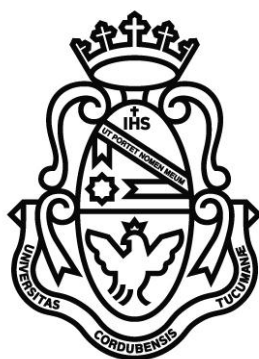


**Tesis para optar al Título de Doctor en Ciencias Químicas**

**ATRESIA FOLICULAR EN LOS VECTORES DE LA  
ENFERMEDAD DE CHAGAS: REGULACIÓN E IMPACTO EN  
LA FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN**



**Bioq. Jimena Leyria**

**Directora de Tesis: Dra. Lilián E. Canavoso**

Departamento de Bioquímica Clínica

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET)

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Córdoba, Argentina, Abril de 2015

---

Directora de tesis:

**Dra. Lilián Canavoso**

Comisión de tesis:

**Dr. Carlos A. Arce**

**Dr. Fabio M. Cerbán**

**Dr. Daniel A. Wunderlin**

Evaluador externo:

**Dra. M. Patricia Juárez**

---

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica Clínica, Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET), de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, con el apoyo de las Becas otorgadas por el Fondo Nacional para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT, Beca de iniciación científica) y por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Beca Interna de Posgrado II).

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo de subsidios otorgados por la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC), CONICET, FONCyT y por la Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior y la Secretaría de Políticas Universitarias (CAPES-SPU, Brasil-Argentina).



*A mis padres, Silvana y Héctor*



## ***AGRADECIMIENTOS***



Dicen que las oportunidades más importantes que pueden cambiar la vida de la gente surgen de la combinación exacta de estar precisa y simultáneamente en un determinado tiempo, lugar y con las personas indicadas. Ninguna otra situación es más explicativa que ésta para describir los últimos años vividos. Este espacio está dedicado a todos aquellos que transitaron conmigo este camino, con mayor o menor intensidad.

A Lilián, gracias por acompañarme y guiarme para finalmente transitar con firmeza el camino de la superación. Siempre te has preocupado y ocupado por el bienestar del grupo y así me lo has hecho sentir. Me diste afecto, confianza y un montón de conocimientos y experiencias (las académicas y todas aquellas otras que nos hacen ser lo que somos). Tengo en mi alma una hermosa foto del “lab 114”. Gracias Lilián.

Al Dr. Rubiolo, la persona que me abrió por primera vez las puertas de un laboratorio de investigación y quien siguió esta tesis muy de cerca, volviéndola más rica con sus consejos y experiencias. Gracias por la confianza Doctor.

A la evaluadora externa, Dra. Patricia M. Juárez y a los miembros del tribunal de tesis por la colaboración y la buena predisposición durante el desarrollo de este trabajo, Dr. Fabio M. Cerbán, Dr. Daniel A. Wunderlin y Dr. Carlos A. Arce.

A todo el Departamento de Bioquímica Clínica, por la ayuda y la asistencia de muchos y a otros por el “feedback” de experiencias, algunas considerablemente geniales y otras no tanto, pero que siempre me han hecho sentir acompañada y contenida, especialmente al “lab 120” y a Ceci Sánchez, por el afecto y el buen humor de todos los días.

A todo el personal técnico y administrativo del Departamento, en especial a Don Navarro, Fabri y Dieguito, por facilitarme siempre que han podido el trabajo en el bioterio; Adri, por asistirme y ayudarme a resolver el “papelero” de todos estos años, siempre tan clara y eficiente; a Laurita, por el cariño y las charlas compartidas; a Carlos Mas, Pilar Crespo y Cecilia Sampedro, por toda la asistencia brindada en los microscopios; a Betina, por hacer lo posible para que el final de este trabajo se desarrolle en tiempo y forma.

Al laboratorio de LAPROTOX, en especial a Celia, gracias por hacerme sentir siempre como en casa.

A Raúl Stariolo y toda la gente de Santa María de Punilla por el mantenimiento y la provisión de insectos.

A Beatriz Settembrini, una gran amiga del laboratorio, porque desinteresadamente siempre le ha brindado al grupo valiosos aportes y contribuciones.

A mi queridísimo “lab 116”, desde las más grandes hasta los más pequeños, los que están y los que ya se fueron, siempre me han hecho sentir parte de ustedes, en lo

---

académico y en lo “no académico”, gracias por la infinita compañía durante todos estos años, sin los “after lab”, todo habría sido más complicado.

A Vachu, por todo lo “especial” que es para mí, sobre todo por su inmensa sinceridad, una amiga del alma.

A mis compañeros más viejos, Silvi y Leo, estaré eternamente agradecida a ellos... todos sus consejos, enseñanzas, experiencias, críticas y estímulos han construido parte de mí. Esta relación traspasó los límites académicos, hace mucho tiempo que me conquistaron. Gracias por estar siempre!

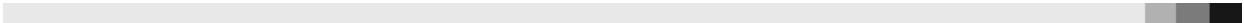
A mi compañerita más joven, Flor, por todo el apoyo en este último tiempo, por generar un lindo ambiente de trabajo y por darme la oportunidad de enseñarle lo que sé. Gracias por la confianza.

A Majo, Luli, Nati y Jor, mis bioquímicas del corazón, a Gracho y mi “concu” Leo, gente linda que siempre ha estado revoloteándome cerca, compartiendo logros y desdichas, con mucho amor y buen humor. A mi “Curie” del alma, una mujer de la que aprendí mucho de química y de la vida, gracias por darme tanto amiga.

A mis hermanas de la vida, Rebe, Gaby, Maru y Vani, que aun estando tan lejos de todo esto, jamás me soltaron la mano, entendieron los tiempos (a veces extensos) del desarrollo de mi tesis, sin reclamar por mis ausencias, cuidándome y conteniéndome. Gracias por lo de ayer, lo de hoy y lo que vendrá, inmensamente dichosa de haberlas conocido.

A toda mi querida familia, en especial a mi abuela, mi ejemplo a seguir y quien fue una parte importante de toda esta historia cuando comencé con mi carrera; a mis hermanos de sangre y corazón, Gise, Maxi y Pablo, por llevarme y traerme, por alimentarme, por cuidarme, por aguantarme y por quererme, especialmente a mi hermana por haberme dado a Mai, una luz de mi vida; a mis padres... no me alcanzan las palabras para expresar mi orgullo de ser parte de ustedes, no sería lo que soy si no fuese por el amor y los valores que me dieron, me enseñaron a provocar a la vida con la finalidad de superarme cada vez un poco más, y personalmente creo que dio un resultado excelente: soy feliz. Eternamente agradecida a toda mi familia!

Por último, y en realidad lo dejo al último porque fue uno de los más recientes hallazgos de mi doctorado, a David... no sé lo que me depara la vida, pero estoy segura de que todo lo que he vivido hasta ahora, cada momento y cada detalle, todo valió la pena por el solo hecho de haberte cruzado en el camino. Estoy completa al lado tuyo. Gracias por llenar de más vida mi vida. Te amo.



***ÍNDICE***



Abreviaturas.....	I
Resumen.....	IV
Summary.....	VII
<i>Capítulo 1. <b>INTRODUCCIÓN</b></i> .....	1
<b>1.1. Enfermedad de Chagas</b> .....	2
Aspectos generales de la enfermedad.....	2
Triatomíneos: vectores de la enfermedad de Chagas.....	4
<b>1.2. El ovario de los triatomíneos: características morfológicas y fases del ciclo reproductivo</b> .....	6
Morfología del tejido ovárico.....	6
El ciclo reproductivo y su relación con el estado nutricional.....	8
<b>1.3. El cuerpo graso y su participación en el proceso de la reproducción</b> .....	10
<b>1.4. Vitelogénesis en insectos</b> .....	11
Regulación de la vitelogénesis.....	13
<b>1.4.1. Proteínas precursoras del vitelo</b> .....	15
Vitelogenina.....	15
Hidrolasas ácidas.....	17
Catepsina D.....	18
Fosfatasas ácidas.....	19
Captación de las proteínas precursoras del vitelo por los ovocitos.....	20
Utilización de las proteínas del vitelo.....	23
<b>1.4.2. Depósito de lípidos en ovocitos en desarrollo</b> .....	23

Lipoforina.....	24
1.5. Atresia folicular.....	24
Atresia folicular en insectos.....	25
<b>Capítulo 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>Capítulo 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1. Insumos de laboratorio.....	31
3.2. Insectos.....	31
3.3. Obtención de hemolinfa, cuerpo graso y tejido ovárico.....	33
3.4. Obtención de criosecciones de tejido ovárico para estudios histo-morfológicos, histoquímicos y de inmunofluorescencia.....	34
3.5. Purificación de lipoforina, vitelina y vitelogenina.....	34
3.6. Conjugación de vitelina y lipoforina con trazadores fluorescen.....	35
3.7. Obtención de anticuerpos anti-vitelina y anti-lipoforina.....	36
3.8. Conjugación de anti-vitelina y anti-lipoforina con FITC.....	36
3.9. Obtención de ARN total.....	37
3.10. Obtención de ADNc: Transcripción reversa.....	38
3.11. Cuantificación de proteínas, carbohidratos y lípidos.....	38
3.12. Distribución de los depósitos lípidicos en tejido ovárico.....	39
3.13. Estudios <i>in vivo</i> con trazadores fluorescentes.....	39
3.14. Estudios de inmunofluorescencia directa.....	40
3.15. Proteólisis <i>in vivo</i> de vitelina durante el proceso de atresia folicular.....	40
3.16. Actividad de peptidasas ácidas en tejido ovárico.....	41
3.17. Actividad de catepsina D en cuerpo graso, hemolinfa y tejido ovárico.....	41

3.18.	Análisis de los productos de clivaje del sustrato para catepsina D mediante espectrometría de masas (LC-MS).....	42
3.19.	Actividad de fosfatasa ácida en tejido ovárico.....	42
3.20.	Expresión del ARNm de catepsina D en cuerpo graso y tejido ovárico: reacción en cadena de la polimerasa convencional y en tiempo real.....	44
3.21.	Expresión de catepsina D en cuerpo graso, hemolinfa y tejido ovárico: ensayos de western blot.....	45
3.22.	Estudios de inmunofluorescencia para localización de catepsina D y tirosina fosfatasa en tejido ovárico.....	46
	Estudios de co-localización y ensayos de FRET.....	47
3.23.	Catepsina D y fosfatasa ácida en la proteólisis <i>in vitro</i> de vitelina.....	48
3.24.	Análisis estadísticos.....	48
	<b>Capítulo 4. RESULTADOS</b> .....	50
4.1.	<b>Parte I:</b> Reservas nutricionales del tejido ovárico y dinámica de adquisición de por los ovocitos durante el ciclo reproductivo de <i>D. maxima</i> .....	51
4.1.1.	Estudios histo-morfológicos del tejido ovárico.....	52
4.1.2.	Modificaciones de las reservas nutricionales del tejido ovárico y su relación con los cambios morfológicos del aparato reproductor.....	54
4.1.3.	Composición y distribución de las reservas lipídicas en tejido ovárico.....	55
4.1.4.	Rol de lipoforina en la formación de las reservas lipídicas del tejido ovárico.....	59
	Lipoforina en la fase vitelogénica.....	59
	Lipoforina y su rol en la dinámica de las reservas lipídicas durante las fases del ciclo reproductivo de <i>D. maxima</i> .....	62

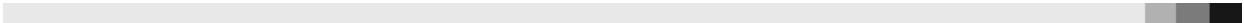
<b>4.2. Parte II: Participación de las hidrolasas ácidas en el proceso de atresia folicular</b>	
de <i>D. maxima</i> .....	65
<b>4.2.1.</b> Proteólisis <i>in vivo</i> de vitelina en las fases de atresia folicular.....	66
<b>4.2.2.</b> Actividad de peptidasas ácidas y catepsina D en el tejido ovárico de <i>D. máxima</i> en las distintas fases reproductivas.....	67
Actividad de peptidasas ácidas.....	67
Caracterización parcial de catepsinas en el tejido ovárico.....	69
<b>4.2.3.</b> Catepsina D en cuerpo graso, tejido ovárico y hemolinfa en las distintas fases reproductivas de <i>D. maxima</i> .....	73
Expresión génica y actividad en el cuerpo graso y en el tejido ovárico.....	73
Catepsina D en la hemolinfa.....	77
<b>4.2.4.</b> Actividad de fosfatasa ácida en el tejido ovárico de <i>D. maxima</i> .....	78
Actividad específica de tirosina fosfatasa y serina/treonina fosfatasa en la atresia folicular.....	80
<b>4.2.5.</b> Localización de catepsina D y tirosina fosfatasa en el tejido ovárico.....	82
Co-localización e interacción de catepsina D y tirosina fosfatasa con vitelina en los gránulos de vitelo.....	84
<b>4.2.6.</b> Participación de catepsina D y fosfatasa ácida en la proteólisis <i>in vitro</i> de vitelina.....	88
 <i>Capítulo 5. DISCUSIÓN</i> .....	90
 <i>Capítulo 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</i> .....	102
<b>REFERENCIAS</b> .....	108
<b>ANEXO</b> .....	126



***ABREVIATURAS***

<b>20-HE</b>	20-hidroxi-ecdisona
<b>β-ATPasa</b>	Subunidad beta del complejo ATP sintetasa
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>anti-Vt</b>	Anticuerpo anti-vitelina
<b>anti-Lp</b>	Anticuerpo anti-lipoforina
<b>apoLp-I</b>	Apolipoforina-I
<b>apoLp-II</b>	Apolipoforina-II
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>AS</b>	“Primer” Antisentido
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>Bodipy-FA</b>	4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-ácido-hexadecanoico
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CA</b>	Córpora allata
<b>Cat D</b>	Catepsina D
<b>DEAE-Trisacryl M</b>	Dietilaminoetil-Trisacryl M
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DIC</b>	Microscopía de contraste de interferencia diferencial
<b>Dil</b>	1,1'-Dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>dNTPs</b>	Deoxinucleótidos trifosfatos
<b>ECL</b>	Enhanced Chemiluminescence (Quimioluminiscencia)
<b>ER</b>	Retículo endoplásmico
<b>EDAC</b>	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocloreuro
<b>EDTA</b>	Ácido etiléndiaminotetracético
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FRET</b>	Transferencia de energía mediante resonancia de fluorescência
<b>Golgi</b>	Aparato de Golgi
<b>HJ</b>	Hormona juvenil
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta performance
<b>ESI-QTOF</b>	Ionización por Electrospray - Cuadrupolo Tiempo de Vuelo
<b>LC-MS</b>	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>Lp</b>	Lipoforina
<b>LRP</b>	Proteína relacionada al receptor de la lipoproteína de baja densidad
<b>Met</b>	Proteína Metopreno-tolerante
<b>MCA</b>	Methyl-coumaryl-7-amide
<b>MCF7</b>	Michigan Cancer Foundation-7

<b>M-MLV-RT</b>	Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney
<b>OG</b>	Oregon Green 514 ácido carboxílico
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PMSF</b>	Fenilmetilsulfonilfluoruro
<b>pNP</b>	<i>p</i> -nitrofenol
<b>pNPP</b>	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
<b>PPVs</b>	Proteínas precursoras del vitelo
<b>Pro-cat D</b>	Pro-catepsina D
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
<b>RVg</b>	Receptor de vitelogenina
<b>RLp</b>	Receptor de lipoforina
<b>RLDL</b>	Receptor de la lipoproteína de baja densidad
<b>RT</b>	Transcripción reversa
<b>S</b>	“Primer” Sentido
<b>SBTI</b>	Inhibidor de tripsina de soja
<b>SDS</b>	Duodecil sulfato de sodio
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>Taq ADN</b>	ADN polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
<b>TAG</b>	Triacilglicerol
<b>TCA</b>	Tricloroacético
<b>TiFA</b>	Tirosina fosfatasa
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa delgada
<b>TBS</b>	Buffer Tris salino
<b>TLCK</b>	N- $\alpha$ -p-tosil-1-lisina clorometil cetona
<b>VCB</b>	Catepsina B vitelogénica
<b>VCP</b>	Carboxipeptidasa vitelogénica
<b>Vg</b>	Vitelogenina
<b>Vt</b>	Vitelina



***RESUMEN***



---

En este trabajo se abordaron aspectos relacionados con la fisiología de la reproducción de los insectos vectores de la enfermedad de Chagas (Hemiptera: Reduviidae), focalizando en el proceso de atresia folicular inducida por privación de la ingesta de sangre en la post-vitelogénesis. Empleando como modelo hembras del vector *Dipetalogaster maxima*, se analizaron los cambios en las reservas nutricionales del tejido ovárico en las fases del ciclo reproductivo y la dinámica de adquisición de lípidos por los ovocitos. El estudio también estuvo dirigido a establecer la relevancia de las hidrolasas ácidas, catepsina D y fosfatasa ácida, en la fase de atresia folicular y su participación en la degradación de las proteínas del vitelo.

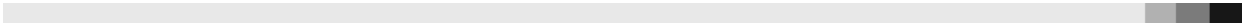
Se demostraron cambios en las reservas nutricionales del tejido ovárico que correlacionaron con los estudios histo-morfológicos del tejido durante el ciclo reproductivo. Promovida por la ingesta de sangre, la fase vitelogénica se caracterizó por el notable desarrollo asincrónico de las ovariolas, el crecimiento de los ovocitos terminales y el aumento significativo de las reservas nutricionales en el tejido ovárico. En tanto, en la fase post-vitelogénica, las ovariolas pequeñas y con folículos atrésicos mostraron escasos niveles de proteínas, lípidos y glucógeno. Los triacilglicerolés representaron la principal forma de depósito de lípidos en el tejido ovárico en las diferentes fases de la reproducción. Sin embargo, se observó un aumento en el contenido de ácidos grasos en las fases de atresia temprana y tardía, probablemente resultado de eventos de lipólisis. En las secciones de tejido ovárico, la coloración con Oil Red O mostró cambios notorios en el tamaño y distribución de los adiposomas en las diferentes fases de la reproducción. Mediante estudios de microscopía láser confocalizada *in vivo* co-inyectando trazadores fluorescentes, demostramos que en la vitelogénesis, los ovocitos reclutan sus reservas lipídicas mediante un proceso de transferencia a nivel de la membrana plasmática mediado por la lipoforina, la principal lipoproteína de insectos, y por la endocitosis de la partícula. Por el contrario, en la fase de atresia, la transferencia de lípidos a los ovocitos no sólo fue menos significativa en comparación con la vitelogenesis sino que además, tuvo lugar sólo mediante un mecanismo clásico a nivel de la membrana celular, sin internalización de la lipoproteína. La convergencia de una vía endocítica y otra no endocítica para la lipoforina en la vitelogénesis permitiría maximizar el depósito de reservas lipídicas en los ovocitos en un período breve a los fines de sustentar exitosamente la embriogénesis.

En relación al rol de las hidrolasas ácidas en la atresia folicular, se observó la proteólisis temprana de vitelina en el tejido ovárico y el aumento de la actividad de peptidasas ácidas y

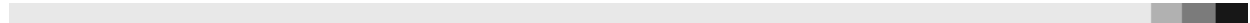
fosfatasa ácida, particularmente de una tirosina fosfatasa. La caracterización de la actividad enzimática con sustratos específicos e inhibidores y el análisis por espectrometría de masas de los productos de digestión del sustrato confirmaron que la actividad de peptidasas símil-catepsina en el tejido ovárico atrésico corresponde a una catepsina D. Mediante RT-qPCR y western blot se demostró que catepsina D se expresa en cuerpo graso y tejido ovárico de hembras en todas las fases del ciclo reproductivo, con un perfil compatible al de una proteína precursora del vitelo. Los ensayos *in vitro* empleando vitelina purificada, homogenatos de tejido ovárico en atresia e inhibidores específicos de hidrolasas ácidas evidenciaron por primera vez en un insecto que en las condiciones de ensayo, la degradación de vitelina es dependiente del pH y que tanto catepsina D como una fosfatasa ácida, de la familia de las tirosinas fosfatasas, son necesarias para promover la proteólisis de vitelina. En las hembras vitelogénicas de *D. maxima*, catepsina D y una tirosina fosfatasa fueron detectadas en la periferia de los gránulos de vitelo, co-localizando parcialmente con vitelina, sugiriendo cierta segregación para limitar su acción sobre vitelina en esta fase reproductiva. Sin embargo, en la atresia folicular temprana, se observó la desorganización de los gránulos de vitelo y un cambio en el patrón de distribución celular de ambas enzimas. La interacción vitelina/catepsina D y vitelina/tirosina fosfatasa en los gránulos de vitelo maduros fue demostrada por análisis de FRET.

Analizados en conjunto, los resultados indicaron que en la fase de atresia folicular de *D. maxima*, los eventos bioquímicos y celulares convergen de manera compleja. En una etapa temprana de esta fase degenerativa, la disminución de las reservas nutricionales del ovario, la activación de hidrolasas ácidas y la proteólisis de vitelina en este tejido facilitarían el mantenimiento de folículos jóvenes y un segundo ciclo gonadotrófico si la hembra accede a una ingesta de sangre. En un estadio avanzado de la atresia, aún si las condiciones nutricionales desfavorables revierten, estos eventos propiciarían condiciones metabólicas que privilegiarían la sobrevivencia de la hembra.

**Palabras claves:** triatomino; enfermedad de Chagas; vitelogénesis; atresia folicular; hidrolasas ácidas, vitelogenina; vitelina; lipoforina; lípidos.



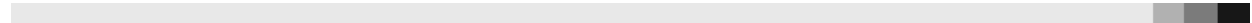
***SUMMARY***



In this study, the experimental approaches were directed to improve our understanding of the reproductive biology of the hematophagous vectors of Chagas' disease, focusing in the process of follicular atresia induced by depriving females of blood meal during post-vitellogenesis. Using anautogenous females of *Dipetalogaster maxima* as a model, we first analyzed the changes of the ovarian nutritional resources at representative days of the reproductive cycle and the dynamics of lipid storage in the oocytes. Secondly, we have addressed the role of cathepsin D and acid phosphatase in yolk protein degradation during follicular atresia.

Results showed that the morphological changes of the ovarian tissue throughout the reproductive cycle were in agreement with the dynamics of nutritional stores in the tissue. Thus, at pre-vitellogenesis, the scarcely developed ovaries contained small amounts of nutritional resources. After females ingested the first blood meal,  $\alpha$  oocytes became vitellogenic and enlarged due to yolk accumulation. At vitellogenesis, lipids, proteins, and glycogen in ovarian tissue increased significantly compared to pre-vitellogenesis and then, decreased during follicular atresia. Triacylglycerol represented the main lipid class stored in ovaries at all reproductive stages. However, an increase in the content of free fatty acid was observed at early and late atresia, probably due to lipolytic events in the tissue. In addition, specific lipid staining of ovarian tissue sections with Oil Red O evidenced remarkable changes in the size and distribution of lipid droplets at different stages of the reproductive cycle. The involvement of lipophorin, the main insect lipoprotein, in lipid delivery to oocytes was investigated in vivo by co-injecting fluorescent probes to follow the fate of the entire particle as well as its lipid cargo. Examination by confocal laser scanning microscopy showed that vitellogenic oocytes recruit their lipid stores by endocytosis of lipophorin and by the classic extracellular lipophorin-shuttle mechanism. Conversely, in atretic stages, lipid transfer to oocytes not only occurred to a lesser extent than vitellogenesis but also, it was accomplished without lipoprotein endocytosis. The convergence of endocytic and non-endocytic lipophorin pathways at vitellogenesis would maximize the storage of lipid resources in developing oocytes, which must take place in few days to successfully support embryogenesis.

In *D. maxima*, deprivation of blood meals during post-vitellogenesis led to degeneration of terminal follicles towards an atretic stage and oocyte resorption. In this species, we showed that follicular atresia encompasses proteolysis of the main yolk protein, vitellin. It was also demonstrated that at atretic stages, ovaries displayed the highest levels of acid peptidases and acid phosphatase activity, mainly a tyrosine phosphatase. A further enzyme characterization and mass spectrometry



analysis of the digestion products of the substrate confirmed that the cathepsin-like peptidase activity in atretic ovaries corresponded to a cathepsin D. At transcriptional and translational levels, fat body and ovaries expressed cathepsin D at all stages of the reproductive cycle, although ovarian transcripts were upregulated in vitellogenesis, resembling a yolk protein precursor. *In vitro* assays using homogenates of atretic ovaries as the enzyme source and enzyme inhibitors demonstrated that vitellin degradation was pH-dependent. Moreover, results showed that, at least under our *in vitro* conditions, cathepsin D and an acid phosphatase, most likely a tyrosine phosphatase, were required to promote vitellin proteolysis. In vitellogenic females of *D. maxima*, tyrosine phosphatase and cathepsin D were found associated to yolk bodies, partially co-localizing with vitellin, suggesting some compartmentalization to limit vitellin proteolysis during oogenesis. However, at early atresia, both enzymes changed their distribution pattern, along with the loss of organized yolk bodies. The interaction among cathepsin D/vitellin and tyrosine phosphatase/vitellin in mature yolk bodies was supported by FRET analysis.

Taken together, the results showed that during follicular atresia in *D. maxima*, biochemical and cellular events converge in a complex way. Thus, the decrease of ovarian nutritional resources, activation of acid hydrolases and vitellin proteolysis may be of physiological relevance in early atresia sustaining young oocytes and facilitating another oviposition cycle if females have access to a blood source. In an advanced stage of follicular degeneration however, even if the nutritional condition is reverted, ovaries are less competent to accomplish a new oviposition cycle and therefore, biochemical and cellular events may act in concert to establish metabolic conditions to privilege female lifespan.

**Key words:** Chagas' disease vectors; vitellogenesis; follicular atresia; acid hydrolases; vitellogenin; vitellin; lipophorin; lipids.

---

## *Capítulo 1. INTRODUCCIÓN*

## 1.1. Enfermedad de chagas

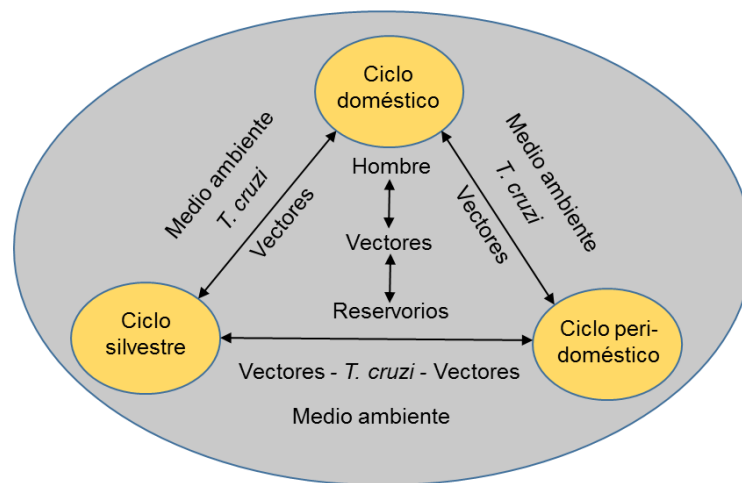
### Aspectos generales de la enfermedad

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es una parasitosis endémica en Latinoamérica, cuyo agente causal es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. El parásito desarrolla un complejo ciclo de vida en el vector invertebrado, insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae (triatominos o vinchucas) y en el huésped mamífero, incluido el hombre<sup>1</sup>.

La enfermedad de Chagas afecta principalmente a las poblaciones rurales y suburbanas de Argentina y Latinoamérica, donde los escasos recursos económicos de estos asentamientos confluyen en conductas socio-culturales que propician el establecimiento y expansión de esta parasitosis<sup>2</sup>. Sin embargo, también contribuyen a la propagación de la enfermedad la migración de portadores desde zonas endémicas a zonas no endémicas donde en ausencia de vectores naturales, otras vías de adquisición del parásito, como las transfusiones de sangre no controladas y la transmisión vertical del parásito de madre a hijo, cobran relevancia<sup>3,4</sup>. Según las estadísticas recientes, entre 7-8 millones de personas en el mundo padecen esta enfermedad, y se estima que más de 15.000 personas mueren al año a causa de esta afección. En tanto, 50 a 70 millones de individuos se encuentran en situación de riesgo de adquirir la infección<sup>5</sup>. En la Argentina, los últimos relevamientos epidemiológicos indican que de 1.600.000 individuos chagásicos, más de 300.000 desarrollan cardiopatía propia de la enfermedad, mientras que 7.300.000 personas representan la población que se encuentra en riesgo de contraer la infección (Programa Nacional de Chagas, Ministerio de Salud de la Nación; <http://www.msal.gov.ar/chagas/>). Es de resaltar que la importancia de esta parasitosis radica no solo en su elevada prevalencia sino también en los altos costos para el tratamiento y prevención de la enfermedad, generando un importante gasto en el sistema de salud de los países afectados<sup>6</sup>.

Desde el punto de vista epidemiológico, la principal vía de transmisión del *T. cruzi* es la vectorial y se lleva a cabo principalmente en tres ciclos: *el ciclo silvestre*, el cual se desarrolla alejado de los asentamientos humanos y en donde solo participan el vector y reservorios silvestres; *el ciclo peri-doméstico*, definido como la invasión progresiva del vector en los

alrededores de los núcleos de población humana, en donde los animales domésticos son los portadores del parásito; por último, *el ciclo doméstico* de la infección, donde se observa la invasión exclusiva del vector en las viviendas rurales y suburbanas. Se ha descrito la interacción entre los 3 ciclos como una causa de aumento en la transmisión enfermedad Chagas, ya que muchas especies de triatomíneos pueden invadir tanto el ambiente doméstico como el selvático o peri-domiciliario atraídos por la luz, el calor, determinados olores, o por transporte accidental (Fig. 1)<sup>7</sup>.



**Fig. 1: Interacción de los ciclos de transmisión del *T. cruzi*. Adaptado de ref. 7.**

En relación al ciclo del *T. cruzi*, cuando un insecto triatomino succiona la sangre de un mamífero infectado, ingiere tripomastigotes circulantes. En el insecto, luego de 2-4 semanas de evolución, algunos parásitos migran al intestino posterior. Ante una nueva alimentación sobre un huésped, el insecto elimina orina y heces conteniendo formas infectivas del parásito. En el caso del hombre, estos parásitos ingresan al organismo a través de las mucosas por pequeñas escoriaciones cutáneas, generalmente producidas por la herida de la picadura o por rasguños<sup>8</sup>. La etapa aguda de la enfermedad se presenta a los 6-10 días luego de la infección y perdurará por semanas, pudiendo presentarse con síntomas que incluyen fiebre, inflamación de nódulos y tejidos linfáticos, conjuntivitis, aunque en la mayoría de los individuos transcurre en forma inadvertida. En la fase crónica de la enfermedad, las principales complicaciones incluyen cardiomiopatías y/o bloqueo de la conducción y problemas digestivos como megacolon y megaesófago, pudiendo transcurrir hasta 25 años antes de manifestarse la patología<sup>1</sup>.



Como fue descrito anteriormente, de todas las vías descritas de la transmisión de la enfermedad de Chagas, la más importante en términos epidemiológicos es la vectorial<sup>9</sup>. Hasta el momento todavía no hay disponibilidad de una vacuna o un fármaco adecuado para el tratamiento de la enfermedad crónica<sup>10</sup>, por lo que el control del vector es la principal alternativa para disminuir la transmisión del parásito.

### **Triatominos: vectores de la enfermedad de chagas**

Los triatominos son una subfamilia de insectos pertenecientes a la familia Reduviidae, del orden Hemiptera. Aunque más de 100 especies integran esta subfamilia, todas ellas capaces de transmitir el *T. cruzi*, sólo algunas pertenecientes a los géneros *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius* son consideradas las de mayor importancia epidemiológica<sup>9</sup>.

La distribución geográfica de los triatominos comprende el continente americano y algunas islas del Caribe, entre las latitudes 42° N y 46° S. También se ha señalado la presencia de triatominos en África, Asia y Australia aunque carecen de importancia sanitaria<sup>3</sup>. Según Schofield (1994)<sup>11</sup>, el comportamiento dispersivo de los triatominos se ve favorecido por el desarrollo urbanístico en zonas rurales, lo cual desplaza no sólo los reservorios que son su fuente de alimento, sino también a los insectos mismos, que por su mal estado nutricional, se dispersan en busca de otras fuentes de alimentación como los animales domésticos y el hombre.

Los triatominos tienen un ciclo hemimetabólico típico, conformado por el huevo, cinco estadios ninfales y el estadio adulto, pudiendo requerir desde tres meses hasta dos años para completarlo, de acuerdo a la especie y a la densidad poblacional que determina el grado de competencia por el alimento. Se caracterizan por la hematofagia obligada a lo largo de todo su ciclo de vida, lo cual indica su potencialidad como transmisor del parásito. De no disponer del hospedador vertebrado, los triatominos tienen la capacidad de ayunar por períodos prolongados. Una característica general de estos insectos es que tienen hábitos nocturnos, se mantienen agregados en refugios durante el día y salen en búsqueda de alimento durante la noche. Sin embargo, ante condiciones adversas, cualquier momento del día puede ser apropiado para la búsqueda de alimento<sup>12</sup>.

Como fue descrito anteriormente, algunas especies de triatominos con distribución peri-domiciliaria o selvática son capaces de invadir la vivienda humana, contribuyendo de esta manera a la transmisión del parásito<sup>7</sup>. Dentro de este grupo, podemos citar a *Dipetalogaster maxima*, una especie endémica de la región fitogeográfica del Cabo, al sur de la Península de Baja California, México (Fig. 2). En los últimos años se ha reportado que *D. maxima* se encuentra en un proceso de adaptación a las viviendas humanas<sup>13,14</sup>. Es la especie de triatomino de mayor tamaño y generalmente habita en zonas secas y rocosas, donde puede desplazarse aún durante el día para conseguir alimento. Debido a su gran tamaño, puede ingerir grandes cantidades de sangre y almacenarla en el intestino, lo cual le permite sobrevivir al ayuno por periodos prolongados en los climas semidesérticos donde habita<sup>14</sup>.



**Fig. 2: Distribución de *Dipetalogaster maxima* en el estado de baja California, México. Adaptado de ref. 14.**

En la actualidad, las estrategias para el control de la enfermedad de Chagas tienen entre sus objetivos principales combatir los vectores para romper el ciclo de transmisión del parásito<sup>15</sup>. Años atrás se consideraba que la escasa variabilidad genética de los triatominos le confería mayor susceptibilidad al control químico con insecticidas. Sin embargo, estudios recientes basados en el secuenciamiento del genoma nuclear y mitocondrial de poblaciones domésticas de estos vectores han demostrado un alto grado de variabilidad genética en estas especies<sup>16</sup>, siendo informados varios focos de resistencia al tratamiento con piretroides<sup>17,18</sup>. En este contexto, un mejor conocimiento de la biología y fisiología de la reproducción de los triatominos es indispensable para el diseño de nuevas estrategias de control vectorial.

## 1.2. El ovario de los triatominos: características morfológicas y fases del ciclo reproductivo

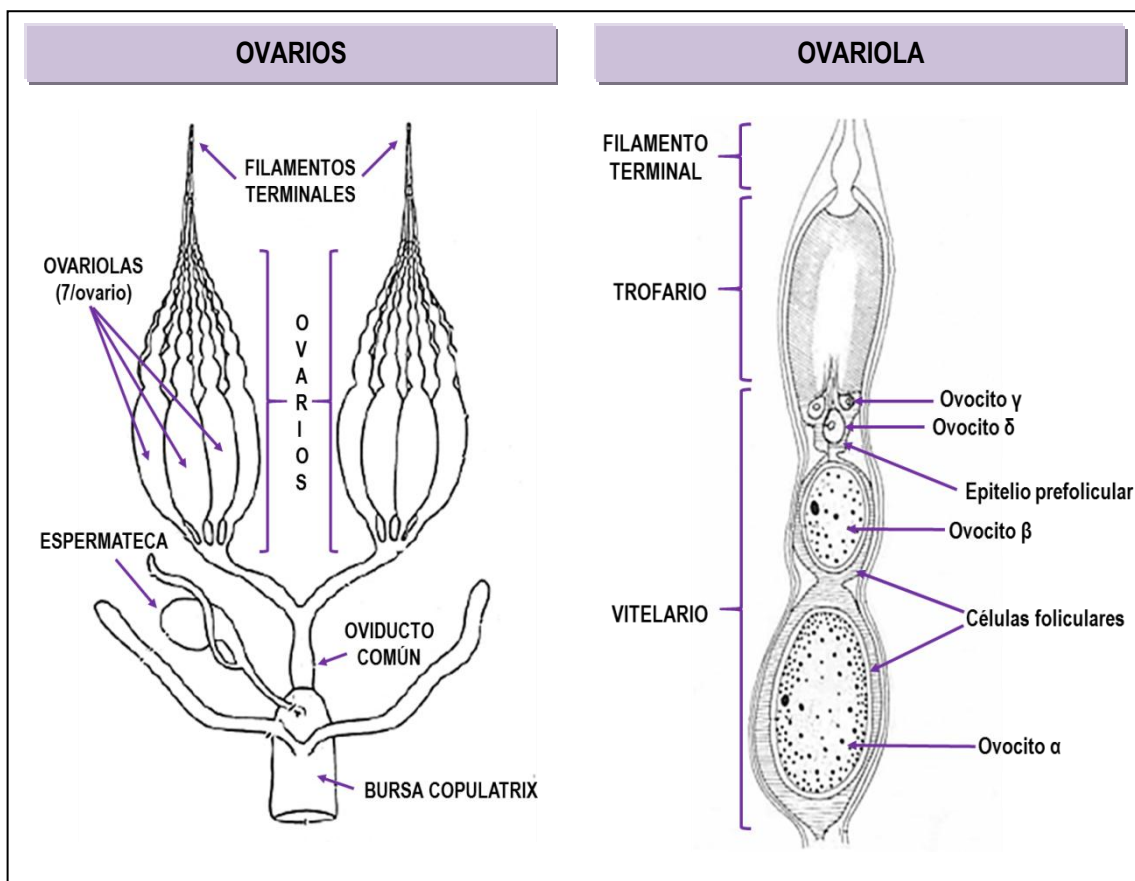
### Morfología del tejido ovárico

El aparato reproductor femenino de los insectos está formado por 2 ovarios, cada uno con un número variable de ovariolas, dependiendo de la especie. Las ovariolas son consideradas la unidad funcional del ovario y contienen a los folículos, los cuales están conformados por ovocitos en diferentes grados de desarrollo rodeados por una o más capas de células foliculares<sup>19</sup>. Dependiendo de la especie, en un ciclo gonadotrófico las ovariolas pueden desarrollarse de manera asincrónica para dar lugar a la oviposición que transcurre durante varios días, tal como ocurre en la polilla *Hyalophora cecropia* o en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. Por el contrario, en las ovariolas con desarrollo sincrónico, todos los folículos maduran simultáneamente y la postura de los huevos ocurre en forma conjunta, como ha sido descrito para el mosquito *Aedes aegypti* o para la langosta *Locusta migratoria*<sup>19,20</sup>.

El aparato reproductor de las hembras triatominos presenta 2 ovarios, conectados mediante oviductos laterales, a un oviducto común, continuado por una bursa copulatrix (vagina) y un par de espermatecas ventrales, las cuales sirven para la recepción y almacenamiento de los espermatozoides (Fig. 3). Cada ovario está compuesto por siete ovariolas de tipo meroístico subtipo telotrófico, indicando que los ovocitos durante las primeras etapas de desarrollo se alimentan por cordones tróficos a partir de células nutricias confinadas en el extremo apical de la ovariola o trofario<sup>21</sup>.

En términos generales, cada ovariola está conformada por un filamento terminal, el cual mantiene al órgano en posición, un trofario y un vitelario que contiene a los ovocitos en diferente grado de desarrollo (Fig. 3). Durante los primeros días en el estadio adulto y antes de una ingesta de sangre, los ovocitos migran hacia el epitelio prefolicular. Por debajo de la región prefolicular se dispone el ovocito en posición  $\gamma$ , rodeado de células foliculares binucleadas de gran tamaño, aún conectados mediante los cordones tróficos a las células nutricias. A continuación se ubican el ovocito en posición  $\beta$ , rodeado por las células foliculares y sin conexión con el trofario. Los ovocitos  $\gamma$  y  $\beta$  crecerán hasta alcanzar un tamaño crítico o estado pre-vitelogénico<sup>22</sup>. Cuando las hembras de triatominos reciben el estímulo adecuado de

alimentación, los ovocitos en posición  $\alpha$  o vitelogénicos aumentan de tamaño por la incorporación de importantes cantidades de proteínas, lípidos y otros nutrientes, y se rodean de un epitelio folicular monoestratificado conformando así un folículo maduro<sup>22,23</sup>. Luego de adquirir el tamaño máximo, los ovocitos vitelogénicos son corionados y ovulados en tanto que aquellos que ocupaban la posición  $\beta$ , entrarán en vitelogenénesis. Es importante destacar que en las hembras de los triatominos cada ovariola presenta un solo ovocito en vitelogenénesis por vez, aunque su desarrollo asincrónico permite observar folículos terminales de diferentes tamaños<sup>22-25</sup>.

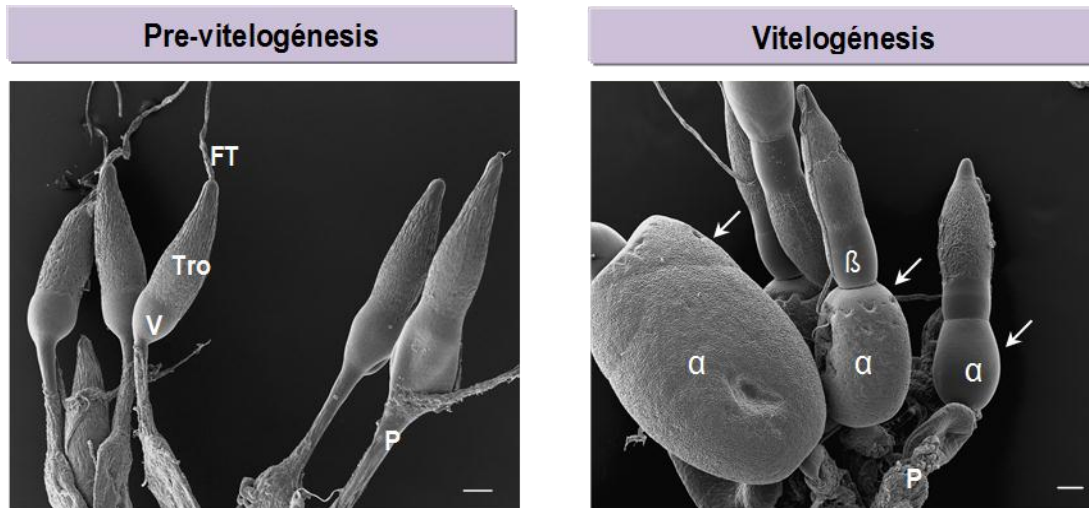


**Fig. 3: Esquema representativo del aparato reproductor de las hembras de triatominos y su unidad funcional, la ovariola.** El aparato reproductor de las hembras triatominos está compuesto por 2 ovarios, conectados mediante oviductos laterales, a un oviducto común, continuado por una bursa copulatrix. La ovariola es la unidad funcional del ovario, en la cual se distingue un trofario, que contiene a las células nutricias y un vitelario en donde se disponen los ovocitos en diferente grado de desarrollo. Adaptado de ref. 22.

## El ciclo reproductivo y su relación con el estado nutricional

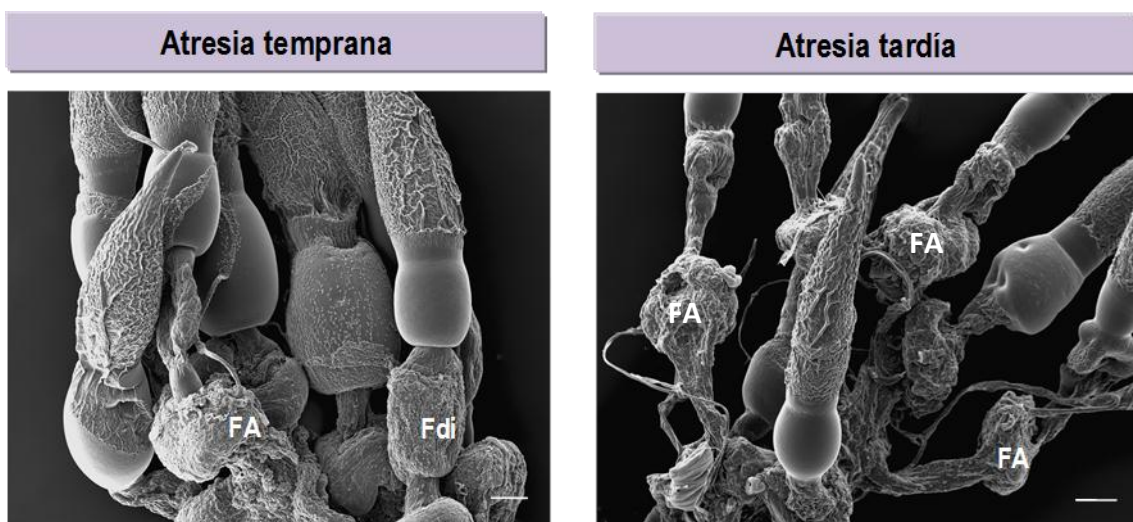
En las hembras de triatominos, la ingesta de sangre induce el crecimiento de los ovocitos mediante un mecanismo que involucra la participación del intestino, el cuerpo grasoso y un par de glándulas neuroendócrinas, la corpora allata. En este sentido, varios estudios han establecido que las hembras deben alcanzar un umbral en términos de cantidad de sangre ingerida para que la oviposición ocurra regularmente<sup>22,26</sup>. Por otro lado, la historia nutricional de la ninfa V también repercute en la producción de huevos y en la autogenia, definida como la capacidad de la hembra para poner un lote de huevos a partir de las reservas de sangre almacenadas en el intestino anterior en el último estadio ninfal. La autogenia, reportada en *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans* entre otras especies<sup>27</sup>, es considerada una característica común en las especies de triatominos más pequeñas ya que éstas alcanzan comidas a repleción con una sola alimentación.

En términos generales, en el ciclo reproductivo de las hembras no autógenas de triatominos se pueden distinguir tres fases, de duración variable dependiendo de la especie: **(a)** pre-vitelogénica; **(b)** vitelogénica y **(c)** post-vitelogénica. La primera transcurre desde la ecdisis de la hembra al estadio adulto hasta que ingiere una comida de sangre. La ingesta de sangre es el evento que marca el inicio de la vitelogénesis, caracterizada por el rápido crecimiento de los ovocitos en posición  $\alpha$  como consecuencia del activo proceso de captación de proteínas precursoras del vitelo (PPVs), principalmente vitelogenina<sup>24</sup>. En *D. maxima*, luego de una comida de sangre, el escaso desarrollo tisular observado en la pre-vitelogénesis es seguido por el notable desarrollo asincrónico de las ovariolas en la fase vitelogénica y por el incremento del tamaño de los ovocitos en posición  $\alpha$  (Fig. 4)<sup>28</sup>.



**Fig. 4: Morfología del tejido ovárico de *D. maxima* en la pre-vitelogénesis y vitelogénesis.** Las flechas señalan ovocitos en posición  $\alpha$  o vitelogénicos de diferente tamaño. Tro, trofario; V, vitelario; P, pedicelo; FT, filamento terminal; Barras: 100  $\mu$ m. Adaptado de ref. 25.

Quando los factores nutricionales o ambientales no son adecuados para estimular la vitelogénesis, algunos folículos degeneran hacia un estado atrésico y son posteriormente resorbidos<sup>23,29</sup>. En los triatominos, las ovariolas presentan un desarrollo asincrónico, por lo que en estas especies, se asume que el final de la oviposición marca el comienzo del período post-vitelogénico. En *D. maxima*, la fase post-vitelogénica se caracteriza por cambios morfológicos que se instauran gradualmente, permitiendo distinguir una fase temprana y una avanzada del proceso degenerativo, denominados atresia folicular temprana y tardía, respectivamente (Fig. 5)<sup>25</sup>.



**Fig. 5: Morfología ovárica de *D. maxima* en la atresia folicular temprana y tardía.** Ft, folículo terminal; Fdi, folículos en degeneración incipiente; FA, folículo atrésico. Barras: 100  $\mu$ m. Adaptado de ref. 25.

### 1.3. El cuerpo graso y su participación en el proceso de la reproducción

En los insectos, el cuerpo graso es un tejido funcionalmente análogo al hígado y al tejido adiposo de los vertebrados. Está conformado por lóbulos y posee una gran capacidad biosintética y alta tasa de actividad metabólica<sup>30</sup>. Desde el punto de vista fisiológico, el cuerpo graso es el principal responsable del almacenamiento y posterior regulación de los depósitos de lípidos e hidratos de carbono como así también de la síntesis de la mayoría de las proteínas de la hemolinfa. Cantidades importantes de vitelogenina, lipoforina (principal lipoproteína de insectos) entre otras, son sintetizadas por este órgano y secretadas a circulación. Los lípidos se almacenan en compartimientos especializados o adiposomas, siendo los triacilglicéridos (TAG) el principal componente. Estas reservas lipídicas constituyen el principal recurso energético durante eventos como el vuelo y la reproducción<sup>31</sup>.

Las funciones fisiológicas que lleva a cabo el cuerpo graso responden a la demanda metabólica del insecto en los diferentes estadios del ciclo de vida. La mayoría de estas funciones están reguladas hormonalmente, por lo que se define al cuerpo graso como un órgano blanco para varias hormonas<sup>32-34</sup>.

Aunque el cuerpo graso está conformado por distintos tipos celulares, los trofocitos o adipocitos son las células predominantes y más importantes del tejido. En estas células, los cambios morfológicos, celulares y moleculares son característicos de cada fase del ciclo reproductivo. Los principales estudios al respecto se circunscriben a las hembras del mosquito *A. aegypti*. En esta especie, la fase pre-vitelogénica se caracteriza por una remodelación tisular para maximizar la eficiencia de la maquinaria biosintética, adecuando al tejido para la síntesis de PPVs que tendrá lugar luego de la ingesta de sangre<sup>35</sup>. Por otro lado, ha sido reportado que la maduración de los ovocitos también dependerá de las condiciones nutricionales de la hembra durante la pre-vitelogénesis, estrechamente relacionadas con la calidad y cantidad de las reservas nutricionales acumuladas en el cuerpo graso durante las etapas larvales del mosquito<sup>36</sup>.

En la fase vitelogénica, que se inicia luego de la ingesta de una comida, el cuerpo graso reconoce señales nutricionales y hormonales, que contribuyen al crecimiento de los folículos para que el evento de oviposición ocurra exitosamente<sup>37</sup>. Esto implica un incremento de la maquinaria biosintética de los adipositos destinada a la síntesis de

importantes cantidades de PPVs, principalmente vitelogenina. Esta proteína será secretada a la hemolinfa e internalizada por los ovocitos para su depósito en compartimientos especializados con el nombre de vitelina<sup>38</sup>. Estudios realizados en el triatmino *D. maxima* demostraron que la expresión de vitelogenina en el cuerpo graso y los niveles en la hemolinfa incrementan significativamente durante la fase vitelogénica<sup>28</sup>. Es importante destacar que en la vitelogénesis, entre otras PPVs, el cuerpo graso sintetiza peptidasas ácidas, las cuales serán liberadas a circulación y luego almacenadas en los ovocitos vitelogénicos<sup>39-42</sup>.

En *A. aegypti*, durante la post-vitelogénesis, cuando las señales que estimulan la vitelogénesis y el crecimiento de los ovocitos son insuficientes, los adipositos exhiben un marcado desarrollo del sistema lisosomal destinado a degradar la maquinaria biosintética desarrollada durante la vitelogénesis. En esta fase reproductiva se destaca la formación de numerosas vacuolas autofágicas y la participación de enzimas lisosomales<sup>34</sup>.

#### **1.4. Vitelogénesis en insectos**

La vitelogénesis es un evento central en la reproducción de los insectos en la que tiene lugar el rápido crecimiento de los ovocitos<sup>19,24</sup>. En estas especies, así como en todos los organismos ovíparos, el desarrollo embrionario ocurre en completo aislamiento del cuerpo materno por lo que la supervivencia del embrión dependerá de los nutrientes almacenados durante la fase vitelogénica. Estas reservas, denominadas genéricamente “vitelo” o “yolk” están conformadas por proteínas, lípidos, carbohidratos y otros componentes minoritarios de origen materno<sup>35,43</sup>. En insectos evolutivamente más desarrollados, la vitelogénesis es un proceso heterosintético en el que los tejidos extraováricos sintetizan PPVs para su almacenamiento en los ovocitos<sup>34</sup>. En la mayoría de los insectos, el cuerpo graso es el principal órgano responsable de sintetizar PPVs, aunque ha sido demostrado que el tejido ovárico también puede contribuir a la síntesis de vitelogenina u otras PPVs<sup>34,44</sup>. En *R. prolixus* fue reportado que las células foliculares de los folículos más desarrollados son capaces de sintetizar vitelogenina<sup>45</sup>. En *D. melanogaster*, la síntesis de los polipéptidos del vitelo se lleva a cabo mayoritariamente en las células foliculares del tejido ovárico<sup>46</sup>. Algunos autores postulan que la participación de diferentes tejidos en la síntesis de PPVs podría representar una estrategia adaptativa para las especies donde la ovogénesis transcurre rápidamente. Sin

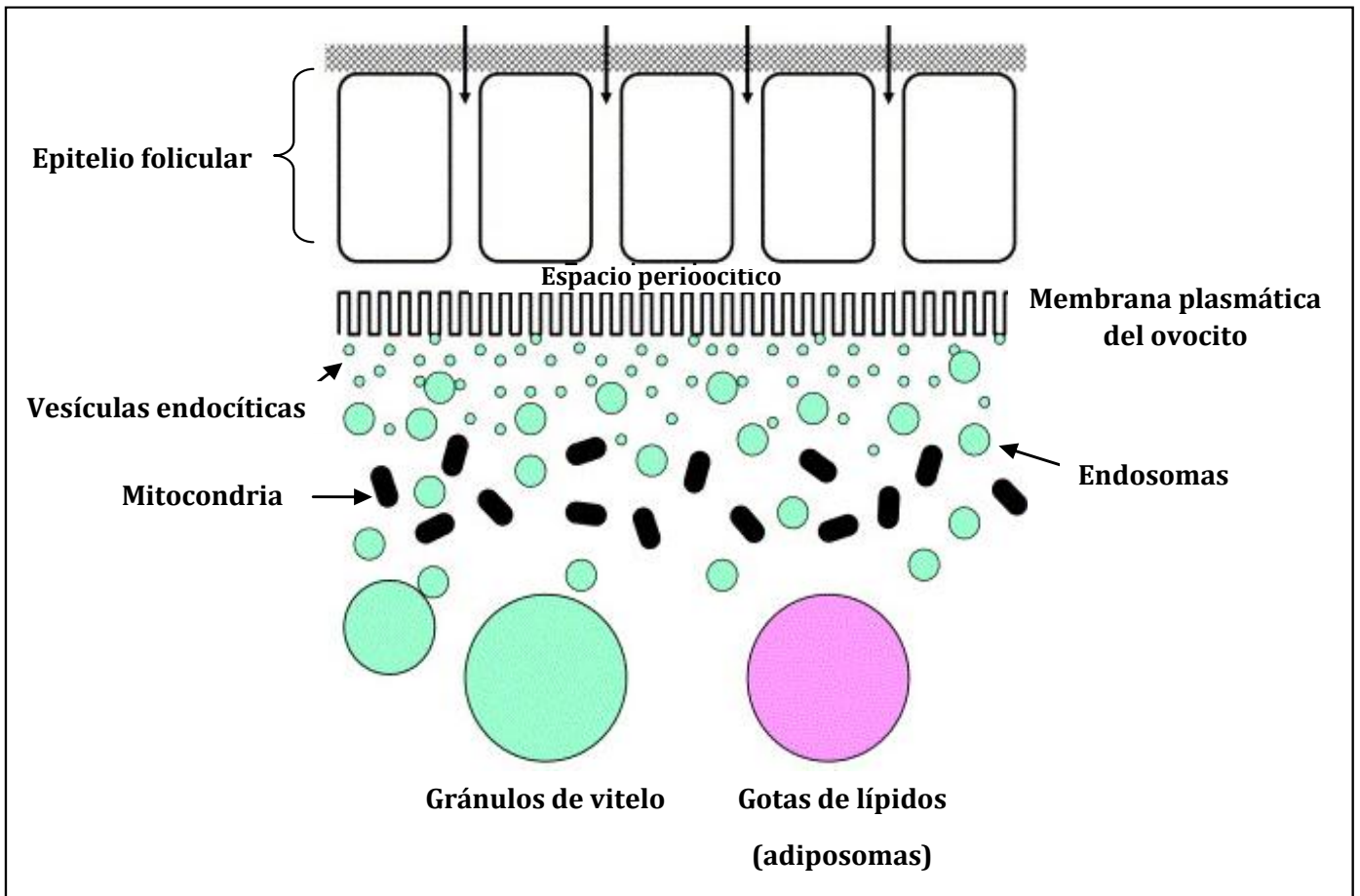


embargo, los mosquitos exhiben una fase vitelogénica corta y la síntesis de vitelogenina tiene lugar sólo en el cuerpo graso<sup>47</sup>.

En los ovocitos se distinguen dos compartimientos subcelulares especializados: los gránulos de vitelo, que almacenan principalmente vitelina, y los adiposomas o gotas de lípidos, responsables del almacenamiento de TAG y lípidos minoritarios (Fig. 6)<sup>48</sup>. Vitelina deriva de la fosfolipoproteína vitelogenina y representa la principal reserva metabólica de aminoácidos para sustentar el desarrollo embrionario. En *D. maxima*, durante la vitelogénesis, los depósitos de vitelina en el tejido ovárico incrementan significativamente, en consonancia con un activo proceso de captación de vitelogenina por los ovocitos en desarrollo<sup>25</sup>.

Durante el desarrollo embrionario, la vitelina sufre una gradual proteólisis, evento mediado por hidrolasas ácidas, las cuales han sido caracterizadas en diferentes especies de insectos<sup>24,49</sup>. La mayoría de estas enzimas son también consideradas PPVs ya que son sintetizadas en el cuerpo graso durante la vitelogénesis, liberadas a la hemolinfa como proenzimas y depositadas en los ovocitos vitelogénicos. También, ha sido reportado que estas hidrolasas ácidas pueden ser aportadas por el propio tejido ovárico, principalmente por las células foliculares<sup>20,42,50,51</sup>.

En los insectos hematófagos, la vitelogénesis es desencadenada por la ingesta de una comida de sangre rica en componentes esenciales como proteínas, lípidos y carbohidratos<sup>22,52</sup>. En este sentido, el intestino desempeña una función relevante modificando componentes de la dieta para la conformación de reservas metabólicas, temporal y funcionalmente organizadas en tejidos como el cuerpo graso y el ovario<sup>53</sup>. La acumulación de lípidos en el tejido ovárico durante la vitelogénesis es crítica por ser uno de los principales recursos energéticos que sustentan el desarrollo embrionario<sup>54</sup>. En el mosquito *Culex quinquefasciatus*, los lípidos del ovario proveen el 90% de la energía necesaria para el óptimo desarrollo del embrión<sup>55</sup>. Por otro lado, los lípidos almacenados en los ovocitos aportan fosfolípidos, moléculas necesarias para el desarrollo de las membranas celulares durante la embriogénesis<sup>24,48</sup>.



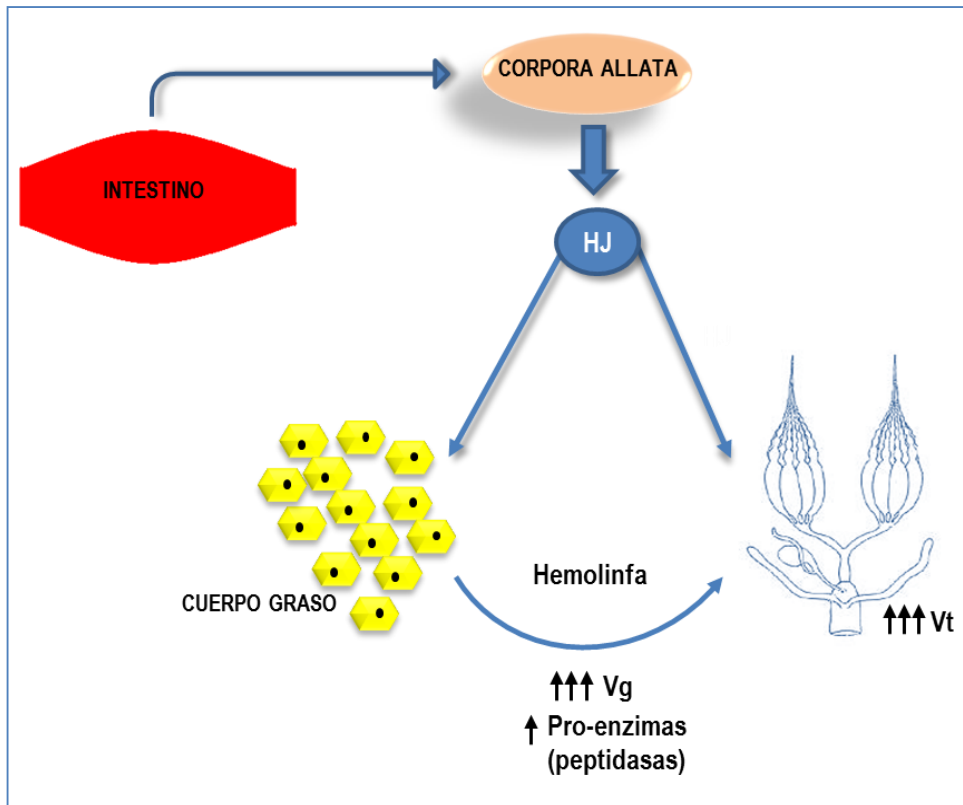
**Fig. 6: Estructuras subcelulares responsables del almacenamiento de nutrientes en los ovocitos: gránulos de vitelo y gotas de lípidos (adiposomas).** Adaptado de ref. 48.

### Regulación de la vitelogénesis

La vitelogénesis se encuentra bajo un estricto control nutricional y hormonal. Las principales hormonas implicadas en la regulación de la transcripción del gen de vitelogenina y otras PPVs son la hormona juvenil (HJ) y la ecdisona. En la actualidad, el conocimiento de la regulación endócrina de la vitelogénesis en insectos deriva fundamentalmente de los estudios realizados en *A. aegypti*. En esta especie, los genes destinados a la producción de PPVs están regulados por la compleja interacción de 4 actores principales: HJ, 20-hidroxi-ecdisona (20-HE), nutrientes sensados por el cuerpo gordo y los péptidos símil-insulina<sup>54</sup>. Por otra parte, en *D. melanogaster*, la vitelogénesis es coordinada de manera compleja por HJ y por 20-HE<sup>56,57</sup>. En triatominos, la principal hormona involucrada en la regulación de la vitelogénesis es HJ. Su rol en el ciclo gonadotrófico fue establecido por primera vez en *R. prolixus*<sup>58</sup>. En estas especies, cada ciclo gonadotrófico está fuertemente asociado a la ingesta de una comida de

sangre. Según el modelo de regulación de la vitelogénesis actualmente aceptado para los triatomíneos, cuando una hembra ingiere la comida de sangre del hospedador vertebrado, se promueve la distensión del intestino y se induce la síntesis de HJ en la corpora allata, un par de glándulas neuroendócrinas localizadas en el complejo retrocerebral, y su liberación a la hemolinfa (Fig. 7). La HJ es un sesquiterpenoide cuya síntesis es regulada por las hormonas peptídicas allatotropina y allatostina, los que llegan a la corpora allata por la hemolinfa o a través de conexiones neuronales. En los triatomíneos, la caracterización fisiológica de allatotropina es parcial y se limita a pocas especies<sup>59,60</sup>. En el cuerpo graso, HJ promueve un marcado remodelamiento tisular y la masiva síntesis de las PPVs, siendo vitelogenina la más importante. Aunque durante varias décadas fracasaron los intentos dedicados a identificar al receptor de HJ en cuerpo graso, las evidencias actuales obtenidas en *D. melanogaster* y *Tribolium castaneum* (escarabajo castaño de la harina) sugieren fuertemente que la proteína Metopreno-tolerante (Met) funciona como el receptor intracelular de HJ<sup>61,62</sup>. En *A. aegypti*, el complejo Met-HJ se uniría a proteínas para formar complejos activos que interaccionan a nivel del ADN con los elementos respondedores, regulando así la transcripción de genes blanco de la hormona juvenil<sup>63,64</sup>.

En los triatomíneos, HJ también tiene como órgano blanco al ovario. Fue propuesto que HJ se une a un receptor específico localizado en la membrana plasmática de las células foliculares y en consecuencia, por medio de vías de señalización aún no dilucidadas, activa a la proteína quinasa C (PKC). Posteriormente, PKC sería la responsable de fosforilar a la subunidad  $\alpha$  de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, lo que resulta en la reducción del tamaño de la célula y la generación de espacios intercelulares que facilitan la llegada de las PPVs desde la hemolinfa hacia el ovocito, proceso denominado patencia (Fig. 7)<sup>65,66</sup>.



**Fig. 7: Modelo de la regulación endocrina y nutricional de la vitelogenesis en *R. prolixus*.** La ingesta de una comida de sangre produce una distensión intestinal que estimula a la corpora allata para la síntesis y secreción a circulación de hormona juvenil (HJ). HJ induce cambios en el cuerpo graso y el tejido ovárico, promoviendo la síntesis de vitelogenina (Vg) en el primero y su captación y depósito como vitelina (Vt) en el segundo.

### 1.4.1. Proteínas precursoras del vitelo

#### Vitelogenina

Diversas PPVs son acumuladas en los ovocitos durante la fase vitelagénica, siendo vitelogenina la más relevante en términos fisiológicos<sup>34,44</sup>.

Las vitelogeninas fueron estudiadas en un amplio grupo de animales, desde vertebrados hasta invertebrados<sup>67</sup>. En insectos, la estructura primaria de las vitelogeninas está altamente conservada, conformando una superfamilia de genes y con homología a las vitelogeninas de otros organismos como nematodos, crustáceos, anfibios y aves, entre otros<sup>68</sup>.

Los genes que codifican para las vitelogeninas han sido identificados y clonados en varias especies de insectos hemimetábolos<sup>69</sup>. En general son codificadas por un ARNm de 6-7 kb y se transcriben como un producto primario de aproximadamente 200 kDa, los que son clivados en distintas subunidades llamadas apoproteínas, que van desde 50 a 180 kDa. En el cuerpo graso, además de los clivajes proteolíticos, el/los precursores de vitelogenina sufren modificaciones co- y post-traduccionales incluídas la glicosilación y la fosforilación, entre otras. En la cucaracha *Leucophaea maderae* se demostró que el bloqueo de la glicosilación produce la acumulación de la proteína en el cuerpo graso<sup>70</sup>. Similares resultados fueron reportados en langostas y mosquitos<sup>71,72</sup>, lo cual sugiere que la glicosilación es un paso importante para la secreción de vitelogenina por el cuerpo graso. Otros autores han propuesto que esta modificación post-traducciona l es importante, pero no indispensable, para la unión de vitelogenina a su receptor<sup>73</sup>. Por otro lado, ha sido demostrado que las vitelogeninas de insectos están altamente fosforiladas<sup>68,74</sup>. Una característica importante de las vitelogeninas de la mayoría de las especies de insectos analizadas, es que comparten la existencia de dominios poli-serina con secuencias altamente conservadas en la región N-terminal<sup>68,75,76</sup>. Las vitelogeninas de cucarachas y mosquitos representan una excepción, presentando además un dominio poli-serina en el dominio C-terminal. Desde el punto de vista funcional, ha sido reportado que estas regiones de poli-serina serían potenciales sitios para los eventos de fosforilación post-traducción de la vitelogenina. En este sentido, las regiones fosfoserina presentan un predominio de cargas negativas, lo que contribuye a la solubilidad de la proteína. Dhadialla y col. (1990)<sup>72</sup> reportaron que la defosforilación de vitelogenina reduce su captación por los ovocitos, sugiriendo que la presencia de residuos fosforilados contribuye a la interacción entre vitelogenina y su receptor en la membrana del ovocito. Finalmente, es importante señalar que el nivel de fosforilación puede cambiar la susceptibilidad de vitelina a la proteólisis programada durante la embriogénesis<sup>42</sup>.

Luego del procesamiento proteolítico y de las modificaciones co- y post- traducción, las subunidades apoproteicas de vitelogenina son ensambladas y secretadas como fosfolipoglicoproteínas oligoméricas de alto peso molecular, reportado entre 210 a 652 kDa para la molécula nativa según la especie. Posterior a su secreción a la hemolinfa, las vitelogeninas son internalizadas y depositadas como vitelina en los gránulos de vitelo. Vitelogenina y vitelina poseen similares propiedades inmunológicas y características físico-

químicas<sup>24</sup>. Sin embargo, ambas proteínas han sido caracterizadas en pocas especies de triatominos, entre las que se destacan *Triatoma protracta*<sup>77</sup>, *T. infestans*<sup>78</sup>, *R. prolixus*<sup>43</sup> y más recientemente, *D. maxima*<sup>28</sup>. En estas especies, las proteínas nativas presentaron un peso molecular entre 220 y 440 kDa. En *R. prolixus*, Salerno y col. (2002)<sup>79</sup> reportaron tres poblaciones de vitelina, con idéntica movilidad electroforética pero con diferente grado de fosforilación y composición de carbohidratos. Su origen respondería a un diferente procesamiento post-endocítico de las vitelogeninas sintetizadas por las células foliculares o nutricias. En *D. maxima* fue reportada una única clase de vitelina, con un peso molecular nativo de ~ 443 kDa, conformada por dos subunidades mayores (~ 170 y 174 kDa), y dos subunidades más pequeñas como componentes minoritarios (~ 50 y 44 kDa)<sup>28</sup>.

### **Hidrolasas ácidas**

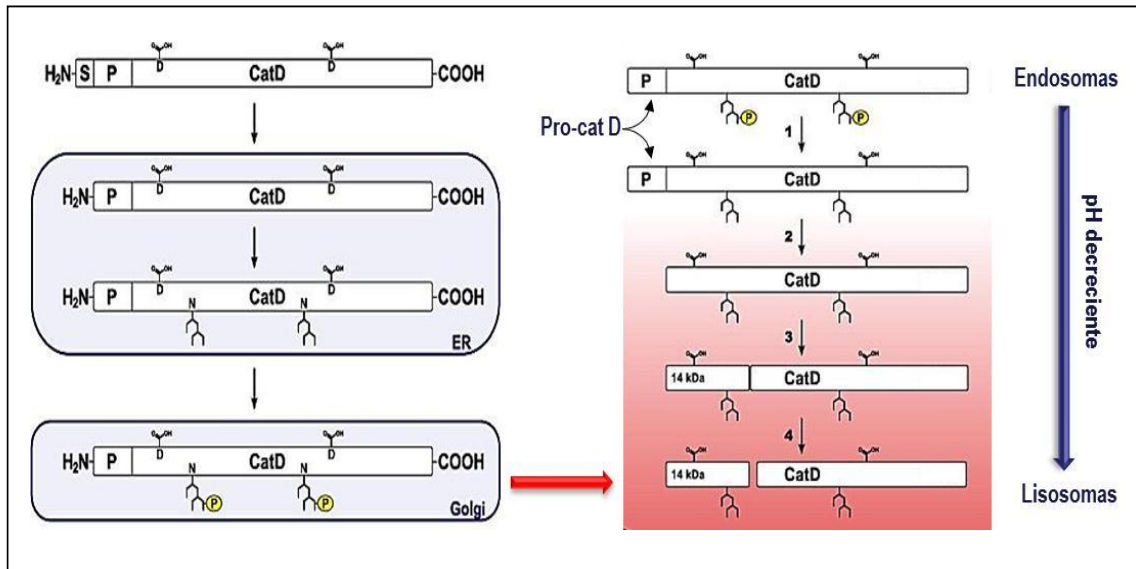
Las hidrolasas ácidas, principalmente del tipo peptidasas y fosfatasas ácidas, están involucradas en la degradación del vitelo y pueden ser sintetizadas como PPVs por el cuerpo graso maternal y/o por las células foliculares del ovario<sup>39,40,42,80,81</sup>. Son internalizadas por los ovocitos y, en la mayoría de las especies descritas, depositadas en los gránulos de vitelo<sup>42,50</sup>. Estas enzimas han sido caracterizadas en los ovocitos de varios insectos<sup>20,42,50,51</sup>, incluyendo una carboxipeptidasa vitelogénica en *A. aegypti* y cisteínas peptidasas en el gusano de seda (*Bombyx mori*)<sup>82</sup>, en la cucaracha (*Blattella germanica*)<sup>83</sup> y en *A. aegypti*<sup>40</sup>. Una característica común de estas peptidasas es que son almacenadas en los gránulos de vitelo como zimógenos (pro-enzimas) y activadas durante la embriogénesis para contribuir en la degradación de las proteínas del vitelo.

Por otro lado, el rol de las fosfatasas ácidas en el procesamiento de las proteínas del vitelo, principalmente vitelina, fue primeramente descrito usando como modelo los embriones de anfibios<sup>84</sup>. Más tarde, los estudios en insectos sugirieron que los eventos de fosforilación/defosforilación mediado por fosfatasas en los residuos serina o tirosina de las proteínas del vitelo desempeñarían un rol importante en la utilización de las mismas, induciendo cambios en la conformación de las moléculas e incrementando su susceptibilidad a la proteólisis<sup>42</sup>. Al presente son varias las fosfatasas ácidas caracterizadas en los ovocitos de diferentes especies de insectos<sup>85-91</sup>. Más aún, ha sido reportado su rol en la degradación de

proteínas del vitelo durante la embriogénesis<sup>92,93,51</sup>. En los triatominos, Nussenzveig y col. (1992)<sup>89</sup> caracterizaron una fosfatasa ácida y una aspártico peptidasa en los ovocitos de *R. prolixus*. Estudios más recientes sugieren que durante el desarrollo embrionario de esta especie, fosfatasa ácida, polifosfatos inorgánicos y catepsina D actúan conjuntamente promoviendo la degradación de proteínas del vitelo<sup>94,95</sup>.

### ***Catepsina D***

Catepsina D es una aspártico endopeptidasa lisosomal (E. C. 3.4.23.5) sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso como pre-pro-catepsina D. Después del clivaje del péptido señal, la pro-catepsina D se almacena en estructuras vesiculares como lisosomas, endosomas o fagosomas. Posteriormente, un segundo clivaje proteolítico da origen a la formación de un intermediario activo de cadena única que rápidamente es convertido a la molécula madura, conformada por 2 cadenas unidas por interacciones covalentes. En humanos, la forma madura de catepsina D está conformada por una cadena pesada y una liviana de ~ 31 kDa y 14 kDa, respectivamente (Fig. 8). La peptidasa es activa en un medio ácido y es fuertemente inhibida por pepstatina A<sup>96</sup>. Catepsina D está involucrada en los procesos de degradación y/o activación de hormonas, factores de crecimiento, precursores enzimáticos, entre otros. Recientemente, catepsina D ha cobrado interés por estar involucrada en procesos patológicos como el cáncer y la enfermedad de Alzheimer<sup>97,98</sup>.



**Fig. 8: Tráfico intracelular de catepsina D.** Los principales eventos proteolíticos involucrados en la maduración de catepsina D ocurren dentro de los compartimentos endo-lisosomal. En estas organelas subcelulares, la pro-catepsina D (Pro-CatD) sufre clivajes proteolíticos para finalmente generar la catepsina D madura (CatD). ER: retículo endoplásmico rugoso; Golgi: Aparato de Golgi. Adaptado de ref. 98.

### Fosfatasa ácida

Las fosfatasa ácida (E.C. 3.1.3.2) constituyen un amplio grupo de enzimas que se caracterizan por catalizar la hidrólisis de grupos fosfomonoésteres de una gran variedad de sustratos en un medio ácido. Actualmente se conoce que la fosforilación/defosforilación de las proteínas modula importantes procesos celulares, incluyendo eventos del ciclo celular, respuesta a factores de crecimiento, hormonas y otros estímulos ambientales, control metabólico y eventos del desarrollo. Estas enzimas se clasifican en familias según su actividad esté dirigida a residuos tirosina, serina o treonina fosforilados (tirosina fosfatasa y serina/treonina fosfatasa, respectivamente)<sup>99</sup>. De manera general, las serinas/treoninas y tirosinas fosfatasa se encuentran agrupadas en al menos 4 familias (Tabla 1). Las serina/treonina fosfatasa se dividen en 2 grandes grupos basándose en su especificidad por sustrato y por la inhibición específica con ciertos fármacos: las fosfoproteína fosfatasa tipo 1 (PP1) y las tipo 2 (PP2), que incluyen PP2A, PP2B y PP2C en base a la dependencia de cationes divalentes.

Además, se han descrito 2 clases principales de tirosina fosfatasa: (a) las que tienen especificidad por defosforilar residuos tirosina, con localización transmembrana o intracelular y



(b), las fosfatasas intracelulares de especificidad dual, las que son parte de una familia diferente y además de tirosina, pueden desfosforilar residuos serina/treonina<sup>99,100</sup>.

Familias de las Serina/treonina fosfatasas	
Tipo 1	PP1
Tipo 2	PP2A PP2B PP2C
Familias de las Tirosinas fosfatasas	
Específicas de tirosinas	Transmembrana Intracelulares
Especificidad dual	

**Tabla 1: Clasificación de las distintas familias que componen al grupo de las fosfatasas ácidas. PP1 y PP2, fosfoproteína fosfatasa tipo 1 y 2, respectivamente.**

### Captación de las proteínas precursoras del vitelo por los ovocitos

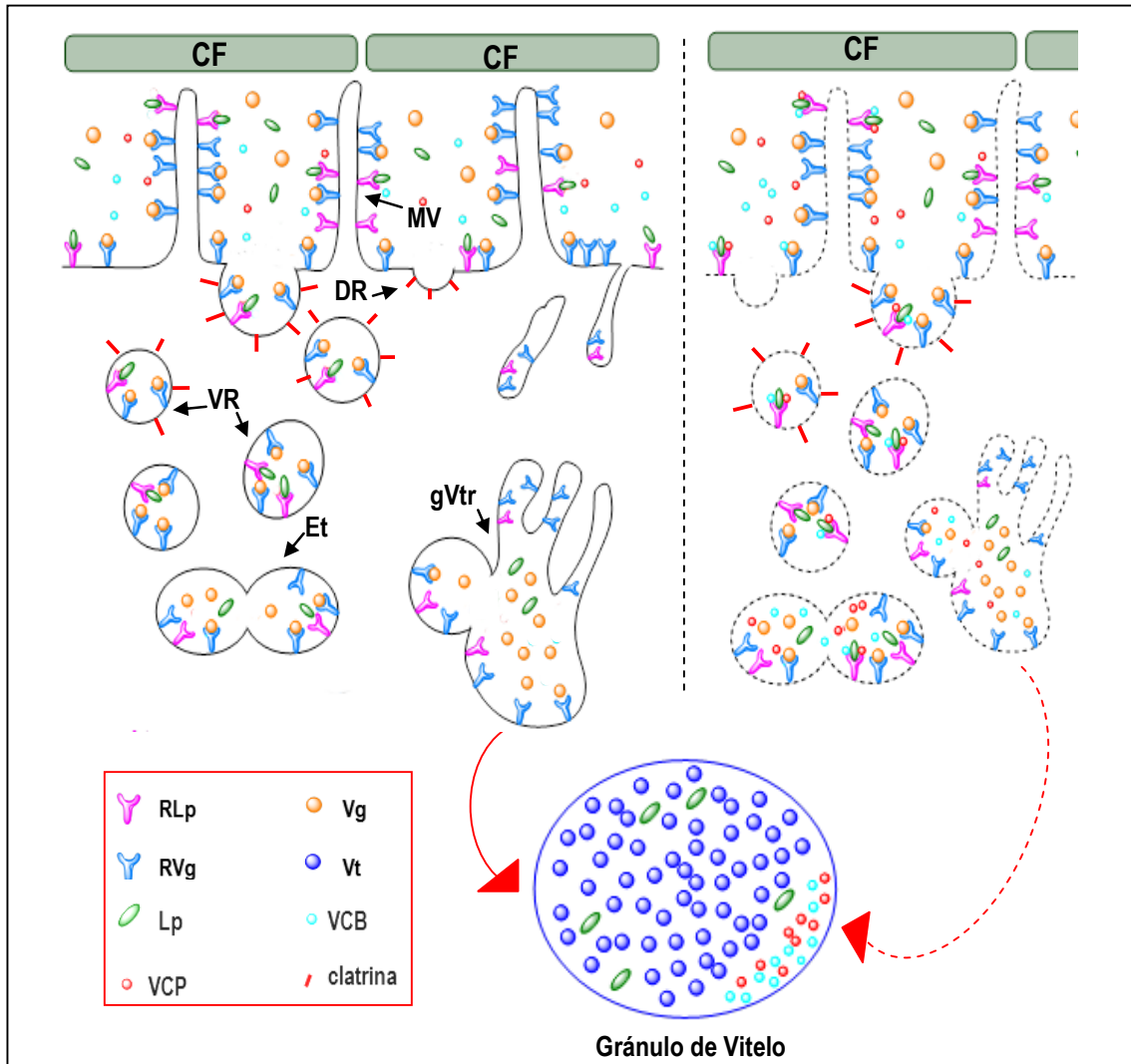
En los organismos ovíparos, la competencia para la captación de las PPVs por los ovocitos constituye un evento central para la ovogénesis. Las primeras observaciones de este proceso fueron reportadas por Telfer en 1960<sup>101</sup>, en ovocitos de la polilla *H. cecropia*, y confirmadas años posteriores con la primera interpretación de endocitosis mediada por receptor brindada por estudios de microscopía electrónica en ovocitos vitelogénicos de *A. aegypti*<sup>102</sup>.

Al presente, el conocimiento en los mosquitos de los eventos celulares que median la captación de las PPVs, específicamente vitelogenina, permiten postular un modelo que es extensivo para la mayoría de las especies de insectos<sup>38</sup>. El mismo establece que la vitelogenina circulante en la hemolinfa se une a su receptor el cual está localizado en las microvellosidades y en las depresiones recubiertas de clatrina de la membrana perioocítica. Luego de esta unión, vitelogenina es internalizada en vesículas recubiertas. La disociación del complejo vitelogenina/receptor ocurre en los endosomas tempranos, que se fusionan conformando gránulos de vitelo transitorios (gVtr), compartimentos intermediarios específicos donde vitelogenina perderá su contenido en lípidos, recibiendo el nombre de vitelina. Los gVtr

almacenan vitelogenina/vitelina hasta conformar un gránulo maduro (gV), sin que la molécula sufra eventos de proteólisis hasta el desarrollo embrionario (Fig. 9).

Al presente, los receptores de vitelogenina (RVgs) han sido clonados en varias especies de insectos incluidos *A. aegypti*<sup>103</sup>, la hormiga *Solenopsis invicta*<sup>104</sup>, y en las cucarachas *Periplaneta americana*<sup>105</sup>, *B. germanica*<sup>106</sup> y *L. maderae*<sup>107</sup>. También ha sido clonado el receptor de los polipéptidos del vitelo de *D. melanogaster*<sup>108</sup>. Por homología en secuencia y por su organización en dominios modulares, los RVg pertenecen a la superfamilia de genes del receptor de la lipoproteína de baja densidad o RLDL, la que incluye además al receptor de lipoforina (RLp), a megalina, y a las proteínas relacionadas al receptor de LDL o LRP<sup>109,110</sup>.

Por otro lado, el mecanismo de captación de las hidrolasas ácidas por los ovocitos vitelogénicos así como la presencia de receptores específicos para éstas, permanece sin dilucidar. Estudios realizados en *A. aegypti* sugieren que 2 peptidasas ácidas de origen materno, una carboxipeptidasa y una catepsina B vitelogénicas, (VCP y VCB, respectivamente), utilizando a la lipoforina como transportador, podrían unirse a los RLp presentes en la membrana oocítica para su internalización e incorporación en los gránulos de vitelo. Sin embargo, al presente no hay evidencias experimentales que avalen esta propuesta (Fig. 9)<sup>19</sup>.



**Fig. 9: Principales eventos de captación e internalización de proteínas precursoras del vitelo por los ovocitos de *A. aegypti*.** El esquema de la izquierda (líneas continuas) resume los eventos de captación e internalización para Vg. El esquema con líneas punteadas (derecha) representa un modelo de captación propuesto para la carboxipeptidasa vitelogénica (VCP) y catepsina B vitelogénica (VCB). MV, microvellosidades; DR, depresiones recubiertas con clatrina; VR, vesículas recubiertas; Et, endosomas tempranos; gVtr, gránulo de vitelo transitorio; RVg, receptor de vitelogenina. RLp, receptor de lipoforina; Vg, vitelogenina; Vt, vitelina; Lp, lipoforina. Adaptado de ref. 19.

## Utilización de las proteínas del vitelo

Varios estudios han demostrado que la acidificación *in vitro* de extractos de gránulos de vitelo estimula la proteólisis de vitelina, poniendo en evidencia la autonomía de estos compartimientos especializados, los cuales contienen la maquinaria necesaria para la degradación de proteínas<sup>88,111-113</sup>. De acuerdo con estas observaciones, los gránulos de vitelo han sido considerados un tipo especial de endosomas, capaces de regular su propio pH intraluminal<sup>114</sup>. Probablemente la acidificación de los gránulos constituye el evento principal para promover la activación de las peptidasas inmaduras (pro-enzimas) a peptidasas activas, proceso vinculado con la progresiva degradación del vitelo. En general, las enzimas que han sido identificadas en los ovocitos de invertebrados tienen un pH óptimo de acción ácido<sup>111-113</sup>.

Al presente han sido postulados diferentes factores que contribuyen al control de la degradación de las proteínas del vitelo durante la embriogénesis. Entre ellos se incluyen: **(a)** la biosíntesis de peptidasas durante la vitelogénesis; **(b)** activación de pro-enzimas en respuesta a las necesidades metabólicas de la embriogénesis; **(c)** acción de inhibidores y activadores endógenos de peptidasas; **(d)** presencia de sustratos específicos para las hidrolasas ácidas; **(e)** localización y compartimentalización subcelular de hidrolasas ácidas y sustratos, y **(f)** modificación de los sustratos para aumentar la susceptibilidad a las peptidasas<sup>42</sup>.

### 1.4.2. Depósito de lípidos en ovocitos en desarrollo

En los insectos, aunque los lípidos constituyen hasta un 40 % del peso seco del huevo, las vías metabólicas por las cuales estos nutrientes son almacenados en los ovocitos son al presente escasamente conocidas. Debido a que la mayoría de los estudios fueron llevados a cabo utilizando pocas especies como modelos, no es posible hacer generalizaciones sobre este proceso<sup>48</sup>. En el gusano del tabaco *Manduca sexta* y en *A. aegypti*, los experimentos *in vitro* demostraron que la síntesis *de novo* de ácidos grasos contribuye con sólo el 1 % de los lípidos totales del huevo. En *M. sexta* además, la endocitosis de vitelogenina y lipoforina aportan aproximadamente un 10 % a los lípidos depositados en el huevo<sup>115,116</sup>. Sin embargo, en estas especies, los lípidos de los ovocitos son mayoritariamente importados desde la

circulación a partir de la lipoforina, la principal lipoproteína de la circulación de los insecto<sup>117</sup>. En el triatomo *P. megistus* se observó que el reclutamiento de lípidos en los ovocitos resulta de un proceso mayoritario de transferencia a nivel de la membrana plasmática del ovocito sin internalización de la lipoproteína, y un de mecanismo minoritario, con la endocitosis de lipoforina<sup>118</sup>.

## Lipoforina

El transporte de lípidos desde el intestino a la circulación y al tejido ovárico es mediado por una única lipoproteína de alta densidad, lipoforina, conformada por dos apolipoproteínas estructurales: apolipoforina-I (apoLp-I, PM ~ 240 kDa) y apolipoforina-II (apoLp-II, PM ~ 80 kDa). A semejanza de la mayoría de las lipoproteínas de mamíferos, la lipoforina es una partícula símil-esférica (PM 450-650 kDa, 30-50 % de contenido lipídico) pero a diferencia de aquellas, la lipoproteína de insectos posee en su “core” diacilglicéridos (DAG) y fosfolípidos como lípidos mayoritarios, además de hidrocarburos, útiles para la formación de la cutícula, carotenoides y hormonas de naturaleza lipofílica, entre otros<sup>119,120</sup>.

La principal función de la lipoforina es transportar, a través de la hemolinfa, diferentes clases de lípidos desde el intestino a los tejidos de depósito (cuerpo graso u ovario) y/o a los sitios de utilización (músculo de vuelo)<sup>120</sup>. Lipoforina actúa principalmente como un “transportador reusable”, aceptando o transfiriendo lípidos a nivel de la membrana plasmática, sin internalización ni degradación de sus componentes apoproteicos estructurales<sup>110</sup>. Este proceso es altamente regulado y dependiente del estado nutricional del insecto<sup>120,121</sup>.

## 1.5. Atresia folicular

La atresia folicular se define como un conjunto de eventos fisiológicos que inducen la pérdida de los folículos ováricos. Altamente conservada en organismos vertebrados e invertebrados, es un proceso degenerativo que se extiende en todo el folículo promoviendo la pérdida de su integridad y su funcionalidad. En el caso particular de los mamíferos, el ovario representa un órgano extremadamente dinámico en el que una importante cantidad de folículos se elimina eficazmente durante toda la vida reproductiva por procesos atrésicos<sup>122</sup>.

### Atresia folicular en insectos

Un aspecto importante para una mejor comprensión de la biología de los insectos incluye dilucidar los mecanismos por lo que estas especies responden a ciertas condiciones nutricionales y/o ambientales sub-óptimas manteniendo la sobrevida. En este contexto, varios reportes han demostrado que los insectos responden a situaciones de estrés mediante la instauración de la atresia folicular, proceso que se caracteriza por cambios histo-morfológicos en el tejido ovárico, los cuales promueven la degeneración de algunos folículos hasta el estado atrésico<sup>29,123,124</sup>. En este proceso, los ovocitos serán resorbidos (oosorción) en lugar de continuar su desarrollo hasta la formación del huevo.

Uno de los principales factores causales de la atresia folicular y de la oosorción en insectos es la escasa o nula disponibilidad de nutrientes<sup>29,125-127</sup>. La atresia folicular y la resorción de los ovocitos son considerados parte de la estrategia reproductiva para optimizar recursos energéticos y nutricionales que permitan la sobrevida de las hembras y/o asegurar un potencial éxito reproductivo cuando las condiciones desfavorables reviertan<sup>29,124,128</sup>.

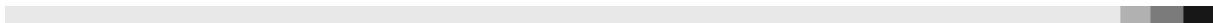
En los insectos, los eventos bioquímicos, celulares y moleculares involucrados en la atresia y/o resorción de ovocitos son poco conocidos. Estos han sido abordados en pocas especies, en las que los cambios generalmente ocurren muy rápidamente, dificultando la exploración de los eventos tempranos del proceso degenerativo. Así, la atresia se evidencia sólo en etapas avanzadas, donde los ovocitos resorbidos en un estadio final se distinguen como corpúsculos de coloración amarillenta variable<sup>29,126,127</sup>.

En los triatominos, la atresia folicular fue descrita a nivel histo-morfológico hace décadas en *R. prolixus* por Huebner y Anderson (1972)<sup>23</sup>. Estudios más recientes en *D. maxima* mostraron que, finalizada la oviposición, la fase post-vitelogénica presenta cambios histo-morfológicos y ultraestructurales graduales en el tejido ovárico y la progresiva pérdida de la competencia de los ovocitos para captar vitelogenina, permitiendo diferenciar estadios tempranos y tardíos de atresia folicular<sup>25</sup>.

Por otro lado, evidencias experimentales sugieren que las hidrolasas ácidas que participan activamente en la degradación de nutrientes durante la embriogénesis, podrían activarse tempranamente en la atresia folicular. En este sentido, ha sido demostrado que en el mosquito *Culex pipiens pallens*, las peptidasas tipo catepsina B y L contenidas en los gránulos de vitelo, se activan tempranamente en respuesta a un déficit nutricional para promover la atresia de algunos folículos y su posterior resorción<sup>126</sup>. Por otro lado, cuando se indujo la atresia folicular en *R. prolixus* mediante la infección con el hongo no entomopatogénico *Aspergillus niger* se observó que la resorción del vitelo coincide con un aumento de la actividad de enzimas del tipo peptidasas ácidas en el ovario<sup>129</sup>.

A nivel celular, los estudios en los folículos atrésicos sugieren que la apoptosis sería el principal mecanismo de muerte celular responsable de la remoción del epitelio folicular<sup>130</sup>. Recientemente, en *D. maxima* fue reportado por primera vez la participación de apoptosis, autofagia y necrosis durante la atresia folicular, demostrándose que la relevancia de estos mecanismos de muerte celular se correlaciona con la progresión del proceso de degeneración folicular<sup>131</sup>.

Desde el punto de vista metabólico, hay estudios que indican que durante el proceso de atresia folicular y resorción de los ovocitos, las reservas nutricionales del tejido ovárico como lípidos y carbohidratos, serían sustancialmente afectadas. Sin embargo, al presente son muy pocas las especies analizadas<sup>29,132-134</sup>.



## *Capítulo 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS*



## **Hipótesis de Trabajo**

En este trabajo de tesis postulamos que el estado nutricional de las hembras de *Dipetalogaster maxima* es un factor importante en la instauración y progresión de la atresia folicular. En respuesta al déficit nutricional durante la post-vitelogénesis se promueven cambios en las reservas nutricionales del ovario y en la dinámica de síntesis y activación de hidrolasas ácidas, facilitando la degradación temprana de la principal proteína del vitelo durante la fase de atresia. Estos eventos serían importantes en la homeostasis del tejido ovárico a los fines de facilitar la sobrevivencia de la hembra o sustentar el mantenimiento de folículos jóvenes hasta que las condiciones nutricionales adversas revierten.

## **Objetivo General**

El presente trabajo tuvo como objetivo profundizar en el conocimiento de la fisiología de la reproducción de los vectores de la enfermedad de Chagas, con énfasis en los eventos bioquímicos, celulares y moleculares que participan en la fase de atresia folicular inducida por déficit nutricional. En el estudio se emplearon como modelo hembras no autógenas de *D. maxima*, para abordar los objetivos específicos que se detallan a continuación.

## **Objetivos Específicos**

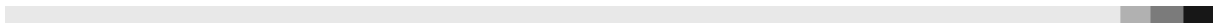
**[1]. Analizar los cambios de las reservas nutricionales en el tejido ovárico en las fases del ciclo reproductivo y la dinámica de adquisición de lípidos por los ovocitos:**

- 1.1. Estudiar las reservas nutricionales del tejido ovárico y establecer su correlación con los cambios histo-morfológicos del aparato reproductor.
- 1.2. Determinar la composición y distribución de las reservas lipídicas en el tejido ovárico.
- 1.3. Analizar la participación de lipoforina en la formación de las reservas lipídicas de los ovocitos en las diferentes fases del ciclo reproductivo.

---

**[2]. Estudiar los eventos que participan en la fase de atresia folicular, focalizando en la participación de las hidrolasas ácidas y en la proteólisis de vitelina:**

- 2.1. Evidenciar la proteólisis de vitelina en el tejido ovárico durante las fases de atresia.
- 2.2. Determinar y caracterizar la actividad de peptidasas ácidas en el tejido ovárico.  
Evaluar la expresión y la actividad de catepsina D en las distintas fases del ciclo reproductivo.
- 2.3. Determinar y caracterizar la actividad de fosfatasa ácida en el tejido ovárico.
- 2.4. Establecer la localización de catepsina D y fosfatasa ácida en el tejido ovárico y analizar la co-localización con vitelina.
- 2.5. Establecer la participación de fosfatasa ácida y catepsina D en la proteólisis de vitelina durante la atresia folicular inducida por déficit nutricional.



*Capítulo 3. MATERIALES Y MÉTODOS*

### 3.1. Insumos de laboratorio

Oregon Green 514 ácido carboxílico (OG), 4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-ácido hexadecanoico (Bodipy FL C16), "SYBR Green" y anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 568 o con Alexa Fluor 488 fueron provistos por Molecular Probes. Las columnas PD-10 (GE Healthcare), reactivos para quimioluminiscencia (ECL) (PerkinElmer), las placas multipocillos (Deltalab), concentradores Centricon (Millipore), marcadores de peso molecular (ColorPlus Prestained Protein Marker, BioLabs Inc.), Fluorsave (Calbiochem), el medio para criocortes Tissue-Tek-OCT (Sakura), placas de silica gel y solventes (J.T Baker) y los estándares de lípidos (Avanti Polar Lipids) fueron adquiridos según lo indicado. Los anticuerpos policlonales anti-catepsina D humana (sc-10725) y anti-PTP1B humana (protein tyrosine phosphatase, sc-14021) y el lisado celular MCF7 fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology.

Los kits para evaluar actividad de serina/treonina fosfatasa (V2460) y tirosina fosfatasa (V2471) y enzimas y reactivos necesarios para la Reacción de transcripción inversa (RT) y la Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) fueron obtenidos de Promega, en tanto los primers fueron de Sigma Genosys. El kit para purificar RNA (MasterPure) fue obtenido de Epicenter Biotechnologies (Stratagene, Agilent Technologies, Inc). Los marcadores de peso molecular para ADN ("Ladder 50 pb" PB-L) fueron provistos por Reactivos Bio-Lógicos (Universidad de Quilmes). La enzima Rox fue adquirida a Roche. El sustrato fluorogénico Abz-AIAFFSRQ-EDDnp (ABZ, ácido ortoaminobenzoico, EDDnp, etilendiamina-2,4-dinitrofenilo) fue una donación de la Dr. Maria Aparecida Juliano (Universidade Federal de São Paulo, Brasil).

Los anticuerpos o reactivos no especificados fueron adquiridos a Sigma-Aldrich. El agua empleada fue calidad Milli Q.

### 3.2. Insectos

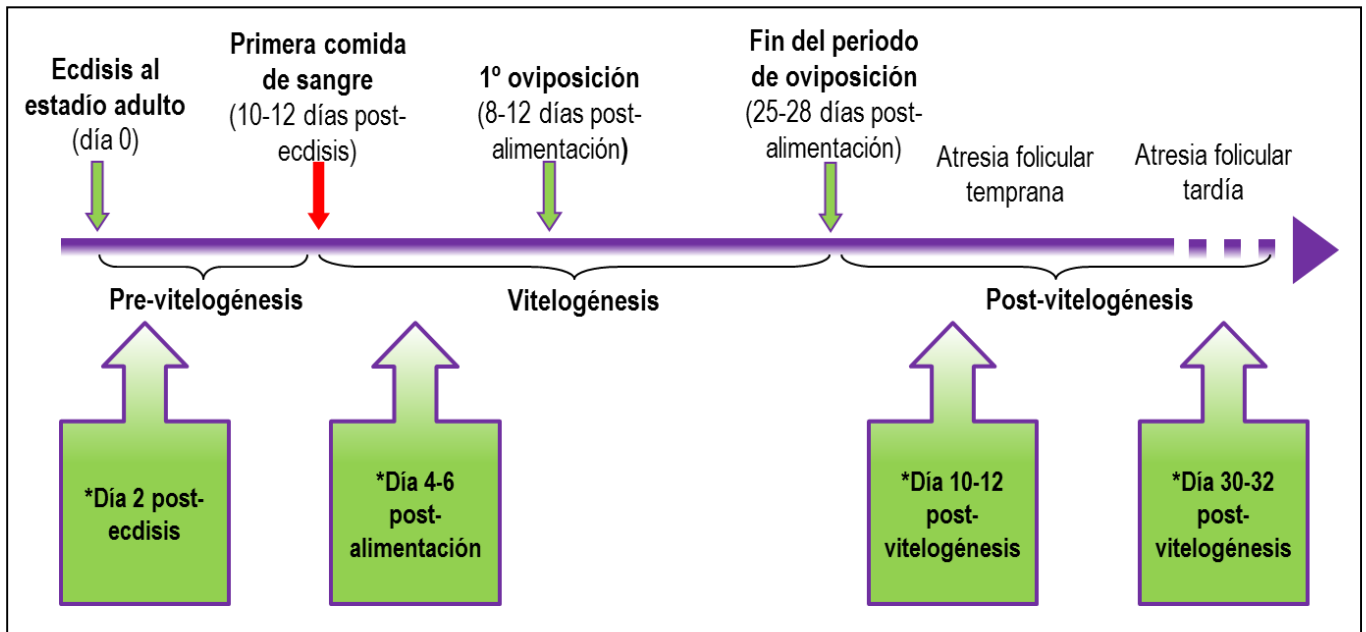
Los insectos utilizados fueron obtenidos a partir de una colonia de *D. maxima* establecida en nuestro insectario, alimentada sobre gallinas y mantenidos según las recomendaciones del Centro de Referencia de Vectores (Santa María de Punilla, Córdoba,

Ministerio de Salud de la Nación) en las siguientes condiciones:  $28 \pm 1$  °C, 60-70 % de humedad y fotoperíodo de 8:16 h luz:oscuridad.

Para los experimentos, las hembras fueron separadas de los machos a partir del V estadio ninfal, luego de lo cual fueron alimentadas con una comida de sangre que representó  $7,2 \pm 1,5$  veces su peso corporal, asegurando en estas condiciones la obtención de hembras no autógenas<sup>135</sup>. Luego de la ecdisis al estadio adulto, las hembras fueron separadas y ubicadas individualmente en frascos junto con dos machos previamente alimentados, por 48 h, controlándose el apareamiento mediante la observación del espermátforo. A los 10-12 días post-ecdisis las hembras apareadas fueron alimentadas sobre gallinas con una ingesta que representó entre 3,0 a 5,5 veces el peso corporal del insecto. En todos los casos, la cantidad de sangre ingerida fue estimada determinando el peso de la hembra antes y después de ser alimentada.

Como se indica en la Fig. 10, en *D. maxima* el período comprendido entre la ecdisis y la primera alimentación en el estadio adulto correspondió a la fase pre-vitelogénica. En tanto, la ingesta de sangre marcó el comienzo de la fase vitelogénica. En estas condiciones estandarizadas, la primera oviposición ocurre entre los días 8-12 post-alimentación, extendiéndose aproximadamente hasta los días 25-28 post-alimentación. El comienzo de la fase post-vitelogénica se registró por el cese en la postura de huevos, condición que fue confirmada si durante 5 días consecutivos no se observó oviposición. En el período post-vitelogénico la degeneración de folículos fue gradual y caracterizada por cambios morfológicos que permiten distinguir un estadio temprano y uno tardío o avanzado de atresia folicular. Para todos los experimentos diseñados en este trabajo, las hembras fueron monitoreadas diariamente durante todo el ciclo reproductivo, hasta los 30-32 días post-vitelogénesis, registrándose en todos los casos el comienzo y final de la oviposición. Durante la post-vitelogénesis, las hembras no recibieron ninguna comida de sangre.

A los fines experimentales, la obtención de la hemolinfa, el cuerpo graso y tejido ovárico se realizó en días representativos para cada fase del ciclo reproductivo de *D. maxima* según se indica: fase pre-vitelogénica (2 días post-ecdisis), fase vitelogénica (4-6 días post-alimentación), atresia folicular temprana (10-12 días post-vitelogénesis) y atresia folicular tardía (30-32 días post-vitelogénesis)<sup>25,28,131</sup>.



**Fig. 10: Fases del ciclo reproductivo de *D. maxima*.** En condiciones estandarizadas del laboratorio, la fase pre-vitelogénica comprende el período desde la ecdisis al estadio adulto (día cero) hasta la ingesta de sangre (~10-12 días post-ecdisis), evento que marca el inicio de la vitelogénesis. La primera oviposición tiene lugar alrededor de los días 8-12 post-alimentación y se extiende hasta los días 25-28 post-alimentación. El cese en la postura de huevos marca el inicio del período post-vitelogénico, caracterizado por la degeneración de folículos ováricos (atresia folicular) y la resorción de ovocitos terminales (oosorción). Los cambios morfológicos en la post-vitelogénesis permiten diferenciar dos estadios de la atresia folicular, uno temprano y uno tardío. Los asteriscos dentro de las flechas indican los días representativos de cada fase para la obtención del material biológico (adaptado de ref. 25).

### 3.3. Obtención de hemolinfa, cuerpo graso y tejido ovárico

La hemolinfa fue obtenida a partir de hembras de *D. maxima* en los diferentes estadios del ciclo reproductivo según lo indicado en la sección [3.2]. Las hembras fueron inmovilizadas y las extremidades fueron seccionadas a nivel de las coxas. La hemolinfa fue colectada con una microjeringa Hamilton, realizando una suave presión sobre el abdomen y colocada en tubos eppendorf fríos conteniendo Na<sub>2</sub>EDTA 10 mM y ditioneitol (DTT) 5 mM. Para los ensayos de western blot y para la purificación de lipoforina o vitelogenina a partir de hemolinfa, una mezcla de inhibidores de proteasas fue agregada a las muestras: fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM, N- $\alpha$ -p-tosil-lisina clorometil cetona (TLCK) 1 mM, aprotinina 0,3  $\mu$ M; pepstatina 1  $\mu$ M y benzamidina 1 mM. En todos los casos, las muestras de hemolinfa fueron centrifugadas para

remover los hemocitos (10 min, 10.000 x g, 4 °C) y utilizadas en los ensayos bioquímicos, previa determinación de proteínas<sup>136</sup>.

Los tejidos ováricos y los cuerpos grasos fueron cuidadosamente diseccionados a partir de hembras en las diferentes fases reproductivas, en presencia de buffer fosfato salino frío (PBS: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,6 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), empleando una lupa estereoscópica equipada con fibra óptica. Posteriormente, los tejidos fueron procesados según lo indicado para cada ensayo.

### **3.4. Obtención de criosecciones de tejido ovárico para estudios histomorfológicos, histoquímicos y de inmunofluorescencia**

Para la obtención de criosecciones, los ovarios fueron fijados con paraformaldehído 4 % en PBS, durante 30 min a temperatura ambiente. La crio-protección se realizó mediante pasajes seriados en soluciones de concentración creciente de sacarosa en PBS (de 10 al 30 %) y luego de ser embebidos en OCT, fueron congelados con nitrógeno líquido. Las secciones de 8 µm obtenidas con un criostato Leica CM1510 (Leica Microsystems) fueron colocadas en portaobjetos tratados con poli-l-lisina 0,01 %.

Para los estudios histo-morfológicos, las secciones de tejido ovárico fueron coloreadas con azul de toluidina 0,1 % (en 1 % de ácido acético) durante 1 min a temperatura ambiente, y observadas en un microscopio de campo claro (Zeiss).

Las criosecciones de tejido ovárico también fueron empleadas en ensayos histoquímicos y de inmunofluorescencia según se indique oportunamente, y examinadas en un microscopio láser confocal Olympus FV300 (Tokio, Japón). Las imágenes fueron adquiridas y procesadas con los software FluoView FV1000 version 1.7.1.0 o FluoView v5.0, según se indique.

### **3.5. Purificación de lipoforina, vitelina y vitelogenina**

Para la purificación de lipoforina (densidad 1,140 g/ml), la hemolinfa colectada de hembras en vitelogénesis (día 6 post-alimentación) fue sometida por ultracentrifugación

(300.000 x g, 4 h, 4 °C) empleando un gradiente de KBr, seguido de un fraccionamiento en Sepharose 6B según lo reportado con anterioridad<sup>118</sup>. La lipoforina purificada fue desalada en columnas PD-10 con PBS, concentrada por ultrafiltración (Centricon 100) y almacenada a 4 °C hasta una semana en presencia de inhibidores de proteólisis (PMSF 1 mM, TLCK 1 mM, aprotinina 0,3 µM y pepstatina 1 µM), previa determinación de proteínas.

La purificación de vitelina se realizó a partir de homogenatos de ovocitos corionados obtenidos de hembras de *D. maxima* vitelogénicas, mediante una doble cromatografía de intercambio iónico, empleando una columna empaquetada con DEAE-Trisacryl M (1,5 x 14,5 cm) y equilibrada con buffer Tris-HCl-Na<sub>2</sub>EDTA (Tris 20 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 2,5 mM, pH 8,3) según lo reportado por Aguirre y col (2008)<sup>28</sup>. La columna fue lavada exhaustivamente con el mismo buffer y las proteínas fueron eluidas con un gradiente lineal de NaCl (0-300 mM, flujo 20 ml/h). Se colectaron fracciones de 1,5 ml, monitoreando proteínas a 280 nm<sup>28</sup>.

La vitelogenina fue aislada a partir de la hemolinfa de hembras vitelogénicas (día 6 post-alimentación) según Fruttero y col. (2011)<sup>118</sup>, mediante dos etapas de ultracentrifugación con un gradiente discontinuo de KBr, seguido de una cromatografía de intercambio iónico según lo descrito para vitelina.

Las fracciones con un perfil proteico compatible con vitelina y vitelogenina fueron concentradas por ultrafiltración (Centricon-100) y almacenada a 4 °C hasta una semana, previa determinación de proteínas.

La purificación de lipoforina, vitelina y vitelogenina fue monitoreada mediante el fraccionamiento por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativa (6 %)<sup>137</sup> y desnaturalizante (SDS-PAGE, 7,5 %)<sup>138</sup>, teñidos con Azul Brillante de Coomassie R-250.

### **3.6. Conjugación de vitelina y lipoforina con trazadores fluorescentes**

La lipoforina fue conjugada con Dil (Lp-Dil), un fluoróforo hidrofóbico no transferible que se intercala en la fracción fosfolipídica de las partículas. La conjugación se realizó incubando la lipoproteína (1 mg/ml) en PBS con Dil resuspendido en DMSO (3 mg/ml), a 37 °C y con agitación constante durante 16 h<sup>139</sup>. Vitelogenina y lipoforina también fueron conjugadas en su fracción proteica con Oregon Green (Lp-OG o Vg-OG, respectivamente) mediante la reacción de acoplamiento mediada por carbodiimida<sup>140</sup>. Se incubaron 1 mg de lipoforina o vitelogenina,



según corresponda, con OG (1 mg/ml) y EDAC (10 mg/ml) en buffer HEPES 0,1 M a temperatura ambiente, durante 2 h y con agitación constante.

Para poder seguir el destino de la carga lipídica de lipoforina, esta lipoproteína fue conjugada con el fluoróforo Bodipy FL C<sub>16</sub> (Bodipy-FA), un análogo del ácido palmítico. Bodipy-FA (0,3 mg) fue mezclado con perlas de vidrio (30 mg) en cloroformo/metanol (2:1 v/v) durante 15 min con agitación suave. El solvente fue evaporado bajo una corriente de nitrógeno, dejando un “film” de Bodipy-FA sobre las perlas. A continuación, se agregó 2 mg de lipoforina en PBS, incubándose 2 h con suave agitación. Las perlas fueron removidas por centrifugación a 10.000 x g durante 5 min, obteniendo así la lipoproteína conjugada (Lp-Bodipy-FA)<sup>141</sup>.

En todos los casos, las moléculas marcadas con fluorescente fueron sometidas a columnas PD-10 para la remoción de los fluoróforos no conjugados.

### **3.7. Obtención de anticuerpos anti-vitelina y anti-lipoforina**

El anticuerpo policlonal anti-vitelina (anti-Vt) utilizado en diferentes ensayos fue obtenido según Aguirre y col. (2008)<sup>28</sup>, inoculando conejos con las dos subunidades mayores de la vitelina (PM ~ 170 y 174 kDa) obtenidas a partir del fraccionamiento de vitelina purificada en geles de poliacrilamida. La fracción  $\gamma$ -globulina fue obtenida por precipitación con sulfato de amonio y el anticuerpo anti-Vt fue concentrado, fraccionado en alícuotas y almacenado a - 20 °C. Según lo reportado por nuestro laboratorio, los ensayos de inmunotransferencia demostraron que el anticuerpo anti-vitelina reacciona contra vitelogenina purificada y con la hemolinfa de hembras vitelogénicas, indicando que vitelogenina y vitelina comparten similares características inmunológicas<sup>28</sup>.

El anticuerpo policlonal anti-lipoforina (anti-Lp) fue obtenido según lo descrito para el anticuerpo anti-Vt, excepto que los conejos fueron inoculados con lipoforina purificada<sup>142</sup>.

### **3.8. Conjugación de anti-vitelina y anti-lipoforina con FITC**

El anticuerpo anti-vitelina fue dializado contra buffer borato (H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 200 mM, pH 9,2) y conjugado con FITC (anti-Vt-FITC), según Hermanson (1996)<sup>140</sup>. Brevemente, 1 mg de anti-vitelina fue incubada con FITC en DMSO (1 mg/ml) durante 2 h a 4 °C, con

agitación constante. Luego de una diálisis exhaustiva en buffer fosfato ( $\text{Na}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,01 M, pH 7,5) el material fue sometido a una columna PD-10 para eliminar el fluoróforo no unido. Posterior a la determinación de proteínas, la relación FITC/anti-Vt fue estimada espectrofotométricamente a 492 nm y a 280 nm. Anti-Vt-FITC fue fraccionada en alícuotas y conservada a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  para su empleo.

El anticuerpo anti-lipoforina también fue conjugado con FITC (anti-Lp-FITC), siguiendo el protocolo descrito para el anticuerpo anti-Vt-FITC<sup>118</sup>.

### **3.9. Obtención de ARN total**

La extracción de ARN de cuerpo graso y tejido ovárico de hembras en las distintas fases del ciclo reproductivo se realizó empleando el equipo comercial “MasterPure RNA purification kit” (Promega), siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, los tejidos diseccionados fueron homogeneizados en frío y transferidos a microtubos pre-enfriados (~ 1-5 mg de homogenato/tubo). Luego del agregado de la solución de lisis y proteinasa K, provistos comercialmente, los microtubos fueron incubados a  $65\text{ }^\circ\text{C}$  por 15 min, agitando en vortex cada 5 min. Posteriormente se agregó el reactivo precipitante y se agitó vigorosamente con vórtex (10 s, temperatura ambiente). Las muestras fueron centrifugadas a  $10.000 \times g$  (10 min,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ) y los sobrenadantes resultantes fueron cuidadosamente transferidos a microtubos nuevos. Luego del agregado de 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol al sobrenadante y la inversión reiterada de los microtubos, las muestras fueron centrifugadas en las condiciones anteriormente descritas para obtener los “pellets”. Para eliminar el ADN genómico, las muestras obtenidas se trataron con la enzima DNasa provista por el equipo comercial. Los “pellets” fueron lavados con etanol al 70 % y solubilizados en buffer con el agregado de un inhibidor de RNasa, provisto por el kit. La concentración de ARN en las muestras fue evaluada mediante el registro de la absorbancia a 260 nm. Se determinó la relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm para evaluar la calidad de la muestra obtenida.

### 3.10. Obtención de ADN complementario: Transcripción reversa

La transcripción reversa (RT) del ARNm y su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR), se realizó de acuerdo a métodos estándares, con ligeras modificaciones<sup>143</sup>. La RT se realizó a partir de 2 µg de ARN total, utilizando la enzima aislada del virus de la leucemia murina Moloney (M-MLV-RT). Brevemente, el ARN en agua libre de RNAsas fue desnaturalizado (65 °C, 3 min) y luego del agregado del buffer provisto por el fabricante y los Oligo dT, se incubó en un termociclador (iCycler, Bio-Rad). Posteriormente, a la mezcla de reacción se le adicionaron los deoxinucleósidos trifosfatos (dNTPs) y la transcriptasa reversa, incubándose durante 60 min a 37 °C. La reacción se inactivó a 94 °C durante 5 min. El ADN complementario (ADNc) obtenido se utilizó en las reacciones de PCR convencional o PCR en tiempo real (qPCR).

### 3.11. Cuantificación de proteínas, carbohidratos y lípidos

La concentración de proteínas en la hemolinfa y en los homogenatos de tejidos fue determinada según Bradford (1976)<sup>136</sup>, empleando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

Para establecer los cambios de las reservas de lípidos y carbohidratos en los tejidos ováricos durante las fases reproductivas, el tejido ovárico fue procesado según Van Handel (1965)<sup>144</sup>. Posteriormente, la cuantificación de lípidos y glucógeno fue realizada mediante ensayos colorimétricos según lo reportado con anterioridad<sup>145,118</sup>.

La composición lipídica del tejido ovárico en las distintas fases del ciclo reproductivo se estableció procesando los ovarios según Folch y col. (1957)<sup>146</sup>, empleando cloroformo/metanol (2:1 v/v) para obtener el extracto lipídico. Los lípidos se secaron en atmósfera de N<sub>2</sub> y se fraccionaron por cromatografía en capa delgada (TLC) empleando placas de Sílica Gel 60G y la mezcla de hexano/éter etílico/ácido fórmico (70:30:3 v/v/v) como fase móvil. Las placas fueron reveladas por la exposición al reactivo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 %/(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O 0,04M/Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 3 mM y posterior calentamiento. Luego, las manchas reveladas fueron analizadas por densitometría, empleando estándares con movilidad conocida<sup>145</sup>.

### 3.12. Distribución de los depósitos lipídicos en tejido ovárico

Para evaluar la distribución de los adiposomas en tejidos ováricos, las criosecciones de tejido obtenidas según se indicó en la sección [3.4] fueron teñidas con una solución de Oil Red O 0,3 % en isopropanol 60 %, durante 30 min a temperatura ambiente<sup>147,148</sup>. Luego de la incubación, los portaobjetos fueron lavados cuidadosamente con PBS y secados a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente fueron montados con Fluorsave y observados en un microscopio Eclipse TE2000-U (Nikon). Las imágenes digitales fueron capturadas con una cámara Nikon Digital Sight DS-U1 y procesadas con el software ACT-2U version 1.51.116.256. El Oil Red O es un colorante que tiñe lípidos neutros, principalmente TAG, proporcionando una coloración rojiza.

### 3.13. Estudios *in vivo* con trazadores fluorescentes

Para seguir el destino de la lipoforina en el tejido ovárico, las hembras de *D. maxima* en diferentes fases del ciclo reproductivo fueron inyectadas individualmente con 20 µg de Lp-Dil o Lp-OG en el hemocele. Las hembras fueron mantenidas a 28 °C hasta su disección, la cual se realizó en buffer PBS a las 3 h post-inyección. En ensayos paralelos, la endocitosis de lipoforina por los ovocitos fue analizada mediante la co-inyección de Vg-OG y Lp-Dil bajo condiciones experimentales similares.

Por otro lado, el destino de la carga lipídica de lipoforina se evaluó mediante la co-inyección de Lp-Bodipy-FA y de Lp-Dil (20 µg/insecto para cada trazador fluorescente). Los insectos fueron mantenidos y procesados en las condiciones detalladas anteriormente. En todos los casos, los tejidos ováricos diseccionados fueron procesados para la obtención de criosecciones según se indicó en la sección [3.4], las que fueron montadas en Fluorsave y analizadas en un microscopio láser confocal Olympus FV300 equipado con los láseres 488 y 543 nm. El procesamiento de las imágenes se realizó con el software FluoView FV1000 version 1.7.1.0.

Se realizaron controles de inhibición de la endocitosis mediante la inyección de Lp-Dil y manteniendo los insectos a 4 °C hasta el momento de la disección.

### 3.14. Estudios de inmunofluorescencia directa

La localización de lipoforina en el tejido ovárico de hembras vitelogénicas se realizó por inmunofluorescencia directa. Para ello, las criosecciones de tejido ovárico fueron bloqueadas con BSA 1 %, Tritón X-100 0,1 % y suero fetal bovino (SFB) 5 % en PBS (60 min, 37 °C). Posteriormente, fueron incubadas con anti-Lp-FITC diluido en BSA 1% en PBS (1:40). Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda y protegidas de la luz. Por último, las secciones de tejido fueron lavadas con PBS, montadas con Fluorsave y examinadas en un microscopio confocal según se detalló en la sección [3.13].

### 3.15. Proteólisis *in vivo* de vitelina durante el proceso de atresia folicular

La degradación de vitelina durante la atresia folicular se evidenció mediante ensayos *in vivo*. Para ello, los ovarios de hembras fueron obtenidos en las fases pre-vitelogénica (día 2 post-ecdisis), vitelogénica (días 4 a 6 post-alimentación) y de atresia temprana (días 10-12 post-vitelogénesis) y tardía (días 30-32 post-vitelogénesis) según lo detallado en la sección [3.2]. Los tejidos fueron homogenizados en un buffer Tris-NaCl (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), a 4 °C y en presencia de inhibidores de proteólisis (PMSF 1 mM, TLCK 1 mM, aprotinina 0,3 µM y pepstatina 1 µM). Luego de dos etapas de centrifugación a 4 °C (5 min a 3.000 x g y 30 min a 15.000 x g, respectivamente), se recolectaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de proteínas (Bradford 1976). Los extractos proteicos (8 µg/calle) fueron fraccionados en SDS-PAGE (7,5 %) y electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa (400 mA, 1 h). Los productos de proteólisis de vitelina fueron evaluados por western-blot, utilizando anti-Vt (1:5000) y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (1:5000), revelados por quimioluminiscencia<sup>25</sup>. El anticuerpo anti-Vt reconoce las dos subunidades mayores de vitelina (Mr ~ 170 kDa y 174 kDa), detectadas como una única banda inmunorreactiva<sup>25,28</sup> y a sus fragmentos proteolíticos. La vitelina purificada fue utilizada como control (0,2 µg/calle para evitar la sobre-expresión).

### 3.16. Actividad de peptidasas ácidas en tejido ovárico

Los ovarios diseccionados a partir de hembras de *D. maxima* en las diferentes fases del ciclo reproductivo fueron homogenizados en buffer fosfato de sodio 20 mM a pH 7,0. Luego de una centrifugación (10.000 x g, 20 min, 4 °C), los sobrenadantes fueron utilizados como fuente enzimática, previa determinación de proteínas<sup>136</sup>. La actividad de peptidasas ácidas fue evaluada empleando hemoglobina como sustrato (concentración final 0,2 %) en un medio de reacción conteniendo buffer acetato de sodio 100 mM a pH 4,0 y 40-200 µg de extracto proteico (volumen final de la reacción 50 µl)<sup>149</sup>. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 1 h a 37 °C y se detuvieron por el agregado de 40 µl de TCA al 10 %. Luego de una centrifugación a 8.000 x g (20 min, 4 °C), los péptidos solubles fueron cuantificados a 280 nm. La actividad hemoglobinolítica específica se expresó como  $A_{280}/\mu\text{g}$  proteína de homogenato/h<sup>25</sup>.

Para identificar la/s clases de peptidasas presentes en los homogenatos de ovario, estos fueron incubados en presencia de inhibidores específicos de aspártico peptidasas (pepstatina A) y de cisteína peptidasas (E64), ambos a una concentración final de 10 µM (30 min a 37 °C). Posteriormente, la actividad de peptidasas ácidas se determinó como fue indicado anteriormente.

Para todas las condiciones ensayadas, los blancos de reacción fueron realizados mediante la adición del sustrato después de la etapa del agregado de TCA.

### 3.17. Actividad de catepsina D en cuerpo graso, hemolinfa, tejido ovárico

La actividad de la catepsina D utilizando el sustrato fluorógeno Abz-AIAFFSRQ-EDDnp<sup>150-152</sup> fue determinada en homogenatos de tejidos (cuerpo graso o tejido ovárico) obtenidos según lo detallado en la sección [3.3] y en la hemolinfa. Brevemente, 10-30 µg de proteínas fueron incubadas en un medio de reacción que contiene el sustrato fluorógeno (concentración final de 20 µM) en buffer citrato-fosfato 20 mM (pH 3,5). Los ensayos se realizaron en microplacas de 96 pocillos, con un volumen final de reacción de 100 µl. Las placas fueron incubadas a 37 °C y las reacciones fueron monitoreadas cada 11 s durante 30 min en un fluorómetro equipado con filtros de 320/430 nm de excitación/emisión (F-Max, Molecular Devices, Inc). El efecto del pH sobre la actividad enzimática de catepsina se analizó

realizando los ensayos en un medio conteniendo buffer citrato-fosfato 20 mM con pHs en el rango de 2,0 a 5,0.

La actividad de catepsina B y L, ambas cisteína peptidasas, fue evaluada utilizando sustratos fluorogénicos específicos acoplados a MCA (methyl-coumaryl-7-amide) (Z-RR-7-amido-MCA y Z-FR-7-amido-MCA, respectivamente), con una concentración final de 20  $\mu$ M en el medio de reacción. Las condiciones de ensayo y el monitoreo fluorométrico se realizó de manera similar que lo descrito para catepsina D, pero empleando filtros de 370/460 nm de excitación/emisión.

En todos los casos, las actividades enzimáticas fueron expresadas como unidades de fluorescencia relativa (UFR)/ $\mu$ g de proteína/min<sup>25</sup>.

### **3.18. Análisis de los productos de clivaje del sustrato para catepsina D mediante espectrometría de masas (LC-MS).**

La actividad de catepsina D fue confirmada analizando los productos de digestión del sustrato fluorogénico Abz-AIAFFSRQ-EDDnp mediante cromatografía líquida-HPLC (LC-HPLC de fase reversa) acoplada a espectrometría de masas en tándem (ESI-QTOF: electrospray cuadrupolo-tiempo de vuelo), en el Centro de Biotecnología de la Universidad Federal de Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil). Para el estudio, 5  $\mu$ l de la reacción enzimática fueron analizados un espectrómetro de masas Q-TOF Micro™ (Waters Corporation), acoplado a un detector nanoACQUITY Ultra Performance LC (UPLC, Waters Corporation) según las condiciones reportadas por Aguirre y col., 2011<sup>25</sup>. Finalmente, los datos fueron procesados y analizados utilizando el software MassLynx™ v 4.1.

### **3.19. Actividad de fosfatasa ácida en tejido ovárico**

Con el propósito de determinar los cambios de actividad de fosfatasa ácida en tejido ovárico durante las fases del ciclo reproductivo de *D. maxima*, los ovarios fueron diseccionados y homogenizados en buffer acético/acetato de sodio 20 mM (pH 4,0), en presencia de DTT 10 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 10 mM e inhibidores de proteasas: PMSF (2 mM), pepstatina A (0,01 mM) e inhibidor de tripsina (SBTI, 50  $\mu$ M). Los homogenatos fueron sometidos a una doble

centrifugación (14.000 x g, 5 min, 4 °C), y los sobrenadantes obtenidos empleados como fuente enzimática, previa determinación de proteínas<sup>136</sup>.

La actividad enzimática se determinó evaluando la generación *p*-nitrofenol (*p*NP) a partir de la hidrólisis de *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP), en un medio de reacción conteniendo buffer ácido acético/acetato y 30 µg de proteínas del homogenato<sup>131</sup>. La reacción se inició con el agregado del sustrato (*p*NPP), y al cabo de 30 min de incubación a 37 °C, la reacción fue detenida por la adición de NaOH 1N. Paralelamente se realizaron controles sin el agregado de homogenato. El *p*NP generado se registró espectrofotométricamente a 405 nm y la actividad enzimática específica fue expresada como nmol *p*NP/mg de proteínas/min. Para cuantificar los nmoles de *p*NP producidos por la reacción se realizaron curvas de calibración con soluciones testigo.

Con el objetivo de establecer qué tipo de fosfatasa ácida está involucrada en el proceso de atresia, 30 µg de homogenato de tejido ovárico de hembras en atresia temprana fueron pre-incubados durante 30 min, a 37 °C en presencia de NaF (inhibidor de serina/treonina fosfatasas), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (inhibidor de tirosina fosfatasas) o con tartrato de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (inhibidor de fosfatasas ácidas de amplio espectro), todos en una concentración final de 1 mM. Posteriormente, la actividad de fosfatasa ácida se determinó según lo indicado anteriormente. El perfil de inhibición de actividad de fosfatasa ácida se estableció empleando homogenatos de ovarios de hembras en atresia temprana, por ser ésta la fase reproductiva donde se detectaron mayores niveles de actividad de la enzima.

Para confirmar si la actividad de fosfatasa ácida en el tejido ovárico atrésico está dirigida principalmente a residuos fosfotirosina (tirosina fosfatasa) o a residuos fosfoserina/fosfotreonina (serina/treonina fosfatasa) se llevaron a cabo ensayos enzimáticos empleando ovarios de hembras en la atresia temprana y tardía como fuente de enzima y fosfopéptidos sintéticos específicos como sustratos, utilizando un kit comercial (Promega) y respetando las condiciones del fabricante. Brevemente, las reacciones se desarrollaron en microplacas, agregando 3-5 µg de homogenato de tejido ovárico y los fosfopéptidos sintéticos específicos, en un medio de reacción ácido (pH 4,0). Luego de 30 min, la reacción fue detenida y la formación de fosfato libre se determinó registrando la absorbancia a 600 nm del complejo formado por fosfato, molibdato y verde de malaquita mediante un lector de microplacas (Multi-Mode Lector, Sienergy HT, BioTek Instruments). La actividad específica se expresó como pmol



de fosfato/mg de proteína/min<sup>153</sup>. La actividad enzimática dirigida a los sustratos fosfopeptídicos fue corroborada mediante ensayos de inhibición, incubando alícuotas de homogenato de tejido ovárico en atresia temprana y tardía en presencia de NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> o tartrato de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (concentración final 1 mM, 30 min, 37 °C). A continuación, los ensayos enzimáticos fueron realizados utilizando los equipos comerciales para tirosina o serina/treonina fosfatasas según se describió anteriormente.

### **3.20. Expresión del ARNm de catepsina D en cuerpo graso y tejido ovárico: reacción en cadena de la polimerasa convencional y en tiempo real**

El diseño de los cebadores o “primers” para catepsina D y la subunidad ribosomal 18S, se realizó empleando la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) considerando las regiones altamente conservadas de la enzima en distintas especies de insectos. Una vez diseñados los “primers” (Tabla 2), se comprobó su especificidad *in silico* mediante un análisis con el algoritmo en línea BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Las PCR convencionales fueron realizadas en un volumen final de 20 µl conteniendo 1x buffer de PCR, 0,5 µM del “primer sentido”, 0,5 µM del “primer anti-sentido”, 0,25 mM de cada dNTP, Taq polimerasa (1 U) y 2 µl de ADNc. El perfil térmico fue: 95 °C por 4 min; 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 25 s (32 ciclos para catepsina D y la unidad ribosomal 18S); 72 °C por 7 min. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en agarosa al 2 % y observados mediante tinción con bromuro de etidio, empleando un marcador de peso molecular para ADN. Como controles negativos se utilizaron agua estéril en lugar del producto de transcripción reversa y reacciones a las que no se adicionó la enzima transcriptasa reversa en la transcripción del ARN. Estos controles se realizaron principalmente en la puesta a punto de la técnica para cada par de “primers” utilizados. Todas las incubaciones fueron realizadas en un termociclador (*i*Cycler, Bio-Rad). La especificidad de los productos fue confirmada mediante secuenciamiento (Macrogen, Korea).

Las reacciones de qPCR fueron realizadas en el termociclador ABI Prism 7500 Detection System (Applied Biosystem) en volúmenes de 15 µl conteniendo 1X buffer PCR, 0,3 µM del “primer sentido”, 0,3 µM del “primer anti-sentido”, 0,25 mM de cada dNTP, Taq-

polimerasa (0,5 U), 1:40000 “SYBR Green”, 30 nM Rox y 1 µl de ADNc. El perfil térmico fue: 94 °C por 4 min; 94 °C por 32 s, 60 °C por 32 s, 72 °C por 32 s (40 ciclos para catepsina D y la unidad ribosomal 18S). La medición de la señal emitida por “SYBR Green” y la enzima Rox en cada ciclo fue realizada en la etapa de “annealing”. La cuantificación de los cambios relativos en la expresión del gen de interés respecto al gen de expresión constitutiva 18S usado como control interno, fue realizada mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Para cada par de “primers” y bajo las condiciones ensayadas se observó la presencia de un solo pico en la curva de disociación, indicando que un solo producto de PCR fue generado en la amplificación (resultados no mostrados). La identidad del producto se evaluó observando el tamaño previsto del amplicón mediante el fraccionamiento por electroforesis en geles de agarosa al 2 % y posterior secuenciamiento (Macrogen). Los resultados son mostrados como las veces de cambio en los niveles de expresión respecto a la pre-vitelogénesis, considerada arbitrariamente como 1.

Gen	Secuencia (5´-3´)	Amplicón	T° an.
Catepsina D	(S) GGTGAAGCACTGCTAGTGTCC (AS) AGCTTGATCTTCGGCAATTG	94 pb	60°
Subunidad ribosomal 18 S	(S) TCGGCCAACAAAAGTACACA (AS) TGTCGGTGTAAGTGGCATGT	104pb	60°

**Tabla 2: Secuencias de “primers” utilizadas para PCR convencional y PCR en tiempo real.** Se indica para cada gen, la secuencia de los “primers” utilizados en orientación 5´-3´, el tamaño del amplicón y la temperatura de “annealing” (T° an.) utilizada en la amplificación. (S) “sense”, (AS) “antisense”.

### 3.21. Expresión de catepsina D en cuerpo graso, hemolinfa y tejido ovárico: ensayos de western blot

Con el objetivo de evaluar la expresión de catepsina D, los cuerpos grasos, ovarios y hemolinfa fueron obtenidos a partir de hembras en las distintas fases del ciclo reproductivo. Los tejidos fueron homogenizados en buffer Tris-HCl-Na<sub>2</sub>EDTA (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, Triton X 100 0,1 %, pH 7,5) en presencia de inhibidores de proteasas (aprotinina 1µM, TLCK 0,5 mM y benzamidina 1 mM). Luego de dos etapas de centrifugación a 4 °C (10 min a 2.500 x g y 20 min a 20.000 x g, respectivamente), se colectaron los sobrenadantes y se determinó la

concentración de proteínas<sup>136</sup>. Los extractos proteicos de cuerpo graso y tejido ovárico y las muestras de hemolinfa (40 µg/calle) fueron fraccionados por electroforesis en geles SDS-Tris-Tricina (10 %)<sup>154</sup> y luego electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa (400 mA, 1h)<sup>155</sup>. Posteriormente, las membranas fueron coloreadas con Ponceau S (0,1 % en ácido acético 5 %) para controlar el proceso de transferencia y registrar la carga proteica en cada calle. Después de lavar la membrana con buffer Tris-HCl 10 mM-NaCl 150 mM (TBS, pH 7,5), la nitrocelulosa fue incubada en solución de bloqueo (TBS, Tween 20 0,1% y leche descremada 5 %) durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo policlonal anti-catepsina D (anticuerpo primario, 1:300) durante toda la noche a 4°C. Luego de los lavados, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (1:5000, 60 min, temperatura ambiente). En todos los casos, los anticuerpos se diluyeron con la solución de bloqueo. Las incubaciones se llevaron a cabo con agitación suave, realizándose 3 lavados con TBS entre las mismas. La inmunoreacción fue revelada por ECL según las instrucciones del fabricante. Tanto para cuerpo graso como para tejido ovárico, el análisis densitométrico fue realizado teniendo en cuenta la intensidad de las bandas compatibles con pro-catepsina D y catepsina D, y la carga total de proteínas en cada calle, evaluada por la tinción Ponceau S. El lisado celular MCF7, derivado de una línea celular de cáncer de mama, fue utilizado como control positivo.

### **3.22. Estudios de inmunofluorescencia para la localización de catepsina D y tirosina fosfatasa en el tejido ovárico**

La detección de catepsina D y tirosina fosfatasa en tejido ovárico se llevó a cabo mediante ensayos de inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos policlonales comerciales anti-catepsina D y anti-tirosina fosfatasa indicados en [3.1]. Las criosecciones de tejido ovárico de hembras en la fase vitelogénica y en atresia folicular temprana fueron bloqueadas con BSA 1 %, Tritón X-100 0,1 % y SFB 5 % en PBS (60 min, a 37 °C). Luego, las criosecciones fueron incubadas con el anti-catepsina D (1:100) o anti-tirosina fosfatasa (1:50) según corresponda, durante toda la noche a 4°C, y posteriormente con el anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con Alexa Fluor 568 (para catepsina D, 1:1000) o con Alexa Fluor 488 (para tirosina fosfatasa, 1:1000), durante 60 minutos a 37 °C. En todos los casos, los

anticuerpos se diluyeron con BSA 1 % en PBS. Finalmente, las secciones de tejido fueron lavadas con PBS, montadas con Fluorsave y observadas con un microscopio láser confocal Olympus FV300, equipado con los láseres de 543 nm y 488 nm.

### **Estudios de co-localización y ensayos de FRET**

La potencial co-localización de catepsina D y tirosina fosfatasa con vitelina en los gránulos de vitelo se analizó mediante la combinación de ensayos de inmunofluorescencia indirecta y directa. En una primera etapa, las criosecciones de tejido ovárico vitelogénico fueron procesadas según se detalló en los ensayos de localización para catepsina D y tirosina fosfatasa (sección [3.22]). Posteriormente, la detección de vitelina se realizó incubando las secciones de tejidos con anti-Vt-FITC (1:40) en PBS conteniendo BSA 1% (1 h, 37°C). Finalmente, los portaobjetos se lavaron con PBS y se procesaron para microscopía láser confocalizada según lo descrito para los ensayos de localización en [3.22].

La interacción catepsina D y tirosina fosfatasa con vitelina fue evaluada mediante FRET (“fluorescence resonance energy transfer” o transferencia de energía por resonancia de fluorescencia). Luego del procesamiento descrito para los ensayos de co-localización, la detección de FRET en el microscopio de fluorescencia fue evidenciada mediante la comparación de la intensidad de fluorescencia del donante (señal para vitelina) antes y después de destruir la fluorescencia del aceptor (señal para ambas hidrolasas ácidas) por “photobleaching”. Los experimentos se realizaron en el microscopio láser confocal Olympus Fluoview 300. Se aplicó un pulso de 15 s de alta intensidad con un láser de 543 nm para destruir la señal fluorescente de las enzimas (aceptores). Si hay interacción con vitelina, el “photobleaching” del aceptor dará lugar a un aumento en la señal fluorescente de la molécula donante<sup>156</sup>. Los resultados de los ensayos fueron analizados mediante el procesamiento de una serie de imágenes “pre-bleach” y “post-bleach”, utilizando el software v5.0 FluoView.

### 3.23. Catepsina D y fosfatasa ácida en la proteólisis *in vitro* de vitelina

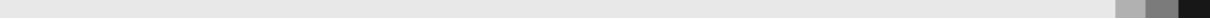
Con el fin de analizar la participación de catepsina D y fosfatasa ácida en la degradación de vitelina durante atresia folicular, se desarrollaron ensayos de proteólisis de vitelina *in vitro*, utilizando vitelina purificada como sustrato (sección [3.5]) y homogenatos de tejido ovárico en atresia temprana como fuente enzimática, obtenidos según lo descrito para los ensayos de proteólisis *in vivo* (sección [3.15])<sup>51</sup>.

En una primera instancia se evaluó la dependencia del pH en los eventos de proteólisis *in vitro* incubando 30 µg de vitelina purificada con 70 µg de homogenato ovárico, a 37 °C y durante 12 h, en presencia de Na<sub>2</sub>EDTA 5 mM y utilizando los siguientes sistemas buffers: formiato de amonio 50 mM (pH 3,0 y 3,5), acetato de sodio 50 mM (para el rango de pH entre 4,0 y 5,0) y fosfato de sodio 50 mM (pH 6,0 y 7,0). Las reacciones se detuvieron mediante la adición de “buffer simple” SDS-PAGE y se sometieron a ebullición durante 5 min<sup>94,152</sup>. Posteriormente, alícuotas conteniendo 50 µg de la mezcla de reacción fueron fraccionadas por electroforesis (SDS-PAGE, 7,5 %). Los productos de degradación de vitelina fueron evaluados por western-blot según lo detallado para los ensayos de proteólisis *in vivo* (sección [3.15]).

La participación de catepsina D y fosfatasa ácida en la proteólisis de vitelina se evaluó mediante ensayos *in vitro* en presencia y ausencia de inhibidores enzimáticos. Brevemente, las reacciones conteniendo vitelina purificada y homogenato de ovarios en atresia temprana según las condiciones establecidas anteriormente fueron incubadas en buffer acetato de sodio 50 mM, NaCl 200 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 5 mM (pH 4,0), en presencia o ausencia de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM (inhibidor de tirosinas fosfatasas); tartrato de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> 10 mM (inhibidor de fosfatasas ácidas de amplio espectro) o de un inhibidor específico de aspártico peptidasas (pepstatina A 80 mM). Paralelamente, una muestra de homogenato de ovario sin el agregado de vitelina purificada fue procesada en similares condiciones y utilizada como control para demostrar que el tejido ovárico no aporta cantidades significativas de vitelina al sistema de reacción.

### 3.24. Análisis estadísticos

A menos que se indique lo contrario, los resultados fueron expresados como la media ± error estándar de la media (EEM) de 3-4 experimentos independientes realizados por



triplicado, según se detalle en la leyenda de las figuras. Excepto para la obtención de ADNc, en donde solo se utilizó el tejido proveniente de un insecto por experimento, para el resto de las condiciones analizadas, los tejidos (ovárico y cuerpo graso) y hemolinfa fueron obtenidos y procesados a partir de 2 insectos.

Los gráficos y las pruebas estadísticas se realizaron empleando los programas GraphPad Prism 6.0 y GraphPad InStat 3.0. (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para el análisis de los grupos se utilizó el test de ANOVA y como post-test para comparaciones múltiples, el test de Student-Newman-Keuls. Un valor de  $P < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.



*Capítulo 4. RESULTADOS*

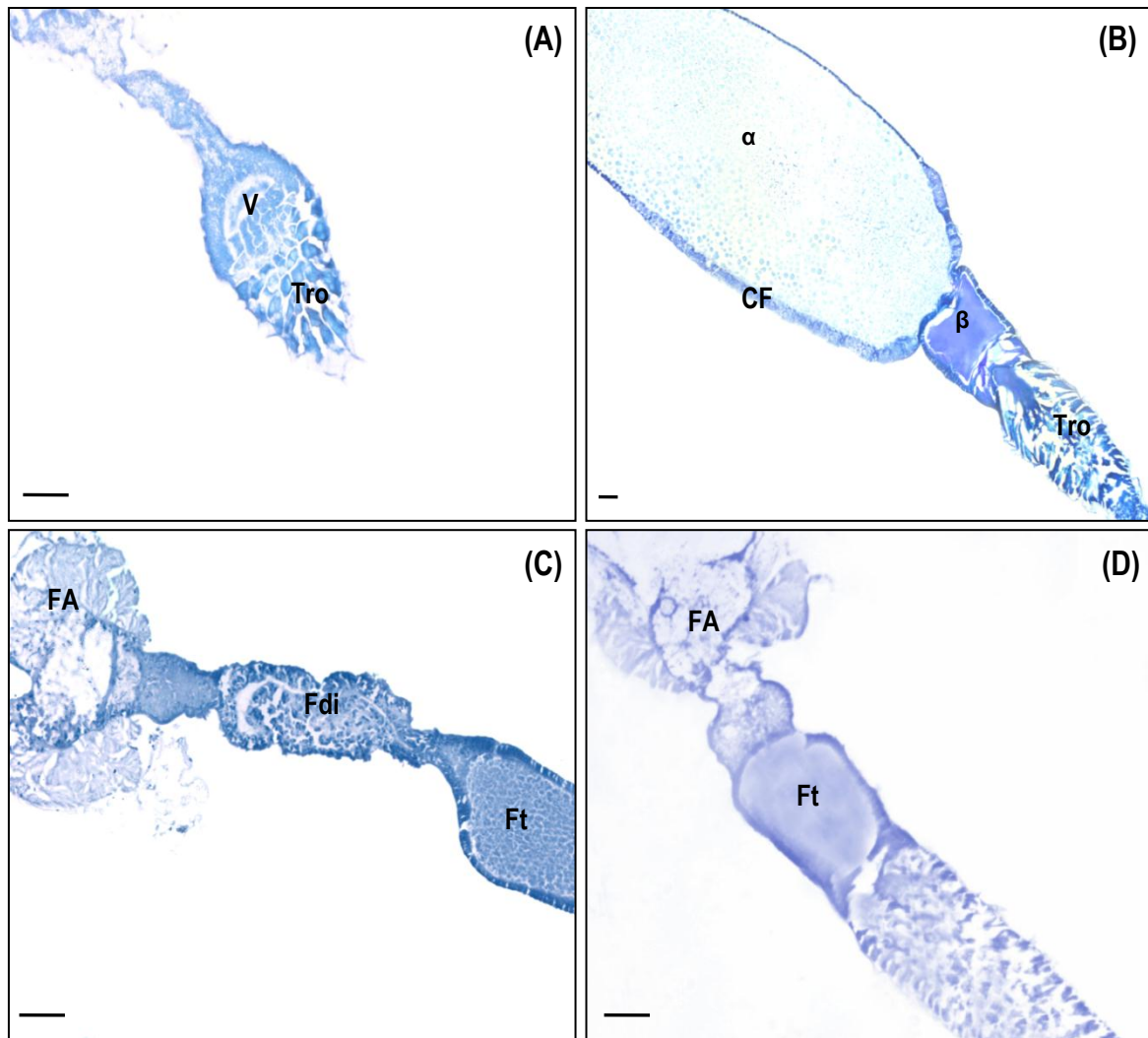
---

**4.1. Reservas nutricionales del tejido  
ovárico y dinámica de adquisición de  
lípidos por los ovocitos durante el ciclo  
reproductivo de *D. maxima***



#### 4.1.1. Estudios histo-morfológicos del tejido ovárico

Las características histológicas del aparato reproductor de las hembras *D. maxima* en las distintas fases de la reproducción fue analizada en criosecciones de tejido ovárico coloreadas con azul de toluidina. En la pre-vitelogénesis (día 2 post-ecdisis), las ovarias presentaron un vitelario poco desarrollado y un trofario apical prominente (Fig. 11A). La ingesta de la primera comida de sangre marcó el inicio de la vitelogénesis, registrándose un notable desarrollo del tejido ovárico, caracterizado por la presencia de ovarias conteniendo ovocitos vitelogénicos (posición  $\alpha$ ) de gran tamaño, rodeados por el epitelio folicular y con gránulos de vitelo distribuidos homogéneamente. En estas ovarias también se distinguieron ovocitos de menor tamaño en posición  $\beta$  (Fig. 11B). Bajo condiciones experimentales estandarizadas, en la post-vitelogénesis las ovarias disminuyeron progresivamente de tamaño y los folículos degeneran de manera gradual hasta un estadio atrésico. En estadios tempranos de la post-vitelogénesis (atresia temprana) fue posible observar simultáneamente folículos terminales conservado cierto grado de desarrollo, folículos en un estadio de degeneración incipiente y folículos resorbidos o atrésicos (Fig. 11C). En tanto, en estadios avanzados de degeneración (atresia folicular tardía), todas las ovarias presentaron escaso desarrollo y sólo se observaron folículos atrésicos (Fig. 11D).



**Fig. 11: Histo-morfología del tejido ovárico en las fases del ciclo reproductivo de *D. maxima*.** Tejido ovárico en las distintas fases del ciclo reproductivo teñidos con azul de toluidina. **(A)**, Sección longitudinal de una ovariola en la pre-vitelogénesis (día 2 post-ecdisis) mostrando un escaso desarrollo; **(B)**, Tejido en vitelogénesis (día 4-6 post-alimentación) mostrando una ovariola con un ovocito en posición  $\alpha$  con marcado desarrollo. Se observa la presencia de gránulos en el interior del folículo, distribuidos homogéneamente. También se distingue un ovocito en posición  $\beta$  con menor desarrollo. **(C)**, Sección de tejido en atresia folicular temprana (días 10-12 post-vitelogénesis), exhibiendo una ovariola conteniendo un folículo terminal con cierto grado de desarrollado coexistiendo con un folículo en degeneración incipiente y otro atrésico. **(D)**, Sección de tejido en atresia folicular tardía (días 30-32 post-vitelogénesis) mostrando una ovariola con escaso desarrollo conteniendo un pequeño folículo terminal y otro atrésico. Tro, trofario; V, vitelario; EF, epitelio folicular; Ft, folículo terminal; Fdi, folículos en degeneración incipiente; FA, folículos atrésicos. Barras: 100  $\mu\text{m}$ .

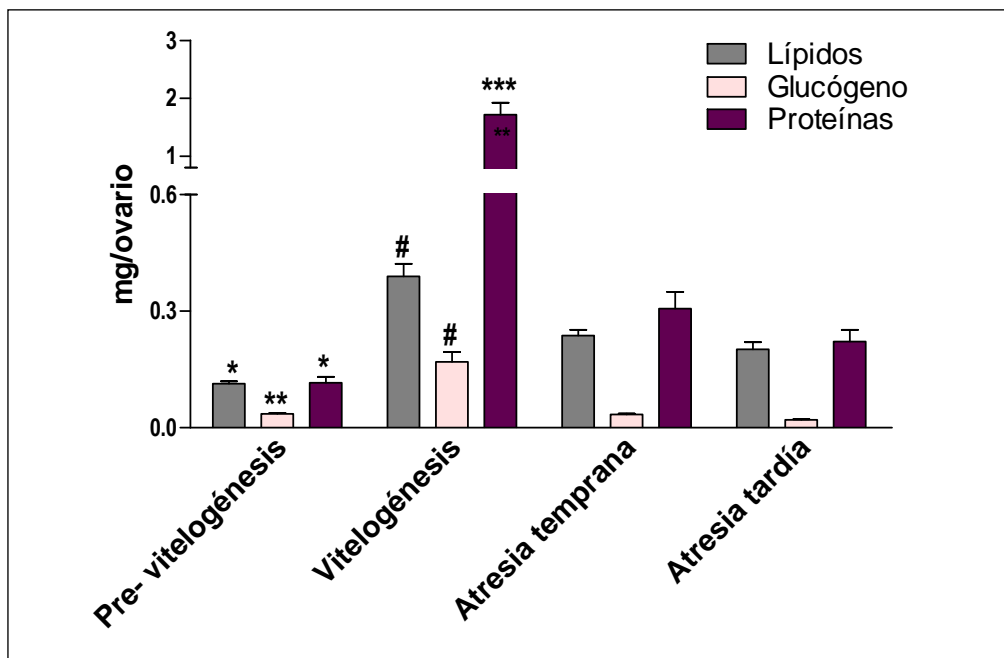
#### **4.1.2. Modificaciones de las reservas nutricionales del tejido ovárico y su relación con los cambios morfológicos del aparato reproductor**

Para correlacionar los cambios morfológicos del tejido ovárico con las modificaciones de las reservas nutricionales, en una primera instancia fueron cuantificados los depósitos de lípidos, proteínas y glucógeno del tejido ovárico de *D. maxima* en las distintas fases reproductivas.

En la pre-vitelogénesis, los ovarios son pequeños y presentaron escasos depósitos de los tres componentes nutricionales, con valores de proteínas y lípidos significativamente menores respecto a los detectados en los ovarios vitelogénicos y atrésicos (Fig. 12). Previsiblemente, durante la fase vitelogénica el tejido ovárico mostró un marcado desarrollo, observándose un incremento significativo en los depósitos de proteínas, lípidos y glucógeno, los que alcanzaron entre los días 4-6 post-alimentación una media de 1,71; 0,39 y 0,17 mg/ovario, respectivamente.

En la fase de atrésia folicular, coincidiendo con la disminución del tamaño de las ovariolas, los depósitos de los 3 nutrientes disminuyeron significativamente con respecto a los registrados en la vitelogénesis. Es de destacar que si bien durante ambas fases atrésicas las reservas de lípidos y proteínas fueron escasas, éstas fueron significativamente mayores a lo descrito en la fase pre-vitelogénica. Por el contrario, en la atrésia temprana y tardía, el contenido en glucógeno fue comparable con lo hallado en la pre-vitelogénesis. No se observaron diferencias significativas en los niveles de proteínas, lípidos y glucógeno cuando se compararon las dos fases de atrésia.

Considerando la fisiología de los triatomíneos, la disminución de las reservas nutricionales observadas en la atrésia folicular podrían responder a las necesidades de la hembra para facilitar su sobrevivencia y/o comenzar un nuevo ciclo gonadotrófico cuando las condiciones nutricionales mejoran.

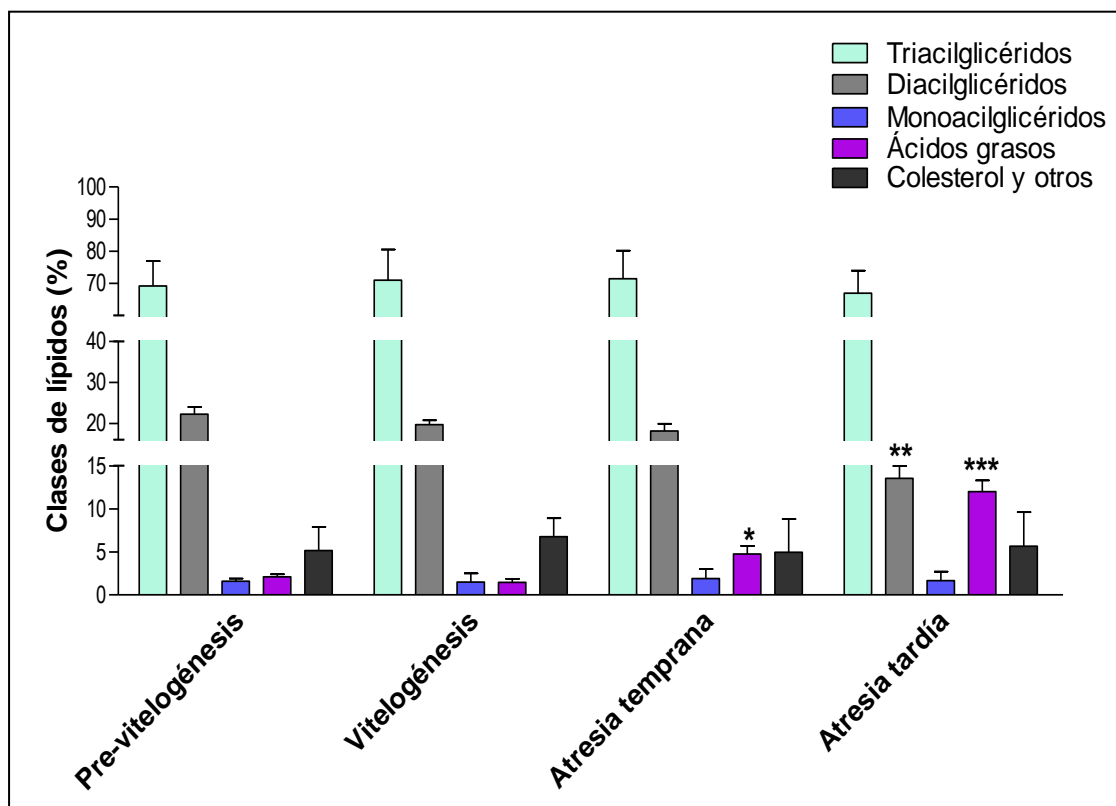


**Fig. 12: Reservas nutricionales en tejido ovárico durante el ciclo reproductivo de *D. maxima*. (A),** Depósitos de proteínas, lípidos y glucógeno en ovarios diseccionados a partir de hembras en pre-vitelogénesis, vitelogénesis y en atresia folicular temprana y tardía. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EEM ( $n = 4$ ). \* $P < 0,01$  vs. vitelogénesis, atresia temprana y tardía; \*\* $P < 0,05$  vs. vitelogénesis; # $P < 0,05$  vs. atresia temprana y tardía; \*\*\* $P < 0,01$  vs. atresia temprana y tardía.

#### 4.1.3. Composición y distribución de las reservas lipídicas en tejido ovárico

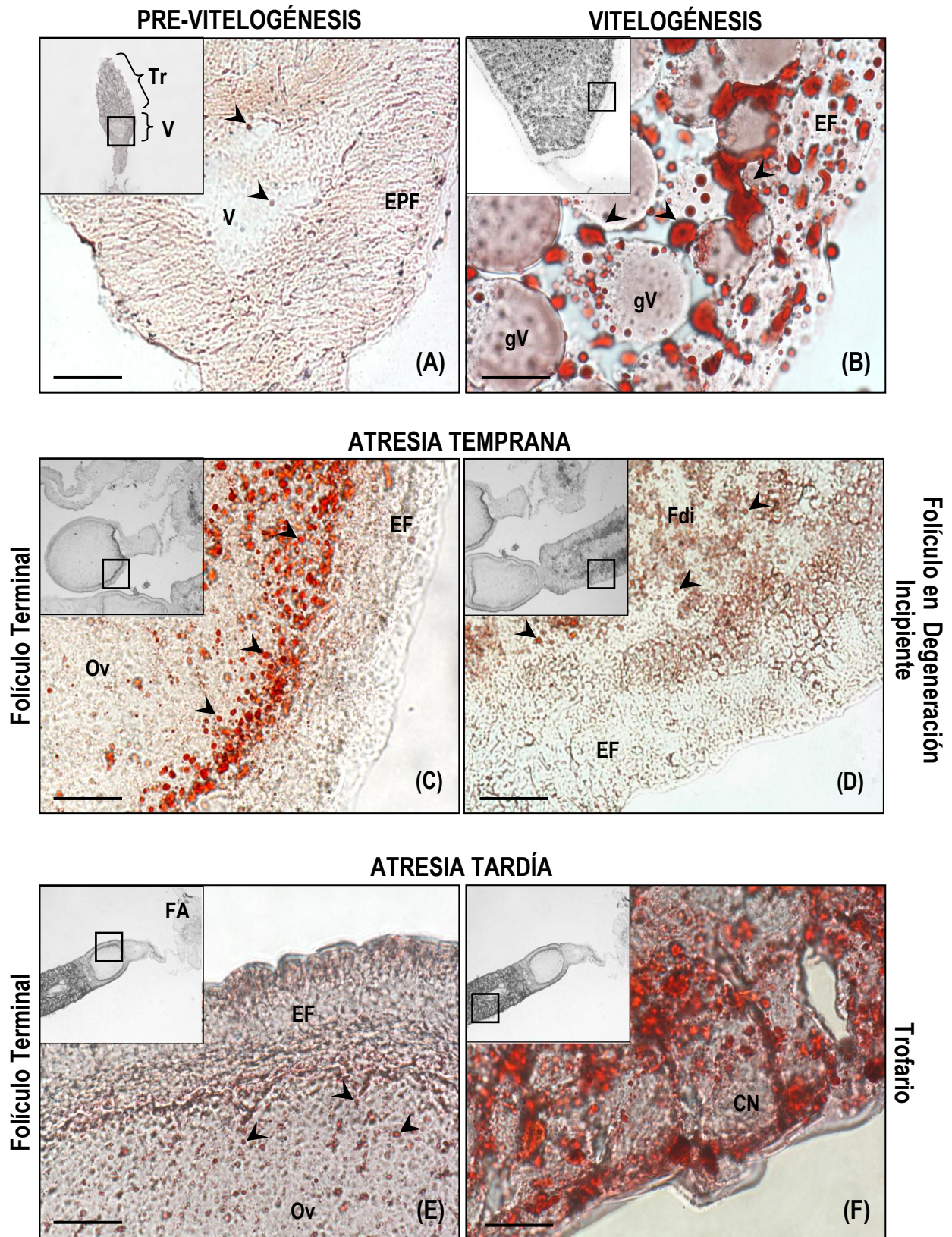
Con el objetivo de analizar la composición de las reservas lipídicas del tejido ovárico en las distintas fases del ciclo reproductivo, los lípidos totales fueron fraccionados por TLC con un sistema de solventes que permite separar las principales clases de lípidos neutros y los ácidos grasos libres. La distribución porcentual de las fracciones lipídicas detectadas mostraron que los TAG representan la principal forma de depósito de los lípidos en el tejido ovárico (~ 70 %), sin observarse cambios significativos en las diferentes fases de la reproducción. En tanto, el porcentaje de DAG disminuyó conforme avanza la fase atrésica con respecto a la vitelogénesis. Concomitantemente, se registró un aumento en el contenido de ácidos grasos, representando en la atresia tardía un 10 % del total de las fracciones de lípidos, mientras que

en la pre-vitelogénesis y vitelogénesis el porcentaje de ácidos grasos no superó el 2,5 %. La distribución porcentual de monoacilglicéridos, colesterol y otros lípidos minoritarios no mostró diferencias significativas en las diferentes fases reproductivas (Fig. 13). Los cambios en el contenido de DAG y ácidos grasos durante la atresia sugieren eventos de lipólisis en el tejido ovárico, probablemente destinados a conservar recursos energéticos en esta fase degenerativa de la reproducción.



**Fig. 13: Distribución porcentual de lípidos en el tejido ovárico en las distintas fases reproductivas.** Los lípidos totales fueron separados mediante cromatografía en capa delgada (TLC) y luego analizados por densitometría. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EEM ( $n = 4$ ). \* $P < 0,05$  vs. pre-vitelogénesis y vitelogénesis; \*\* $P < 0,05$  vs. pre-vitelogénesis, vitelogénesis y atresia temprana; \*\*\* $P < 0,01$  vs. pre-vitelogénesis, vitelogénesis y atresia temprana.

Para evaluar la distribución de las gotas de lípidos (adiposomas) en los ovarios de *D. maxima* durante el ciclo reproductivo, las criosecciones de tejido obtenidas en las diferentes fases fueron teñidas con Oil Red O. En la pre-vitelogénesis, el tejido ovárico mostró escasas gotas de lípidos, pequeñas y confinadas en la periferia del ovocito terminal (Fig. 14A). Por el contrario, en el tejido ovárico vitelogénico se encontraron abundantes adiposomas en los ovocitos en posición  $\alpha$ , de forma irregular y mayor tamaño en comparación con lo observado en la pre-vitelogénesis. Se observaron además, adiposomas grandes en el epitelio folicular (Fig. 14B). Por otro lado, en las ovariolas del tejido en atresia folicular temprana se distinguieron gotas de lípidos pequeñas y con un patrón de distribución diferencial según el folículo analizado. En este sentido, en aquellos folículos que conservaban cierto grado de desarrollo, los adiposomas se localizaron principalmente en la zona cortical de los ovocitos terminales. En tanto, en los folículos en degeneración incipiente, su distribución fue homogénea en todo el folículo (Figs. 14C-D). Los folículos terminales de los ovarios en atresia tardía exhibieron adiposomas de tamaño comparable con los observados en la pre-vitelogénesis, aunque más abundantes y con una distribución más homogénea (Fig. 14E). Sorprendentemente, en esta fase reproductiva, fueron visualizados numerosos adiposomas de gran tamaño en el trofario de algunas ovariolas (Fig. 14F). En la post-vitelogénesis, la observación de adiposomas pequeños en los folículos ováricos es compatible con la ocurrencia de eventos de lipólisis en esta fase degenerativa.



**Fig. 14:** Distribución de los adiposomas en el tejido ovárico en las fases del ciclo reproductivo de *D. maxima*. Secciones de tejido ovárico de hembras teñidas con Oil Red O y analizadas por microscopía óptica. (A) pre-vitelogénesis, (B) vitelogénesis, (C-D) atresia temprana y (E-F) tardía, respectivamente. (A), (B), (C) y (E) son micrografías de folículos terminales, (D) corresponde a un folículo en incipiente degeneración y (F) es una sección del trofario. Los insertos corresponden a las imágenes con menor magnificación. Resultados

similares fueron obtenidos en 3 ensayos independientes. Las cabezas de flecha indican los adiposomas. EPF, epitelio prefolicular; gV, gránulos de vitelo; EF, epitelio folicular; Fdi, folículo en degeneración incipiente; FA, folículo atrésico; V, vitelario; Ov, ovocito; CN, células nutricias. Barras: 20  $\mu$ m.

#### 4.1.4. Rol de lipoforina en la formación de las reservas lipídicas del tejido ovárico

##### Lipoforina en la fase vitelogénica

Para estudiar la participación de lipoforina, principal lipoproteína de insectos, en la transferencia y conformación de las reservas de lípidos en los ovocitos, se realizaron ensayos *in-vivo* de co-inyección con trazadores fluorescentes que permiten seguir el destino de la partícula lipoproteica (Lp-OG, verde o Lp-Dil, rojo) o el de su contenido lipídico (Lp-Bodipy-FA, verde).

En las hembras en vitelogénesis, cuando la formación de las reservas lipídicas es notablemente mayor respecto a las otras fases reproductivas, los resultados de la co-inyección de Lp-Dil (Fig. 15A) y Lp-OG (Fig. 15B) mostraron que ambos trazadores co-localizan significativamente en los ovocitos en posición  $\alpha$ , en estructuras compatibles con gránulos de vitelo, sugiriendo su endocitosis (Fig. 15C). También fue observada la co-localización en el espacio perioocítico, en consonancia con el rol de lipoforina en la transferencia de lípidos a nivel de la membrana plasmática descrita para los tejidos periféricos (Fig. 15C). Por otro lado, los ensayos de inmunofluorescencia directa usando el anticuerpo anti-Lp-FITC también mostraron que la lipoforina se encuentra asociada a estructuras compatibles con gránulos de vitelo (Fig. 15D). En conjunto, los resultados obtenidos en esta etapa sugirieron que hay endocitosis de lipoforina en los ovocitos vitelogénicos. Además, debido a que el perfil de fluorescencia obtenido con Lp-Dil y Lp-OG fueron similares, fue posible diseñar experimentos ulteriores utilizando Lp-Dil para seguir el destino de la partícula.

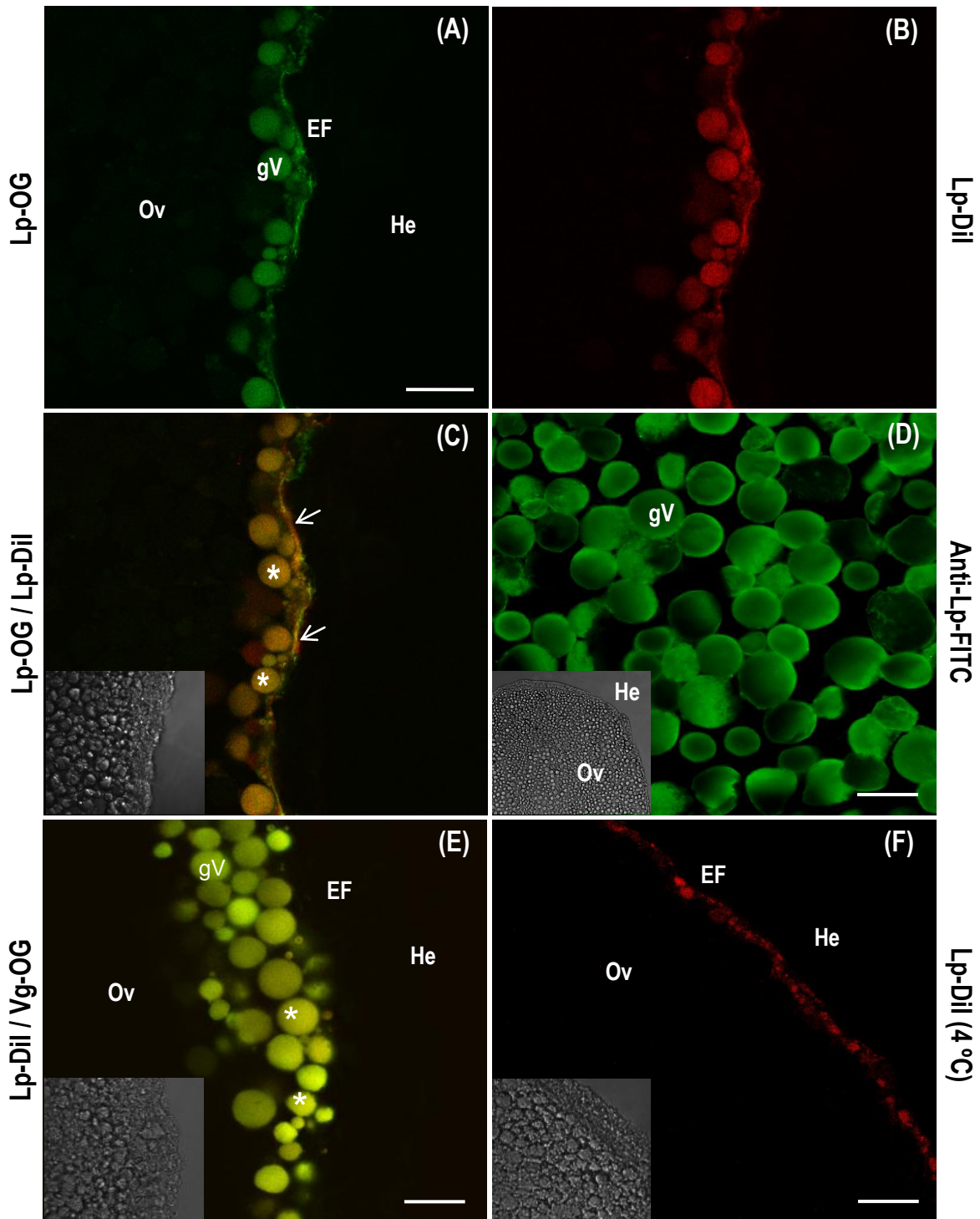
Considerando que vitelogenina es captada por los ovocitos mediante endocitosis mediada por receptor y depositada como vitelina (Vt) en los gránulos de vitelo, la endocitosis de la lipoforina fue analizada mediante la co-inyección de Lp-Dil y vitelogenina-OG (Vg-OG), empleando este último trazador fluorescente como marcador de endocitosis. A las 3 h pos-inyección, los resultados mostraron una importante co-localización de Vt-OG (la forma de



---

depósito correspondiente a Vg-OG) y Lp-Dil en numerosos gránulos de vitelo (Fig. 15E), confirmando que al menos parte de la lipoforina inyectada es internalizada por los ovocitos vitelogénicos mediante endocitosis. En los insectos inyectados con Lp-Dil y mantenidos a 4 °C para inhibir el proceso de endocitosis, la marcación fluorescente fue localizada sólo en el espacio perioocítico, sin observarse señal en los ovocitos (Fig. 15F).

## VITELOGÉNESIS



**Fig. 15: Localización de lipoforina (Lp) en ovocitos vitelogénicos de *D. maxima*: estudios *in vivo* y por inmunofluorescencia directa.** La lipoforina fue conjugada con Oregon Green (Lp-OG, verde) o con Dil (Lp-Dil, rojo) para seguir el destino de la partícula. Lp-OG y Lp-Dil fueron co-inyectados en el hemocel de hembras vitelogénicas. Luego de 3 h, los insectos fueron diseccionados y los tejidos ováricos procesados para observación mediante microscopía láser confocalizada. Las micrografías muestran la fluorescencia para Lp-OG (A) y Lp-Dil (B) en una sección del folículo vitelogénico. (C), Superposición de (A) y (B) demostrando co-localización de ambos trazadores en estructuras compatibles con gránulos de vitelo (asteriscos) y en el espacio

perioocítico (flechas). El inserto muestra la imagen de DIC correspondiente a (A-C). **(D)**, Inmunofluorescencia directa en criosecciones de tejido ovárico vitelogénico incubadas con anti-Lp-FITC y analizadas por microscopía láser confocalizada. La señal de fluorescencia para Lp se observa en estructuras compatibles con gránulos de vitelo. **(E)**, Vitelogenina conjugada con Oregon Green (Vg-OG) fue co-inyectada con Lp-Dil en el hemocel de hembras vitelogénicas para confirmar endocitosis de Lp. **(F)**, Ovocito en posición  $\alpha$  de una hembra vitelogénica inyectada con Lp-Dil y mantenida a 4 °C por 3 h (control de endocitosis). Los insertos muestran las correspondientes imágenes de DIC. Resultados similares fueron obtenidos en 3 ensayos independientes. EF, epitelio folicular; Ov, ovocito; gV, gránulo de vitelo; He, hemolinfa. Barras: 20  $\mu$ m.

## Lipoforina y su rol en la dinámica de las reservas lipídicas durante las fases del ciclo reproductivo de *D. maxima*

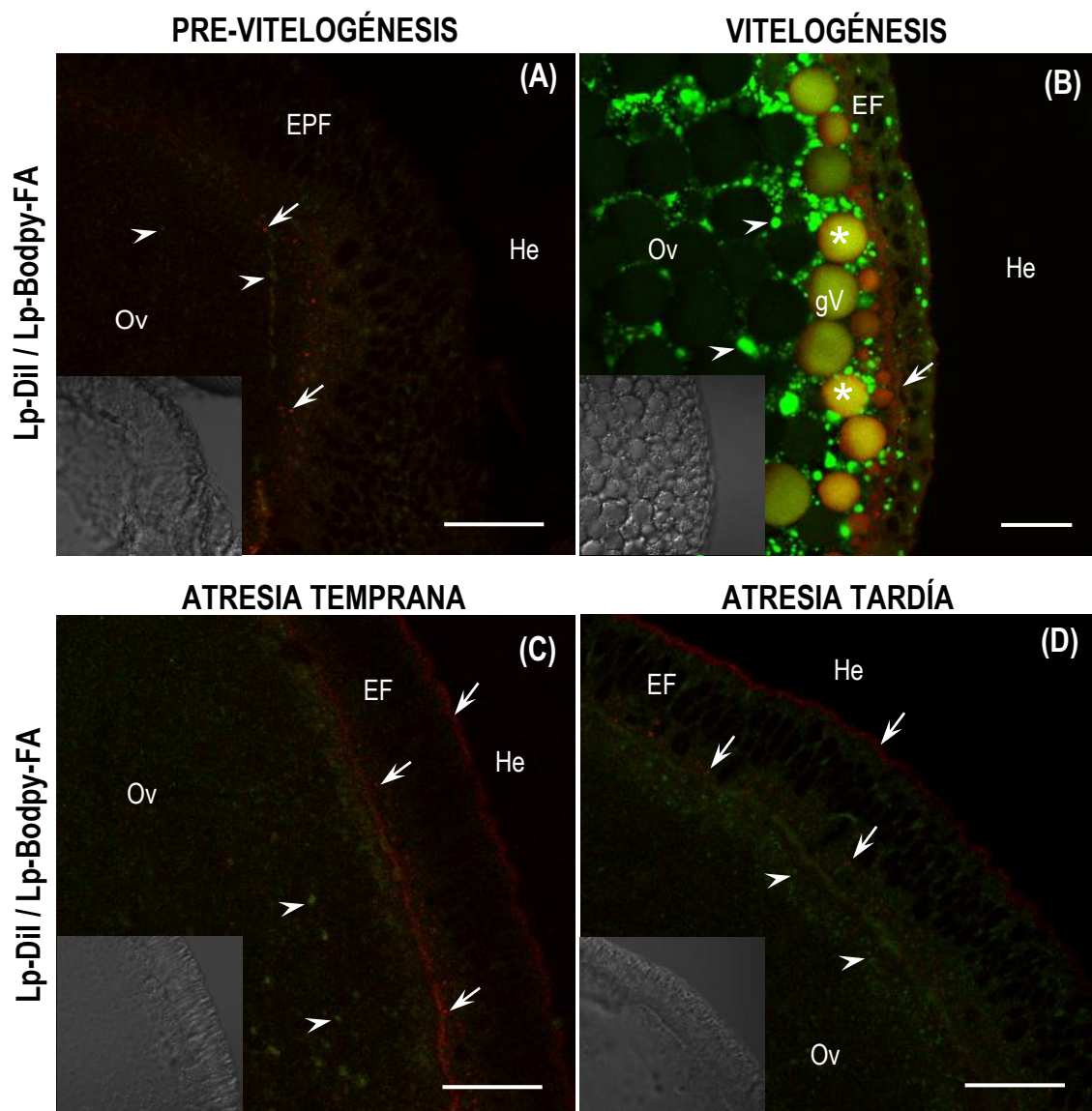
En esta etapa experimental se realizaron ensayos *in vivo* co-inyectando Lp-Bodipy-FA y Lp-Dil en hembras en las diferentes fases reproductiva con el objetivo de visualizar simultáneamente la localización celular de los lípidos transferidos y el destino de la partícula lipoproteica, respectivamente. A las 3 h post-inyección en los folículos pre-vitelogénicos se observó una débil señal fluorescente correspondiente a Lp-Dil, localizada principalmente en el área cortical de los folículos (Fig. 16A). La señal de Lp-Dil también fue débil cuando se analizaron secciones de tejido ovárico atrésico, aunque la misma presentó una distribución diferente a la observada en la pre-vitelogénesis. En la atresia folicular temprana y tardía, la señal de Lp-Dil se distinguió en el espacio perioocítico de los folículos terminales y en la región basal del epitelio folicular (Figs. 16C-D). Tanto en la pre-vitelogénesis (Fig. 16A) como en la atresia folicular temprana y tardía no fue posible observar Lp-Dil dentro de los ovocitos (Fig. 16C-D), sugiriendo que en estos estadios de la reproducción la endocitosis de lipoforina no es un proceso relevante en la conformación de las reservas lipídicas.

Cuando se analizó la señal para Bodipy-FA, los folículos pre-vitelogénicos y los folículos terminales del tejido ovárico en atresia mostraron una débil fluorescencia (Figs. 16A y C-D, respectivamente). Además, no se detectó Lp-Dil o Bodipy-FA en los folículos en incipiente degeneración ni en los ovocitos resorbidos (resultados no mostrados). Por el contrario, en la fase vitelogénica, los ovocitos en posición  $\alpha$  mostraron una notable señal para Bodipy-FA. Los ensayos de co-localización evidenciaron que Lp-Dil es depositada en los gránulos de vitelo, en tanto la señal para Bodipy-FA se observó en los gránulos de vitelo (como Lp-Bodipy-FA) y en

---

los adiposomas (Fig. 16B). En algunos gránulos de vitelo, la señal de Lp-Dil mostró una distribución periférica, no siendo posible establecer si tal patrón responde a una segregación particular de lipoforina en estas estructuras especializadas.

En conjunto, los resultados indican que durante las fases reproductivas de *D. maxima*, los lípidos transportados por la lipoforina son mayoritariamente transferidos a los ovocitos a nivel de membrana sin mediar la endocitosis de la lipoproteína, y posteriormente compartimentalizados en los adiposomas. Sin embargo, en la vitelogénesis, este mecanismo de transferencia converge con la endocitosis de la lipoforina, probablemente para maximizar en esta fase reproductiva el reclutamiento de reservas lipídicas en los ovocitos.



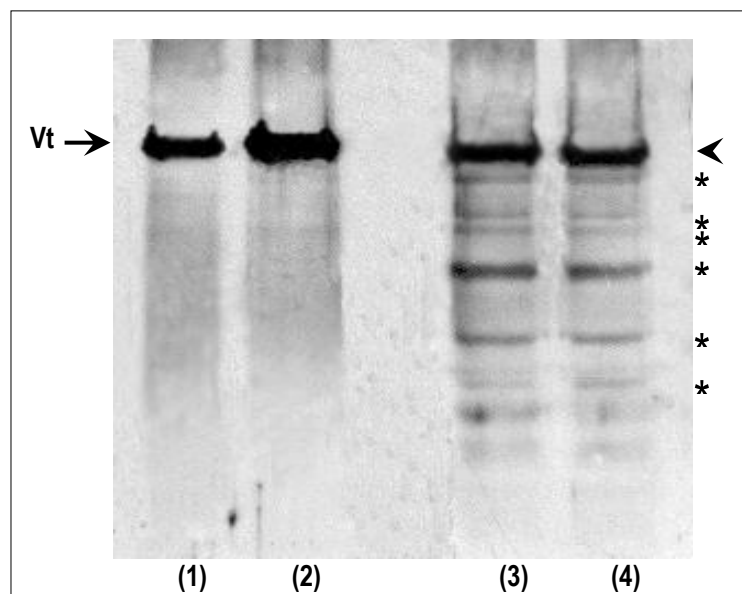
**Fig. 16: Estudios in vivo para seguir el destino de la lipoforina (Lp) y su carga lipídica en el tejido ovárico de *D. maxima*.** Lipoforina fue conjugada con Dil para seguir el destino de la partícula (Lp-Dil, rojo) o con Bodipy-FA, para analizar el destino de sus lípidos (Lp-Bodipy-FA, verde). Las hembras en diferentes fases del ciclo reproductivo fueron co-inyectadas con Lp-Dil y Lp-Bodipy-FA. En las micrografías se muestra el “merge” de los canales rojo y verde en los folículos terminales de ovarios en pre-vitelogénesis (A), vitelogénesis (B), atresia temprana (C) y tardía (D). Los insertos muestran las imágenes en DIC. Las flechas indican la señal para Lp-Dil y las cabezas de flechas para Bodipy-FA en los adiposomas. En (B), los asteriscos muestran la co-localización en los gránulos de vitelo de Lp-Dil y Lp-Bodipy-FA. Resultados similares fueron obtenidos en 3 ensayos independientes. EPF, epitelio prefolicular; EF, epitelio folicular; Ov, ovocito; gV, gránulo de vitelo; He, hemolinfa. Barras: 20  $\mu$ m.

---

## **4.2. Participación de las hidrolasas ácidas en el proceso de atresia folicular de *D. maxima***

#### 4.2.1. Proteólisis *in vivo* de vitelina en las fases de atresia folicular

Teniendo en cuenta que la atresia folicular se asocia con la degradación de nutrientes y siendo vitelina la principal proteína de los ovocitos, se realizaron ensayos de western blot, utilizando el anticuerpo anti-Vt para evidenciar la proteólisis *in vivo* de vitelina en tejidos ováricos atresicos. Como se muestra en la Fig. 17, en la vitelogénesis el anticuerpo reveló una única banda correspondiente a las 2 subunidades principales de vitelina (~ 170 y 174 kDa) (Fig. 17, calle 2). Por el contrario, en las fases de atresia folicular temprana y tardía se observaron varias bandas inmunoreactivas, de distinto peso molecular, correspondientes a fragmentos proteolíticos de vitelina. El perfil de degradación en ambos estadios de atresia fue similar (Fig. 17, calles 3 y 4). La proteólisis de vitelina en los tejidos ováricos atresicos podría contribuir al mantenimiento de condiciones fisiológicas que faciliten la sobrevivencia de las hembras y/o un nuevo ciclo vitelogénico cuando las condiciones nutricionales mejoren.



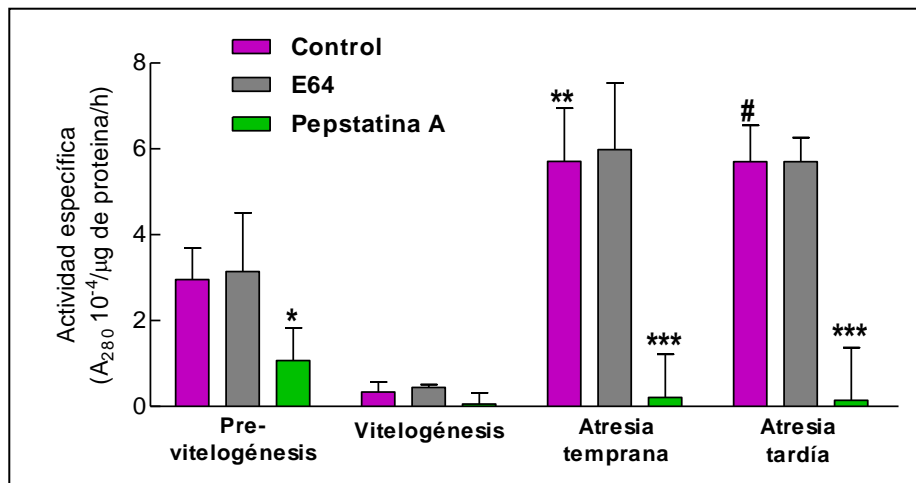
**Fig 17: Proteólisis *in vivo* de vitelina (Vt) en el tejido ovárico atresico de *D. maxima*.** Homogenatos de tejido ovárico obtenidos de hembras en vitelogénesis, atresia temprana y tardía (calles 2-4, respectivamente, 0,8 µg de proteína/calle) fueron incubados con el anticuerpo anti-Vt. Las principales subunidades de Vt (~ 170 y 174 kDa) fueron detectadas como una única banda (cabezas de flecha). En la atresia temprana y tardía los fragmentos proteolíticos de Vt son indicados en la figura por asteriscos (calles 3 y 4, respectivamente). Calle 1: estándar de Vt (0,2 µg para evitar sobre-exposición). La imagen de western blot es representativa de 3 experimentos independientes.

#### **4.2.2. Actividad de peptidasas ácidas y catepsina D en el tejido ovárico de *D. maxima* en las distintas fases reproductivas**

##### **Actividad de peptidasas ácidas**

Para establecer la participación de las hidrolasas ácidas en el proceso de atresia folicular, se estudió en primera instancia el perfil de actividad de peptidasas ácidas en homogenatos de tejidos ováricos, utilizando hemoglobina bovina como sustrato y un medio de reacción ácido. La actividad hemoglobinolítica fue detectada en todas las fases del ciclo reproductivo, aunque los mayores niveles de actividad enzimática se registraron en la atresia folicular temprana y tardía. En tanto, en los homogenatos de tejidos vitelogénicos se detectaron los niveles de actividad más bajos de todas las fases reproductivas. La actividad de peptidasas ácidas fue inhibida casi completamente por pepstatina A, un inhibidor de aspártico peptidasas, en las dos fases de atresia (~ 96 % y ~ 97 % de inhibición, respectivamente), y en menor medida en la pre-vitelogénesis (~ 64 %). La escasa actividad enzimática encontrada en la vitelogenesis también fue significativamente inhibida (~ 86 %) (Fig. 18). Por otro lado, el tratamiento de los homogenatos con E64, un inhibidor de cisteína peptidasas, no produjo inhibición enzimática. En conjunto, estos resultados sugieren que enzimas del tipo aspártico peptidasas estarían involucradas en el proceso de atresia folicular.



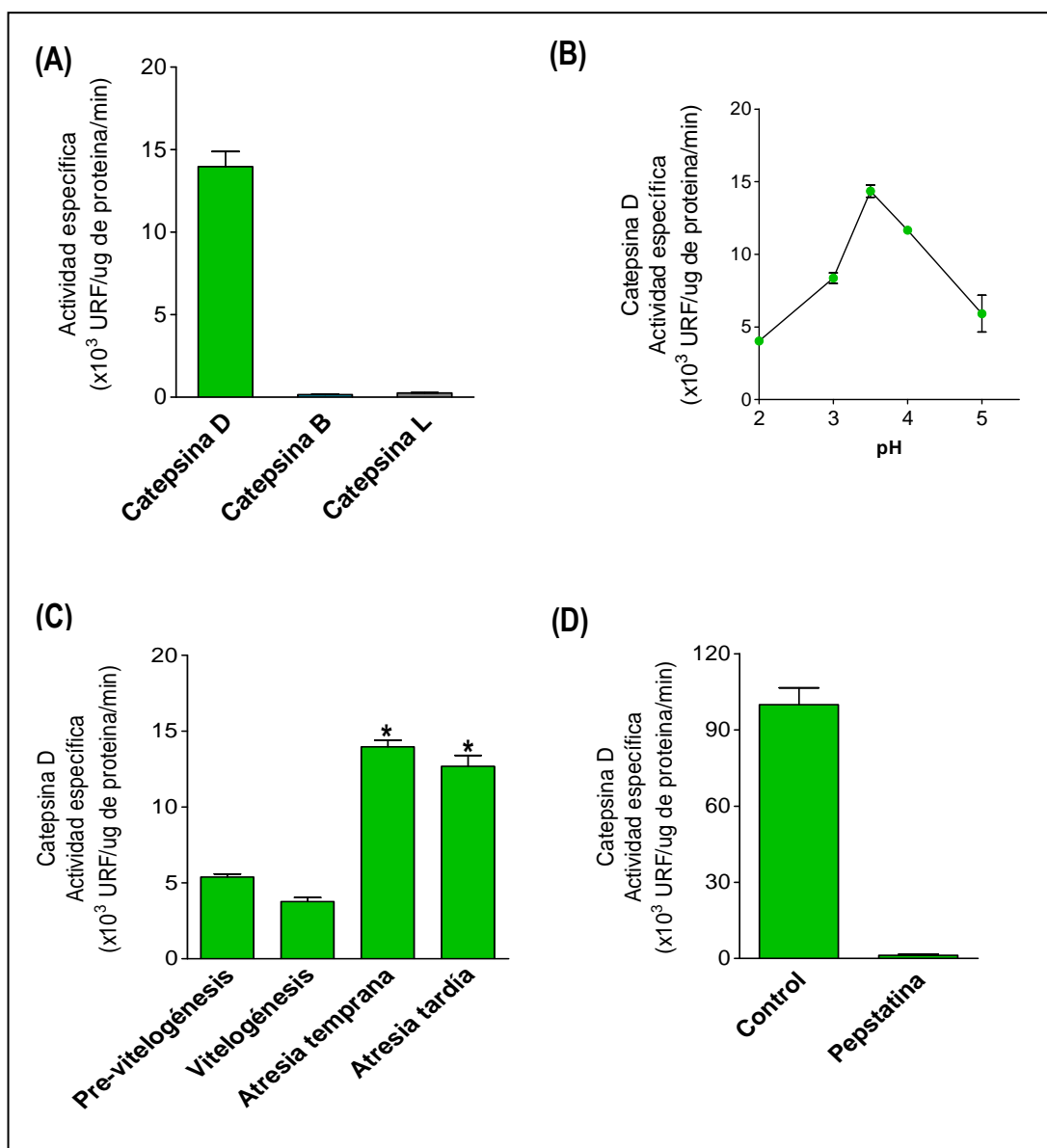


**Fig 18: Actividad proteolítica de peptidasas ácidas en el tejido ovárico de *D. maxima*.** Para los ensayos se utilizaron homogenatos de tejidos obtenidos a partir de hembras en las distintas fases del ciclo reproductivo. Los controles indican la actividad de las peptidasas ácidas utilizando 40-200  $\mu\text{g}$  de proteínas del homogenato como fuente enzimática y hemoglobina bovina como sustrato. La reacción de detuvo por el agregado de TCA y los fragmentos solubles del sustrato presentes en el sobrenadante fueron registrados a 280 nm. El efecto de inhibidores de peptidasa ácida sobre la actividad enzimática se analizó pre-incubando alícuotas de homogenatos con E64 (inhibidor de cisteína peptidasas) o pepstatina A (inhibidor de aspártico peptidasas) a una concentración final de 10 mM cada uno. En todos los casos, la actividad contra hemoglobina fue expresada como  $A_{280}/\mu\text{g}$  de proteína/h y representa la media  $\pm$  EEM ( $n = 4$ ). \* $P < 0,05$  vs. Pre-vitelogénesis (control); \*\* $P < 0,05$  vs. Pre-vitelogénesis (control) y  $P < 0,01$  vs. Vitelogénesis (control); \*\*\* $P < 0,01$  vs. Atresia temprana y Atresia tardía (control); # $P < 0,05$  vs. pre-vitelogénesis (control) y  $P < 0,001$  vs. vitelogenesis (control).

## Caracterización parcial de las catepsinas en el tejido ovárico

Considerando que la actividad proteolítica contra hemoglobina en los homogenatos de tejido ovárico atrésico fue susceptible a pepstatina A, se llevaron a cabo experimentos para caracterizar parcialmente la actividad de catepsina D, una aspártico peptidasa, utilizando el sustrato Abz-AIAFFSRQ-EDDnp. Además, en los homogenatos de tejido ovárico en atresia temprana se determinó la actividad de dos cisteína peptidasas, catepsinas B y L, utilizando sustratos fluorogénicos específicos (Z-RR-7-amido-MCA y Z-FR-7-amido-MCA, respectivamente). En los homogenatos se detectó actividad para catepsina D, en tanto la actividad correspondiente a catepsinas B y L fue muy baja o indetectable (Fig. 19A), resultados en acuerdo con lo observado en los ensayos de inhibición de la actividad hemoglobinolítica con E64 (Fig. 18). La actividad de catepsina D en el tejido ovárico atrésico fue dependiente del pH, siendo máxima a pH 3,5 (Fig. 19B). Por tal motivo, el resto de los ensayos enzimáticos para catepsina D se realizaron a pH 3,5.

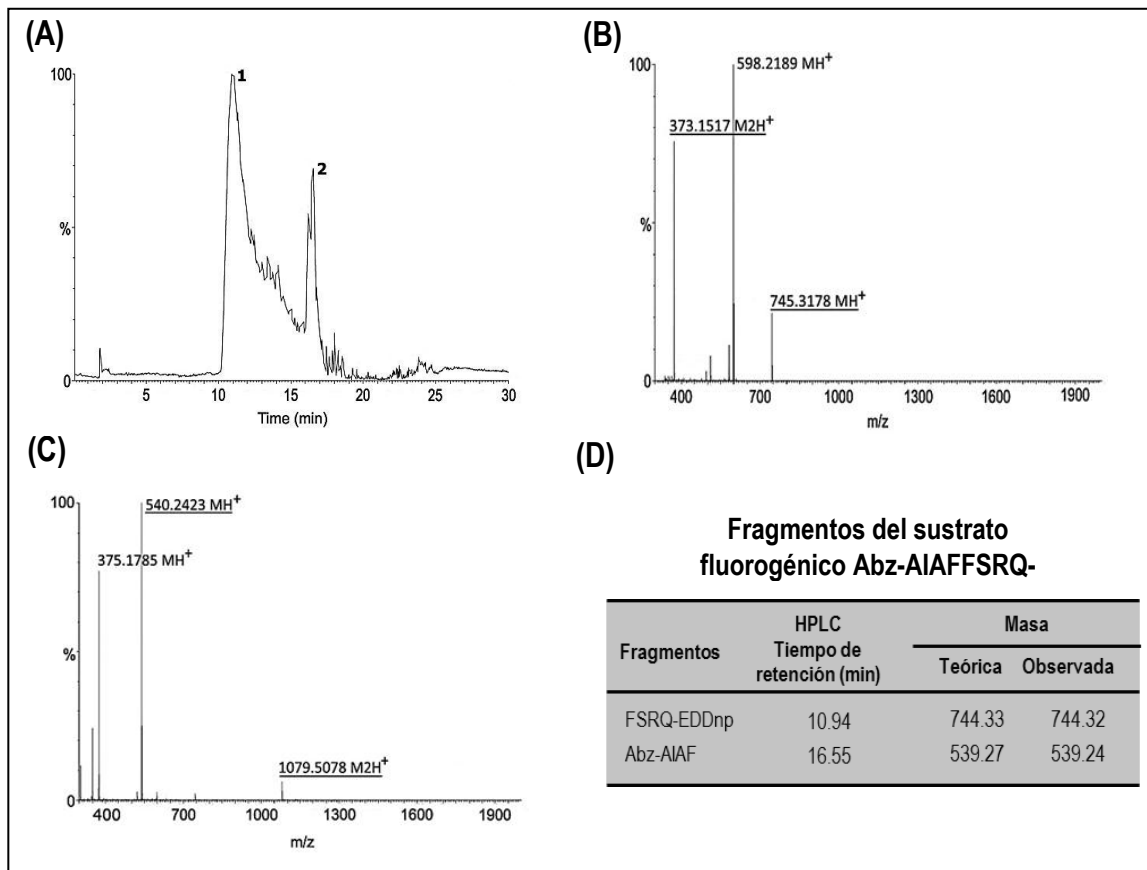
Cuando la actividad de catepsina D fue evaluada en homogenatos de tejido ovárico de hembras de *D. maxima* en las diferentes fases del ciclo reproductivo, los resultados mostraron un aumento significativo de la actividad en la atresia folicular temprana y tardía, respecto a los niveles detectados en la pre-vitelogénesis y vitelogenesis (Fig. 19C). La actividad de la enzima en la atresia folicular temprana fue fuertemente inhibida por pepstatina A (~ 98,7 % de inhibición) (Fig. 19D), compatible con las características de una aspártico peptidasa. Los altos niveles de actividad de catepsina D ovárica detectados en la atresia sugieren una participación importante de esta peptidasa en el proceso degenerativo, probablemente promoviendo la proteólisis temprana de vitelina en esta fase reproductiva.



**Fig. 19: Caracterización parcial de peptidasas simil catepsinas en el tejido ovárico de *D. maxima*.** (A), Actividad de catepsinas D, B y L en homogenatos de tejido ovárico en atresia utilizando sustratos fluorogénicos específicos (Abz-AIAFFSRQ-EDDnp para la catepsina D; Z-RR-7-amido-MCA y Z-FR-7-amido-MCA para catepsinas B y L, respectivamente); (B), Efecto del pH sobre la actividad de catepsina D empleando el sustrato Abz-AIAFFSRQ-EDDnp; (C), Actividad de catepsina D en tejido ovárico de hembras en las distintas fases del ciclo reproductivo; (D), Inhibición de la actividad de la catepsina D. Excepto en (C), todos los ensayos se realizaron empleando homogenatos de ovarios en atresia temprana. Las reacciones se llevaron a cabo según las condiciones indicadas en "Materiales y Métodos", incubando 10-30  $\mu$ g con los sustratos específicos, en una concentración final de 20  $\mu$ M. El efecto de pepstatina A se analizó pre-incubando el inhibidor (concentración final de 10  $\mu$ M) con alícuotas de homogenato ovárico. Las reacciones fueron monitoreadas en un fluorómetro equipado con filtros 320/430 nm (simil-catepsina D) o 370/460 nm (simil-catepsina B y L). Los resultados fueron expresados como unidades relativas de fluorescencia (URF)/ $\mu$ g de proteína/min y representaron la media  $\pm$  EEM (n = 3). \*P < 0,001 vs. pre-vitelogénesis y vitelogénesis.

---

La actividad de catepsina D fue confirmada analizando los productos de digestión del sustrato fluorogénico específico Abz-AIAFFSRQ-EDDnp por los homogeneatos de tejido ovárico en atresia mediante LC-MS. Según se muestra en el cromatograma (Fig. 20A), la hidrólisis del sustrato a pH óptimo de reacción (pH 3,5) originó dos 2 picos importantes correspondientes a los fragmentos proteolíticos FSRQ-EDDnp (pico 1, tiempo de retención 10.94 min) y Abz-AIAF (pico 2, tiempo de retención 16.55 min) (Figs. 20B-C, respectivamente). Según los espectros de masas, ambos fragmentos presentaron un peso molecular similar a los establecidos teóricamente para la hidrólisis del sustrato Abz-AIAFFSRQ-EDDnp por catepsina D (Fig. 20D). Otros picos menores, probablemente correspondientes a impurezas, también fueron observados. En conjunto, los resultados demostraron que los homogenatos de tejido ovárico en atresia clivan el sustrato de manera preferencial entre 2 residuos fenilalanina, en coincidencia con lo esperado para enzimas del tipo catepsina D<sup>97,150</sup>.



**Fig. 20: Determinación del sitio de clivaje del sustrato fluorogénico Abz-AIAFFSRQ-EDDnp por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).** (A), cromatograma de iones totales de los productos de reacción enzimática. Se observan dos picos principales (señalados como 1 y 2); (B y C), espectros de masas de los fragmentos del sustrato correspondiente a FSRQ-EDDnp (pico 1) y Abz-AIAF (pico 2), respectivamente. Se subrayan los iones correspondientes a los productos de digestión. Los iones detectados en (B) y (C) (580 a 600 m/z y 350 a 380 m/z, respectivamente) representan impurezas no caracterizadas. (D), Resumen de los resultados mostrados en (A) y (C) y comparación entre la masa observada y la masa teórica de cada fragmento. La figura muestra los resultados de un experimento representativo (n = 2).

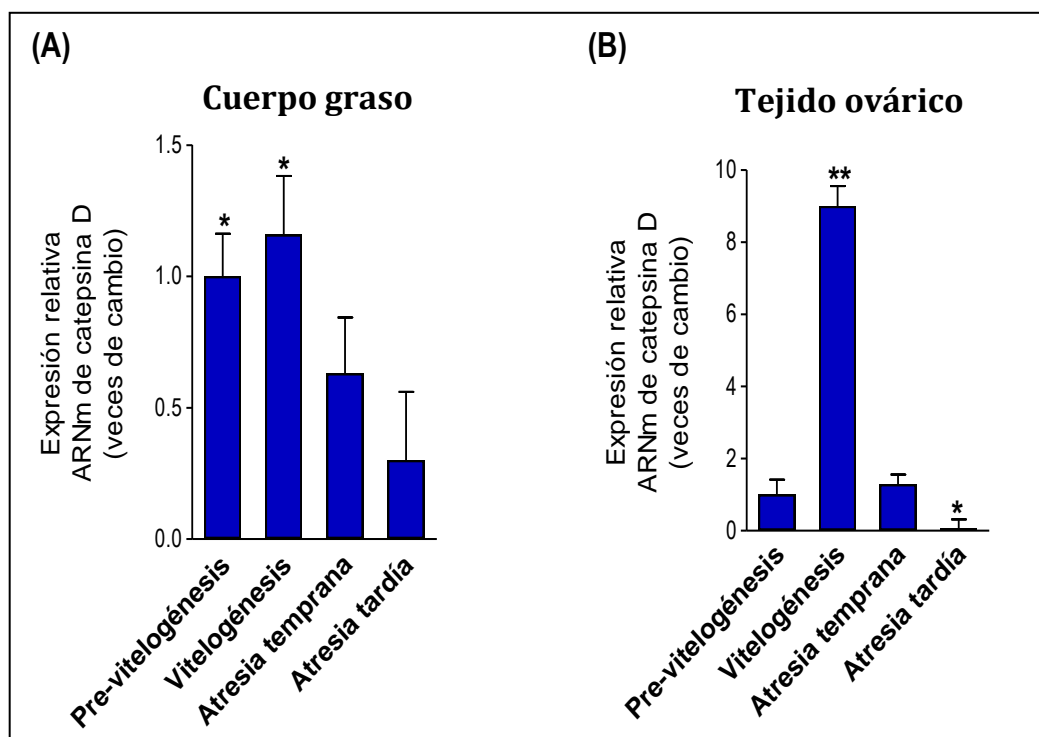
### 4.2.3. Catepsina D en cuerpo graso, tejido ovárico y hemolinfa en las distintas fases reproductivas de *D. maxima*

#### ***Expresión génica y actividad en el cuerpo graso y en el tejido ovárico***

La expresión génica de catepsina D en cuerpo graso y en el tejido ovárico se evaluó estableciendo el perfil de transcripción por PCR en tiempo real (qPCR) y la expresión de la proteína mediante ensayos de western blot.

En primer lugar, cuando se realizaron los ensayos de PCR convencional utilizando los “primers” descritos en la sección [3.20], el fraccionamiento electroforético en agarosa del producto de amplificación mostró una única banda del tamaño esperado (94 pb) (resultados no mostrados). La especificidad del producto fue confirmada mediante secuenciación y posterior análisis con el algoritmo en línea BLAST (resultados no mostrados). El amplicón mostró un 89 % de identidad con el ARNm de catepsina D del triatómido *T. infestans* (GenBank: GQ871498.1). Estos resultados permitieron clonar la catepsina D de tejido ovárico de *D. maxima* en un trabajo en colaboración con los Dres. J. Soulages y E. Arrese (Oklahoma State University, USA) que excede el marco experimental de este trabajo de tesis. El 80 % de la secuencia total del transcripto fue anotada en la base Genbank (Genbank: KF724683).

Por ensayos de qPCR, en el cuerpo graso se detectaron los niveles más altos de ARNm en la pre-vitelogénesis y vitelogénesis (Fig. 21A). En tanto, el nivel del transcripto hallado en los ovarios vitelogénicos fue significativamente mayor respecto a lo observado en las fases pre-vitelogénica y de atresia (Fig. 21B). Los niveles más bajos de ARNm de catepsina D fueron detectados en el tejido ovárico de hembras en atresia tardía, coincidiendo con la disminución del tamaño de las ovariolas y la resorción de los ovocitos en esta fase reproductiva (Fig. 21B). Se observaron similares perfiles de amplificación en cuerpo graso y en tejido ovárico mediante ensayos de PCR convencional (resultados no mostrados). En síntesis, esta etapa experimental permitió evidenciar que los cambios en los niveles del transcripto para catepsina D en cuerpo graso y tejido ovárico son característicos de cada fase del ciclo reproductivo.

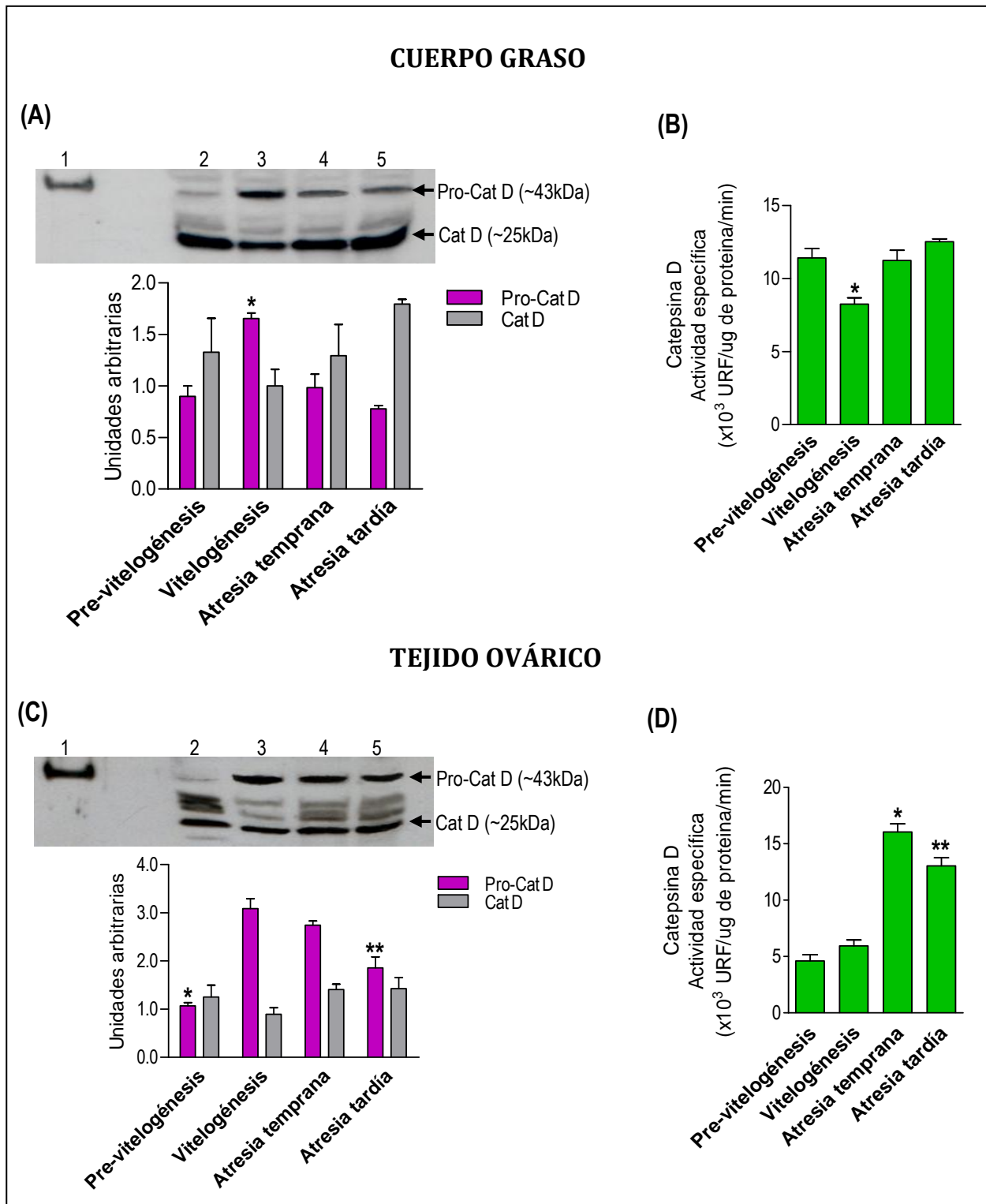


**Fig. 21: Cuantificación relativa del ARNm de catepsina D mediante RT-qPCR.** El ARN total fue extraído de cuerpos grasos (A) y ovarios (B) de hembras en diferentes fases del ciclo reproductivo. La cuantificación del transcripto de catepsina D se efectuó según lo indicado en "Materiales y Métodos", empleando el ARNm de la subunidad ribosomal 18S como control interno. Los resultados expresados como la media  $\pm$  EEM ( $n = 3$ ) indican las veces de cambio en los niveles de expresión respecto a la pre-vitelogénesis, considerada arbitrariamente como 1. (A), \* $P < 0,01$  vs. atresia temprana y tardía; (B), \*\* $P < 0,001$  vs. pre-vitelogénesis, atresia temprana y tardía; \* $P < 0,05$  vs. pre-vitelogénesis y atresia temprana.

---

El perfil de expresión de catepsina D en cuerpo graso y tejido ovárico fue evaluado por western blot, empleando un anticuerpo comercial anti-catepsina D, el cual reconoce la proenzima (pro-catepsina D) y la forma activa de la catepsina D. En todas las fases reproductivas, en ambos tejidos se detectaron dos bandas inmunorreactivas principales, con pesos moleculares compatibles con pro-catepsina D (~ 43 kDa) y catepsina D (~ 25 kDa). También se observaron bandas de menor intensidad, probablemente correspondientes a fragmentos de degradación de catepsina D o a señales inmunorreactivas no específicas (Figs. 22A y C, paneles superiores). El análisis densitométrico de los perfiles de western blot mostró que en cuerpo graso y ovarios la expresión de pro-catepsina D fue máxima en la vitelogenesis y disminuyó en las fases de atresia temprana y tardía, coincidiendo con un aumento en la expresión de la forma activa de la enzima (Figs. 22A y C, paneles inferiores) y con los altos niveles de actividad de catepsina D registrada en ambas fases degenerativas (Figs. 22B y D). En este contexto, los resultados sugieren que la síntesis y activación de catepsina D en cuerpo graso y tejido ovárico podrían responder a las necesidades fisiológicas específicas de ambos órganos en cada fase del ciclo reproductivo.





**Fig. 22: Expresión y actividad de catepsina D en cuerpo graso y tejido ovárico de *D. maxima*. (A) y (C), Paneles superiores: Pro-catepsina D (Pro-Cat D) y catepsina D (Cat D) fueron evaluadas por western blot en homogenatos de cuerpo graso (A) y tejido ovárico (C) obtenidos a partir de hembras en los días representativos de la pre-vitelogénesis, vitelogénesis, atresia temprana y tardía (calles 2-5 respectivamente, 40 µg/calle). Los ensayos se llevaron a cabo empleando el anticuerpo comercial anti-catepsina D. Las bandas fueron reveladas mediante ECL, utilizando 0,2 µg del lisado celular comercial MCF7 como control positivo (calle 1). Las flechas**

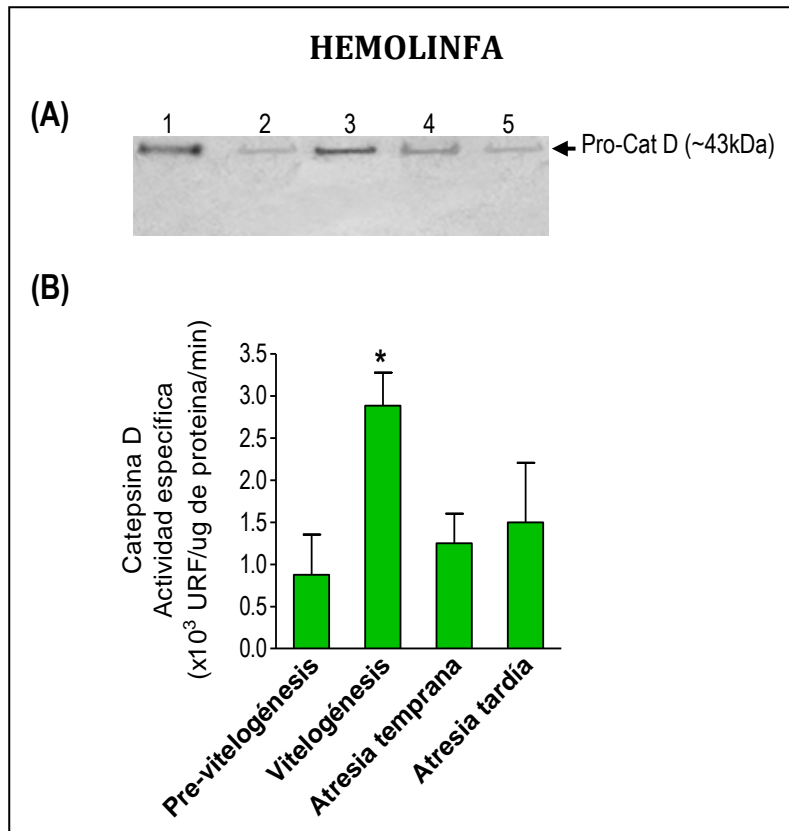
/indican las bandas compatibles con Pro-Cat D (~43 kDa) y Cat D (~25 kDa) y las imágenes de los western blots muestran un experimento representativo de 3 ensayos independientes. **(A) y (C), Paneles inferiores:** Los análisis densitométricos correspondientes a tres ensayos de western blot fueron realizados considerando la intensidad de las bandas compatibles con Pro-cat D y Cat D y la cantidad total de proteínas sembradas en cada calle y coloreadas con Ponceau S. (A), \*P < 0,01 vs. pre-vitelogénesis, atresia temprana y tardía; (C), \*P < 0,001 vs. vitelogénesis, atresia temprana y tardía; \*\*P < 0,001 vs. vitelogénesis y atresia temprana. **(B) y (D),** Actividad de catepsina D en homogenatos de cuerpo graso (B) y tejido ovárico (D). Los ensayos fueron realizados utilizando el sustrato fluorogénico específico y 10-30 µg de proteínas según lo indicado en “Materiales y Métodos”. Los resultados expresados como unidades relativas de fluorescencia (URF)/µg proteína/min representan la media ± EEM (n = 3). (B), \*P < 0,05 vs. pre-vitelogénesis, atresia temprana y tardía. (D), \*\*P < 0,001 vs. pre-vitelogénesis y vitelogénesis.

### **Catepsina D en la hemolinfa de *D. maxima***

Cuando se realizaron los ensayos de western blot para evaluar catepsina D en la hemolinfa de las hembras de *D. maxima* en las diferentes fases del ciclo reproductivo se observó una única banda inmunorreactiva compatible con pro-catepsina D (~ 43 kDa). Se detectaron bajos niveles de la pro-enzima en la pre-vitelogénesis y niveles de expresión aumentados en la vitelogénesis y en la atresia folicular temprana (Fig. 23A). En la atresia tardía, los niveles de la pro-catepsina D disminuyeron notablemente, detectándose una débil banda inmunorreactiva (Fig. 23A, calle 5).

Aunque en nuestras condiciones experimentales no se detectó una banda compatible con catepsina D en ninguna de las fases del ciclo reproductivo, todas las muestras de hemolinfa obtenidas de hembras en las diferentes fases reproductivas mostraron actividad específica contra el sustrato para catepsina D. La actividad enzimática fue significativamente mayor en la vitelogénesis (Fig. 23B). Sin embargo, es importante destacar que los niveles de actividad de catepsina D en la hemolinfa fueron notablemente menores que los registrados en el cuerpo graso y en el tejido ovárico (Figs. 23B y D).

Los cambios en la expresión de pro-catepsina D observados en la hemolinfa en las distintas fases reproductivas reflejarían la dinámica entre la síntesis de cuerpo graso y la captación por el tejido ovárico, sugiriendo además un comportamiento similar al de una PPV.



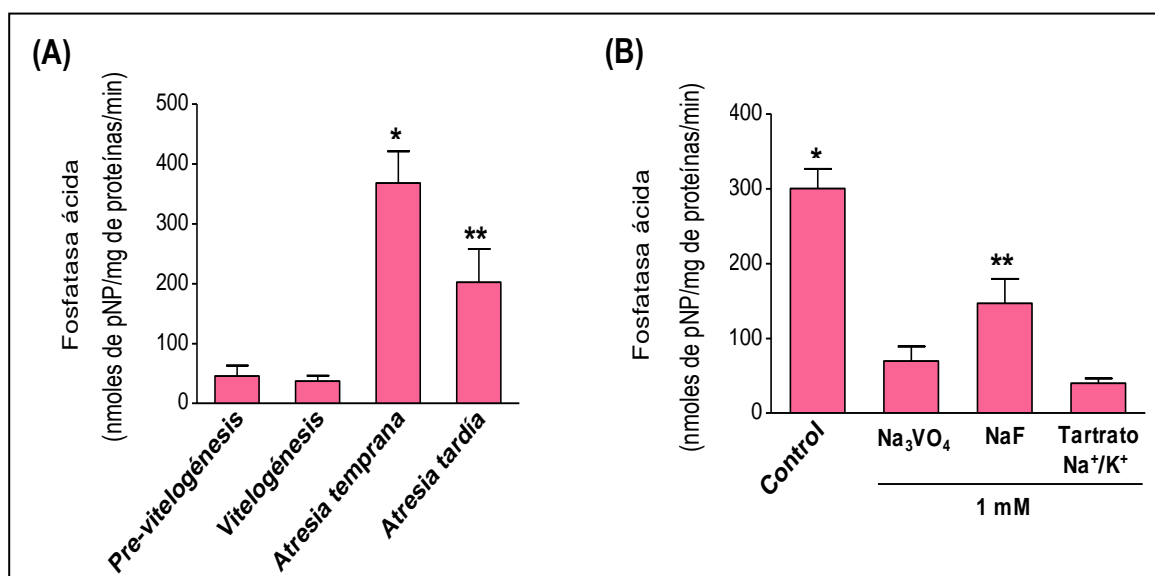
**Fig. 23: Expresión y actividad de catepsina D en la hemolinfa de hembras *D. maxima*.** (A), Pro-catepsina D (Pro-Cat D) en la hemolinfa de hembras en días representativos de la pre-vitelogénesis, vitelogénesis, atresia temprana y tardía (calles 2-5 respectivamente, 40  $\mu$ g/calle). Los ensayos de western blot se llevaron a cabo empleando el anticuerpo comercial anti-catepsina D. Las bandas fueron visualizadas por ECL empleando 0,2  $\mu$ g del lisado celular comercial MCF7 como control positivo (calle 1). Las flechas indican Pro-Cat D (~43 kDa) y la imagen muestra un experimento representativo de 3 ensayos independientes. (B), Actividad de catepsina D en la hemolinfa según las condiciones descritas en "Materiales y Métodos". Los resultados expresados como unidades relativas de fluorescencia (URF)/ $\mu$ g de proteína/min representan la media  $\pm$  EEM (n = 3). \*P < 0,05 vs. pre-vitelogénesis, atresia temprana y tardía.

#### 4.2.4. Actividad de fosfatasa ácida en el tejido ovárico de *D. maxima*

En insectos ha sido reportado que la actividad de fosfatasa ácida dirigida hacia las proteínas del vitelo incrementa su susceptibilidad a los eventos de proteólisis durante la embriogénesis<sup>87</sup>. Por otro lado, hemos demostrado que en *D. maxima*, la atresia folicular se caracteriza por la proteólisis parcial de vitelina y niveles significativos de actividad de fosfatasa

ácida en ovarios<sup>25,131</sup>. En este contexto, nos propusimos determinar la clase de fosfatasa ácida presente en tejido ovárico, focalizando en los estadios de atresia.

Cuando se utilizó pNPP como sustrato, los niveles de actividad enzimática en las fases de atresia fueron significativamente mayores a los detectados en la pre-vitelogénesis y vitelogénesis, registrándose los niveles más elevados en la atresia temprana (10-12 días post-vitelogénesis) (Fig. 24A). Por otra parte, la Fig. 24B muestra que la actividad de fosfatasa ácida en homogenatos de tejido ovárico en atresia folicular temprana fue significativamente inhibida por Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, (un inhibidor de tirosina fosfatasas, ~ 77 % de inhibición) y por tartrato de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (un inhibidor de fosfatasas de amplio espectro, ~ 87 % de inhibición). También se observó la inhibición por NaF, un inhibidor de serina/treonina fosfatasas, aunque en menor medida (~ 51 % de inhibición, Fig. 24B). Similares resultados fueron obtenidos cuando se ensayaron concentraciones mayores de los inhibidores (resultados no mostrados). En conjunto, estos resultados fuertemente sugieren que la principal responsable de la actividad de fosfatasa ácida en tejido ovárico atrésico es una tirosina fosfatasa.



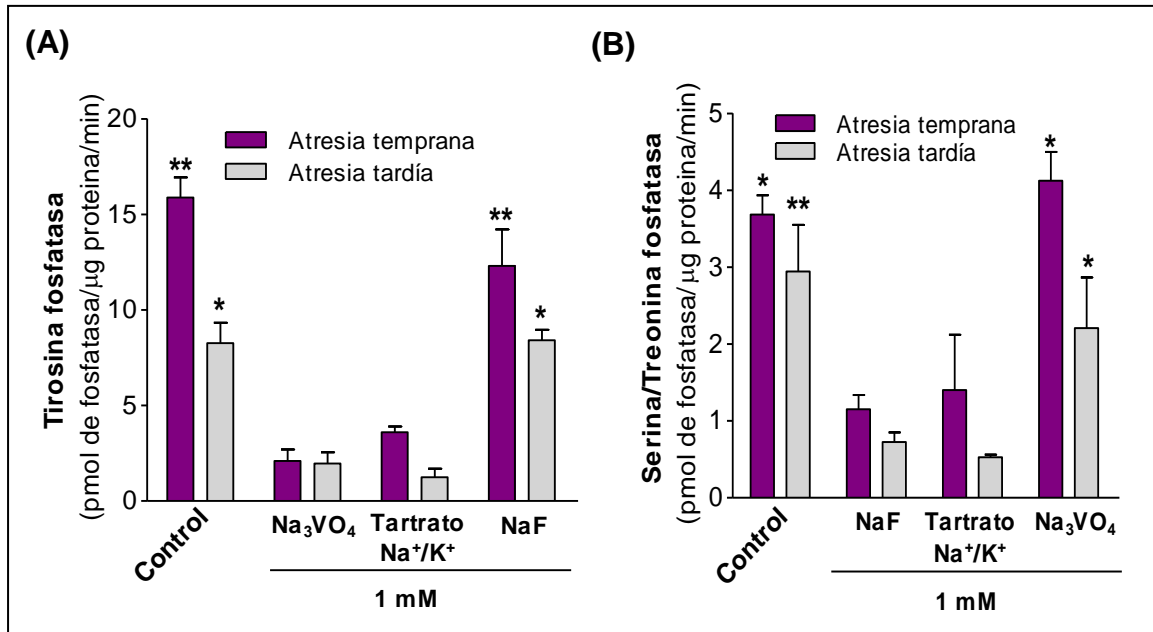
**Fig. 24: Actividad de fosfatasa ácida en el tejido ovárico de *D. maxima*.** (A), Actividad enzimática utilizando 30  $\mu$ g de homogenato de tejidos obtenidos de hembras en días representativos de las fases del ciclo reproductivo y midiendo la cantidad de p-nitrofenol formado (pNP). Los resultados fueron expresados como actividad específica (nmoles de pNP/mg de proteínas/min) y cada punto representa la media  $\pm$  EEM ( $n = 3$ ). \* $P < 0,05$  vs. pre-vitelogénesis, vitelogénesis y atresia temprana; \*\* $P < 0,001$  vs. pre-vitelogénesis y vitelogénesis. (B), Efecto de inhibidores sobre la actividad de fosfatasa ácida. Las alícuotas de homogenato de ovario atrésico (atresia folicular

temprana) fueron tratadas con  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (inhibidor de tirosina fosfatasas), NaF (inhibidor de serina/treonina fosfatasas) o tartrato de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (inhibidor de fosfatasas de amplio espectro). \* $P < 0,05$  vs.  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , NaF y tartrato de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ; \*\* $P < 0,001$  vs.  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  y tartrato de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

### **Actividad específica de tirosina fosfatasa y serina/treonina fosfatasa en la atresia folicular**

Con el objetivo de establecer la participación de la/s clase/s de fosfatasas ácidas presentes en el tejido ovárico durante la atresia folicular, se llevaron a cabo ensayos enzimáticos empleando fosfopéptidos sintéticos como sustratos específicos para tirosina fosfatasas y serina/treonina fosfatasas. Los resultados mostraron que en la atresia temprana, los niveles de actividad de tirosina fosfatasa fueron aproximadamente 2 veces superiores a los registrados en la atresia tardía (Fig. 25A). En los homogenatos atrésicos, la actividad de tirosina fosfatasa fue significativamente inhibida por  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (87 % y 76 % en la atresia temprana y tardía, respectivamente) en tanto el tratamiento con NaF (inhibidor de serina/treonina fosfatasas) no produjo efecto inhibitorio significativo.

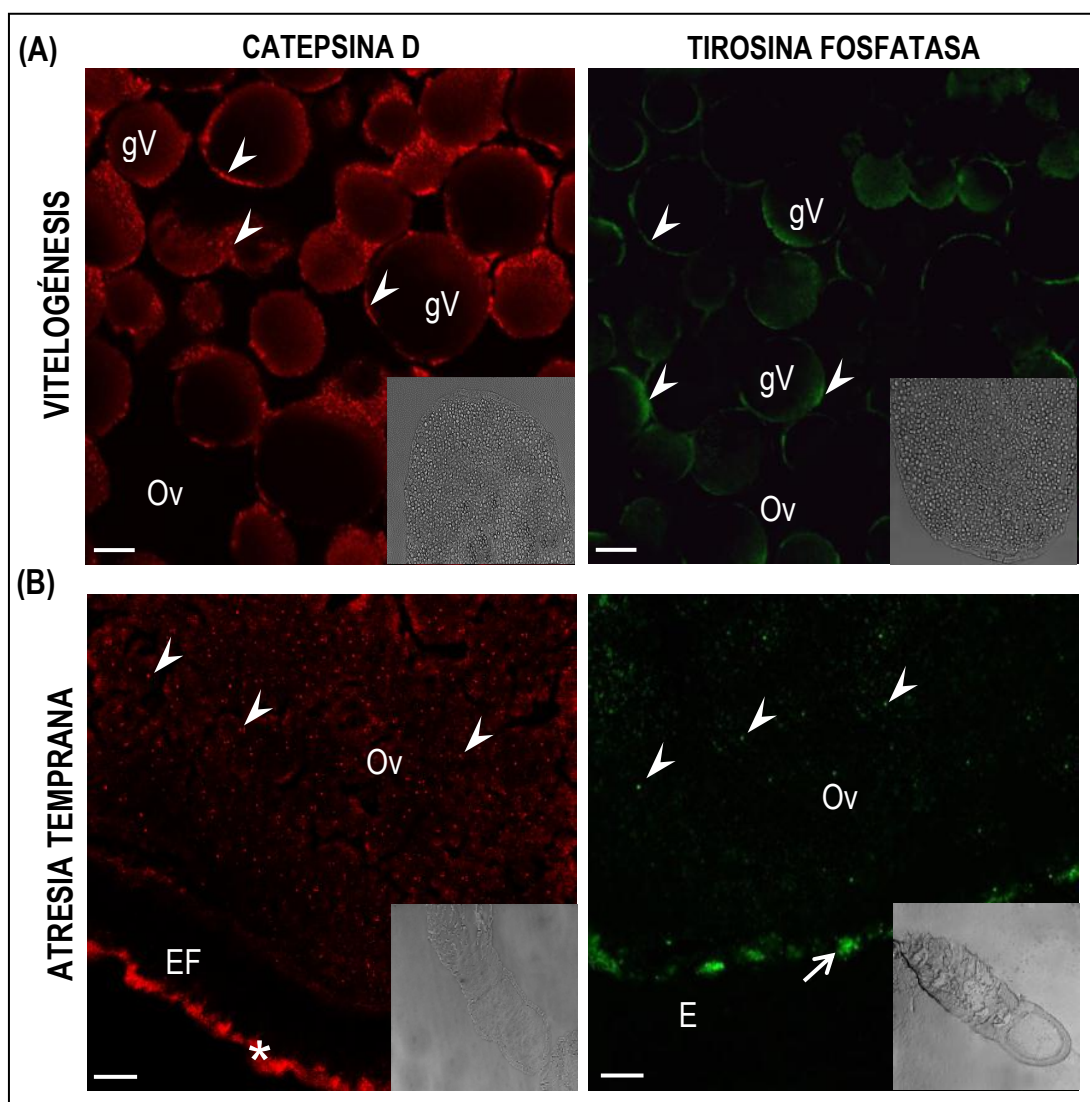
Por otro lado, los homogenatos de tejido ovárico en atresia temprana y tardía mostraron similares niveles de actividad contra el sustrato específico para serina/treonina fosfatasa, la que fue inhibida por NaF (~ 69 % y ~ 78 % en la atresia folicular temprana y tardía, respectivamente). Esta clase de fosfatasa ácida no sufrió inhibición cuando se ensayó  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , un inhibidor de tirosina fosfatasa (Fig. 25B). Como era esperable, la actividad de tirosina y serina/treonina fosfatasas fueron inhibidas significativamente por el tratamiento con un inhibidor de fosfatasas de amplio espectro (tartrato de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ). Aunque los resultados indicaron que la actividad de fosfatasa ácida en tejido ovárico atrésico se corresponde a ambas clases de enzimas, tirosina y serina/treonina fosfatasas, los cambios en los niveles de actividad registrados para tirosina fosfatasa en las fases de atresia sugieren que esta clase de hidrolasa podría tener un rol más importante en el proceso de atresia folicular temprana.



**Fig. 25: Actividad específica de tirosina fosfatasa (A) y serina/treonina fosfatasa (B) en homogenatos de tejido ovárico en atresia temprana y tardía.** Los ensayos fueron realizados usando fosfopéptidos específicos como sustratos con o sin el agregado de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , NaF o tartrato de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . La actividad específica fue expresada como pmol de fosfato/ $\mu\text{g}$  de proteína/min. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM ( $n = 3$ ). **(A)**, Atresia temprana: \* $P < 0,001$  vs.  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  y tartrato de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ; Atresia tardía: \*\* $P < 0,05$  vs.  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  y tartrato de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . **(B)**, Atresia temprana: \* $P < 0,01$  vs. NaF y tartrato de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ; Atresia tardía: \* $P < 0,01$  vs. NaF y tartrato de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ; \*\* $P < 0,001$  vs. NaF y tartrato de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

#### 4.2.5. Localización de catepsina D y tirosina fosfatasa en el tejido ovárico

La localización de catepsina D y tirosina fosfatasa en los tejidos ováricos de *D. maxima* en las diferentes fases del ciclo reproductivo se investigó mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta, utilizando los anticuerpos comerciales indicados en “Materiales y Métodos”. En la vitelogénesis, la señal fluorescente para ambas hidrolasas ácidas se observó en los ovocitos en posición  $\alpha$ , claramente asociada a los gránulos de vitelo (Fig. 26, panel A). Por el contrario, en la atresia temprana catepsina D y tirosina fosfatasa mostraron un patrón de fluorescencia punteado y con distribución homogénea en los ovocitos de los folículos terminales. (Fig. 26, panel B). Además, en la atresia temprana, catepsina D fue observada en la región basal del epitelio folicular mientras que la señal para tirosina fosfatasa estuvo localizada en el espacio perioocítico de los folículos (Fig. 26, panel B). Los cambios en el patrón de fluorescencia observados en la atresia están en coincidencia con la desorganización celular de los folículos en esta fase reproductiva<sup>29</sup>.



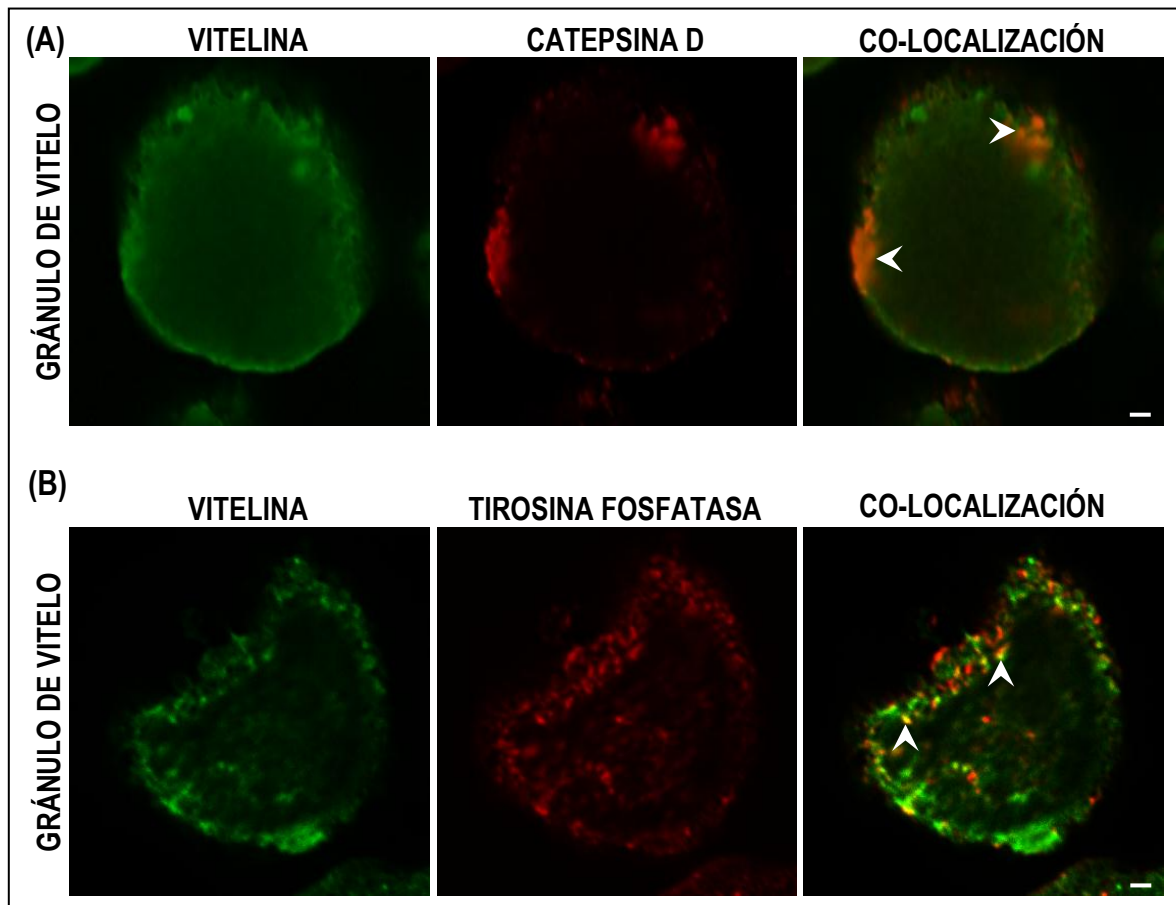
**Fig. 26: Localización de catepsina D y tirosina fosfatasa en folículos ováricos de *D. maxima*.** Las criosecciones de tejido ovárico en vitelogenesis y atresia folicular temprana fueron procesadas para inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos anti-catepsina D (señal roja) y anti-tirosina fosfatasa (señal verde) y examinadas mediante microscopía láser confocalizada. **Panel (A)**, Sección de un folículo en vitelogénesis mostrando catepsina D y tirosina fosfatasa asociadas a los gránulos de vitelo (cabezas de flechas). **Panel (B)**, Sección de un folículo terminal en la atresia temprana, mostrando ambas hidrolasas ácidas con un patrón de fluorescencia puntuado de distribución homogénea en los ovocitos (cabezas de flechas). En la atresia folicular temprana, catepsina D también fue observada en la región basal del epitelio folicular (asterisco), mientras que la señal para tirosina fosfatasa fue localizada en el espacio perioocítico de los folículos terminales (flecha). En todos los casos, los insertos las imágenes de DIC con menos magnificación. Resultados similares fueron obtenidos en 3 ensayos independientes. Ov, ovocito; CF, células foliculares; gV, gránulo de vitelo. Barras: 10  $\mu$ m.



---

### ***Co-localización e interacción de catepsina D y tirosina fosfatasa con vitelina en los gránulos de vitelo***

En la fase vitelogénica se analizaron gránulos de vitelo para determinar la potencial co-localización de catepsina D y tirosina fosfatasa con vitelina. Los resultados demostraron que ambas hidrolasas co-localizan parcialmente con la principal proteína de los ovocitos (Fig. 27). Sin embargo, la co-localización de vitelina/catepsina D se mostró restringida a algunas regiones periféricas de los gránulos de vitelo (Fig. 27A, co-localización) en tanto vitelina/tirosina fosfatasa mostró un patrón de co-localización parcial más heterogéneo dentro de estos compartimentos subcelulares (Fig. 27B, co-localización). En conjunto, los resultados sugieren cierta segregación de ambas hidrolasas en los gránulos de vitelo, probablemente para limitar su acción sobre vitelina.

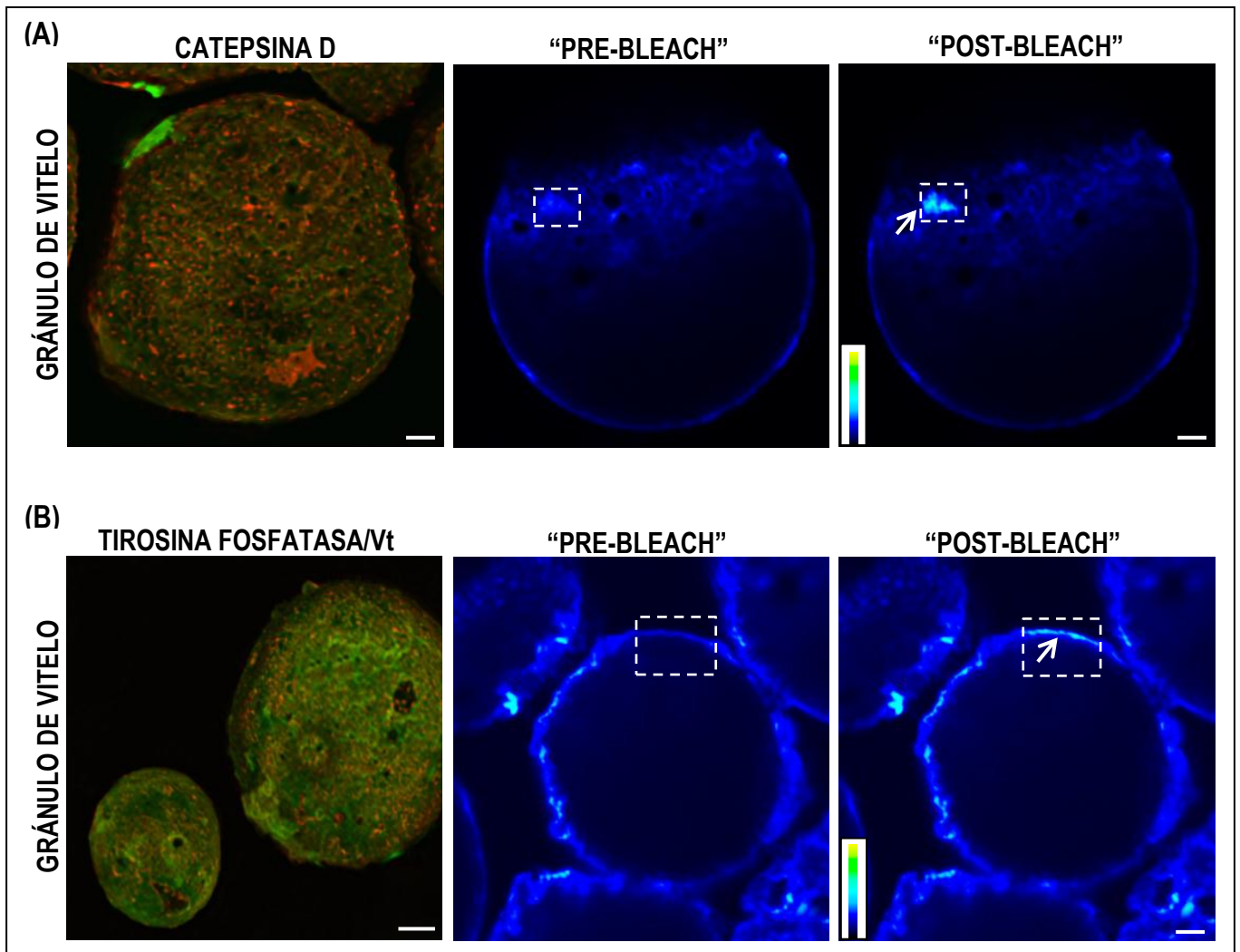


**Fig. 27: Co-localización de catepsina D y tirosina fosfatasa con vitelina en los gránulos de vitelo.** Los tejidos ováricos de hembras vitelogénicas de *D. maxima* fueron procesados para inmunofluorescencia. **(A-B)**, Patrón de inmunofluorescencia para vitelina (Vt, verde) y catepsina D o tirosina fosfatasa (rojo). La co-localización parcial de Vt/catepsina D **(A)** y Vt/tirosina fosfatasa **(B)** fue indicada en los paneles con cabezas de flechas. Resultados similares fueron obtenidos en 3 ensayos independientes. Barras: 2  $\mu$ m.

---

Cuando se realizaron los ensayos de FRET en los gránulos de vitelo para analizar la potencial interacción entre ambas hidrolasas ácidas y vitelina, se detectó un aumento de fluorescencia verde del donante (vitelina) después del “photobleaching” de la fluorescencia roja correspondiente a los aceptores (catepsina D o tirosina fosfatasa) (Figs. 28A y B, “post-bleach”). Estos resultados indicaron que la distancia de ambas enzimas con vitelina está comprendida en el rango de 1-10 nm, demostrando su interacción en los gránulos de vitelo.

Cuando la co-localización de las hidrolasas ácidas con vitelina y los ensayos de FRET fueron analizados en los ovocitos de los folículos terminales en atresia temprana, no se observaron estructuras correspondientes a los gránulos de vitelo. En estos experimentos, aunque fue posible distinguir la señal para catepsina D y tirosina fosfatasa, la desorganización tisular observada en esta fase dificultó la observación de la señal fluorescente para vitelina y la interpretación de los resultados (resultados no mostrados).

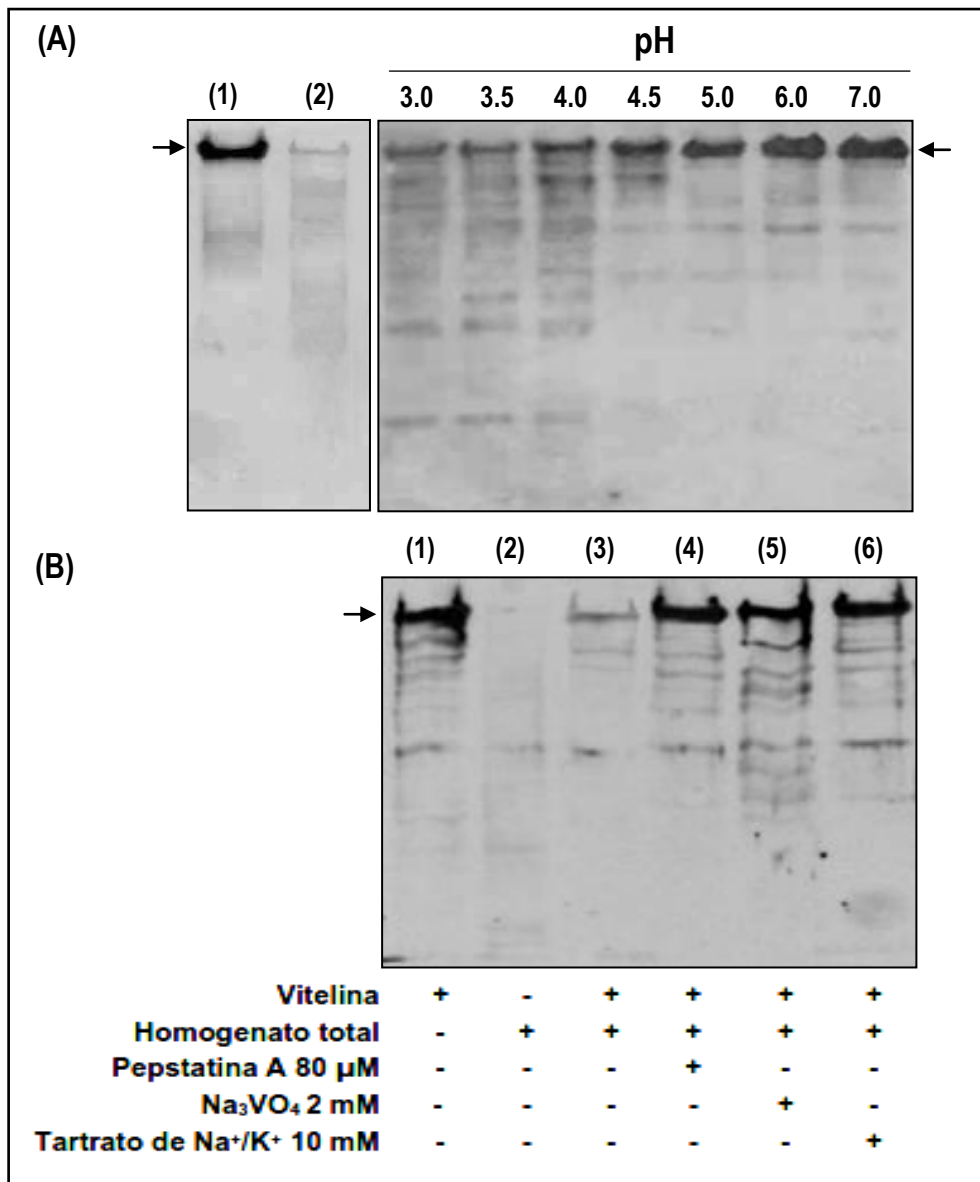


**Fig. 28: Interacción de catepsina D y tirosina fosfatasa con vitelina mediante ensayos de FRET.** Los tejidos ováricos de hembras vitelogénicas fueron procesados para inmunofluorescencia según lo indicado en “Materiales y Métodos”. En los paneles (A) y (B), las imágenes de la izquierda muestran las proyecciones en el plano Z calculadas a partir de la máxima señal de intensidad que deriva de todos los planos focales para vitelina (Vt, señal verde), catepsina D (A) o tirosina fosfatasa (B) (ambas señales en rojo). En los paneles, las imágenes del medio y derecha muestran la intensidad de fluorescencia del donante (señal para Vt) antes y después de destruir la fluorescencia del aceptor (catepsina D o tirosina fosfatasa, según corresponda) por “photobleaching” (FRET). Los boxes en blanco indican las áreas de “pre” y “post-bleach”. Las flechas señalan el aumento en la intensidad de fluorescencia de Vt. Para una mejor visualización del incremento de la intensidad de fluorescencia se muestran las imágenes pseudocoloreadas en la escala de gris, indicándose el gradiente de color en el interior de cada imagen. Resultados similares fueron obtenidos en 3 ensayos independientes. Barras: 5  $\mu\text{m}$  para la imagen del panel izquierdo en (B) y 2  $\mu\text{m}$  para el resto de las imágenes mostradas.

#### 4.2.6. Participación de catepsina D y fosfatasa ácida en la proteólisis *in vitro* de vitelina

En *D. maxima*, el proceso de atresia se presenta con la degradación de vitelina en el tejido ovárico, la principal proteína del vitelo, y con un aumento significativo de la actividad de catepsina D y de tirosina fosfatasa. Sustentados en estos resultados, se llevaron a cabo ensayos de proteólisis *in vitro* empleando vitelina purificada como sustrato y homogenatos de tejido ovárico en atresia temprana como fuente enzimática para evidenciar el rol de ambas hidrolasas ácidas en la proteólisis de vitelina. Cuando se analizaron los fragmentos de proteólisis mediante western blot utilizando el anticuerpo anti-Vt, los resultados mostraron que la proteólisis de vitelina es dependiente del pH, siendo significativa en el rango de pH entre 3,0 y 4,0. (Fig. 29A). A manera de control, también se demostró que el homogenato de tejido ovárico en atresia aporta una escasa cantidad de vitelina al sistema *in vitro* (Fig. 29A, calle 2).

Cuando los ensayos *in vitro* se realizaron a pH 4,0, cercano al pH de actividad óptima para catepsina D y fosfatasa ácida, los resultados mostraron que vitelina es considerablemente degradada, evidenciándose por western blot pocos fragmentos proteolíticos de baja intensidad (Fig. 29B, calle 3). Sin embargo, la proteólisis de vitelina fue significativamente inhibida por pepstatina A (un inhibidor de aspártico peptidasas),  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (un inhibidor de tirosina fosfatasas) y por tartrato de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (un inhibidor de fosfatasas de amplio espectro) (Fig. 29B, calles 4-6, respectivamente), mostrando patrones similares al obtenido para vitelina purificada sometida a las condiciones de incubación del ensayo (12 h a 37 °C) (Fig. 29B, calle 1). En conjunto, estos resultados muestran que en las condiciones experimentales *in vitro* ensayadas, catepsina D y una fosfatasa ácida de la clase tirosina fosfatasa son necesarias para promover la proteólisis de vitelina.



**Fig. 29: Proteólisis in vitro de vitelina (Vt): dependencia del pH y el efecto de inhibidores de catepsina D y fosfatasa ácida.** Para los ensayos se utilizaron homogenatos de tejido ovárico en atresia como fuente enzimática y Vt purificada como sustrato específico. **(A), Panel izquierdo**, Vt purificada y homogenato de tejido ovárico sin incubación (calles 1 y 2, respectivamente); **(A), Panel derecho**, dependencia del pH de la proteólisis in vitro de Vt. La reacción se llevó a cabo durante 12 h a 37 °C empleando diferentes buffers según el pH evaluado (3,0-7,0). En todos los casos, la proteólisis de Vt se evidenció por western blot utilizando el anticuerpo anti-Vt, previo fraccionamiento de las proteínas por SDS-PAGE (7,5 %). **(B)**, Vt purificada y homogenatos de tejido ovárico en atresia fueron incubados durante 12 h a 37 °C en un medio de reacción a pH 4,0, en ausencia (calle 3) o presencia de pesptatina A (inhibidor de aspártico peptidasas, calle 4), de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (inhibidor de tirosina fosfatasas, calle 5) o tartrato de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (inhibidor de fosfatasas de amplio espectro, calle 6). Como control, Vt purificada y el homogenato de tejido fueron incubados en las mismas condiciones de ensayo (calles 1 y 2, respectivamente). Las flechas indican las principales subunidades de Vt (~ 170 y 174 kDa) detectadas como una única banda inmunoreactiva. Las imágenes de los western blot son representativas de 3 experimentos independientes.

---

*Capítulo 5. DISCUSIÓN*

Las hembras de los vectores de la enfermedad de Chagas ingieren con cada comida de sangre una importante cantidad de lípidos y proteínas, los que luego de la digestión y absorción a nivel intestinal son transferidos a los tejidos periféricos, entre ellos, al ovárico<sup>118</sup>. En este trabajo demostramos que los cambios en las reservas nutricionales en los ovarios de las hembras de *D. maxima* correlacionaron con los estudios histo-morfológicos del tejido durante el ciclo reproductivo (Figs. 11-12). El aumento de las reservas nutricionales durante la vitelogénesis fue reportado en otras dos especies de triatominos, *R. prolixus* y *P. megistus*<sup>118,158,159</sup>. En tanto, en el insecto dermáptero *Labidura riparia* también se observó un incremento significativo de los depósitos lipídicos en la vitelogénesis y una franca disminución en la post-vitelogénesis<sup>134</sup>. En este sentido, ha sido propuesto que los recursos nutricionales del tejido ovárico almacenados durante la vitelogénesis podrían mobilizarse en la fase de atresia a los fines de facilitar la sobrevivencia de la hembra y/o para el mantenimiento de folículos jóvenes<sup>29,123</sup>. En *D. maxima*, la disminución de los recursos nutricionales en el tejido ovárico observados durante la post-vitelogénesis podría reflejar la adecuación metabólica del insecto a las necesidades energéticas en esta fase reproductiva. Debido a que en la atresia temprana algunas ovariolas muestran folículos terminales con cierto desarrollo, es posible que la movilización de los nutrientes del ovario contribuyan a facilitar un nuevo ciclo vitelogénico si la hembra recibe una comida de sangre. En condiciones estandarizadas de crianza, las hembras de *D. maxima* alimentadas con sangre a los 5-7 días post-vitelogénesis realizan un segundo ciclo de oviposición<sup>25</sup>. Por el contrario, considerando la capacidad de los triatominos para sobrevivir a largos períodos de ayuno<sup>12</sup>, es probable que en un estadio avanzado de atresia los importantes cambios bioquímicos e histo-morfológicos que conducen a la resorción de los ovocitos reflejen la escasa competencia del tejido para afrontar un nuevo ciclo de oviposición aún si el déficit nutricional revierte, priorizando la utilización de las reservas nutricionales para la sobrevivencia de la hembra.

En la fisiología de la reproducción de los insectos, los lípidos constituyen la principal reserva energética del tejido ovárico, participan de la formación de las membranas biológicas del nuevo organismo y son precursores de hormonas, entre otros<sup>48</sup>. En este trabajo informamos que en *D. maxima*, los TAG y DAG representaron la principal forma de depósito de lípidos en el tejido ovárico en las diferentes fases de la reproducción, con niveles en la vitelogénesis comparables a lo reportado para los folículos ováricos de *R. prolixus*<sup>159</sup>. Sin



embargo, también observamos un aumento en el contenido de ácidos grasos en las fases de atresia temprana y tardía (Fig. 14). Considerando que durante la regresión del tejido ovárico hay cambios notorios en la morfología ovárica y resorción de ovocitos<sup>29</sup>, es posible inferir que los ácidos grasos detectados en la atresia se originen de la lipólisis de los depósitos de TAG. No obstante, los eventos que regulan la movilización de los depósitos lipídicos en los ovocitos han sido escasamente explorados<sup>157,160,161</sup>. Con nuestro diseño experimental no fue posible establecer si los ácidos grasos del tejido ovárico atrésico son relevantes para mantener energéticamente la instauración y progresión de la fase de atresia o, si reciclados a la hemolinfa, contribuyen a mejorar las condiciones metabólicas de la hembra.

En la actualidad ha sido informado que la abundancia, tamaño y forma de los adiposomas puede variar considerablemente dependiendo de las necesidades de la célula y del medio en el que se encuentra<sup>162</sup>. En el tejido ovárico de los insectos, los estudios que analizan la dinámica de las gotas de lípidos en los ovocitos son escasos<sup>48,163,164</sup>. Similar a lo reportado en *R. prolixus*<sup>23</sup>, en *D. maxima* los escasos depósitos de lípidos en los ovarios pre-vitelogénicos fueron observados como gotas de lípidos pequeñas (Fig. 14A). Sin embargo, Clifton y Noriega (2012)<sup>165</sup> reportaron que en las hembras de *A. aegypti*, en condiciones de crianza con alta concentración de sucrosa, los ovarios pre-vitelogénicos tienen importantes depósitos de lípidos neutros. Los autores sugirieron que este “pool” de lípidos sustentaría la demanda energética de procesos como la endocitosis de las PPVs y la síntesis del receptor de vitelogenina al comienzo de fase vitelogénica. Por otro lado, en acuerdo con el alto contenido de lípidos encontrado en los ovarios vitelogénicos de *D. maxima*, los ovocitos en posición  $\alpha$  mostraron abundantes adiposomas, grandes y con forma irregular, distribuidos uniformemente (Fig. 14B). Más aún, es importante destacar que en esta fase reproductiva se encontraron adiposomas en el epitelio folicular. En este contexto, ha sido propuesto que las reservas de los adiposomas en otros tipos celulares diferentes a los adipocitos están destinadas a cubrir las necesidades energéticas propias de la célula<sup>166</sup>. Teniendo en cuenta que durante la vitelogénesis los ovocitos tienen grandes depósitos de lípidos y considerando que en esta fase reproductiva el epitelio folicular es metabólicamente muy activo<sup>19</sup>, es posible sugerir que las células foliculares prioricen el uso de sus reservas lipídicas para cubrir necesidades fisiológicas propias, limitando la transferencia al ovocito o a la circulación.

Los estudios empleando cultivos celulares en condiciones de suministro limitado de nutrientes demostraron que los adiposomas pueden rápidamente disminuir su tamaño<sup>162</sup>. Cuando el proceso de atresia folicular en *D. maxima* fue inducido por un déficit nutricional privando a las hembras de la ingesta de sangre durante la post-vitelogénesis, se observaron adiposomas marcadamente más pequeños que los observados en la vitelogénesis y un incremento significativo en el contenido de ácidos grasos en los ovarios atrésicos, sugiriendo la lipólisis de los depósitos. En la atresia temprana, las gotas de lípidos se localizaron en la zona cortical de los ovocitos terminales (Fig. 14C). Además, se observaron adiposomas en el trofario de las ovariolas en atresia tardía (Fig. 14F). En los ovarios de la avispa *Pteromalus puparum*, durante la transición de la vitelogénesis a la oosorción se observó la disminución del tamaño de los adiposomas y una redistribución hacia la periferia del ovocito. Los autores atribuyeron este cambio en la organización a un proceso de transferencia de nutrientes desde el ovario a la hemolinfa, proporcionando recursos nutricionales y/o energéticos que faciliten la supervivencia del insecto en condiciones adversas<sup>132</sup>. Aunque en este trabajo no se presentan evidencias sobre la redistribución de lípidos o “reciclado” a circulación, el patrón de los adiposomas observado en el tejido ovárico en las fases atrésicas sugiere que en *D. maxima* podría operar un mecanismo similar a *P. puparum*.

Aunque los lípidos constituyen hasta un 40 % del peso seco del huevo, las vías por las cuales estos nutrientes son almacenados en los ovocitos son escasamente conocidas<sup>48</sup>. Ha sido propuesto que la complejidad de los procesos de formación y utilización de reservas lipídicas en los ovocitos requiere de la participación de múltiples actores tales como receptores de lipoproteínas<sup>107</sup>, lipasas del tipo lipoproteína lipasa<sup>157</sup> y proteínas transferidoras de lípidos<sup>48</sup>, los que al presente han sido parcialmente caracterizados. Más aún, los resultados obtenidos a partir de los estudios en pocas especies de insectos no pueden ser generalizados ya que la formación y utilización de reservas lipídicas es influenciada por el estilo de vida de cada especie, su estado nutricional y el ciclo de desarrollo. En *M. sexta* la endocitosis de vitelogenina y lipoforina contribuyen al depósito de lípidos en los ovocitos en forma minoritaria<sup>167</sup>. En *A. aegypti*, luego de la ingesta de sangre, se reportó la localización de lipoforina tanto en el espacio interfolicular y perioocítico como en los gránulos de vitelo<sup>168</sup>. Además, en las hembras del mosquito *Anopheles gambiae*, los estudios de co-localización empleando trazadores fluorescentes demostraron que la lipoproteína es captada por ovocitos y

depositada en los gránulos de vitelo<sup>24,169</sup>. Por el contrario, en el vector *R. prolixus*, los estudios de inmunohistoquímica sugirieron ausencia de endocitosis de la lipoproteína<sup>170,171</sup>. En esta tesis demostramos que en *D. maxima* el reclutamiento de lípidos en los ovocitos tiene lugar mediante diferentes procesos según la fase reproductiva de la hembra. En la vitelogénesis, los estudios *in vivo* co-inyectando Lp-Dil/Lp-OG y los ensayos de inmunofluorescencia permitieron detectar lipoforina en estructuras compatibles con gránulos de vitelo, sugiriendo la endocitosis de la lipoproteína (Fig. 15C). La endocitosis de lipoforina fue finalmente demostrada por estudios de co-localización con vitelogenina, la principal proteína precursora del vitelo (Fig. 15E). Similares resultados fueron reportados en *P. megistus*, demostrándose que la transferencia de lípidos a los ovocitos es mediada por la clásica vía no endocítica de la lipoforina y por la endocitosis de la lipoproteína<sup>118</sup>. Considerando la fisiología de la reproducción de los insectos, es importante destacar que durante la vitelogénesis los ovocitos reclutan sus reservas de lípidos en un lapso de tiempo breve, por lo que la convergencia de las vías no endocítica y endocítica de lipoforina permitirían maximizar el proceso. También es importante contemplar que algunos componentes hidrofóbicos minoritarios transportados por la lipoforina podrían no alcanzar el ovocito por difusión acuosa a través de la membrana celular, por lo que necesariamente deberían ser incorporados por endocitosis, como se ha postulado para el cuerpo graso de *L. migratoria*<sup>172</sup>.

En la fase vitelogénica, el epitelio folicular de *D. maxima* muestra una marcada patencia a los fines de facilitar la endocitosis de las PPVs y la captación de nutrientes por el ovocito<sup>25,28</sup>. Tal como ha sido reportado para otras especies de insectos, los receptores endocíticos de vitelogenina y lipoforina, pertenecientes a la superfamilia de receptores del gen RLDL, tienen alto nivel de expresión en la membrana de ovocitos vitelogénicos<sup>48,109</sup>. Aguirre y col. (2011)<sup>25</sup> demostraron que en *D. maxima* la endocitosis de vitelogenina tiene lugar no sólo en la vitelogénesis sino también en las fases pre-vitelogénica y de atresia temprana, aunque en menor extensión. Sin embargo, nuestros ensayos realizados con una estrategia experimental similar no evidenciaron señal de fluorescencia compatible con la endocitosis de lipoforina en la fases pre-vitelogénica y de atresia folicular (Figs. 16A y 16C-D, respectivamente). Aunque al presente las diferencias en la captación de lipoforina y vitelogenina durante el ciclo reproductivo de *D. maxima* permanecen sin dilucidar, la

caracterización de sus receptores en el ovocito o en el tejido ovárico permitirá un mejor entendimiento de su regulación.

Un hallazgo importante en este trabajo fue la observación de la transferencia de Bodipy-FA, un análogo fluorescente del ácido palmítico, desde la lipoforina a los ovocitos en todas las fases del ciclo reproductivo. Sin embargo, los experimentos de co-inyección con Lp-Bodipy-FA/Lp-Dil revelaron que el proceso presenta características particulares según la fase reproductiva analizada. En los ovocitos en vitelogenesis, la captación de Bodipy fue significativa, observándose la señal fluorescente en los adiposomas y en los gránulos de vitelo (Fig. 16B). Con una diferente estrategia experimental, Santos y col. (2011)<sup>159</sup> también demostraron que la transferencia de ácidos grasos a los ovocitos de *R. prolixus* aumenta rápidamente en la vitelogénesis. Por el contrario, en los folículos en pre-vitelogénesis y en atresia, la señal para Bodipy-FA fue detectada sólo en los adiposomas pequeños de los ovocitos (Figs. 16A y 16C-D, respectivamente). La transferencia de lípidos observada en la atresia temprana y tardía es relevante considerando que en estas fases del ciclo reproductivo el contenido de lípidos en el tejido ovárico disminuye significativamente (Fig. 12), sugiriendo su movilización a la hemolinfa o su utilización en los folículos. En base a estos resultados, podría especularse que si en la atresia los lípidos son exportados desde los ovocitos a la hemolinfa, este proceso, mediado por lipoforina, sería bi-direccional facilitando también que parte de los lípidos transportados por la lipoproteína se transfieran al ovocito. La transferencia bi-direccional de lípidos, vía lipoforina, por difusión pasiva mediante un gradiente de concentración ha sido propuesta con anterioridad<sup>173</sup>. Sin embargo, para establecer la significancia fisiológica de los hallazgos en la atresia será necesario avanzar en el entendimiento del rol de los receptores para lipoforina en los ovocitos. Resultados preliminares en *D. maxima* sugieren que la  $\beta$ -ATPasa localizada en la membrana del tejido ovárico vitelogénico regula la transferencia de lípidos a los ovocitos desempeñando el rol de receptor no endocítico de lipoforina.

En los insectos, la oosorción ha sido asociada con la degradación de las reservas nutricionales del ovocito y con el reciclado a la hemolinfa de la principal proteína del vitelo, vitelina, en su forma nativa o como productos de proteólisis, a los fines de conservar recursos metabólicos para la hembra<sup>29,132,127</sup>. Más aún, al presente hay evidencias a nivel ultraestructural respecto a la digestión de las proteínas del vitelo durante la oosorción<sup>133</sup>. En este contexto, nuestros resultados en *D. maxima* sugieren que la proteólisis de vitelina

observada en el tejido ovárico atresico (Fig. 17) podría contribuir al mantenimiento de condiciones fisiológicas que faciliten un nuevo ciclo vitelogénico, si las hembras reciben una segunda comida de sangre. En apoyo de esta hipótesis, es importante señalar que Aguirre y col. (2011)<sup>25</sup> reportaron que los niveles de vitelogenina o sus fragmentos proteolíticos en la hemolinfa de las hembras de *D. maxima* en atresia fueron mayores a los detectados en la fase pre-vitelogénica.

En los insectos, la degradación de las proteínas del vitelo durante la embriogénesis es mediada por hidrolasas ácidas, destacándose el rol de las cisteína y aspártico peptidasas y de las fosfatasas ácidas<sup>89,94,95</sup>. Sin embargo, estas enzimas asociadas a los gránulos de vitelo podrían activarse tempranamente durante la fase de atresia<sup>126,129,130,131</sup>. En este trabajo demostramos niveles altos de actividad de peptidasas ácidas en el tejido ovárico de *D. maxima* en las fases de atresia folicular temprana y tardía (Fig. 18). Demostramos además que dicha actividad correspondió mayoritariamente a una similar catepsina D (Figs. 19-20), a diferencia de lo informado en *R. prolixus*<sup>129</sup>. En conjunto, los resultados en *D. maxima* indicaron que catepsina D se activa tempranamente en el proceso de atresia folicular, probablemente para promover la proteólisis temprana de vitelina en esta fase reproductiva.

En la fisiología de la reproducción de los insectos el cuerpo graso desempeña funciones que responden a la demanda metabólica/energética de la hembra, siendo los cambios moleculares y celulares observados en este tejido, característicos de cada fase reproductiva. Durante la vitelogénesis, el cuerpo graso sintetiza importantes cantidades de PPVs, entre ellas vitelogenina y peptidasas ácidas, para su depósito en los ovocitos<sup>34</sup>. En el cuerpo graso de *D. maxima* observamos que los niveles de ARNm de catepsina D fueron más altos en la pre-vitelogénesis y vitelogénesis (Fig. 21A). Sin embargo, la expresión de pro-catepsina D y catepsina D analizada por western blot mostró niveles comparables en la pre-vitelogénesis y en la atresia temprana y tardía (Fig. 22A). En la pre-vitelogénesis además, la actividad de catepsina D fue significativamente mayor a lo observado en la vitelogénesis. El análisis de estos resultados indicaría que en la pre-vitelogénesis, el ARNm de catepsina D en cuerpo graso se traduce a pro-catepsina D y se procesa a la forma activa de la enzima. Desde un punto de vista fisiológico, el rol de catepsina D en cuerpo graso durante la pre-vitelogénesis de *D. maxima* sería relevante promoviendo la degradación de proteínas para suplir con

aminoácidos a los adipocitos y otros tipos celulares que conforman este tejido hasta que la hembra acceda a una comida de sangre.

En *A. aegypti* se informó que una catepsina B y una carboxipeptidasa son sintetizadas en el cuerpo graso como pro-enzimas durante la vitelogénesis, formando parte de las PPVs que se depositan junto con vitelina en los ovocitos en desarrollo<sup>39,40</sup>. En acuerdo con el comportamiento de una PPVs, los niveles de ARNm de catepsina D y la expresión de pro-catepsina D fueron significativamente elevados en los cuerpos grasos obtenidos de hembras en vitelogénesis. Además, es importante destacar que pro-catepsina D fue detectada en la hemolinfa de hembras en todas las fases del ciclo reproductivo, reflejando probablemente la dinámica entre su secreción desde el cuerpo graso a la circulación y su depósito en los ovocitos (Fig. 23A). En estas células, pro-catepsina D se activaría en respuesta al proceso de atresia o más tardíamente, como parte del programa de embriogénesis, tal como fue descrito para otras especies<sup>42,50,51</sup>. Sorprendentemente, en la hemolinfa de *D. maxima* de todas las fases del ciclo reproductivo se detectó actividad para catepsina D, aunque en nuestras condiciones experimentales los ensayos de western blot no revelaron la banda compatible con la forma madura de la peptidasa (Figs. 23A-B). En la hemolinfa de *B. mori* se informaron resultados similares en relación con una PPVs del tipo cisteína peptidasa<sup>41</sup>. Es ampliamente conocido que la actividad proteolítica de catepsina D se encuentra estrechamente asociada al medio ácido de los lisosomas<sup>97</sup>. Más aún, ha sido reportado que el procesamiento de pro-catepsina D a catepsina D involucra la actividad autocatalítica de la enzima (en los lisosomas)<sup>174</sup>. Considerando estos antecedentes, resulta factible que la actividad de catepsina D en la hemolinfa de *D. maxima* sea consecuencia del procesamiento de pro-catepsina en el medio de reacción ácido otorgado en el ensayo *in vitro*.

En la post-vitelogénesis, el sistema lisosomal del cuerpo graso de las hembras de *A. aegypti* desempeña un rol importante degradando la maquinaria biosintética desarrollada durante la vitelogénesis<sup>34</sup>. En esta especie, la síntesis de vitelogenina en el cuerpo graso y su concentración en la hemolinfa disminuyeron marcadamente en esta fase reproductiva, coincidiendo con la activación de una aspártico peptidasa lisosomal<sup>80,175</sup>. De manera similar, en *D. maxima* se reportó la disminución en la expresión de vitelogenina en cuerpo graso al final de la fase vitelogénica<sup>28</sup>. Además, se informó la caída significativa de los niveles de vitelogenina

en la hemolinfa en las fases de atresia durante el período post-vitelogénico<sup>25</sup>. En este trabajo detectamos el transcrito de catepsina D en los cuerpos grasos de hembras en atresia temprana y tardía, al mismo tiempo que la expresión de la forma activa de la enzima y su actividad, incrementaron. Considerando estos resultados, es posible especular que durante la atresia folicular, catepsina D en cuerpo graso pueda ser parte del mecanismo que opera en la remodelación del tejido en respuesta a la transición de la vitelogenesis al período post-vitelogénico.

Durante la vitelogénesis, las peptidasas ácidas del tipo cisteína peptidasas pueden ser sintetizadas en el cuerpo graso y en los folículos ováricos, más específicamente en el epitelio folicular<sup>41</sup>. En *D. maxima*, encontramos niveles de ARNm para catepsina D en el tejido ovárico vitelogénico significativamente mayores respecto a lo detectado en las demás fases del ciclo reproductivo, sugiriendo que la síntesis de catepsina D en el ovario contribuye a los depósitos de la enzima en los ovocitos (Fig. 21B). A nivel de expresión de la proteína, pro-catepsina D disminuyó en los ovarios obtenidos en la fase de atresia temprana y tardía, detectándose también un aumento de la actividad enzimática en el tejido en estas fases reproductivas (Figs. 22C-D, respectivamente). En insectos, la atresia folicular y la resorción de los ovocitos son parte del sistema integral que controla la función del ovario. En la mayoría de las situaciones, la oosorción tiene como finalidad recuperar nutrientes y asegurar el potencial reproductivo de la hembra<sup>29,123</sup>. Así, en los folículos atrésicos de *C. p. pallens*, la activación temprana de peptidasas símil-catepsina facilitaría la degradación de proteínas del vitelo y la oosorción<sup>126</sup>. En tanto, en el triatomo *R. prolixus* se postuló que la activación de aspártico y cisteína peptidasas en los tejidos ováricos atrésicos sería relevante para la degradación de las proteínas del vitelo<sup>129</sup>. En este contexto, los perfiles de expresión génica y actividad de catepsina D en los ovarios de *D. maxima* en las fases reproductivas sugieren que esta aspártico peptidasa tiene un rol importante en la atresia, probablemente promoviendo la degradación de las proteínas del vitelo. Además, debido a que en la mayoría de las especies de triatominos los ovocitos basales son resorbidos en la pre-vitelogénesis si la hembra no adquiere una comida de sangre<sup>22</sup>, en el tejido ovárico de *D. maxima* catepsina D también podría estar involucrada en el proceso de oosorción durante la pre-vitelogénesis.

Al presente han sido caracterizadas varias fosfatasa acidas en los ovocitos de diferentes especies de insectos<sup>85-90</sup>. Estas hidrolasas se activan durante la embriogénesis, y aunque su función en el programa de degradación de las proteínas en el vitelo no ha sido confirmada, estarían implicadas en la defosforilación de vitelina para aumentar su susceptibilidad a la proteólisis y/o en la degradación de inhibidores de peptidasas<sup>42,51,93-95,176</sup>. En *D. maxima* demostramos un aumento significativo en la actividad de fosfatasa ácida en el tejido ovárico en las fases atrésicas, registrándose los niveles más elevados en la atresia temprana (Fig. 24). Más aún, mediante el uso de inhibidores específicos y ensayos enzimáticos con sustratos para tirosina y serina/treonina fosfatasa encontramos que la actividad de fosfatasa ácida en la atresia se corresponde principalmente a la de tirosina fosfatasa (Fig. 25). En este sentido, la actividad de tirosina fosfatasa en la atresia temprana fue aproximadamente el doble respecto a lo registrado en la atresia tardía, mientras que la actividad de serina/treonina fosfatasa en los homogenatos de tejido ovárico en las dos fases de atresia no mostró cambios significativos. Estos resultados podrían sugerir un papel más relevante para tirosina fosfatasa en los eventos tempranos de la atresia folicular. Las tirosinas fosfatasa están implicadas en numerosos procesos biológicos<sup>177</sup> y su participación en la ovogénesis o embriogénesis temprana ha sido reportada tanto en insectos como en el nematodo *Ascaris suum*<sup>91,92,178,179</sup>. A la vez, es ampliamente conocido que las vitelogeninas y vitelinas de insectos están altamente fosforiladas<sup>76</sup>, y en este contexto, la defosforilación mediada por fosfatasa ácidas sería un factor importante regulando su degradación en la embriogénesis<sup>51,93,94</sup>. En *D. maxima*, el análisis informático de una secuencia parcial de vitelina obtenida por espectrometría de masas en tándem (NetPhos 2.0 Server; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) arrojó sitios putativos de fosforilación con alto grado de confianza para tirosina, serina y treonina (resultados no mostrados). Es posible entonces que, a semejanza de lo propuesto para la embriogénesis de otras especies de insectos, la activación temprana de tirosina y serina/treonina fosfatasa observada en la atresia folicular de *D. maxima* tenga como finalidad aumentar la susceptibilidad de vitelina a la proteólisis. Sin embargo, debido a que en insectos y mamíferos hay evidencias que vinculan la activación de fosfatasa ácida con la degeneración celular y la autofagia<sup>131,180,181</sup>, la activación de tirosina y serina/treonina fosfatasa en la atresia de *D. maxima* también podría estar asociada a los



eventos de lisis celular y remoción de folículos atrésicos por autofagia reportados en esta especie<sup>131</sup>.

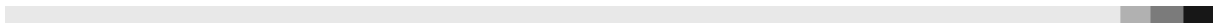
En los organismos ovíparos, la acidificación de los gránulos de vitelo durante la embriogénesis es un factor importante para la activación de pro-enzimas y consecuentemente, para la degradación de las proteínas del vitelo<sup>182,183</sup>. En algunas especies de insectos y en la garrapata se reportó la cooperación entre una fosfatasa ácida y varias peptidasas para promover la degradación de vitelina durante la embriogénesis<sup>93,91,94</sup>. En este trabajo de Tesis, empleando como modelo a *D. maxima*, demostramos que catepsina D y fosfatasa ácida se activan tempranamente en tejido ovárico durante la fase de atresia folicular. Más aún, los ensayos *in vitro* utilizando homogenatos de ovarios atrésicos como fuente enzimática y vitelina purificada como sustrato, demostraron que la degradación de vitelina es dependiente del pH y más importantemente, que tanto catepsina D como una fosfatasa ácida de la clase tirosina fosfatasa son necesarias para promover la proteólisis de vitelina (Fig. 29). Si bien al presente el mecanismo intrínseco de asociación entre estas hidrolasas ácidas es desconocido, se postuló que los polifosfatos inorgánicos almacenados en los gránulos de vitelo son sustratos para fosfatasa ácida e inhibidores de catepsina D<sup>95,176</sup>. En consecuencia, en el microambiente de los gránulos de vitelo, la degradación de polifosfatos mediada por fosfatasas permitiría desinhibir gradualmente la actividad de las peptidasas durante la atresia.

En los insectos, la segregación de las peptidasas y sustratos en los ovocitos es un factor importante en el control de la degradación de las proteínas del vitelo<sup>42,40,184</sup>. Por otro lado, estudios histoquímicos revelaron que la actividad de fosfatasa ácida también presenta cierta compartimentalización en los folículos ováricos<sup>91,176</sup>. En las hembras vitelogénicas de *D. maxima*, tirosina fosfatasa y catepsina D fueron detectadas en la periferia de los gránulos de vitelo, co-localizando parcialmente con vitelina, sugiriendo una segregación parcial en estas estructuras posiblemente para limitar la degradación de vitelina en la ovogénesis (Fig. 26A y Fig. 27). Sorprendentemente, en la fase de atresia folicular temprana, cuando se observaron los mayores niveles de actividad de tirosina fosfatasa y catepsina D y la desorganización de los gránulos de vitelo, ambas enzimas cambiaron su patrón de distribución celular (Fig. 26B). Mediante análisis de FRET se demostró la interacción tirosina fosfatasa/vitelina y catepsina D/vitelina en los gránulos de vitelo maduros (Fig. 28), lo que facilitaría la acción de estas

---

hidrolasas sobre vitelina en la fase de atresia folicular. Por otro lado, es importante destacar en los folículos terminales del tejido ovárico en atresia temprana, la señal fluorescente para catepsina D también fue observada en el dominio basal del epitelio folicular (Fig. 26B), probablemente asociada a la muerte celular por apoptosis y autofagia reportados en *D. maxima*<sup>131</sup>. También se detectó señal para tirosina fosfatasa en el espacio perioocítico (Fig. 26B), compatible con su tránsito desde la circulación al ovocito o con su acción sobre los fosfolípidos de la membrana plasmática de estas células<sup>42</sup>.

Los resultados de este segundo objetivo demostraron por primera vez que en el triatómido *D. maxima*, catepsina D es sintetizada en cuerpo graso y en el tejido ovárico con un perfil compatible al de una PPV. Se demostró que catepsina D y fosfatasa ácida, principalmente una tirosina fosfatasa, co-localizan con vitelina en los gránulos de vitelo y se activan tempranamente en la fase de atresia. Finalmente, se aportaron evidencias que demuestran que ambas hidrolasas son necesarias para promover la proteólisis *in vitro* de vitelina.



*Capítulo 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS*

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis, junto a hallazgos previos obtenidos en nuestro laboratorio, permiten postular un modelo a los fines de integrar los eventos moleculares, bioquímicos y celulares que tienen lugar en la vitelogénesis y en la atresia folicular, así como resaltar las áreas de potencial interés en investigación.

En *D. maxima*, la unión de vitelogenina y otras PPVs a su/s receptor/res localizados en la membrana oocítica son eventos centrales para el crecimiento del ovocito durante la vitelogénesis. No obstante, en la fase de atresia, los ovocitos disminuyen la captación de vitelogenina, debido probablemente a una disminución en la expresión de los receptores de la membrana y a la pérdida de la patencia en el epitelio folicular<sup>25</sup>. Ensayos preliminares en nuestro laboratorio mostraron que el receptor de vitelogenina de *D. maxima* es un miembro de la familia de los RLDL que se expresa en el tejido ovárico en todos los estadios del ciclo reproductivo, aunque más significativamente en la vitelogénesis. En este contexto, el receptor de vitelogenina representa un campo promisorio de estudio dirigido a lograr una mejor comprensión de los aspectos bioquímicos involucrados en la atresia folicular.

En los triatominos, la síntesis de vitelogenina en cuerpo graso y su captación por los ovocitos en la fase vitelogénica es mediada por la HJ<sup>66</sup>. Por el contrario, en los mosquitos, la expresión de vitelogenina y otras PPVs es mediada por 20-HE<sup>56</sup>. En estas especies además, la intrincada interacción entre HJ y los péptidos símil-insulina así como el estado nutricional de la hembra en la fase pre-vitelogénica de arresto son claves para la decisión de sobrevivencia del insecto o la reproducción<sup>185</sup>. En las hembras de *A. aegypti*, la privación de azúcar en la dieta resulta en una disminución de las reservas lipídicas en los ovocitos y en el aumento de la tasa de oosorción, efectos revertidos por la topicación con metoprene, un análogo de HJ<sup>165</sup>. En *D. maxima*, los aspectos relacionados con la potencial regulación endócrina del proceso de atresia folicular y oosorción no han sido explorados. Por lo tanto, su estudio sería de relevancia a los fines de comprender cómo el cuerpo graso y el ovario, órganos clave para la reproducción, se adecuan al déficit nutricional durante la post-vitelogénesis.

En *D. maxima*, catepsina D es sintetizada en el cuerpo graso y en el ovario con un perfil compatible al de una PPV, aunque la contribución de ambos tejidos a los depósitos de catepsina D en los ovocitos no fue establecida. Así mismo, los eventos que regulan su internalización permanecen sin dilucidar. En *A. aegypti* fue sugerido que las hidrolasas ácidas símil-catepsinas podrían unirse al RLp en los ovocitos para su posterior internalización<sup>19</sup>. En

este sentido, se proyectan ensayos de co-inmunoprecipitación tendientes a evaluar la interacción catepsina D/lipoforina en la membrana de los ovocitos de *D. maxima*. La comprobación de dicha interacción aportaría las primeras evidencias a nivel experimental respecto al mecanismo de incorporación de las hidrolasas ácidas en los ovocitos.

En condiciones estandarizadas, la fase post-vitelogénica en *D. maxima* se caracteriza por la atresia de los folículos y la oosorción<sup>25,28</sup>. En los insectos ha sido propuesto que ambos procesos son parte de la estrategia reproductiva de las hembras destinada a la adecuación de los recursos metabólicos ante condiciones nutricionales adversas<sup>29,125,127</sup>. Durante las fases de atresia, la disminución significativa de las reservas nutricionales en el tejido ovárico de *D. maxima* indicaría su movilización para contribuir al mantenimiento de folículos jóvenes y/o de condiciones energéticas en la hembra hasta la mejora de la situación nutricional (acceso a una ingesta de sangre). El aumento en el contenido en ácidos grasos detectados en la atresia temprana y tardía concuerda con esta hipótesis y sugiere la lipólisis de los depósitos de TAG y/o DAG con similar objetivo. Los factores que regulan los eventos de lipólisis en los ovocitos de insectos han sido escasamente estudiados, limitándose a describir la participación de lipoproteínas lipasas en unas pocas especies<sup>48,161</sup>. La caracterización bioquímica y funcional de triacilglicerol lipasas en los ovocitos resulta un área de particular interés a los fines de comprender los mecanismos de provisión energética durante la regresión del tejido ovárico.

En la fase de atresia, los ensayos *in vivo* con trazadores fluorescentes indicaron que la transferencia de lípidos a los ovocitos no sólo es menos significativa en comparación con la vitelogénesis sino que además, tiene lugar mediante un mecanismo clásico a nivel de la membrana celular, sin internalización del ligando<sup>186</sup>. En este contexto, el/los receptores para lipoforina serían claves para la conformación de reservas en los ovocitos. Resultados preliminares indican que en estas células, la  $\beta$ -ATPasa se desempeñaría como receptor no endocítico para lipoforina, de manera análoga a su función en el tejido intestinal del triatomino *P. megistus*<sup>187</sup>. Estos hallazgos permitieron dirigir nuestro interés en dilucidar el rol de  $\beta$ -ATPasa-lipoproteínas en la dinámica de formación de las reservas lipídicas en tejido ovárico durante las fases de la reproducción.

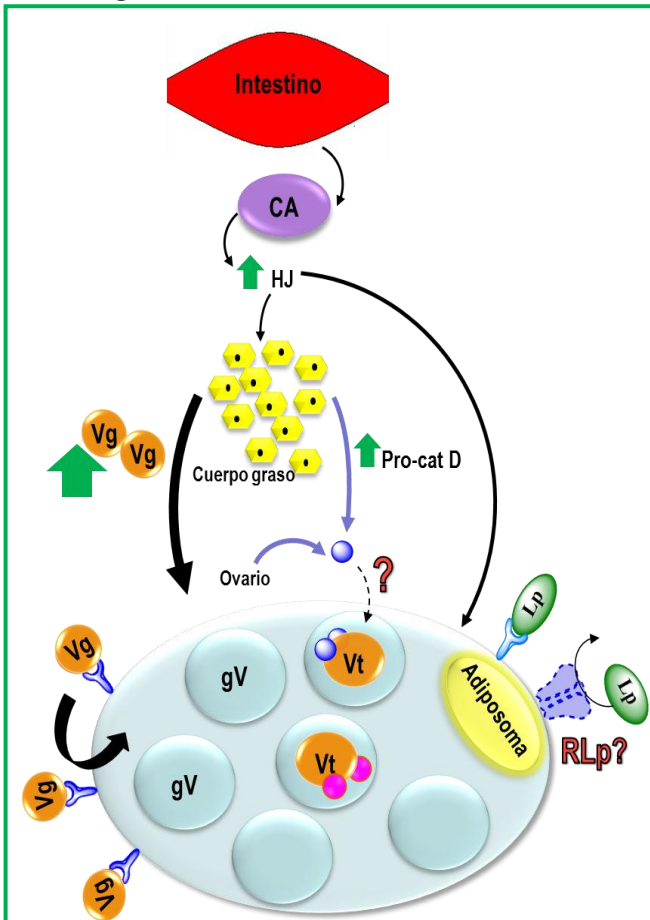
En la atresia folicular se observó la proteólisis temprana de vitelina y el aumento de la actividad de catepsina D y fosfatasa ácida, particularmente tirosina fosfatasa. Los ensayos de proteólisis *in vitro* demostraron que ambas hidrolasas son necesarias para promover la

degradación temprana de vitelina en la atresia. En la vitelogénesis, catepsina D y tirosina fosfatasa co-localizan parcialmente con vitelina en los gránulos de vitelo, sugiriendo cierto grado de segregación de ambas hidrolasas en estas estructuras subcelulares para limitar su acción sobre de vitelina. Experimentalmente no fue posible demostrar si en la atresia folicular, estas hidrolasas interaccionan con vitelina, siendo necesarios ensayos complementarios y la optimización de las condiciones de los estudios de FRET para dilucidar este aspecto.

Analizados en conjunto, los resultados presentados sugieren que en *D. maxima*, la atresia folicular es una estrategia de adecuación metabólica y tisular en la que convergen eventos bioquímicos y celulares de forma compleja. En una etapa temprana de esta fase degenerativa, la disminución de las reservas nutricionales del ovario, la activación de hidrolasas ácidas y la proteólisis de vitelina en este tejido facilitarían el mantenimiento de folículos jóvenes y un segundo ciclo gonadotrófico si la hembra accede a una ingesta de sangre. En un estadio avanzado de la atresia, aún si las condiciones nutricionales desfavorables revierten, estos eventos se destinarían al establecimiento de condiciones metabólicas que permitan la sobrevivencia de la hembra. Al presente, los trabajos no reportan evidencias directas respecto al “reciclado” de nutrientes en la atresia, constituyendo este aspecto un desafío experimental importante debido a las características del sistema circulatorio abierto de los insectos y a las particularidades de los triatominos como modelos.

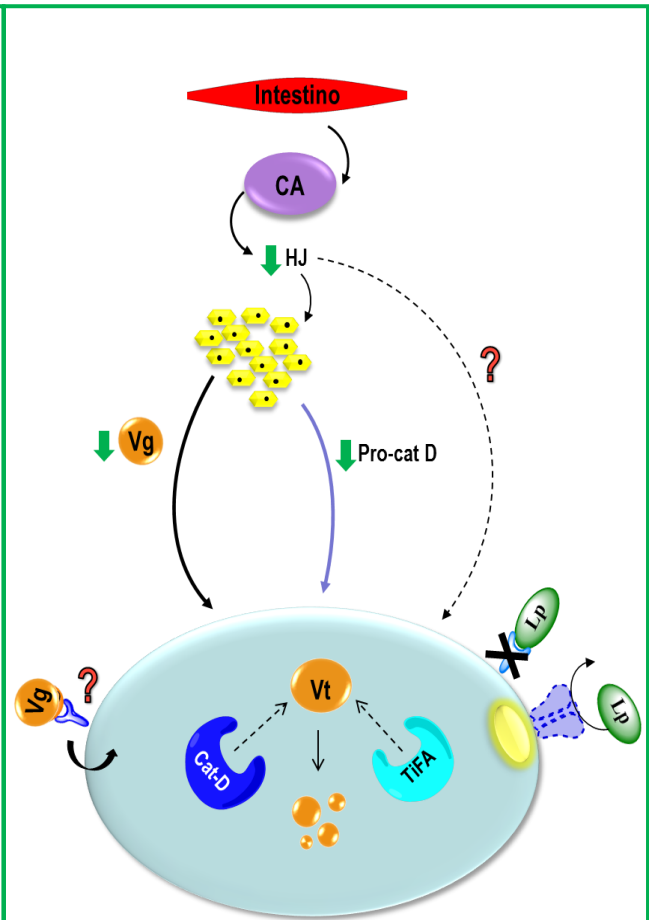
En los vectores de la enfermedad de Chagas la fase reproductiva de atresia folicular tiene un impacto importante en el ciclo de vida de las hembras y consecuentemente, en la epidemiología de la enfermedad. El estudio de los eventos implicados en este proceso permite profundizar en el conocimiento de la biología y fisiología de la reproducción de estos vectores, generando resultados potencialmente útiles en el diseño de estrategias destinadas al control del insecto. Su estudio también posibilitaría obtener conocimientos a nivel bioquímico y celular que podrían ser extensivos para otras especies con importancia en salud, agricultura y/o ganadería.

## Vitelogénesis



- ↑ Proteínas
- ↑ Lípidos
- Pro-Cat D
- ↓ Actividad Cat D
- ↓ Actividad TiFA
- TiFA

## Atresia Folicular



- ↓ Proteínas
  - ↓ Lípidos
  - ↑ Actividad Cat D
  - ↑ Actividad TiFA
- (↑AG → ¿lipasas?)

### MOVILIZACIÓN DE NUTRIENTES

#### ATRESIA TEMPRANA

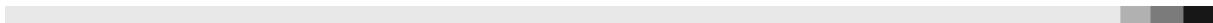
- Mantenimiento de folículos jóvenes.
- 2<sup>do</sup> ciclo gonadotrófico (ingesta de sangre).

#### ATRESIA TARDÍA

- Condiciones metabólicas que permitan la sobrevida de la hembra.

**Fig. 30: Integración de los eventos bioquímicos y celulares en las fases vitelogénica y de atresia folicular de las hembras de *D. maxima*.** En la vitelogénesis, la ingesta de sangre induce la distensión intestinal y la liberación de la hormona juvenil (HJ) desde la corpora allata (CA). En el cuerpo graso, JH estimula la síntesis de vitelogenina (Vg), la principal proteína precursora del vitelo (PPV). Durante la vitelogenesis, la síntesis de Pro-catepsina D (Pro-Cat D) tiene lugar en el cuerpo graso y en el tejido ovárico, comportándose como una PPV. Vg y Pro-Cat D serán captadas por los ovocitos y almacenadas en los gránulos de vitelo (gV). En estas estructuras subcelulares, una tirosina fosfatasa (TiFA) se encuentra parcialmente co-localizando con vitelina (Vt). En la vitelogénesis los ovocitos reclutan lípidos a través del proceso de transferencia mediado por lipoforina (Lp) a nivel de membrana del ovocito y por la endocitosis de la lipoproteína. El cese de la oviposición en *D. maxima* marca el comienzo de la fase post-vitelogénica, caracterizada por cambios histo-morfológicos graduales, la degeneración de los folículos ováricos a un estado atrésico y la oosorción. En la atresia folicular convergen la disminución en la síntesis de Vg y Pro-Cat D en cuerpo graso, una menor captación de Vg en los ovocitos, la caída de las reservas nutricionales del tejido ovárico y la proteólisis de Vt, medida por catepsina D (Cat D) y TiFA. En una etapa temprana de la fase degenerativa, estos eventos facilitarían el mantenimiento de folículos jóvenes y un segundo ciclo gonadotrófico si la hembra accede a una ingesta de sangre. En un estadio avanzado de la atresia, aún si las condiciones nutricionales desfavorables revierten, los cambios en las reservas nutricionales, la activación de hidrolasas ácidas y la proteólisis de Vt privilegiarían el establecimiento de condiciones metabólicas que permitan la supervivencia de la hembra. El modelo contempla la potencial acción reguladora de HJ en la síntesis de Pro-CatD, la participación de receptores para Vg (RVg) y Lp (RLp) putativos y la acción de lipasas en el ovocito aún no caracterizadas.





***REFERENCIAS***

1. Rassi, A. Jr., Rassi, A., Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet*. **375**, 1388-1402.
2. Ventura-Garcia, L., Roura, M., Pell, C., Posada, E., Gascón, J., Aldasoro, E., Muñoz, J., Pool, R. (2013). Socio-cultural aspects of Chagas disease: a systematic review of qualitative research. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2410.
3. Coura, J. R., Viñas, P. A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*. **465**, S6-S7.
4. Klein, N., Hurwitz, I., Durvasula R. (2012). Globalization of Chagas Disease: A Growing Concern in Nonendemic Countries. *Epidemiol. Res. Int.* Article ID 136793.
5. World Health Organization (2014). Chagas disease (American trypanosomiasis). World Health Organ Fact Sheet 340. Disponible en: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
6. Steverding, D. (2014). The history of Chagas disease. *Parasit. Vectors*. **7**, 317.
7. Coura, J. R. (2013). Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **108**, 962-967.
8. Rodrigues, J. C., Godinho, J. L., de Souza, W. (2014). Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. *Subcell. Biochem.* **74**, 1-42.
9. Coura, J. R. (2015). The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **1**, 1-6.
10. Pinto-Dias, J. C. (2006). The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). *Ann. Intern. Med.* **144**, 772-774.
11. Schofield, C. J. (1994). Epidemiología de *Trypanosoma cruzi* y sus vectores. En: Triatominae. Biología y control. Zeneca Public Health, Eurocommunica Publications, UK, pp. 13-16.
12. Jurberg, J., Galvão, C. (2006). Biology, ecology, and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease, and implications for human health. *Denisia* 19, zugleich Katalogue der OÖ. Landesmuseen Neue Serie 50. **19**, 1095-1116.
13. Guzmán-Bracho, C. (2001). Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends Parasitol.* **17**, 372-6.

14. Salazar-Schettino, P. M., Rojas-Wastavino, G. E., Cabrera-Bravo, M., Bucio-Torres, M. I., Martinez-Ibarra, J. A., Monroy-Escobar, M. C., Rodas-Retana, A., Guevara-Gómez, Y., Vences-Blanco, M. O., Ruiz-Hernandez, A. L., Torres-Gutiérrez, E. (2010). A revisión of thirteen species of Triatominae (Hemiptera:Reduviidae) vectors of Chagas disease in Mexico. *J. Selva Andina Res. Soc.* **1**, 57-80.
15. Abad-Franch, F., Santos, W. S., Schofield, C. J. (2010). Research needs for Chagas disease prevention. *Acta Trop.* **115**, 44-54.
16. Noireau, F. (2009). Wild *Triatoma infestans*, a potential threat that needs to be monitored. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **1**, 60-4.
17. Germano, M. D., Roca-Acevedo, G., Mougabure-Cueto, G. A., Toloza, A. C., Vassena, C. V., Picollo, M. I. (2010). New findings of insecticide resistance in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from the Gran Chaco. *J. Med. Entomol.* **47**, 1077-1081.
18. Fabro, J., Sterkel, M., Capriotti, N., Mougabure-Cueto, G., Germano, M., Rivera-Pomar, R., Ons, S. (2012). Identification of a point mutation associated with pyrethroid resistance in the paratype sodium channel of *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Infect. Genet. Evol.* **12**, 487-91.
19. Swevers, L., Raikhel, A. S., Sappington, T. W., Shirk, P., Iatrou, K. (2005). Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. En: Gilbert, L. I., Iatrou, K., Gill, S. S. (Eds.). *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 1: Reproduction and Development, Elsevier, Pergamon, pp. 87-155.
20. Raikhel, A. S., Dhadialla, T. S. (1992). Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu. Rev. Entomol.* **37**, 217-251.
21. Huebner, E., Anderson, E. (1972). A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus*. Cytoarchitecture and development of the trophic chamber. *J. Morphol.* **138**, 1-40.
22. Stoka, A. M., Salomón, O. D., Noriega, F. G. (1987). Physiology of Triatominae's reproduction. En: Brenner, R. R., Stoka, A. M. (Eds.). *Chagas' Disease Vectors*, Vol. 2. CRC Press, Florida, pp. 109-129.
23. Huebner, E., Anderson, E. (1972a). A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus*. I. The ontogeny of the follicular epithelium. *J. Morphol.* **136**, 459-493.

24. Atella, G. C., Gondim, K. C., Machado, E. A., Medeiros, M. N., Silva-Neto, M. A., Masuda, H. (2005). Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *An. Acad. Bras. Cienc.* **77**, 405-430.
25. Aguirre, S. A., Fruttero, L. L., Leyria, J., Defferrari, M. S., Pinto, P. M., Settembrini, B. P., Rubiolo, E. R., Carlini, C. R., Canavoso, L. E. (2011). Biochemical changes in the transition from vitellogenesis to follicular atresia in the hematophagous *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **42**, 832-841.
26. Davey, K. (2007). The interaction of feeding and mating in the hormonal control of egg production in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* **53**, 208-215.
27. Noriega, F. G. (1992). Autogeny in three species of Triatominae: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma rubrovaria*, and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* **29**, 273-277.
28. Aguirre, S. A., Frede, S., Rubiolo, E. R., Canavoso, L. E. (2008). Vitellogenesis in the hematophagous *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of Chagas' disease. *J. Insect Physiol.* **54**, 393-402.
29. Bell, W. J., Bohm, M. K. (1975). Oosorption in insects. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **50**, 373-396.
30. Arrese, E. L., Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* **55**, 207-225.
31. Azeez, O. I., Meintjes, R., Chamunorwa, J. P. (2014). Fat body, fat pad and adipose tissues in invertebrates and vertebrates: the nexus. *Lipids Health Dis.* **13**, 71.
32. Wyatt, G. R. (1980). The fat body as a protein factory. En: *Insect Biology in the Future*. Locke, M., Smith D. S. (Eds.). Academic Press, New York, pp. 201-225.
33. Schooley, D. A., Horodyski, F. M., Coast, G. M. (2005). Hormones controlling homeostasis in insects: endocrinology. En: Gilbert, L. I., Iatrou, K., Gill, S. (Eds.). *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 3. Elsevier, Amsterdam, pp. 493-550.
34. Giorgi, F., Snigirevskaya, E., Raikhel A. S. (2005). The cell biology of yolk protein precursor synthesis and secretion. En: Raikhel, A. S. (Ed.), *Reproductive Biology of Invertebrates*, Vol. 12, Part B. Adiyodi, A. G., Adiyodi, R. G. (Eds.). Science Publishers, Inc., pp. 33-68.

35. Sappington, T. W., Raikhel, A. S. (1998). Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**, 277-300.
36. Shiao, S. H., Hansen, I. A., Zhu, J., Sieglaff, D. H., Raikhel, A. S. (2008). Juvenile hormone connects larval nutrition with target of rapamycin signaling in the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* **54**, 231-39.
37. Park, J. H., Attardo, G. M., Hansen, I. A., Raikhel, A. S. (2006). GATA factor translation is the final downstream step in the amino acid/target-of-rapamycin-mediated vitellogenin gene expression in the anautogenous mosquito *Aedes aegypti*. *J. Biol. Chem.* **281**, 11167-11176.
38. Snigirevskaya, E. S., Raikhel, A. S. (2005). Receptor-mediated endocytosis of yolk proteins in insect oocytes. En: Raikhel, A. S., (Ed.), Reproductive biology of invertebrates. Vol 12, Part B. Progress in vitellogenesis. Adiyodi, A. G., Adiyodi, R. G. (Eds.). Science Publishers, Inc., pp. 198-227.
39. Cho, W. L., Deitsch, K. W., Raikhel, A. S. (1991). An extraovarian protein accumulated in mosquito oocytes is a carboxypeptidase activated in embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 10821-10824.
40. Cho, W. L., Tsao, S. M., Hays, A. R., Walter, R., Chen, J. S., Snigirevskaya, E. S., Raikhel, A. S. (1999). Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *J. Biol. Chem.* **274**, 13311-13321.
41. Yamamoto, Y., Yamahama, Y., Katou, K., Watabe, S., Takahashi, S. Y. (2000). Bombyx acid cysteine protease (BCP): hormonal regulation of biosynthesis and accumulation in the ovary. *J. Insect Physiol.* **46**, 783-791.
42. Yamahama, Y., Yamamoto, Y., Watabe, S., Takahashi, S. Y. (2005). Regulation of yolk protein degradation during insect embryogenesis. En: Raikhel, A. S., (Ed.), Reproductive biology of invertebrates. Vol 12, Part B. Progress in vitellogenesis. Adiyodi, A. G., Adiyodi, R. G. (Eds.). Science Publishers, Inc., pp. 315-354.
43. Valle, D. (1993). Vitellogenesis in insects and other groups - a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **88**, 1-26.

44. Bellés, X. (2005). Vitellogenesis directed by juvenile hormone. En: Raikhel, A. S. (Ed.), *Reproductive Biology of Invertebrates*, Vol. 12, Part B. Progress in vitellogenesis. Adiyodi, A. G., Adiyodi, R. G. (Eds.). Science Publishers, Inc., pp. 157-197.
45. Melo, A. C., Valle, D., Machado, E. A., Salerno, A. P., Paiva-Silva, G. O., Silva, C. O., de Souza, W., Masuda, H. (2000). Synthesis of vitellogenin by the follicle cells of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 549-557.
46. Bownes, M. (2005). The regulation of yolk protein gene expression and vitellogenesis in higher Diptera. En: Raikhel, A. S., (Ed.), *Reproductive biology of invertebrates*. Vol 12, Part B. Progress in vitellogenesis. Adiyodi, A. G., Adiyodi, R. G. (Eds.). Science Publishers, Inc., pp. 95-128.
47. Raikhel, A. S. (2005). Vitellogenesis of disease vectors, from physiology to genes. En: Marquardt, W. C. (Ed.). *Biology of Disease Vectors*. El Sevier. Academic Press, London, UK., pp., 329-346.
48. Ziegler, R., Van Antwerpen, R. (2006). Lipid uptake by insect oocytes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **36**, 264-272.
49. Giorgi, F., Nordin, J. H. (2005). Biochemical and ultrastructural aspects of vitellin utilization during embryogenesis. En: Raikhel, A. S., (Ed.), *Reproductive biology of invertebrates*. Vol 12, Part B. Progress in vitellogenesis. Adiyodi, A. G., Adiyodi, R. G. (Eds.). Science Publishers, Inc., pp. 355-391.
50. Izumi, S., Yano, K., Yamamoto, Y., Takahashi, S. Y. (1994). Yolk proteins from insect eggs: structure, biosynthesis and programmed degradation during embryogenesis. *J. Insect Physiol.* **40**, 735-746.
51. Oliveira, D. M., Ramos, I. B., Reis, F. C., Lima, A. P., Machado, E. A. (2008). Interplay between acid phosphatase and cysteine proteases in mediating vitellin degradation during early embryogenesis of *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.* **54**, 883-891.
52. Ryan, R. O., Van der Horst, D. J. (2000). Lipid transport biochemistry and its role in energy production. *Annu. Rev. Entomol.* **45**, 233-260.
53. Canavoso, L. E., Frede, S., Rubiolo, E. R., (2004). Metabolic pathways for dietary lipids in the midgut of hematophagous *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 845-54.

54. Beenackers, A. M. T., Van der Horst, D. J., Van Marrewijk, W. J. A. (1981). Rol of lipids in energy metabolism. En: Energy metabolism in insects. Downer, R. G. H. (Ed.), Plenum, New York, pp. 53-100.
55. Van Handel, E. (1993). Fuel metabolism of the mosquito (*Culex quinquefasciatus*) embryo. *J. Insect Physiol.* **39**, 831-833.
56. Hansen, I. A., Attardo, G. M., Rodriguez, S. D., Drake, L. L. (2014). Four-way regulation of mosquito yolk protein precursor genes by juvenile hormone-, ecdysone-, nutrient-, and insulin-like peptide signaling pathways. *Front. Physiol.* **20**, 103.
57. Gruntenko, N. E., Yu Rauschenbach, I. (2008). Interplay of JH, 20E and biogenic amines under normal and stress conditions and its effect on reproduction. *J. Insect Physiol.* **54**, 902-908.
58. Wigglesworth, V. B. (1936). The function of corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Q. J. Microsc. Sci.* **79**, 91-121.
59. Riccillo, F. L., Ronderos, J. R. (2010). Allatotropin expression during the development of the fourth instar larvae of the kissing-bug *Triatoma infestans* (Klüg). *Tissue and Cell.* **42**, 355-359.
60. Sterkel, M., Riccillo, F. L., Ronderos, J. R. (2010). Cardioacceleratory and myostimulatory activity of allatotropin in *Triatoma infestans*. *Comp. Biochem. Physiol. A.* **155**, 371-377.
61. Miura, K., Oda, M., Makita, S., Chinzei, Y. (2005). Characterization of the *Drosophila* Methoprene-tolerant gene product. Juvenile hormone binding and ligand-dependent gene regulation. *FEBS J.* **272**, 1169-1178.
62. Charles, J. P., Iwema, T., Epa, V. C., Takaki, K., Rynes, J., Jindra, M. (2011). Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 21128-21133
63. Li, M., Mead, E. A., Zhu, J. (2011). Heterodimer of two bHLH-PAS proteins mediates juvenile hormone-induced gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 638-643.
64. Zou, Z., Saha, T. T., Roy, S., Shin, S. W., Backman, T. W., Girke, T., White, K. P., Raikhel, A. S. (2013). Juvenile hormone and its receptor, methoprene-tolerant, control the dynamics of mosquito gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 2173-2181.
65. Hartfelder, K. (2000). Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**, 157-77.

66. Davey, K. (2007). From insect ovaries to sheep red blood cells: a tale of two hormones. *J. Insect Physiol.* **53**, 1-10.
67. Sappington, T. W., Oishi, K., Raikhel, A. S. (2002). Structural characteristics of insect vitellogenins. En: Raikhel, A. S. (Ed.), Reproductive Biology of Invertebrates, Vol. 12, Part B. Progress in vitellogenesis. Adiyodi, A. G., Adiyodi, R. G. (Eds.). Science Publishers, Inc., pp. 69-101.
68. Tufail, M., Raikhel, A. S., Takeda, M. (2005). Biosynthesis and processing of insect vitellogenins. En: Raikhel, A. S. (Ed.), Reproductive Biology of Invertebrates, Vol. 12, Part B. Progress in vitellogenesis. Adiyodi, A. G., Adiyodi, R. G. (Eds.). Science Publishers, Inc., pp. 1-32.
69. Tufail, M., Nagaba, Y., Elgendy, Y. M., Takeda, M. (2014) Regulation of vitellogenin genes in insects. *Entomol. Sci.* **17**, 269-282
70. Don-Wheeler, G., Engelmann, F. (1997). The biosynthesis and processing of vitellogenin in the fat bodies of females and males of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**, 901-918.
71. Wojchowski, D. M., Parsons, P., Nordin, J. H., Kunkel, J. G. (1986.) Processing of pro-vitellogenin in insect fat body: a role for high-mannose oligosaccharide. *Dev. Biol.* **116**, 422-430.
72. Dhadialla T. S., Raikhel A. S. (1990). Biosynthesis of mosquito vitellogenin. *J. Biol. Chem.* **265**, 9924-9933.
73. Konig, R., Nordin, J. H., Gochoco, C. H., Kunkel, I. G. (1988). Studies on ligand recognition by vitellogenin receptors in follicle membrane preparations of the German cockroach, *Blattella germanica*. *Insect Biochem.* **18**, 395-404.
74. Takahashi, S. Y. (1987). Studies on the phosphorylation of ovarian proteins from the silkworm, *Bombix mori*: identification of band 2 protein as egg specific protein. *Insect Biochem.* **17**, 141-152.
75. Bownes, M. (1982). Yolk polypeptides in higher Diptera. *Q. Rev. Biol.* **57**, 247-274.
76. Tufail, M., Takeda, M. (2008). Molecular characteristics of insect vitellogenins. *J. Insect Physiol.* **54**, 1447-1458.
77. Mundall, E., Engelmann, F. (1977). Endocrine control of vitellogenin synthesis and vitellogenesis in *Triatoma protracta*. *J. Insect Physiol.* **23**, 825-836.



78. Salomón, O. D., Stoka, A. (1986). Vitellin and vitellogenin characterization of *Triatoma infestans* and related species. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* **36**, 419-429.
79. Salerno, A. P., Dansa-Petretski, M., Silva-Neto, M. A., Coelho, H. S., Masuda, H. (2002). *Rhodnius prolixus* vitellin is composed of three different populations: comparison with vitellogenin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 709-717.
80. Snigirevskaya, E. S., Hays, A. R., Raikhel, A. S. (1997). Secretory and internalization pathways of mosquito yolk protein precursors. *Cell Tissue Res.* **290**, 129-142.
81. Giorgi, F., Yin, L., Cecchettini, A., Nordin, J. H. (1997). The vitellin-processing protease of *Blattella germanica* is derived from a pro-protease of maternal origin. *Tissue Cell.* **29**, 293-303.
82. Kageyama, T., Takahashi, S. Y. (1990). Purification and characterization of a cysteine proteinase from silkworm eggs. *Eur. J. Biochem.* **193**, 203-210.
83. Liu, X., Mc Carron, R. C., Nordin, J. H. (1996). A cysteine protease that processes insect vitellin. Purification and partial characterization of the enzyme and the proenzyme. *J. Biol. Chem.* **271**, 33344-33351.
84. Lemanski, L. F., Aldoroty, R. (1974). Role of acid phosphatase in the breakdown of yolk platelets in developing amphibian embryos. *J. Morph.* **153**, 419-426.
85. Chino, H. (1961). Enzymatic pathways in the formation of sorbitol and glycerol in diapausing egg of the silkworm, *Bombyx mori* (L.) II. On the phosphatases. *J. Insect Physiol.* **6**, 231-240.
86. Narise, S. (1984) Purification of acid phosphatase from *Drosophila virilis*. *Insect Biochem.* **14**, 473-480.
87. Purcell, J., Quinn, T. M., Kunkel, J. G., Nordin, J. H. (1988). Correlation of yolk phosphatase with the programmed proteolysis of vitellin in *Blatella germanica* during embryonic development. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **9**, 237-250.
88. Fagotto, F. (1990a). Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **14**, 217-235.
89. Nussenzveig, R. H., Oliveira, P. L., Masuda, H. (1992). Identification of yolk platelet-associated hydrolases in the oocytes of *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **21**, 253-262.

90. Ribolla, P. E. M., Daffre, S., de Bianchi, A. G. (1993) Cathepsin B and acid phosphatase activities during *Musca domestica* embryogenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**, 217-223.
91. Oliveira, D. M., Machado, E. A. (2006). Characterization of a tyrosine phosphatase activity in the oogenesis of *Periplaneta americana*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **63**, 24-35.
92. Fialho, E., Silveira, A. B., Masuda, H., Silva-Neto, M. A. (2002). Oocyte fertilization triggers acid phosphatase activity during *Rhodnius prolixus* embryogenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 871-880.
93. Silveira, A. B., Castro-Santos, J., Senna, R., Logullo, C., Fialho, E., Silva-Neto, M. A. (2006). Tick vitellin is dephosphorylated by a protein tyrosine phosphatase during egg development: effect of dephosphorylation on VT proteolysis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **36**, 200-209.
94. Fialho, E., Nakamura, A., Juliano, L., Masuda, H., Silva-Neto, M. A. (2005). Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.* **436**, 246-253.
95. Gomes, F. M., Oliveira, D. M., Motta, L. S., Ramos, I. B., Miranda, K. M., Machado, E. A. (2010). Inorganic polyphosphate inhibits an aspartic protease-like activity in the eggs of *Rhodnius prolixus* (Stahl) and impairs yolk mobilization in vitro. *J. Cell Physiol.* **222**, 606-611.
96. Gacko, M., Minarowska, A., Karwowska, A., Minarowski, L. (2007). Cathepsin D inhibitors. *Folia Histochem. Cytobiol.* **45**, 291-313.
97. Benes, P., Vetvicka, V., Fusek, M. (2008). Cathepsin D: many functions of one aspartic protease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **68**, 12-28.
98. Zaidi, N., Maurer, A., Nieke, S., Kalbacher, H. (2008). Cathepsin D: a cellular roadmap. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**, 5-9.
99. Barford, D., Das, A. K., Egloff, M. P. (1998). The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 133-64.
100. Anand, A., Srivastava, P. K. (2012). A molecular description of acid phosphatase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **167**, 2174-2197.

101. Telfer, W. H. (1960). The selective accumulation of blood proteins by the oocytes of saturniid moths. *Biol. Bull. Woods Hole*. **118**, 338-351.
102. Roth, T. F., Porter, K. R. (1964). Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Cell. Biol.* **20**, 313-332.
103. Sappington, T. W., Kokoza, V. A., Cho, W. L., Raikhel, A. S. (1996). Molecular characterization of the mosquito vitellogenin receptor reveals unexpected high homology to the *Drosophila* yolk protein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 8934-8939.
104. Chen, M. E., Lewis, D. K., Keeley, L. L., Pietrantonio, P. V. (2004). cDNA cloning and transcriptional regulation of the vitellogenin receptor from the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Mol. Biol.* **13**, 195-204.
105. Tufail, M., Takeda, M. (2005). Molecular cloning, characterization and regulation of the cockroach vitellogenin receptor during oogenesis. *Insect Mol. Biol.* **14**, 389-401.
106. Ciudad, L., Bellés, X., Piulachs, M. D. (2006). Systemic RNAi of the cockroach vitellogenin receptor results in a phenotype similar to that of the *Drosophila* yolkless mutant. *FEBS J.* **273**, 325-335.
107. Tufail, M., Takeda, M. (2009). Insect vitellogenin/lipophorin receptors: molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms. *J. Insect Physiol.* **55**, 87-103.
108. Schonbaum, C. P., Lee, S., Mahowald, A. P. (1995). The *Drosophila* yolkless gene encodes a vitellogenin receptor belonging to the low density lipoprotein receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 1485-1489.
109. Tufail, M., Elmogy, M., Ali Fouda, M. M., Elgendy, A. M., Bembenek, J., Trang, L. T., Shao, Q. M., Takeda, M. (2009). Molecular cloning, characterization, expression pattern and cellular distribution of an ovarian lipophorin receptor in the cockroach, *Leucophaea maderae*. *Insect Mol. Biol.* **18**, 281-294.
110. Van der Horst, D. J., Rodenburg, K. W. (2010). Lipoprotein assembly and function in an evolutionary perspective. *Bio. Mol. Concepts*. **1**, 165-183.
111. Fagotto, F. (1990b). Yolk degradation in tick eggs: II. Evidence that cathepsin L-like proteinase is stored as a latent, acid-activable proenzyme. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **14**, 237-252.

112. Nordin, J. H., Beaudoin, E. L., Liu, X. (1990). Proteolytic processing of *Blattella germanica* vitellin during early embryo development. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **15**, 119-135.
113. Nordin, J. H., Beaudoin, E. L., Lin, X. (1991). Acidification of yolk granules in *Blattella germanica* eggs coincide with proteolytic processing of vitellin. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **18**, 177-192.
114. Maxfield, F. R., Yamashiro, D. J. (1991). Acidification of organelles and intracellular sorting of proteins during endocytosis. In *Intracellular trafficking of proteins*. Steer, C. J. and Hanover, J. A. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, U.K., pp. 157-182.
115. Kawooya, J. K., Osir, E. O., Law, J. H. (1988). Uptake of the major hemolymph lipoprotein and its transformation in the insect egg. *J. Biol. Chem.* **263**, 8740-8747.
116. Ziegler, R. (1997). Lipid synthesis by ovaries and fat body of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Eur. J. Entomol.* **94**, 385-391.
117. Van Antwerpen, R., Pham, D. Q. D., Ziegler, R. (2005). Accumulation of lipids in insect oocytes. En: Raikhel, A. S. (Ed.), *Reproductive Biology of Invertebrates*, Vol. 12, Part B. Adiyodi, A. G., Adiyodi, R. G. (Eds.). Science Publishers, Inc., pp. 265-287.
118. Fruttero, L. L., Frede, S., Rubiolo, E. R., Canavoso, L. E. (2011). The storage of nutritional resources during vitellogenesis of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): the pathways of lipophorin in lipid delivery to developing oocytes. *J. Insect Physiol.* **57**, 475-86.
119. Juárez, M. P., Fernández, G. C. (2007). Cuticular hydrocarbons of triatomines. *Comp. Biochem. Physiol. A.* **147**, 711-730.
120. Arrese, E. L., Canavoso, L. E., Jouni, Z. E., Pennington, J. E., Tsuchida, K., Wells, M. A. (2001). Lipid storage and mobilization in insects: Current status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**, 7-17.
121. Canavoso, L. E., Jouni, Z. E., Karnas, K. J., Pennington, J. E., Wells, M. A. (2001). Fat metabolism in insects. *Annu. Rev. Nutr.* **21**, 23-46.
122. Matsuda, F., Inoue, N., Manabe, N., Ohkura, S. (2012). Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J. Reprod. Dev.* **58**, 44-50.

123. Wang, M. H., Horng, S. B. (2004). Egg dumping and life history strategy of *Callosobruchus maculatus*. *Physiol. Entomol.* **29**, 26-31.
124. Moore, P. J., Attisano, A. (2011). Oosorption in response to poor food: complexity in the trade-off between reproduction and survival. *Ecol. Evol.* **1**, 37-45.
125. Bell, W. J. (1971). Starvation-induced oöcyte resorption and yolk protein salvage in *Periplaneta Americana*. *J. Insect Physiol.* **17**, 1099-1111.
126. Uchida, K., Ohmori, D., Ueno, T., Nishizuka, M., Eshita, Y., Fukunaga, A., Kominami, E. (2001). Preoviposition activation of cathepsin-like proteinases in degenerating ovarian follicles of the mosquito *Culex pipiens pallens*. *Dev. Biol.* **237**, 68-78.
127. Kotaki, T. (2003). Oosorption in the stink bug, *Plautia crossota stali*: induction and vitellogenin dynamics. *J. Insect Physiol.* **49**, 105-113.
128. Barrett, E. L., Preziosi, R. F., Moore, A. J., Moore, P. J. (2008). Effects of mating delay and nutritional signals on resource recycling in a cyclically breeding cockroach. *J. Insect Physiol.* **54**, 25-31.
129. Medeiros, M. N., Ramos, I. B., Oliveira, D. M., da Silva, R. C., Gomes, F. M., Medeiros, L. N., Kurtenbach, E., Chiarini, L. B., Masuda, H., de Souza, W., Machado, E. A. (2011). Microscopic and molecular characterization of ovarian follicle atresia in *Rhodnius prolixus* *Stahl* under immune challenge. *J. Insect Physiol.* **57**, 945-953.
130. Uchida, K., Nishizuka, M., Ohmori, D., Ueno, T., Eshita, Y., Fukunaga, A. (2004). Follicular epithelial cell apoptosis of atretic follicles within developing ovaries of the mosquito *Culex pipiens pallens*. *J. Insect Physiol.* **50**, 903-912.
131. Aguirre, S. A., Pons, P., Settembrini, B. P., Arroyo, D., Canavoso, L. E. (2013). Cell death mechanisms during follicular atresia in *Dipetalogaster maxima*, a vector of Chagas' disease (Hemiptera: Reduviidae). *J. Insect Physiol.* **59**, 532-541.
132. Guo, J. Y., Dong, S. Z., Ye, G. Y., Li, K., Zhu, J. Y., Fang, Q., Hu, C. (2011). Oosorption in the endoparasitoid, *Pteromalus puparum*. *J. Insect Sci.* **11**, 90.
133. Asplen, M. K., Byrne, D. N. (2006). Quantification and ultrastructure of oosorption in *Eretmocerus eremicus* (Hymenoptera: Aphelinidae). *J. Morphol.* **267**, 1066-1074.
134. Sayah, F. (2008). Changes in the lipid and fatty acid composition of hemolymph and ovaries during the reproductive cycle of *Labidura riparia*. *Entomol. Sci.* **11**, 55-63.

135. Marcato, M. B., Stariolo, R., Rubiolo, E. R. (2003). Reservas metabólicas en hembras autógenas y no autógenas de *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae). Sociedad Argentina de Protozoología. XIX Reunión Científica Anual.
136. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
137. Bollag, D. M., Edelstein, S. J. (1991). Electrophoresis under nondenaturing conditions. En: Protein Methods. Wiley-Liss, Inc., pp. 143-160.
138. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
139. Pitas, R. E., Innerarity, T. L., Weinstein, J. N., Mahley, R. W. (1981). Acetoacetylated lipoproteins used to distinguish fibroblasts from macrophages *in vitro* by fluorescence microscopy. *Arteriosclerosis.* **1**, 177-185.
140. Hermanson, G. T. (1996). Antibody modification and conjugation. En: Bioconjugate Techniques. Academic Press, San Diego, pp. 456-493.
141. Martin-Nizard, F., Richard, B., Torpier, G., Nouvelot, A., Fruchart, J. C., Duthilleul, P., Delbart, C. (1987). Analysis of phospholipid transfer during HDL binding to platelets using a fluorescent analog of phosphatidylcholine. *Thromb. Res.* **46**, 811-825.
142. Canavoso, L. E., Rubiolo, E. R. (1995). Interconversions of lipophorin particles by adipokinetic hormone in hemolymph of *Panstrongylus megistus*, *Dipetalogaster maximus* and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Comp. Biochem. Physiol. A.* **112A**, 143-150.
143. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1996). En: Current protocols in molecular biology, New York: John Wiley Sons, Inc., pp.15.0.1-15.8.8.
144. Van Handel, E. (1965). Microseparation of glycogen, sugars, and lipids. *Anal. Biochem.* **11**, 266-271.
145. Canavoso, L. E., Stariolo, R., Rubiolo, E. R. (2003). Flight metabolism in *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): the role of carbohydrates and lipids. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **98**, 909-914.

146. Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
147. Fukumoto, S., Fujimoto, T. (2002). Deformation of lipid droplets in fixed samples. *Histochem. Cell. Biol.* **118**, 423-428.
148. Akiduki, G., Imanishi, S. (2007). Establishment of a lipid accumulation model in an insect cell line. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **66**, 109-121.
149. Stanisçuaski, F., Ferreira-Dasilva, C. T., Mulinari, F., Pires-Alves, M., Carlini, C. R. (2005). Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon.* **45**, 753-760.
150. Sorgine, M. H., Logullo, C., Zingali, R. B., Paiva-Silva, G. O., Juliano, L., Oliveira, P. L. (2000). A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.* **275**, 28659-28665.
151. Piovesan, A. R., Stanisçuaski, F., Marco-Salvadori, J., Real-Guerra, R., Defferrari, M. S., Carlini, C. R. (2008). Stage-specific gut proteinases of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*: role in the release of entomotoxic peptides from *Canavalia ensiformis* urease. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**, 1023-1032.
152. Defferrari, M. S., Demartini, D. R., Marcelino, T. B., Pinto, P. M., Carlini, C. R. (2011). Insecticidal effect of *Canavalia ensiformis* major urease on nymphs of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* and characterization of digestive peptidases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **41**, 388-399.
153. Peuhu, E., Kaunisto, A., Laihia, J. K., Leino, L., Eriksson, J. E. (2010). Molecular targets for the protodynamic action of cis-urocanic acid in human bladder carcinoma cells. *BMC Cancer.* **10**, 521.
154. Schägger, H., Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
155. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 4350-4354.
156. Kenworthy, A. K. (2001). Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods.* **24**, 289-296.

157. Van Antwerpen, R., Salvador, K., Tolman, K., Gentry, C. (1998). Uptake of lipids by developing oocytes of the hawkmoth *Manduca sexta*. The possible role of lipoprotein lipase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**, 399-408.
158. Santos, R., Mariano, A. C., Rosas-Oliveira, R., Pascarelli, B., Machado, E. A., Meyer Fernandes, J. R., Gondim, K. C. (2008). Carbohydrate accumulation and utilization by oocytes of *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **67**, 55-62.
159. Santos, R., Rosas-Oliveira, R., Saraiva, F. B., Majerowicz, D., Gondim, K. C. (2011). Lipid accumulation and utilization by oocytes and eggs of *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **77**, 1-16.
160. Van der Horst, D. J., Ryan, R. O. (2012). Lipid Transport. En: *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Gilbert, L. I. (Ed.). Vol. 9. pp. 317-345.
161. Arrese, E. L., Mirza, S., Rivera, L., Howard, A. D., Chetty, P. S., Soulages, J. L. (2008). Expression of lipid storage droplet protein-1 may define the role of AKH as a lipid mobilizing hormone in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**, 993-1000.
162. Walther, T. C., Farese, R. V. (2012). Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 687-714.
163. Liu, T. P., Davies, D. M. (1972). Ultrastructure of protein and lipid inclusions in frozen-etched blackfly oocytes (Simuliidae, Diptera). *Can. J. Zool.* **50**, 59-62.
164. Wiemerslage, L. J. (1976). Lipid droplet formation during vitellogenesis in the *Cecropia* moth. *J. Insect Physiol.* **22**, 41-50.
165. Clifton, M. E., Noriega, F. G. (2012). The fate of follicles after a blood meal is dependent on previtellogenic nutrition and juvenile hormone in *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* **58**, 1007-1019.
166. Suzuki, M., Shinohara, Y., Ohsaki, Y., Fujimoto T. (2011). Lipid droplets: size matters. *J. Electron Microsc. (Tokyo)* **60**, Suppl 1, S101-116.
167. Kawooya, J. K., Law, J. H. (1988). Role of lipophorin in lipid transport to the insect egg. *J. Biol. Chem.* **263**, 8748-8753.
168. Sun, J., Hiraoka, T., Dittmer, N. T., Cho, K. H., Raikhel, A. S. (2000). Lipophorin as a yolk protein precursor in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 1161-1171.



169. Atella, G. C., Shahabuddin, M. (2002). Differential partitioning of maternal fatty acid and phospholipid in neonate mosquito larvae. *J. Exp. Biol.* **205**, 3623-3630.
170. Gondim, K. C., Oliveira, P. L., Masuda, H. (1989). Lipophorin and oogenesis in *Rhodnius prolixus*: transfer of phospholipids. *J. Insect Physiol.* **35**, 19-27.
171. Machado, E. A., Atella, G. C., Gondim, K. C., de Souza, W., Masuda, H., (1996). Characterization and immunocytochemical localization of lipophorin binding sites in the oocytes of *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **31**, 185-196.
172. Dantuma, N. P., Pijnenburg, M. A., Diederens, J. H. B., Van der Horst, D. J. (1997). Developmental down-regulation of receptor-mediated endocytosis of an insect lipoprotein. *J. Lipid Res.* **38**, 254-265.
173. Soulages, J. L., Wells, M. A. (1994). Lipophorin: the structure of an insect lipoprotein and its role in lipid transport in insects. *Adv. Protein. Chem.* **45**, 371-415.
174. Wittlin, S., Rösel, J., Hofmann, F., Stover, D. R. (1999). Mechanisms and kinetics of pro-cathepsin D activation. *Eur. J. Biochem.* **265**, 384-93.
175. Cho, W. L., Raikhel, A. S. (1992). Cloning of cDNA for mosquito lysosomal aspartic protease. Sequence analysis of an insect lysosomal enzyme similar to cathepsins D and E. *J. Biol. Chem.* **267**, 21823-21829.
176. Oliveira, D. M., Gomes, F. M., Carvalho, D. B., Ramos, I., Carneiro, A. B., Silva-Neto, M. A., de Souza, W., Lima, A. P., Miranda, K., Machado, E. A. (2013). Yolk hydrolases in the eggs of *Anticarsia gemmatalis hubner* (Lepidoptera: Noctuidae): a role for inorganic polyphosphate towards yolk mobilization. *J. Insect Physiol.* **59**, 1242-1249.
177. Tonks, N. K. (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**, 833-846.
178. Yamaguchi, S., Katagiri, S., Sekimizu, K., Natori, S., Homma, K. J. (2005). Involvement of EDTP, an egg-derived tyrosine phosphatase, in the early development of *Drosophila melanogaster*. *J. Biochem.* **138**, 721-728.
179. Wimmer, M., Schmid, B., Tag, C., Hofer, H. W. (1998). *Ascaris suum*: protein phosphotyrosine phosphatases in oocytes and developing stages. *Exp. Parasitol.* **88**, 139-145.

180. Goncu, E., Parlak, O. (2008). Some autophagic and apoptotic features of programmed cell death in the anterior silk glands of the silkworm, *Bombyx mori*. *Autophagy*. **4**, 1069-1072.
181. Malagoli, D., Abdalla, F. C., Cao, Y., Feng, Q., Fujisaki, K., Gregorc, A., Matsuo, T., Nezis, I. P., Papassideri, I. S., Sass, M., Silva-Zacarin, E. C., Tettamanti, G., Umemiya-Shirafuji, R. (2010). Autophagy and its physiological relevance in arthropods: current knowledge and perspectives. *Autophagy*. **6**, 575-588.
182. Fagotto, F. (1995). Regulation of yolk degradation, or how to make sleepy lysosomes. *J. Cell Sci.* **108**, 3645-3647.
183. Abreu, L. A., Valle, D., Manso, P. P. A., Façanha, A. R., Pelajo-Machado, M., Masuda, H., Masuda, A., Vaz, I. Jr., Lenzi, H., Oliveira, P. L., Logullo, C. (2004). Proteolytic activity of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin D (YBC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 443-449.
184. Yamahama, Y., Uto, N., Tamotsu, S., Miyata, T., Yamamoto, Y., Watabe, S., Takahashi, S. Y. (2003). In vivo activation of pro-form *Bombyx* cysteine protease (BCP) in silkworm eggs: localization of yolk proteins and BCP and acidification of yolk granules. *J. Insect Physiol.* **49**, 131-140.
185. Perez-Hedo, M., Rivera-Perez, C., Noriega, F. G. (2014). Starvation increases insulin sensitivity and reduces juvenile hormone synthesis in mosquitoes. *Plos One*. **9**, e86183.
186. Leyria, J., Fruttero, L. L., Aguirre, S. A., Canavoso, L. E. (2014). Ovarian nutritional resources during the reproductive cycle of the hematophagous *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae): focus on lipid metabolism. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **87**, 148-163.
187. Fruttero, L. L., Demartini, D. R., Rubiolo, E. R., Carlini, C. R., Canavoso, L. E. (2014).  $\beta$ -chain of ATP synthase as a lipophorin binding protein and its role in lipid transfer in the midgut of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **52**, 1-12.



***ANEXO*** 

Los resultados obtenidos en esta Tesis fueron publicados y/o presentados total o parcialmente según se detalla a continuación. Por limitaciones de espacio, sólo se listan los trabajos y abstracts publicados en revistas con referato, las anotaciones en bases de datos y los trabajos con distinción y/o premiados.

## **Publicaciones**

**Leyria J**, Fruttero LL, Aguirre SA, Canavoso LE (2014). Ovarian nutritional resources during the reproductive cycle of the hematophagous *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae): focus on lipid metabolism. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **87**, 148-163.

Aguirre SA, Fruttero LL, **Leyria J**, Defferrari MS, Pinto PM, Settembrini BP, Carlini RC, Rubiolo ER, Canavoso LE (2011). Biochemical changes during the transition from vitellogenesis to follicular atresia in the hematophagous *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **41**, 832-884.

## **Manuscritos enviados para su publicación**

**Leyria J**, Fruttero LL, Nazar M, Canavoso LE (2015). The Role of Cathepsin D and Acid Phosphatase in the Process of Follicular Atresia in *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae), a Vector of Chagas' Disease. Suministrado a *Plos One*. En revisión.

## **Abstracts**

**Leyria J**, Nazar M, Fruttero LL, Rubiolo ER, Canavoso LE (2013). Involvement of two acid hidrolases in the follicular atresia in *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae). *Biocell* **37** (3), A127.

**Leyria J**, Aguirre SA, Nazar M, Canavoso LE (2013). Biochemical and molecular aspects of vitellogenin and its receptor during the reproductive cycle of *Dipetalogaster maxima*. *Biocell* **37** (3), A127.

---

**Leyria J**, Fruttero LL, Aguirre SA, Rubiolo ER, Canavoso LE (2013). Changes of nutritional resources in ovarian tissue of *Dipetalogaster maxima* during the reproductive cycle. *Biocell* **37** (3), A128.

**Leyria J**, Aguirre SA, Fruttero LL, Carlini RC, Rubiolo ER (2011). Role of acid hydrolases during follicular atresia in a vector of Chagas' disease. *Biocell* **35** (3), A299.

**Leyria J**, Aguirre SA, Fruttero LL, Rubiolo ER, Canavoso LE (2009). Physiological and biochemical aspects of vitellogenesis and follicular regression in vectors of Chagas' disease. *Biocell* **33** (3), 260.

#### **Anotación de secuencias en bancos de datos**

**Leyria J**, Fruttero LL, Arrese EL, Nazar M, Soulages JL, Canavoso LE (2013). *Dipetalogaster maximus* cathepsin D mRNA, partial cds". *Genbank* accession #KF724683.

#### **Trabajos con distinción y/o premiados**

**Leyria J.**, Nazar M, Fruttero LL, Rubiolo ER y Canavoso LE (2013). Rol de dos hidrolasas ácidas en la atresia folicular de *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae). XIX Jornadas Científicas de la Sociedad de Biología de Córdoba. Ciudad de La Falda, Córdoba.

**Leyria J**, Aguirre SA, Fruttero LL, Carlini RC, Rubiolo ER, Canavoso LE (2011). Rol de hidrolasas ácidas durante la atresia folicular de *Dipetalogaster maxima*, un vector de la enfermedad de Chagas. 2º Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina.