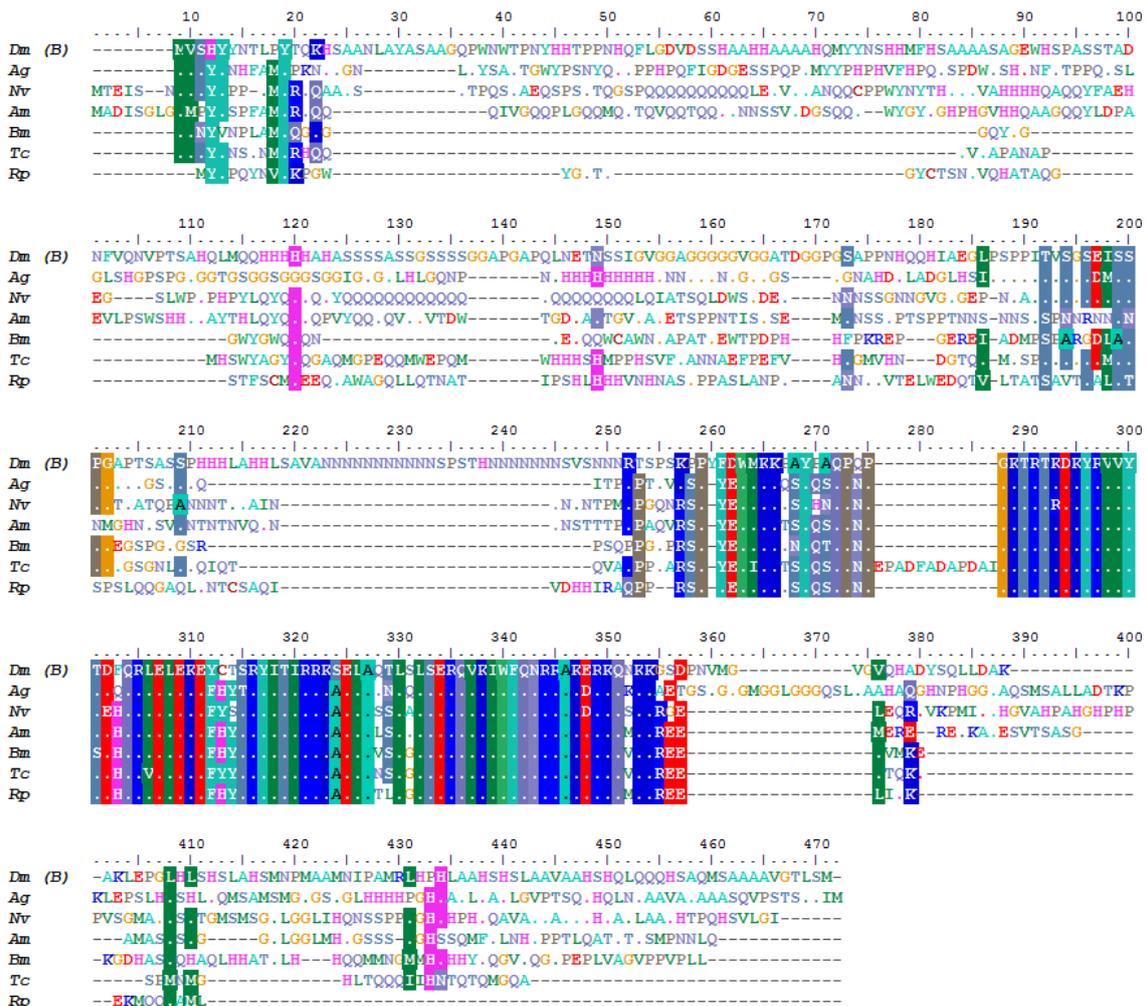
7.- abdominalA



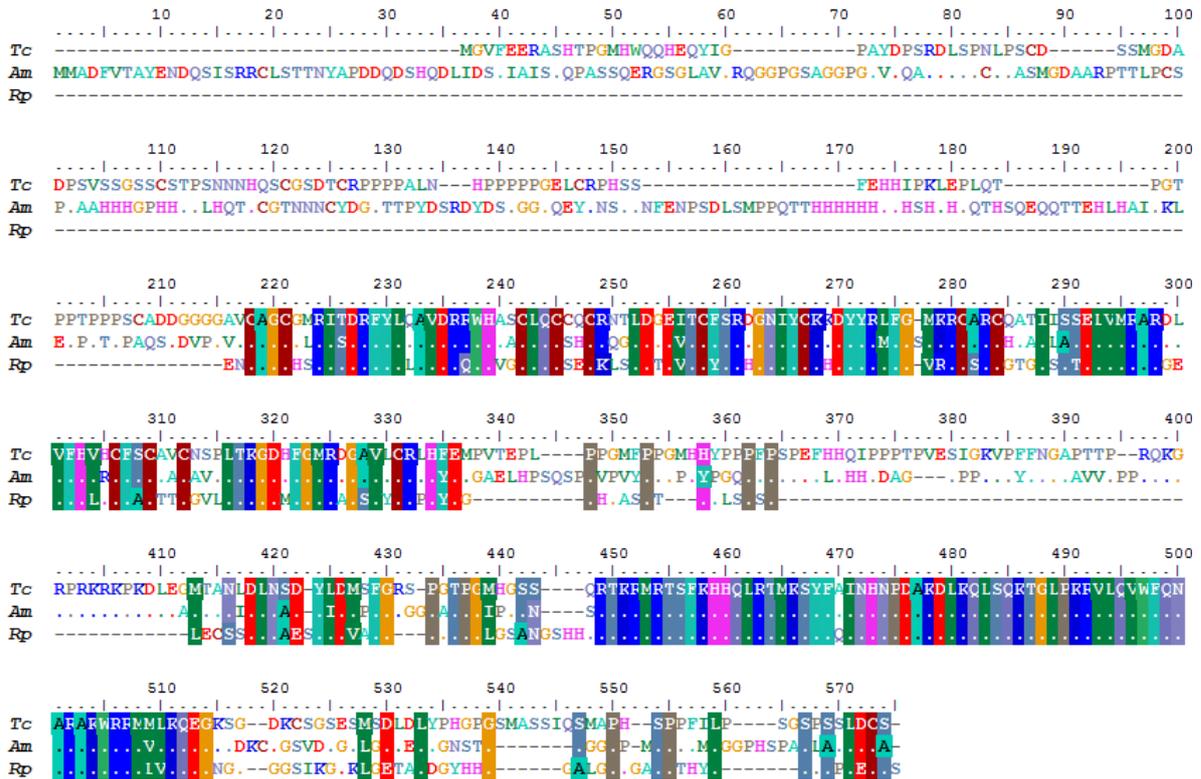
### 8.- abdominalB



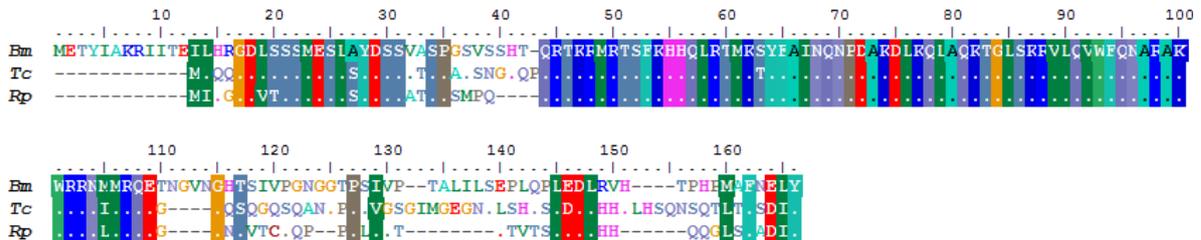
### 9.- caudal



10.- apterous1



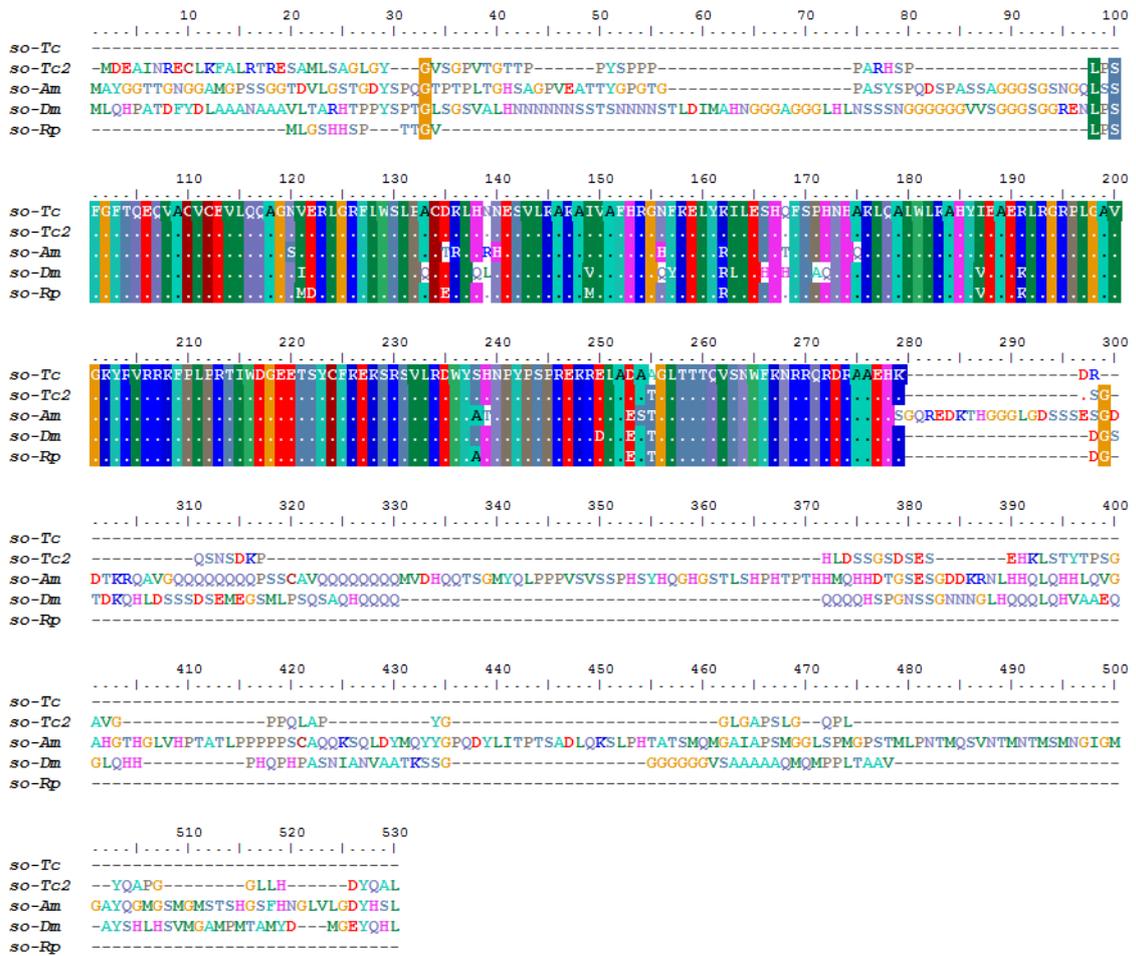
11.- apterous2



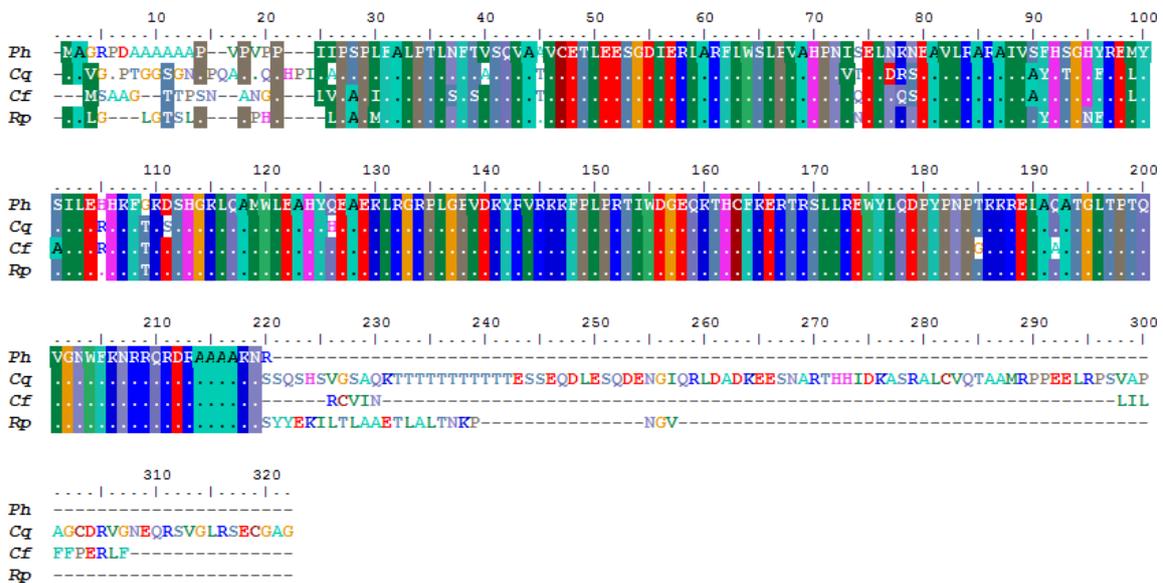
Apterous 1 y 2 comparados



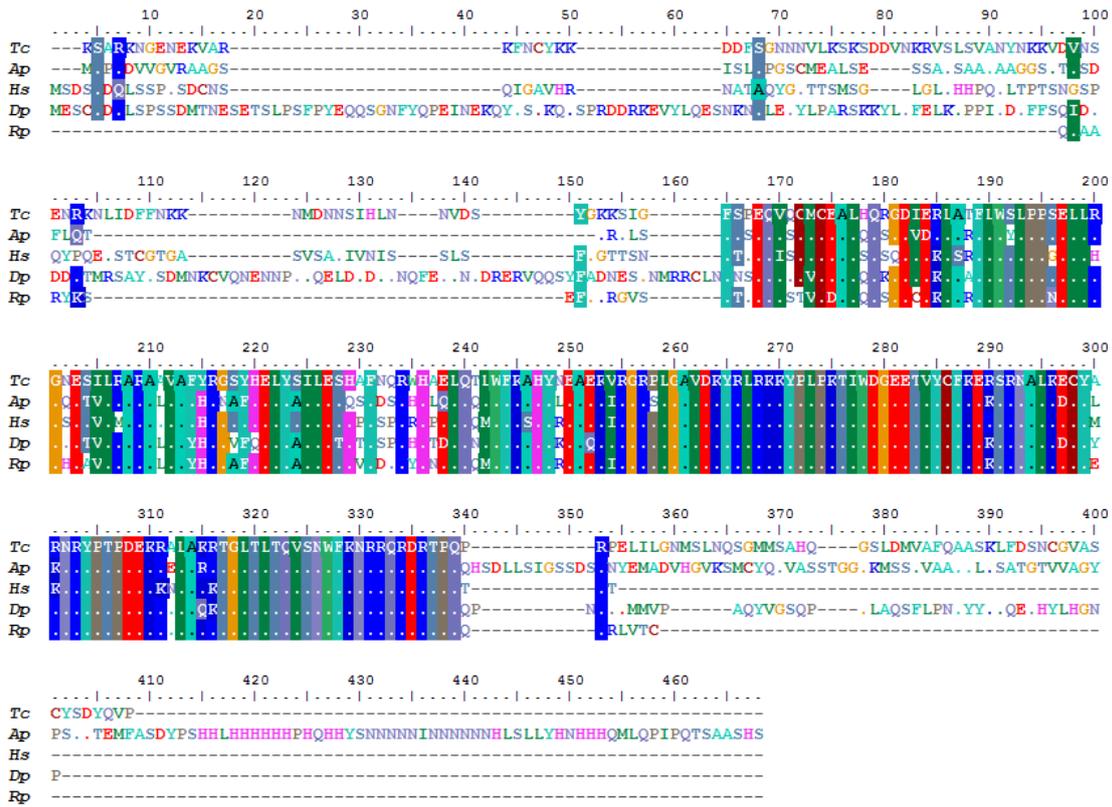
### 12.- six1/sine oculis



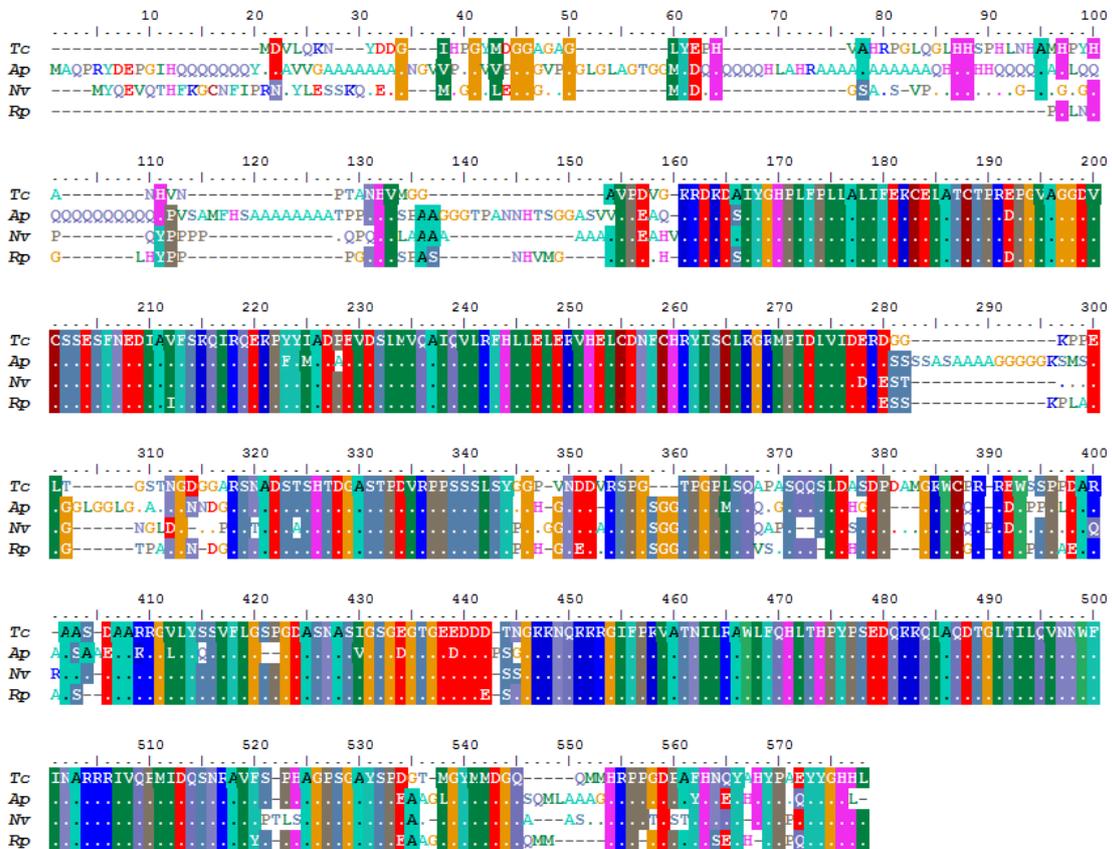
### 13.- six3/optix



14.- six4

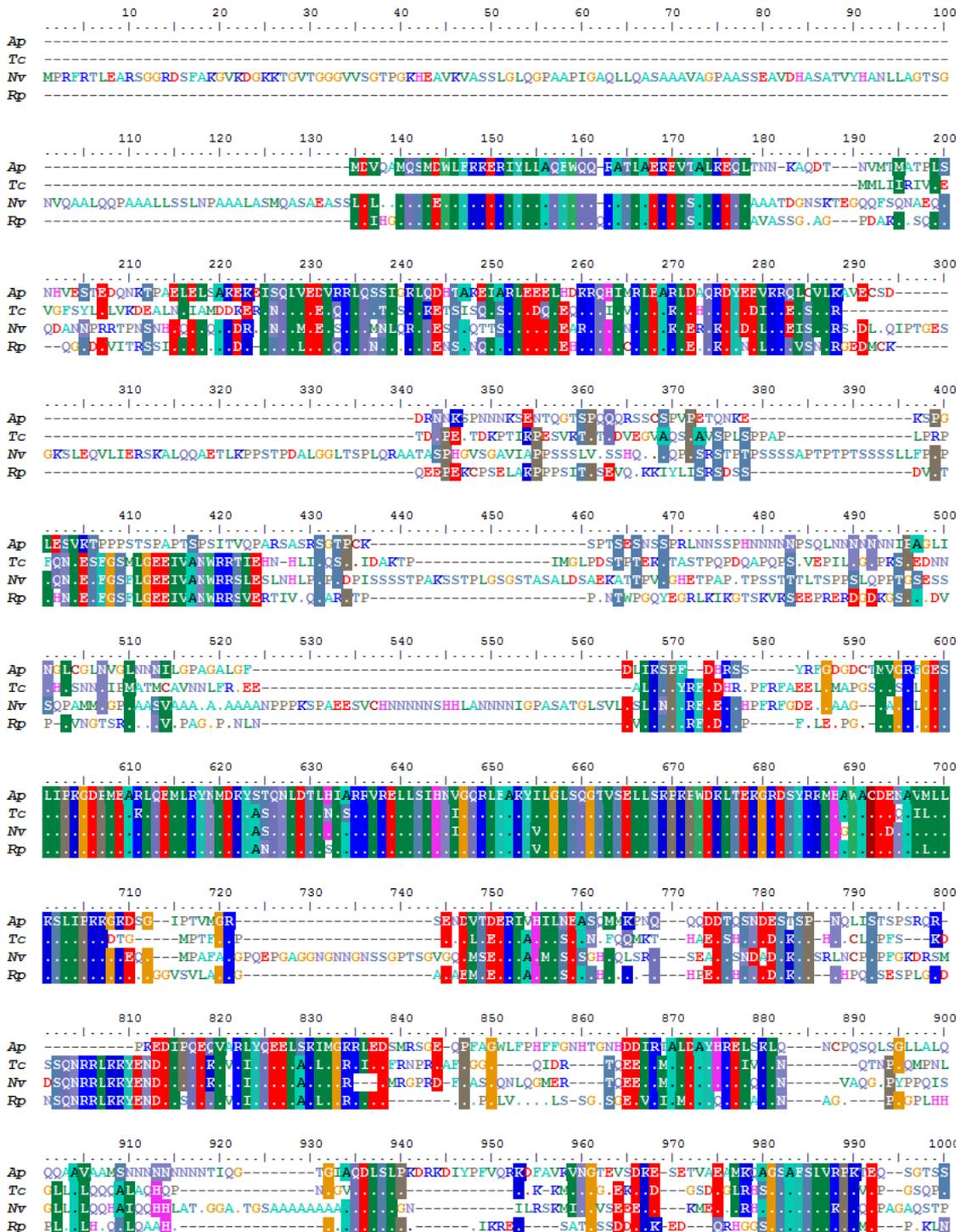


15.- homothorax



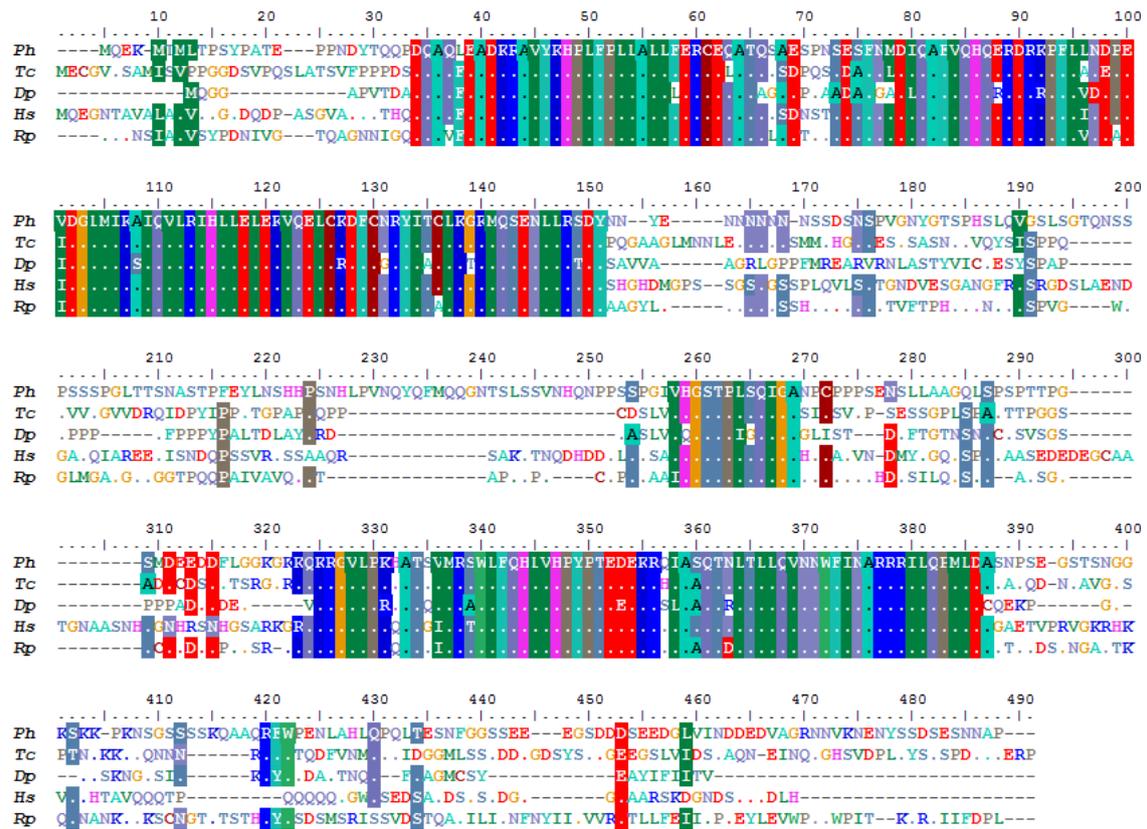


## 19.- cut

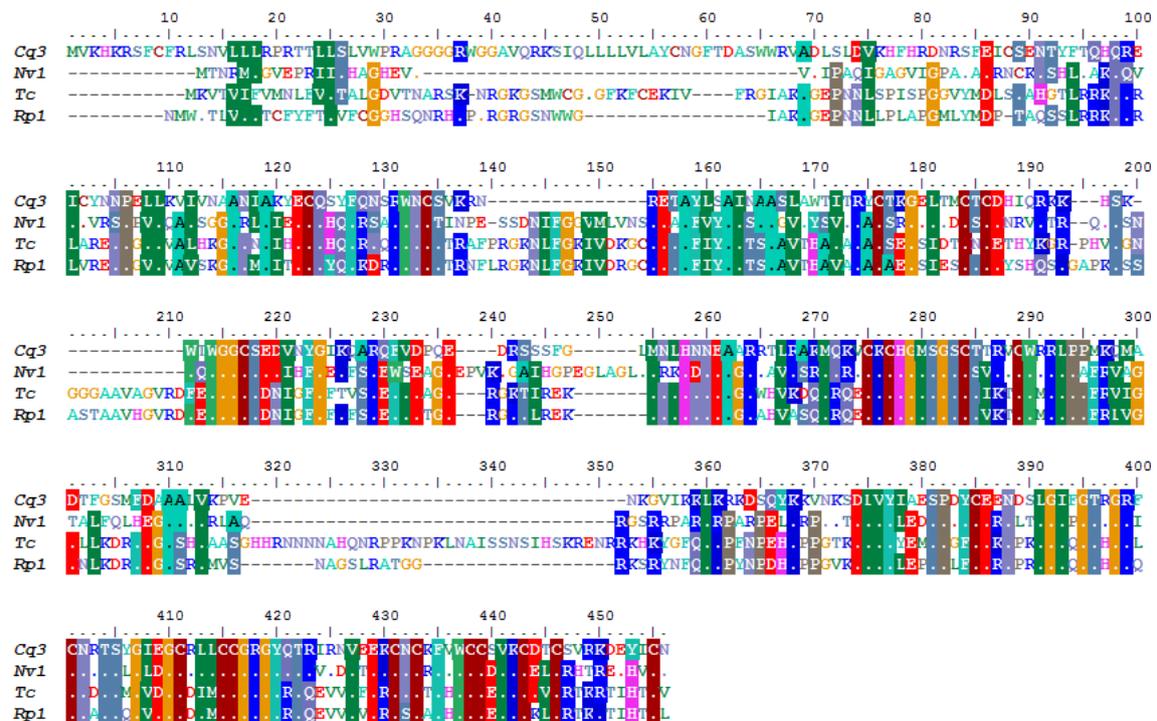


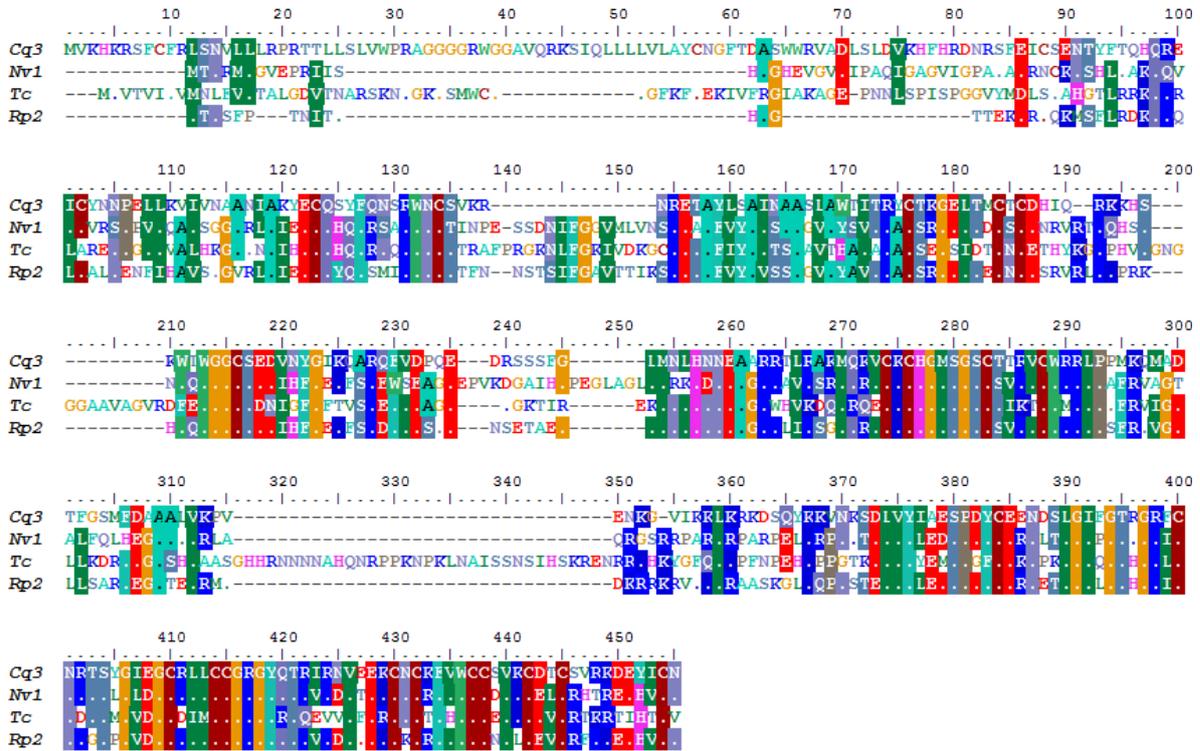
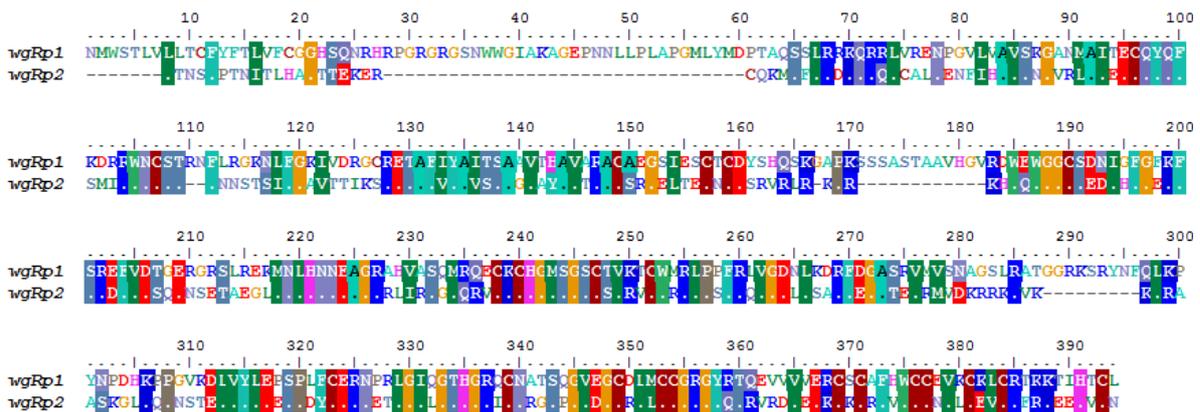


20.- PBX/knotted 1 homeobox 2



22.- wingless1



23.- *wngless2**wg1* y *wg2* comparados

### ANEXO III: Información adicional sobre genes anotados

| gen         | longitud total (pb)                          | región codificada (aa) | grado de completud de la sec.         | dominios conservados esperados                                                                                                                                                                    | dominios conservados encontrados | cantidad de exones | supercontig       | hebra | región          | regiones N (cantidad y longitud en pb)                                | predicción               | PM teórico |
|-------------|----------------------------------------------|------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------|-------------------|-------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------|
| <b>lb</b>   | 116.893                                      | 341                    | posiblemente falta un exón intermedio | 6                                                                                                                                                                                                 | 5                                | 2                  | GL563154          | -     | 895088-1011981  | cant: 2 (en intrón)<br>long: 253;43720                                | -                        | 39015,28   |
| <b>pb</b>   | 135.937                                      | 702                    | Sí                                    | muchos, distribuidos por toda la secuencia                                                                                                                                                        |                                  | 3                  | GL563154          | -     | 1148850-1284787 | cant: 2 (en intrón1)<br>Long: 385; 788                                | RPTMP08240<br>RPTMP08242 | 77714,4    |
| <b>dfd</b>  | 44.523                                       | 402                    | Sí                                    | 4                                                                                                                                                                                                 | 4                                | 2                  | GL563083          | -     | 1769235-1724712 | NO                                                                    | RPTMP06239               | 44598,656  |
| <b>scr</b>  | desconocida (repartido en distintos contigs) | 338                    | SI                                    | 7                                                                                                                                                                                                 | 1 (total)                        | 2                  | GL557615 (exón1)  | +     | 35618-36341     | ¿?                                                                    | RPTMP14716               | 24311,504  |
|             |                                              |                        |                                       | 7                                                                                                                                                                                                 | 1 (total)                        |                    | GL546178 (exón 2) | -     | 67884-68176     |                                                                       | RPTMP05010               | 11940,888  |
| <b>antp</b> | desconocida (repartido en distintos contigs) | 324                    | Sí                                    | 6                                                                                                                                                                                                 | 2                                | 2                  | GL546322 (exón1)  | -     | 7825-8551       | ¿?                                                                    | RPTMP04432               | 26112,982  |
|             |                                              |                        |                                       | 6                                                                                                                                                                                                 | 2                                |                    | GL563182 (exón2)  | +     | 699036-699284   |                                                                       | -                        | 10053,586  |
| <b>ubx</b>  | 434.277                                      | 311                    | Sí                                    | prácticamente todo el gen                                                                                                                                                                         |                                  | 2                  | GL563083          | -     | 1109896-1544173 | cant: 8 (en intrón) Long: 1818; 278; 260; 733; 28723; 961; 627; 48306 | RPTMP06242               | 34145,008  |
| <b>abdA</b> | desconocida (ensamblado final incompleto)    | 350                    | Sí (anotado parcialmente)             | prácticamente todo el gen                                                                                                                                                                         |                                  | 3                  | GL563083          | -     | 2070004-1070435 | ¿?                                                                    | RPTMP00482               | 38152,3    |
| <b>cad</b>  | 83.319                                       | 237                    | ¿?                                    | pocas regiones conservadas fuera del homeodominio; si bien existen algunos motivos ausentes, estos están ausentes también en otros ortólogos. El BLAST lo reconoce como <i>cad</i> y los datos de |                                  | 3                  | GL562574          | +     | 105240-188558   | cant:4 (en intrón1)<br>Long:523; 236; 1564; 53065                     | RPTMP10305               | 27146,922  |

| interferencia coinciden. Los tres exones contienen parte de la región conservada. |         |     |            |                                                       |   |        |          |   |                 |    |                                                                                |            |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------|-----|------------|-------------------------------------------------------|---|--------|----------|---|-----------------|----|--------------------------------------------------------------------------------|------------|-----------|
| <b>apt1 parte 1</b>                                                               | 14.567  | 145 | NO         |                                                       |   | 2      | GL563109 | + | 59952-74519     | -  | RPTMP03945                                                                     | 16509,28   |           |
| <b>apt1 parte 2</b>                                                               | 27.222  | 140 | NO         | falta una región N-ter                                |   | 2      | GL561001 | - | 36341-63563     | -  | -                                                                              | 18641,434  |           |
| <b>apt2</b>                                                                       | 4.082   | 130 | SÍ         | prácticamente toda la secuencia                       |   | 2      | GL561501 | - | 6010-10092      | -  | -                                                                              | 14847,089  |           |
| <b>six1</b>                                                                       | 587     | 196 | NO         | 1                                                     | 1 | 1      | GL562733 | - | 560990-561576   | -  | Contig17612.24.mrna                                                            | 22644,06   |           |
| <b>six3</b>                                                                       | 1.842   | 231 | SÍ         | prácticamente toda la secuencia                       |   | 2      | GL563033 | + | 976999-978841   | -  | Contig17912.64.mrna                                                            | 26454,65   |           |
| <b>six4</b>                                                                       | 7.940   | 198 | NO         | 1                                                     | 1 | 2      | GL562865 | + | 496844-504783   | -  | RPTMP07118                                                                     | 23491,092  |           |
| <b>hth</b>                                                                        | 281.207 | 412 | NO         | Está prácticamente completa, pero falta el N-terminal |   | 11     | GL562732 | - | 256547-537754   |    | int3(780, 1619), int6 (563), int7 (493), int8 (1364) y int9 (1710, 89351, 397) | 45057,516  |           |
| <b>exd</b>                                                                        | 766545  | 385 | SÍ         | prácticamente toda la secuencia                       |   | 9      | GL563079 | + | 1053428-1819973 |    | Int2 (425; 456; 308; 60353; 474; 39417; 235; 576); Int8 (220)                  | RPTMP02685 | 42620,695 |
| <b>latrop hilin3</b>                                                              | ¿?      | ¿?  | NO!!       | prácticamente toda la secuencia                       |   | mín.17 | GL562733 | + | ¿?              | ¿? | RPTMP02238                                                                     | ¿?         |           |
| <b>sp</b>                                                                         | 954     | 317 | SI         | prácticamente toda la secuencia                       |   | 1      | GL562486 | - | 318788-319741   | -  | -                                                                              | 34993,93   |           |
| <b>wg1</b>                                                                        | 1182    | 393 | SÍ         | esparcidos por toda la secuencia                      |   | 4      | GL562503 | - | 535067-571544   | -  | RPTMP04726                                                                     | 43833,67   |           |
| <b>wg2</b>                                                                        | 993     | 330 | falta M1   | esparcidos por toda la secuencia                      |   | 7      | GL563069 | + | 1253959-1264030 | -  | RPTMP07588                                                                     | 37635,395  |           |
| <b>fk1</b>                                                                        | 903     | 300 | ¿?         | ¿?                                                    |   | 4      | GL563045 | + | 800-35758       |    | RPTMP11724                                                                     | 33574,33   |           |
| <b>fk2</b>                                                                        | 585     | 194 | M1 dudosa. | ¿?                                                    |   | 3      | GL563091 | - | 484785-         | -  | RPTMP09985                                                                     | 22537,738  |           |

|                                         |      |     |                             |                                  |   |          |   |               |               |            | 492301    |
|-----------------------------------------|------|-----|-----------------------------|----------------------------------|---|----------|---|---------------|---------------|------------|-----------|
| <b>araucan</b>                          | 960  | 319 | falta n-ter                 | esparcidos por toda la secuencia | 4 | GL561259 | – | 24206-6998    | –             | RPTMP00254 | 35430,992 |
| <b>ara Nter</b>                         | 252  | 84  | NO falta M1 y nexa con Cter | esparcidos                       | 1 | GL562528 | – | 225855-226106 | –             | RPTMP05806 | 8604,442  |
| <b>tup/isl<sub>29</sub><sub>1</sub></b> | 1026 | 341 | Sí                          | esparcidos                       | 6 | GL562393 | – | 723839-752886 | 2 (intr.2 y5) | RPTMP00762 | 37897,04  |

<sup>29</sup> El N-terminal se encontró parcialmente en el mismo contig pero en hebra y dirección contrarias, cayendo el extremo Nter en una zona de incertidumbre. Sólo hay una traza correspondiente a la región.

## ANEXO IV: Otros genes anotados

**Ortólogo del gen *araucan* (*Rp-ara*):** contiene la secuencia proteica de al menos 390 residuos:

```

VAVSPGGSTGGAVSPTPGSPCCEGGRSMLTDPVSGQTVCSQYDTTARLALSSYPRPPVY
      10      20      30      40      50      60
SAHYPSTDQNPYPSIDSSAFYSF
      70      80
*****
YGGGYDLAARRKNATRESTATLKAWLNEHKKNPYPT
      90     100     110     120
KGEKIMLAIITKMTLTQVSTWTFANARRRLKKNKMTWEPKNKTDDDDDAVLSDCDDKDKD
      130     140     150     160     170     180
DCDEDKMKDHRMKDGVLVKAEHRLKELDDDDDLDEDMRKGPDMVVPHHMLGPPSH
      190     200     210     220     230     240
HHMMLKEEMSKDCGVVPVATKPKIWSLADTAACTPPPSVQATWGPSPYRPPPGGGGGGG
      250     260     270     280     290     300
YGGYFGGYPDVQTDTPPQTPPNMKLPSYQGPQPYQAAPAGYYTRQEPSPNNHPLQPPP
      310     320     330     340     350     360
PHHQPNNEETAFAKPFYKSPSQMSGGFVSPV
      370     380     390

```

Se encontró esta secuencia coincidente con una predicción, pero incompleta, la región N-terminal propuesta por el software (MVEAVRVEASSK) es incorrecta. Se encontró una región similar al N-terminal en otro *contig* y dentro de una segunda predicción; sin embargo no contiene una posible M1. Por otra parte, entre las dos regiones identificadas falta una zona conservada.



**Estructura del gen *araucan*.** Está distribuida en al menos 6 exones teóricos, de los cuales se encontraron 4 en las bases de datos. El esquema muestra como bloques blancos los exones teóricos necesarios faltantes y como bloques grises los exones identificados. Los exones identificados son de 252pb; 332pb; 550pb y 40pb, separados por intrones de N pb; N pb; N pb; ~13kb y ~1kb. El primer exón se encontró en el *supercontig* GL562528 y los siguientes en el *supercontig* GL561259.

**Ortólogo del gen *tailup* (*Rp-tup*) / *insuline gene enhancer protein 1-like* (*Rp-isl1-like*):** se encontró la secuencia proteica de 341 residuos:

```

RLFGTKCDKCSLSFRKDDFVMAKTKIYHIECFRCSACERQLIPGDEFALREDGLFCKED
    10      20      30      40      50      60
HEVLEKATNGENNNNNANISNNNSLLHNEGSNSSESSEGSNKCREGSVRSGKVSDDGKE
    70      80      90     100     110     120
TRVRTVLNEKQLHLTLRTCYSANPRPDALMKEQLVEMTGLSPRVIRVWFONKRCCKDKKRAI
    130     140     150     160     170     180
AMKQQMQQEKDGRKLGYGSMQGI PMVASSPVRHESPLGMNPIEVTSYQPPWKALSDFALH
    190     200     210     220     230     240
TDLDRLDPTAPPFQHLVNOVRGQQLATGVSFDFPFSSTIAASLLGELGKGVKTRGNTHPLA
    250     260     270     280     290     300
VFHHPRGVVTPTDMVHPDSTDSYVTYLESDDSLQHDAPSP
    310     320     330     340

```

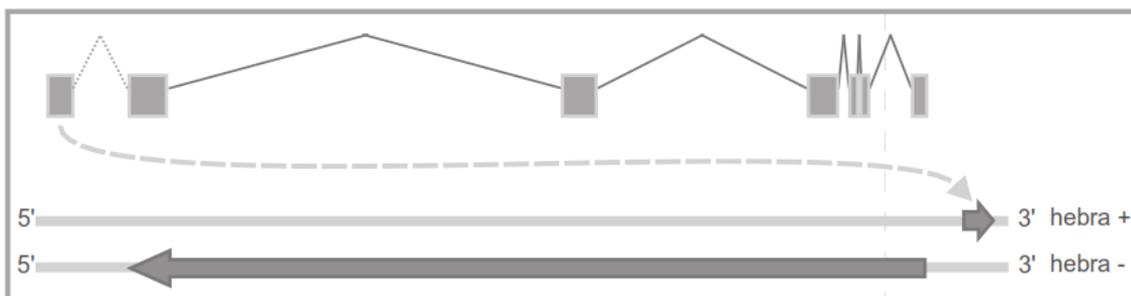
Esta secuencia similar al gen *tailup* coincide con una predicción, según la cual es probable que exista un *splicing* alternativo. Dado que se afecta la región no conservada de los exones 4 y 5, para este análisis sólo tuve en cuenta una isoforma. En ambos casos, la predicción se encuentra incompleta, faltando una región N-terminal conservada. Esta región se encontró en las cercanías del gen, pero en la cadena opuesta y por lo tanto con su sentido invertido; muy probablemente debido a un error del ensamblado. Están presentes casi todos los aminoácidos mínimos y necesarios, excepto la M1, que cae en una región de incertidumbre. La secuencia es:

```

EKRRRLSLCVGCGSQIHDQYILRVAPDLEWHAACLKCAECHQFLDETCTCFVREGKTYCKRDYV
    10      20      30      40      50      60

```

Las trazas sólo contienen un archivo con una secuencia correspondiente a la región (gnl|ti|1993571013 name:NADK-aal15g12.b1), esto permite extenderla hacia el N-terminal sólo unos pocos residuos (LEFKYLWFKKFT), los cuales no contienen regiones conservadas y es probable que queden por fuera del exón.



**Estructura del gen *tailup*.** Está en el *supercontig* GL562393 y contiene al menos 7 exones de 189pb; 280pb; 290pb; 211pb; 73pb; 74pb y 98pb; separados por intrones de N pb; ~160kb; ~9kb; 745pb; 156pb y ~2kb. El intrón de longitud desconocida se indica con línea de puntos.



TSGGSSGIAGPVGISSSSHHPPGHHPGPTNHHGTSVGRPSHRLPISPMSPDHQ: encontrado en el genoma. Exón 17 con la secuencia QVSDMSDEDGRRVSDMSRQSSRSYGDHRPLIPYTPASVATDRNFHAAFDAAFRQLKEQAAAAVGHHAHATVVAPHQGTVAVL DGETVVCHLQPDYTSRTTLHHQPYSEC: encontrado en las trazas. Este exón corresponde al final de la proteína, que está conservado en todas las secuencias analizadas.

Este gen no contiene homeodominio ni es de importancia en el marco de esta investigación, pero fue analizado para su anotación y por ese motivo lo incorporo en este apartado.



**Estructura del gen *latrophilin3*.** Su estado de secuenciación resultó muy pobre. Se estimó que el gen debe tener un mínimo teórico de 17 exones, sin embargo sólo tres están presentes en la versión 2.0, los cuales fueron anotados y se esquematizan en gris oscuro. La mayoría de las regiones faltantes fueron encontradas en las trazas (gris claro) y unas pocas secuencias teóricas no estaban en ninguna base de datos (blanco). Los tres exones anotados tenían longitudes de 104pb, 169pb y 328pb respectivamente y se hallaron en el *supercontig* GL562733.

## ANEXO V.1: pb según ensamblado versión 1.0

### 3 exones, el primero con 2 variantes.

**1er exón:** se detectaron dos variantes alternativas para un exón anterior, que posiblemente corresponde al extremo N-terminal, que contiene pequeños motivos conservados: SQPSMAEF, EYPWMKEKK, el más largo de ellos tiene una posible M1 que está seguida por una secuencia RGKRQ, conservada en *Apis*, el otro tiene una metionina no conservada en *Apis*, *Nasonia*, *Tribolium* ni *Drosophila*. Estos exones son reconocidos por el blast-p como pb, aún sin estar asociados al HD. Están separados entre sí por unas 10,2Kb y del siguiente exón unas 181kb y 171kb, respectivamente.

**2º y 3er exones:** Los dos exones q codifican el HD están separados por un intrón de casi 6,6Kb. Es posible que el que contiene la 2ª parte del HD sea el último.

### Código de colores:

- **resaltado en celeste:** las regiones codificantes/codificadas que se pueden considerar con bastante certeza como parte del exón.
- **resaltado en gris:** las regiones contenidas entre dos secuencias STOP, que flanquean la secuencia conservada y que, o bien no pertenecen a él, o bien no se puede asegurar que pertenezcan a él.
- **resaltado en gris oscuro:** comienzo de la coincidencia entre las dos alternativas.
- **blanco con fondo petróleo:** regiones de secuencia externa a pb, *downstream* al exón1, que son coincidentes en las dos secuencias<sup>31</sup>.
- **resaltado en verde:** STOP y posibles M1.
- **en letras naranjas:** secuencia (C)AG correspondiente a posible fin de intrón y comienzo de exón.
- **en letras azules:** secuencia (AG)GT correspondiente a posible fin de exón y comienzo de intrón.
- **en letras rojas:** motivo YPWM y hélices H1 y H3, usados como guía visual dentro de la secuencia.

### Estructura probable del gen:

```

ENSRDRRANKKSTETAVRLDQLCEVGVIRGKQPQQPTSQQQQQPQPQPHGPQTQQQEHVVDQOHEPDDDDDEGEEYLLKAGRNPAGGGPDEGVVVPP
GPPPHQQPVPVSHQGFWMASVSAATGMGDMIPGESGFISSQPSMAEFILPHHMTAGDMSFSPGQPQPSYQPMQDQQAVQYEPWMKEKKTARKSNQQ -
intrón de 180/170Kb - ENGLPRLRLRTAYTNTQLLELEKEFHFNKYLCPERRIEIAASLDLTERQ - intrón de 6,6kb -
VKVWFQNRMKHKRQTLKQGGEGDEKEPGGKAGKGDGLLGHDETSKSKSCQNCLEPGLMGEHLTSRTNNNNNNSTSYNNNSNASSGASSVTSTSSFEK
LEEDSRNESRVLTSPLGLPVKRPNEVVVKTEGTGISMCASSPNNKCLKDTRLISPEIAIKGALTPASTPGTPTAGTSPLEMPGQYVQARRGSPTAAT
AIATATASVTAVLNPNSVNNLVQVVRCAAPNPFSPPPQQRHPVNAEYRMAQYRQFTREYTTQQRVYPNSDYRQNPASRPNMHPHPRARQGYQQGYQV
YQONVYNGYNQEYVNRQYQYDSDYPGSTNYGSHYHYNSEVMAHETNTTNNSTTVGNTGYQENYQHVVDYSPGKPPTPQGYEIGHQGGEEASVNPVNHGVS
SPDPFPSNQHGHTASVMTTPNSVRTDSSSGEYYNSLHHFYNAEQQNNPQHASSENSNSSDFNFLTNLANDFAPEYYQLS

```

### Secuencias nucleotídicas

#### Exón 1B

```

GTA GGAAATAGTCGCGATCGACGGGCGAATAAAAAATCAACAGAAACGGCGGTGAGACTGGATCAGTTGATGTGTGAGGTGGGAGTGATGCGGGGCAAGC
AACCACAACAGCCGACCTCCCAGCAACAACAGCAACCCGAGCCGCAACCCGACGGTCCGAGACACAACAAGAGCAGTGGTAGATCAACAGCATGAA
CCAGACGACGATGATGATGAAGGCGAAGAAGAATACTATTAAAAGCTGGTTCGTAACCCAGCCGGTGGTGGTCCGGACGAGATGGGCGTGGTGGTACC
ACCGGGTCCACCGCCACATCAACAGCCAGTACCGTCCGACCAAAGGGTTTTGGATGTCCGCGGTGAGTGCAGCGGCCACCGGCATGGGCGACATGATACCTG
GTGAATCTGGTTTTATATCTTCGCAACCGTCCATGGCGGAGTTTCATATTGCCACATCACATGACCGCCGCGATATGAGTCTTAGCCCTGGACAGCCTCAA
CCATCTTATCCGACGCAATGGACCAACAGCAAGCTGTACAAGAATATCTTGGATGAAGGAGAAGAAGACGGCAAGGAAGCAACCAACAAGGTTA

```

#### Exón 1A

```

GTA GATCAAACAGCATGAACCAGACGACGATGATGATGAAGGCGAAGAAGAATACTATTAAAAGCTGGTTCGTAACCCAGCCGGTGGTGGTCCGGACC
AGATGGGCGTGGTGGTACCACCGGGTCCACCGCCACATCAACAGCCAGTACCGTCCGACCAAAGGGTTTTGGATGTCCGCGGTAAGTGCAGCGGCCACCGGC
ATGGGCGACATGATACCTGGTGAATCTGGTTTTATATCTTCGCAACCGTCAATGGCAGAGTTTCATATTGCCACATCACATGACCGCCGCGATATGAGTCC
TAGCCCTGGACAGCCTCAACCATCTTATCCGACGCAATGGACCAACAGCAAGCTGTACAAGAATATCTTGGATGAAGGAGAAGAAGACGGCAAGGAAGA
GCAACCAACAAGGTTA

```

<sup>31</sup> Se hizo el alineamiento abarcativo con el fin de establecer la posible duplicación de la secuencia por artificio de la técnica. El resultado muestra gran coincidencia pero no identidad, por lo tanto es probable que se trate de secuencias diferentes.

**Exón 2**

ATAATATTACTGTTACTCCTTTTTTCGATAAAGTGACTATTGATTATTATCTGTGTCAGAGAACGGACTGCCACGACAGCTGAGGACAGCTTACACGAACA  
 CCCAAGTGTGGAACTGGAGAAAGAGTTCATTTCACAAGTATCTTTGCAGGCCAAGAAGAATTGAGATTGCCGCTCGCTGGACCTAACGGAGAGACA  
 GTAAGCAAAGAGCCAGAGCCCCAGCTAATATACTAACTGCATCCCTTCTCTTGCAGGCCCGCTCCAGCCAGCCCACTGACCGGGCCGCCTACAGA  
 CGCCACCTCCGAAACACGATGTTACAGTGTCAACTGACAAATCTA

**Exón 3**

CTAAGTGATTATTCCATCAGTGACACTATTCTTTCTTGTTTTATTACAGGTGAAAGTATGGTCCAAAACAGGGCGGATGAAGCACAAAAGGCAAACCT  
 TGAGTAAGCAGGGTGAAGAAGGAGATGAAAAAGAACAGGAGGTAAAGCTGAAAAAGGAGATAAAGGATTGCTAGGTACAGCAGAGACTAGCAAGAAGAGT  
 TGCCAAAAGTGTGAAGTCCCACTGGCATGTTGGGCGAACATTTAACTTCCGAACTAACACAACAATAACAACAGTACGAGCTATAATAACAACAGCAA  
 CGCAAGTCCGGAGCTCCAGTGTGACCAGTACGACTAGTTCGTTTGAAGTGTAGAAGAAGATTCCCGCTCAAATGAAAGCCGAGTACTACCTCTCCCG  
 GGCTTTTCCCGGTAAAGCGCCAAACGAGGTTGTAGTGAAGACGGAAGTGGCATCAGTATGTGCGCATCATCGCCGGGAAATAAAAAAACTGTGTA  
 GATAAAGACTTATCTCGCCGAAATTGCTATTAAAGGAGCTTTGACTCCTGCTTCCACACCGGGCACACCTGGTACGGTGGGACAAGTCTCTAGAAAT  
 GCCTGGCCAGTATGTGGTCAAGCAAGAAGAGGATCACAACGGCAGCCACAGCAATAGCCACGGCTACAGCTTCCGTCACCGCTGTCTTACCAAACCCGT  
 CCGTAAACAATCTTGTGCAAGTAGTCAGGTGTGCTGCACCGAATAATTTCCCATCTCCTCCGCCCAACAAGGCAACCAGTAAATGCGGAATATAGGATG  
 GCGCAATATAGACAACAGTTTACTAGAGAATATACAACACAGCAGAGGGTTTATCCCAATTCGGATTATCGACAACAGAAATCCCGCTCAAGACCTAATGG  
 TATGCATCCCAAGGGCTCGTCAAGGATACCAACAGGACAGTACCAACAGTACTGCCAGAATGTATATAATGGGTACAATCAGGAATATATAATCAA  
 GGCAATATCAATATGATTCGGATTACCCAGGTAGCACTAATATGGTCTTATCATGGTACAATTCGAAGTATGGCTCAGCAACAAACACCAACAA  
 AACAGTACAACGGTGGCAACACTGGTTACTACCAAGAGAATTAACAACATGTTGACTATAGTCCAGGTAAACCGCCAAACCACTGGTTATTATGAAAT  
 TGGTATCAAGGTGGTGAAGCGTCCAATGTTCCAAATCATTATGGTGTCTCGTCCGGATCCGTTCCCATCAAAACCAACATGGCGGTACAGCGTCAGTAA  
 TGACTCCGCAATAGCGTCAGAACAGATAGTTCGTCGGAGAGTATTATAATTCGCTGCATCATTTTTATAACGCTGAACAACAGCAAAACAATCCGCA  
 CATGCTTCTGAAATAGTAACAGTTCGTGAGATTTAATTTTCTAACCAATTTGGCGAATGATTTGCCCCAGAATATTATCAGTCTCAGCTG

**Secuencias proteicas****Exón 1A y secuencias aleañas**

\*FHFSRFAGVHASNRWT\*RIQQPEMSSGGVGM\*ENSRDRRANKKSTETAVRLDQLMCEVGM\*MRGKQPQQPPTSQQQQQPQPQPHGPQQTQ  
 QQEHVVDQQHEPDDDDDEGEEEEYLLKAGRNPAGGGPDEMGVVVPPGPPPHQQPVPSHQ\*GFWMSAVSAAATGMGDMI PGES  
 GFISSQPSMAEFILPHHMTAGDMSPPSPGQPPQPSYPQPMDDQQQAVQ\*Y\*P\*W\*M\*KE\*KK\*TT\*ARKSNQQG\*CLFI\*FF\*SSVMDFENVLLF\*  
 VRSGAICSNLKNPFRPTFRAQFT\* IYMTSVAFTLFNSKTLFTFLY\*FSIQKSKCSSTTRSTADSIK\*LESSNNWYSEIYSKEHS\*VNTVFLBREII INVHCF  
 W\*LIHCFNRMKM\*MPMSVLFYIIKGCWVFLVCSWTDCVN\*P\*RCPS\*VESSAQWKI\*KI\*L\*FDVIFSSVIEENQAGLLRIDHISYFLRPFVLFVFC  
 YWWSWEKDPQTQKQKRGICITSSLHCHV\*GV\*YWGCSKLED\*GYIKPK\*LYPSL\*L\*KP\*MVFKKPKWGRVFP\*IRRKIGAGTSL\*GNESLRPYTFSK  
 V\*GKP\*KTYFFIEIRFFS\*K\*NGFL\*PLP\*MI\*NTCTTLMINAFSSSS\*RIW\*KLY\*YQWY\*DCGTNSSEM\*NLIIQKFCINLTF\*Q\*FKKIDILFF  
 SIKFKVLKY\*KYVLHNV\*QNKV\*NVY\*TIYQCIHVP\*ISTYLNFIQTS\*RIW\*\*\*IDFCHYEGRLKSPCKNKNYLIQWGPFLFFNIVSF\*AYTLRPTLL  
 \*FVDPFRIIGFVQV\*KIADRFCNHLV\*IKSF\*FPPAISSYWGTTNSPREPSLENRGDVKRVGTLFPLIILRQLLRCDLVRCDRGRGLFCGPVIGVFLAARF  
 SNGPITMKNMHL

**Exón 1B y secuencias aleañas**

\*GGSDAGASQPQAGPPKQQQTAATRTVRRHNNKSTW\*IKQHEPDDDDDEGEEEEYLLKAGRNPAGGGPDEMGVVVPPGPPPHQQPV  
 VPSHQ\*GFWMSAVSAAATGMGDMI PGESGFISSQPSMAEFILPHHMTAGDMSPPSPGQPPQPSYPQPMDDQQQAVQ\*Y\*P\*W\*M\*KE\*KK\*TT\*ARKSNQQG\*  
 CLFI\*FF\*SSVMDFENVLLF\*VRSGAICSNLKNPFRPTFRAQFT\* IYMTSVAFTLFNSKTLFTFLY\*FSIQKSKCSSTTEVPPI\*HSG  
 KVRIGIQKFTQKSILELIQCS\*EGKLLMFIVFGD\*FIVSIG\*KTKCQCQYYFTSLKGVSSVLSAHLIVSISPEDDLVPRSKARHNEKKRYKDCNLT  
 LFFLQ\*LKKIKLVCCELIFHIFGHFWFLCFVVIICLGRKTLNVPKSPKAV\*LLPSIVMC\*GV\*YWGCSKLED\*GYIKPK\*LYPSL\*L\*KP\*MVFKKPK  
 WGRVFP\*IRRKIGAGTSL\*GNESLRPYTFSKV\*GKP\*KTYFFIEIRFFS\*K\*NGFL\*PLP\*MI\*NTCTTLMINAFSSSS\*RIW\*KLY\*YQWY\*DCGT  
 NSSEM\*NLIIQKFCINLTF\*Q\*FKKIDILFFSIKFKVLKY\*KYVLHNV\*QNKV\*NVY\*TIYQCIHVP\*ISTYLNFIQTS\*RIW\*\*\*IDFCH\*EGRLKS  
 PCKNKNYLIQWGPFLFFNIVSF\*AYTLRPTLL\*FVEPPRIIGFVQV\*KIADRFCNHLV\*IKSF\*SRQPFHLHIREQIVRVGSQVWRIGGM\*NELEPYFH\*F  
 CDHNC\*SVSWCDVMMKDFVVGQSWAFFLQLGFQTVQ\*

**Exón 2**

\*YYCYSFFDKVTIDLLSVAENGLPRRLRTAYTNTQLLELEKEFHFNKYLCPRRRIEIAASLDLTERQVSKEPRAPANITKI  
 HPFSCRPASSHHLTGPPTDAHLRNTMFTCQLTI\*

**Exón 3**

\*VIISISDTILFFVLLQVKVWFQNRMRMKHKRQTLKQGEEGDEKEPGGKAGKGDKLLGHDETSKKSQCNCLEPPGMLGEH  
 LTRSTNNNNNNSTSYNNNSNASSGASSVTSTSSFEKLEEDSRSNESRVLTSPGLLPVKRPNEVVVKTETGTISMCASSPGN  
 NKKLCKDTRLISPEIAIKGALTPASTPGTPTAGTSPLEMPGQYVVQARRGSPATAATAIATATASVTAVLPNPSVNNLVQV  
 VRCAAPNNFSPPPPQRHPVNAEYRMAQYRQFTREYTTQQRVYPNSDYRQONPASRPNMGHPPRARQGYQQGQYQQYCCQN  
 VYNGYNQEEYNNQRQYQYDSYDYPGSTNYGSHYGNSEVMAHETNTTNNSTTVGNTGYQENYQHVDYS PGKPPPTQPGYYEIG  
 HQGGEASNPNHYGVSSPDPFSPNQHGHTASVMTPPNSVRTDSSSGEYNSLHHFYNAEQQONNPQHASSENSNSSSDFNFL  
 TNLANDFAPEYYQLS\*

## Secuencias nucleotídicas con traducción simultánea

ADN: AACAGCCGGAATAGTGGAGCGTGGTAAAGT**AGG**AAAT**AGT**CGCGATC  
+3: Q P E M S G G V G K **E** N S R D R

ADN: GACGGCGAATAAAAAATCAAC**AG**AAACGGCGGT**CAG**ACTGGATC**AGTT****GA**  
+3: R A N K K S T E T A V R L D Q L **M**

ADN: **GTGTGAGGTGGAGT****CA**TGCGGGG**CAAG**CAACACAAC**AG**CCGACCTCC  
+3: C E V G V **M** R G K Q P Q Q P T S Q

ADN: **AGCAACAACAGCA**ACCGC**AG**CCGCAACCGCACGGTCCGC**AG**ACACAACAAC  
+3: Q Q Q Q P Q P Q P H G P Q T Q Q Q

ADN: **AAGAGCACGTGGTAG**TCAAC**AG**CATGAACC**AG**ACGACGATGATGAT**GAAG**  
+3: E H V V D Q Q H E P D D D D D E G

ADN: GCGA**AGAGAAG**AATACCTATTAA**AG**CTGGTCTGAACCC**AG**CCGGTGGTG  
+3: E E E E Y L L K A G R N P A G G G

ADN: GTCCGGAC**AGATG**CGCGTGGTGGTACCACCGGGTCCACCGCCACATCAAC  
+3: P D E **M** G V V V P P G P P P H Q Q

ADN: **AGCCAGT**ACCGTCGCACCA**AG**GGTTTTGGATGTCGCGGTGAGTGCAGCGG  
+3: P V P S H Q G F W M S A V S A A A

ADN: CCACCGCATGGGCGACATGATACCTGGTGAATCTGGTTTTATATCTTCGC  
+3: T G M G D M I P G E S G F I S S Q

ADN: AACCGTCCATGGCGGAGTTCATATTGCCACATCACATGACCGCCGGCGATA  
+3: P S M A E F I L P H H M T A G D M

ADN: TGAGTCTAGCCCTGGACAGCCTCAACCATCTATCCGACCCAATGGACC  
+3: S P S P G Q P Q P S Y P Q P M D Q

ADN: AACAGCAAGCTGTACAAGAATATCTTGGATGAAGGAGAAGAAGACGGCAA  
+3: Q Q A V Q E Y P W M K E K K T A R

ADN: GGAAGAGCAACCAACA**AGGT**TAGTGCCTATTTATTTAATTTTTTGTATCTT  
+3: K S N Q Q **G** **E** C L F I \* F F \* S S

\*\*\*\*\*

ADN: ACAAGACACGTGGT**AG**TCAAC**AG**CATGAACC**AG**ACGACGATGATGATG  
+3: K S T W **\*** I K Q H E P D D D D D E

ADN: **AAGCGGAAGAAGA**AATACCTATTAA**AG**CTGGTCTGAACCC**AG**CCGGTGTG  
+3: G E E E E Y L L K A G R N P A G G

ADN: GTGGTCCGAC**AGATG**CGCGTGGTGGTACCACCGGGTCCACCGCCACATC  
+3: G P D E **M** G V V V P P G P P P H Q

ADN: AAC**AGCCAGT**ACCGTCGCACCA**AG**GGTTTTGGATGTCGCGGTAAGTGCAG  
+3: Q P V P S H Q G F W M S A V S A A

ADN: CGGCCACCGCATGGGCGACATGATACCTGGTGAATCTGGTTTTATATCTT  
+3: A T G M G D M I P G E S G F I S S

ADN: CGCAACCGTCAATGGCAGAGTTCATATTGCCACATCACATGACCGCCGGCG  
+3: Q P S M A E F I L P H H M T A G D

ADN: ATATGAGTCTAGCCCTGGACAGCCTCAACCATCTATCCGACCCAATGG  
+3: M S P S P G Q P Q P S Y P Q P M D

ADN: ACCAACAGCAAGCTGTACAAGAATATCTTGGATGAAGGAGAAGAAGACGG  
+3: Q Q Q A V Q E Y P W M K E K K T A

ADN: CAAGGAAGCAACCAACA**AGGT**TAGTGCCTATTTATTTAATTTTTTGGT  
+3: R K S N Q Q **G** **E** C L F I \* F F W S

\*\*\*\*\*

ADN: AACTTACTTTATCAACATATAAATATTACTGTTACTCTTTTTCGATAAAG  
+3: L T L S N I **E** Y Y C Y S F F D K V

ADN: TGACTATTGATTTATTATCTGT**TCAG**AGAACGGACTGCCACGCACTGA  
+3: T I D L L S V A **E N G L P R R L R**

ADN: GGACAGCTTACACGAACCCCACTGTGGAAGTGGAGAAGAGTTCATTT  
+3: T A Y T N T Q L L **E L E K E F H F**

ADN: TCAACAAGTATCTTTGACGGCCAAGAAGATTGAGATTGCCGCTCGCTGG  
+3: N K Y L C R P R R I E I A A S L D

ADN: ACCTAACGGAGAGAC**AGGT**AAGCAAAGAGCCAGAGCCCGAGTAAATATAA  
+3: **L T E R Q** V S K E P R A P A N I T

ADN: CTAAACTGCATCCCTTCTCTTGACGGCCCGCTCCAGCCAGCCCACTGA  
+3: K L H P F S S C R P A S S H A H L T

ADN: CCGGGCCGCTACAGACGCCCACTCCGAAACAGATGTTCAAGTGTCAAC  
+3: G P P T D A H L R N T M F T C Q L

ADN: TGACAATCTAGGATACATCCTTCCGCTCGTCATAACCGGTTCTTCTTTCT  
+3: T I **E** D T S F R S S \* P R S S F S

\*\*\*\*\*

ADN: TAAAGAATGTATTGTATATAATTTTAACTTTTTTGTAAAGTATTATTTTC  
+2: K E C I C I \* F \* T F L \* V I I S

ADN: CATCAGTGACACTATTCTTTTCTTTGTTTATT**CAGGT**GAAAGTATGGTT  
+2: I S D T I L F F V L L Q **V K V W F**

ADN: CCAAACAGGCGGATGAAGCACAAAAGGCAAACTTGAGTAAGCAGGGTGA  
+2: **Q N R R M K H K R Q T L S K Q G E**

ADN: AGAAGGAGATGAAAAAGAACCAGGAGTAAAGTGGAAAAGGAGATAAAGG  
+2: **E G D E K E P G G K A G K G D K G**

ADN: ATGTGCTAGGTCACGACGAGACTAGCAAGAAGAGTGGCAAACTGTGAAT  
+2: **L L G H D E T S K K S C Q N C E I**

ADN: CCCACCTGGCATGTTGGGGAACATTTAACTTCCCGAACTAACAAACAACA  
+2: **P P G M L G E H L T S R T N N N N**

ADN: TAACAACAGTACGAGCTATAATAACAACAGCAACGCAAGTCCGGAGCCTC  
+2: **N N S T S Y N N N S N A S S G A S**

ADN: CAGTGTGACCAGTACGACTAGTTCGTTTGAAGTGGAAAAGTGGAAAAGTTC  
+2: **S V T S T T S S F E K L E E D S R**

ADN: CTCAAATGAAAGCCGAGTACTTACCTCTCCCGGCTTTTGGCGGTAAGGG  
+2: **S N E S R V L T S P G L L P V K R**

ADN: CCAAACAGGTTGTAGTGAAGACGGAACTGGCATCAGTATGTGGCATC  
+2: **P N E V V V K T E T G I S M C A S**

ADN: ATCGCCGGGAAATAATAAAAACTGTGTAAAGATACAAGACTTATCTCGCC  
+2: **S P G N N K K L C K D T R L I S F**

ADN: GGAAATTGCTATTAAGGAGCTTTGACTCTGCTTCCACACCGGCAACCC  
+2: **E I A I K G A L T P A S T P G T F**

ADN: TGGTACGGTGGGACAAGTCTCTAGAAATGCCTGGCCAGTATGTGGTCCA  
+2: **G T A G T S P L E M P G Q Y V V Q**

ADN: AGCAAGAAGAGGATCACCACCGCAGCCACAGCAATAGCCACGGCTACAGC  
+2: **A R R G S P T A A T A I A T A T A**

ADN: TTCCGTCACCGCTGTTCTACCAACCCCGTCCGTAACAACTTTGTGCAAGT  
+2: **S V T A V L P N P S V N N L V Q V**

ADN: AGTCAGGTGTGCTGCACCGAATAATTTCCCATCTCCTCCGCCCAACAAAG  
+2: **V R C A A P N N F P S P P P Q Q R**

ADN: GCACCC**GT**AAATGCGGAATATAGGATGGCGCAATATAGACAACA**GT**TTAC  
+2: **H P V N A E Y R M A Q Y R Q Q F T**

ADN: TAGAGAATATACAACAGCAGAGG**GT**TTATCCCAATTCGGATTATCGACA  
+2: **R E Y T T Q Q R V Y P N S D Y R Q**

ADN: ACAGAATCCCGCCTCAAGACCTAAT**GT**ATGCATCCACCAAGGGCT**CGT**CA  
+2: **Q N P A S R P N G M H P P R A R Q**

ADN: AGGATACCAACAGGGAC**GT**ACCAACA**GT**ACTGCCAGAAT**GT**ATATAATGG  
+2: **G A Y Q Q G Q Y Q Q Y C Q N V Y N G**

ADN: **GT**ACAATCAGGAATATTATAATCAAAGGCAATATCAATATGATTCGGATT  
+2: **Y N Q Q E Y Y N Q R Q Y Q Y Y D S D Y**

ADN: CCG**AGT**AGCACTAATTAT**CGT**TCTTATCATGGCTACAATTC**CGA**TTAT  
+2: **P G S T N Y G S Y H G Y N S E V M**

ADN: GGCTCAGAAACAACACCACCAACA**AGT**ACAAC**GGT**TGGCAACACTGG  
+2: **A H E T N T T N N S T T V G N T G**

ADN: TTACTACCAAGAGAATTACCAACATGTGACTATAGTCCAGGTAACCGCC  
 +2: Y Y Q E N Y Q H V D Y S P G K P E

ADN: AACCCAACCTGTTATTATGAAATTGTCATCAAGGTGGTGAAGCGTCCAA  
 +2: T Q P G Y Y E I G H Q G G E A S N

ADN: GTTCCAAATCATTATGTTCTCCTCGCCGGATCCGTTCCCATCAAACCA  
 +2: V P N H Y G V S S P D P F P S N Q

ADN: ACATGGCGGTACAGCGTCACTAATGACTCCGCCAAATAGCGTCAGAACAGA  
 +2: H G G T A S V M T P P N S V R T D

ADN: TAGTTCGTCCGGAGAGTATTATAATTCGTGCATCATTTTTATAACGCTGA

+2: S S S G E Y Y N S L H H F Y N A E

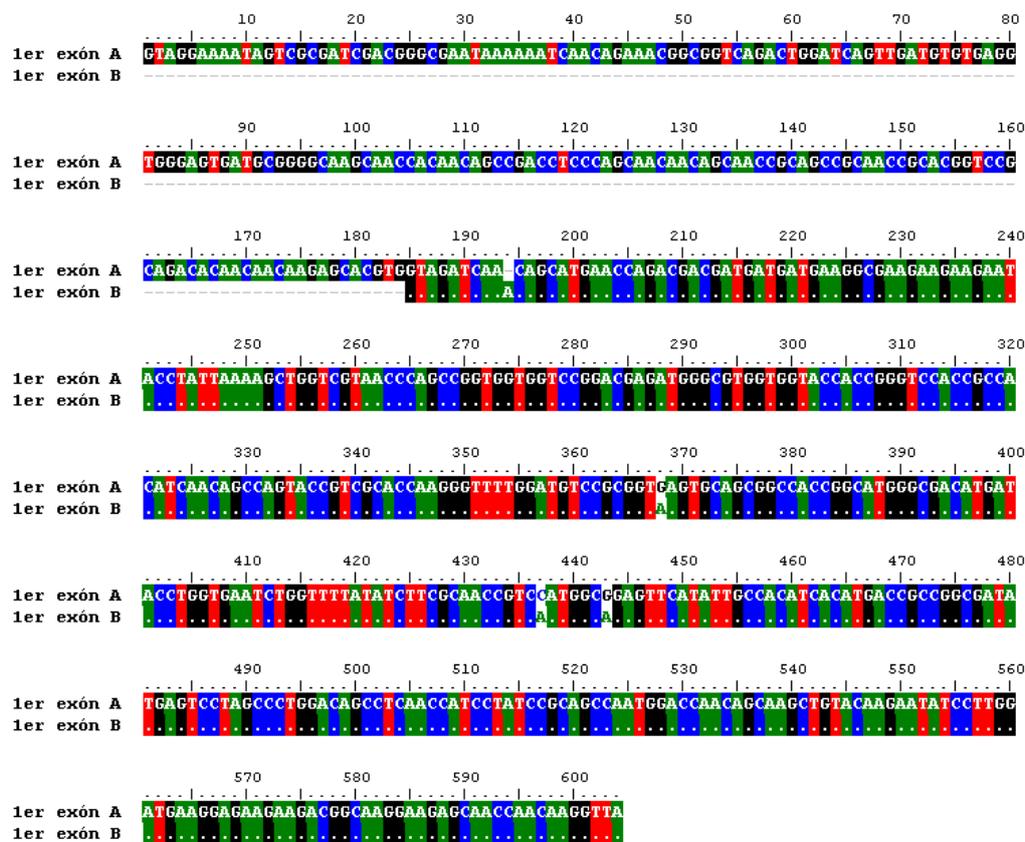
ADN: ACAACAGCAAAACAATCCGCAACATGCTTCTGAAAATAGTAACAGTTCGTC  
 +2: Q Q Q N N P Q H A S E N S N S S S

ADN: AGATTTTAATTTTCTAACCAATTTGGCGAATGATTTTGCCCCAGAATATTA  
 +2: D F N F L T N L A N D F A P E Y Y

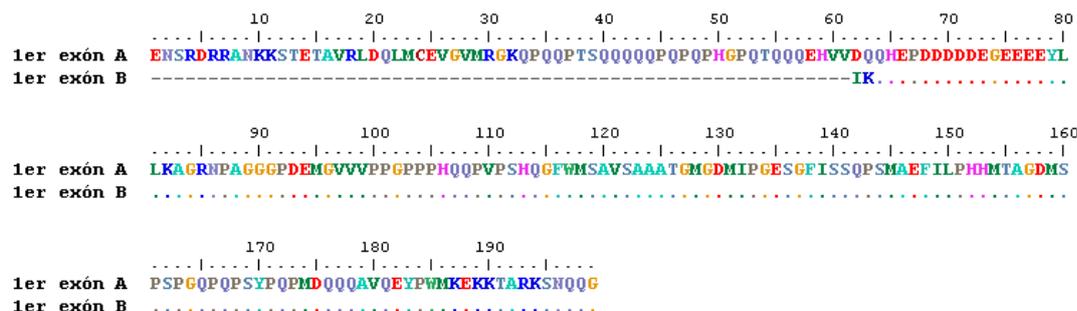
ADN: TCAGCTCAGCTGAGAATCCATGCTTGTGTTAATTTGTTATTACAGCAATAAT  
 +2: Q L S E S M L V \* F V I T A I I

### Comparación a nivel de nucleótidos de las variantes A y B del 1º exón:

Se hizo el alineamiento con el fin de establecer la posible duplicación de la secuencia por artificio de la técnica. El resultado muestra gran coincidencia pero no identidad, por lo tanto es probable que se trate de secuencias diferentes.



### Comparación a nivel de aminoácidos de las variantes A y B del 1º exón:



## ANEXO V.2: *abdB* según trazas y ensamblado versión 1.0

### *abdB* armado de novo a partir de las trazas

Se encontraron dos exones con los cuales se obtiene una secuencia aparentemente completa. El primer exón es igual al primero de *abdB-2*; el segundo se parece más al de *abdB-1* correspondientes a la versión 1.0 del genoma ensamblado (se muestra a continuación)

**Exón 1:** Región anterior al HD; no se descarta que haya un exón alternativo previo. Se marcan posible M1, la secuencia SWWT previa aparece conservada en *A.mellifera*, pero el inicio está conservado respecto a *T.castaneum*:

```

agaattaactgtgagtttggtgatggtaagttgtgtgatgtaaaacaataaaaata
R I N C E F G D G K L C D V K Q ■ N K I
aa>tagcaaaaaacaaacgcacatgccctgattcga>caggctttctttatctgtttcctgta
N S K K Q N A C P D S T G F L Y L F P V
ccatcatatcctgtgtacatcaatttcaaccgcccacacaaccggttaaaattctc
P S Y P A V H Q F Q P P A T Q P V K I L
atcatcggcgacctggcc>gagggtgtgcctcaccggggggcccctgtacgacaatggc
I I G D L A E G V A S P G G P L Y D N G
ggctccggcg>gagcagcctgtct>cagag>accccgggcccga>cagctgctgaccatcctgg
G S G G A A C L R D P G P T A A V P S W
tggacc>atgagt>aacggcaacatctcctatgaggaacagccagtcttaccgcccgaacc
W T M M N G N I S Y E E Q P V L P P P T
ttgacgccaataaaaaacatcgcccagcagtagccggtaactaccagcagttcagcatct
L T P I K T S P S S T P V T T S S S A S
agtacatcaccagtgccagtcacaaactggcccattacacataccagcgaaggttaggc
S T S P V A S Q T G P L H I P A K R L G
tatgaatgctgtgaaccagctggaccaggtgttatcaggcatgcacaccagctagccag
Y E C V E P A G P G V I R H A H H G S Q
ccatggaattatagtcctgtggacacacatcatgccagtcacgcttttgatcagtagcc
P W N Y S P V D T H H A S P A F D Q Y A
cagccaacctactacaataatacctgatagccgtgataggaaatccggcctattttggaat
Q P T Y Y N I P D S R D R K S G L F W N
ccagcttcggccacgggacaagattataaataactagcacaatgacaccgggtacatct
P A S A T G Q D Y K Y T S T M T P G T S
actgaaccacctgtttctacttctgtcatcaaaagtttttcacaatcctgtgtgaattatgta
T E P P V S T C H Q S F S Q S W C N Y V
ccttatacaacggctagtagacatcatgtggatggccatcatcaatcttccgtgccat
P Y T T A S R H H V D G H H Q S S V P Y
ctctcggcgggatgatcgtagggatctctgctatggtcgaaagtagaccatttacacac
L S P A D D R R V S A M V E S T P F T H
gatacctataatccactgcggaattaccggcgccagagc>ctgtaccgt>ccacaccat
D T Y N P L R N Y P A P E P V P S T P Y
ccacctcc>aggt>aagct>gattttttaaataattttatacccaactttttcaatgagtgca
P P P G K L I F ■ I F Y T Q L F S M S A

```

**Exón 2:** exón con HD. Parece haber splicing alternativo, en violeta se marcan dos posibles finales de intrón que mantienen el marco de lectura. El extremo C-terminal no está conservado, es posible que el codón de terminación corresponda al final de la unidad transcripcional tanto como que haya exones adicionales.

```

ttaaataatgacagtggtggatgaaatt>gcaaaaaagtt>tactgaccat>cc>actgtttgt
L N M T V W D E I A K K V Y ■ P S T V C
gtt>cagct>ggcct>cgctgacggggcgt>caac>atgt>ccagcagtg>ggag>taagtaataatcca
V T A A S L T G V N M S S M G V S N N P
ttggagtggactggccaagt>cactgtaaggaaaaaacgtaaaccttattcaaaagtccaa
L E W T G Q V T V R K K R K P Y S K F Q
acattggaacttgaaaaagagttcctattttaatgctgtagctttcaaaacagaaacgatgg
T L E L E K E F L F N A Y V S K Q K R W
gaattgacagtaatttaaaatcaaccgaacgacaagtgaataatggtttcaaaatagg
E L A R N L N L T E R Q V K I W F Q N R
cgaatgaaaaataagaaaaacaatcaaaagacaagcggcccaacaacagaaacaataat
R M K N K K N N Q R Q A A Q Q Q N N N N
aataatagcgcgaacgctaaccaccatggaggcggcgtggagccg>gt>ggt>gctgct>gtg
N S A N A N H H G G G A G A G G A A V
gggacgcaccacg>gt>gctg>cgccacaccat>gt>gt>caccgcacatcatcggccaccaac
G T H H G A A A H H V V T A H H P A T N
ggggccttgaaacatcatcag>tga>ccttcg>cccttctct>gggg>tcag>tgtc>gg>tcacat
G A L K H H Q ■

```

## Versión 1.0: ¿ *abdB* duplicado?

Aparentemente, no se trata de alternativas de *splicing* porque el primero parece estar constituido por 2 exones y el segundo por 3. En ambos casos, el C-terminal no es conservado, por lo que podría haber exones adicionales. En las versiones 1 y 2 se subrayan las regiones donde los *contigs* debieron ser completados.

### *abdB-1*

Exón 1 de *contig* 153 sólo

```
..XXXXXXXXSPSSPTVTTSSASSTSPVASQTGPLHI PAKRLGYECVEPAGPGVIRHAHHSQPWNYS PVDTHHASPFDQYAQPTYYNIPD
SRDRKSGLFWNPASATGQDYKYTSTMTPGTSTEPVSTCHQSFSQS WCNYPYTTASRHHVDGHHQSSVPYLSPADRRRVSAMVESTPFT
HDTYNE LRNYPAPEPVPSTPYPPP GKLIF*
```

Secuencia completa, resultante de *contig* 153 mas 9317

```
*IAKKQACPDSTGFLYLFPVPSYPAVHQFQPPATQPVKILIIIGDLAEGVASPGGPLYDNGSGGAACLRDPGPTAAVPSWWTMMNGNIS
YEEQPVLPPTLTPIKTSPTSSTPVTSSASSTSPVASQTGPLHI PAKRLGYECVEPAGPGVIRHAHHSQPWNYS PVDTHHASPFDQY
AQPTYYNIPDSRDRKSGLFWNPASATGQDYKYTSTMTPGTSTEPVSTCHQSFSQS WCNYPYTTASRHHVDGHHQSSVPYLSPADRRRV
SAMVESTPFTHDTYNE LRNYPAPEPVPSTPYPPP GKLIF* -Intrón 24Kb-
*PSTVCVT AASLTGVNMSSMGVSN NPLEWTGQVTVRKKRKPYSKFQTI ELEKEFLFNAYVSKQKRWELARNLNLTERQVKI WFNRRMKN
KKNRQRAAQQQNNNNNSANANHHGGGAGAGAAVGTTHGAAAHVVTAAHHPATNGAL KHHQ*
```

***abdB-2***: Así como está no se puede armar, falta un exón que mantenga el marco de lectura, que debería contener la región conservada: NPLEWTGQV. El primer exón es el que estaba contenido en el *contig* #9317 y la región codificante está sobre el final del mismo, terminando abruptamente. Para obtener la secuencia *stop* de ese primer exón fue necesario extenderla mediante información de las trazas. El inicio está conservado en *T.castaneum* y contenido en *P.humanus*.

Exón 1 de *contig* 9317 solo

```
*NKINSKKQACPDSTGFLYLFPVPSYPAVHQFQPPATQPVKILIIIGDLAEGVASPGGPLYDNGSGGAACLRDPGPTAAVPSWWTMMNG
NISYEEQPVLPPTLTPIKTSPTSSTPVTSSASSTSPVASQTGPLHI PAKRLGYECVEPAGPGVIRHAHHSQPWNYS PVDTHHASPFD
DQYAQPTYYNIPDSRDRKSGLFWNPASATGQDYKYTSTMTPGTSTEPVSTCHQSFSQS WCNYPYTTASRHHVDGHHQSSVPYLSPAD
RRVSAMVES
```

De *contig* 9317 más trazas

```
*NKINSKKQACPDSTGFLYLFPVPSYPAVHQFQPPATQPVKILIIIGDLAEGVASPGGPLYDNGSGGAACLRDPGPTAAVPSWWTMMNG
NISYEEQPVLPPTLTPIKTSPTSSTPVTSSASSTSPVASQTGPLHI PAKRLGYECVEPAGPGVIRHAHHSQPWNYS PVDTHHASPFD
DQYAQPTYYNIPDSRDRKSGLFWNPASATGQDYKYTSTMTPGTSTEPVSTCHQSFSQS WCNYPYTTASRHHVDGHHQSSVPYLSPAD
RRVSAMVESTPFTHDTYNE LRNYPAPEPVPSTPYPPP GKLIF*
-Intrón de longitud desconocida-
```

De *contig* 675

```
*QTTSQWLWASTGPSV ELEKEFLFNAYVSKQKRWELARNLNLTERQVKI WFNRRMKNKKNRQRAAQQQNNNNNSANANHHGGGAGAG
GAAVGTTHGAAAHVVTAAHHPATNGAL KHHQ*
```

### Código de colores:

- **resaltado en rojo**: regiones codificadas que se pueden considerar con bastante certeza como parte del exón de la primera variante en la versión 1.0.
- **blanco resaltado en marrón**: regiones codificadas que se pueden considerar con bastante certeza como parte de la segunda variante en la versión 1.0.
- **resaltado en gris**: las regiones contenidas entre dos secuencias STOP, que flanquean la secuencia asignada al gen y que se presume que son externas al CDS.
- **resaltado en amarillo**: algunos pequeños motivos conservados usados como guía visual dentro de la secuencia (ejemplo Hélices 1 y 3 del HD).
- **resaltado en verde**: STOPs y posibles M1.
- **en letras naranjas**: secuencia (C)AG correspondiente a posible fin de intrón y comienzo de exón.
- **en letras azules**: secuencia (AG)GT correspondiente a posible fin de exón
- **en letras violetas**: posible secuencia de ramificación dentro de intrón.
- **en letras verdes**: secuencia rica en AT dentro del intrón y cercana a su extremo 3'.

## ANEXO VI: unión de *supercontigs* C8957+1041

El primer exón de antp apareció en dos *supercontigs* diferentes (#8957 y #1041). La secuencia codificada era idéntica en los dos casos. Aún así, se consideró la posibilidad de que se tratara de dos variantes de *splicing* con diferencias en sus regiones reguladoras. Sin embargo, al ensayar posibles coincidencias entre los exones asignados al *cluster HOX*, descubrí que tenían una superposición de secuencia que abarcaba la región codificante y que por lo tanto, se trataba de una redundancia producida por artefacto de la técnica.

En este anexo se muestran 1) la secuencia final, producto de empalmar ambos *contigs* y 2) parte del producto de empalme, a modo de alineación para mostrar la coincidencia perfecta. En este caso, la secuencia no se lee pero el sombreado de color permite visualizar el resultado.

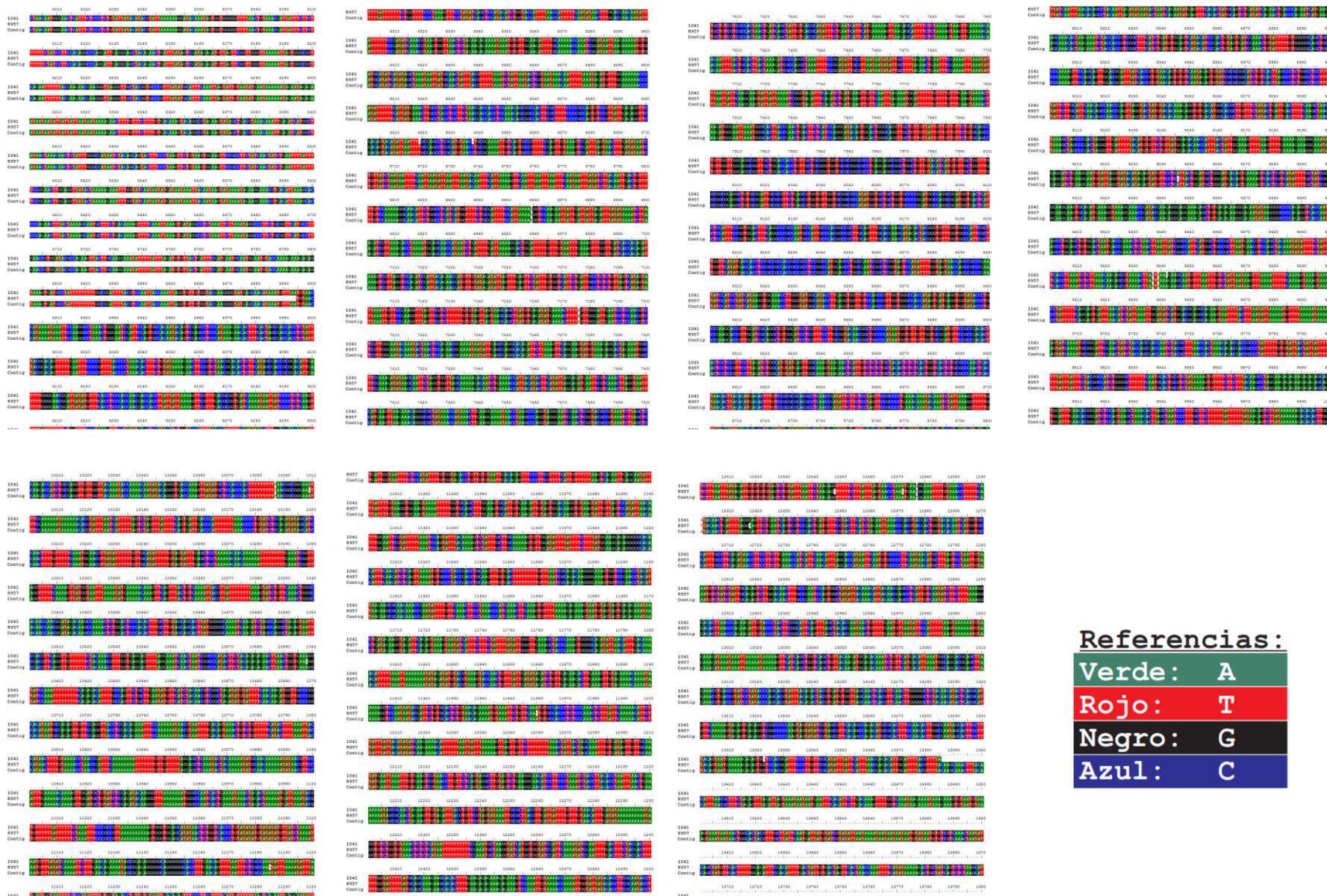
### Referencias

- Gris C1041
- Blanco zona de solapamiento de *contigs*
- Verde región codificante de exón 1 de antp
- Celeste C8957

#### >Contigs C8957+C1041

TAAACAATACTGACGCCAATCGGGCATATATACTTCTCATTTTTTTTGAAGGGGGATTACATTTTCATTTATAAACTTTCTGTAAAGTATATTTATCGCCAACTTGGCCTTATGCAATTTATCCAA  
AAGTGTGGTTTAAAGATTACTAGTGGGGTAAGCAACATACCAAGATAATGTAGAAATTAAACAGTTTCCAGCTTTTCCTCTTAGGTACCAATTTTCATTTTGTCTATCTCCACCCCTCCGGAA  
ACCATCACTTTGGATTGGTAAATTAACGTGAAGATTTCCAAAGCATACAGTAACTACCAGCCTATTAATCATCATCTGCAGGACTTTTCCTCAGGAGTACCAAAATCATCAGCGTACATG  
AGCAGCGGATATTCACACCCCTCTAATACCACTTCAATGAAATCATAGAAATCATTTATAAAATAAGAAAGGGTAGGAGAGATTAACCTCCCTGCCTCAACCCCGCCAGCAATACAAAT  
GCTTCGATAGTCCCTTACGTGGTCAAACAGATGATTCGTATTTTTCTATAAAGCCGTGAAGGGCATTTATAAATTTATTTGACACGCCCTAATGAAAAGTTTATAAAATATGAGTTTCTACAGG  
GAATCGAAGGCGCCTTAAATCAATGAAACAGCAGTACATTTTTGTCTTTTTTACGAGTTTGTAGTTTAATTAACCAGCAAAATTAAGATATTGTCTACAGTAGAATATCCGATCCGAAACCC  
GCCTGACATTCATTTAAAACATTTTCCTCCATCCACAGTTGCAATTCACAACATAGCAAACAGAAAATAAATTTGGCAGTACCAATCCATAAAAGATATTCCTCTGTAATTTACATGTTGGT  
TTCCCTTTCTTAAACAGCGAAAATTTATGATTTTGAAGAAGTGTCCGGATATTGGAACATTTGTAATCAAATAAAATAGTGAAGAATTTTCCAAAATAACATCCGGGCAATCTTTAAAGAA  
TTCCATTTGAATACGGCTGATCTCCGGAGCTTACCATTTTACGGCTGTTCACACTTGCCTTAGTTCGAAATTTGAAAAGCTTTATCTAAGGCTCATTTGAAATAAGGGAGGGCATACGAATGG  
GCGAGCCTGCACAGGAGGTTCAACAACATGATTGAAATAGTTAACCCATTTGCTCACAAGTTATTCCTGGACACCAATATATTTTCATTTTTCACAAATTTTATCAATTTCCAAAAGCCTTTCCGAT  
CCTTAACGTGTCTAAATTTATCAAAATCTTAGATGAAATCTCTTTCTTTTCTTCTGACACAGTATCTTAATCTTGATAGACTGTACATAAAGTTCCTTAATTAATAACAAATTAGTTTCTCTAT  
ATAAATTCACACAGATAAAAGTTTCTTCTTAAAGCCACACACGAAAATCAAACCATTTCTCTCAGCACTGGCATTTAAACTTATTTTCAATTTGATAGTACTCCCTAAATACGATGCCCTCTAA  
TAATATTTACAACAGATTTACACTTCTGTCTGATCATCCGGATATCTATCCGGATGTTTTGCATTAATATTTATATTTCTTAAATTTAAGGCATATAACCGATCCATTTGAGTTTGGTA  
AGATTGGAACAAATTTCTTTATGGTCTTTCCAAGTTTAAAGCAAAATCGGGAGGCTATGATCAGAAAGATTTCTGCTTCTACTTGAAGTCTTTACTAATGCTAATATACTCATGGAGCCG  
TAGCTAAATCTATAACAGATTACTCTTTGGTCTTAAAGATAAAATTTCCCTTTCCGATCACTGGAGTTTCACCAATCAATCACTATCAACTCAAAAGTCAGAACATAATCAAGAAAACCTCTCCCT  
TATTTGTAAATGAGGCATCTCCGACTTTCTTTCCGAATTTAGATTTCCGACCAAAATATCCAGATTTCTTCCAGAAATGACTTGTATTCTCAGAGATTCGATACAGTCCCAATCAAAATTA  
CCGTATACAGCTGCAGAAACATGTTACTGATTTTATCTAAATCTCTTTCCATTCGTAAATTCGTATAAAGCGGAAGTAATAAAATTTAAATCCCGACCTGAATTAACATAACAAATTTGGTTC  
TATTTTTCGAAACTGAAACCTTCGAAATTAAGTTCTTAATCCCAATTTACCCGCTATGCTTCAACTTTCCGCTCCCAAACTTTACATTTCTCAAGTTCTCAGCCAGATAACTGAAACCCGGTAAAA  
ATTTTCAAATAACAAATCTTCTTCCCAAAAGAGTTTCATAAAGTAAAAAATATCAACTTTTGTAAACTTTCGAAACTCAAAAGAGGACATTTTCTTTTATTTCTTAACTTAACTAGCTTATAGC  
CAAATTTGAACAACACTTATCATTTACCCTTTCTACTTCTGACACTCTATTTCACTATTAATTAACACTTCTCTGCTTTTTTGCACACTCTCTTACAGCCCTCTTACTCCAGCCTCAATTT  
ATAGATCGGCCATTTCTCGGGTTCCACTTTGAGTATTTAATTTCAACATATTTCTTAAAGCTCGTAAAGTCTCTCAGGAAAACAAATTTCACTTCGCCAATTTTCGAACCCATCTCTTACT  
COACACTTCAAAACCTTCTTCAAATTTCCAATAAAACCTCTCTTTTAAAGATAAAGAACTCACTTCCATCTCAATCAATCAATGGTTCCTATCAATTTCTTCTAATCTCTCATTTAGGAA  
CTCTCTTCCGCTGGCTCCTACAGAAAGATCTTTATGTAACATGTCAGCAGTACCTTTAATCTTCTAGCACTTTTAAATATATCCAGGTTACTTCTTTGATTTAAATTCGGCAGAAATAATATCTT  
GGCTATTAAGCTTTTAAACTTAGGCTTTAATAATGCCCACATTTTAACTCGAAACGCCCTCACAAGCTCTTTCACAACTTAAACATTTATCCTTCCAGCCGATTTCTCTTACACCTCTAAAA  
FCAGATTTTTCCTTACTTTATTAACCAAAATCTTCAACAATTTATTCATCGCTCTCTGATTTTATCTCTCTATTTCTTTTAAATGCTTTATTTCTACTAATAACAATCCATTTTAT  
CTACTAGTGTTTAAAGTCTTCCCTGCAGCGCAAGCCTTCGCTGAATACTTTCAACTGACGGTCAAATAATTCACCAATCTTTCTAAGCAGCAATTTCCATATCGCTCTCCCTTTGAACTTTTAT  
TTTTAATCTCTCCGGGAAATCTACTTCTCTCCCTTGGTTCGCACTATTTGATGAGTGTGATGCTGATTTGCAATTTCCCTTTCTTTTATCATATAAAATTAATGTACGTAGAATATTTATTC  
AAGTATTTTTCTATAAATTTATGATTAATTTCTCTTAAATCTAATTTAAACGAAACATTTGACATAAAGTCAAACAGCAAAATTTCAAGTAAATTTGTTAGTGTAAATTTTACGTTTGT  
TCTACGGTTATACAGTCTATACTTTTAAAGAGCCTTTGAACTTAGGACTCTGTGACGTTAGTGAACGGGCTGACGGCTGCCGCTTACGCTGTCACTGACAGATAACTTATCGGCTTATAGCG  
TCAAATCCCTCTCTAGTAAATAGTCATGCAAAACGTAACAGACATACCTGAAACTTAGCTCCAAATACGAAATTTCTACAATAATTTTAAATACTTTTCTCAAGAACGGCTCGATAGATTTCTGTAA  
AAATCACACAACTTTCAAATCACTTAAATTTCAATTTTGAACCTTTTGAACACTGATCATCGCTCAACAACATAAGCACTCAAAATAATGCGGACAGAAAGTTCACAGCACTCCAGCTTCAAGAA  
ACTCTTTAAAAACCTTTAGTTTAAAAATCTGTAATTTTAAATTAATTTCTACGAAAGAAATACAGTATATTTTGAAGAATTTATCTCTTAAATAGAGGAAACAAATGAAATATCTGTGT  
ATCTCAATAAAAACCTTTTCCCTTTCTTTTGTAAATTAGGTTAAACCGTAACATGTTTCAAAATCTCCCTGCTCATTTACATCTTCTCAACAAGAGAAAGGCCAAATTTACCTTTCTAACAACAAAT  
GACCTACAATACCATGTTTAAATAAGTGTAGAATTTGCAACATTTCCCAATTTCAATGTAAATTAAGTGAATCTTACTTAAATTAGAGAGCTTCTGCTCGAAATTTAGCAGTAAGAAATGAAAGTAT  
ATAGAAACACTAAGAATAATTTGATTTCTGTAATGGCAGGAGAAGGTCGTAGTATCTGGAAGAAGAAAGCACTCAGGAAAGAGGTCGATTAATACTAATTTGCGTATGCGTAAATCAAGTCCCT  
TCACAAGCCACTTTGCTACTTTCCGTTACAGACTAGCCTTCCCAAGTTTGTCTCTGTCTGCTGCTGCTTCTGCTGCTTCCCAAGTTTGAAGAAGAAGCAAGCTAATCTGGCTTAAGT  
TTTTTTTTTTGAAAGAAAGTGGAAAAGAGGAAAGCAAAATTTGGCCGGCTCCCTCTCAGAAAGGCCCAAGAAATTTATTTCTTTTTTTTACCCCTCGAATTTCTTTCTACTTT  
CTTTGAAAACCTTCCCCTATGAAAGAAATTTGCGAGAAATTCGCCGCCCTCCGCTGCTTTTTTTTTTTGACGGGGTTCAGACTTTTGAAGCACTTTCTGCAAGTAAAGGCAAGAGAGTGGCC  
TTTCATCAGACTTTTTTAAAAAATAATTTTTCAACAACATTAATAAACTCAAACTCTCCGGAACACTCCGCCAAATCTCTCTACGCACTTCAACAATGGGAACCTCAATTTCCCTCTGTGA  
TTATACATACGTATAAAAGAGGATACAAATAGTGGTGGGGTTTTAACGTGAACATTTATTTCTTTTTTTCTATCCCTTCCAGGCCAGGATGAGGAGTACAGAACTGATTTATAGTGCAT  
AGAGATGTAGTTGGTTGGTTAAAAATTAGTGGGGGTGCAATTTTTACGAAAGCAAGGGTTAGGGTTGCTACGGTCCCGTTTATATGATTTCAAATTAGTATTTGTAATGTAATAAAAA  
TAGAATAGAGAATAAATAATTTATTTAATAATAAAAGAACTTTGGTCTTTTGTGCAAAAGTACAGGCTAGAAATGATGCTGACGTAACAAATTTAGATCATGGCTTAACTAAAACACTGTAT  
TTGGCGGATAATCTACAGCAGTACTTTCCCTAAGTCTGTAACTGGAAGTTCGCCCTCTATCACTACTGAAATTTATTTCCGGAACCTTGGAGGTTTATCTAAAAAGAAATTTGGTATCAATAATA  
TGATAATAATTTACAATAGTATAAAATAGAAGAAACGTCATTAAGCAACCCGAAACTTTACTAAAAGCAATGCTTTCTGCAAAAAGTTTCAAATTAAGTGTAGAGGCTCTAAATTTCTAAAT  
AGGCCCTTTCCGGTTTCCGACTTTGAACCGTGGATACGCCAGAAATTTACTTGAAGAAATTTTATTTATTTAGATGTGTTACTGATTTCCGATGAAATGCAATGGAATTTACCAAAAGAAAGAGATGAAG  
TGATGCCATTTTTTTTTGGGGGTTTTACGTCCTAATTTACAAATTTAGTGTGTGGTACGAAAGGGTATGAGCAACATAAATGTTTAAATGTAACCATAAAAATTTCCAAAGGCTTAACTGGGAATC  
GATTCCGCGCAACAATACAGTCGAGCTCCCAATAAAGAACACTTCTCAATAGCAGCACTCTTCTTACCGCAGTTTTTGAAATTTCCCGGTTTTACCCCTAAACACTTTCTGTATAAAGAACTCCG  
CTAAGCCGACCTCTTCATAGCCAGCCGGGACATTTGATTTGGGGAAACGGATTTATTTCCACTTCCCAACAGCAGCCCTTATTTAATAAAGTTCGTTGACCGGCTGATCAAAATTAATTTCCCT  
TCTCAAGTTTTATTTTTTTCTGGTTTTCCCTAAGTTTTCTATATCAGCTCCATACATCTGGTACCAATTTTAAACATTTTTCAATATAACTTTGACGACAAATAATTTATTTTTCCGATACAACT  
AAGTGGTTAACTCTAGAAAGAAATAAATGTTGGAAGATTTTGCAAAACCAAAATCCGGAATAATAAAGAAATTTGATGATCATATAGCTAAATTAATTTGCAAAATTTTACGTTTAAAT  
TATTAATCTCGTAAATAACAATTTTTAATAGATGTTTGAAGAAACCCATTTTTTCTATTAAGAACTGCCCTACTCTCTTCTAAGCAGCACCCTCAAAGCCGCACTTTCTTCCGCCCA  
GTGCTCCGTTATTGAGAGTTTCGACAGTACATTTAATTTTTGCGAGCCCTGCATGTAACCTGCGGAAAATTTGCAGTGGCGTTTTGAGTTGTAAGTGCATTTAGTAACTTTGATATACTGTTATCT  
AATAATTTCAATTAATTTAATTAATAAATTTTCAATAAAGTTCAAATTAATTTAATTTCAATAATTTATATCTTACAAATTTGACTGTTTTTTGTCAAAAGGCAACATTTCCGCCCTCATCATGTT  
TTCTGCGATTTTCCAATTTAAAGGTTCAAGAAATTTGATTTATAGATTTATATAAATAATCTAAGATTTTTAAAGCACTAAAAATGGAGCAACCAATCTGATTTTTAATAAGGACTGGATTTTTG  
TTGTAATTTGAAAGTTTGGTGTATCACCAGATAAAGTCGTTAGTCCAGATTCGATTACAGAAAGATGTTGTAATAGATATTAGTTTGGTTCATTTTGTGGTTCATTTGCTGCTCTGTTAGTGA  
TAGTATTAATTTGTCGAAGTTTTAGTCTGCTTTTTTTGTGTAGTGTAGTAAAGCTTATGTAGATATGAAACTTTTAGTTGGGATGAACTCCCAAGCTTGAATCCCAAGCTGCTTGAAGTAACTAACT  
CCAGAACGAAAATAATTTAGCAGGAGCAGATCTTTAAGTTTCCAGGAAATTTGCAAAACCAAAATCCGGAATAATAAAGAAATTTGATGATCATATAGCTAAATTAATTTGCAAAATTTTACGTTT  
ATTACATCTTATAGAGATGAAATCTGCAAACTAGGTAATCTAGGAAGTTAAGAAACAGCCGCTTAAACCAATAACTTTGAGGAAAATTTACCTTGAAGGAAAATTTAGCCGAGTAACTAAGTCCCT  
CGCCGTAATCTTACCTCTGCTGCCACTAATCTATCAGCTATTTGTCAGCAGTATTTCTGAATCTTATCGAAAAGTTAAGACATTTTTCTTAAAGCACTGTTGAAAACAACAATTTTACT  
GCATTTACTAAGATCCGCGCTAAATTTCCGGATTTCCGTTAATAATATTTGCTTTTGAAGCTGAATTTCCGAAAATTTAAATATTTAAATTTTCAAGGAAGTATTTAAATCCGGGTAGATTT  
CAGATCTGATGAAAGTTGTTCAAATTTAGAAATGGATTTTTTTGTTTGAAGTAAACTAAGAGGGAATTTAAATGGGCATTTACGAACTGACTTCATCCAGGATACAGTGGCCAGGTT  
CTGTGTGATTTGTTGTTGTTCTGTGACGGCTGTGTTGGGAGGCCGTGCTGTGACACCCTGCTGTGCGGTTGGTGGCGGGCGCTGAGGAGCGCCGCTGCTGTGATCATGATGTTGCTGGTT  
TGGCGCGGAGGCTGCGGATTTGCGGCTTCTGAGCGGTGTTTGGTGGCGCGGATATGCTGCTGGTGGCCCGGATGGCCGAGGATGGTGCATCATCTCCATTTCCGCGGACTTTACAGCC  
GCCAATGCCATTTGCCAGCCGCTTCCGATTTTCGACGAAGCATAGACTACGGGTGTTTGGTGCCACTTCCGTTGGTTCATATGACACCTTCCGCGCCAGCCCGCCCTCCGCGCATGGAGCCCTGGCA  
ATCGGCTCCGATGCTCAATTTTTTGGTGTAAACCGCCGAAATATCCCTTATCAATAAGTGGAAACTTGGGATGGCATACTTTGAGGTGTGTCAGCGCTTGTGAGGTTGTCAGCGCTCACTAGTGATG

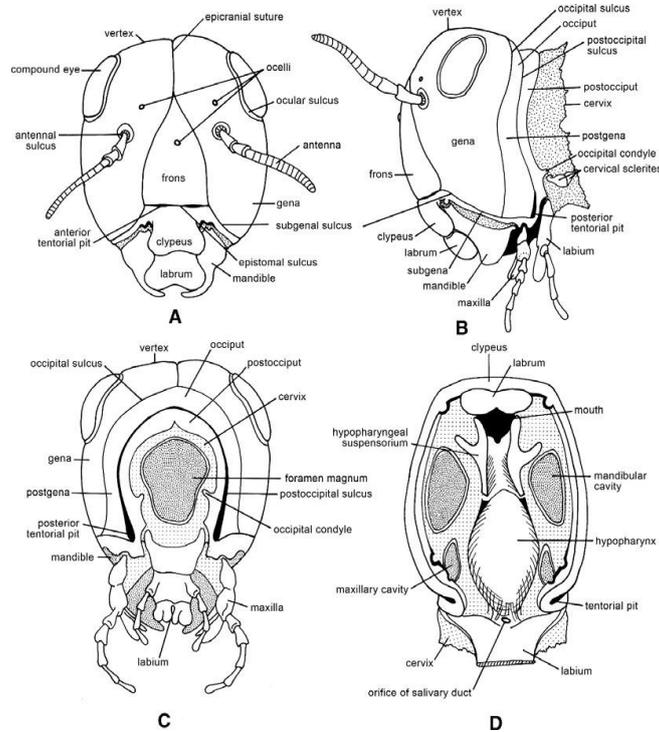




**Referencias:**  
**Verde: A**  
**Rojo: T**  
**Negro: G**  
**Azul: C**

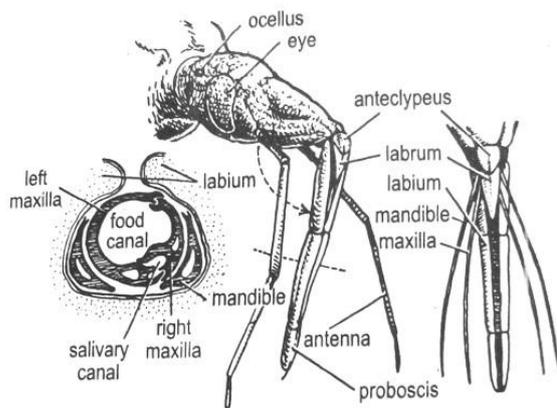
## ANEXO VII: Estructuras cefálicas

### Aparato masticador generalizado



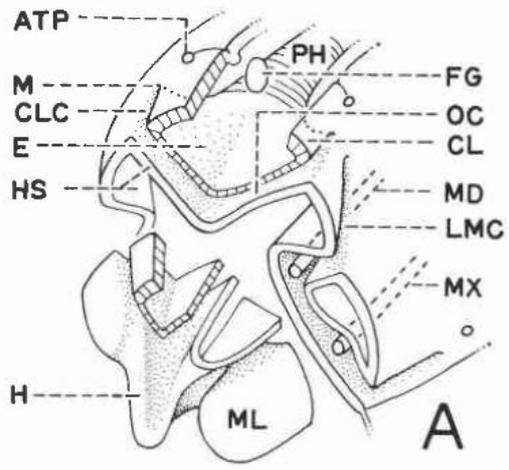
(Snodgrass, 1935)

### Haustelo de un redúvido y corte transversal de la cabeza de un hemíptero generalizado



*Triatoma protracta* (Hemiptera, Reduviidae)

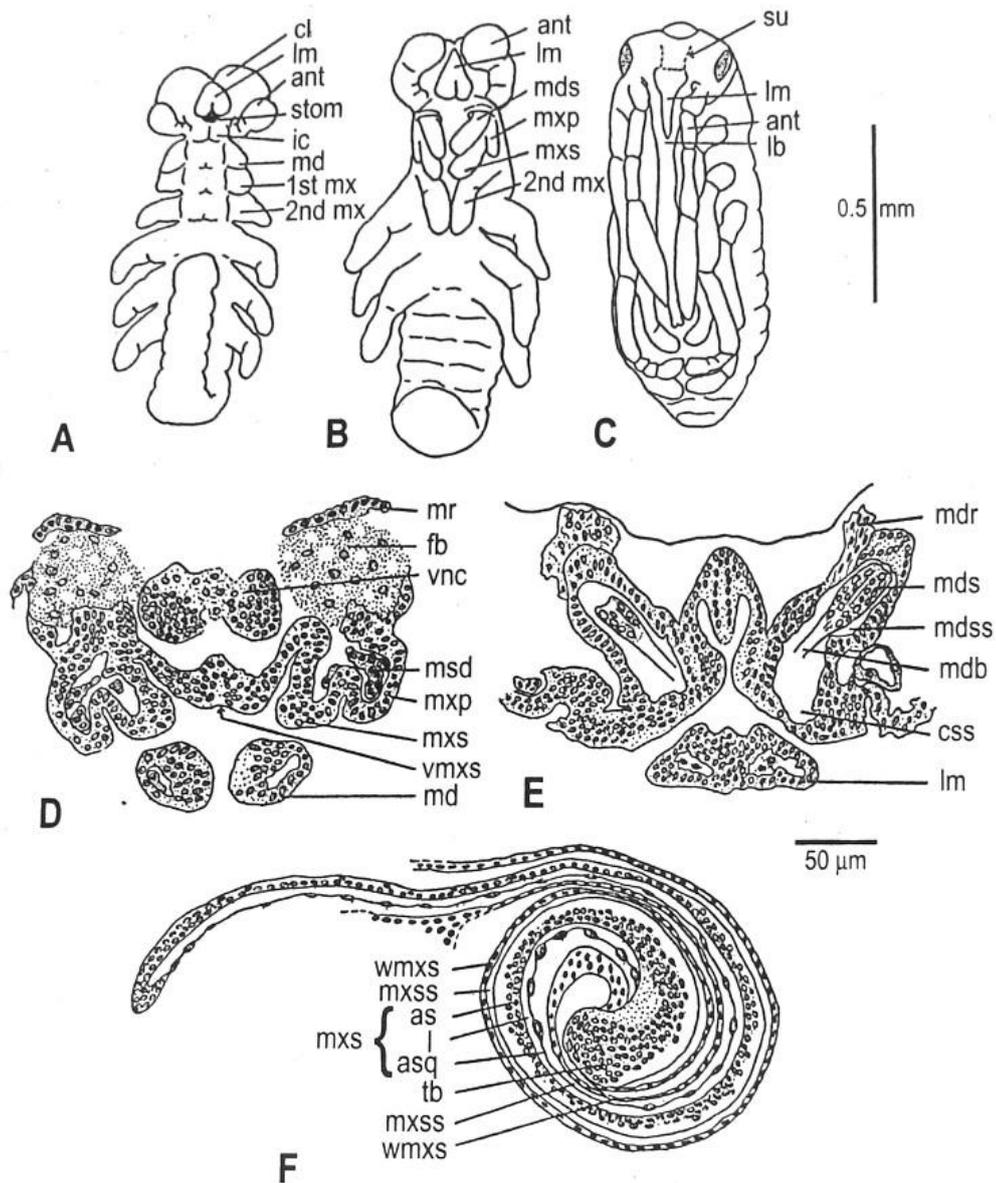
(Heming, 2003)



Mandíbulas (MD) y maxilas (MX) internalizadas en la estructura cefálica

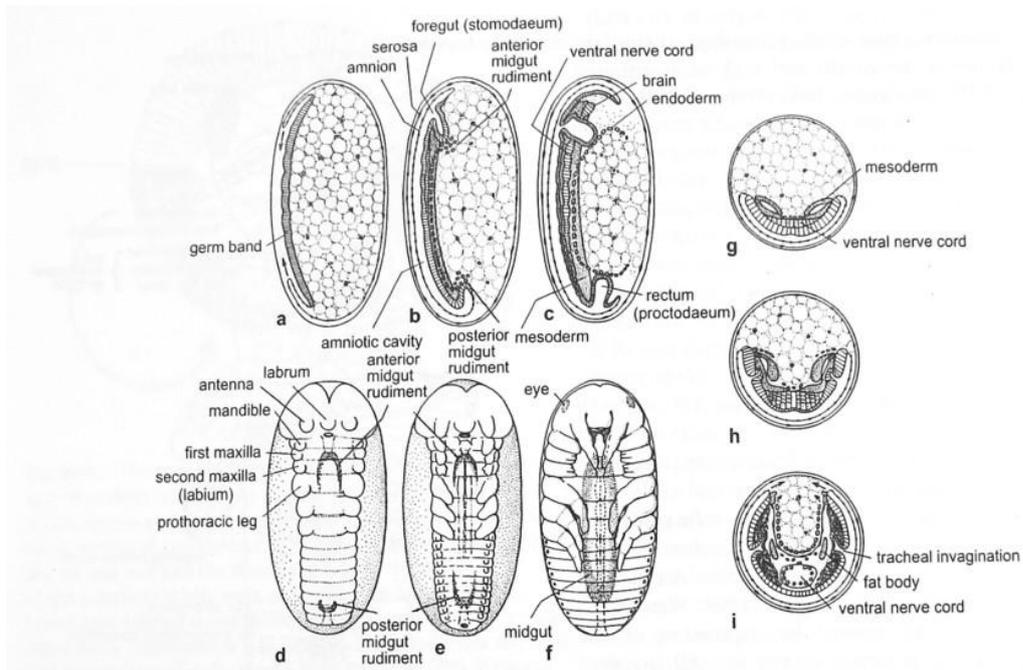
(Parsons, 1974)

## Internalización de estiletos durante el desarrollo



Embriogénesis de las partes bucales de *O. fasciatus*. Aspecto ventral de un embrión al 47% de la embriogénesis (A), 53% (B) y 100% (C). Sección transversa del segmento maxilar de un embrión al 50% (D) de la embriogénesis y al 83% (E). F. Sección sagital de un estilete maxilar al 73% de la embriogénesis, mostrando el enrollamiento dentro de la cabeza. (Heming, 2003)

## Formación del endodermo



Desarrollo de las envolturas embrionarias, intestino, sistema nervioso central y cavidad corporal de un insecto no especializado en cortes sagitales (**a-c**), vistas ventrales (**d-f**) y cortes transversales (**g-i**). (Heming, 2003)