

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**“CARACTERIZACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN DE  
LA VITELOGENINA EN EL VECTOR DE LA  
ENFERMEDAD DE CHAGAS *Triatoma infestans*  
(HEMIPTERA: REDUVIIDAE)”**

**Lic. María José Blariza**

**Directora: Dra. Beatriz A. García  
Co-Director: Dr. Néstor W. Soria**

**Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular**

**Facultad de Ciencias Médicas**

**Universidad Nacional de Córdoba**

**Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)**

**CONICET-UNC**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**Córdoba, Argentina**

**2014**

## COMISIÓN ASESORA

Dra. Beatriz A. García  
INICSA (CONICET). Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

Dra. Carolina Touz  
Instituto de Investigación Médica, Mercedes y Martín Ferreyra. Córdoba, Argentina.

Dr. Rolando Rivera Pomar  
Centro Regional de Estudios Genómicos (CREG), Universidad Nacional de La Plata. Centro de Bioinvestigaciones Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

## DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

### TRIBUNAL

Firma: ..... Aclaración:.....

Firma: ..... Aclaración: .....

Firma: ..... Aclaración: .....

*A mi familia...*

*A Bautista...*

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios y a la Virgen por estar presentes en cada paso de mi vida y por permitirme alcanzar un nuevo objetivo*

*A mi Directora, Dra. Beatriz García, por abrirme las puertas del laboratorio, por brindarme sus experiencias y confianza. A mi Codirector de Tesis, Dr. Néstor Soria, por iniciarme en la biología molecular.*

*A los miembros de la Comisión Asesora, Dr. Rolando Rivera Pomar y Dra. Carolina Touz por sus sugerencias tan enriquecedora, su compromiso para con esta tesis y su excelente predisposición.*

*A mis padres, “Bibi” y “Dedé” mis ejemplos a seguir, por su apoyo incondicional en esta tesis y en la vida, por sus valores inculcados.*

*A mis hermanos y amigos, Gabriela y Juan Pablo, por estar siempre.*

*A Javier y Bautista, por su paciencia y tierna compañía. Gracias por compartir mi vida y mis logros.*

*A mis abuelos, símbolos de trabajo, lucha, honestidad y tantos otros valores, sé que comparten mi alegría.*

*A mis amigas por sus mates, consejos y paciencia. Por estar siempre en los momentos buenos y en los no tanto.*

*A mis compañeras de laboratorio y de la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular que formaron parte esta aventura, por su ayuda constante y por los hermosos momentos compartidos.*

## PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

**Blariza M.J.**, Néstor W. Soria, Adrián G. Torres, Carla G. Grosso and Beatriz A. García. 2014. cDNA isolation and characterization of two vitellogenin genes in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *Gene* 543, 118-124.

**Blariza M.J.**, Jimena Leyria, Lilián E. Canavoso, Néstor W. Soria, Beatriz A. García. Expression analysis of two vitellogenin genes in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). Enviado a publicar.

## PUBLICACIONES REALIZADAS EN EL MARCO DE LA TESIS

García B.A., Pérez de Rosas A.R, **Blariza M.J.**, Grosso C.G., Fernández C.J. and Stroppa M.M. 2013. Molecular Population Genetics and Evolution of the Chagas' Disease Vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Current Genomics* 14, 316-323.

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<i>Enfermedad de Chagas</i> .....	7
<i>Vectores</i> .....	9
<i>Ciclo reproductivo de Triatomíneos</i> .....	14
Vitelogénesis .....	18
Regulación de la vitelogénesis .....	22
<i>Vitelogenina</i> .....	24
<i>Proteínas minoritarias precursoras del vitelo</i> .....	29
<b>OBJETIVOS</b> .....	30
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<i>Insectos</i> .....	31
<i>Extracción de tejidos</i> .....	32
<i>Extracción de ARN</i> .....	35
Extracción de ARN total.....	35
<i>Síntesis de ADN copia (ADNc)</i> .....	38
<i>Amplificación rápida del extremo 3´ del ADNc</i> .....	39
Síntesis de ADN copia .....	39
Amplificación del extremo 3´ del ADNc .....	39
Purificación de la banda extraída del gel .....	41
<i>Diseño de primers específicos, degenerados e inespecíficos</i> .....	42
<i>Amplificación de diferentes fragmentos del gen de la vitelogenina (Vg)</i> .....	42
Purificación de los productos de PCR .....	44
Clonación de los productos de PCR .....	45
Preparación de medios de cultivo LB y LB agar .....	45
Preparación del producto de ligación .....	45
Transformación de células competentes .....	46

Selección de las colonias con insertos .....	47
Mini preparaciones de plásmidos .....	48
PCR de insertos contenidos en los plásmidos .....	49
Secuenciación de diferentes fragmentos del gen de la vitelogenina .....	50
<b><i>Amplificación rápida del extremo 5' del ADNc</i></b> .....	51
Tratamiento con fosfatasa alcalina .....	51
Tratamiento con pirofosfatasa ácida .....	52
Unión del oligonucleótido 5'-RACE .....	53
Síntesis de la primera cadena de ADNc .....	54
Síntesis de la segunda cadena de ADNc y amplificación por PCR .....	54
<b><i>Análisis de las secuencias de ADNc de vitelogenina</i></b> .....	56
<b><i>Alineamiento de secuencias y relación filogenética</i></b> .....	56
<b><i>Determinación de la expresión a nivel de transcripción de dos genes de la vitelogenina Vg1 y Vg2</i></b> .....	57
Diseño de primers y sondas TaqMan .....	58
PCR cuantitativa .....	59
<b><i>Determinación de la expresión del gen de vitelogenina (Vg) a nivel proteico</i></b> .....	61
Western Blot .....	61
Ensayos de inmunofluorescencia indirecta .....	62
<b><i>ARN de interferencia (ARN<sub>i</sub>)</i></b> .....	63
Producción del templado por PCR .....	63
Síntesis de ARN de doble cadena (ARN <sub>dc</sub> ) .....	66
Remoción de la hebra molde de ADNc, hibridación de ARN de doble cadena (ARN <sub>dc</sub> ) y remoción de ARN de cadena simple (ARN <sub>sc</sub> ) .....	67
Purificación del ARN de doble cadena (ARN <sub>dc</sub> ) .....	67
Inyección de ARN de doble cadena (ARN <sub>dc</sub> ) .....	68

## **RESULTADOS** .....

<b><i>Identificación de dos genes de vitelogenina (Vg1 y Vg2) en Triatoma infestans</i></b> .....	71
<b><i>Análisis comparativo de las secuencias de Vg1 y Vg2</i></b> .....	72
<b><i>Análisis de la secuencia de aminoácidos de Vg2</i></b> .....	74



<i>Comparación de la secuencia de aminoácidos de Vg2 de Triatoma infestans con las de otros insectos</i> .....	77
<i>Relaciones filogenéticas de Vg2 de Triatoma infestans con las vitelogeninas (Vgs) de otros insectos hemimetábolos</i> .....	79
<i>Expresión de los genes Vg1 y Vg2 a nivel de transcripción en ambos sexos, diferentes tejidos y dos estadios evolutivos de Triatoma infestans</i> .....	81
<i>Expresión de los genes Vg1 y Vg2 a nivel de transcripción en diferentes condiciones de alimentación</i> .....	83
Expresión de los genes Vg1 y Vg2 en cuerpo graso de hembras adultas .....	84
Expresión de los genes Vg1 y Vg2 en ovarios de hembras adultas .....	87
<i>Determinación de la expresión del gen Vg a nivel proteico</i> .....	89
<i>Silenciamiento de los genes Vg1 y Vg2 utilizando ARN de interferencia (ARN<sub>i</sub>)</i> .....	92
<b>DISCUSIÓN</b> .....	96
<b>CONCLUSIONES</b> .....	106
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	108

# ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>μl</b>	Microlitros
<b>μg</b>	Microgramos
<b>μM</b>	Micromolar
<b>anti-Vt</b>	Anticuerpo anti-vitelina
<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>ADNasa</b>	Desoxiribonucleasa
<b>ADNc</b>	ADN complementario al ARN
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNasa</b>	Ribonucleasa
<b>ARNdc</b>	ARN doble cadena
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ARNi</b>	ARN de interferencia
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CF</b>	Células foliculares
<b>DE</b>	Desvío estándar
<b>dNTPs</b>	Desoxiribonucleótidos trifosfato
<b>DR</b>	Depresiones recubiertas
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ECL</b>	Enhanced Chemiluminescence (Quimioluminiscencia)
<b>EDTA</b>	Ácido etiléndiaminotetracético
<b>Et</b>	Endosoma temprano
<b>GVt</b>	Gránulo de vitelo transicional
<b>GV</b>	Gránulo de vitelo maduro
<b>H</b>	Hemolinfa
<b>20-HE</b>	20-hidroxiecdisona

<b>HJ</b>	Hormona juvenil
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>Kb</b>	Kilobase o 1000 pb
<b>kDa</b>	Kilodaltons
<b>Lp</b>	Lipoforina
<b>LpR</b>	Receptor de lipoforina
<b>M</b>	Molar
<b>Min.</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MV</b>	Microvellosidades
<b>Nm</b>	Nanómetro
<b>OCT</b>	Temperatura de corte óptima
<b>Oligo</b>	Oligodeoxiribonucleótido
<b>Oligo-dT</b>	Oligonucleótido de desoxitimidina
<b>ORF</b>	Marco de lectura abierto
<b>Oo</b>	Ovocitos
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>pH</b>	Logaritmo negativo de la concentración de hidrogeniones por litro
<b>PPV</b>	Proteína precursora del vitelo
<b>RHBP</b>	Proteína de unión al hemo en <i>Rhodnius prolixus</i>
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PPV</b>	Proteína precursora del vitelo
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa

<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT</b>	Transcriptasa reversa
<b>Seg.</b>	Segundos
<b>RVg</b>	Receptor de vitelogenina
<b>SDS</b>	Duodecil sulfato de sodio
<b>TBS</b>	Buffer Tris salino
<b>UTR</b>	Región no traducida
<b>Vg</b>	Vitelogenina
<b>VR</b>	Vesículas recubiertas
<b>Vt</b>	Vitelina
<b>x g</b>	Unidad de aceleración de la gravedad
<b>X-Gal</b>	5-Bromo-4-cloro-3indolil $\beta$ -d-galactopiranosido

## RESUMEN

Con el propósito de analizar en *Triatoma infestans* un gen involucrado en el proceso de ovogénesis como el que codifica para vitelogenina (Vg), fosfolipoglicoproteína precursora de vitelina (Vt), se inició el estudio con la identificación de dos genes Vg (Vg1 y Vg2). Se determinaron los patrones de expresión de ambos genes a nivel de transcripción (qPCR) y proteico (Western Blot) en cuerpo graso y ovarios de hembras adultas durante la fase pre-vitelogénica (período sin alimentar) y vitelogénica (después de la ingesta de sangre). Además, la expresión a nivel de ARNm se analizó en diferentes tejidos de hembras y machos adultos y en cuerpo graso de ninfas de quinto estadio. No se detectó ARNm de Vg en ninfas ni en machos adultos. Ambos genes se expresaron a nivel transcripcional y proteico en cuerpo graso y ovarios de las hembras adultas y se observó un efecto significativo de la alimentación en los niveles de dicha expresión en el cuerpo graso. Además, mediante ensayos de inmunofluorescencia, se detectó una fuerte señal para Vt en los folículos terminales de hembras vitelogénicas. El silenciamiento de los genes Vg mediante ARN de interferencia (ARN<sub>i</sub>) disminuyó su expresión en cuerpo graso y ovarios de hembras adultas, observándose ausencia de oviposición.

## ABSTRACT

Two vitellogenin genes (Vg1 and Vg2) were identified in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans*. The expression levels of both genes were determined by qPCR and Western Blot in fat body and ovaries of adult females, at different times after molting (pre-vitellogenesis, unfed period) and after a blood meal (vitellogenic phase). Vg1 and Vg2 genes were also evaluated by qPCR in different tissues of adult males and females as well as in fat body of fifth instar nymphs. No trace of Vg1 or Vg2 mRNAs was detected in adult males or in nymphs. Both, Vg1 and Vg2 genes, were expressed in the fat bodies and ovaries of adult females. The data showed a significant effect of feeding on the Vg1 and Vg2 mRNA levels and protein levels in the fat body of adult females. Besides, the immunofluorescence assays showed a strong signal for vitellin (Vt) in the yolk bodies of terminal follicles of vitellogenic females. The involvement of different organs in the synthesis of Vg suggests a different role for these Vgs that support the oocyte growth. The silencing of the Vg genes by RNA<sub>i</sub> decreased their expression in fat body and ovaries of adult females and was observed absence of oviposition.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Enfermedad de Chagas

La Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas corresponde a una infección parasitaria causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Constituye un grave problema en América Latina, donde hay alrededor de 8 millones de personas infectadas y 109 millones que viven en áreas endémicas y por lo tanto en riesgo de contraer la infección (Rassi y col., 2010). En Argentina, el número de personas infectadas con *T. cruzi* supera actualmente los 2,5 millones. Aunque la enfermedad se manifiesta fundamentalmente en regiones rurales y periurbanas que presentan condiciones socioeconómicas y culturales precarias, la creciente migración humana a las ciudades en las últimas décadas ha incrementado la incidencia de la infección con *T. cruzi* en los centros urbanos. Esta enfermedad ligada a condiciones de pobreza se presenta en regiones donde coexiste con otras enfermedades que son más aparentes y menos silenciosas, razón por la cual pasa desapercibida como un problema de salud.

La enfermedad en el hombre presenta una fase aguda, en general caracterizada por fiebre, inflamación de hígado, bazo y ganglios linfáticos, que persiste por 4 a 8 semanas; luego permanece silenciosa y asintomática para entrar en la fase crónica. En promedio, un 70% de los infectados entran en la fase crónica indeterminada o latente, en la cual pueden sufrir alteraciones leves en el sistema nervioso y en ciertos órganos como la vesícula biliar y glándulas varias.



Sin embargo, en el 10 al 30% de los casos, los pacientes entran en la fase crónica cardíaca y digestiva. Estos enfermos manifiestan daños en el sistema nervioso periférico y lesiones irreparables en órganos internos tales como el corazón, esófago y colon después de 10 o 20 años de adquirida la infección. Además, es importante destacar que, en general, esta forma crónica conduce a la muerte (Laranja y col., 1956; Rosenbaum, 1964). Por otra parte, aunque esta patología se puede tratar mediante el uso de ciertas drogas de actividad parasiticida tales como el benznidazol y el nifurtimox, los pacientes deben permanecer medicados durante largos períodos, pueden tener reacciones colaterales y la efectividad es a lo sumo de un 60% (Viotti y col., 1994; Sosa Estani y col., 1998). Al respecto, se ha demostrado resistencia natural a estos químicos en algunas cepas de *T. cruzi* (OMS, 2002).

Las estimaciones realizadas en base a registros oficiales indican que en la última década, se han producido entre 14.500 y 15.000 muertes atribuidas a la enfermedad de Chagas (Clayton, 2010; Aufederheide y col., 2004). Las proyecciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud para el 2005 y 2015, revelaron que la mortalidad por esta enfermedad sería significativamente mayor que la producida por otras enfermedades transmitidas por vectores en las Américas (WHO Statistical Information System, WHOSIS).

Históricamente, la transmisión vectorial de *T. cruzi* ha sido el mecanismo más importante mediante el cual los seres humanos son infectados con el parásito. Se estima que el 85% de los casos se debe a la transmisión mediante vectores. Sin embargo, las transfusiones de sangre, la transmisión congénita en la que la madre infectada transmite el parásito a su hijo y los trasplantes de órganos se consideran

mecanismos secundarios de transmisión del parásito (Coura y Viñas, 2010; Virchhoff, 2011; Muñoz y col., 1992; OMS, 2002). En el hombre, este parásito circulante en las vías sanguíneas ingresa en ciertas células para reproducirse. Durante este proceso se produce destrucción celular y se origina una nueva generación de parásitos que continúan la infección. Los vectores de *T. cruzi* son insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) que se infectan al ingerir sangre de ciertos animales domésticos y salvajes reservorios del parásito. Los parásitos maduran en las vías digestivas del vector hasta alcanzar su fase infectiva. Cuando el insecto infectado se alimenta, defeca inmediatamente y los tripanosomas de las heces penetran a través de las mucosas, heridas y/o abrasiones de la piel producidas principalmente en respuesta al prurito originado por la picadura.

### 1.2. Vectores

La enfermedad de Chagas es transmitida por insectos miembros de la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Esta subfamilia está constituida por más de 140 especies (Stevens y col., 2011), gran parte de las cuales son susceptibles a la infección con *T. cruzi*. Sin embargo, sólo unas pocas son consideradas de importancia epidemiológica en la transmisión de la enfermedad de Chagas debido fundamentalmente a su elevado grado de asociación con el hombre (Schofield, 1988). La importancia de estas especies como vectores depende de factores biológicos y de comportamiento. Entre ellos, se pueden

mencionar el tiempo de alimentación, la capacidad de dispersión y el tiempo transcurrido entre la comida de sangre y la defecación (Stevens y col., 2011; Schofield, 1988). Además, es importante destacar su gran adaptación a los ambientes domésticos, que involucran tanto a la vivienda como al peridomicilio (corrales, gallineros, entre otros). Teniendo en cuenta principalmente esta última característica, se consideran de mayor relevancia epidemiológica a cinco especies pertenecientes a los géneros *Triatoma*, *Pastrongylus* y *Rhodnius* (Clayton, 2010; Aufederheide y col., 2004).

Los triatominos son insectos hematófagos obligados; tanto los adultos de ambos sexos y los cinco estadios ninfales se alimentan de sangre y al menos es necesaria una ingesta para su muda (Hack, 1955). La ingesta sanguínea representa una condición esencial en la evolución de los triatominos en todas las etapas de su vida (Canale y Carcavallo, 1985). Por lo tanto, estas especies son vectores potenciales de *T. cruzi* desde su primer estadio debido a que pueden adquirir la infección en su primera ingesta de sangre. Sin embargo, los primeros estadios rara vez transmiten el parásito ya que deben adquirirlos en una única comida de sangre (Stevens y col., 2011).

Los insectos vectores se distribuyen desde los Estados Unidos hasta la República Argentina (aproximadamente entre latitudes 40° N y 46° S) (Schofield, 1985). El género más numeroso y ampliamente distribuido de la subfamilia Triatominae es *Triatoma* con más de 70 especies. Entre las especies transmisoras de mayor importancia a nivel sanitario se destaca *Triatoma infestans*, considerada el principal vector de la enfermedad de Chagas en América del Sur con una amplia distribución entre las latitudes 10° y 46° S. En nuestro país, a esta especie

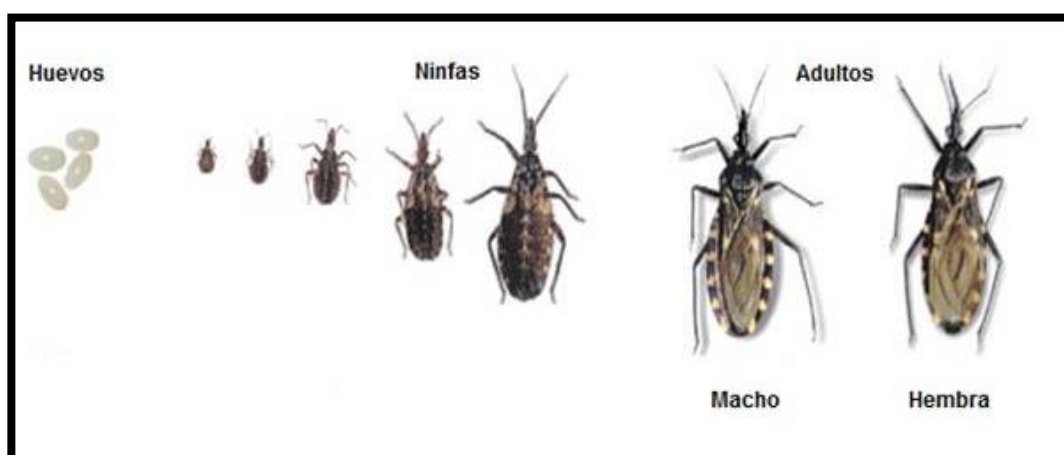
se la ha hallado desde el extremo norte en Jujuy hasta el sur de la provincia de Chubut. *T. infestans* es responsable de aproximadamente la mitad de los casos de infección con *T. cruzi* (Bargues y col., 2006). Este insecto se encuentra íntimamente ligado al hombre, habitando casi exclusivamente en ambientes domiciliarios y peridomiciliarios (Schofield, 1985). Al respecto, aunque las habitaciones humanas constituyen su biotopo más frecuente, también se lo encuentra en los refugios de animales domésticos, gallineros, corrales, conejeras, palomares y depósitos (Canale y Carcavallo, 1985). En el área endémica, la existencia de viviendas con un patrón de construcción que se caracteriza por paredes de adobe, techos de ramas y hojas de vegetación local mezclada con tierra favorecen la supervivencia del vector. En las grietas de paredes y pisos, los insectos de esta especie encuentran refugio que los protegen de los predadores domésticos y de condiciones climáticas desfavorables. *T. infestans* tiene hábitos nocturnos en todas las etapas de su desarrollo y su presencia puede ser detectada con relativa facilidad debido a que sus deyecciones pueden observarse sobre las paredes como manchas de tinta china. El insecto puede alimentarse en promedio durante 15,5 min (Dias, 1956) y se ha observado que las ninfas del tercer estadio pueden succionar hasta cinco veces su peso (Cerisola y col, 1974). Abalos y Wygodzinsky (1951), observaron en colonias de *T. infestans* de laboratorio que las ninfas recién mudadas no toman su primera comida inmediatamente después de mudar ya que existe un período de reposo prealimentario. Además, se detectó que las ninfas mudan luego de una sola ingesta sanguínea por estadio y ejemplar, excepto el estadio ninfal V que necesita dos alimentaciones para alcanzar el estadio adulto. En relación a su ciclo de vida, *T. infestans* tarda aproximadamente

entre 100 y 200 días para llegar desde el huevo al estado adulto (Figura 1) y esto depende de la temperatura y la frecuencia de la alimentación. Se ha estimado que en regiones más templadas, estos insectos tienen dos generaciones al año, mientras que en las regiones con climas más fríos, excepcionalmente pueden presentarse dos generaciones (Hack, 1955). Una hembra de *T. infestans* vive alrededor de un año y medio, copula varias veces a lo largo de su ciclo biológico y puede oviponer en total cerca de 600 huevos en toda su vida. Esta alta tasa reproductiva es esencial para su supervivencia y es un factor crucial en la lucha contra el vector.

Por ser la enfermedad de Chagas una zoonosis con numerosos reservorios naturales, es muy poco probable erradicarla. Sin embargo se han llevado a cabo y se están realizando actualmente, numerosos esfuerzos para controlar la transmisión de la misma, tales como los implementados por la Iniciativa de Salud del Cono Sur (INCOSUR), la Iniciativa Andina y la Iniciativa Centroamericana. Estos programas se basan en la realización de campañas de educación social, la utilización de insecticidas para eliminar a los triatomíneos y el mejoramiento de la calidad de las viviendas en las regiones endémicas. Como resultado de estas acciones se estima una reducción de la incidencia del mal de Chagas en Latinoamérica de alrededor del 65% en el año 2000 respecto al año 1990 (OMS, 2002).

El control de vectores es considerado actualmente como una de las estrategias más efectivas para reducir la incidencia de la enfermedad de Chagas. Los programas de control se basan particularmente en la aplicación de insecticidas piretroides sintéticos que atacan al sistema nervioso central y periférico

interactuando con canales de sodio (Zerba, 1999). Es importante destacar que estos insecticidas resultan poco perjudiciales para el ser humano; sin embargo, con el tiempo los insectos pueden adquirir resistencia a los mismos de tal forma que su aplicación sería cada vez menos efectiva (Picollo, 1994; Vassena y col., 1999). A este respecto, se han observado fallas en el control del vector *T. infestans* debido a la existencia de resistencia a los insecticidas piretroides (Picollo y col., 2005; Germano y col., 2010). Por otra parte, el control de vectores presenta dificultades por la extensión y variabilidad de las áreas endémicas y por el tiempo requerido para prevenir la recuperación de las poblaciones tratadas (Dias, 1987).

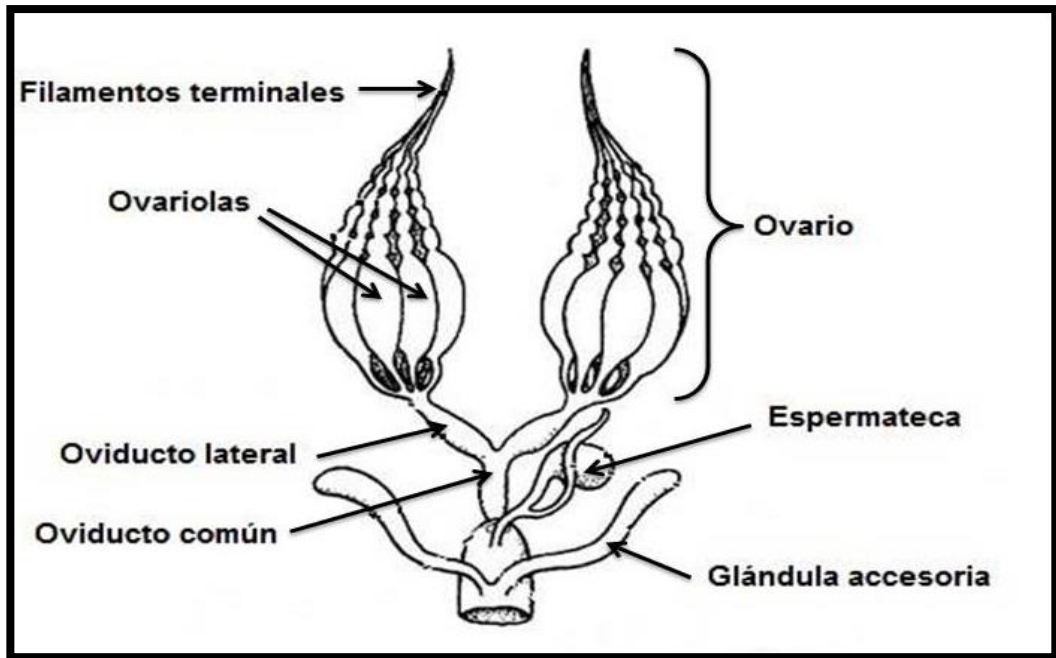


**Figura 1:** Ciclo de vida de *Triatoma infestans*. El insecto se reproduce por huevos de color blanco que miden aproximadamente entre 2-3 mm y que cambian a rosado cuando se completa la evolución del embrión. Desde que ocurre la oviposición hasta que alcanza el estado adulto (formas aladas), la vinchuca pasa por cinco etapas de crecimiento (estadios ninfales) con cambios graduales de tamaño y sin alas.

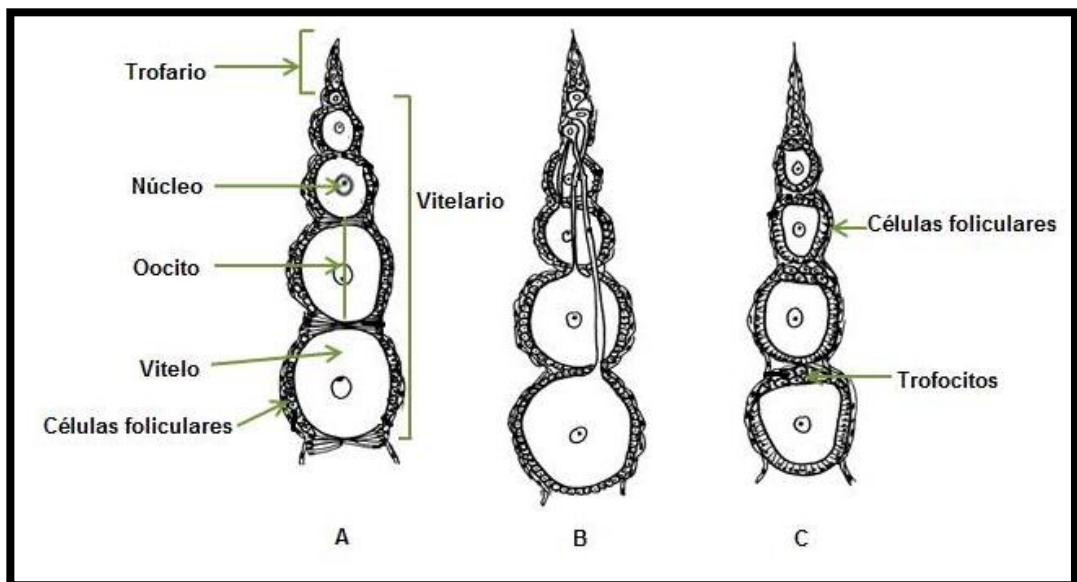
### 1.3. Ciclo reproductivo de Triatomínos

El aparato reproductivo de las hembras de triatomínos está constituido por oviductos, espermateca, glándulas accesorias, vagina y un par de ovarios (Figura 2). Cada ovario contiene siete ovariolas que constituyen la unidad funcional productora del huevo. En general, están constituídas por un trofario o germario, lugar donde proliferan las células germinales y se forman los folículos, y por un vitelario en el cual los folículos acumulan los componentes del vitelo y ocurre la formación del corion (Raikhel y Dhadialla, 1992; Atella y col., 2005). En insectos se han descrito distintos tipos de ovariolas (Figura 3) cuyo número varía según la especie (Atella y col., 2005; Raikhel y col., 2002). Los insectos triatomínos presentan ovariolas de tipo meroístico y subtipo telotrófico (Figura 3B).

En algunas especies de insectos los folículos dentro de la ovariola pueden madurar de manera sincrónica dando una postura de huevos en forma conjunta tal como ocurre en *Aedes aegypti* y *Locusta migratoria* o bien presentar un desarrollo asincrónico, dando lugar a una oviposición de varios días, como sucede en *Hyalophora cecropia* o en *Drosophila melanogaster* (Raikhel y Dhadialla, 1992; Swevers, L y col., 2005). Los triatomínos *T. infestans* (Stoka y col., 1987), *Rhodnius prolixus* (Pratt and Davey, 1972) y *Dipetalogaster maxima* (Aguirre y col., 2008) presentan ovariolas con desarrollo asincrónico, motivo por el cual se observan ovocitos en diferentes estados de maduración en forma simultánea.



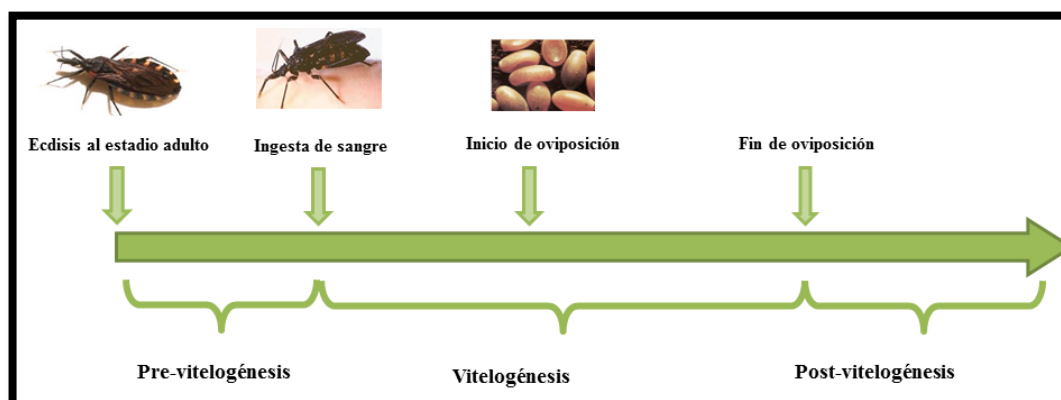
**Figura 2:** Esquema del aparato reproductivo de las hembras de triatomino (Adaptada de Stoka y col., 1987).



**Figura 3:** Esquemas de los distintos tipos de ovariolas. Ovariola de ovario panoístico (A), ovariolas de ovario meroístico, telotrófico o acrotrofico (B) y politrófico (C) (Adaptada de Stoka y col., 1987).

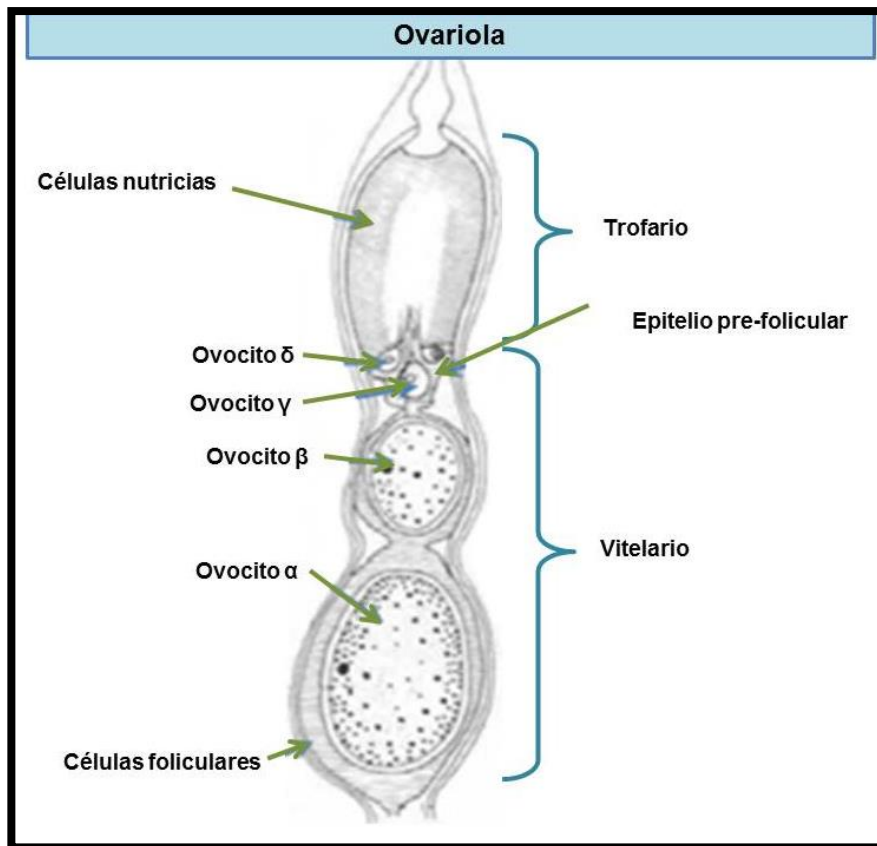


En el ciclo reproductivo de triatominos se pueden distinguir las fases pre-vitelogénica, vitelogénica y post-vitelogénica. La fase pre-vitelogénica transcurre desde la ecdisis de la hembra al estadio adulto hasta que ingiere una comida de sangre. La etapa vitelogénica se inicia con la ingesta de sangre y se caracteriza por el rápido crecimiento de los ovocitos terminales como consecuencia del activo proceso de captación de precursores del vitelo, particularmente de vitelogenina (Vg) que es la proteína precursora de vitelina (Vt). Finalmente, el período post-vitelogénico comienza al final de la oviposición (Figura 4). Durante esta última fase, si la hembra no recibe una segunda ingesta de sangre, los ovocitos terminales son resorbidos (Aguirre y col., 2011). A diferencia de los triatominos, en los insectos con ovariolas de desarrollo sincrónico, la fase post-vitelogénica coincide con el final del proceso de acumulación de los precursores del vitelo y marca el inicio de la formación del corion (Klowden, 1997; Stoka y col., 1987; Swevers y col., 2005).



**Figura 4:** Fases del ciclo reproductivo de Triatominos.

En triatominos, antes del estímulo de la ingesta de sangre, los ovocitos de una ovariola migran hacia el epitelio prefolicular permaneciendo unidos al trofario por los cordones tróficos (ovocitos en posición  $\delta$ ). Por debajo de la región prefolicular se dispone el ovocito en posición  $\gamma$ , rodeado de células foliculares binucleadas de gran tamaño. A continuación se observa el ovocito en posición  $\beta$  rodeado por células foliculares (Figura 5). Los ovocitos  $\gamma$  y  $\beta$  crecerán hasta alcanzar un tamaño crítico o estado pre-vitelogénico que en *T. infestans* y *R. prolixus* es de aproximadamente 700  $\mu\text{m}$  y 400  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Aguirre y col., 2011; Stoka y col., 1987). Cuando las hembras de triatominos reciben el estímulo adecuado de alimentación, los ovocitos terminales (posición  $\alpha$  o vitelogénicos) aumentan de tamaño y se rodean de un epitelio folicular monoestratificado, conformando un folículo (Figura 5) (Stoka y col., 1987; Atella y col., 2005). Luego de adquirir el tamaño máximo, los ovocitos vitelogénicos son corionados y ovulados en tanto que aquellos que ocupaban la posición  $\beta$ , entrarán en vitelogénesis. Es importante destacar que en las hembras de los triatominos cada ovariola presenta un solo ovocito en vitelogénesis por vez, aunque su desarrollo asincrónico permite observar folículos terminales de diferentes tamaños (Stoka y col., 1987; Aguirre y col., 2011).



**Figura 5:** Esquema de ovariola de hembras de triatómidos, en la que se distingue el trofario con las células nutricias y el vitelario donde se disponen los ovocitos en diferente grado de desarrollo (Figura adaptada de Stoka y col., 1987).

### 1.3.1. Vitelogénesis

En los insectos, como en otros organismos ovíparos, el desarrollo del embrión ocurre fuera del cuerpo de la madre. Por lo tanto, para que el huevo sobreviva es necesario utilizar el material previamente almacenado. Este material al que se denomina vitelo, está compuesto por proteínas, lípidos, azúcares y una pequeña proporción de otros componentes que se encuentran almacenados en el

interior del huevo de una manera altamente organizada (Atella y col., 2005).

La acumulación de los componentes del vitelo implica un proceso en el cual un tejido extra ovárico, el cuerpo graso, produce las proteínas que posteriormente serán acumuladas en el huevo. En la mayoría de los insectos, el cuerpo graso es el sitio exclusivo de síntesis de proteínas precursoras del vitelo (PPVs) como la Vg y en otros, el ovario es un órgano vitelogénico complementario (Melo y col., 2000; Raikhel y col., 2005). Sin embargo, se ha descrito que en algunas especies de dípteros el ovario es el sitio exclusivo de síntesis de PPVs (Raikhel y col., 2005). Por otra parte, aunque Vg se considera generalmente una proteína específica de hembras, en algunas especies de insectos se han observado síntesis de Vg en machos (Engelmann, 1979; Trenczek y Engels, 1986; Valle, 1993; Piulachs y col., 2003). Además, se ha detectado síntesis de Vg en hembras ninfas de quinto estadio en *R. prolixus* (Valle y col., 1993).

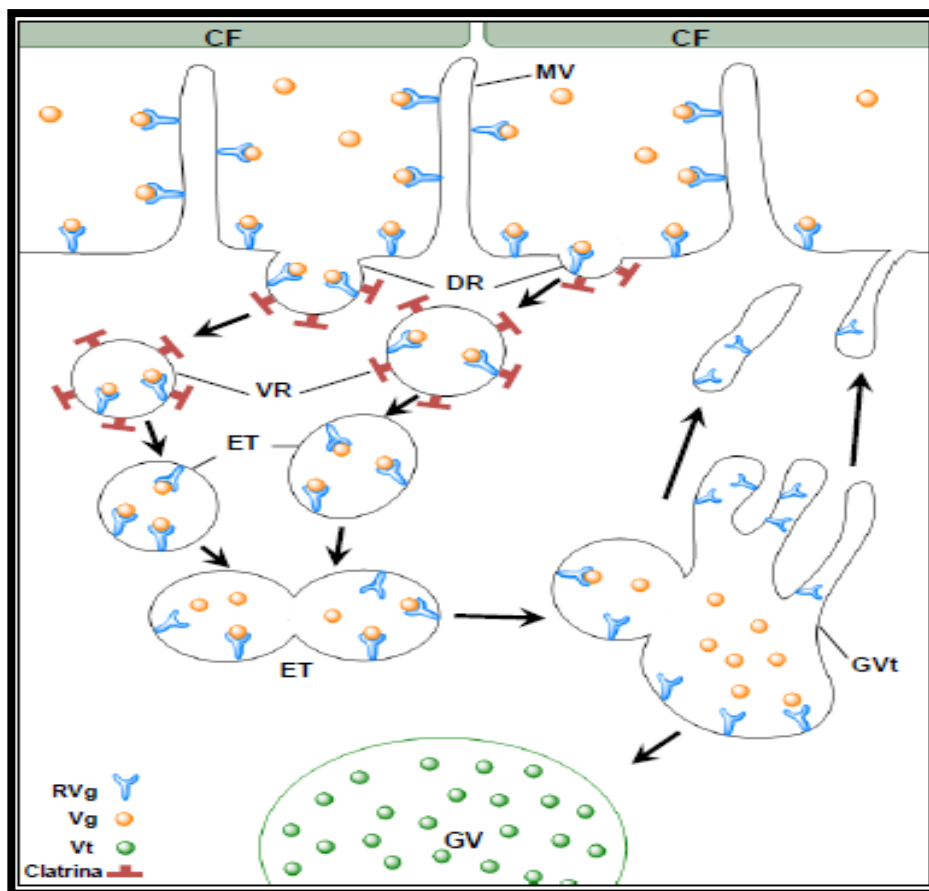
El cuerpo graso es un órgano que combina las funciones del hígado y del tejido adiposo de vertebrados y está conformado por múltiples lóbulos que están principalmente distribuidos en el abdomen y en un menor grado en el tórax y la cabeza. Esta estructura multilobular le permite al tejido una mayor interacción con la hemolinfa (Raikhel y col., 2005; Tufail y col., 2005). Desde el punto de vista fisiológico, es el responsable del metabolismo y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas, así como de sintetizar la mayoría de las proteínas de la hemolinfa (Raikhel y col., 2005; Tufail y col., 2005).

La principal PPV sintetizada por el cuerpo graso es la Vg, que suple con aminoácidos, fosfatos y en menor medida lípidos, al embrión en desarrollo (Atella

y col., 2005; Giorgi y col., 2005; Masuda y col., 2005). Como se mencionó anteriormente, los triatominos son insectos hematófagos obligados y por lo tanto ingieren grandes cantidades de sangre en una única comida. Esta comida de sangre le aporta aminoácidos y lípidos que pueden ser utilizadas para la producción de moléculas como Vg (Atella y col., 2005). La Vg es sintetizada en los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso, posteriormente transferida al aparato de Golgi y empaquetada dentro de vesículas secretorias que emergen del mismo. Durante este proceso la molécula naciente de Vg es clivada proteolíticamente y luego las subunidades resultantes son ensambladas y secretadas juntas como una proteína de alto peso molecular (Tufail y takeda, 2008). Además, las moléculas de Vg son modificadas para permitir el transporte de carbohidratos, lípidos, sulfatos y otros nutrientes a través de la hemolinfa hacia el ovario, siendo la glicosilación un paso importante en la subsecuente secreción de Vg por parte del cuerpo graso.

Una vez que las moléculas de Vgs son secretadas hacia la hemolinfa, son captadas por los ovocitos en desarrollo. La captación de Vg se lleva a cabo a través de endocitosis mediada por receptores (RsVg) (Figura 6). Por acción de la hormona juvenil (HJ) se estimula que las células foliculares disminuyan su tamaño y se abran canales entre ellas, fenómeno conocido como patencia (Davey y Huebner, 1974; Davey 1996 y Davey, 2007). Esto permite a la Vg poder penetrar y entrar en contacto con la superficie del ovocito, donde se encuentran los RsVg. La Vg circulante en la hemolinfa se une a receptores localizados en las microvellosidades y en las depresiones recubiertas de clatrina de la membrana oocítica para su posterior internalización como vesículas recubiertas. Estas

vesículas se fusionan con endosomas, donde se produce la disociación del complejo Vg/RVg, se forman los gránulos de vitelo transitorios (GVt) y los receptores vuelven a la superficie del ovocito. A continuación la Vg perderá su contenido de lípidos para cristalizar como Vt y conformar los gránulos de vitelo maduros (GV) (Tufail y takeda, 2008; Sappington y Raikhel, 1998).



**Figura 6:** Esquema de los principales eventos de captación e internalización de Vg por los ovocitos de *Aedes aegypti*. CF, células foliculares; MV, microvellosidades; DR, depresiones recubiertas; VR, vesículas recubiertas; ET, endosomas tempranos; GVt, gránulo de vitelo transitorio; GV, gránulo de vitelo maduro; Vg, vitelogenina; Vt, vitelina; RVg, receptor de Vg (Snigirevskaya y Raikhel, 2005).

### 1.3.2. Regulación de la vitelogenénesis

La síntesis y la acumulación de las proteínas del huevo se encuentran bajo un control hormonal y nutricional (Figura 7) (Atella y col., 2005; Valle y col., 1993; Valle, 1993). Además, se demostró en *Triatoma protracta* y *R. prolixus* que la vitelogenénesis es estimulada por el apareamiento (Mundall y Engelmann, 1977; Davey, 1987).

Estudios pioneros pusieron en evidencia el rol de la HJ en la regulación de la vitelogenénesis en *R. prolixus* (Wigglesworth, 1936; Coles, 1965). Posteriormente, se evidenció que la vitelogenénesis en insectos se encuentra controlada básicamente por dos hormonas, la HJ y la ecdisona (Valle, 1993). Se ha descrito que la distención abdominal que provoca la ingesta de sangre induce a una glándula neuroendócrina localizada en el complejo retrocerebral, denominada corpora allata, para producir la HJ. Sin embargo, la distención por sí sola no es suficiente para inducir la ovogénesis ya que depende de la presencia de proteínas en la dieta (García y Azambuja, 1985). Por otra parte, se ha observado que la HJ también se libera en respuesta al apareamiento. En la actualidad, el conocimiento de la fisiología reproductiva y regulación endócrina de la vitelogenénesis en insectos deriva principalmente de estudios realizados en el mosquito vector de la fiebre amarilla, *A. aegypti* (Raikhel, 2005; Raikhel y col., 2002). Se demostró que las células foliculares sintetizan 20-hidroxiecdisona (20-HE) y ésta estimula la síntesis de Vg en el cuerpo graso durante la vitelogenénesis. Además, se vio que en *D. melanogaster*, la vitelogenénesis es coordinada de manera

compleja por HJ y por 20-HE (Belles, X. 2005; Bownes, M. 2005).

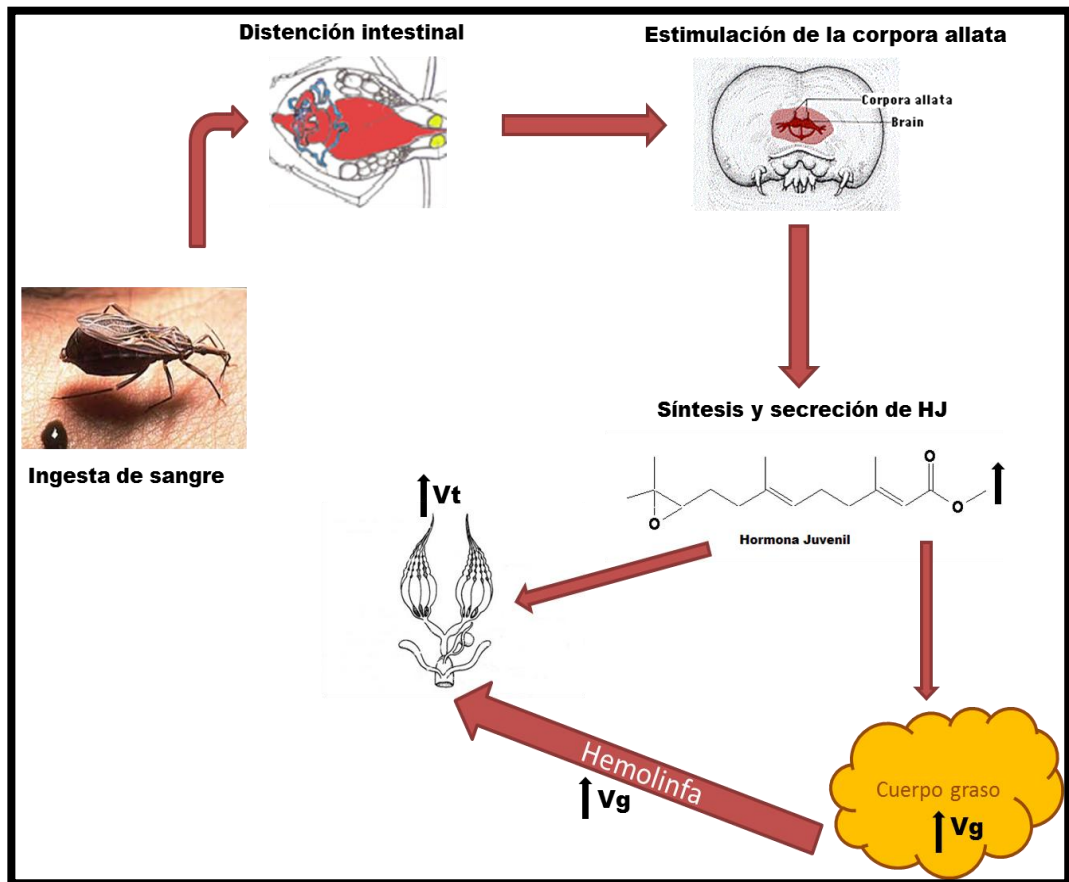
En los vectores de la enfermedad Chagas, cada ciclo gonadotrófico y el desarrollo de huevo está fuertemente relacionado a la ingesta de una comida de sangre. Hack (1955) infirió, a través de sus experiencias en *T. infestans*, que es necesario el alimento para posibilitar la puesta de huevos y que cada ingesta sanguínea determina un período de ovoposición de aproximadamente 11-12 días a una temperatura ambiente de 28°C. Sin embargo, se ha observado autogenia en algunas especies de Triatominae como *T. infestans* y *R. prolixus*, es decir la capacidad de una hembra para poner sus huevos sin ingesta de sangre en la etapa adulta (Noriega, 1992).

Según el modelo de regulación de la vitelogénesis actualmente aceptado para los triatominos (Figura 7), cuando una hembra ingiere sangre del hospedador vertebrado, se promueve la distensión intestinal y se induce la síntesis y secreción de HJ (Davey, 1987; Venugopal y Kumar, 2000). En la circulación, la HJ ejerce su acción sobre dos órganos blancos principales, el cuerpo graso y el ovario. En el cuerpo graso la HJ activa la expresión de genes para la síntesis de PPVs, de las cuales la Vg es la más abundante (Davey, 1987). En el ovario, la HJ induce patencia, lo que facilita la llegada de los precursores del vitelo desde la hemolinfa al ovocito (Davey, 2007; Davey, 2000). Además, la HJ estimula en el ovocito la captación de Vg y otras proteínas a través de endocitosis mediada por receptor (Sappingon y Raikhel, 1998; Venugopal y Kumar, 2000; Davey, 2007).

A pesar de la importancia crucial que tiene la expresión de la vitelogenina en la reproducción de *T. infestans*, insecto clave para la transmisión de la infección con el parásito *T. cruzi*, aún no ha sido caracterizado su gen y se



desconoce su cinética de expresión entre sexos y a través del desarrollo.



**Figura 7:** Esquema de la regulación endócrina y nutricional de la vitelogénesis en *Rhodnius prolixus*. La ingesta de sangre produce la distensión intestinal que estimula a la corpora allata para sintetizar y secretar HJ. Una vez en circulación, la HJ induce cambios en el cuerpo graso y tejido ovárico, promoviendo la síntesis de Vg en el primero y su captación y depósito en el segundo. HJ: Hormona Juvenil; Vg: Vitelogenina; Vt: Vitelina.

#### 1.4. Vitelogenina

La vitelogénesis es el período de rápido crecimiento del ovocito y es cuando ocurre el depósito de vitelo en el mismo. Diversas PPVs son acumuladas

en los ovocitos durante la fase vitelogénica, siendo la Vg la más relevante desde un punto de vista fisiológico por ser la proteína precursora de Vt que constituye la principal reserva de energía del huevo. Las Vgs de los insectos son fosfolipoglicoproteínas sintetizadas como precursores de ~200 kD derivadas de un ARNm de ~6-7 kb (Tufail y col., 2014). La secuencia de amino ácidos, estructura y composición de las Vgs son muy conservadas entre insectos y otros animales ovíparos, sugiriendo su origen común a partir de una proteína ancestral (Sappington y col., 2002). Además, comparten cierta homología con otras proteínas más alejadas, las lipoproteínas (Raikhel y col., 2005). Se han descrito familias multigénicas constituídas por dos o tres genes que codifican para Vgs en diversas especies de insectos (Hughes, 2010), como por ejemplo en *L. migratoria*, *Leucophaea maderae*, *Riptortus clavatus*, *Plautia stali*, *Periplaneta americana* y *A. aegypti*.

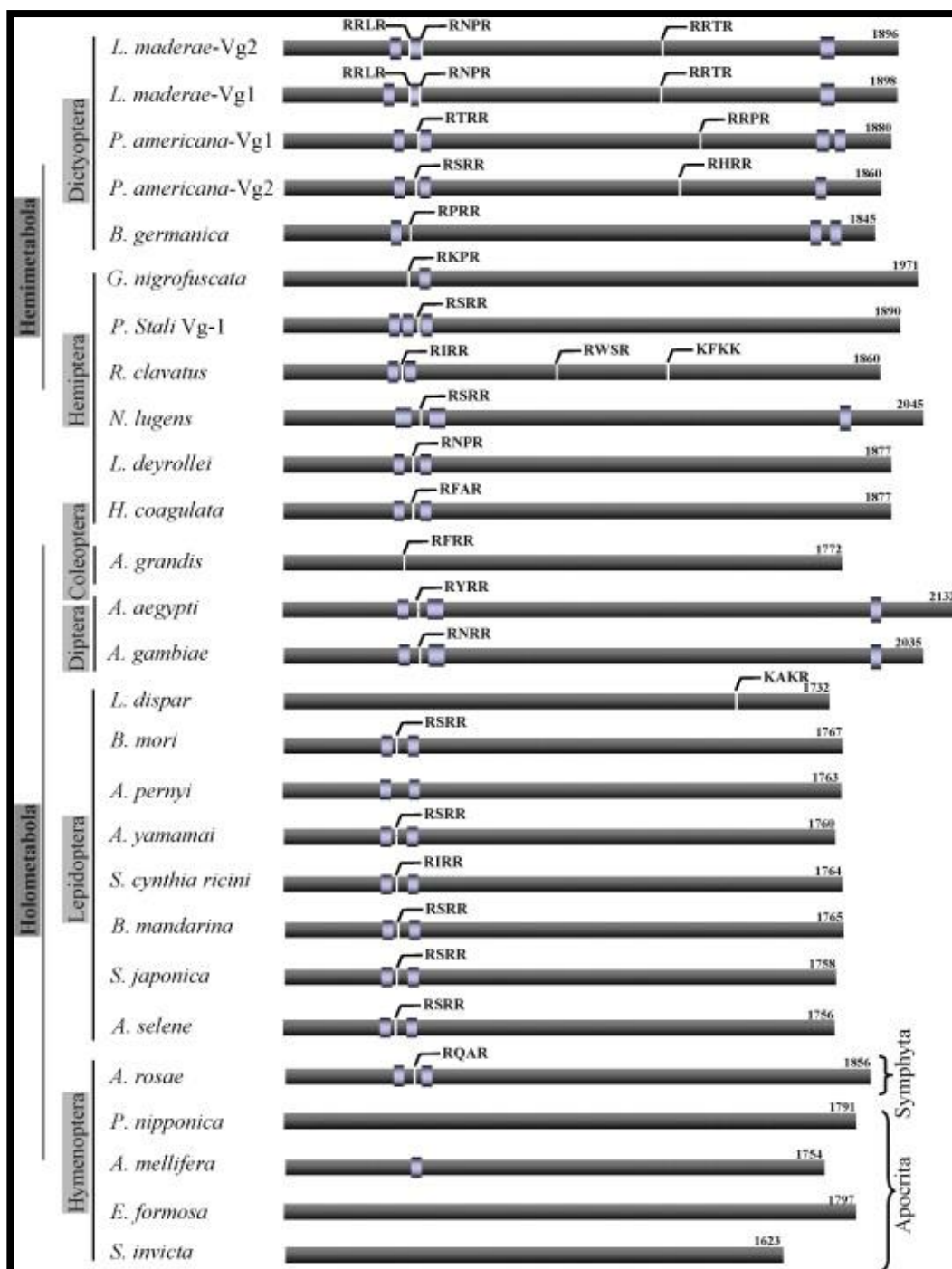
Una característica llamativa de la Vg de insectos es la presencia de un dominio poli-serina que se encuentra conservado en la región N-terminal de todas las secuencias de Vg, excepto en miembros del suborden Apocrita (himenópteros). Si bien todavía no es claro el rol que desempeña la región poli-serina, se cree que podría servir como un sitio de fosforilación. La múltiple fosforilación de proteínas podría regular muchas actividades de la misma, incluyendo su clivaje. Se estima, además, que las regiones fosfoserina presentan una densidad de cargas negativas muy importante que contribuye a la solubilidad de la proteína (Tufail y Takeda, 2008; Havukainen y col., 2012).

Las moléculas de Vgs son modificadas por glicosilación, fosforilación y a veces, sulfatación y posteriormente la mayoría de las Vgs de insectos son

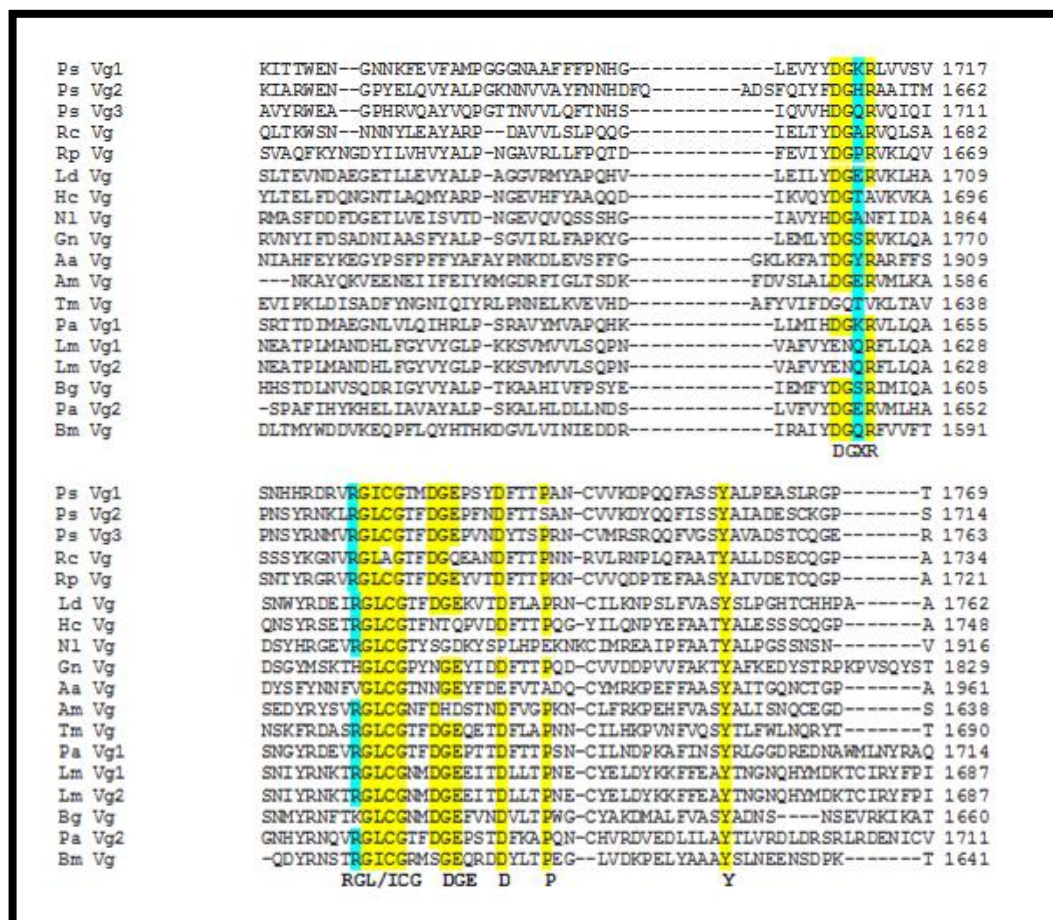
clivadas en una subunidad mayor y otra menor antes de ser secretada a la hemolinfa como grandes moléculas oligoméricas (Chen y col., 1997; Raikhel, 2005).

En todos los insectos, excepto los pertenecientes al suborden Apocrita, el producto primario del gen Vg es clivado en un sitio consenso (R/K) XX (R/K) por endoproteasas del tipo subtilisina y una protoproteína convertasa. Este motivo de cuatro residuos aminoacídicos ha sido detectado de manera conservada en el extremo N-terminal en la mayoría de las Vgs y se encuentra flanqueado por dominios poli-serina (Figura 8) (Tufail y Takeda 2008; Raikhel, 2005; Shu y col., 2009 y Havukainen y col., 2012). En los insectos hemimetábolos, el precursor de Vg es sucesivamente clivado en varias subunidades, polipéptidos mayores y menores; el motivo RXXR suele estar también próximo al extremo C-terminal o en el centro del precursor (Figura 8) (Tufail y Takeda, 2008; Raikhel, 2005).

Alineamientos de la región C-terminal revelaron que los motivos GL/ICG, DGXR y los residuos cisteína se encuentran altamente conservados en las secuencias de Vg de casi todos los insectos. En la mayoría de las secuencias, el motivo DGXR se localiza a 17-19 residuos del motivo GL/ICG. Se cree que este último motivo, junto con los residuos de cisteína y el motivo DG formarían la estructura necesaria para el correcto desempeño de las Vts durante la embriogénesis (Figura 9) (Tufail y Takeda, 2008; Shu y col., 2009).



**Figura 8:** Comparación de la estructura de 27 Vgs pertenecientes a 25 especies de insectos. Las secuencias RXXX son sitios de clivaje consenso durante el procesamiento post-traducción. Los cuadrados indican la localización de dominios poliserina en la molécula de Vg (Figura adaptada de Tufail y Takeda 2008).



**Figura 9:** Comparación estructural de una porción de la región C-terminal de 18 Vgs de insectos: *Plautia stali* Vg 1 (*Ps Vg1*), *Plautia stali* Vg 2 (*Ps Vg2*), *Plautia stali* Vg3 (*Ps Vg3*), *Riptortus clavatus* Vg (*Rc Vg*), *Rhodnius prolixus* Vg (*Rp Vg*), *Lethocerus deyrollei* Vg (*Ld Vg*), *Nilaparvata lugens* Vg (*Nl Vg*), *Graptosaltria nigrofuscata* Vg (*Gn Vg*), *Homalodisca coagulata* Vg (*Hc Vg*), *Periplaneta americana* Vg 1 (*Pa Vg1*), *Periplaneta americana* Vg2 (*Pa Vg 2*), *Tenebrio molitor* Vg (*Tm Vg*), *Aedes aegypti* Vg (*Aa Vg*), *Bombix mori* Vg (*Bm Vg*), *Leucophaea maderae* Vg 1 (*Lm Vg 1*), *Leucophaea maderae* Vg 2 (*Lm Vg2*), *Blattella germánica* Vg (*Bg Vg*) y *Apis melifera* Vg (*Am Vg*). Los motivos DGXR, GL/ICG, DG y los residuos conservados se muestran resaltados (Figura adaptada de Tufail y Takeda, 2008).

### 1.5. Proteínas minoritarias precursoras del vitelo

Un número minoritario de proteínas son secretadas por el cuerpo graso de hembras durante la vitelogénesis y acumuladas selectivamente por los ovocitos en desarrollo.

Los lípidos son una fuente de energía crítica durante la embriogénesis y representan el 30-40% del peso seco del huevo. Las lipoforinas (Lp) son proteínas transportadoras de lípidos en insectos y juegan un rol importante en la acumulación de lípidos en los ovocitos. La captación de los lípidos ocurre vía endocitosis mediada por receptores. Se han detectado en algunas especies como *A. aegypti*, *L. migratoria* y *Blattella germanica* la presencia de receptores ováricos para Lp (LpR) (Raikhel y col., 2005; Atella y col., 2005). Además de las proteínas mencionadas anteriormente se encuentran, la microvitelina, proteína de unión al grupo hemo presente en *R. prolixus* (RHBP) y la proteína de unión a calcio (Raikhel y col., 2005; Atella y col., 2005).

Por otra parte, la degradación de las proteínas del vitelo en moléculas más pequeñas ocurre a lo largo de la embriogénesis y probablemente esté regulada a través de una batería de proteasas. Hasta el presente, se han detectado en *A. aegypti* dos proenzimas específicas de hembras. Una de ellas es la carboxipeptidasa vitelogénica (CPV) y la otra, catepsina B (CBV). Ambas utilizan la misma vía secretoria que la Vg y se depositan en la capa amorfa periférica que rodea el núcleo central de Vt, sugiriendo que juegan un rol importante en la proteólisis de Vt durante el desarrollo embrionario (Fialho y col., 2002;

Yamahama y col., 2005; Raikhel y col., 2002, 2005; Oliveira y col., 2008).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de este proyecto es analizar un gen de importancia en la reproducción de *Triatoma infestans*, vector de la enfermedad de Chagas. Este estudio aportará nuevas bases que podrían ser de utilidad para el desarrollo de estrategias alternativas de control que permitan limitar eficientemente la propagación de la enfermedad en la población, fundamentalmente en áreas en las que el vector manifiesta resistencia al tratamiento con insecticidas.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Con el propósito de caracterizar el gen de la vitelogenina y analizar su expresión en *T. infestans*, se propuso:

- a) Determinar la secuencia de ADN copia (ADNc) del gen de la vitelogenina en *T. infestans*.
- b) Analizar sus niveles de expresión en diferentes tejidos y estadios evolutivos del vector.
- c) Determinar la expresión del gen en diferentes condiciones de alimentación del insecto.
- d) Iniciar estudios de silenciamiento del gen de la vitelogenina utilizando ARN de interferencia (ARNi).



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

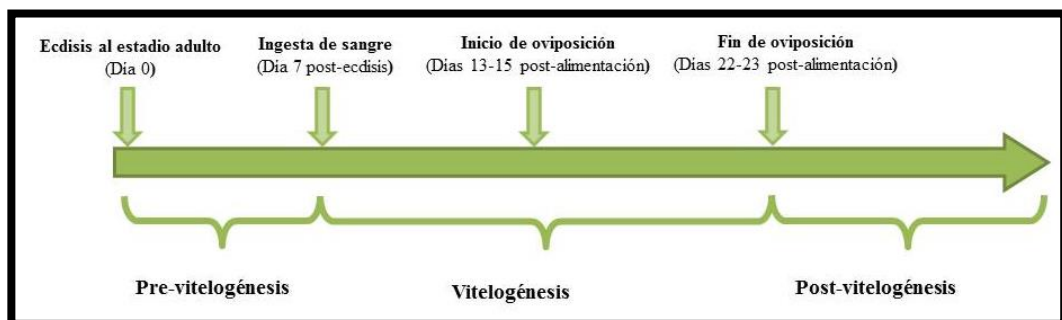
#### 3.1. Insectos

Los ejemplares de *Triatoma infestans* utilizados en este estudio proceden de una colonia de laboratorio del Centro de Referencia de Vectores del Servicio Nacional de Chagas de Córdoba, en las que las condiciones normales de mantenimiento son las siguientes: a) Temperatura:  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ; b) Humedad: 60-70%; c) Iluminación diaria: 6 horas de luz y 18 horas de oscuridad; d) Alimentación de los insectos sobre gallinas una vez cada 15 días.

Para los experimentos diseñados en este trabajo, las hembras fueron separadas de los machos a partir del estadio ninfal V según lo descrito por Espinola (1966). Posteriormente, fueron alimentadas con dos comidas de sangre con un intervalo de 15 días, asegurando en estas condiciones la obtención de hembras no autógenas (Marcato y col., 2003). En esta etapa se separó un grupo experimental constituido por hembras de estadio ninfal V. El otro grupo experimental consistió de hembras y machos que se mantuvieron separados después de su emergencia a adultos hasta que fueron capaces de recibir una comida de sangre el día 7 posterior a la ecdisis. Después de la alimentación, se colocaron en forma individual parejas de ambos sexos en diferentes contenedores y se verificó el apareamiento por la presencia del espermátforo.

Como se indica en la Figura 10, en condiciones estandarizadas de laboratorio, la fase comprendida entre la ecdisis al estadio adulto y la primera

alimentación de las hembras (período pre-vitelogénico) es de aproximadamente 7 días. La ingesta de sangre marca el comienzo de la fase vitelogénica. La primera oviposición ocurre entre los días 13-15 post-alimentación, extendiéndose hasta los días 22-23 posteriores a la ingesta de sangre. El comienzo de la fase post-vitelogénica se registró por el cese de la postura de huevos.



**Figura 10:** Etapas del ciclo reproductivo de hembras adultas de *Triatoma infestans*.

### 3.2. Extracción de tejidos

Con el propósito de aislar fragmentos de ADN copia (ADNc) del gen de la vitelogenina (Vg) en *T. infestans*, se extrajo cuerpo grasoso y ovarios de hembras adultas entre los días 3 y 6 después de la alimentación.

Para determinar la expresión del gen Vg a nivel de transcripción en diferentes tejidos y estadios evolutivos del insecto vector, inicialmente se llevaron a cabo extracciones de cuerpo grasoso, cabeza y músculo de hembras y machos adultos. Conjuntamente, se extrajo cuerpo grasoso de hembras de estadio ninfal V y ovarios de hembras adultas. Todas las extracciones se realizaron el día 5 post-alimentación.

Con el objetivo de analizar los niveles de ARNm en diferentes días post-alimentación, se obtuvo cuerpo graso y tejido ovárico de individuos adultos de *T. infestans* según se indica a continuación:

Extracción de cuerpo graso de hembras:

- Período pre-vitelogénico: días 2, 4 y 6 post-muda.
- Período vitelogénico: días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 20 y 24 post-alimentación.

Además, se extrajo cuerpo graso de machos adultos los mismos días indicados para las hembras.

Extracción de ovario:

- Período pre-vitelogénico: días 2, 4 y 6 post-muda.
- Período vitelogénico: días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 17 post-alimentación.

Por otra parte, con el propósito de analizar dicha expresión en otra etapa evolutiva del insecto se recolectó cuerpo graso de hembras de estadio ninfal V. En este caso, las extracciones se realizaron diariamente entre los días 5 y 15 posteriores a la segunda alimentación, período a partir del cual comienzan a mudar a adultos.

Para determinar la expresión de Vg a nivel proteico, se obtuvo cuerpo graso y tejido ovárico de hembras adultas de *T. infestans* en días representativos de cada fase del ciclo reproductivo del insecto vector, según se indica a continuación:

Extracción de cuerpo graso:

- Período pre-vitelogénico: días 3, 8 y 10 post-muda.

- Período vitelogénico: días 3, 7, 10, 14, 17, 20 y 22 post-alimentación.

Extracción de ovarios:

- Período pre-vitelogénico: días 3, 8 y 10 post-muda.
- Período vitelogénico: días 3, 6 y 10 post-alimentación.

Además, para realizar ensayos de inmunofluorescencia indirecta se obtuvo tejido ovárico el día 7 post-muda y el día 4 post-alimentación. Por otra parte, con el objetivo de iniciar estudios de silenciamiento del gen Vg mediante la utilización de ARN de interferencia (ARN<sub>i</sub>), se extrajo cuerpo graso y tejido ovárico de hembras adultas de *T. infestans* los días 4 y 5 post-alimentación, respectivamente.

Para aislar fragmentos de ADNc del gen Vg, analizar su expresión a nivel de transcripción e iniciar estudios de su silenciamiento, se extrajeron pools de cuerpo graso, tejido ovárico, cabeza y músculo de individuos de *T. infestans* en condiciones asépticas e inmediatamente después de la extracción se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización. Mientras, que para determinar la expresión de Vg a nivel proteico se diseccionaron pools de cuerpo graso y tejido ovárico 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 7,2) empleando una lupa estereoscópica equipada con fibra óptica. En este último caso, los tejidos se conservaron a -20°C con inhibidores de proteasas.

### 3.3. Extracción de ARN

#### 3.3.1. Extracción de ARN total utilizando TRIZOL (Invitrogen)

La extracción de ARN total para la posterior obtención de fragmentos de ADNc del gen Vg se realizó a partir de un pool de cuerpo graso y de un pool de ovarios extraídos de hembras adultas de *T. infestans*.

Se procedió a extraer el ARN total a partir de 100 mg de tejido. Se colocó la muestra en un homogenizador de vidrio estéril con 1 ml de TRIZOL y se comenzó a disgregar el tejido hasta obtener una mezcla turbia homogénea. Este material se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, el tejido homogenizado se colocó en un tubo tipo eppendorf y se centrifugó a 14.000 x g durante 5 min. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo estéril, se le adicionó 0,2 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 seg. Inmediatamente, se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min a 4°C. La fase acuosa (superior) fue transferida a un nuevo tubo estéril, se agregó 500 µl de isopropanol y se mezcló enérgicamente antes de ser incubada a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 µl de etanol 75%, agitando suavemente para asegurar la limpieza de todas las paredes del tubo. Se centrifugó a 7.500 x g durante 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió el ARN en 20 µl de agua libre de ARNasa (DEPC 0,01%) y se tomaron 2 µl que se sembraron en

un gel de agarosa al 1,2% para constatar la integridad del ARN obtenido. El tubo con el ARN total fue guardado en freezer a -20°C.

### **3.3.2. Extracción de ARN total utilizando el kit de purificación de ARN MasterPure (Epicentre)**

Las extracciones de ARN total para las determinaciones de expresión del gen de Vg en *T. infestans* se realizaron a partir de pooles de:

- Cuerpo graso, ovarios, músculo y cabeza de hembras adultas.
- Cuerpo graso, músculo y cabeza de machos adultos.
- Cuerpo graso de hembras de estadio ninfal V.

Se procedió a extraer el ARN total a partir de 5 mg de tejido. Se colocó cada muestra en un homogenizador de vidrio esteril conteniendo 300 µl de una solución para la lisis de células y tejidos (1 µl de 50 µg/µl de Proteinasa K en 299 µl de *Tissue and Cell Lysis Solution*) y se comenzó a disgregar el tejido hasta obtener una mezcla turbia homogénea. El material homogeneizado se transfirió a un tubo estéril tipo eppendorf y se agitó vigorosamente. Posteriormente, se incubaron las muestras a 65°C durante 15 min, agitando vigorosamente cada 5 min. A continuación, se colocaron las muestras en hielo durante 5 min. Se añadieron 150 µl de un reactivo para precipitar proteínas (*MPC Protein Precipitation Reagent*) a los 300 µl de cada muestra y se agitó vigorosamente durante 10 seg. Para precipitar los residuos se centrifugó a 14.000 x g durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo estéril, se agregaron 500 µl de

isopropanol y se invirtió 40 veces el tubo para mezclar. Para precipitar los ácidos nucleicos, se procedió a centrifugar el contenido del tubo a 14.000 x g durante 10 min a 4°C. Se vertió cuidadosamente el contenido del tubo para evitar despegar el precipitado y se removió todo el isopropanol con una pipeta. Se procedió a eliminar el ADN residual contaminante, resuspendiendo el precipitado en 200 µl de una solución de ADNasa (5 µl de *RNase-Free DNase I* en 195 µl de *1X DNase buffer*) y se incubó durante 30 min a 37°C. Finalizado el período de incubación, se añadieron 200 µl de una solución de lisis (*2X T and C Lysis Solution*) y se agitó vigorosamente durante 5 seg. A continuación, como se detalló precedentemente, se procedió al tratamiento con el reactivo para precipitar proteínas (*MPC Protein Precipitation Reagent*) y el posterior tratamiento del sobrenadante con isopropanol para finalmente centrifugar y obtener el precipitado de ARN. Luego, se lavó dos veces el precipitado con etanol 75%, descartando el sobrenadante y se secó el precipitado a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió el ARN en 32 µl de buffer TE y se añadió 1 µl de un inhibidor de ARNasa (*ScriptGuard*). Para constatar la integridad del ARN obtenido se tomaron 2 µl de la muestra y se sembraron en un gel de agarosa al 1,2%. El tubo con el ARN total fue guardado en freezer a -20°C.

La cuantificación del ARN extraído mediante los métodos descritos en los puntos 3.3.1. y 3.3.2. se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm, considerando que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg/ml. Se determinó su pureza mediante la relación 260/280 nm.

### 3.4. Síntesis de ADN copia (ADNc)

La síntesis de ADNc se realizó a partir del ARN total utilizando la enzima transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen).

En un tubo de microcentrífuga de 0,2 ml libre de nucleasas se combinaron:

- 1-5 µg de ARN total
- 1 µl de oligo (dT)<sub>20</sub> (50 µM)
- 1 µl de dNTP mix (10 mM )
- Agua destilada estéril hasta un volumen de 13 µl

La mezcla se incubó a 65°C durante 5 min y se enfrió en hielo por 3 min.

A continuación, para la síntesis de la primera cadena de ADNc, se agregó:

- 4 µl del buffer 5X
- 1 µl del buffer DTT (0,1M)
- 2 µl de Transcriptasa Reversa SuperScript III (200U/µl)

El volumen final de la mezcla de reacción (20 µl) se mezcló suavemente y se incubó a 55°C durante 60 min. Una vez terminada la incubación se inactivó la enzima por calentamiento a 70°C durante 15 min.

Para la amplificación de fragmentos superiores a 1 kb se requirió remover el ARN complementario al ADNc mediante el tratamiento con ARNasa



H (Invitrogen). Al tubo conteniendo la reacción anteriormente descrita se le añadió 1 µl de ARNasa H (2U/µl) y se incubó a 37°C durante 20 min.

### **3.5. Amplificación rápida del extremo 3' del ADNc (3'-RACE)**

#### **3.5.1. Síntesis de ADN copia (ADNc)**

Con el propósito de obtener el extremo 3' del gen Vg se implementó el método de amplificación rápida de los extremos de ADNc (RACE) utilizando el Kit GeneRacer (Invitrogen). De acuerdo al protocolo descrito en el punto anterior (3.4.), se obtuvo la primera cadena de ADNc mediante la transcripción reversa de ARN total procedente de cuerpo graso de un pool de hembras adultas entre 3 y 6 días después de la alimentación, utilizando la enzima SuperScript III y el primer GeneRacer Oligo dT. Este primer contiene un adaptador anexado al oligo(dT)<sub>n</sub> que solo permite retrotranscribir y amplificar el ARNm con cola PolyA.

#### **3.5.2. Amplificación del extremo 3' del ADNc**

Para obtener el extremo 3' del ADNc que codifica para Vg se llevaron a cabo reacciones de amplificación, mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la PCR se utilizó el primer GeneRacer 3' (complementario

a la secuencia del adaptador del primer GeneRacer Oligo-dT) en combinación con uno diseñado por Lee y col. (2000) (Tabla 1) a partir de una región conservada correspondiente a la secuencia de aminoácidos GL/ICG cercana al extremo C-terminal de la proteína (Romans y col., 1995; Nose y col., 1997).

Se combinaron los siguientes reactivos en un volumen final de 50 µl:

- 34,27 µl de agua
- 5 µl del buffer Amersham, 10X
- 2 µl de mezcla de dNTP (10 mM)
- 3,33 µl de primer GeneRacer 3' (10 µM)
- 3,33 µl de primer I-6 (10 µM)
- 0,4 µl de Taq Amersham (5U/µl)
- 1,67 µl de ADNc de cadena simple (del paso anterior)

El contenido del tubo se mezcló cuidadosamente y se colocó en un termociclador con el siguiente programa de temperaturas:

- Desnaturalización inicial: 94°C durante 5 min.
- 40 ciclos de:
  - 94°C durante 45 seg.
  - 48°C durante 60 seg.
  - 72°C durante 70 seg.
- Elongación final: 72°C durante 7 min.

El producto de amplificación fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio. La banda de tamaño esperado, de

aproximadamente 500 pares de bases (pb) correspondiente al extremo 3' del gen Vg, fue extraída del gel.

### 3.5.3. Purificación de la banda extraída del gel

La extracción de la banda visualizada en el gel de agarosa se llevó a cabo mediante un bisturí estéril. Posteriormente, se procedió a purificar el producto de PCR de en la banda, utilizando el kit de extracción de QIAGEN (*QIAquick Gel Extraction*). Con este propósito, se pesó la porción de gel extraído en un tubo tipo eppendorf y se añadieron 3 volúmenes del buffer QG por volumen de gel (100 mg ~ 100 µl). A continuación, se incubó a 50°C durante 10 min para que el gel se disuelva completamente, mezclando el tubo por agitación cada 2-3 min. Después, se agregó 1 volumen de isopropanol, se mezcló y se colocó dentro de una columna de QIAquick que se ubicó en un tubo de recolección y se centrifugó durante 1 min. Se descartó el filtrado y se colocó la columna en el mismo tubo de recolección. Para eliminar todo resto de agarosa, se añadió 0,5 ml de buffer QG y se centrifugó durante 1 min. Para lavar, se agregó 0,75 ml de buffer PE, se dejó reposar 5 min y se centrifugó durante 1 min. Se descartó el filtrado y se centrifugó nuevamente la columna durante 1 min a una velocidad superior a 10.000 x g. Finalmente, la columna QIAquick se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, se añadió 50 µl de buffer de elución EB en el centro de la misma y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min.

El producto de PCR purificado se secuenció mediante un secuenciador automático ABI 3130XL (Applied Biosystems). El análisis comparativo del fragmento obtenido de ADNc de *T. infestans* con secuencias de ADNc del gen Vg de otras especies de insectos reveló que corresponde al extremo 3' de ese gen.

### **3.6. Diseño de primers específicos, degenerados e inespecíficos**

Se alinearon secuencias de ADNc del gen Vg obtenidas en otras especies de insectos Hemípteros como *Riptortus clavatus* (AAB72001), *Graptopsaltria nigrofuscata* (BAA85987) y *Plautia stali* (Vg1: BAA88075, Vg2: BAA88076, Vg3: BAA88077) mediante el método CLUSTAL implementado en MegAlign (version 1.01 DNASTAR, 1993) que permite realizar alineamientos múltiples de secuencias. Posteriormente, se diseñaron primers a partir de las zonas más conservadas que se detectaron en dicho alineamiento (Tabla 1). Por otra parte, se diseñaron primers específicos a partir del fragmento 3' del gen Vg previamente aislado en *T. infestans* (ver sección anterior). Estos primers específicos se utilizaron en combinación con los primers degenerados e inespecíficos diseñados a partir de las regiones más conservadas detectadas en los alineamientos antes mencionados, con el propósito de amplificar hacia el extremo 5' del gen.

### 3.7. Amplificación de diferentes fragmentos del gen de la vitelogenina (Vg)

Cada uno de los primers específicos e inespecíficos diseñados se utilizaron para amplificar por PCR segmentos del gen Vg, utilizando ADNc que se sintetizó a partir de ARN total extraído de un pool de cuerpo graso de diferentes hembras adultas de *T. infestans* que se encontraban entre el tercer y sexto día después de su alimentación. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador con gradiente de temperatura (MyCycler, BIO-RAD), en el que es posible establecer distintas temperaturas de unión con el primer con el propósito de optimizar más rápidamente las condiciones de reacción con primers inespecíficos.

Cada reacción se realizó en un volumen final de 15,5  $\mu$ l de una solución conteniendo:

- 9,08  $\mu$ l de agua
- 3  $\mu$ l del buffer GoTaq, 5X
- 0,3  $\mu$ l de mezcla de dNTP (10 mM)
- 1  $\mu$ l de primer Forward (10  $\mu$ M)
- 1  $\mu$ l de primer Reverso (10  $\mu$ M)
- 0,12  $\mu$ l de GoTaq (5U/ $\mu$ l)
- 1  $\mu$ l de ADNc de cadena simple (de la sección 3.4)

Los tubos con la reacción se colocaron en el termociclador con el siguiente programa de temperaturas:

- Desnaturalización inicial: 94°C durante 5 min.
- 40 ciclos de:
  - 94°C durante 60 seg.
  - Diferentes temperaturas durante 60 seg.
  - 72°C durante 60 seg (1min/Kb).
- Elongación final: 72°C durante 10 min.

La amplificación de los segmentos de ADNc se constató en geles de agarosa al 1,5 % teñidos con bromuro de etidio.

### 3.7.1. Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR que revelaron una única banda del tamaño esperado, se purificaron mediante el kit de purificación de PCR (*QIAquick*, *QIAGEN*) para su secuenciación directa. Para su purificación, se añadieron 5 volúmenes del buffer PB por cada volumen del producto de PCR y se colocó en una columna de centrifugación *QIAquick*, que a su vez se ubicó dentro de un tubo de recolección de 2 ml y se centrifugó durante 60 seg. Luego se desechó el filtrado y se colocó la columna nuevamente en el mismo tubo de recolección para proceder a lavar. Para ello, se añadieron 0,75 ml del buffer PE y se centrifugó durante 60 seg. Nuevamente se desechó el filtrado y se ubicó la columna en el mismo tubo. Para eluir el ADN, se ubicó la columna dentro de un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, se añadieron 50 µl del buffer EB en el centro de la

membrana y se centrifugó durante 1 min.

### **3.7.2. Clonación de los productos de PCR**

Cuando el producto de PCR reveló la presencia de más de una banda en el gel de agarosa, se procedió a su purificación (como en sección 3.7.1.) y posterior clonación utilizando el kit TOPO TA Cloning (Invitrogen).

#### **3.7.2.1 Preparación de medios de cultivo LB y LB agar**

##### **• Medio LB (200 ml)**

En un erlenmeyer limpio se disolvieron 2 gr de peptona, 1 gr de extracto de levadura y 2 gr de NaCl en 190 ml de agua destilada. Posteriormente se autoclavó y se dejó enfriar hasta llegar aproximadamente a 55 °C. Se añadieron 200 µl de ampicilina (50 µg/ml) y se mantuvo a 4 °C.

##### **• LB agar (200 ml)**

A un medio LB, como el descrito precedentemente, se le agregó 3 gr de agar y se lo llevó a autoclavar. Se dejó enfriar hasta llegar aproximadamente a 55°C y se añadieron 200 µl de ampicilina (50 µg/ml). Posteriormente, se vertieron 25 ml del medio LB agar en cada placa de Petri y se mantuvieron invertidas a 4°C.

### 3.7.2.2. Preparación del producto de ligación

En un tubo tipo eppendorf de 0,2 ml se combinaron los siguientes reactivos en un volumen final de 6  $\mu$ l:

- 4  $\mu$ l del producto de PCR fresco
- 1  $\mu$ l de solución salina
- 1  $\mu$ l del vector pCR 2.1-TOPO

Se mezcló suavemente la reacción y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente (22-23°C). Luego, se colocó el tubo en hielo hasta comenzar la transformación.

### 3.7.2.3. Transformación de células competentes

Las células competentes fueron descongeladas en hielo para realizar la transformación. Se añadieron 2  $\mu$ l de la reacción de ligación del producto de PCR (fragmento de ADNc del gen Vg) y el plásmido pCR 2.1-TOPO a un vial conteniendo bacterias químicamente competentes, se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 30 min. La transformación fue realizada por medio de un golpe de calor, para lo cual se calentó la mezcla a 42°C sin agitación durante 30 seg. Inmediatamente se transfirieron los tubos a hielo durante 2 min, se añadieron 250  $\mu$ l de medio S.O.C. y se agitó a 200 rpm a 37°C durante 60 min.



### 3.7.2.4. Selección de las colonias con insertos

Se esparcieron 20  $\mu$ l de X-Gal 2% sobre cada placa de Petri precalentada a 37°C y se dejó secar. Las células transformadas se sembraron sobre las placas y se las llevaron a estufa a 37°C durante toda la noche. Por cada transformación, se esparcieron dos volúmenes diferentes en dos placas para garantizar que al menos una placa tuviese colonias bien separadas.

Los plásmidos pCR 2.1-TOPO contienen un fragmento del gen que codifica para una subunidad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa que actúa en forma complementaria con una subunidad de origen cromosómico a la que le falta esa porción. Esa  $\beta$ -galactosidasa funcional actúa sobre el sustrato incoloro X-Gal originando un compuesto de color azul que da una tonalidad de ese color a la colonia. Cuando se inserta ADN en el sitio de clonado múltiple, que contiene el fragmento del gen de la  $\beta$ -galactosidasa del plásmido, se interrumpe el fragmento de la enzima determinado por el vector, no se forma enzima funcional y la colonia permanece blanca. Las colonias que desarrollaron color azul se descartaron por ser clones negativos, ya que sus plásmidos no contenían insertos. Las colonias blancas, correspondientes a los clones positivos, se eligieron al azar para ser crecidas en medio LB líquido con ampicilina y posteriormente realizar mini preparaciones de plásmidos.

Se seleccionaron 10 colonias positivas por muestra para cultivarlas en medio LB líquido. Para este fin, se procedió a tocar con un tip estéril de 200  $\mu$ l una colonia blanca de la placa y se sumergió en un tubo Falcon estéril

conteniendo 3 ml de medio LB. Finalmente, se lo llevó a un baño líquido a 37°C y 90 rpm durante toda la noche. Se repitió la operación por cada una de las 10 colonias positivas seleccionadas.

### 3.7.3. Mini preparaciones de plásmidos

Se tomaron 1,5 ml del medio cultivo desarrollado en cada tubo Falcon (ver en sección anterior) y se lo colocó en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Luego se lo peleteó a 3000 rpm durante 5 min para concentrar el material y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se realizó dos veces para utilizar los 3 ml del cultivo. El precipitado fue resuspendido en 500 µl de STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA), se centrifugó y se descartó el sobrenadante como en el paso anterior. El precipitado se resuspendió en 100 µl de Solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA) se mezcló vigorosamente por inversión del tubo y se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 200 µl de Solución II (SDS 1%, NaOH 0,2 M), se mezcló por inversión suave y se colocó en hielo durante 5 min con el propósito de realizar un shock osmótico y térmico a las células. Para neutralizar el efecto del paso anterior, se agregaron 150 µl de Solución III (AcNa 3 M pH 5,2), se mezcló y se incubó en hielo durante 10 min. Luego se procedió a centrifugar la muestra a 12.000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 300 µl de isopropanol. Se centrifugó nuevamente a 12.000 rpm durante 5 min y el precipitado obtenido se resuspendió

en 500  $\mu\text{l}$  de etanol 70% (este paso se repitió dos veces). El etanol fue removido por completo y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente para remover los restos de etanol. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 20  $\mu\text{l}$  de agua estéril. Esta suspensión que contiene los plásmidos se utilizó como se describe en la siguiente sección.

### 3.7.4. PCR de insertos contenidos en los plásmidos

Para amplificar por PCR segmentos del gen Vg insertos en el vector de clonación se utilizó una dilución de los plásmidos resultantes de la mini preparación y los primers universales M13, complementarios a la secuencia del vector. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador con gradiente MyCycler (BIO-RAD).

Se combinaron los siguientes reactivos en un volumen final de 15,5  $\mu\text{l}$ :

- 10,58  $\mu\text{l}$  de agua
- 1,5  $\mu\text{l}$  del buffer Amersham, 10X
- 0,3  $\mu\text{l}$  de mezcla de dNTP (10 mM)
- 1  $\mu\text{l}$  de primer M13 Forward (10  $\mu\text{M}$ )
- 1  $\mu\text{l}$  de primer M13 Reverso (10  $\mu\text{M}$ )
- 0,12  $\mu\text{l}$  de Taq Amersham (5U/ $\mu\text{l}$ )
- 1  $\mu\text{l}$  del producto de la minipreparación

El contenido del tubo se mezcló y se colocó dentro de un termociclador con el siguiente programa de temperaturas:

- Desnaturalización inicial: 94°C durante 2 min.
- 30 ciclos de:
  - 94°C durante 60 seg.
  - 55°C durante 60 seg.
  - 72°C durante 60 seg.
- Elongación final: 72°C durante 7 min.

La amplificación de los segmentos de ADNc se constató en geles de agarosa al 1,5 % teñidos con bromuro de etidio.

### **3.7.5. Secuenciación de diferentes fragmentos del gen de la vitelogenina**

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo mediante el método de terminación de síntesis de cadena con didesoxinucleótidos (Sanger y col., 1977), utilizando un secuenciador automático (ABI 3130XL, Applied Biosystems). En todos los casos se determinó la secuencia de ambas hebras de ADN. Los primers utilizados para las reacciones de PCR fueron empleados para la secuenciación de sus productos y en el caso de los insertos de ADN clonados se utilizaron primers M13 complementarios al vector de clonación. Las secuencias obtenidas de los productos de PCR permitieron identificar 2 genes de Vg (Vg1 y Vg2) en *T. infestans*.

### 3.8. Amplificación rápida del extremo 5' del ADNc (5'-RACE)

Con el fin de completar el extremo 5' del gen Vg, se utilizó la técnica 5'-RACE empleando el kit ExactSTART Eukaryotic mRNA 5'-&3'-RACE (Epicentre).

#### 3.8.1. Tratamiento con fosfatasa alcalina

Se trataron 5 µg de ARN total con fosfatasa alcalina que convierte el ARN con un extremo 5' monofosfato o 5' trifosfato en un ARN con extremo 5' hidroxilo para asegurar que no participen en el proceso de amplificación por la técnica RACE, mientras que el ARN con el capuchón de 7-metilguanositri-fosfato en el extremo 5' (*Cap*) no se ve afectado por el tratamiento con fosfatasa.

Para ello, en un tubo de microcentrífuga se adicionaron los siguientes reactivos en un volumen final de 100 µl:

- 73,89 µl de agua estéril libre de nucleasas
- 10 µl de buffer de reacción APex
- 11,11 µl de ARN total (5 µg)
- 5 µl de fosfatasa alcalina APex

Se incubó la reacción a 37°C durante 15 min. Luego se procedió a realizar una extracción con fenol: cloroformo. Con este propósito, se añadieron 1 µl de glucógeno y 100 µl de fenol: cloroformo (1:1) y se agitó vigorosamente. Posteriormente, para separar las dos fases se centrifugó a 10.000 x g durante 1 min. Se recolectó y se guardó la fase acuosa (fase superior) en un nuevo tubo estéril. Luego se añadieron 100 µl de agua libre de nucleasas a la fase de fenol: cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 10.000 x g durante 1 min para separar las dos fases. Nuevamente se recolectó la fase acuosa (superior) y se combinó con la fase acuosa recogida previamente. Se añadieron 200 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) a las fases acuosas combinadas, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 10.000 x g durante 1 min para separar las dos fases. La fase acuosa (fase superior) que contiene el ARN se puso en un nuevo tubo. Se añadieron 20 µl de acetato de sodio 3M y 100 µl de isopropanol y se agitó vigorosamente. Se incubó en hielo durante 30 minutos y se centrifugó a más de 10.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Luego se descartó el sobrenadante con cuidado de no remover el precipitado que contiene el ARN. Se lavó el precipitado con etanol frío 80% y se centrifugó a más de 10.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió el ARN en 7,5 µl de agua libre de nucleasas.

### 3.8.2. Tratamiento con pirofosfatasa ácida (TAP)

La muestra tratada con fosfatasa alcalina se trató con una pirofosfatasa ácida para retirar la estructura del *cap* 5' del ARNm intacto.

Al tubo que contenía los 7,5  $\mu$ l resultantes del tratamiento con fosfatasa alcalina se lo colocó en hielo y se le agregó:

- 1  $\mu$ l de buffer TAP
- 0,5  $\mu$ l de un inhibidor de RNasa
- 1  $\mu$ l de la enzima TAP

Se incubó la reacción a 37°C durante 15 min. Luego se retiró el tubo de la incubación y se mantuvo a temperatura ambiente.

### 3.8.3. Unión del oligonucleótido 5'-RACE

Se utilizó la enzima T4 ligasa, para unir un oligonucleótido de ARN al extremo 5' de los ARNm. El oligonucleótido de ARN proporciona un sitio de unión para el primer Race 5'.

Al tubo que contenía los 10  $\mu$ l del ARN tratado con TAP se le agregaron los siguientes reactivos:

- 4  $\mu$ l de agua libre de nucleasas
- 2  $\mu$ l del buffer de la enzima ligasa

- 1  $\mu\text{l}$  del buffer TAP STOP
- 1  $\mu\text{l}$  del oligonucleótido 5'-RACE
- 1  $\mu\text{l}$  de ATP (2mM)
- 1  $\mu\text{l}$  Ligasa T4

Se incubó la reacción a 37°C durante 30 min.

### 3.8.4. Síntesis de la primera cadena de ADNc

La transcripción inversa se llevó a cabo usando un primer reverso específico (TIR8) del gen Vg (Tabla 1) y la transcriptasa inversa MMLV.

Al tubo que contenía los 20  $\mu\text{l}$  resultantes del paso anterior se le agregaron los siguientes reactivos hasta llegar a 40  $\mu\text{l}$  finales:

- 14  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas
- 1  $\mu\text{l}$  de primer para la síntesis de ADNc (TIR8) (10 $\mu\text{M}$ )
- 2  $\mu\text{l}$  de mix de dNTP
- 2  $\mu\text{l}$  de buffer MMLV RT
- 1  $\mu\text{l}$  MMLV Transcriptasa Reversa

Se incubó la reacción a 37°C durante 60 min. Luego para inactivar por calor la MMLV-RT se incubó la reacción a 85°C durante 10 min. Finalmente, se añadió 1  $\mu\text{l}$  de solución de ARNasa a la reacción y se incubó a 55°C durante 5 min.



La reacción se mantuvo a 55°C hasta la amplificación por PCR.

### 3.8.5. Síntesis de la segunda cadena de ADNc y amplificación por PCR

Para amplificar el extremo 5', se combinaron los siguientes reactivos en un volumen final de 17  $\mu$ l:

- 10,48  $\mu$ l de agua
- 1,6  $\mu$ l del buffer Taq Platinum, 10X
- 1,32  $\mu$ l de mezcla de dNTP (10 mM)
- 0,48  $\mu$ l de MgCl (50 mM)
- 1  $\mu$ l de primer TIR8 (10  $\mu$ M)
- 1  $\mu$ l de primer 2 (10  $\mu$ M)
- 0,12  $\mu$ l de Taq Platinum (5U/ $\mu$ l)
- 1  $\mu$ l de ADNc de cadena simple (del paso anterior)

El contenido del tubo se mezcló cuidadosamente y se colocó dentro de un termociclador con el siguiente programa de temperaturas:

- Desnaturalización inicial: 94°C durante 5 min.
- 35 ciclos de:
  - 94°C durante 60 seg.
  - 62°C durante 60 seg.
  - 72°C durante 3 min.
- Elongación final: 72°C durante 10 min.

El producto de PCR se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio. Una banda correspondiente al tamaño esperado de aproximadamente 1000 pb se purificó usando un kit de purificación de PCR QIAquick (*QIAGEN*) (ver sección 3.7.1) para su secuenciación directa en un secuenciador de ADN automatizado (ABI 3130XL, Applied Biosystems). El análisis comparativo del fragmento obtenido de ADNc de *T. infestans* con secuencias de ADNc del gen Vg de otras especies de insectos reveló que corresponde al extremo 5' de ese gen.

### **3.9. Análisis de las secuencias de ADNc de vitelogenina (Vg)**

Las secuencias de ADNc de Vg obtenidas para *T. infestans* se compararon con las de otros insectos, depositadas en el Banco de Genes, utilizando las herramientas "BLAST-N" o "BLAST-X" disponibles en el sitio Web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas de ADNc y la posición del codón stop se infirieron utilizando el Programa ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>). Los sitios de posible fosforilación se detectaron mediante el uso del programa NetPhos 2,0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>).

### 3.10. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de Vg y relación filogenética

Se alinearon secuencias completas de aminoácidos de Vg correspondientes a distintas especies de insectos, utilizando el programa Clustal W en MEGA versión 5.1 (Tamura y col., 2011). Las secuencias de Vg que se incluyeron en el alineamiento corresponden a las especies que se indican a continuación junto con el número de acceso al Banco de Genes en paréntesis: *Plautia stali* (Vg1: BAA88075, Vg2: BAA88076, Vg3: BAA88077), *Riptortus clavatus* (AAB72001), *Triatoma infestans* (Vg2: AIA09041), *Rhodnius prolixus* (JAA76239), *Lethocerus deyrollei* (BAG12118), *Homalodisca coagulata* (DQ118408), *Nilaparvata lugens* (AEL22916), *Graptopsaltria nigrofuscata* (BAA85987), *Periplaneta americana* (Vg1: BAA86656, Vg2: BAB32673), *Blattella germanica* (CAA06379) y *Leucophaea maderae* (Vg1: AB052940, Vg2: AB194976). La filogenia de las secuencias se construyó mediante el método de Neighbor-Joining (NJ), utilizando el programa MEGA versión 5.1 (Tamura y col., 2011). Se utilizaron como extragrupos para los análisis filogenéticos las secuencias de aminoácidos de *Tenebrio molitor* (AAU20328), *Apis mellifera* (AJ517411), *Aedes aegypti* (AAA18221) y *Bombyx mori* (BAA06397). La solidez de la hipótesis filogenética fue evaluada por el método de bootstrap, el cual permite estimar el porcentaje de veces que un determinado grupo de secuencias permanecen juntas en el árbol consenso resultante de 1000 muestreos al azar del mismo set de datos.

### **3.11. Determinación de la expresión a nivel de transcripción de dos genes de la vitelogenina (Vg1 y Vg2)**

Para determinar la expresión a nivel de ARNm de los genes Vg1 y Vg2 en diferentes tejidos, sexos, condiciones de alimentación y etapas de desarrollo de *T. infestans* se utilizó la técnica de PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR).

#### **3.11.1. Diseño de primers y sondas TaqMan**

Se diseñaron primers específicos (Tabla 1) y sondas TaqMan (Tabla 2) a partir de las secuencias de ADNc de Vg obtenidas, mediante el programa Primer Express (Applied Biosystems). Además, se diseñaron primers específicos y una sonda TaqMan a partir de secuencias del gen de la  $\beta$ -actina previamente obtenidas en nuestro laboratorio. Se combinaron distintos juegos de primers para lograr la amplificación de bandas únicas y específicas correspondientes a los genes Vg1, Vg2 y  $\beta$ -actina, como se indica a continuación.

Cada reacción se realizó en un volumen final de 19  $\mu$ l, mezclando los volúmenes y concentraciones correspondientes de los siguientes reactivos:

- 12,12  $\mu$ l de agua estéril
- 1,6  $\mu$ l del buffer core PCR, 10X
- 0,48  $\mu$ l de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (50mM)

- 0,64  $\mu$ l de mezcla de dNTP (10 mM)
- 1  $\mu$ l de primer Forward (10  $\mu$ M) correspondiente a cada gen
- 1  $\mu$ l de primer Reverso (10  $\mu$ M) correspondiente a cada gen
- 0,16  $\mu$ l de SureStart Taq (5U/ $\mu$ l)
- 2  $\mu$ l de ADNc de cadena simple

Los parámetros de amplificación con que se llevaron a cabo las PCR fueron los siguientes:

- Desnaturalización inicial: 94°C durante 2 min.
- 35 ciclos de:
  - 94°C durante 20 seg.
  - 50- 60°C durante 20 seg.
  - 72°C durante 30 seg.
- Elongación final: 72°C durante 2 min.

Mediante el uso de un termociclador con gradiente de temperatura (MyCycler, BIO-RAD), se identificó una temperatura de hibridación adecuada para todos los conjuntos de cebadores (58°C). Esto ha permitido analizar los tres genes en una placa de PCR en tiempo real.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 3 % teñidos con bromuro de etidio. Aquellos que revelaron una única banda del tamaño esperado (~70 pb), se clonaron utilizando el Kit TOPO TA Cloning (ver sección 3.7.2) y se secuenciaron los ADN insertos en el vector. Para verificar si se trataba de las secuencias esperadas, se compararon con las secuencias de referencia de los

genes Vg (Vg1 y Vg2) y de  $\beta$ -actina a partir de las cuales se diseñaron los primers específicos para su amplificación. Estos primers y sus sondas fueron empleadas para la cuantificación de la expresión mediante PCR en tiempo real.

### 3.11.2. PCR cuantitativa (qPCR)

La qPCR se llevó a cabo en el equipo Mx3005P QPCR System (Stratagene) utilizando el kit Brilliant QPCR Core Reagent (Stratagene). Cada reacción se realizó en un volumen final de 20  $\mu$ l de una solución conteniendo:

- 11,52  $\mu$ l de agua estéril
- 1,6  $\mu$ l del buffer core PCR, 10X
- 0,48  $\mu$ l de  $Cl_2Mg$  (50mM)
- 0,64  $\mu$ l de mezcla de dNTP (10 mM)
- 1  $\mu$ l de primer Forward (10  $\mu$ M) correspondiente a cada gen
- 1  $\mu$ l de primer Reverso (10  $\mu$ M) correspondiente a cada gen
- 1,6  $\mu$ l de la sonda correspondiente a cada gen
- 0,16  $\mu$ l de SureStart Taq (5U/ $\mu$ l)
- 2  $\mu$ l de ADNc de cadena simple

Los parámetros de amplificación con que se llevaron a cabo las PCR fueron los siguientes:

- Desnaturalización inicial: 95 °C durante 10 min.
- 40 ciclos de:

95°C durante 15 seg.

58°C durante 60 seg.

El número relativo de copias de ARNm de Vg se calculó de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Para normalizar el nivel de ARN total de cada reacción, se utilizó la diferencia entre el ARNm de Vg y  $\beta$ -actina ( $\Delta CT$ ). Para compensar la variación intra-experimental se realizaron tres repeticiones para cada reacción. Además, se realizaron dos experimentos independientes. Para evaluar si existen diferencias entre los datos obtenidos se realizó un test ANOVA y un post test de Bonferroni utilizando GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software). La significación estadística se asumió con un valor de  $P \leq 0,05$ .

### **3.12. Determinación de la expresión del gen de vitelogenina (Vg) a nivel proteico**

#### **3.12.1 Western Blot**

La determinación de la expresión de Vg se realizó mediante la técnica de Western Blot a partir de homogenatos de cuerpo graso y ovarios de hembras adultas de *T. infestans*. Los tejidos fueron homogeneizados en buffer Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) a 4°C con inhibidores de proteasas. Luego de una etapa de centrifugación (5 min a 3.000 x g) los sobrenadantes fueron sometidos a una

segunda centrifugación (30 min a 15.000 x g) y posteriormente en los sobrenadantes se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (1976).

Los extractos proteicos se fraccionaron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (10 µg/calle de proteínas ováricas, 15 µg/calle de proteínas de cuerpo graso y 0,2µg/calle de vitelina de otro triatomino, *Dipetalogaster máxima*, como standard) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en condiciones estándares (Towbin y col., 1979). Luego, se procedió a lavar la membrana con buffer salino Tris (TBS, Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) y se realizaron etapas de bloqueo utilizando TBS conteniendo 0,1% de Tween 20 (TBS-T) y leche descremada al 5% bajo agitación suave a temperatura ambiente.

Ensayos preliminares demostraron que el anticuerpo policlonal dirigido contra las principales subunidades de vitelina (Vt) de *Dipetalogaster maxima* (Aguirre y col., 2008), reconoce en los homogenatos de *T. infestans* una banda de peso molecular compatible con vitelogenina/vitelina (Vg/Vt) (Aguirre y col., 2008). Las incubaciones con anticuerpos primarios y secundarios se realizaron durante 1 h cada uno a temperatura ambiente como sigue: (a) anticuerpo anti-vitelina (1:2000) en TBS-T-leche 5% y (b) HPR anticuerpo conjugado de cabra anti-conejo (1:2000) en el mismo medio. Luego de tres lavados con TBS, se visualizaron las bandas inmunorreactivas mediante quimioluminiscencia empleando un kit comercial de acuerdo con el protocolo del fabricante (ECL, Perkin-Elmer).



### 3.12.2 Ensayos de inmunofluorescencia indirecta

Los ovarios de hembras en pre-vitelogénesis (día 7 post-ecdisis) y vitelogénesis (día 4 post-alimentación) fueron fijados en paraformaldehído al 4% en PBS. Posteriormente, los órganos se transfirieron a sacarosa/PBS, embebidos en OCT y congelados rápidamente en nitrógeno líquido (Fruttero y col., 2011). Se obtuvieron secciones de tejido de 9  $\mu\text{m}$  con un criostato Leica CM1510 (Leica Microsystems) y se colocaron en portaobjetos de vidrio tratados con poli-L-lisina. Para los ensayos de inmunofluorescencia, las secciones de tejido se bloquearon y se permeabilizaron con 1% de albúmina (BSA), suero bovino fetal al 5% y 0,1% de Triton X-100 en PBS durante 60 min. A continuación, las secciones se incubaron con el anticuerpo anti-vitelina en PBS conteniendo 1% de BSA (1:100) durante 1 h y luego con anti-IgG de conejo marcado con Alexa 568 (1:500, Molecular Probes) en el mismo medio durante 1 h. Todas las incubaciones se llevaron a cabo en cámara húmeda a 37°C y después de cada paso se llevaron a cabo tres lavados de 5 min con PBS. Por último, los portaobjetos se lavaron con agua destilada y luego del secado fueron montados con Fluorsave (Calbiochem). Las secciones de tejido fueron observadas en un microscopio Eclipse TE2000-U (Nikon) equipado con filtros adecuados (excitación 540-580 nm/emisión 600-660 nm). Las imágenes digitales fueron capturadas con una cámara Nikon Sight digital DS-U1 y procesadas con ACT-2U versión 1.51.116.256 software (Nikon).

### 3.13. ARN de interferencia (ARN<sub>i</sub>)

Para los estudios de silenciamiento de los genes Vg1 y Vg2 se utilizó el kit T7 RiboMAX Express RNAi System (Promega).

#### 3.13.1. Producción del templado por PCR

Se diseñaron primers específicos (Tabla 1) a partir de las secuencias de ADNc de los genes Vg1 y Vg2 y se añadieron al extremo 5' de los mismos la secuencia del promotor T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGN (17-22)-3'). Se utilizaron y combinaron distintos juegos de primers para lograr la amplificación de bandas únicas y específicas para los genes Vg1 y Vg2. La generación de dos moldes de ADNc para cada uno de esos genes requiere de cuatro primers y dos amplificaciones de PCR (Figura 11).

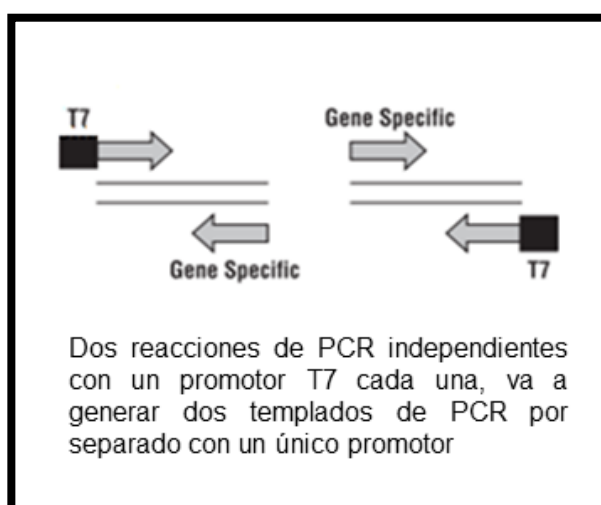
Cada reacción se realizó en un volumen final de 15,5 µl, mezclando los volúmenes y concentraciones correspondientes de los siguientes reactivos:

- 5,99 µl de agua estéril
- 3,1 µl del buffer A, 10X
- 0,31 µl de mezcla de dNTP (10 mM)
- 1,085 µl de primer Forward (10 µM) correspondiente a cada gen
- 1,085 µl de primer Reverso (10 µM) correspondiente a cada gen
- 0,058 µl de Kapa 2G Taq (5U/µl)

- 3,1  $\mu$ l Enhancer
- 1  $\mu$ l de ADNc de cadena simple

Los parámetros de amplificación con que se llevaron a cabo las PCR fueron los siguientes:

- Desnaturalización inicial: 95 °C durante 30 seg.
- 40 ciclos de:
  - 95 °C durante 30 seg.
  - 60-64°C durante 30 seg.
  - 72°C durante 15 seg.
- Elongación final: 72°C durante 30 seg.



**Figura 11:** Esquema representativo de la obtención de dos productos de PCR del mismo gen utilizando 2 set de primers, dos de ellos con la secuencia del promotor T7 en el extremo 5'. Dos reacciones independientes con un promotor T7 cada una, va a generar dos templados de PCR por separado con un único promotor.

Mediante el uso de un termociclador con gradiente de temperatura (MyCycler, BIO-RAD), se identificó la temperatura de hibridación adecuada para los conjuntos de cebadores (60°C para el gen Vg1 y 64°C para el gen Vg2).

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1,5 % teñidos con bromuro de etidio para verificar que se generó un único producto de PCR del tamaño esperado (~500 pb del gen Vg1 y ~650 pb del gen Vg2). Aquellos productos que revelaron una única banda del tamaño esperado se purificaron como se describe en la sección 3.7.1 y posteriormente se secuenciaron. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias de referencia de los genes Vg a partir de las cuales se diseñaron los primers específicos.

### **3.13.2. Síntesis de ARN de doble cadena (ARNdc)**

Para sintetizar las cadenas de ARN complementarias a partir de cada molde de ADNc, en un tubo de microcentrífuga de 0,2 ml se combinaron a temperatura ambiente los siguientes reactivos en un volumen final de 20 µl:

#### Gen Vg1

- 10 µl del buffer RiboMAX Express T7, 2X
- 5 µl de templado (0,5 µg)
- 3 µl de agua libre de nucleasas
- 2 µl enzima T7 express

### Gen Vg2

- 10  $\mu\text{l}$  del buffer RiboMAX Express T7, 2X
- 5  $\mu\text{l}$  de templado (13,5  $\mu\text{g}$ )
- 3  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas
- 2  $\mu\text{l}$  enzima T7 express

Se mezcló suavemente y se incubó a 37°C durante 30 min.

### **3.13.3. Remoción de la hebra molde de ADNc, hibridación de ARN de doble cadena (ARNdc) y remoción de ARN de cadena simple (ARNsc)**

Luego de la reacción de transcripción, la hebra molde de ADNc se eliminó por digestión con ADNasa, mientras que se mantiene la integridad del ARN sintetizado.

Para hibridar las cadenas de ARN se mezclaron volúmenes iguales de ARN complementario (20  $\mu\text{l}$  de cada reacción) y se incubó a 70°C durante 10 min. Luego, se enfrió lentamente hasta llegar a temperatura ambiente (~20 min).

Para eliminar cualquier resto de ARNsc, dejando intacto el ARNdc se añadió 1  $\mu\text{l}$  de la solución de ARNasa diluida en agua libre de nucleasas (1:200) y 1  $\mu\text{l}$  RQ1 ARNasa libre de ADNasa a los 20  $\mu\text{l}$  de volumen de la reacción de síntesis de ARNdc y se incubó a 37°C durante 30 min.

#### **3.13.4. Purificación del ARN de doble cadena (ARNdc)**

A los 44 µl resultantes de la etapa anterior, se añadieron 0,1 volúmen de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y 1 volumen de isopropanol. Se mezcló y se colocó en hielo durante 5 min. A continuación, se centrifugó a máxima velocidad en una microcentrífuga durante 10 min. Luego se descartó el sobrenatante y se lavó el precipitado con 0,5 ml de etanol frío al 70%. El etanol fue removido y se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 min. Finalmente, se resuspendió el ARN en agua libre de nucleasa. El ARNdc resultante se purificó y se cuantificó mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.

#### **3.13.5. Inyección de ARN de doble cadena (ARNdc)**

Para la inyección de ARNdc generado para ambos genes (Vg1 y Vg2) se utilizaron hembras de *T. infestans* recién mudadas al estadio adulto que no se alimentaron. Se procedió a inyectar 5 µl de ARNdc en el quinto esternito del abdomen de cada insecto. Un grupo de 3 hembras fueron inyectadas con ARNdc del gen Vg1, otro grupo de 3 hembras con ARNdc del gen Vg2 y un grupo control de 3 hembras fueron inyectadas con agua libre de nucleasas. Al día siguiente se procedió a alimentar a las hembras inyectadas y a machos adultos recién mudados. Posteriormente, se colocaron en parejas en frascos individuales (cada pareja en un contenedor), se verificó el apareamiento por presencia del espermátforo y se

procedió a extraer cuerpo graso y tejido ovárico. Finalmente, se extrajo ARN total de ambos tejidos, se sintetizó ADNc y se midieron los niveles transcripcionales de ambos genes en cuerpo graso y tejido ovárico por qPCR. Se realizaron dos experimentos independientes. Para evaluar si existen diferencias entre los datos obtenidos se realizó un test “t” y un post test de Bonferroni utilizando GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software). La significación estadística se asumió con un valor de  $P \leq 0,05$ .

**Tabla 1:** Secuencia de de todos los primers utilizados en el estudio

Nombre	Secuencia	
<i>Primers degenerados (para PCR)</i>		
PF1D	5'-GTNTTYGARCCNTAYYTNGARGGN-3'	Sentido
RipF 2318	5'-CTTCAAMRNATGGCAGA-3'	Sentido
C1	5'-CCBRDGDCCADDGGGAATCC-3'	Antisentido
<i>Primers inespecíficos (para PCR)</i>		
RhoF4766	5'-CATCAAGCCACAACCTTTC-3'	Sentido
RhoF4820	5'-GAAGGTGCTTCATATCAAAAGG-3'	Sentido
FA5	5'-ACTCTCCATCGAATGTGCCGC-3'	Sentido
FA12	5'-ACTTGGAACTGCAGGTAACCTGG-3'	Sentido
RA1	5'-AGAGCACAGCAGTGCCTGTCCGGG-3'	Antisentido
RA5	5'-AGACTGAATATGGTTATTCAGGCC-3'	Antisentido
RA9	5'-CAACCGGATCTTCAGAAGTAGTTGG-3'	Antisentido
RA12	5'-CCCAAGTTACCTGCAGTTCCA-3'	Antisentido
<i>Primers específicos (para PCR)</i>		
PR1	5'- TCGGGATTTCGCTCCTTTTCTTGT-3'	Antisentido
PF2	5'- TGATGTAGAAGCCGGGCGTAACA-3'	Sentido
PF3	5'- AAGTTTTAGATTTCTCTAAGGAATCAA-3'	Sentido
PF2	5'- GTACAAATTTATGCCCTTCCCAACGG-3'	Sentido
PR3	5'- CCGTTGGGAAGGGCATA-3'	Antisentido
PF4	5'- AAGCCACAACCTTTCGACAACAG-3'	Sentido
PF5	5'- CCAGTAAATGTGGGTAAATGCTGG-3'	Sentido
PR4	5'- GCATGCCAGCATTACCCA-3'	Antisentido
PF6iso	5'- CTGCCCGGGCTTTTACT-3'	Sentido
PFA	5'- ATTTGTCGTTTCAGATCAGCCCC-3'	Sentido
PRA	5'- TAAACCAAGCGTTTCCCGGT-3'	Antisentido
PFB3'	5'- TAAGCGAAGAAGAAGCTGGACG-3'	Sentido
TIR7	5'- TATATCTGCCCATGAGATGGC-3'	Antisentido
TIR9	5'- CCGTGAATGCAGTGAGAACGC-3'	Antisentido
TIF8	5'- CAGAGTCTACCCAGACTTGCC-3'	Sentido
TIF9	5'- CAGAGAAACTGCACACAACCG-3'	Sentido
<i>Primers para clonación</i>		
M13F	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	Sentido
M13R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	Antisentido
<i>Primers RACE (para la obtención de la secuencia completa de ADNc)</i>		
I-6	5'-GGTATTTGCGG-3' <b>Lee y col. (2000)</b>	3'-RACE Vg-1
PF5	5'-CCAGTAAATGTGGGTAAATGCTGG-3'	3'-RACE Vg-2
Primer 2	5'-TAGACTTAGAAATTAATACGACTCACTATAGGCGGCCACCG-3'	5'-RACE Vg-2
GeneRacer3'	5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3'	3'-RACE Vg-1
GeneRacer3'	5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3'	3'-RACE Vg-2
TIR8	5'-CGTGATGGTTACTAGAGCAGGTCC-3'	5'-RACE Vg-2
<i>Primers qPCR (para PCR cuantitativa)</i>		
QAF5	5'-TATAATCAAGGATCCCTTAGAATTTGC-3'	Vg-1, forward
QAF2	5'-CGCATGAGAAGCTCTTAACCA-3'	Vg-2, forward
QβactinaF	5'-CCCCTTTCAGTGAGGATCTTCA-3'	Control interno
QAR5	5'-TTGGCTGGTCTTCAAAAGTT-3'	Vg-1, reverse
QAR2	5'-ACGCGATGATTAGTGCATCCT-3'	Vg-2, reverse
QβactinaR	5'-CGCCATCCTTCGATTGGA-3'	Control interno
<i>Primers ARNi (para obtener ARNdc)</i>		
P6	5'- TAATACGACTCACTATAGGGGTAAAGTTAAGGTCAATGGC-3'	RNAi1; Vg-1, forward
PARA	5'- TAAACCAAGCGTTTCCCGGT-3'	RNAi1; Vg-1, reverso
P8	5'- TAATACGACTCACTATAGGTAAACCAAGCGTTTCCCGGT-3'	RNAi2; Vg-1, reverso
PARNAiF1	5'-GGTAAAGTTAAGGTCAATGGC-3'	RNAi2; Vg-1, forward
P9	5'-TAATACGACTCACTATAGGGGTCTTGAAGCTTTTACTCCCG-3'	RNAi3; Vg-2, forward
PBRNAiR	5'-GGTACACAGTGAACCTCTACTCGC-3'	RNAi3; Vg-2, reverso
P10	5'-TAATACGACTCACTATAGGGGTACACAGTGAACCTCTACTCGC-3'	RNAi4; Vg-2, reverso
PBRNAiF	5'-GGTCTTGAAGCTTTTACTCCCG-3'	RNAi4; Vg-2, forward



**Tabla 2:** *Secuencia de las sondas TaqMan utilizadas en la técnica de PCR en tiempo real*

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>
SONDA A	VIC- CCACTTATGCAATTGTAGATG 3´
SONDA B	VIC- TCTTGCTTGAAAGGACGTCGT 3´
SONDA $\beta$ ACTINA	FAM- AAGATAGTCGGTAAGGTCCCGGCCG 3´

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Identificación de dos genes de vitelogenina (Vg1 y Vg2) en *Triatoma infestans*

Se aisló un fragmento de ADNc correspondiente al gen Vg de *T. infestans* utilizando un primer diseñado por Lee y col. (2000) a partir de una región conservada correspondiente a la secuencia de aminoácidos GL/ICG, cercana al extremo C-terminal de la proteína, y un primer reverso en la región 3' complementario a la secuencia del adaptador de un primer oligo-dT. Se obtuvo una secuencia de 466 pb, correspondiente a extremo 3' del gen Vg que contenía un codón de terminación (TAA) y una señal de poliadenilación (AAATTAA) 54 nucleótidos hacia 3' del codón de terminación. Subsecuentes transcripciones reversas y amplificaciones (RT-PCR) utilizando primers específicos diseñados a partir de este primer fragmento y primers inespecíficos o degenerados, diseñados a partir de regiones conservadas de Vg de otras especies de hemípteros, permitieron obtener secuencias parciales de ADNc de dos genes que codifican para Vg en *T. infestans*, a los que denominamos Vg1 y Vg2. La secuencia de ADNc parcial del gen Vg1, obtenido a partir del primer fragmento de 466 pb aislado, comprende 861 pb (número de acceso del Banco de Genes: AIA09042); 794 pb que codifican 264 aminoácidos y 67 pb que corresponden a la región 3' no traducida (3'-UTR). El procedimiento de amplificación rápida del extremo 5' de cDNA (RACE) dio como resultado la secuencia de ADNc completa del gen Vg2

de *T. infestans* (número de acceso del Banco de Genes: AIA09041). En total, se secuenciaron 5.639 pb de ADNc del gen Vg2 que comprenden un marco de lectura abierto (ORF) de 5.565 nucleótidos codificantes de una proteína de 1.855 aminoácidos y un peso molecular inferido de aproximadamente 208,69 kDa. La secuencia de ADNc incluye 74 pb de la región 3' no traducida (3'- UTR) y el codón de terminación TGA.

### **4.2. Análisis comparativo de las secuencias de Vg1 y Vg2**

Se compararon un total de 843 posiciones nucleotídicas de los genes Vg1 y Vg2 (Figura 12). En ese fragmento de ADNc el 69,99% de los nucleótidos fueron idénticos, mientras que el 30,01% restante correspondió a 253 sitios variables. Las posiciones nucleotídicas variables incluyeron 101 transiciones (39,92%), 102 transversiones (40,32%) y 50 indels (19,76%, inserciones y deleciones). Por otra parte, el análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas de ADNc reveló un porcentaje de aminoácidos idénticos del 58,94% con una homología del 76,43% entre Vg1 y Vg2 (Figura 13).

TiVg1	AGGTGGTAAAGTTAAGGTCAATGGCCAAGTTTAGATTCTCTAAGGAATCATTAACTCA	94
TiVg2	AGTTGGTAAAGTTGTGGTGAAAGGCCAAGACTGCAGATTCTCTAAGGAATCTGTAECTCA	4826
TiVg1	AGTTAAATAAAGATGGAGAGTGTAGTACAAATTTATGCCCTTCCCAACGGAGTTCT	154
TiVg2	ATTTAAATAAAGATGGAGAGTCCAAGTACAAATTTATGCCCTTCCCAACGGAGAAGT	4886
TiVg1	AAGGTTTTGAGTCCAGAACTGGC-----ACT--	182
TiVg2	AAGGTTTTTATTCCAGAACTGGCCGGGCTTTTACTCCCGGTCTTGAAGCTTTTACTCC	4946
TiVg1	-----GAAGTCACTACGATGGCATAGATCTTACTCCAAATTAACAATACTACAG	235
TiVg2	CGGCTTGAAGTAGTCTACGATGGCAGAGATCAACTTCAAGCTAGCAATTACTACAG	5006
TiVg1	AGGTAAAGTSCGCGGTTTATGTGGACTTTTCGACGGAGAATATGTACAGATTTCACTAC	295
TiVg2	AGGTAAAGTSCGCGGTTTATGTGGACTTTTCGACGGAGAATATGTACAGATTTCACTAC	5066
TiVg1	ACCAAAGAAGTGTATAATCAAGATCCCTTAGAATTGCGCCACTTATGCAATTGTAGA	355
TiVg2	GCCAAGGAAGTGTATTCAGATCCCTTAGAATTGCGCAATTAAGCAATTGTAGA	5126
TiVg1	TGGAAC TTGTGAAGACCAGC AAGAAGTAAACAACGAG--CTAAATTTCCCTTGT	413
TiVg2	TGAAAC TTGTCAAGACCAGCAAGAGTTCAATCAACGAGTTCTTAACTT--CCATGC	5184
TiVg1	TATTAAGAAATGTATGTTGGGAGATGTTATTASTGATGTAGAAGCCGGSCGTAACTAA	473
TiVg2	TATTAACAAAATGTATCTTGGGAGATGTCGTAAGCAAGGAGAAGCTGGACGATTCAAA	5244
TiVg1	CCACGCATAGAAAGCCCTCTAACCAAGATGCTTCAAGG--TGGATCAAGAAACCCATG	531
TiVg2	CCACGCATAGAAACTTCTCAGTCCAACTACTCCBTGGCATGGT--GGACAACAAAATG	5302
TiVg1	AAGTAGGATGCACTAAATCATGGCTAGAAAATG-TTGAGCAACTGGAAAGACATGCTTC	590
TiVg2	AAGTAGGATGCACTAAATCATGGCTAGAAAATG-TTGAGCAACTGGAAAAACTTGCTTC	5361
TiVg1	AGTTTACCTCCCCAACTCTCTGTAAATAGTAAACCAACTAAAAGATTGASAAA	650
TiVg2	AGTTTCACTCCCCAACTGACTGTCAATTCCAAATGTAAGCAACTTCGAAGATTGASAAAG	5421
TiVg1	AAAATAGATTTTACTGTGTACAGAAATAGCAGCGCTAATAACATTGGGTACAGATGATA	710
TiVg2	CGAATAGATTTTACTGTGTACAAATAGCAGCTGCTAATAACATTGGGTACAGATGATA	5481
TiVg1	AAAAAAGGAGCGAATCCCGAATTTAGTCAGAAAACGGCAACGCTTGGTTTTAACTTAAT	770
TiVg2	AAAAAAGGAGCCAATCCCGAATTTAGTCAGAAAACGGCAACGAAATGGTTTTAAAGTAAAT	5541
TiVg1	GTTCCAGAAAGATGCATTTCT-ATTAAATTTTAAATTATTAAATTTTAGTTTAGG	829
TiVg2	GTAACAGAGCGATGTGTTCTAACAGATTCTGTTGGATATTATTAA-TTTTAGAAATAGG	5600
TiVg1	TAC	832
TiVg2	TAC	5603

**Figura 12:** Análisis comparativo de las secuencias de ADNc de Vg1 y Vg2 de *Triatoma infestans*. Los nucleótidos idénticos en ambos genes se destacan con negro y los codones stop se resaltan en rojo.

TiVg1	-----LSFRSAF <b>G</b> PLE <b>G</b> G <b>K</b> V <b>K</b> V <b>N</b> G <b>Q</b> V <b>L</b> D <b>F</b> S <b>K</b> E <b>S</b> I <b>T</b> Q <b>V</b> K <b>N</b> K <b>D</b> G <b>E</b> V <b>L</b> V <b>Q</b>	42
TiVg2	REGTANQKELLILLGKDVVQVLPTGG <b>S</b> E <b>I</b> V <b>G</b> K <b>V</b> V <b>N</b> G <b>Q</b> T <b>A</b> D <b>F</b> S <b>K</b> E <b>S</b> V <b>A</b> Q <b>F</b> K <b>Y</b> K <b>D</b> G <b>E</b> V <b>Q</b> V <b>Q</b>	1620
TiVg1	IYALPN <b>G</b> V <b>L</b> R <b>F</b> S <b>V</b> P <b>E</b> -----T <b>G</b> T <b>E</b> V <b>I</b> <b>L</b> <b>D</b> G <b>I</b> R <b>I</b> L <b>L</b> Q <b>I</b> N <b>N</b> N <b>Y</b> R <b>G</b> K <b>V</b> R <b>G</b> L <b>C</b> G <b>T</b> F <b>D</b>	89
TiVg2	VYALPT <b>G</b> E <b>V</b> R <b>L</b> L <b>F</b> P <b>G</b> T <b>A</b> R <b>A</b> F <b>T</b> P <b>G</b> L <b>E</b> A <b>F</b> T <b>E</b> <b>G</b> L <b>E</b> V <b>V</b> <b>I</b> <b>D</b> G <b>T</b> R <b>V</b> K <b>L</b> Q <b>A</b> S <b>N</b> <b>Y</b> R <b>G</b> R <b>V</b> R <b>G</b> L <b>C</b> G <b>T</b> F <b>D</b>	1680
TiVg1	<b>G</b> E <b>Y</b> V <b>T</b> D <b>F</b> T <b>T</b> P <b>K</b> N <b>C</b> I <b>I</b> K <b>D</b> P <b>L</b> E <b>F</b> A <b>A</b> T <b>Y</b> A <b>I</b> V <b>D</b> T <b>C</b> E <b>G</b> P <b>A</b> K <b>E</b> L <b>N</b> Q <b>R</b> A <b>K</b> I <b>S</b> P <b>C</b> <b>Y</b> E <b>K</b> I <b>V</b> M <b>L</b> G <b>D</b> V <b>I</b> S	149
TiVg2	<b>G</b> E <b>Y</b> V <b>T</b> D <b>F</b> T <b>T</b> P <b>N</b> C <b>V</b> F <b>K</b> N <b>P</b> S <b>E</b> F <b>A</b> A <b>S</b> <b>Y</b> A <b>V</b> V <b>D</b> E <b>T</b> C <b>G</b> P <b>A</b> K <b>E</b> L <b>H</b> Q <b>R</b> V <b>L</b> N <b>L</b> P <b>C</b> <b>Y</b> K <b>Q</b> T <b>V</b> L <b>L</b> G <b>D</b> V <b>V</b> S	1740
TiVg1	D <b>V</b> E <b>A</b> G <b>R</b> N <b>K</b> P <b>R</b> M <b>R</b> S <b>S</b> L <b>T</b> K <b>M</b> L <b>Q</b> G <b>G</b> S <b>R</b> K <b>H</b> S <b>E</b> V <b>G</b> T <b>N</b> H <b>R</b> V <b>E</b> I <b>V</b> E <b>Q</b> E <b>G</b> K <b>T</b> C <b>F</b> S <b>L</b> E <b>P</b> L <b>V</b> S <b>C</b> S <b>K</b> C <b>K</b>	209
TiVg2	E <b>E</b> E <b>A</b> G <b>R</b> F <b>Q</b> P <b>R</b> I <b>R</b> T <b>S</b> Q <b>S</b> N <b>L</b> L <b>R</b> G <b>I</b> G <b>G</b> Q <b>Q</b> T <b>E</b> E <b>R</b> C <b>S</b> K <b>L</b> C <b>S</b> K <b>V</b> I <b>E</b> Q <b>S</b> G <b>K</b> T <b>C</b> F <b>S</b> L <b>H</b> P <b>Q</b> M <b>T</b> C <b>T</b> S <b>K</b> C <b>K</b>	1800
TiVg1	<b>F</b> T <b>K</b> K <b>L</b> E <b>K</b> K <b>I</b> D <b>F</b> <b>Y</b> C <b>V</b> Q <b>N</b> S <b>S</b> A <b>S</b> K <b>H</b> W <b>V</b> Q <b>M</b> T <b>R</b> K <b>G</b> A <b>N</b> P <b>D</b> F <b>S</b> Q <b>K</b> P <b>A</b> N <b>E</b> W <b>F</b> N <b>I</b> N <b>V</b> P <b>E</b> R <b>C</b> I <b>S</b> I*	264
TiVg2	<b>A</b> T <b>S</b> K <b>L</b> E <b>K</b> R <b>V</b> E <b>F</b> H <b>C</b> V <b>E</b> N <b>S</b> A <b>A</b> T <b>K</b> H <b>W</b> V <b>E</b> M <b>I</b> K <b>K</b> G <b>A</b> N <b>P</b> D <b>F</b> S <b>Q</b> K <b>P</b> A <b>N</b> E <b>W</b> F <b>K</b> V <b>N</b> V <b>P</b> E <b>R</b> C <b>V</b> P <b>N</b> *	1855

**Figura 13:** Comparación de la región C-terminal de Vg1 y Vg2 de *Triatoma infestans*. Los motivos DGXR y GL/ICG se muestran encuadrados en color gris y los residuos idénticos se destacan con negro. Los asteriscos indican los codones de stop.

### 4.3. Análisis de la secuencia de aminoácidos de Vg2

La base de datos de dominios conservados (CDD) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) predijo tres regiones conservadas para Vg2 (Figura 14). Dos dominios N-terminales, que comparten cierta homología con las lipoproteínas, fueron encontrados entre las posiciones de aminoácidos 6-323 y 408-750, respectivamente. Un tercer dominio, conocido como el factor tipo D de von Willebrand (VWD), fue ubicado cerca de la región C-terminal de la proteína entre los aminoácidos 1.507 y 1.692. Además, la secuencia posee una secuencia consenso de clivaje, RXXR, dos regiones poliserina y los motivos conservados

## Resultados

---

GL/ICG y DGXR (Figura 14). Como se ha descrito para la mayoría de los insectos: a) el tetra residuo RXXR se encuentra cerca de la región N-terminal y está flanqueado por los dominios poliserina, b) el motivo DGXR se ubica pocos residuos hacia el extremo N-terminal del motivo GL/ICG (Tufail y Takeda, 2008). Por otra parte, se encontraron 121 residuos potenciales de fosforilación (serina: S, treonina: T, tirosina: Y).

```

PQKLGWKNGLNLYRYEVRGRITVUGLHQVADQFAGVLVKGKLTVPKSEDEILNLQVHLEQAE 60
VHTNLSSGWSITYIEDHDLNKKLPISDTPFELKLNKNGVVDKMYVDKNLPTWEVNVLKAIA 120
SQLQVDTOAENLKKSRVNQVPVEGQITIGVYKTVEDTDTGECETIINDISPLPQYVQLSRPE 180
LVPLPNLLGAHGQVIDIVKTKNYSNCEQRMAYHFGLTGLTDWEPASNQMGSFLSRS SVTR 240
VIVTGTLTSTYTIQSSVTINKIVLAPHLYNNQKGIVASRMNLTLEAVTSSSGSPQVPVNP 300
TVKNLVVEYNAATTEENAQSHLMFRYIQGDEPTKVHKHSSSSSESSSSSEESLYTLMMRS 360
RRSIGTRRVENYSESSSSSESNSSDDSDSSIGSSSEDFWQPKPTLNEANSPFLPYFIGYLG 420
NSIQASSKVNQVSVVYKLAKEIGEEVLDGNSITGGNLSKFTVLVNVVHTMNTTQLLEAT 480
EKLYVPYSKVVQITTEGDHPLYQAWVFRDAVAEVTGPAVLTITHWILNHKITGAEEAHV 540
VGVLPNSAHYPTTEYMNTEFFELLKNEEVQKQRYLNTSVLTAFTDLVRKAQVNRETAHNRY 600
PVHSGFDLTPKIDRVVSEQVVTYLETQLKKAVEQGDSPNIQVYIRALGNTAHPKILGVYE 660
PYLEGHEGVTDFQRLTIVASLDKITRVYPRLARVLFKIQNSGETPEVRVAAVMQLMKT 720
NPPAOILORMAHTNVDHSROVNAAVKSAIENAAARLHGPTSYQLAQNAKSAVHLLTTQDF 780
GFHQSYNFLHDYVVKEEELMITYLAYIQGEDSVVPSAFYTLWRGLGGYKRPFFQASWM 840
TSHAGSLVDLLFDQFTEVDQSGKPKHGHGSEQEGDWTLEKVGKFLNFETELDQVEGNV 900
LVSAFGVKNFFTFDNHTIEYLPEYVKYLTQQLRNGHHFNYNKLYNKHTLQFGFPTATGLP 960
FFYTFSTPTRTHFAGEVKGFSHPDLAGEQGGDKILIPKTADFTGLFKLMYTIKTEGVLGF 1020
TTPYNHKTFFVADFKNFHFGLPVKATVEVDLEHKKFQTKFQPWGENRNEKFVEYSTVAYT 1080
SVHDLLELEPIAEGDNTEIIVRVPVQRFETTFGEADTGFAFDVKVESEQKFVDWATFYNG 1140
ASKYDFMYALLFPFHGDTINNNFTVYTNTHKTTAKYVKFFFTYDLDLVKTGGTGTHISH 1200
NKHRVVS GTGDES KDNDVPSSTTPASQQRQKEFLQRAVAGIKDSYAQVFDLGVQFEGQT 1260
NAEYVATAAYSRSYVHPNRTFLFYFGKQPAKVTGHTKPYQVALQVNEFPTVPVTDFEKA 1320
LHADPTSHISAKLYFGENVYSGGKVVYVQGTFKQSEGRREYVEHHPVSALCRRQMEEGNYL 1380
LPACRNATASANFLDHYKFAVKYEGVPEVVKYHVYKTYTIARYFANHIVSEDFVTPSGKE 1440
GYLDVFGVKFTHDLKAVNVSIEIPVLTSEFNNVYFPEWFTPFVVVHPVYDFDDRFGQHFFR 1500
AQHFPTCVFDKXQATTFDNRYBPVNVGKCVHALVHVSPTTEFGYTGQSTYYDYDDFTVLV 1560
REGTANQKELLILLGKDVVQLPTGGSEIVGKVVVNGQTADFSKESVAQFKYKDGEVQVQ 1620
VYALPTGEVRLLPFGTARAFTPGLEAFTPGLEVVYDQTRVVKLQASNYRGRVFEKGGFD 1680
GEYVTDFTTPRNCVFKNPSEFAASYAVVDETQCGPAKELHQRVNLNLPYKQTVLLGDVVS 1740
EEEAGRFPQPRIRTSQSNLLRGIGGQQTTEERCSKLC SKVIEQSGKTCFSLHPQMTCTSKCK 1800
ATSKLEKRVEFHCVPNSAATKHWVEMIKKGANPDFSQKPANEFKVNVPERCVPN* 1855

```

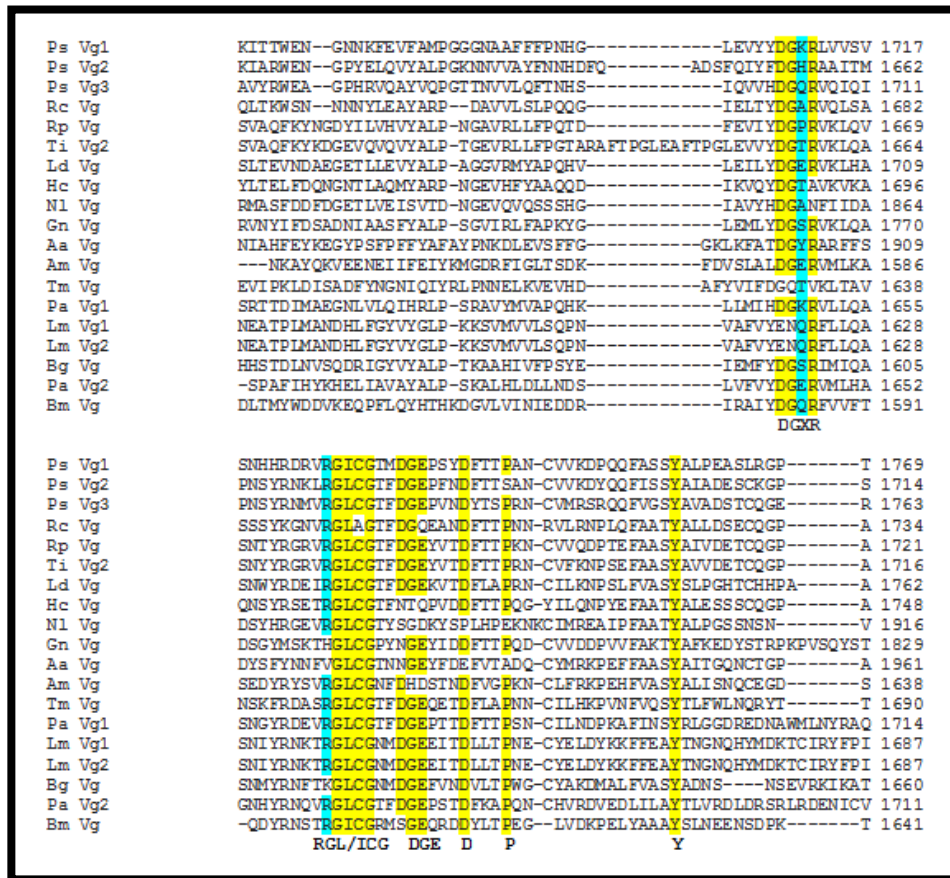
**Figura 14:** Secuencia de aminoácidos deducida de la proteína Vg2 en *Triatoma infestans*. Los aminoácidos se numeran a la derecha. Las tres regiones conservadas, predecidas por el Centro Nacional de Información sobre Biotecnología, se indican: a) los dos dominios N-terminales se muestran enmarcadas; b) el factor D de von Willebrand se resalta en gris oscuro en el extremo C-

terminal. Las regiones ricas en residuos serina se muestran subrayadas. La secuencia de posible sitio de corte, RXXR, se indica en negrita y subrayada. Los sitios con residuos de posible fosforilación, serina (S), treonina (T) y tirosina (Y) se muestran resaltados con color gris claro. Los motivos DGXR y GL/ICG se presentan enmarcados. El asterisco indica el codón de terminación de la proteína.

#### 4.4. Comparación de la secuencia de aminoácidos de Vg2 de *Triatoma infestans* con las de otros insectos

La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica de ADNc de Vg2 de *T. infestans* se comparó con las secuencias de Vg correspondientes a otros insectos hemimetábolos y con especies de holometábolos representativas de los órdenes Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e Hymenoptera (*Bombyx mori*, *Aedes aegypti*, *Tenebrio molitor* y *Apis mellifera*, respectivamente). Dentro de las especies de hemimetábolos el alineamiento de las secuencias reveló que Vg2 de *T. infestans* es más similar a Vg de *Rhodnius prolixus* (74% de identidad), seguido por *Lethocerus deyrollei* (47%), *Homalodisca coagulata* (43%), *Plautia stali* (Vg1: 39%, Vg2: 37 %, Vg3: 38%), *Nilaparvata lugens* (35%), *Graptosaltria nigrofuscata* (35%), *Riptortus clavatus* (32%), *Periplaneta americana* (Vg1: 33%, Vg2: 31%), *Blattella germanica* (27%) y *Leucophaea maderae* (Vg1: 26%, Vg2: 27%). El alineamiento de la región C-terminal de las secuencias de aminoácidos de Vg de las especies mencionadas precedentemente, demostró que los residuos DG (del motivo DGXR) junto con el motivo GL/ICG se encuentran altamente conservados (Figura 15).

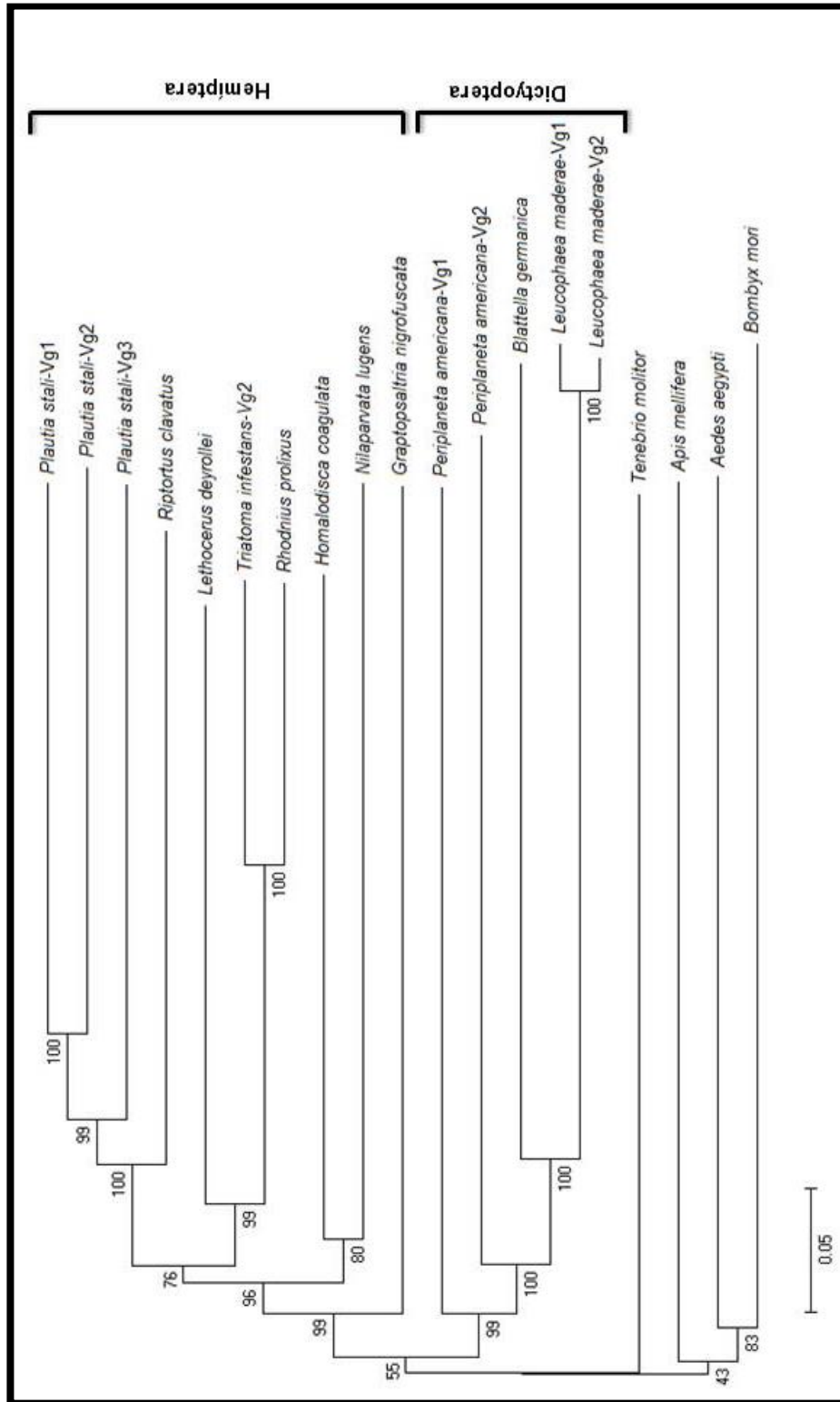




**Figura 15:** Alineamiento de un fragmento de la región C-terminal de Vg de insectos hemimetábolos (*Rhodnius prolixus*: Rp Vg; *Plautia stali*: Ps Vg1, Ps Vg2, Ps Vg3; *Riptortus clavatus*: Rc Vg; *Lethocerus deyrollei*: Ld Vg; *Triatoma infestans*: Ti Vg2; *Nilaparvata lugens*: Nl Vg; *Graptopsaltria nigrofusca*: Gn Vg; *Homalodisca coagulata*: Hc Vg; *Periplaneta americana*: Pa Vg1, Pa Vg2; *Blattella germánica*: Bg Vg; *Leucophaea maderae*: Lm Vg1, Lm Vg2) y especies de holometábolos representativas de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera* e *Hymenoptera* (*Bombyx mori*: Bm Vg; *Aedes aegypti*: Aa Vg; *Tenebrio molitor*: Tm Vg; *Apis mellifera*: Am Vg). Los motivos DGXR, GL/ICG, DGE y los aminoácidos conservados en las secuencias se muestran resaltados.

### **4.5. Relaciones filogenéticas de Vg2 de *Triatoma infestans* con las vitelogeninas de otros insectos hemimetábolos**

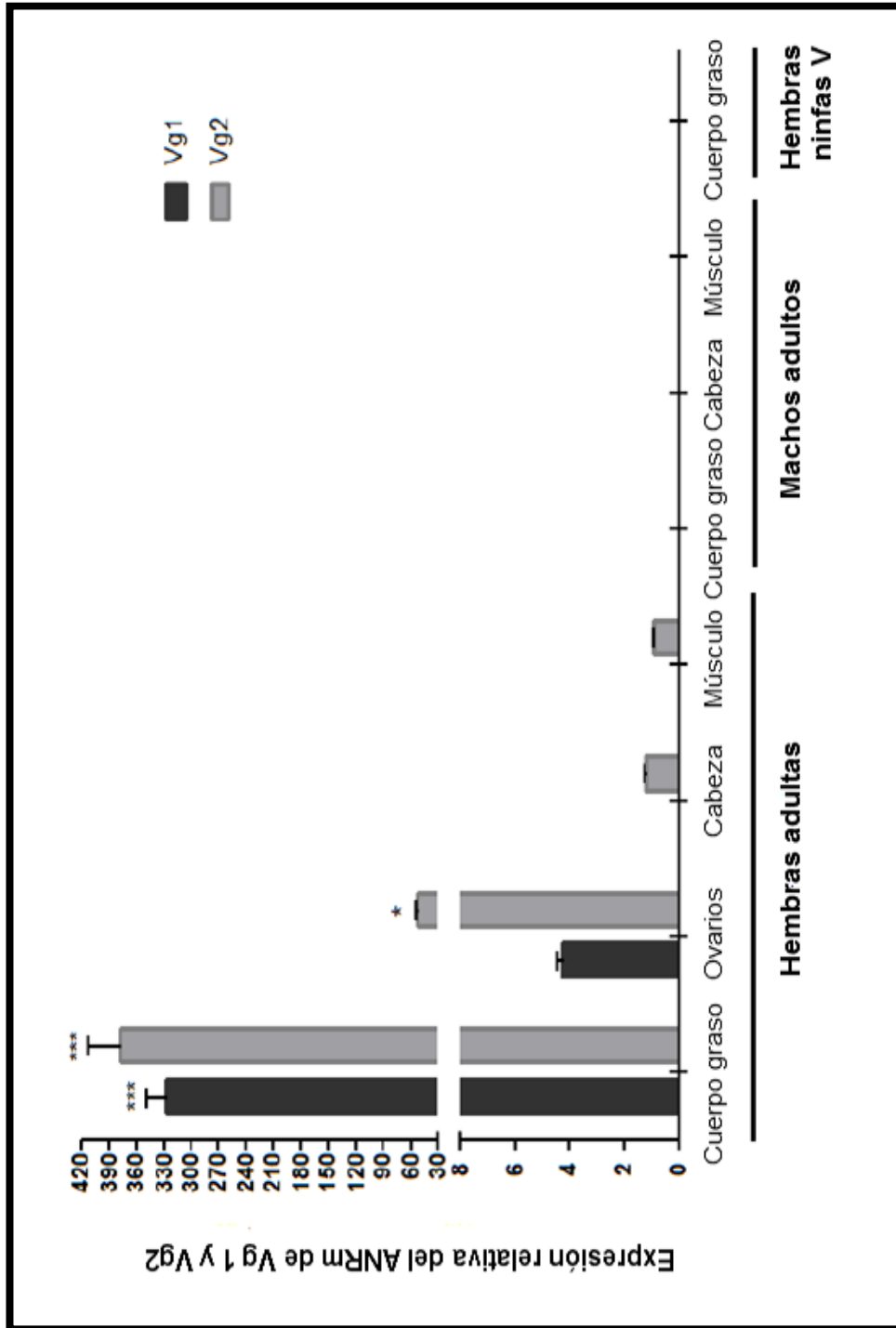
La relación evolutiva de 15 Vgs derivadas de 11 insectos hemimetábolos fue evaluada luego de alinear las secuencias completas de aminoácidos utilizando el método de Neighbor-Joining (NJ) (MEGA versión 5.1) y cuatro especies representativas de los órdenes Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e Hymenoptera (*B. mori*, *A. aegypti*, *T. molitor* y *A. mellifera*, respectivamente) como extragrupos para el análisis filogenético (Figura 16). El árbol filogenético basado en las secuencias completas de Vg de insectos hemimetábolos mostró claramente dos clusters. Las secuencias de Vg de dictiópteros y hemípteros aparecieron en clusters separados, en ambos casos con valores de bootstrap de 99%. Dentro de los hemípteros, *T. infestans* se agrupó con *R. prolixus* con un valor de bootstrap de 100% y ambas especies se relacionaron estrechamente con *L. deyrollei* (99%). Por otra parte, *R. clavatus* se relacionó con *P. stali* con un elevado valor de bootstrap (100%). *G. nigrofuscata* se ubicó en una posición basal en el cluster de hemípteros con un valor de bootstrap de 96 %.



**Figura 16:** Árbol consenso construido mediante el método de Neighbour-Joining a partir de 19 secuencias de aminoácidos de Vg, 15 correspondientes a insectos hemimetábolos y cuatro de especies que se utilizaron como extragrupos para el análisis filogenético (*Tenebrio molitor*, *Apis mellifera*, *Aedes aegypti*, y *Bombyx mori*). Los números indican valores de bootstrap. Sólo se muestran valores > 50%.

### **4.6. Expresión de los genes Vg1 y Vg2 a nivel de transcripción en ambos sexos, diferentes tejidos y dos estadios evolutivos de *Triatoma infestans***

Se analizó la expresión de los genes Vg1 y Vg2 a nivel de ARNm en ambos sexos, diferentes tejidos y dos etapas de desarrollo de *T. infestans*. En todos los casos, la expresión se determinó en ejemplares del insecto vector después de 5 días de haber sido alimentados con sangre. Los resultados de la PCR en tiempo real revelaron que Vg1 y Vg2 se expresaron en cuerpo graso y en ovarios de hembras adultas (Figura 17). Además, se detectó una leve expresión de Vg2, en cabeza y musculo de hembras adultas.



**Figura 17:** Expresión relativa de los genes Vg1 y Vg2 (ARNm) en ambos sexos, diferentes tejidos y dos etapas de desarrollo de *Triatoma infestans* el día 5 después de la ingesta de sangre (fase vitelagénica). Las barras representan el desvío estándar ( $\pm$  DE) de la media.

### **4.7. Cinética de la expresión transcripcional de los genes Vg1 y Vg2 pre y post-alimentación**

Bajo nuestras condiciones estandarizadas de laboratorio, el período entre la eclosión a la etapa adulta y la primera alimentación es para las hembras de *T. infestans* de aproximadamente 7 días (período pre-vitelogénico). Después de la alimentación (comienzo del período vitelogénico), la primera oviposición ocurre entre los días 13 y 15 y se extiende hasta los días 22-23 posteriores a la ingesta de sangre (final del período vitelogénico). El inicio del período post-vitelogénico se detectó con la interrupción de la oviposición (Figura 10). Para la postura de un segundo lote de huevos se necesita, como en otros triatomíneos, de una nueva alimentación de sangre (Stoka y col., 1987; Aguirre y col., 2011).

Se analizó la expresión a nivel de ARNm de los genes Vg1 y Vg2 en ejemplares adultos de ambos sexos de *T. infestans* en diferentes días después de la muda y de la ingesta de sangre. Además, se investigó la expresión de los genes Vg en hembras de estadio ninfal V en diferentes días después de una segunda alimentación de sangre. No se detectó expresión de los genes Vg1 y Vg2 en el cuerpo graso de las ninfas ni en el cuerpo graso de machos adultos de *T. infestans*, mientras que ambos genes se expresaron en cuerpo graso y ovarios de hembras adultas. Durante el período pre-vitelogénico, los genes Vg1 y Vg2 se expresaron ligeramente en cuerpo graso y ovarios de hembras adultas. Sin embargo, se observaron diferentes patrones de expresión en ambos tejidos durante la fase

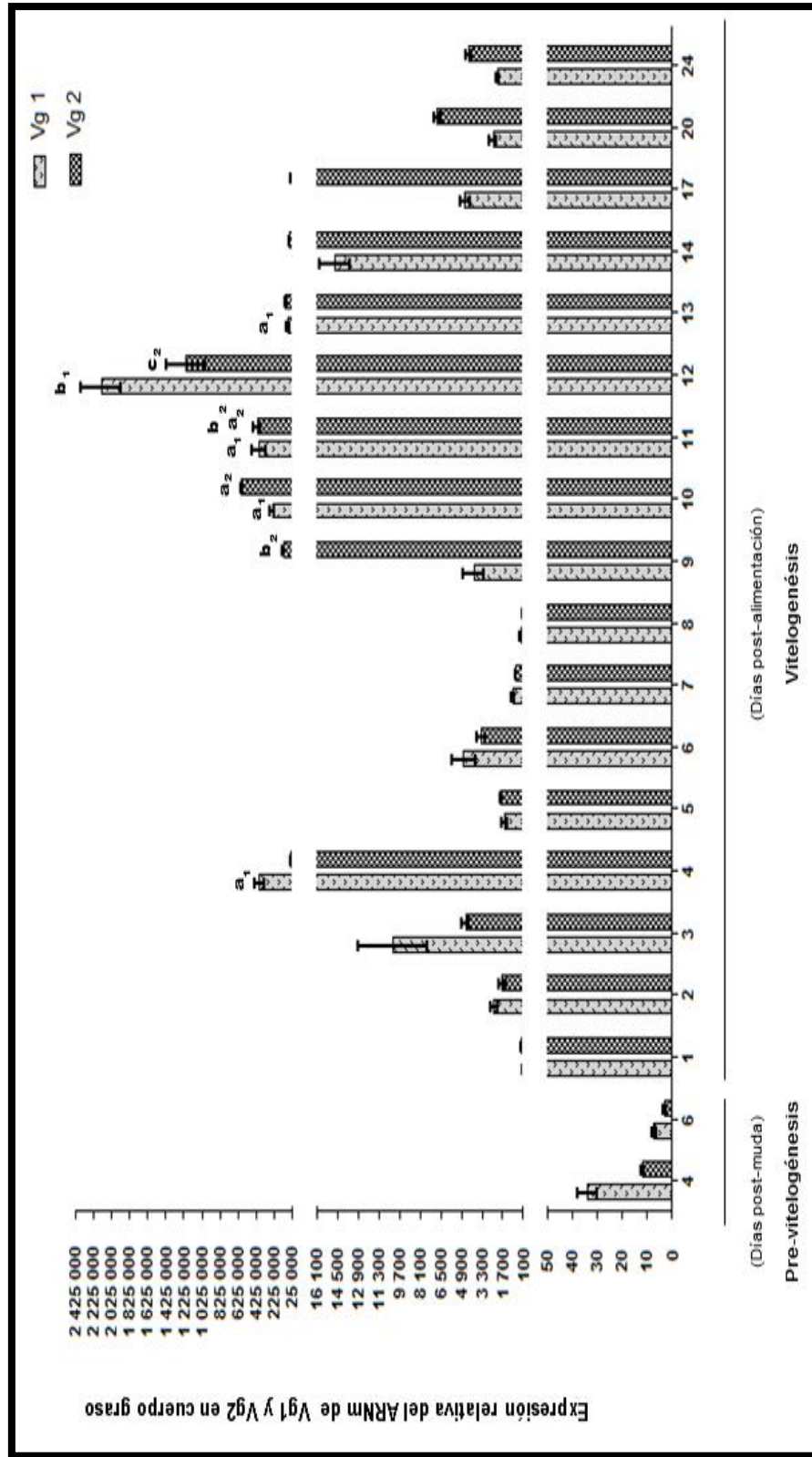
vitelogénica. Los niveles de ARNm de Vg1 y Vg2 comenzaron a aumentar en el cuerpo graso desde el día 1 después de la ingesta de sangre (Figura 18) y desde el día 10 en ovarios (Figura 19).

### **4.7.1. Expresión de los genes Vg1 y Vg2 en cuerpo graso de hembras adultas**

Como lo muestra la figura 18, en el cuerpo graso se observaron patrones de expresión transcripcional similares de los genes Vg1 y Vg2 a nivel de ARNm (Figura 18). Ambos transcritos demostraron depender de la alimentación. Los niveles de ARNm de Vg1 y Vg2 fueron aproximadamente 4 veces superiores en el día 4 que en el día 6 después de la ecdisis. Los niveles de los transcritos de Vg1 y Vg2 fueron más elevados el día 1 después de la alimentación en comparación con los insectos sin alimentar, después aumentaron progresivamente hasta llegar a un primer pico el día 4 y posteriormente disminuyeron entre los días 5 y 8, alcanzando en el día 8 niveles similares a los detectados el primer día después de la alimentación. Luego, ambos niveles de transcritos aumentaron hasta alcanzar su máximo el día 12 post-alimentación y después de este incremento empezaron a disminuir lentamente. El gen Vg1 presentó niveles de expresión significativos los días 4 y 11 ( $P < 0,05$ ) después de la ingesta de sangre en comparación con la mayoría de los días analizados y la expresión en el día 12 posterior a la alimentación fue altamente significativa ( $P < 0,001$ ) con respecto a todos los días analizados. La expresión del gen Vg2 fue significativa los días 10 ( $P < 0,001$ ) y

11 ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$ ) con respecto a la mayoría de los días analizados y el día 12 ( $P < 0,001$ ) después de la alimentación la expresión fue significativa con respecto a todos los días. El nivel de transcritos del gen Vg1 fue significativamente mayor que el del gen Vg2 en los días 4 ( $P < 0,001$ ) y 12 ( $P < 0,001$ ) después de la ingesta de sangre y menor el día 10 ( $P < 0,01$ ) (Figura18).

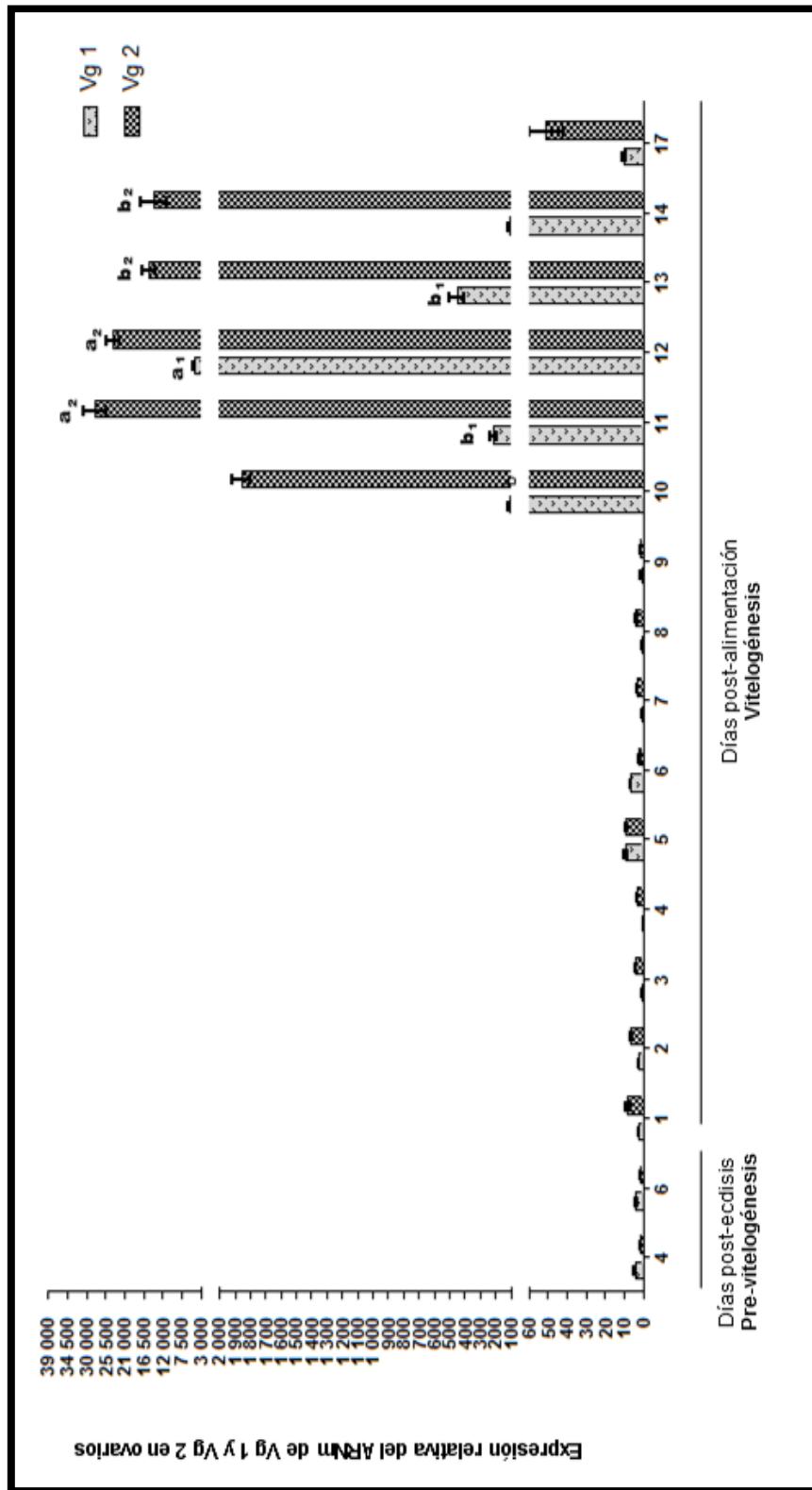




**Figura 18:** Expresión relativa de los genes Vg1 y Vg2 (ARNm) en cuerpo graso de hembras adultas de *Triatoma infestans* en diferentes tiempos después de la ecdisis al estadio adulto (período sin alimentar) y durante los primeros 24 días después de la ingesta de sangre. Las barras representan el desvío estándar ( $\pm$  DE) de la media y las letras y subíndices iguales indican que no existen diferencias significativas. El gen Vg1 presentó niveles significativos de expresión los días 4 y 11 ( $P < 0,05$ ) después de la comida de sangre con respecto a la mayoría de los días analizados y la expresión en el día 12 después de la alimentación ( $b_1$ ) fue altamente significativa ( $P < 0,001$ ) en relación a la expresión que ocurre en todos los días analizados. El nivel de ARNm de Vg2 fue significativo los días 10 ( $P < 0,001$ ) y 11 ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$ ) en la mayoría de las comparaciones y en el día 12 ( $c_2$ ) fue significativo ( $P < 0,001$ ) con respecto a todos los días analizados.

### 4.7.2. Expresión de los genes Vg1 y Vg2 en ovarios de hembras adultas

En ovarios el incremento del ARNm de Vg1 y Vg2 se detectó a partir del día 10 después de la alimentación de sangre (Figura 19). El nivel de ARNm de Vg1 fue significativo los días 12 ( $P < 0,001$ ) y 13 ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,001$ ) posteriores a la comida de sangre en comparación con el resto de los días analizados, excepto entre los días 13 y 11. El nivel de transcritos del gen Vg2 fue elevado y significativo los días 11 ( $P < 0,001$ ), 12 ( $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$ ), 13 ( $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$ ) y 14 ( $P < 0,001$ ) en la mayoría de las comparaciones; el nivel de ARNm de Vg2 fue significativamente mayor que el de Vg1 durante esos cuatro días ( $P < 0,001$ ) (Figura 19).

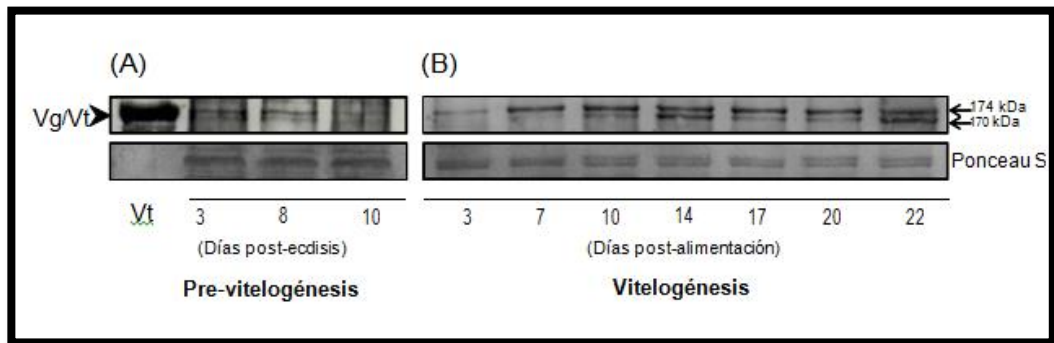


**Figura 19:** Expresión relativa de los genes Vg1 y Vg2 (ARNm) en ovario de hembras adultas de *Triatoma infestans* en diferentes tiempos después de la ecdisis al estadio adulto (período sin alimentar) y durante los primeros 17 días después de la ingesta de sangre. Las barras representan el desvío estándar ( $\pm$  DE) de la media y las letras y subíndices iguales indican que no existen diferencias significativas. El nivel de ARNm de Vg1 fue significativo los días 12 ( $P < 0,001$ ) y 13 ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,001$ ) post-alimentación en comparación con el resto de los días analizados, excepto entre los días 13 y 11. El nivel del transcritto Vg2 fue elevado y significativo los días 11 ( $P < 0,001$ ), 12 ( $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$ ), 13 ( $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$ ) y 14 ( $P < 0,001$ ) en la mayoría de las comparaciones.

### 4.8. Cinética de la expresión proteica del gen de vitelogenina

Se llevaron a cabo ensayos de Western Blot para evaluar el efecto de la alimentación en la expresión de la proteína Vg en hembras adultas. Se evaluó la expresión de la proteína en homogenatos de cuerpo graso y tejido ovárico empleando el anticuerpo policlonal anti-vitelina (anti-Vt) empleado por Aguirre y col. (2008) en su estudio de vitelogénesis en el triatomino *Dipetalogaster maxima*. Los resultados mostraron que el anticuerpo reconoce en los homogenatos una banda de peso molecular de 170/174 kDa compatible con Vt, en acuerdo con lo reportado para otras especies de triatominos (Aguirre y col., 2008).

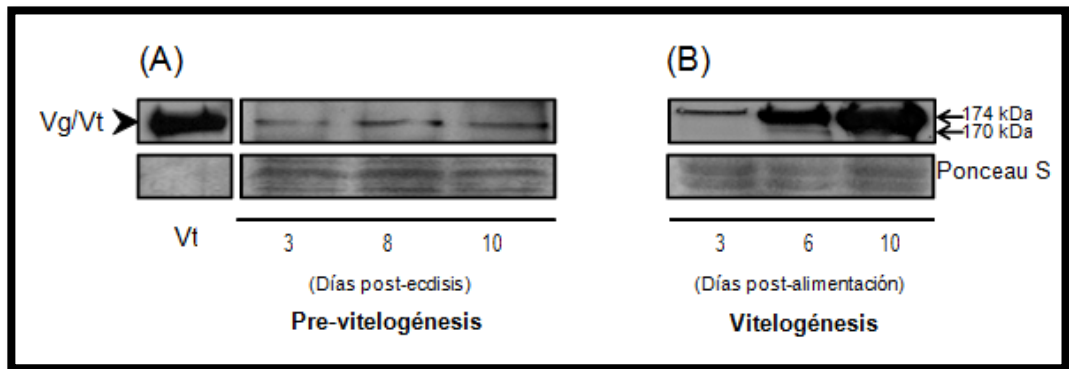
En cuerpo graso, durante la pre-vitelogénesis, la banda inmunorreactiva correspondiente a Vg fue débil los días 3 y 8 después de la ecdisis y escasamente visible el día 10 (Figura 20A). Por el contrario, la señal de Vg aumentó notablemente después de pocos días de la alimentación con sangre, durante la fase vitelogénica (Figura 20B).



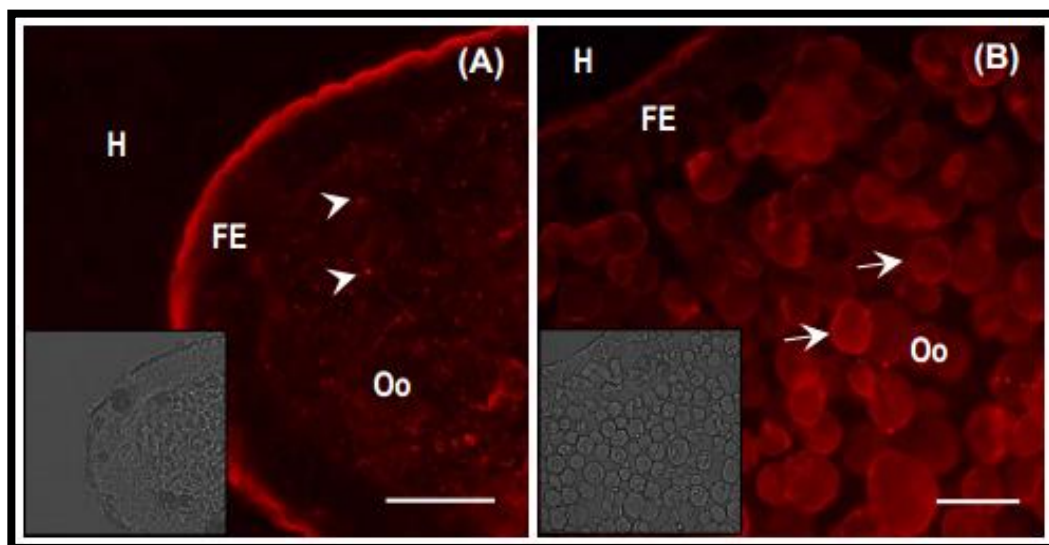
**Figura 20:** *Expresión de Vg en cuerpo graso de hembras adultas de Triatoma infestans. La expresión de Vg en cuerpo graso se analizó mediante Western Blot, usando un anticuerpo policlonal anti-Vt. Las determinaciones se realizaron en diferentes tiempos después de la ecdisis (fase pre-vitelogenica, período sin comer) y de que las hembras recibieran una comida de sangre (fase vitelogénica) (A y B, respectivamente). Carril Vt: vitelina purificada (0,2 µg/carril). Panel superior: las flechas indican el peso molecular de las principales subunidades de Vt/Vg.*

En los ovarios, el Western Blot mostró una banda inmunoreactiva débil para la proteína Vg/Vt durante la pre-vitelogénesis (días 3, 8, y 10 después de la ecdisis) (Figura 21A), mientras que se observó un aumento notable de Vt desde el día 3 al 10 después de la ingesta de sangre (Figura 21B). De acuerdo con el patrón de Vg/Vt encontrado en los ovarios, los ensayos de inmunofluorescencia mostraron una fuerte señal para Vt en los gránulos de vitelo de los folículos terminales de hembras vitelogénicas (Figura 22B). Por el contrario, en los ovarios pre-vitelogénicos la señal Vg/Vt se encontró principalmente en la región basal del epitelio folicular, aunque en el interior de los ovocitos también se observó un patrón puntiforme fluorescente débil (Figura 22A). Este hallazgo sugiere que

durante la pre-vitelogénesis, la Vg sintetizada se acumula en la región basal del epitelio folicular para ser tomada por el ovocito durante la vitelogénesis.



**Figura 21:** Expresión de Vg en ovarios de hembras adultas de *Triatoma infestans*. La expresión de Vg en ovarios se analizó mediante Western Blot, usando un anticuerpo policlonal anti-Vt. Las determinaciones se realizaron en diferentes tiempos después de la ecdisis (fase pre-vitelogenica, período sin comer) y de que las hembras recibieran una comida de sangre (fase vitelogénica) (A y B, respectivamente). Carril Vt: vitelina purificada (0,2  $\mu$ g/carril). Panel superior: las flechas indican el peso molecular de las principales subunidades de Vt/Vg.



**Figura 22:** Localización de Vg/Vt en el tejido ovárico de *Triatoma infestans* por inmunofluorescencia indirecta. Los ovarios de las hembras en pre-vitelogénesis (7 días después de la ecdisis) y vitelogénesis (4 días después de la ingesta de sangre) se diseccionaron y se procesaron como se indica en *Materiales y Métodos*. (A) Sección de un folículo terminal de una hembra pre-vitelogénica que muestra fluorescencia en la región basal del epitelio folicular y en el ovocito (puntas de flecha); (B) Sección de un folículo terminal de una hembra vitelogénica mostrando la señal fluorescente para Vt en los gránulos de vitelo (flechas). FE, epitelio folicular; Oo, ovocitos; H, hemolinfa. Barras: 25  $\mu$ m.

#### 4.9. Silenciamiento de los genes Vg1 y Vg2 utilizando ARN de interferencia (ARN<sub>i</sub>)

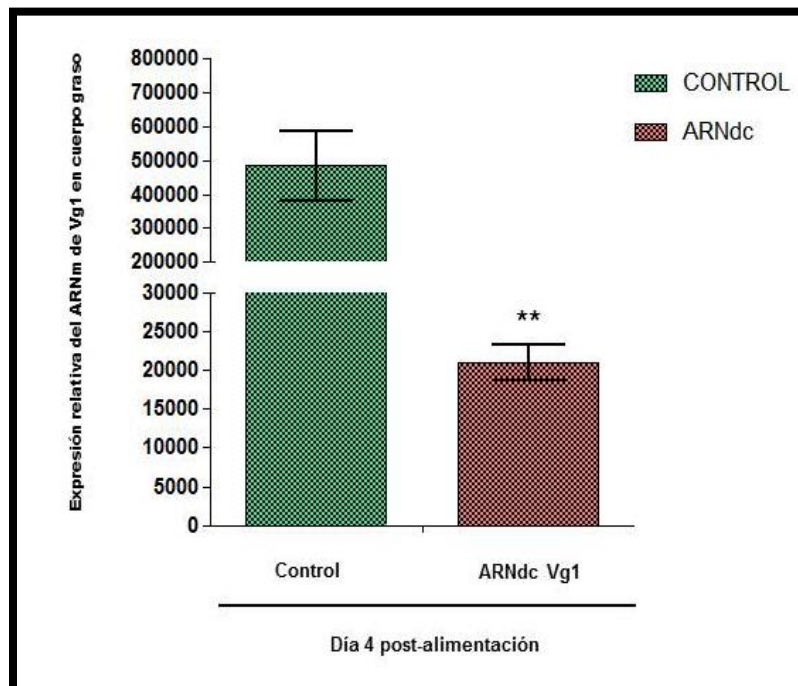
Con el propósito de silenciar los genes Vg en hembras adultas de *T. infestans* se utilizó la técnica de interferencia por ARN empleando ARN de doble cadena (ARN<sub>dc</sub>) (Hannon, 2002). Un fragmento de 650 pb del gen Vg1 y otro de 500 pb correspondiente al gen Vg2 se amplificaron utilizando primers específicos

y ADNc obtenido a partir de cuerpo graso. Los productos de PCR se usaron como molde para la síntesis de ARN bicatenario utilizando el Sistema RiboMax T7 de Promega. Cinco  $\mu\text{l}$  de ARN bicatenario purificado correspondiente a cada gen se inyectó en forma independiente entre el quinto y sexto esternito del abdomen de hembras adultas de *T. infestans* utilizando una jeringa Hamilton. Un grupo control se inyectó con 5  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas. A continuación las hembras de los tres grupos experimentales fueron alimentadas y se extrajo cuerpo graso y tejido ovárico los días 4 y 5 después de la alimentación, respectivamente. A partir de estos tejidos se evaluaron, mediante PCR en tiempo real, los efectos de la inyección con el ARNdc en la expresión de los genes de Vg (Vg1 y Vg2). El análisis comparativo entre el grupo control y los grupos tratados con ARNdc mostró que la expresión de los genes Vg1 y Vg2 se redujo significativamente ( $P < 0,001$ ) en cuerpo graso (Figura 23 A, B) y en ovarios (Figura 23 C, D) después de la inyección con ARN<sub>i</sub>. Mientras que no se observaron diferencias significativas en la expresión relativa de Vg1 y Vg2 en las hembras inyectadas con agua libre de nucleasas en comparación con aquellas, que en las mismas condiciones de alimentación, no fueron inyectadas.

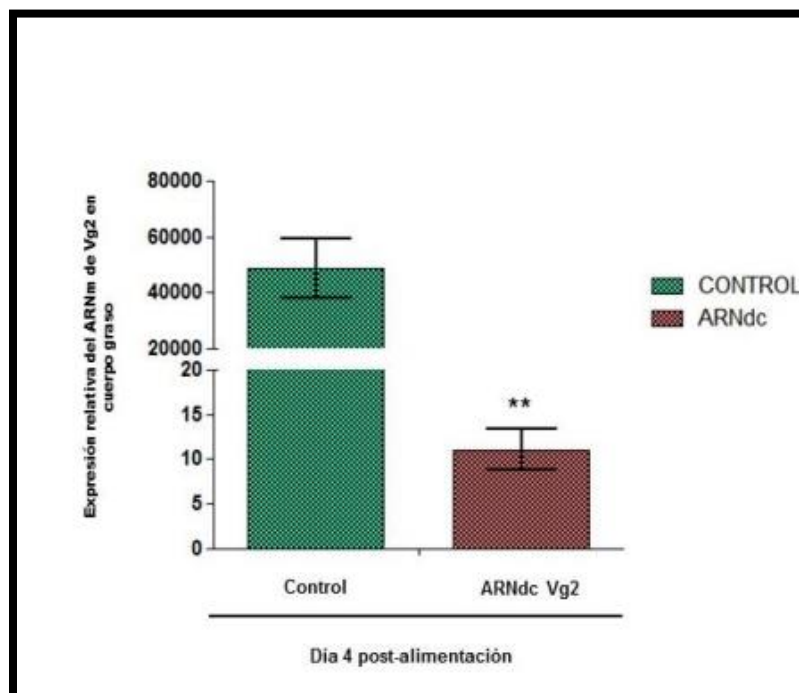
Por otra parte, se realizó un seguimiento durante el período vitelogénico de las hembras inyectadas con ARNdc y con agua libre de nucleasas que no se utilizaron para validar los efectos de silenciamiento mediante la técnica qPCR. En correlación con los datos mostrados en la Figura 23, el análisis preliminar del fenotipo de falta de función de Vg reveló ausencia de oviposición de las hembras tratadas con ARNdc de ambos genes con respecto al grupo control.

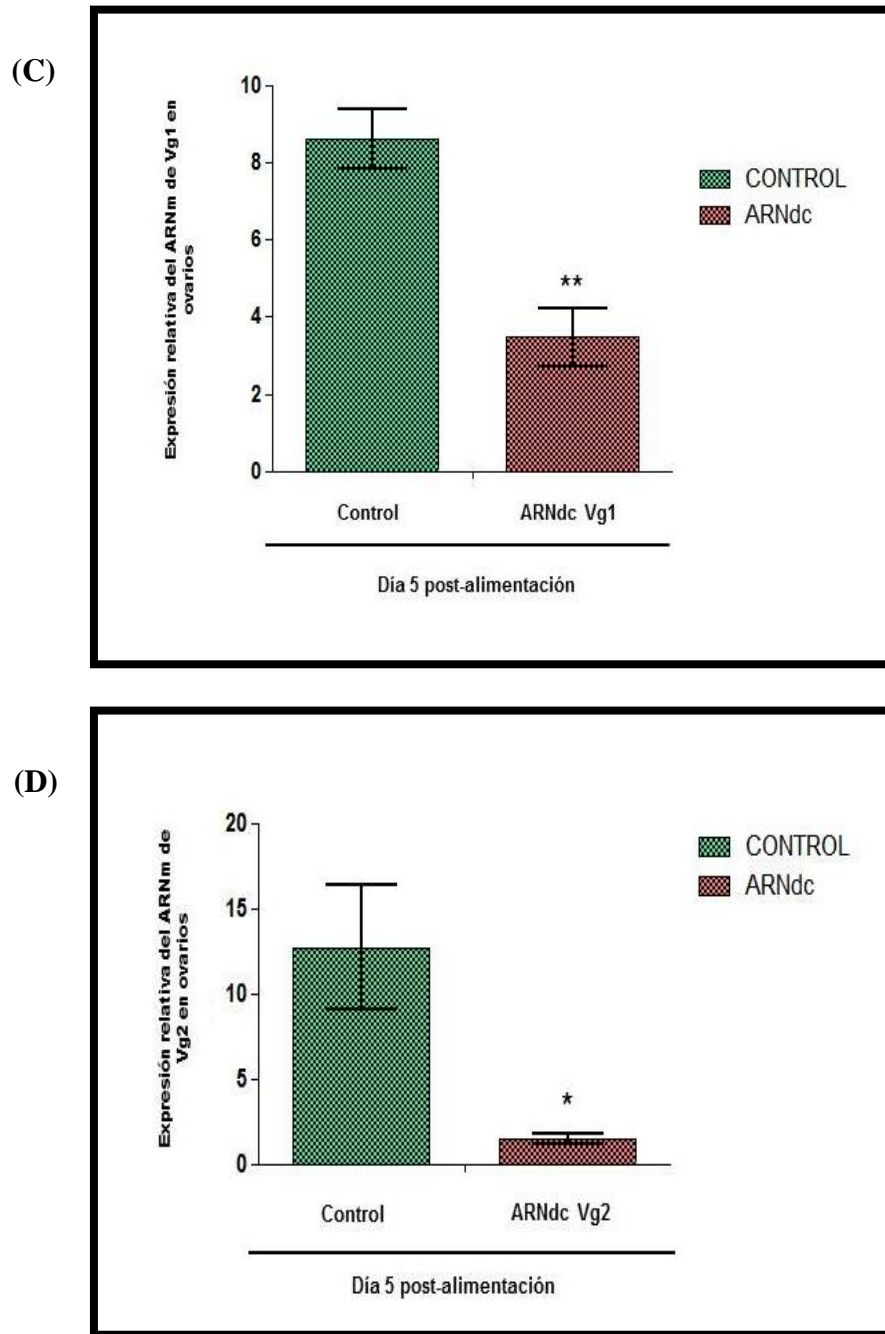


(A)



(B)





**Figura 23:** Efectos del silenciamiento con  $ARN_i$  en la expresión de los genes Vg 1 y Vg2 en cuerpo graso (A, B) y ovarios (C, D) de hembras adultas de *Triatoma infestans*. En todos los casos se observó un descenso significativo de la expresión en los grupos inyectados con ARNdc con respecto a los inyectados con agua (controles). Cada experimento se replicó en forma independiente y consistió de un pool de 3 hembras adultas. Los asteriscos indican diferencia

## Resultados

---

*estadística significativa: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .*

## 5. DISCUSIÓN

Los insectos hematófagos, tales como *Triatoma infestans*, ingieren grandes cantidades de sangre en una sola comida, que por lo general corresponde varias veces su peso corporal (Canavoso y col., 2004; Atella y col., 2005). Se ha descrito en estos insectos la importancia de una comida de sangre para el inicio del proceso de vitelogénesis, ya que en cada ciclo gonadotrófico una adecuada cantidad y calidad de nutrientes promueve en cuerpo graso la síntesis de proteínas precursoras del vitelo (PPVs), siendo la vitelogenina (Vg) una fosfolipoglicoproteína precursora de la vitelina (Vt), principal componente del vitelo y fundamental para el desarrollo del embrión. Actualmente se acepta que la ovogénesis es controlada por hormonas que son liberadas en respuesta a la distensión abdominal causada por una ingesta de sangre (Davey, 1987). Sin embargo, la dilatación abdominal por sí sola no es suficiente para inducir ovogénesis sino que depende de la presencia de proteínas en la dieta (Hack, 1955; García y Azambuja, 1985; Atella y col., 2005).

Con el propósito de estudiar el proceso de vitelogénesis en *T. infestans*, en una primera instancia se identificaron dos genes Vg (Vg1 y Vg2) (Blariza y col., 2014). Se han descrito múltiples genes Vg en diversas especies de insectos, que incluyen a *Locusta migratoria*, *Leucophaea maderae*, *Riptortus clavatus*, *Plautia stali*, *Periplaneta americana* y *Aedes aegypti*. Sin embargo, el rol que cumplen los diferentes genes Vg detectados en insectos es aún incierto (Tufail y col., 2014).

La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida del ADNc del gen *Vg2* de *T. infestans* con otras 18 secuencias de *Vg* correspondientes a 14 especies de insectos, confirmó la existencia de regiones altamente conservadas como el motivo GL/ICG, las regiones poliserinas y el motivo DGXR (Tufail y col., 2005; Tufail y Takeda, 2008, 2009, 2014). Se propuso que los residuos DG del motivo DGXR conjuntamente con el motivo GL/ICG y residuos de cisteínas en posiciones conservadas podrían formar una estructura necesaria para la adecuada función de la *Vt* durante la embriogénesis (Tufail y col., 2001). Sin embargo, la función específica de otros aminoácidos altamente conservados en la región C-terminal de la mayoría de las *Vgs*, también presentes en *T. infestans*, como por ejemplo los aminoácidos ácidos aspártico (D) y glutámico (E) y los aminoácidos hidrofóbico prolina (P) e hidrofílico tirosina (Y), todavía permanece incierta. Por otra parte, se ha propuesto que las regiones de poliserina pueden servir como sitios de fosforilación, dando origen a una elevada concentración de cargas negativas (Goulas y col., 1996) que podría promover la solubilidad de la *Vg* (Gerber-Huber y col., 1987). Miller y col. (1982) y Dhadialla y col. (1992) informaron que la defosforilación de *Vg* reduce su captación por el ovocito, sugiriendo que los residuos fosforilados podrían contribuir a la interacción entre *Vg* y su receptor en la superficie del ovocito.

El análisis de la expresión de los genes *Vg* a nivel de ARNm en ambos sexos, diferentes tejidos y dos etapas de desarrollo reveló la presencia de transcritos de *Vg* sólo en hembras adultas (Blariza y col., 2014). Los genes *Vg1* y *Vg2* se expresaron en cuerpo graso y tejido ovárico y, en mucha menor medida, se observó expresión de *Vg2* en la cabeza y el músculo (Figura 17). En general en

insectos, se ha observado que el cuerpo graso de hembras es el sitio de biosíntesis de Vg (Engelmann, 1983; Giorgi y Nordin, 2005; Tufail y Takeda, 2008). Sin embargo, en concordancia con nuestros resultados, algunos estudios han indicado que el cuerpo graso no es el único tejido vitelogénico y que en el epitelio folicular de ovarios de algunas especies se produce una síntesis complementaria de Vg (Melo y col., 2000; Giorgi y col., 2005; Belles, 1998, 2005). El cuerpo graso es un órgano multilobulado que se distribuye principalmente en el abdomen y en menor medida en tórax y cabeza (Raikhel y col., 2005). Es probable que los niveles ínfimos de expresión del gen Vg2 detectados en cabeza y músculo se puedan atribuir a la expansión del cuerpo graso sobre dichos tejidos.

Por otra parte, se investigó la expresión de los genes Vg a nivel de transcripción en ambos sexos de ejemplares adultos de *T. infestans* en diferentes días después de la muda (post-ecdisis, período sin alimentar) y de una ingesta de sangre (post-alimentación). Además, para determinar el inicio de la expresión de la Vg en *T. infestans*, se analizaron hembras de estadio ninfal V en un rango de 5 a 15 días después de una segunda alimentación de la sangre. De acuerdo con nuestros resultados preliminares (Blariza y col., 2014), obtenidos a partir de determinaciones de expresión realizadas en ninfas de quinto estadio y machos adultos el día 5 pos-alimentación, no se observó expresión de Vg1 y Vg2 en cuerpo graso de hembras de estadio ninfal V o de machos adultos. Contrariamente a estos resultados, se ha detectado Vg en machos de algunas especies de insectos (Engelmann, 1979; Trenczek y Engels, 1986; Valle, 1993; Piulachs y col., 2003), incluyendo el hemíptero *Rhodnius prolixus*, y se ha observado también Vg en hembras de quinto estadio ninfal de esta especie (Valle y col., 1993). Como se

demonstró, los genes Vg se expresaron a nivel de ARNm en cuerpo graso y ovarios de hembras adultas de *T. infestans* (Blariza y col., 2014). Sin embargo, se observaron diferentes patrones de expresión en ambos tejidos (Figuras 18 y 19).

Los primeros niveles de ARNm de Vg en *T. infestans* se detectaron después de la emergencia al estadio adulto (post-ecdisis) y la proteína también estuvo presente durante este período sin alimentación. Aunque en varios órdenes de magnitud inferior que en las hembras adultas alimentadas con sangre, el hecho de que los genes Vg1 y Vg2 se expresan en el cuerpo graso de hembras adultas sin alimentar (período pre-vitelogénico), sugiere que los genes Vg pueden ser expresados constitutivamente en esta etapa. Las Vgs de insectos también han sido implicadas en el transporte de azúcares, lípidos, fosfatos, vitaminas y hormonas (Chen y col., 1997; Sappington y Raikhel, 1998). Es posible que la presencia de Vg durante la fase previtelogénica esté relacionada con algunas de estas funciones. Por otra parte, los insectos hematófagos como los vectores de la enfermedad de Chagas, requieren grandes ingestas de sangre para activar los genes que participan en la digestión de la sangre, la síntesis de PPVs y en última instancia, la producción de huevos (Raikhel, 2005). Aunque en *T. infestans* se observó autogenia, definida como la capacidad de una hembra adulta de poner huevos sin haber ingerido ninguna comida de sangre en esta etapa (Noriega y col., 1992), bajo nuestras condiciones de crianza de las colonias de laboratorio las hembras fueron anautógenas. En este contexto, es probable que aunque insuficiente para promover la vitelogénesis y la producción de huevos, el remanente de sangre ingerida por las hembras anautógenas durante el último estadio ninfal sea suficiente para la síntesis de pequeños niveles de Vg durante la

pre-vitelogénesis.

Los niveles de ARNm de Vg1 y Vg2 en el cuerpo graso de hembras adultas aumentaron considerablemente después de la ingesta de sangre y se mantuvieron elevados 24 días después de la alimentación (Figura 18). En forma coincidente con el patrón de transcripción, la señal de Vg detectada por inmunoreacción en el cuerpo graso de hembras adultas aumentó después de la alimentación, permaneciendo elevada durante el período vitelogénico (Figura 20). De acuerdo con otros estudios, que han demostrado que el cuerpo graso de las hembras es el principal sitio de la biosíntesis de Vg en los insectos (Tufail y Takeda, 2008), los niveles de transcripción de Vg fueron elevados en el cuerpo graso de hembras adultas de *T. infestans*. Como era de esperar, después de la alimentación (período vitelogénico), la sangre fue utilizada para promover la síntesis de Vg en cuerpo graso. En concordancia con nuestros resultados, Aguirre y col. (2008) detectaron mediante ensayos de Western Blot una mínima expresión de la proteína Vg en el cuerpo graso de otro triatomino, *Dipetalogaster maxima*, durante el período sin alimentación; sin embargo, la expresión de Vg en el cuerpo graso y sus niveles en la hemolinfa aumentaron significativamente después de la ingesta de sangre. Como se ha demostrado en otras especies de hemípteros, como *R. prolixus* (Coles, 1965; Wang y Davey, 1993) y *Triatoma protracta* (Mundall y Engelmann, 1977), lo más probable es que este proceso esté controlado por la hormona juvenil (HJ) secretada por la glándula neuroendócrina localizada en el complejo retrocerebral, denominada corpora allata.

Vg es la proteína precursora del vitelo que ofrece reservas de energía en los invertebrados y vertebrados ovíparos. En los insectos hembra, el cuerpo graso



produce precursores del vitelo tales como Vgs, que se secretan en la hemolinfa y luego son captadas por ovocitos competentes a través de endocitosis mediada por receptor (Snigirevskaya y Raikhel, 2005; Tufail y Takeda, 2009). En los ovocitos, la Vg se almacena en los gránulos de vitelo como Vt. Durante este proceso, las Vgs se modifican por glicosilación, lipidación, fosforilación y clivaje proteolítico (Dhadialla y Raikhel, 1990). Además de la acumulación de Vg sintetizada por el cuerpo graso, los ovarios también sintetizan proteínas que se requieren para el desarrollo embrionario (Melo y col., 2000; Giorgi y col., 2005; Belles, 1998, 2005). Aunque se han descrito diferencias en el contenido lipídico y en el grado de fosforilación de Vg y Vt, en la mayoría de los insectos se ha observado que estas proteínas comparten propiedades inmunogénicas y características físico-químicas (Salerno y col., 2002; Raikhel y Dhadialla, 1992). En este sentido, un estudio en el que se utilizó un anticuerpo policlonal anti-Vt obtenido a partir de *D. máxima*, reveló que Vg y Vt poseen propiedades inmunogénicas similares (Aguirre y col., 2008). Se demostró que los anticuerpos generados contra las subunidades mayores de Vt de *D. maxima* también reconocen inmunológicamente Vgs de cuerpo graso y de la hemolinfa en las hembras de esa especie. Por otra parte, ensayos preliminares demostraron que el anticuerpo policlonal dirigido contra las principales subunidades de Vt de *D. maxima* (Aguirre y col., 2008), reconoce en los homogenatos de *T. infestans* una banda de peso molecular compatible con Vg/Vt, motivo por el cual se lo utilizó en el presente trabajo. Los ensayos de Western Blot realizados a partir de ovarios de *T. infestans*, revelaron un notable y progresivo incremento de Vt después de la ingesta de sangre (Figura 21). Sin embargo, es importante señalar que este método no permite distinguir

entre las Vts originadas a partir del cuerpo graso o del tejido ovárico.

Los elevados niveles de Vg detectados en el cuerpo graso después de la alimentación (Figura 20) fueron consistentes con las cantidades crecientes de Vt observadas en el tejido ovárico (Figuras 21 y 22). En estudios realizados en los triatomíneos *R. prolixus* (Oliveira y col., 1986), *Panstrongylus megistus* (Frutero y col., 2011) y *D. maxima* (Aguirre y col., 2011), se observaron niveles notables de Vg captada por endocitosis en los folículos vitelogénicos. En *T. infestans*, se observó, mediante ensayos de inmunofluorescencia, que los folículos ováricos terminales de hembras vitelogénicas almacenarían grandes cantidades de Vt (Figura 22), probablemente originada a partir de Vg captada por endocitosis. Sin embargo, como ya se ha mencionado, la detección de transcritos de Vg en los ovarios de *T. infestans* (Figura 19) concuerda con observaciones realizadas en otros insectos, en los que se ha demostrado que el epitelio folicular también está involucrado en la síntesis de proteínas del vitelo (Giorgi y col., 2005; Belles, 1998, 2005). A igual que en otros insectos, en *R. prolixus* el cuerpo graso es la principal fuente de Vg (Valle et al., 1993). Sin embargo, se ha demostrado en esta especie que las células del folículo del ovario también sintetizan Vg, especialmente después de que ha cesado la absorción de Vg proveniente de la hemolinfa (Melo et al., 2000). Además, Aguirre y col. (2008) observaron en *D. maxima* una inmunorreacción positiva con el anticuerpo anti-Vt en un reducido número de células epiteliales foliculares que rodean a los ovocitos más grandes, lo que sugiere que al menos algunas células foliculares podrían sintetizar Vg. Como se ha observado en todos los triatomíneos, *T. infestans* (Stoka y col., 1987), *R. prolixus* (Pratt y Davey, 1972) y *D. maxima* (Aguirre y col., 2008) tienen

ovariolas con desarrollo asincrónico, motivo por el cual contienen ovocitos con diferentes grados de la maduración. En *R. prolixus* la síntesis de Vg de ovario alcanza su pico durante la fase tardía del desarrollo de los ovocitos, justo antes de la formación del corion (Melo y col., 2000). Es probable que los folículos vitelogénicos tardíos de *T. infestans* estén implicados en la síntesis de Vg, lo que explicaría el aumento de los niveles de ARNm de Vg observados a partir del día 10 después de la alimentación (Figura 19), en coincidencia con el inicio de la formación de los huevos en los ovarios de esta especie.

La participación de diferentes órganos en la síntesis de Vg sugiere un rol diferente para estas Vgs que contribuyen al crecimiento de los ovocitos. Por otra parte, la inducción de la expresión de los genes Vg1 y Vg2 en cuerpo graso dependiente de la alimentación, indicaría una participación directa en la formación de los huevos. Los diferentes patrones de expresión de los genes Vg1 y Vg2 a nivel de ARNm observados en el cuerpo graso y el ovario durante la fase vitelogénica, sugieren la existencia de diferentes factores reguladores que podrían estar involucrados en la expresión de esos genes en el cuerpo graso y el tejido ovárico de *T. infestans*. Como se infirió en un estudio realizado en *Drosophila melanogaster* (Bownes, 1989), es probable que los diferentes perfiles de expresión de ambos genes en el cuerpo graso y el ovario podrían ser causados por diferente sensibilidad de estos tejidos a las hormonas del desarrollo.

Un método reciente que permite interrumpir la función de genes específicos es el que utiliza ARN de interferencia (ARN<sub>i</sub>). El ARN<sub>i</sub> inhibe la acumulación de los transcritos de un gen en particular (Fire y col., 1998). Se ha convertido en una herramienta poderosa para el silenciamiento de genes en un

amplio rango de organismos, tales como *Drosophila*, *Tribolium*, *Caenorhabditis elegans*, ratones (Hutvagner y Zamore, 2002; Hannon, 2002), abejas (Beye y col., 2002) y en insectos hemípteros (Huges y Kaufman, 2000). La técnica de interferencia por ARN se caracteriza por su simplicidad y por ser aplicable tanto en vitro como en vivo (Fjose y col., 2001). Por otra parte, si bien han surgido varios métodos para evaluar la función específica de los genes, se ha destacado el uso de ARN de doble cadena (ARNdc) como una de las metodologías más prometedora en la interferencia por ARN (Hannon, 2002).

En un trabajo con abejas adultas, Amdam y col. (2003) observaron una elevada eficacia de la técnica de inyección intra-abdominal con ARNdc para inhibir la expresión del gen Vg. Sólo el 15% de las abejas adultas criadas a partir de huevos inyectados con ARNdc redujo los niveles de ARNm de Vg y se observó que la interrupción parecía ser incompleta en algunos individuos; mientras que el grupo con inyección intra-abdominal mostró una reducción del 96% de los transcritos de Vg. Por otra parte, al igual que lo observado en el nemátodo *C. elegans* (Hunter, 1999), en el triatomino *R. prolixus* se determinó que la inyección de ARNdc es más eficaz que su ingestión en la inducción de interferencia por ARN (Araujo y col., 2006). Se ha propuesto que este efecto podría deberse a la estructura y la disposición del cuerpo graso (Amdam y col., 2003), debido a que este tejido se encuentra altamente expuesto en el abdomen del insecto cuando se inyecta ARNdc.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo muestran que el tratamiento por inyección intra-abdominal de ARNdc en hembras adultas de *T. infestans* logró reducir significativamente los niveles de expresión del ARNm de Vg1 y Vg2 en

cuerpo graso y ovarios. El análisis del fenotipo producido por la falta de función de Vg, se correlacionó con los datos mostrados en la Figura 23 e indicó haber inhibido la oviposición en las hembras de *T. infestans* tratadas en comparación con aquellas inyectadas con agua libre de nucleasas (grupo control). Sin embargo, estos ensayos funcionales son preliminares y deben profundizarse con un número superior de hembras destinadas a un bioensayo de oviposición.

Wang y col. (2013) demostraron en sus estudios en *Helicoverpa armigera* que el silenciamiento del gen que codifica para 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa reduce los niveles de ARNm de Vg, influye en la fecundidad y reduce la oviposición. Estos autores consideraron que la técnica de interferencia por ARN sería una promesa contra esta plaga y otros insectos plagas similares, mediante la liberación de hembras molecularmente esterilizadas por el silenciamiento de ese gen. La aplicación de esta técnica en el estudio de la función de genes como los involucrados en la reproducción aportaría nuevas bases para el diseño de estrategias alternativas de control del vector de la enfermedad de Chagas *T. infestans*, fundamentalmente en áreas en las que el insecto vector manifiesta resistencia al tratamiento con insecticidas.

## 6. CONCLUSIONES GENERALES

- La expresión de los genes Vg1 y Vg2 en el cuerpo graso de hembras adultas anautógenas sin alimentar (período pre-vitelogénico), sugiere que los genes Vg pueden ser expresados constitutivamente en esta etapa.
- El remanente de sangre ingerida por las hembras anautógenas durante el último estadio ninfal, aunque insuficiente para promover la vitelogénesis y la producción de huevos, sería suficiente para la síntesis de pequeños niveles de Vg durante la pre-vitelogénesis.
- La presencia de Vg durante la fase pre-vitelogénica estaría relacionada con otras funciones descritas para Vg como el transporte de azúcares, lípidos, fosfatos, vitaminas y hormonas.
- En cuerpo graso, se confirmó que el aumento de los niveles de ARNm de Vg1 y Vg2 observado después de la alimentación se correlaciona con el incremento de la proteína Vg.
- Los niveles de expresión de los genes Vg en el cuerpo graso de hembras adultas de *T. infestans* indican, al igual que lo observado en otros insectos, que el cuerpo graso de las hembras es el principal sitio de la biosíntesis de Vg.

## Conclusiones

---

- Las cantidades crecientes de Vt observadas en el tejido ovárico durante el período vitelogénico se originarían a través de captación por endocitosis de Vgs sintetizadas por el cuerpo graso.
- El hallazgo de la señal de proteína Vg/Vt en los ovarios pre-vitelogénicos, principalmente en la región basal del epitelio folicular, sugiere que la Vg sintetizada se acumula en la región basal de ese epitelio para ser tomada por el ovocito durante la vitelogénesis. Además, la detección de transcritos de Vg en los ovarios de *T. infestans* también indica que el epitelio folicular está involucrado en la síntesis de proteínas del vitelo.
- En ovarios, el aumento de los niveles de ARNm de Vg observados a partir del día 10 después de la alimentación sugiere que en los folículos vitelogénicos tardíos se produciría la mayor síntesis de Vg detectada en este tejido.
- Los diferentes patrones de expresión de los genes Vg1 y Vg2 a nivel de ARNm observados en el cuerpo graso y el ovario durante la fase vitelogénica, sugieren la existencia de diferentes factores reguladores que podrían estar involucrados en la expresión de esos genes en el cuerpo graso y el tejido ovárico de *T. infestans*.
- La aplicación de la técnica de interferencia por ARN en el estudio de la función de genes involucrados en la reproducción aportaría nuevas bases para el diseño de estrategias alternativas de control del vector de Chagas *T. infestans*, fundamentalmente en áreas en las que el insecto vector manifiesta resistencia al

## Conclusiones

---

tratamiento con insecticidas.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abalos, J.W. y Wygodzinsky, P. (1951). Las Triatominae Argentinas (Reduviidae, Hemiptera). *An. Inst. Med. Reg.* **2**,1-179.
- Aguirre, S.A., frede S., Leyria, 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.
- 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.
- Amdam, G.V., Simoes, Z.L., Guidugli, K.R., Norberg, K., Omholt, S.W. (2003). Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnol.* **3**,1.
- Araujo, R., Santos, A., Pinto, F.S., Gontijo, N.F., Lehane, M.J., Pereira, M.H. (2006). RNA Interference of the Salivary Gland Nitrophenol 2 in the Triatomine Bug *Rhodnius Prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA Ingestion or Injection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **36**, 683–693.
- Atella, G.C., Gondim, K.C., Machado, E.A., Medeiros M.N., Silva-Nieto M.A.C. y Masuda H. (2005). Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *Ann. Bras. Acad. Cienc.* **77**, 405-430.

- Aufderheide, A.C., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., Arriaza, B., Renier, C., Wittmers, L. E. Jr., Fornaciari, G., Allison, M. (2004). A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 2034-2039.
- Bargues, M.D., Klisiowics D.R., Panzera F., Norieau F., Mancilla A., Perez R., Rojas M. G., O' Connor J.E., Gonzalez-Candelas F., Galvao C., Jurberg J., Carcavallo R.U., Dujardin J.P., Mas-coma S. (2006). Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size Infection. *Genet. Evol.* **6**, 46-62.
- Belles, X. (1998). Endocrine effectors in insect vitellogenesis, in: Coast, G.M., Webster, S.G. (Eds.), *Recent Advances in Arthropod Endocrinology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp.71-90.
- Belles, X. (2005). Vitellogenesis directed by juvenile hormone. En: Raikhel, A. S. (Ed.), *Reproductive Biology of Invertebrates*, vol. XII, Part B. Adiyodi, A. G., Adiyodi, R. G. (Ed.). Science Publishers Inc., pp. 157-197.
- Beye, M., Haertel, S., Hagen, A., Hasselmann, M. y Omholt S.W. (2002). Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif. *Insect Molec. Biol.* **11**,527-532.
- Blariza, M.J., Soria, N.W., Torres, A.G., Grosso, C.G., García, B.A. (2014). cDNA isolation and characterization of two vitellogenin genes in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *Gene* **543**, 118-124.

- Bownes, M. (1989). The roles of juvenile hormone, ecdysone and the ovary in the control of *Drosophila* vitellogenesis. *J. Insect Physiol.* **35**, 409-413.
- 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. XII, Part B. Adiyodi, A. G., Adiyodi, R. G. (Ed.). Science Publishers Inc., pp. 95-128.
- 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.
- Bulet, P. (1999). *Drosophila* antimicrobial peptides. *M S-Med. Sci.* **15**, 23-29.
- Canale, D.M y Carcavallo, R.U. (1985). *Triatoma infestans* (Klug, 1834). En: Carcavallo, R. U, Rabinovich, J. E. y Tonn R. J. (Eds.), *Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas*, Vol. XVIII, Part I. Servicio Nacional de Chagas Ministerio de Salud y Acción social, Córdoba, Argentina. pp. 237-250.
- 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. Molec. Biol.* **34**, 845-854.
- Cerisola, J.A., Romwedder R.R., Segura E.L., Del Prad C.E., Alvarez M., Wynne Martini G.S., (1974). *El xenodiagnostico*, Ministerio de Bienestar Social, Secretaria de Estado de Salud Pública, Buenos Aires. pp. 127.
- Chen, J.S., Sappington, T.W., Raikhel, A.S. (1997). Extensive sequence conservation among insect, nematode, and vertebrate vitellogenins reveals common ancestry. *J. Mol. Evol.* **44**, 440-451.

- Clayton, J. (2010). Chagas disease 101. *Nature* **465**, S4—S5.
- Coles, G.C. (1965). Haemolymph proteins and yolk formation in *Rhodnius prolixus* Stål. *J. Exp. Biol.* **43**, 425-431.
- Coura, J.R., Viñas P.A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* **465**, S6-S7.
- Dhadialla, T.S., Raikhel, A.S. (1990). Biosynthesis of mosquito vitellogenin. *J. Biol. Chem.* **265**, 9924-9933.
- Dhadialla, T.S., Hays, A.R., Raikhel, A.S. (1992). Characterization of the solubilized mosquito vitellogenin receptor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **22**, 803-816.
- Davey, K.G., Huebner, E. (1974). The response of the follicle cells of *Rhodnius prolixus* to juvenile hormone and antigonadotropin in vitro. *Can. J. Zool.* **52**, 1407-1412.
- Davey, K.G. (1987). Inputs to the hormonal control of egg development in *R. prolixus*. En: Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *Ann. Bras. Acad. Cienc.* **77**, 405-430.
- Davey, K.G. (1996). Hormonal control of the follicular epithelium during vitellogenin uptake. *Invert. Reprod. Develop.* **30**, 249-254.
- Davey K.G. (2000). The modes of action of juvenile hormones: some questions we ought to ask. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 663-9.
- Davey, K.G. (2007). The interaction of feeding and mating in the hormonal control of egg production in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* **53**, 208-215.

- Dias, E. (1956). Observação sobre eliminação de dejeções e tempo de sucção em alguns triatomíneos sulamericanos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **54**, 115-124.
- Dias, J.C.P. (1987). "Epidemiology of Chagas' disease in Brazil", pp. 57-84. In: Z. Brener and A. M. Stoka [eds.], Chagas' disease vectors. CRC, Boca Raton, FL.
- Engelmann, F. (1979). Insect vitellogenin: identification, biosynthesis, and the role in vitellogenesis. *Adv. Insect Physiol.* **14**, 49-108.
- Engelmann, F. (1983). Vitellogenesis controlled by juvenile hormone. En: Downer, D. G. H., Laufer, H. (Ed.). *Endocrinology of Insects*. New York: Alan R. Liss. pp. 259-270.
- Espinola, N.H. (1966). Note on sex differences in immature forms of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Rev. Bras.* **26**, 263-267.
- Fialho, E., Nakamura, A., Juliano, L., Masuda, H., Silva-Neto, M. A. (2002). Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.* **436**, 246-253.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811
- Fjose, A., Ellingsen, S., Wargelius, A., Seo, H.C. (2001). RNA interference: mechanisms and applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* **7**, 31-57.
- 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**, 475-486.
- García, E.S. y Azambuja P. (1985). A protein diet initiates oogenesis in *R. prolixus*. En: Oogénesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *Ann. Bras. Acad. Cienc.* **77**, 405-430.
- Gerber-Huber, S., Nardelli, D., Haefliger, J.A., Cooper, D.N., Givel, F., Germond, J.E., Engel, J., Green, N.M., Wahli, W. (1987). Precursor-product relationship between vitellogenin and the yolk proteins as derived from the complete sequence of a *Xenopus* vitellogenin gene. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4737-4760.
- 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.
- Giorgi, F. y Nordin, J.H. (2005). Biochemical and ultrastructural aspects of vitellin utilization during embryogenesis. En: Raikhel, A. S. (Ed.), Reproductive Biology of Invertebrates, vol. XII, Part B. Adiyodi, A. G., Adiyodi, R. G. (Ed.). Science Publishers Inc., pp. 355-391.
- Goula, A., Triplett, E.L., Tabrosky, G. (1996). Oligophosphopeptides of varied structural complexity derived from the egg phosphoprotein, phosvitin. *J. Protein Chem.* **15**, 1-9.
- Hack, W.H. (1955). Estudios sobre la biología del *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (HEM., REDUVIIDAE). *An. Inst. Med. Regional.* **4**, 125-147.
- Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature* **418**, 244-251.

- Havukainen, H., Underhaug J., Wolschin F., Adam G., Halskau O (2012). A vitellogenin polyserine cleavage site: highly disordered conformation protected from proteolysis by phosphorylation. *J. Exp. Biol.* **215**, 1837-1846.
- Hughes, A.L. (2010). Evolutionary conservation of amino acid composition in paralogous insect vitellogenins. *Gene.* **467**, 35-40.
- Hughes, C.L. y Kaufman T.C. (2000). RNAi analysis of deformed, proboscipedia and sex combs reduced in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*: novel roles for Hox genes in the hemipteran head. *Development* **127**, 3683–3694.
- Hunter, C.P. (1999). Genetics: a touch of elegance with RNAi. *Curr. Biol.* **9**, R440–R442.
- Hutvágner, G. y Zamore, P.D. (2002). RNAi: nature abhors a doublestrand. *Cur. Opin. Genet. Dev.* **12**, 225-232
- Huvenne, H. y Smagghe, G. (2010) Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *J. Insect Physiol.* **56**, 227–235.
- Klowden, M.J. (1997). Endocrine aspects of mosquito reproduction. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **35**, 491-512.
- Laranja, F.S., Dias, E., Nóbrega, G., Miranda A. (1956). “Chagas disease: a clinical, epidemiologic and pathologic study”. *Circulation.* **14**, 1035-1060.

- Lee, J.M., Hatakeyama, M., Oishi, K. (2000). A simple and rapid method for cloning insect vitellogenin cDNAs. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 189-194.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods.* **25**, 402-408.
- 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.
- Masuda, H., Braz, G.R.C., Paiva-Silva, G.O., Silva-Neto, M.A.C., Oliveira, P.L. (2005). Non-vitellin yolk proteins. En: Raikhel, A. S. (Ed.), *Reproductive Biology of Invertebrates*, vol. XII, Part B. Adiyodi, A .G., Adiyodi, R. G. (Ed.). Science Publishers Inc., pp. 289-314.
- Miller, M.S., Benore, P.M., White, H.B. (1982). Dephosphorilation of chicken riboflavin-binding protein and phosphovitin decreases their uptake by oocytes. *J. Biol. Chem.* **257**, 6818-6824.
- Melo, A.C.A., Valle, D., Machado, E.A., Salerno, A.P., Paiva-Silva, G.O., Cunha, E., Silva, N.L., de Souza, W. and Masuda, H. (2000). Síntesis of vitellogenin by the follicle cells of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 549-557.
- Mundall, E. y Engelmann F. (1977). Endocrine control of Vg synthesis and vitellogenesis in *Triatoma protracta*. En: *Oogénesis and egg development in triatomines: a biochemical approach.* *Ann. Bras. Acad. Cienc.* **77**, 405-



430.

- Muñoz, P.,E. Thiermann, M. Atías, C. Acevedo Schwartzmann. 1992. “Enfermedad de Chagas congénita sintomática en recién nacidos y lactantes”. *Rev. Chil. Pediatría*. **65**, 196-202.
- 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.
- Nose, Y., Lee, J. M., Ueno, T., Hatakeyama, M., Oishi, K. (1997). Cloning of cDNA for vitellogenin of the parasitoid wasp, *Pimpla nipponica* (Hymenoptera: Apocrita: Ichneumonidae): vitellogenin primary structure and evolutionary considerations. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**, 1047-1056.
- Oliveira, P.L., Gondim, K.C., Guedes, D.M., Masuda, H. (1986). Uptake of yolk protein in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* **32**, 859-866.
- Oliveira, D.M.P., Ramos, I.B., Reis, F.C.G., Lima, A., Machado, E.A. (2008). Interplay between acid phosphatase and cystein proteases in mediating vitellin degradation during early embryogenesis of *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.* **54**, 883-891.
- OMS. Comité de Expertos de la OMS en Control de la Enfermedad de Chagas. 2002. “Control de la Enfermedad de Chagas: Segundo Informe del Comité de Expertos de la OMS”. Ginebra.
- Picollo, M.I. (1994). “Métodos de detección y monitoreo de resistencia en Triatominos”. *Acta Tox. Arg.* **2**, 56-58.

- Picollo, M.I.; Vassena, C.; Santo Orihuela, P.; Barrios, S.; Zaidemberg, M.; Zerba, E. (2005). High resistance to pyrethroid insecticides associated to the ineffectiveness of field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from the north of Argentina. *J. Med. Entomol.* **42**, 637-642.
- Piulachs, M.D., Guidugli, K.R., Barchuk, A.R., Cruz, J., Simoes, Z.L.P., Belles, X., (2003). The vitellogenin of the honey bee *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**, 49-465.
- Pratt, G.E. y Davey, K.G. (1972). The corpus allatum and oogenesis in *Rhodnius prolixus* (Stal). I. The effect of allactectomy. *J Exp. Biol.* **56**, 201-214.
- Raikhel, A.S., Kokoza V.A., Zhu J., Martin D., Wang S., Li C., Sun G., Ahmed A., Dittmer N. y Attardo G. (2002). Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 1275-1286.
- Raikhel, A.S. (2005). Vitellogenesis of disease vectors , from physiology to genes. En: Marquardt, W. C. (Ed.), *Biology of Disease Vectors*. Elsevier Academic Press, London, UK, pp.329-346.
- Raikhel, A.S. y Dhadialla, T.S. (1992). Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu. Rev. Entomol.* **37**, 217-251.
- Raikhel, A.S., Brown, M.R. and Belles, X. (2005) Hormonal control of reproductive process. En: Gilbert, L.I, Iatrou, K. and Gill, S.S. (Eds), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Elsevier Ltd., Oxford., pp. 433-491.

- Rassi, A., Jr. Rassi, A., Marin-Neto, J.A. (2010). Chagas disease. *Lancet*. **375**, 1388-1402.
- Romans, P., Tu, Z., Ke, Z., Hagedorn, H. (1995). Analysis of a vitellogenin gene of the mosquito, *Aedes aegypti* and comparisons to vitellogenins from other organisms. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, 839-958.
- Rosenbaum, M.B. (1964). "Chagasic cardiomyopathy". *Prog. Cardiovasc. Dis.* **3**, 199-224.
- 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.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463-5467.
- Sappington, T.W. y Raikhel A.S. (1998). Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**, 277-300.
- Sappington, T., Oishi, K., Raikhel, A.S. (2002) Structural characteristics of insect vitellogenins. En: Raikhel, A.S. y Sappington, T.W. (Eds.), *Progress in Vitellogenesis*, Reproductive Biology of Invertebrates, vol. XII, Part A. Science Publishers, Inc., pp. 69-101.
- Schofield, C.J. (1985). Population dynamics and control of *Triatoma infestans*. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* **65**, 149-164.

- Schofield, C.J. (1988). Biosystematics of the Triatominae. En: Service, M. W. (Eds.) Biosystematic of Hematophagous Insects. Systematics Assoc. Special Vol. 37, Oxford. Clarendon Press. pp. 248-312.
- Shakesby, A.J., Wallace, I.S., Isaacs, H.V., Pritchard, J., Roberts, D.M. (2009). A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**, 1–10.
- Shu, Y., Zhou J., Tang W., Lu K., Zhou Q., Zhang G. (2009). Molecular characterization and expression pattern of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) vitellogenin, and its response to lead stress. *J.insect Physiol.* **55**, 608-616.
- Snigirevskaya, E.S. y Raikhel, A.S. (2005). Receptor-mediated endocytosis of yolk proteins in insect oocytes. En: Raikhel, A. S. (Ed.), Reproductive Biology of Invertebrates, vol. XII, Part B. Adiyodi, A. G., Adiyodi, R. G. (Ed.). Science Publishers Inc., pp. 198-227.
- Sosa Estani S., Segura, E.L., Ruiz, A.M., Velazquez, E., Porcel, B.M., Yampotis, C. (1998). “Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease”. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59**, 526-529.
- Stevens L., Dorn P. L., Schmidt J. O., Klotz J. H., Lucero D. y Klotz S. A. (2011). Kissing Bugs. The Vectors of Chagas. En: *Advances in Parasitology*, Academic Press, UK. pp. 169-186.
- Stoka, A. M., Salomón, O. D., Noriega, F. G. (1987). Physiology of Triatominae's reproduction. En: Brenner, R. R., Stoka, A. M. (Ed.), Chagas' Disease Vectors, vol. 2. CRC Press, Florida, pp. 109–129.

- 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. (Ed.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol. 1: Reproduction and Development, Elsevier, Pergamon, pp. 87-155.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.
- 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.* **76**, 4350–4354.
- Trenczek, T.A., Engels, W. (1986). Occurring of vitellogenin in drone honeybees. *Int. J. Invertebr. Reprod. Dev.* **10**, 307-311.
- Tufail, M., Raikhel, A.S., Takeda, M. (2005). Biosynthesis and processing of insect vitellogenins. En: Raikhel, A.S. y Sappington, T.W. (Eds.), *Progress in Vitellogenesis, Reproductive Biology of Invertebrates*, vol. XII, Part B. Science Publishers, Inc., Enfield, USA-Plymouth. pp. 1-32.
- Tufail, M. y Takeda M. (2008). Molecular characteristics of insect vitellogenins. *J. Insect Physiol.* **54**, 1447-1458.
- Tufail, M. y Takeda, M. (2009). Insect vitellogenin/lipophorin receptors: molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms. *J. Insect Physiol.* **55**, 87-103.

- Tufail, M, Nagaba, Y., Elgendy, A.M., Takeda, M. (2014). Regulation of vitellogenin genes in insects. *Entomol. Sci.* DOI:10.1111/ens.12086.
- Valle, D. (1993). Vitellogenesis in insects and other groups-a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **88**, 1-26.
- Valle, D., Kun, J., Linss, J., de Souza García, E., Goldenberg, S. (1993). cDNA Cloning and expression of *Rhodnius prolixus* vitellogenin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**, 457-465.
- Vassena, C., Picollo M. I., Zerba E. (1999). "Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuela *Rhodnius prolixus*". *Med. Vet. Entomol.* **14**, 51-55.
- Venugopal, K.J. y Kumar D. (2000). Role of juvenile hormone in the synthesis and sequestration of vitellogenins in the red cotton stainer, *Disdercus Koenigii* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Com. Biochem. Physiol. C.* **127**, 153-163.
- Viotti, R., Vigliano, C., Armenti, H., Segura. E. (1994). "Treatment of Chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow up". *Am. Heart J.* **127**, 151-162.
- Virchhoff, L.V. (2011). Epidemiology of American Trypanosomiasis (Chagas disease). En: *Advances in Parasitology*, Academic Press, UK. pp. 11-18.
- Wang, Z. y Davey, K.G. (1993). The role of juvenile hormone in vitellogenin production in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* **39**, 471-476.
- Wang Z., Dong Y., Desneux N., Niu C. (2013). RNAi Silencing of the HaHMG-CoA Reductase Gene Inhibits Oviposition in the *Helicoverpa armigera* Cotton Bollworm. *Ploss One* **8**, 1-9.

- Wigglesworth, V.B. (1936). The function of corpus allatum in the growth and reproduction of *R. prolixus* (Hemiptera). En: Oogénesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *Ann. Bras. Acad. Cienc.* **77**, 405-430.
- 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. XII, Part B. Adiyodi, A .G., Adiyodi, R. G. (Ed.). Science Publishers Inc., pp. 315-354.
- Zerba, E.N. (1999). “Past and Present of Chagas Vector Control and Future Needs”. Global Collaboration for Development of Pesticides for Public Health (GCDPP). World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES).