

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
Programa de Fisiología. Bienio 2000/01

**RECEPTORES NUCLEARES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN
ENDOCRINA EN *BLATTELLA GERMANICA* (L) (DICTYOPTERA,
BLATTELLIDAE). CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES BgEcR-A, BgHR3 y
BgFTZ-F1.**

**Memoria realizada para optar al grado de doctor en Ciencias Biológicas por Josefa
Cruz Rodríguez, Licenciada en Ciencias Biológicas.**

Trabajo realizado en el Departamento de Fisiología y Biodiversidad Molecular del Instituto de Biología Molecular de Barcelona (CSIC), bajo la co-dirección de los Drs. David Martín Casacuberta y Xavier Bellés Ros.

Dr. David Martín Casacuberta
Científico titular del CSIC

Dr. Xavier Bellés Ros
Profesor de Investigación del CSIC

Tutor

Dr. Miquel Riera Codina
Profesor Titular de Fisiología

Doctorando

Josefa Cruz Rodríguez

Barcelona, 2005

A mis padres y a Juan

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| I. PREFACIO..... | III |
| 1. INTRODUCCIÓN GENERAL..... | 1 |
| 1.1. El desarrollo de los insectos está controlado hormonalmente..... | 4 |
| 1.2. La 20-hidroxiecdisona actúa a través de una cascada génica. El modelo de Ashburner..... | 5 |
| 1.3. Los receptores nucleares. Estructura y mecanismo de acción. | 8 |
| 1.3.1. Estructura..... | 8 |
| 1.3.2. Mecanismo de acción..... | 10 |
| 1.4. Filogenia de los receptores nucleares de insectos..... | 12 |
| 1.5. La 20-hidroxiecdisona controla el eje funcional HR3 – FTZ-F1..... | 13 |
| 1.5.1. <i>Hr3</i> | 14 |
| 1.5.2. <i>ftz-fl</i> | 15 |
| 1.6. Conclusiones y objetivos..... | 16 |
| 2. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 19 |
| 2.1. Insectos..... | 21 |
| 2.2. Técnicas quirúrgicas..... | 21 |
| 2.2.1. Disección de los ovarios y del cuerpo graso..... | 21 |
| 2.2.2. Disección de las ootecas..... | 22 |
| 2.2.3. Obtención de la hemolinfa..... | 22 |
| 2.2.4. Disección de las glándulas protorácicas..... | 22 |
| 2.2.5. Preparación de la cutícula..... | 23 |
| 2.3. Células embrionarias UM-BGE-1 de <i>B. germanica</i> | 23 |
| 2.4. Extracción de ácidos ribonucleicos..... | 23 |
| 2.5. Clonaje de los cDNAs de BgHR3 y BgFTZ-F1..... | 23 |
| 2.5.1. PCR..... | 24 |
| 2.5.2. Amplificación rápida de los extremos 5' y 3' de los cDNAs.. | 25 |
| 2.5.3. Obtención de los cDNAs completos de los receptores nucleares..... | 26 |
| 2.6. Electroforesis de DNA..... | 27 |
| 2.7. Electroforesis de RNA..... | 27 |
| 2.8. Ligación de insertos en plásmidos..... | 28 |
| 2.9. Purificación de plásmidos..... | 28 |
| 2.10. Secuenciación de DNA..... | 28 |
| 2.11. Transcripción / traducción <i>in vitro</i> | 29 |
| 2.11.1. Trascrición / traducción <i>in vitro</i> y marcaje con S ³⁵ -Met..... | 29 |

| | |
|--|----|
| 2.11.2. Separación de las proteínas sintetizadas <i>in vitro</i> | 29 |
| 2.12. Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de acrilamida-bisacrilamida-sds..... | 30 |
| 2.13. RT-PCR semicuantitativa..... | 31 |
| 2.13.1. Tratamiento con DNAsa..... | 31 |
| 2.13.2. Retrotranscripción..... | 31 |
| 2.13.3. PCR..... | 32 |
| 2.14. Southern-blot..... | 34 |
| 2.14.1. Electroforesis y transferencia del DNA..... | 34 |
| 2.14.2. Hibridación y detección..... | 35 |
| 2.15. Northern-blot..... | 36 |
| 2.15.1. Electroforesis y transferencia del RNA..... | 36 |
| 2.15.2. Hibridación y detección..... | 36 |
| 2.16. Marcaje de sondas con fluoresceína..... | 36 |
| 2.17. Tratamientos en cuerpos grasos incubados <i>in vitro</i> | 37 |
| 2.18. RNA de interferencia <i>in vivo</i> | 37 |
| 2.18.1. Obtención del RNA de doble cadena (dsRNA)..... | 37 |
| 2.18.1.1. Clonaje del fragmento diana..... | 38 |
| 2.18.1.2. Linearización del DNA plasmídico..... | 39 |
| 2.18.1.3. Síntesis de dsRNA..... | 39 |
| 2.18.2. Preparación e inyección del dsRNA..... | 40 |
| 2.19. Marcaje con Lyso Tracker-red y dihidroclorido 4',6-diamidino- 2-fenilindol (DAPI)..... | 40 |
| 2.20. Tinción con DAPI y medición del ancho de rama de la glándula protorácica..... | 41 |
| 2.21. Cortes histológicos de la cutícula ventral..... | 42 |
| 2.22. Inmunocitoquímica de engrailed..... | 43 |
| 2.23. Observaciones microscópicas..... | 45 |
| 2.24. Cuantificación de ecdisteroides hemolinfáticos..... | 45 |

| | |
|--|----|
| 3. CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS cDNAs DE BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1..... | 47 |
| 3.1. Antecedentes..... | 49 |
| 3.2. Resultados..... | 49 |
| 3.2.1. Clonaje de tres cDNAs correspondientes a los homólogos de HR-3 en <i>B. germanica</i> | 49 |
| 3.2.2. Clonaje de dos cDNAs correspondientes a los homólogos de FTZ-F1 en <i>B. germanica</i> | 56 |
| 3.3. Discusión..... | 60 |
| 3.3.1. BgHR3..... | 60 |
| 3.3.2. BgFTZ-F1..... | 61 |
| 4. ANÁLISIS DEL DESARROLLO NINFAL DE <i>B. germanica</i> . PATRONES DE EXPRESIÓN Y REGULACIÓN HORMONAL DE BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1..... | 63 |
| 4.1. Antecedentes..... | 65 |
| 4.2. Resultados..... | 65 |
| 4.2.1. Niveles circulantes de ecdisteroides y de HJIII durante el desarrollo ninfal de <i>B. germanica</i> | 65 |
| 4.2.2. Patrones de expresión de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 durante el desarrollo ninfal de <i>B. germanica</i> | 67 |
| 4.2.3. Regulación hormonal <i>in vitro</i> de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1..... | 69 |
| 4.3. Discusión..... | 72 |
| 4.3.1 Niveles hemolinfáticos de ecdisteroides y de HJIII durante el desarrollo ninfal de <i>B. germanica</i> | 73 |
| 4.3.2 Análisis de BgEcR-A en el desarrollo ninfal de <i>B. germanica</i> . .. | 73 |
| 4.3.3 Análisis de BgHR3 en el desarrollo ninfal de <i>B. germanica</i> | 74 |
| 4.3.4 Análisis de BgFTZ-F1 en el desarrollo ninfal de <i>B. germanica</i> | 75 |

| | |
|--|-----|
| 5. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS FACTORES BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 DURANTE EL DESARROLLO NINFAL DE <i>B. germanica</i> MEDIANTE RNAi <i>in vivo</i> | 77 |
| 5.1. Antecedentes..... | 79 |
| 5.2. Resultados..... | 80 |
| 5.2.1. Puesta a punto de la técnica del RNAi en <i>B. germanica</i> | 80 |
| 5.2.2. El RNAi <i>in vivo</i> en ninfas de <i>B. germanica</i> reduce los niveles de mensajero de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1..... | 83 |
| 5.2.3. Regulación de la expresión <i>in vivo</i> de BgHR-3 y BgFTZ-F1 por la 20E en glándulas protorácicas..... | 86 |
| 5.2.4. Análisis fenotípico de las ninfas interferidas para BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1..... | 87 |
| 5.2.5. La interferencia de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 produce alteraciones en los niveles de ecdisteroides hemolinfáticos..... | 88 |
| 5.2.6. Análisis fenotípico de las hembras adultas interferidas para BgEcR-A y BgFTZ-F1 durante el desarrollo ninfal..... | 94 |
| 5.3. Discusión..... | 101 |
| 5.3.1. Función de la 20E sobre la expresión de BgHR3 y BgFTZ-F1 en glándulas protorácicas <i>in vivo</i> | 101 |
| 5.3.2. BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 intervienen en el desarrollo ninfal de <i>B. germanica</i> controlando los niveles de ecdisteroides hemolinfáticos..... | 102 |
| 5.3.3. BgEcR-A y BgFTZ-F1 intervienen en diferentes procesos de la hembra adulta de <i>B. germanica</i> | 104 |
| 6.- PAPEL DE BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 EN LA EMBRIOGÉNESIS DE <i>B. germanica</i> | 107 |
| 6.1. Antecedentes..... | 109 |
| 6.2. Resultados..... | 110 |
| 6.2.1. Niveles de ecdisteroides y de HJIII durante el desarrollo embrionario..... | 110 |

| | |
|--|-----|
| 6.2.2. Caracterización de la embriogénesis temprana (morfogénesis) de <i>B. germanica</i> | 110 |
| 6.2.3. Análisis del proceso de segmentación durante la morfogénesis de <i>B. germanica</i> | 117 |
| 6.2.4. Patrones de expresión de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 durante la embriogénesis de <i>B. germanica</i> | 121 |
| 6.2.5. El tratamiento de la hembra con dsBgEcR-A y dsFTZ-F1 y efecto sobre los embriones..... | 122 |
| 6.2.6. Tratamiento de la hembra con dsBgHR3 y efecto sobre los embriones..... | 124 |
| 6.3. Discusión..... | 131 |
| 6.3.1. Niveles de ecdisteroides y de HJIII durante el desarrollo embrionario..... | 132 |
| 6.3.2. Caracterización del desarrollo embrionario temprano de <i>B. germanica</i> | 132 |
| 6.3.3. Expresión de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 durante el desarrollo embrionario de <i>B. germanica</i> | 136 |
| 6.3.4. Análisis de la función de BgEcR-A y BgFTZ-F1 durante la embriogénesis temprana de <i>B. germanica</i> | 138 |
| 6.3.5.- Análisis de BgHR3 en el desarrollo embrionario de <i>B. germanica</i> | 140 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 141 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 145 |

I. PREFACIO

En la actualidad se conocen alrededor de 1.750.000 especies, en su mayoría animales pluricelulares, de los que 1.085.000 son artrópodos. De hecho, los insectos representan más de la mitad de todas las formas vivientes conocidas, siendo, de largo, el grupo animal más diverso del planeta. La gran diversidad morfológica presente en este grupo, así como su capacidad adaptativa, han hecho que hayan colonizado la mayoría de los hábitats presentes en nuestro planeta. El éxito evolutivo de este grupo radica en la aparición de la metamorfosis completa. Este complejo proceso ha sido estudiado a lo largo de la historia, tanto por la enorme fascinación que despierta, como por ser la clave de la expansión adaptativa de este grupo animal. Así, el análisis de los mecanismos endocrinos y moleculares que han permitido la aparición de la metamorfosis completa es uno de los retos más significativos en la investigación sobre el desarrollo de los insectos. El principal problema que se ha de resolver para entender la aparición de la metamorfosis completa, consiste en explicar cómo un insecto hemimetábolo que presenta dos fases de crecimiento diferenciadas, la ninfa y el adulto, se ha podido transformar un organismo con tres estadios de desarrollo, larva, pupa y adulto.

La Unidad de Fisiología de Insectos del Instituto de Biología Molecular de Barcelona (CSIC), dirigida por el Prof. Xavier Bellés, lleva más de veinte años trabajando en diferentes aspectos de la fisiología de la cucaracha *Blattella germanica*, haciendo especial hincapié en los procesos endocrinos de la reproducción. Recientemente, los Drs. Xavier Bellés y David Martín han iniciado el estudio, a nivel molecular, de los mecanismos endocrinos que controlan el desarrollo ninfal y embrionario de esta cucaracha. El presente trabajo se enmarca, precisamente, en el estudio de este proceso cuyo objetivo final es el entender cómo ha aparecido la metamorfosis completa en insectos evolucionados a través de la caracterización, a nivel más molecular, de los mecanismos hormonales que controlan el desarrollo en insectos primitivos.

Es en este punto, momento en el que finaliza la escritura del trabajo de varios años, en el que se hace balance de los conocimientos científicos adquiridos, pero, también, de las vivencias personales. Es el momento, pues, de agradecer a todas las

personas que me han ayudado en estos últimos años, y sin los que esta tesis no habría podido llegar a buen puerto.

En primer lugar, quiero agradecer al Prof. Xavier Bellés por acogerme en su grupo y haberme ofrecido una beca, pero, sobretodo por llevarme de la mano en mis primeros pasos en este fascinante mundo de la ciencia y contagiarme su entusiasmo. También me gustaría agradecer a la Dra. M^a Dolors Piulachs todas las horas que pasó enseñándome y guiándome en mis primeras incursiones dentro de la biología molecular. Sinceramente, gracias.

Quiero agradecer al Dr. Miquel Riera, del Departamento de Fisiología de la Universidad de Barcelona, por su gentileza al autorizar la presentación de esta memoria.

Al Dr. Joaquin Gutiérrez y a la Dra. Isabel Navarro, del Departamento de Fisiología por su ayuda y colaboración en todos los trámites relacionados con la presentación del presente trabajo.

Al Dr. Jordi Bernués, del Departamento de Biología Molecular y Celular del Instituto de Biología Molecular (CSIC), por su gentileza al enseñarme todos esos pequeños trucos necesarios para la realización de dsRNA, pieza clave de esta tesis.

A todos mis compañeros de laboratorio, que no han hecho sino que arroparme a lo largo de estos años compartidos, no puedo más que darles mil gracias y esperar formar parte de su corazón, como ellos formarán siempre parte del mío. Rafa, Dani Leira, Laura, Viviana, Paula y Santi, un abrazo. Dr. Comas, la distancia nos enseña que hay amistades que se forjan rápida, pero intensamente. No puedo más que decirte gracias por la amistad y por haber sido tan paciente con aquella novata que llegó a revolucionar tu apacible vida en el laboratorio. A José Luis quiero agradecerle su amistad y el enseñarme a ser mejor persona y científico. Lluïsa y Nuria, mis dos grandes amigas, ya lo sabéis, con palabras solo puedo decir os gracias, gracias por todo, y como siempre, en estos casos, las palabras se quedan cortas. A mis dos compañeros del “team” de los receptores nucleares, Dani y Oscar, gracias por las risas, por los buenos momentos, por los no tan buenos, por las charlas científicas y por las no científicas... simplemente gracias por haber conseguido que todos los momentos fuesen buenos momentos. Os voy a echar mucho de menos.

He reservado el final para la persona que me ha enseñado a buscar el por qué, a no quedarme en el resultado e ir más allá, la persona que me ha contagiado su pasión por la ciencia y me ha enseñado que un resultado siempre se puede explicar, pero que hay que buscar la explicación correcta. Gracias, David. Sabes que jamás podré agradecerte todo el esfuerzo y dedicación que has puesto en esta tesis. Espero que, aunque en la distancia, sigamos compartiendo grandes hipótesis sobre el receptor de la hormona juvenil.

Fuera del laboratorio, siempre he contado con el apoyo incondicional de mis padres. A ellos decirles que sin su cariño, comprensión y toneladas de paciencia no podría haber hecho la carrera que me apasionaba y dedicarme a este trabajo que tanto me llena. A mi hermano, por todas aquellas noches de estudio en las que me soportaba estoicamente. Gracias.

Por último, a Juan, mi apoyo incondicional, que ha “sufrido” esta tesis casi tanto como yo. Gracias por aguantar mi mal humor y sobretodo por querer estar conmigo en cualquier lugar del mundo. Gracias de todo corazón.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Ya lo dijo el naturalista estadounidense Richard Vaughan: “Confiemos en que cuando los insectos dominen la tierra, recuerden con gratitud que cortésmente les invitamos a todos nuestros “picnics”. De entre todas las especies de insectos, aquellos que demuestran un mayor interés por las actividades que el hombre desarrolla en el campo durante los fines de semana, se encuentran las pertenecientes a los órdenes Coleoptera (escarabajos), Lepidoptera (polillas y mariposas), Hymenoptera (hormigas, abejas y avispas) y Diptera (moscas y mosquitos). De hecho, estos cuatro grupos representan más del 60% del total de las 900.000 especies de insectos descritas, de largo el grupo animal más abundante. ¿Cuál es la razón de tal éxito? La respuesta es simple, todos ellos poseen metamorfosis completa.

La metamorfosis es uno de los procesos más fascinantes que acontecen durante el desarrollo de los insectos. Según el tipo de metamorfosis que presentan, los insectos pueden dividirse en tres grupos. Los más primitivos, por ejemplo los pececillos de plata, carecen de ella y por ello se denominan ametábolos. Las formas inmaduras de estos insectos son morfológicamente idénticas a sus formas adultas, con la única excepción de que no presentan una genitalia funcional. En segundo lugar encontramos a los insectos que presentan una metamorfosis incompleta, los hemimetábolos, cuyas formas inmaduras, denominadas ninfas, presentan una morfología muy similar a la de sus formas adultas. Las ninfas, además de carecer de genitalia funcional, presentan rudimentos alares que sólo se transformarán en alas funcionales durante la transición a formas adultas. Cucarachas, saltamontes y langostas entre otros insectos, pertenecen a este tipo. Por último, los insectos con metamorfosis completa, los holometábolos, presentan tres estadios de desarrollo morfológicamente muy diferenciados, larva, pupa y adulto. La peculiaridad de estos animales radica en que las tres fases de crecimiento de los insectos ocupan nichos ecológicos diferentes y, por consiguiente, no compiten por los mismos recursos alimenticios, lo que permite a estos animales colonizar nuevos hábitats y diversificarse rápidamente. Su éxito es tal, que el número de especies de insectos holometábolos es mayor que el resto de especies de animales, plantas y hongos combinadas.

1.1. EL DESARROLLO DE LOS INSECTOS ESTÁ CONTROLADO HORMONALMENTE

A pesar de las variaciones descritas en el proceso de la metamorfosis, el crecimiento de los insectos, tanto holometábolos como hemimetábolos, se produce a lo largo de sucesivos estadios larvarios o ninfales, respectivamente. Las transiciones, o mudas, entre estos estadios, están controladas por las fluctuaciones hemolinfáticas que presentan una familia de hormonas, los ecdisteroides (figura 1.1). Así, la presencia de niveles altos de la forma activa de los ecdisteroides, la 20-hidroxiecdisona (20E), al final de cada fase larvaria/ninfal induce el proceso de la muda. Además de la 20E, en el desarrollo de los insectos interviene una segunda familia de hormonas, las hormonas juveniles (HJ). Estas hormonas de naturaleza sesquiterpénica determinan el fenotipo tras las correspondientes mudas. En presencia de HJ, la muda da lugar a nuevas formas inmaduras del organismo (larva-larva o ninfa-ninfa) mientras que en su ausencia se

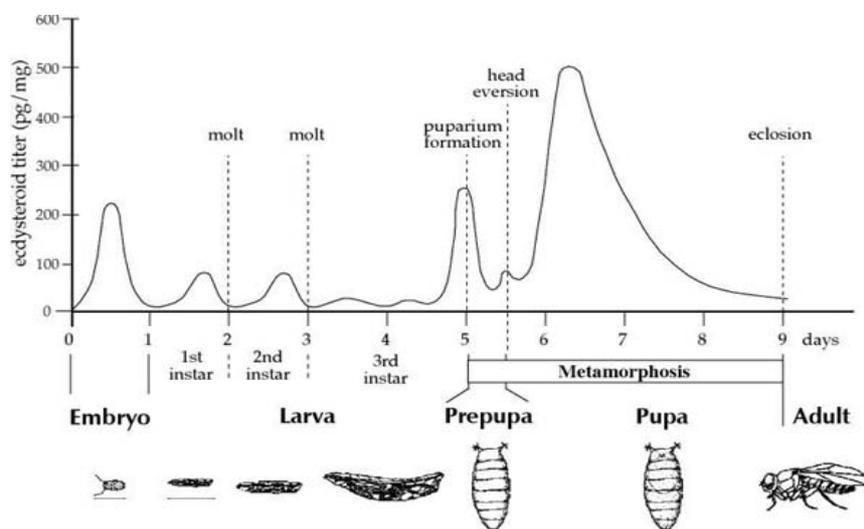


Figura 1.1.- Las principales transiciones durante el desarrollo de los insectos están controladas por pulsos discretos de hormonas ecdisteroidales. Se representa el ciclo vital del díptero *Drosophila melanogaster*. Las líneas discontinuas representan las principales transiciones que acontecen durante la vida del insecto (adaptado de Riddiford, 1993).

inicia la metamorfosis en insectos holometábolos o la muda imaginal en los hemimetábolos (Riddiford, 1993, 1994, 1996). El propio proceso de la metamorfosis completa, que consiste en la destrucción de los tejidos larvarios y la creación de las estructuras adultas a partir de tejidos indiferenciados denominados discos imaginales, también está controlado por la 20E y la HJ (véase Thummel, 2001).

1.2. LA 20-HIDROXIECDISONA ACTÚA A TRAVÉS DE UNA CASCADA GÉNICA. EL MODELO DE ASHBURNER

Uno de los grandes retos de la fisiología del desarrollo de los insectos durante las últimas décadas ha sido establecer el mecanismo molecular por el que la 20E ejerce sus funciones, tanto en el control de la muda como en la metamorfosis. De hecho, tras la identificación de la estructura química de la 20E en el año 1954 por parte del profesor Peter Karlson (Butenandt y Karlson, 1954), la primera aproximación en la caracterización del mecanismo de acción a nivel molecular de dicha hormona tuvo que esperar hasta la década de los setenta. Fue entonces cuando el profesor Michael Ashburner, mediante una serie de elegantes experimentos utilizando incubaciones *in vitro* de cromosomas politénicos gigantes de la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*, propuso un modelo de acción de la 20E basado en la existencia de una jerarquía de factores de transcripción (Ashburner, 1973; Ashburner *et al.*, 1974). Esta jerarquía recibiría, con los años, el nombre de “modelo de Ashburner” (figura 1.2). En este modelo, la 20E tras unirse a su receptor activaría de forma directa y rápida a una serie de genes que se denominaron “tempranos”. A su vez, los genes tempranos serían los responsables de activar a una larga batería de genes “tardíos” que serían los encargados de llevar a cabo la función biológica. Por último las proteínas codificadas por los genes tempranos inactivarían a sus propios genes controlando temporalmente la expresión de éstos. Durante los años siguientes el modelo de Ashburner quedó completamente confirmado cuando los grupos de los profesores Ronald Evans y David Hogness clonaron y caracterizaron el receptor de la 20E y la mayoría de los genes

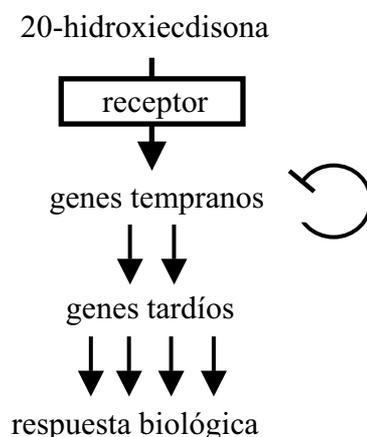


Figura 1.2.- Representación esquemática de la cascada de factores reguladores inducidos por la 20-hidroxicdisona (20E) conocido como Modelo de Ashburner. El complejo 20E-receptor induce de forma directa una serie de genes reguladores tempranos que a su vez controlan la expresión de un número mayor de genes tardíos que inducen la respuesta biológica apropiada. Las proteínas generadas por los genes tempranos reprimen la expresión de sus propios genes, para controlar temporalmente el efecto de la hormona.

tempranos. Así, se demostró que el receptor funcional de la 20E está formado por el heterodímero de dos proteínas, el propio receptor de ecdisona (EcR) que se encarga de unir la 20E y el producto del gen ultraspiráculo (USP) (Yao *et al.*, 1993; Koelle *et al.*, 1991). Una vez EcR-USP ha unido 20E, el heterodímero controla la expresión de varios genes tempranos entre los que destacan el *receptor hormonal 3 (Hr3 o Hr46)*, *HR4*, *HR39*, *E75*, *E78* y *fushi tarazu transcription factor 1 (ftz-f1)*. Finalmente, son estos genes, ya sea actuando solos o en combinación con otros factores, los que producen el efecto biológico observado. Al analizar la estructura de los factores mencionados se constató, de forma sorprendente, que tanto los dos componentes del receptor de la 20E como los seis genes tempranos mencionados, pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares. Estas proteínas son factores de transcripción que se caracterizan por su capacidad de unir ligandos así como por su habilidad para unirse al DNA y activar o reprimir la transcripción de genes diana. Durante los últimos años, gracias a la secuenciación completa del genoma de *D. melanogaster*, se han

identificado 10 nuevos receptores nucleares, describiendo de esta manera un total de 18 miembros de esta familia en insectos (tabla 1.1).

Tabla 1.1.- Listado de los 18 receptores nucleares presentes en el genoma de *D. melanogaster*. Entre paréntesis se indican los ligandos conocidos para cada receptor nuclear. La columna de regulación por 20E se refiere a los genes cuya transcripción está controlada por la 20E. (+) representa una respuesta débil a la 20E. En la columna de número de isoformas, se muestra el número de las isoformas descritas (PD), el número de proteínas posibles en función del análisis genómico (PP) y el número de isoformas de RNA para cada receptor (RNA). Los datos para la confección de la tabla se han obtenido de King-Jones y Thummel, 2005.

| Receptores nucleares en <i>D. melanogaster</i> (ligando) | Regulación por 20E | Nº de isoformas (PD/PP/RNA) | Ortólogo en humanos (ligando) |
|--|--------------------|-----------------------------|---|
| E75 | + | 3/4/4 | REV-ERB |
| E78 | + | 2/3/2 | REV-ERB |
| DHR3 | + | 1/3/3 | RORB (all trans retinoic acid) |
| EcR (20-hidroxicdisona) | + | 3/3/5 | FXR (Chenodeoxycholic acid) LXR (22(R)-hidroxycholesterol) |
| DHR96 | (+) | 1/1/2 | VDR (1 α , 25-dihydroxyvitamin D ₃) |
| HNF-4 | ? | 1/3/3 | HNF4A |
| USP | - | 1/1/1 | RXRA (9-cis-retinoic acid) |
| DHR78 | (+) | 1/2/4 | TR2 |
| Tailless | ? | 1/1/1 | TLX |
| Dissatisfaction | ? | 1/1/1 | TLX |
| DHR83/CG10296 | ? | 0/1/1 | PNR |
| DHR51/CG16801 | ? | 0/2/2 | PNR |
| Seven up | ? | 1/3/3 | COUP-TF1 |
| ERR | ? | 0/2/2 | ERRb (diethylstilbestrol) |
| DHR38 | - | 2/2/2 | NURR1 |
| FTZ-F1 | + | 2/2/3 | LRH-1 (phospholipid) SF-1 (phospholipid) |
| DHR39 | + | 2/2/2 | LRH-1 (phospholipid) SF-1 (phospholipid) |
| DHR4 | + | 1/2/2 | GCNF |

1.3. LOS RECEPTORES NUCLEARES. ESTRUCTURA Y MECANISMO DE ACCIÓN

Los receptores nucleares son factores de transcripción que presentan una estructura modular, esto es, dividida en regiones discretas de aminoácidos que poseen una estructura y función específica.

1.3.1. Estructura

Todos los miembros de esta familia están compuestos por 5-6 dominios aminoacídicos diferenciados, dos de los cuales están altamente conservados desde el punto de vista funcional entre todos los miembros de la familia, el dominio de unión a DNA (DBD) y el dominio de unión a ligando (LBD) (figura 1.3A). El DBD esta formado por dos dedos de zinc. El primero de ellos es el encargado de unirse específicamente al DNA mediante una secuencia conservada de cinco aminoácidos denominada *caja-p* (Umesono y Evans, 1989). El segundo dominio característico de los receptores nucleares es el LBD. Este dominio, mucho menos conservado que el anteriormente descrito, está situado en el extremo C-terminal del DBD y constituye la principal interfase de heterodimerización de esta familia de proteínas. El hecho de que el LBD permita la dimerización de los diferentes componentes de la familia de los receptores nucleares, ha provocado que aumente significativamente el repertorio de secuencias a las que se pueden unir en el DNA y por consiguiente sus funciones reguladoras. El LBD está compuesto por 11-13 hélices α que conforman un bolsillo hidrofóbico capaz de unir pequeñas moléculas de naturaleza lipofílica. Además, dentro del LBD se encuentra una región, denominada *secuencia de función de activación-2* (AF-2), que es la responsable de la actividad transcripcional del receptor nuclear una vez ha unido su ligando. En los últimos años, se han realizado varios análisis estructurales y moleculares del LBD, demostrando que una vez unido al ligando, la hélice α 12 cambia de conformación pasando de un estado inactivo a una nueva configuración en la cual la región AF-2 interactúa con co-activadores transcripcionales y permite que el receptor nuclear actúe (Glass y Rosenfeld, 2000). Entre el DBD y el

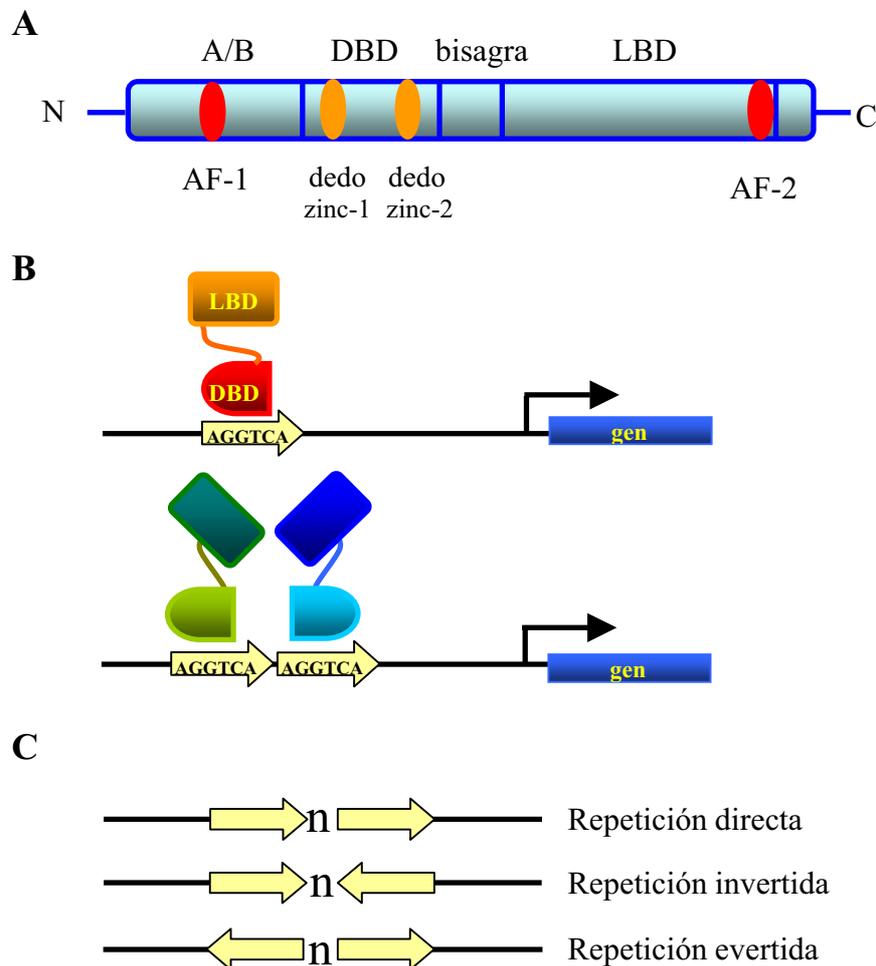


Figura 1.3.- Estructura y características funcionales de los receptores nucleares. (A) Representación esquemática de la estructura de un receptor nuclear, señalándose los diferentes dominios funcionales. La región A/B confiere capacidad de activar la transcripción de forma independiente a unir el ligando a través de la secuencia AF-1. El dominio de unión a ligando (LBD) es el responsable de la interacción con secuencias específicas en el DNA. El DBD está formado por dos dedos de zinc. La región bisagra se encarga de unir el DBD con el dominio de unión a ligando (LBD). El LBD es responsable de unir el ligando y presenta capacidad de activar la transcripción a través de la secuencia AF-2. (B) Los receptores nucleares actúan como monómeros o como hetero- u homodímeros uniéndose a secuencias *consenso* en el DNA. (C) Las secuencias *consenso* de unión a los receptores nucleares son repeticiones directas, invertidas o evertidas de la secuencia AGGTCA separadas por 0-6 nucleótidos (n).

LBD se encuentra una región bisagra que se encarga de dar flexibilidad a la proteína. En la región N-terminal de la proteína, se encuentra la región A/B. Este dominio no está conservado entre los diferentes miembros de la superfamilia de los receptores nucleares y su principal función es la de conferir capacidad transcripcional a la proteína de forma independiente de unión al ligando, a través de una secuencia denominada *secuencia de función de activación-1* (AF-1).

1.3.2 Mecanismo de acción

Para poder ejercer su función reguladora, los receptores nucleares se unen a una secuencia específica en el DNA, que es idéntica, o casi, a la secuencia consenso 5'-AGGTCA-3' (figura 1.3B). Algunos miembros de la familia, como por ejemplo HR3 o FTZ-F1, se unen a esta secuencia como monómeros. Otros receptores, sin embargo, actúan como homo- o heterodímeros uniéndose a dos secuencias consenso seguidas, que en estos casos conforman el elemento de respuesta funcional. Las dos secuencias consenso que conforman el elemento completo de respuesta funcional pueden organizarse de diferente manera. Así, existen repeticiones directas, repeticiones invertidas, e incluso repeticiones evertidas. Además, en todos los casos, las secuencias consenso pueden estar separadas entre sí por 0-6 nucleótidos (figura 1.3C). La secuencia de los elementos consenso así como la orientación de los mismos contribuye esencialmente a generar la especificidad de unión que presentan los diferentes receptores nucleares.

Durante la última década, han sido numerosos los análisis moleculares encaminados a entender el mecanismo de acción por el cual los receptores nucleares transforman una señal hormonal en un efecto transcripcional. En general, puede considerarse que estos receptores actuarían siguiendo básicamente dos modelos (figura 1.4). En el primero, los receptores nucleares se hallan en el citoplasma de las células unidos a ciertas moléculas que actuarían como chaperones. Al unirse a su hormona respectiva, los receptores se translocarían al interior del núcleo donde actuarían como homo- o heterodímeros, uniéndose a las secuencias consenso de los genes diana y

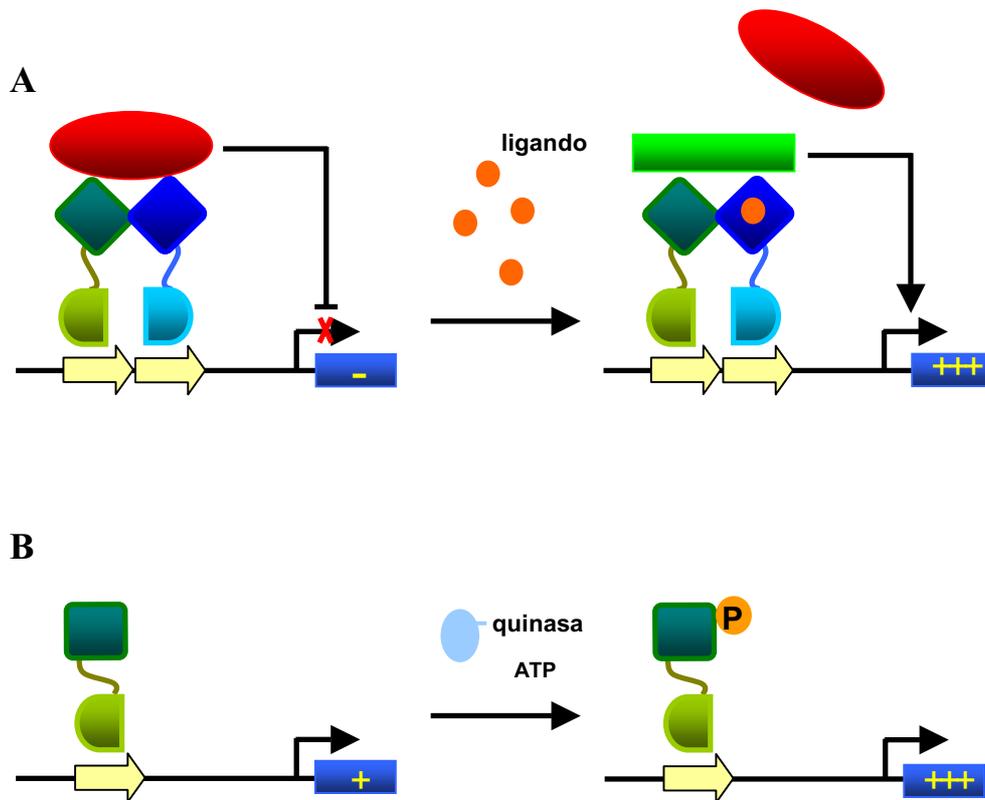


Figura 1.4.- Mecanismos moleculares de acción de los receptores nucleares. (A) Representación esquemática del funcionamiento del heterodímero EcR/USP. En ausencia de ligando, el heterodímero es capaz de reclutar co-represores e inhibir la transcripción de los genes diana. Tras unir el ligando correspondiente, el heterodímero cambia de conformación e interacciona con proteínas co-activadoras desplazando la unión a co-represores y activando, de esta manera, la transcripción génica. (B) En el segundo modelo, representado por el factor esteroideogénico-1 (SF-1) de vertebrados, el receptor nuclear actuando como monómero es capaz de activar constitutivamente al gen diana. Su fosforilación mediante quinasas, resulta en un dramático aumento de la capacidad transcripcional del receptor.

activando su transcripción. Dentro de este mismo modelo de acción, existen heterodímeros, como por ejemplo EcR-USP, que en ausencia de ligando actuarían como represores de la transcripción, mediante su interacción con proteínas co-represoras. Al unirse el correspondiente ligando, el heterodímero interaccionaría con co-activadores, desplazando a los co-represores y activaría la transcripción (figura 1.4A). En el segundo modelo, representado por el factor esteroideogénico 1 (SF-1), ortólogo en vertebrados de

FTZ-F1, la activación producida por el receptor nuclear dependería de la fosforilación del mismo. Así, el receptor, en general actuando como monómero, actuaría como un activador constitutivo débil. Sin embargo, tras su fosforilación por una quinasa se produciría un claro incremento de su actividad transcripcional (Hammer *et al.*, 1999) (figura 1.4B).

1.4. FILOGENIA DE LOS RECEPTORES NUCLEARES DE INSECTOS

Los receptores nucleares son proteínas que se han encontrado en los diferentes grupos que conforman los metazoos, desde esponjas, equinodermos y tunicados, hasta artrópodos y vertebrados (Laudet y Bonneton, 2005). Un análisis filogenético detallado de los genes que conforman la superfamilia de los receptores nucleares muestra la existencia de seis subfamilias, cuyos miembros presentan, como hemos indicado en el apartado anterior, una alta conservación entre sus respectivos DBDs y LBDs. La figura 1.5 representa un árbol filogenético que muestra la relación existente entre los receptores nucleares de humanos (señalados en azul) y los de la mosca *D. melanogaster* (señalados en verde). El hecho de que tanto los genomas de insectos y de humanos, aunque separados por 600-800 millones de años de evolución, presenten genes que codifican para miembros de las seis subfamilias de receptores indica que éstas se establecieron durante etapas tempranas de la evolución de los metazoos (Benton y Ayala, 2003). Como puede apreciarse en la figura 1.5, cuatro de los receptores nucleares de *D. melanogaster* se han generado por duplicación, hecho que no se ha producido en el caso de los vertebrados. Las cuatro parejas de receptores que se han duplicado son E75-E78, DHR51-DHR83, DHR39-FTZ-F1 y dissatisfaction (*dsf*)-tailless (*tll*). De éstos, solo la pareja E75-E78 está representada en el genoma de *Caenorabditis elegans* (*nhr-85-sex-1*), lo que indica que esta duplicación tuvo lugar antes de la separación de los nematodos y artrópodos.

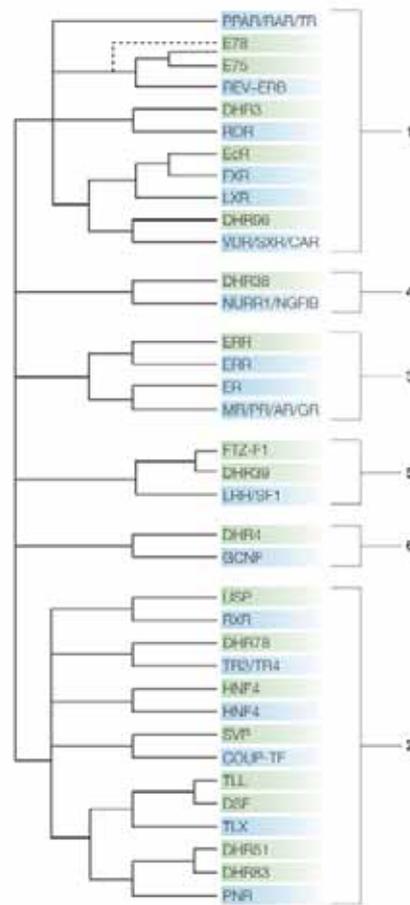


Figura 1.5.- Árbol filogenético que muestra las relaciones evolutivas entre los receptores nucleares de humanos (en azul) y los de *Drosophila melanogaster* (en verde). Los receptores nucleares se agrupan en seis subfamilias (numeradas a la derecha del árbol). Los datos para la obtención del árbol están extraídos de Laudet y Bonneton, 2005. La figura está adaptada de King-Jones y Thummel, 2005.

1.5. LA 20-HIDROXIECDISONA CONTROLA EL EJE FUNCIONAL HR3-FTZ-F1

Como hemos descrito anteriormente, la cascada de factores nucleares inducidos por la 20E, controla procesos diversos durante el desarrollo de los insectos, desde las mudas larvianas/ninfales hasta el proceso de la metamorfosis (Thummel, 1995). Dos

receptores de esta cascada, HR3 y FTZ-F1, conforman un eje funcional en sí mismos, que ha sido caracterizado en gran detalle en insectos holometábolos. Así, en *D. melanogaster* y en el lepidóptero *Manduca sexta*, se han demostrado que la 20E induce directamente la expresión de HR3 y reprime, a su vez, la expresión de FTZ-F1 (Horner *et al.*, 1995; Palli, *et al.*, 1992; Hiruma y Riddiford, 2001, 2003). Además, el propio HR3 induce la aparición de FTZ-F1 cuando la 20E desaparece (White *et al.*, 1997). Este complejo mecanismo de regulación se ha mostrado de suma importancia para el estricto control temporal de la expresión de ambos factores, justo antes de cada muda larvaria y durante el periodo de la formación de la prepupa, en el inicio de la metamorfosis (Sullivan y Thummel, 2003). A continuación se describen resumidamente las principales características de ambos receptores nucleares.

1.5.1. *Hr3*

Este gen temprano ha sido clonado y caracterizado exclusivamente en insectos holometábolos. En todos los casos analizados, *Hr3* es activado de forma directa por la 20E (Palli *et al.*, 1992, 1996; Jindra *et al.*, 1994; Horner *et al.*, 1995, Langelan *et al.*, 2000, Kapitskaya *et al.*, 2000) y su actividad transcripcional la lleva cabo actuando como monómero al unirse a secuencias consenso en el DNA de sus genes dianas (White *et al.*, 1997; Kageyama *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 1997). Por otro lado, HR3 es considerado un receptor huérfano, es decir, sin ligando conocido. En este sentido, el descubrimiento reciente de que su ortólogo en vertebrados, ROR- α , es capaz de unir moléculas derivadas del colesterol (Kallen *et al.*, 2002) y que ROR- β presenta una afinidad muy alta por el ácido retinoico (Stehlin-Gaon *et al.*, 2003) sugiere que HR3 podría tener un ligando natural. Sin embargo, la baja similitud entre los LBDs de los diferentes HR3s de insectos respecto a sus ortólogos de vertebrados, sugiere que este ligando, en caso de existir, podría no pertenecer a la misma familia de moléculas que las descritas anteriormente.

El análisis funcional de *Hr3* se ha llevado a cabo exclusivamente en *D. melanogaster*, mediante el análisis de varias líneas mutantes. Así, se ha demostrado que DHR3 desempeña, en la mosca del vinagre, un papel esencial en la formación del

sistema nervioso durante la embriogénesis, en el control de las mudas larvarias y en el inicio de la metamorfosis (Koelle *et al.*, 1992; Carney *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 1999). Respecto al último punto, se ha demostrado además que durante las etapas tempranas del proceso metamórfico, DHR3 es el responsable de la inhibición de la expresión de otros genes tempranos inducidos por la 20E, actuando de esta manera como el factor clave en el control de la duración del efecto biológico de dicha hormona (Lam *et al.*, 1999). Por otro lado, DHR3 controla de forma directa la expresión de β FTZ-F1, gen clave para el desarrollo de la metamorfosis, al unirse en varios elementos de respuesta situados en el promotor del gen β FTZ-F1 (Kageyama *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 1997). Estos resultados sugieren, en resumen, que en el proceso de la metamorfosis, DHR3 es uno de los responsables de controlar la transición entre los programas genéticos de larva a prepupa.

1.5.2. *ftz-fl*

Al igual que en el caso anterior, el receptor nuclear huérfano FTZ-F1 solo ha sido caracterizado en insectos holometábolos. En todos los casos, la expresión de este gen se regula negativamente por la 20E (Sun *et al.*, 1994; Hiruma y Riddiford, 2001). Sus ortólogos en vertebrados son LHR-1 y SF-1. La actividad transcripcional de SF-1 se modula por efecto de fosforilación, produciendo el mismo efecto estabilizador que tiene lugar en otros receptores nucleares al unir su correspondiente ligando (Figura 2B) (Hammer *et al.*, 1999). En los últimos años se ha demostrado que SF-1 de ratón y humanos y LHR-1 de humanos pueden unir segundos mensajeros de tipo fosfatidil-inositoles (Krylova *et al.*, 2005), lo que sugiere que FTZ-F1 de insectos podrían tener como ligando a moléculas de este tipo. Como en el caso de HR3, el análisis de las funciones biológicas que desempeña FTZ-F1 solo se ha llevado a cabo en *D. melanogaster*. En este insecto, el gen *ftz-fl* presenta dos promotores que generan dos isoformas con la región N-terminal diferente (Ueda *et al.*, 1990; Lavorgna, *et al.*, 1991, 1993). La isoforma α -FTZ-F1 ejerce su función reguladora durante los primeros estadios de la embriogénesis, controlando la expresión de genes clave para el desarrollo del patrón embrionario mediante la interacción con la proteína homeótica FTZ (Yu *et*

al., 1997; Guichet *et al.*, 1997). La segunda isoforma, β FTZ-F1, se expresa durante fases más tardías de la embriogénesis y durante el resto del desarrollo de la mosca, ejerciendo funciones reguladoras esenciales durante las fases post-embrionarias, esto es, durante las mudas larvianas y durante el desarrollo de la pupa (Yamada *et al.*, 2000). Durante las etapas tempranas de la metamorfosis, β FTZ-F1 es estrictamente necesario para que el desarrollo del programa genético encargado de la destrucción de tejidos larvianos, así como de la morfogénesis de las nuevas estructuras que darán lugar al insecto adulto (Woodard *et al.*, 1994; Broadus *et al.*, 1999).

1.6. CONCLUSIONES Y OBJETIVOS

Llegados a este punto, es importante subrayar que todos los estudios sobre la jerarquía de los factores inducidos por la 20E se han llevado a cabo en insectos holometábolos. No se conoce si la jerarquía de factores nucleares inducidos por la 20E también existe y opera en insectos más primitivos con un desarrollo hemimetábolo. Pretendemos iniciar la caracterización de la mencionada jerarquía de receptores nucleares utilizando como modelo el dictióptero *Blattella germanica*, que presenta un desarrollo hemimetábolo. El principal objetivo del presente proyecto es, pues, el clonaje y la caracterización de los homólogos de los receptores nucleares HR3 y FTZ-F1 en *B. germanica*. Además, incluiremos el análisis funcional del receptor de ecdisona que se había clonado previamente en nuestro laboratorio y que denominamos BgEcR-A. De este modo, analizaremos en profundidad el eje regulador: EcR - HR3 - FTZ-F1 y estableceremos su papel regulador en la cucaracha alemana.

En último término, la caracterización, a nivel molecular, de los mecanismos hormonales que controlan el desarrollo en insectos primitivos, nos ayudará a entender cómo ha aparecido la metamorfosis completa en insectos evolucionados y, en último término, nos permitirá establecer las bases evolutivas de los cambios en la morfología de los organismos. Y es que como el Profesor James Truman, uno de los más reconocidos científicos en este campo, explica: “Cualquier innovación que es capaz de

generar más de la mitad de todas las especies animales existentes, no es una innovación trivial”.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. INSECTOS

Para realizar los diferentes ensayos se utilizaron hembras de *B. germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae) provenientes de una colonia mantenida en el laboratorio en condiciones constantes de temperatura ($30 \pm 1^\circ\text{C}$), de humedad relativa (70-75 %) y en completa oscuridad. La alimentación que se les suministraba consistía en pienso especial para perros PANLAB 125 y agua *ad libitum* (Piulachs, 1987).

2.2. TÉCNICAS QUIRÚRGICAS

Las disecciones se realizaron sobre ejemplares anestesiados mediante un flujo continuo de CO_2 . Para la manipulación y la extracción de los diferentes tejidos se utilizaban pinzas INOX 5 Super Wit y microtijeras Diener.

Todas las disecciones se realizaron bajo solución salina Ringer.

Solución salina Ringer:

| | |
|--------------------|---------|
| NaCl | 9 g/l |
| KCl | 0,2 g/l |
| NaHCO ₃ | 0,2 g/l |
| CaCl ₂ | 0,2 g/l |

2.2.1. Disección de los ovarios y del cuerpo graso

Para extraer los ovarios, se realizó una abertura longitudinal en la parte ventral del abdomen del insecto, desde la cloaca genital hasta el tórax. Seguidamente, se separaron los esternitos abdominales y, tras retirar el cuerpo graso, quedaron al descubierto ambos ovarios, uno a cada lado del tubo digestivo.

En ninfas de quinta y sexta fase, la edad se determinó de forma cronológica, dado que no se dispone de un parámetro que permita establecer la edad fisiológica. Por

el contrario, en hembras adultas, se utilizó la longitud del oocito basal como parámetro para determinar la edad fisiológica, según lo establecido por Piulachs (1987).

Para la obtención del cuerpo graso, una vez abierto el insecto, se descartaron el tubo digestivo, los ovarios y las glándulas colaterales, dejando al descubierto el cuerpo graso abdominal, el cual retiramos cuidadosamente con la ayuda de las pinzas.

2.2.2. Disección de las ootecas

Las ootecas se retiraron de las hembras aplicando una leve presión con unas pinzas a ambos lados de cada ooteca, y tirando de ella cuidadosamente. Para la disección de los embriones, las ootecas se sumergieron en un baño a 95°C durante unos minutos, tras lo cual, se abrieron las ootecas y se separaron los embriones del corion.

2.2.3. Obtención de la hemolinfa

Para la obtención de hemolinfa, se seccionó el fémur de una de las patas posteriores y se aplicó, sobre el corte, una micropipeta de cristal aforada de 5 µl que permitió la recolección de la hemolinfa por capilaridad.

2.2.4. Disección de las glándulas protorácicas

Con la ayuda de agujas entomológicas se inmovilizó el insecto de manera que la región ventral del cuello quedara completamente visible. Se retiró la cutícula de esta zona, así como, las traqueas dorsales dejando expuesto el ganglio protorácico y sus nervios conectivos. A continuación se seccionaron los nervios y se retiró el ganglio, quedando al descubierto la glándula protorácica, sobre el tubo digestivo. Finalmente, se cortaron las cuatro ramas de dicha glándula por su zona más distal.

2.2.5. Preparación de la cutícula

Para la obtención de la cutícula, se realizaron dos aberturas longitudinales en las zonas latero-dorsales del insecto, desde el último segmento abdominal hasta el tórax. Posteriormente se cortó transversalmente el tórax y se retiraron los externitos abdominales.

2.3. CÉLULAS EMBRIONARIAS UM-BGE-1 DE *B. germanica*

La línea celular UM-BGE-1 deriva de embriones de 5 días de *B. germanica* (Kurtti y Brooks, 1977). Esta línea celular se mantuvo a 25°C en medio de cultivo L15B (SIGMA) suplementado como describieron Munderloh y Kurtti (1989).

2.4. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS RIBONUCLEICOS

Las extracciones de RNA se realizaron utilizando el kit de Sigma GenElute Mammalian Total RNA siguiendo las instrucciones del fabricante. Para las extracciones de RNA total de cuerpo graso, ovario, y ootecas, los tejidos, previamente congelados en nitrógeno líquido, se trituraron utilizando un homogeneizador mecánico. En el caso de las glándulas protorácicas o de células UM-BGE-1 de *B. germanica*, se congelaron en el tampón de lisado y se procedió directamente a la extracción del RNA. Una vez obtenido el RNA, se cuantificó la concentración y pureza mediante lectura de su absorbancia a 260 y 280 nm, en un biofotómetro (Eppendorf).

2.5. CLONAJE DE LOS cDNAs DE BgHR3 y BgFTZ-F1

El clonaje de los homólogos de HR3 y FTZ-F1 en *B. germanica* se llevó a cabo mediante técnicas de PCR, complementadas con 5'- y 3'-RACE.

2.5.1. PCR

Con el fin de amplificar una región inicial del cDNA de los receptores nucleares a clonar, se realizó una PCR con oligonucleótidos degenerados, basados en regiones conservadas del DBD de los homólogos de insectos, utilizando como molde cDNA obtenido a partir de 2µg de RNA de células UM-BGE-1 de *B. germanica*. Las reacciones de PCR se realizaron con Accutaq (SIGMA) siguiendo las especificaciones del fabricante, excepto por la utilización de los oligonucleótidos a una concentración 5 veces superior a la indicada, dado que se trata de oligonucleótidos degenerados.

Los oligonucleótidos degenerados utilizados fueron:

| Molécula | Nombre oligonucleótido | Secuencia oligonucleótido | Tamaño fragmento amplificado |
|----------|------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| BgHR3 | HR3-F1 | 5'-TGYGARGGNTGYAARGG-3' | 134 pb |
| | HR3-R1 | 5'-ARRCAYTTYTGNAGNCGRCA-3' | |
| BgFTZ-F1 | FTZ-F1-F1 | 5'-TGYGARTCNTGYAARGG-3' | 134 pb |
| | FTZ-F1-R1 | 5'-ARRCAYTTYTGRAANCGRCA-3'. | |

Las condiciones de la PCR fueron las mismas en ambos casos:

| | | |
|------|--------|--------|
| 94°C | 2 min | |
| 94°C | 30 seg |] x 5 |
| 52°C | 1 min | |
| 68°C | 1 min | |
| 94°C | 30 seg |] x 35 |
| 55°C | 1 min | |
| 68°C | 1 min | |
| 68°C | 10 min | |

2.5.2. Amplificación rápida de los extremos 5' y 3' de los cDNAs

Para la obtención de las secuencias completas de HR3 y FTZ-F1 se utilizaron las técnicas del 5' y 3'RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*). Esta técnica fue descrita inicialmente por Forhman *et al.* (1988) y la llevamos a cabo siguiendo las instrucciones del 5'RACE for Rapid Amplification of cDNA Ends, Versión 2.0 (Invitrogen), o bien, siguiendo las instrucciones del 3'RACE for Rapid Amplification of cDNA Ends, Versión 2.0 (Invitrogen), a partir de 2 µg de RNA total obtenido de células UM-BGE-1 de *B. germanica*.

Los oligonucleótidos específicos utilizados en ambas técnicas se diseñaron en base a las secuencias de ambos receptores nucleares obtenidas según se ha descrito en el apartado anterior:

| Técnica | Molécula | Nombre oligonucleótido | Secuencia oligonucleótido |
|---------|----------|------------------------|--------------------------------|
| 5'RACE | BgHR3 | HR3-R2 | 5'-TACTGGCATCGGTTTCCTGTTGAC-3' |
| 3'RACE | BgHR3 | HR3-F2 | 5'-TCCCAGAGCTCCGTCGTCAACTA-3' |
| 5'RACE | BgFTZ-F1 | FTZ-F1-R2 | 5'-CGACGCATGTGTAGACCTTCTT-3' |
| 3'RACE | BgFTZ-F1 | FTZ-F1-F2 | 5'-TTCTTCAAGAGGACAGTGCAA-3' |

Las reacciones de PCR se realizaron a partir de 5 µl de dC-Tailed DNA o de 1 µl de 3'cDNA originados mediante la técnica del 5' o del 3'-RACE, respectivamente. En todas las amplificaciones se utilizó la DNA-polimerasa Ecotaq (Ecogen) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Las condiciones de las PCRs fueron:

5'RACE de BgHR3

94°C 2 min
 94°C 30 seg
 55°C 30seg
 72°C 1 min
 72°C 5 min

} x 40

3'RACE de BgHR3

94°C 2 min
 94°C 30 seg
 66°C 30 seg
 72°C 3 min
 72°C 5 min

} x 40

5'RACE de BgFTZ-F1

94°C 2 min
 94°C 30 seg
 60°C 30 seg
 72°C 1 min
 94°C 30 seg
 56°C 30 seg
 72°C 1 min
 72°C 5 min

x 5

x 35

3'RACE de BgFTZ-F1

94°C 2 min
 94°C 30 seg
 64°C 30 seg
 72°C 2 min
 72°C 5 min

x 40

2.5.3. Obtención de los cDNAs completos de los receptores nucleares

Para obtener la secuencia completa de los diferentes cDNAs se diseñó una pareja de oligonucleótidos flanqueando la región codificante de cada uno de ellos. El oligonucleótido directo se situó delante de la metionina inicial y el reverso tras el codón de parada:

| Molécula | Nombre oligonucleótido | Secuencia oligonucleótido | Tamaño del fragmento amplificado |
|----------------------|------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| BgHR3-A | HR3-F3 | 5'-GGCGCACCAAAAGTGGATTAATTGA-3' | 3.322 pb |
| | HR3-R3 | 5'-ATCTGCAGAAACTCACCGAGCTAA-3' | |
| BgHR3-B ₁ | HR3-F4 | 5'-CGATGCTTCCACTGACCAATACTA-3' | 3.544 pb |
| BgHR3-B ₂ | HR3-R3 | 5'-ATCTGCAGAAACTCACCGAGCTAA-3' | 3.181 pb |
| BgFTZ-F1A | FTZ-F1-F3 | 5'-TGTCCTACAGACCTACATTTATACT-3' | 2.030 pb |
| BgFTZ-F1B | FTZ-F1-R3 | 5'-GGACTTTGTCAACAATTCATTTTCAGT-3' | 1.994 pb |

Todas las amplificaciones se realizaron con la DNA-polimerasa con actividad correctora de errores, Accutaq (SIGMA), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Como molde se utilizó cDNA originado a partir de RNA-polyA⁺ de células UM-BGE-1 de *B. germanica*.

2.6. ELECTROFORESIS DE DNA

Las electroforesis de DNA se realizaron en geles de agarosa del 1 al 1,5 % (p/v), preparados en tampón TBE 0,5X. En cada carril se cargó la cantidad adecuada de DNA disuelto en tampón de carga (Sambrook *et al.*, 1989). Las electroforesis se llevaron a cabo a voltaje constante de 100-130V tras lo cual el gel se tiñó en una solución de Bromuro de Etidio de 0,2 µg/ml en agua. La visualización del RNA se realizó mediante un transiluminador de luz ultravioleta.

Tampón electroforesis TBE 0,5X:

| | |
|---------------|---------|
| Tris base | 44,5 mM |
| Ácido bórico | 44,5 mM |
| EDTA (pH 8.0) | 1 mM |

2.7. ELECTROFORESIS DE RNA

Las electroforesis de RNA se realizaron en geles desnaturalizantes de agarosa con formaldehído al 4,5 %. En cada carril se cargó la misma cantidad de RNA previamente desnaturalizado durante 15 min a 65°C. Las electroforesis se llevaron a cabo a voltaje constante 90-100 V en tampón de electroforesis (MEN 1X). Tras la electroforesis, el gel se tiñó en una solución de Bromuro de Etidio de 0,2 µg/ml en agua. La visualización del RNA se realizó mediante un transiluminador de luz ultravioleta.

MEN 1X:

MOPS 20 mM

Acetato sódico 5 mM

EDTA 1 mM

pH a 7 con NaOH 2N

2.8. LIGACIÓN DE INSERTOS EN PLÁSMIDOS

Todas las ligaciones de los fragmentos de DNA generados por PCR se llevaron a cabo en el vector pSTBlue-I siguiendo las instrucciones del pAcceptor Vector Kit (Novagen). Las transformaciones del DNA plasmídico se realizaron en células competentes Novablue de *E. coli* (Novagen), siguiendo el procedimiento descrito por Sambrook (1989).

2.9. PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

La purificación de DNA plasmídico se realizó siguiendo las instrucciones de Gen Elute Plasmid Miniprep KIT (SIGMA) a partir de cultivos líquidos incubados toda la noche a 37°C en agitación constante (250 r.p.m).

2.10. SECUENCIACIÓN DE DNA

La secuenciación del DNA se realizó mediante el método de terminación de la cadena por dideoxinucleótidos. Los diferentes clones se secuenciaron en ambos sentidos utilizando los oligonucleótidos T7 y SP6 (presentes en el vector de clonaje), así como otros internos específicos, en el sistema ABI de secuenciación automática por fluorescencia. Estas secuenciaciones se realizaron el Servicio de Secuenciación de DNA del Instituto de Biología Molecular de Barcelona del CSIC de Barcelona.

2.11. TRANSCRIPCIÓN / TRADUCCIÓN *IN VITRO*

El sistema de lisado de reticulocitos, descrito originalmente por Pelham y Jackson (1976), permite la confirmación de pautas abiertas de lectura mediante la traducción de un RNA parental transcrito *in vitro*. En nuestro caso se utilizó el kit TNT Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) que permite realizar la transcripción y la traducción en una reacción única. El lisado contiene una RNA polimerasa de un fago, que transcribe el RNA a partir de un DNA exógeno, y este RNA es utilizado como molde para la traducción. La síntesis proteica se realizó en presencia de metionina marcada con S³⁵ permitiendo su detección mediante autorradiografía tras su separación por peso molecular en gel SDS-PAGE.

2.11.1. Transcripción / traducción *in vitro* y marcaje con S³⁵-Met

Se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante. Como molde se utilizó 1 µg de DNA plasmídico en el que se encontraba la secuencia completa de nuestros cDNAs, y en la reacción se utilizó 1 µl S³⁵-Metionina (10 mCi/mol).

2.11.2. Separación de las proteínas sintetizadas *in vitro*

La separación de las proteínas sintetizadas *in vitro* se realizó mediante electroforesis de proteínas en geles de acrilamida-bisacrilamida-SDS tal y como se indica en el apartado 2.12.

La visualización de las bandas proteicas, se realizó sumergiendo los geles en una solución de azul de Comassie al 8 %, la cual permite detectar bandas que contengan del orden de 2 a 5 µg de proteína, y lavándolos posteriormente en metanol-ácido acético (30 %- 10%). Posteriormente los geles se secaron en un secador de geles y se expusieron a

una película fotográfica Kodak para la detección de las bandas marcadas radiactivamente.

2.12. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA-SDS

La electroforesis en gel de acrilamida-bisacrilamida (poliacrilamida) (Laemmli, 1970) permite separar proteínas según su peso molecular a medida que migran a través de una matriz de poliacrilamida. En nuestro caso, las muestras se diluyeron convenientemente en tampón de muestra con SDS y β -mercaptoetanol, y se desnaturalizaron por ebullición durante 5 min. Seguidamente, la solución proteica se sometió a electroforesis con amperaje constante de 20 mA durante 2-3 h.

SOLUCIONES:

Tampón concentrador:

| | |
|--------------------------|------|
| Acrilamida-bisacrilamida | 2,5% |
| Tris-HCl (pH6.8) | 0,5M |
| SDS | 0,4% |

Tampón separador:

| | |
|--------------------------|------|
| Acrilamida-bisacrilamida | 10% |
| Tris-HCl (pH8.8) | 1,5M |
| SDS | 0,4% |

Tampón de muestra:

| | |
|-------------------------|--------|
| Tris-HCl (pH6.8) | 1,5M |
| Glicerol | 10% |
| SDS | 2% |
| β -mercaptoetanol | 5% |
| Azul de bromofenol | 0,001% |

Tampón de electroforesis:

| | |
|---------|--------------|
| Glicina | 1,92M |
| Tris | 0,25M |
| SDS | 1% |
| | pH 8.3 – 8.5 |

2.13. RT-PCR SEMICUANTITATIVA

Para la determinación de las cantidades relativas de los mRNA de interés, se utilizó la técnica de RT-PCR semicuantitativa. Esta técnica se basa en la retrotranscripción de una cantidad constante de RNA, que servirá de molde para realizar PCR con oligonucleótidos específicos, permitiendo determinar la abundancia relativa de cada transcrito. Previamente a la retrotranscripción se trató el RNA con DNAsa para eliminar el DNA genómico. La metodología seguida se describe a continuación:

2.13.1. Tratamiento con DNAsa

El tratamiento con DNAsa se llevó a cabo en todas las muestras dado que en la extracción de RNA siempre existe una pequeña contaminación con DNA genómico que puede interferir en la posterior amplificación de los diferentes transcritos.

PROCEDIMIENTO:

1. En un volumen final de 10µl añadir los siguientes componentes:
 - 300 ng – 1 µg de RNA
 - 1 µl tampón de la DNAsa
 - 1 µl RQ1 RNase-Free DNase (Promega)
2. Incubar 30 min a 37°C.
3. Añadir 1 µl de solución Stop de la DNAsa a la reacción e incubar 10 min a 65°C con el fin de parar la reacción e inactivar la enzima.
4. Poner en hielo.

2.13.2. Retrotranscripción

PROCEDIMIENTO:

1. Incubar las muestras durante 5 min a 75°C con el fin de desnaturalizar el RNA.
2. Poner en hielo para evitar hibridaciones entre las cadenas del RNA.

3. Añadir los diferentes reactivos, a concentración final:
 - 1 X tampón de reacción
 - 250 ng Random Primer (Promega)
 - 500 μ M de cada dNTP
 - 10 mM DTT
 - 40 unidades RNAsin Ribonuclease Inhibitor (Promega)
4. Equilibrar la reacción durante 10 min a temperatura ambiente.
5. Añadir 200 unidades de SuperScriptTM II RNase H⁺ Reverse Transcriptase (Invitrogen) o un volumen equivalente de H₂O en los controles.
6. Incubar 50 min a 42°C para que tenga lugar la retrotranscripción.
7. Incubar durante 10 min a 75°C para terminar la reacción.
8. Dejar equilibrar 10 min a temperatura ambiente.
9. Añadir 20 μ l de TE pH8.0.

2.13.3. PCR

Las condiciones de PCR se realizaron dentro de la zona de amplificación lineal para cada uno de los diferentes transcritos.

REACCIÓN DE PCR:

En tubo Eppendorf de 0,2 ml añadir los siguientes reactivos, a concentración final:

| | |
|-------------|-----------------------------|
| 1 x | tampón de PCR |
| 1,5 mM | MgCl ₂ |
| 200 μ M | de cada dNTP |
| 200 nM | cebador directo |
| 200 nM | cebador antisentido |
| 1 μ l | cDNA |
| 1 unidad | Taq DNA polimerasa (Ecogen) |

Volumen final de 25 μ l en H₂O.

OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS:

| Molécula | Nombre oligonucleótido | Secuencia oligonucleótido | Tamaño del fragmento amplificado |
|----------------------|------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| BgEcR-A | EcR-A-F1 | 5'-TACTCCGGAGGTAGCGTCATCAT-3' | 520 pb |
| | EcR-A-R1 | 5'-GACGGTGAAGACAACCAGTCATC-3' | |
| BgHR3-A | HR3-F3 | 5'-GGCGCACCAAAAGTGGATTAATTGA-3' | 631 pb |
| | HR3-R4 | 5'-CGCTGATGTCGTACGGCATCT-3' | |
| BgHR3-B ₁ | HR3-F5 | 5'-TTGCTGGCGCCCGACAAAAGATC-3' | 693 pb |
| | HR3-R5 | 5'-CAAGAAGACCCAGAGAACTAGCTT-3' | |
| BgHR3-B ₂ | HR3-F5 | 5'-TTGCTGGCGCCCGACAAAAGATC-3' | 671 pb |
| | HR3-R6 | 5'-GATAACTGCGCCGGATCTGTTGTAA -3' | |
| BgHR3-B | HR3-F6 | 5'-CGATGCTTCCACTGACCAATACTA-3' | 523 pb |
| | HR3-R2 | 5'-TACTGGCATCGGTTCTGTTGAC-3' | |
| BgFTZ-F1A | FTZ-F1-F4 | 5'-TATAGTCTACACAGCGAATCAGA-3' | 444 pb |
| | FTZ-F1-R4 | 5'-GTACATCGGGCCGAATTTGTTTCT-3' | |
| BgFTZ-F1B | FTZ-F1-F5 | 5'-TTCTAGTTCTGCAGCCGGAGGT-3' | 452 pb |
| | FTZ-F1-R4 | 5'-GTACATCGGGCCGAATTTGTTTCT -3' | |
| BgFTZ-F1com | FTZ-F1-F6 | 5'-GAGGAATTCGTCTTCTTCAAGGA-3' | 601 pb |
| | FTZ-F1-R3 | 5'-GGACTTTGTCAACAATTCATTTTCAGT-3' | |
| BgActina-5C | Actina5C-F | 5'-TCGTTTCGTGACATCAAGGAGAAGCT-3' | 308 pb |
| | Actina5C-R | 5'-TGTCGGCAATTCCAGGGTACATGGT-3' | |

En aquellas muestras que procedían de tratamientos con RNAi, la amplificación del transcrito silenciado se realizó utilizando un oligonucleótido contenido en el fragmento utilizado como dsRNA y uno externo.

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar estas regiones fueron:

| Molécula | Nombre oligonucleótido | Secuencia oligonucleótido | Tamaño fragmento amplificado |
|-----------|------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| BgEcR-A | EcR-A-F2 | 5'-TACTCCGGAGGTAGCGTCATCAT-3' | 470 pb |
| | EcR-A-R2 | 5'-TACTGCATTCTTTGTAATGCTTCT-3' | |
| BgHR3-A | HR3-F3 | 5'-GGCGCACCAAAAGTGGATTAATTGA-3' | 631 pb |
| | HR3-R4 | 5'-CGCTGATGTCGTACGGCATCT-3' | |
| BgHR3-B | HR3-F6 | 5'-CGATGCTTCCACTGACCAATACTA-3' | 523 pb |
| | HR3-R2 | 5'-TACTGGCATCGGTTCTGTTGAC-3' | |
| BgFTZ-F1A | FTZ-F1-F4 | 5'-TATAGTCTACACAGCGAATCAGA-3' | 444 pb |
| | FTZ-F1-R4 | 5'-GTACATCGGGCCGAATTTGTTTCT-3' | |
| BgFTZ-F1B | FTZ-F1-F5 | 5'-TTCTAGTTCTGCAGCCGGAGGT-3' | 452 pb |
| | FTZ-F1-R4 | 5'-GTACATCGGGCCGAATTTGTTTCT-3' | |

2.14. SOUTHERN BLOT

2.14.1. Electroforesis y transferencia del DNA

Las electroforesis de DNA se realizaron tal y cómo se detalla en el apartado 2.6. Posteriormente, los geles se desnaturalizaron durante 30 min en una solución de desnaturalización en agitación constante, y a continuación se neutralizaron otros 30 min en una solución de neutralización. Seguidamente, el DNA se transfirió durante toda la noche a una membrana de nylon Hybond-N (Amersham) por capilaridad en una

solución SSC x10. Finalmente, el DNA se fijó a la membrana mediante irradiación con luz ultravioleta (UVStratalinker 2400, Stratagene).

SOLUCIONES:

Solución de desnaturalización:

| | |
|------|-------|
| NaCl | 1,5 M |
| NaOH | 0,5 M |

Solución de neutralización:

| | |
|------------------|-------|
| NaCl | 1,5 M |
| Tris-HCl (pH7.2) | 0,5 M |

SSC x10:

| | |
|----------------|--------|
| NaCl | 1,5 M |
| Citrato sódico | 150 mM |

Ajustar el pH a 7 y filtrar.

2.14.2. Hibridación y detección

Las membranas, con el DNA fijado, se pre-hibridaron en una solución de hibridación, durante 1 h a 42°C en agitación constante. Tras la prehibridación, se añadió la sonda correspondiente marcada con fluoresceína y se dejó en agitación a 42°C durante toda la noche. Para detectar el marcaje se siguió las instrucciones del Gene Images CDP-Star Detection module (Amersham).

Solución de hibridación:

| | |
|---------------------|------------|
| SSC | 2x |
| SDS | 0,1% (p/v) |
| Sulfato de dextrano | 5% (p/v) |
| Líquido de bloqueo | 1/20 |

2.15. NORTHERN BLOT

2.15.1. Electroforesis y transferencia del RNA

Las electroforesis de RNA se realizaron tal y cómo se detalla en el apartado 2.7.

Seguidamente, el gel se transfirió durante toda la noche a una membrana de nylon Hybond-N (Amersham) por capilaridad en una solución SSC x10. Finalmente, el RNA se fijó a la membrana mediante irradiación con luz ultravioleta mediante un UV Stratalinker 2400 (Stratagene).

2.15.2. Hibridación y detección

Las membranas se sometieron al mismo procedimiento seguido en el apartado 2.14.2.

2.16. MARCAJE DE SONDAS CON FLUORESCENCIA

Las sondas que se utilizaron en los Southern blot de las diferentes RT-PCRs, se generaron mediante PCR, utilizando las diferentes parejas de oligonucleótidos detalladas en el apartado 2.13.3, y como molde los correspondientes clones plasmídicos. Estas PCRs se limpiaron utilizando el kit de Sigma GenElute PCR Clean-up, y a continuación se marcaron con fluoresceína siguiendo las instrucciones del Gene Images Random Labelling Module (Amersham).

La sonda utilizada en la detección del mRNA del gen de la vitelogenina mediante Northern blot se generó siguiendo el mismo sistema, siendo los oligonucleótidos los que se detallan, para este transcrito, en el apartado 2.18.1.1.

2.17. TRATAMIENTOS EN CUERPOS GRASOS INCUBADOS *IN VITRO*

Para las incubaciones *in vitro* se utilizó el cuerpo graso abdominal, adherido a la cutícula dorsal comprendido entre el tercer segmento torácico y el penúltimo segmento abdominal. De este modo, la cutícula permanecía flotando en el medio permitiendo que los lóbulos de cuerpo graso quedasen sumergidos completamente. Los cuerpos grasos se incubaron en una placa de 48 pozos (NUNC) donde se preincubaron en 500 µl de medio de cultivo Grace con L-Glutamina y sin hemolinfa (SIGMA) durante 30 min. Transcurrido este tiempo se incubaron en 1 ml de medio fresco. Los diferentes tratamientos hormonales se llevaron a cabo añadiendo al medio 1 µl de la solución hormonal, o del solvente en el caso de los controles, durante diferentes periodos de tiempo, según el experimento. Las incubaciones se realizaron a 30°C en completa oscuridad, y el medio se cambió cada 4 h para evitar contaminaciones.

2.18. RNA DE INTERFERENCIA *IN VIVO*

Una aproximación actual a la determinación de la función de proteínas en organismos que no se pueden modificar genéticamente de forma estable, como es el caso de *B. germanica*, consiste en el silenciamiento transitorio de los transcritos que las codifican. Este procedimiento se basa en el tratamiento con una doble cadena de RNA (dsRNA) idéntica a un fragmento del mensajero que se pretende silenciar, la cual, al penetrar en las células se procesa en fragmentos de 21-23 nucleótidos que desencadenan la degradación del mensajero endógeno diana.

2.18.1. Obtención del RNA de doble cadena (dsRNA)

La metodología para la obtención del RNA de doble cadena (dsRNA) se detalla a continuación:

2.18.1.1. Clonaje del fragmento diana

En primer lugar se amplificaron y clonaron las diferentes regiones de los receptores nucleares que se utilizaron para la síntesis del dsRNA.

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar estas regiones fueron:

| Molécula | Nombre oligonucleótido | Secuencia oligonucleótido | Tamaño fragmento amplificado |
|-------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| BgVg | Vg-F | 5'-TGAAATGCGAAGGAAAGCCAA-3' | 732 pb |
| | Vg-R | 5'-CCTGTCAAGACCTGAAATGTA-3' | |
| BgEcR-A | EcR-A-F1 | 5'-TACTCCGGAGGTAGCGTCATCAT-3' | 520 pb |
| | EcR-A-R1 | 5'-GACGGTGAAGACAACCAGTCATC-3' | |
| BgHR3 | HR3-F7 | 5'-TCCCAGAGCTCCGTCGTCAACTA-3' | 411 pb |
| | HR3-R4 | 5'-CGCTGATGTCGTACGGCATCT-3' | |
| BgHR3(2) | HR3-F8 | 5'-AGAGGACGAAGTGCGGTTCCATA-3' | 242 pb |
| | HR3-R4 | 5'-CGCTGATGTCGTACGGCATCT-3' | |
| BgFTZ-F1 | FTZ-F1-F7 | 5'-GAATAGTTCAGGGCTTTTTGAAGCT-3' | 502 pb |
| | FTZ-F1-R | 5'-CGACGCATGTGTAGTCCTTCTT-3' | |
| BgFTZ-F1(2) | FTZ-F1-F6 | 5'-GAGGAATTCCGTCTTCTTCAAGGA-3' | 601 pb |
| | FTZ-F1-R3 | 5'-GGACTTTGTCAACAATTCATTTTCAGT-3' | |

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo a partir de 50 ng del plásmido en el que se había insertado el cDNA completo de la molécula en cuestión. En todas las amplificaciones se utilizó la polimerasa Accutaq (SIGMA), siguiendo las especificaciones del fabricante. Los fragmentos amplificados se ligaron en el vector pSTBlue-I entre los promotores T7 y SP6.

2.18.1.2. Linearización del DNA plasmídico

Para la síntesis de los correspondientes dsRNAs se ha de partir de un fragmento lineal de DNA que contenga, en un extremo, el promotor T7, o SP6, y un extremo 5' protuberante, en el otro. Para ello digerimos, con los enzimas adecuados, 15 µg del plásmido con el inserto correspondiente durante toda la noche a 37°C, para la realización de la reacción con SP6-RNApol, y 6 µg para la reacción con T7-RNApol.

Tras la digestión, los fragmentos se concentraron mediante una precipitación con fenol-cloroformo/etanol. El precipitado se resuspendió en 5 µl de H₂O_dpec.

2.18.1.3. Síntesis de dsRNA

PROCEDIMIENTO:

1. Las reacciones de síntesis de RNA de cadena sencilla (ssRNA) se realizaron de forma independiente.

En un volumen final de 50µl:

| | |
|--------|---|
| 5 µl | fragmento lineal del DNA plasmídico |
| 10 µl | 5x Promega Buffer (Promega) |
| 4 µl | 100 mM DTT (Promega) |
| 1 µl | RNasin Ribonuclease Inhibitor (40 u/µl) (Promega) |
| 10 µl | 10 mM cada rNTP (Amersham) |
| 1,5 µl | SP6 RNA-pol (15 u/ µl) (Promega) |

o

T7 RNA-pol (20 u/ µl) (Promega)

2. Incubar 2 h a 37°C.
3. Verificar el correcto funcionamiento de ambas reacciones mediante electroforesis en gel de agarosa de 1 µl de cada reacción.
4. Juntar las dos reacciones de ssRNA (por SP6 RNA-pol y por T7 RNA-pol).
5. Incubar en un baño a 95°C durante 10 min

6. Dejar que la temperatura disminuya progresivamente hasta la temperatura ambiente, permitiendo así la hibridación de las cadenas complementarias de ssRNA.
7. Concentrar los dsRNAs mediante precipitación por fenol-cloroformo/etanol. Resuspender el precipitado en 39,5 μ l de H₂O_dpec.
8. Realizar un tratamiento conjunto con DNAsa y RNAsaA para eliminar el DNA plasmídico, así como el ssRNA que no ha hibridado correctamente.
En volumen final de 50 μ l:
 - 5 μ l Tampón de la DNAsa (x10) (Promega)
 - 5 μ l DNase/RNase-free (1 u/ μ l) (Promega)
 - 0,5 μ l RNaseA (10 μ g/ μ l) (SIGMA)Incubar 15 min a 37°C.
9. Limpiar y concentrar mediante precipitación por fenol-cloroformo y etanol. Resuspender el precipitado en 39,5 μ l de H₂O_dpec.

2.18.2. Preparación e inyección del dsRNA

La concentración del dsRNA se determinó mediante lectura de la densidad óptica en un biofotómetro (Eppendorf). El dsRNA se diluyó en Ringer filtrado con filtro millex de 0,22 μ m, hasta obtener la concentración deseada para inyectar 1 μ l en hembras de sexta fase ninfal, o adultas. El dsRNA se inyectó directamente en la cavidad abdominal del insecto, utilizando una jeringa HAMILTON.

2.19. MARCAJE CON LYSO TRACKER-RED Y DIHIDROCLORIDO 4',6-DIAMIDINO-2-FENILINDOL (DAPI)

El marcaje con Lyso Tracker Red (Molecular Probes) permite la detección de lisosomas en células vivas. De esta manera se pueden determinar la presencia de una gran actividad lisosomal en un tejido, propia de procesos de autofagia. Para la detección de ácidos nucleicos se utilizó la tinción con DAPI (SIGMA).

PROCEDIMIENTO:

1. Permeabilizar los tejidos incubándolos durante 10 min a temperatura ambiente en PBT.
2. Incubar durante 10 min con una solución de 1 µg DAPI (SIGMA)/ml PBT.
3. Lavar el exceso de marcaje mediante dos lavados de 5 min con PBS 0,2 N.
4. Incubar durante 5 min con una solución de Lyso Tracker (Molecular Probes) 1:1000 en PBS 0,2 N.
5. Eliminar el exceso de marcaje mediante dos lavados de 10 min con PBS 0,2 N pH 6.8.
6. Montar las distintas preparaciones en medio de montaje Mowiol 4-88 (Calbiochem).

SOLUCIONES:Tampón fosfato salino (PBS) 0,2N pH 6.8:

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 130 mM |
| KCl | 2,7 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 10 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,8 mM |
| ajustar el pH a 6.8. | |

Mowiol 4-88:

| | |
|----------|--------------|
| mowiol | 0,1 % (p/v) |
| glicerol | 0,24 % (p/v) |
| Tris-HCl | 0,1 M pH 8,5 |

PBT:

| | |
|--------------------|------|
| PBS 0,2 M (pH 6.8) | 1X |
| Tween | 0,3% |

2.20. TINCIÓN CON DAPI Y MEDICIÓN DEL ANCHO DE RAMA DE LA GLÁNDULA PROTORÁCICA

Para determinar el ancho de las ramas de las glándulas protorácicas se realizó tinción con DAPI (SIGMA) para facilitar su visualización y medición. Posteriormente,

estas glándulas protorácicas se fotografiaron y sobre estas fotografías se midió el ancho utilizando el programa AdobePhotoshop (Adobe Systems Incorporated). Se realizaron tres medidas independientes de cada una de las cuatro ramas y se utilizó el valor promedio de estas catorce mediciones como el valor del ancho de las ramas de una glándula protorácica.

PROCEDIMIENTO:

1. Fijar los tejidos incubándolos durante 30 min en paraformaldehído (PF) 4%.
2. Lavar dos veces durante 10 min con PBS 0,2 N pH 6.8.
3. Permeabilizar las glándulas protorácicas incubándolas durante 10 min a temperatura ambiente en PBT.
4. Incubar durante 10 min con una solución de 1 µg DAPI (SIGMA)/ml PBT.
5. Lavar el exceso de marcaje mediante dos lavados de 5 min con PBS 0,2 N.
6. Montar las distintas preparaciones en medio de montaje Mowiol 4-88 (Calbiochem).

2.21. CORTES HISTOLÓGICOS DE LA CUTÍCULA VENTRAL

PROCEDIMIENTO:

1. Fijar la muestra en PF al 4% en PBS a 4°C durante toda la noche.
2. Deshidratar el tejido tres veces durante 10 min en cada una de las siguientes soluciones:
 - etanol (EtOH) 70 %
 - EtOH 90 %
 - EtOH 95 %
 - EtOH 100 %
 - EtOH 100 % : Xilol (1:1)
3. Para incluir la muestra en parafina, primero sumergir el tejido en una solución de Xilol: Parafina (1:1) a 42°C durante toda la noche, y posteriormente, sumergirlo en parafina durante 3-4 h a 42°C.

4. Realizar los bloques de parafina y guardarlos a 4°C toda la noche.
5. Cortar con micrótomo muestras histológicas de 6 µm de grosor y ponerlas sobre portaobjetos previamente humedecidos.
6. Secar los portaobjetos en placa calefactora a 42°C un mínimo de 3 h.
7. En cestos de tinción, proceder a la rehidratación de las muestras sumergiéndolas 6 min en cada una de las siguientes soluciones:
 - Xilol
 - EtOH 100 %
 - EtOH 90 %
 - EtOH 70 %
 - H₂O
8. Teñir las muestras histológicas 5 min en azul de toluidina.
9. Lavar el exceso de tinción 10 min con H₂O .
10. Deshidratar las muestras durante 5min en EtOH 90 % y EtOH 100 %, y durante 10 min en Xilol.
11. Montar las muestras en medio de montaje DPX.

2.22. INMUNOCITOQUÍMICA DE ENGRAILED

Como marcador de segmentación en embriones de *B. germanica* se inmunolocalizó la proteína engrailed, para ello se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-engrailed/invested 4D9 generado contra epítomos conservados entre las proteínas engrailed e invested de *D. melanogaster* por el grupo del Prof. Nipan Patel (Patel *et al.*, 1989).

PROCEDIMIENTO:

1. Incubar los embriones 45 min a temperatura ambiente y con agitación en solución PEM-FA.
2. Lavar tres veces 10 min a temperatura ambiente con PBSTB.

3. Permeabilizar los embriones incubándolos 1 h a temperatura ambiente con PBSTB+NGS.
4. Incubar durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-engrailed 4D9 a una concentración 1:1.
5. Lavar 4 veces durante 10 min a temperatura ambiente en la solución PBST.
6. Incubar los embriones durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-ratón unido a peroxidasa (SIGMA) diluido 1:100 en PBST.
7. Lavar 3 veces con PBT durante 5 min a temperatura ambiente.
8. Lavar 3 veces con PBT durante 30 min a temperatura ambiente.
9. Lavar con PBS 0,2 N pH 6.8.
10. Realizar el revelado mediante incubación de 3-5 min en la solución de diaminobenzidina (DAB).
11. Montar los tejidos en glicerol al 50 % en PBS 0,2 N pH 6.8.

SOLUCIONES:

PEM:

| | |
|----------------------------|--------|
| Pipes (SIGMA) | 100 mM |
| EGTA (SIGMA) | 2 mM |
| MgSO ₄ | 1 mM |
| ajustar el pH a 7 con HCl. | |

PEM-FA:

| | |
|-------------------------------------|---|
| PEM | 9 |
| Paraformaldehido (37 %) | 1 |
| preparar en el momento de utilizar. | |

PBST:

| | |
|------------------|-------|
| PBS 0,2 N pH 6.8 | 1 X |
| Triton x-100 | 0,1 % |

PBSTB:

| | |
|------|-------|
| PBST | 1 X |
| BSA | 0,1 % |

PBSTB + NGS:

| | |
|-------------------|-------|
| PBSTB | 1 X |
| normal goat serum | 5,0 % |

2.23. OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS

Las diferentes preparaciones microscópicas se examinaron utilizando un microscopio Zeiss Axiophot. Las imágenes se captaron mediante una cámara Olympus acoplada al microscopio, y se procesaron utilizando el programa AdobePhotoshop (Adobe Systems Incorporated).

2.24. CUANTIFICACIÓN DE ECDISTEROIDES HEMOLINFÁTICOS

Los ecdisteroides hemolinfáticos se cuantificaron mediante la técnica de ELISA siguiendo el procedimiento descrito por Porcheron *et al.* (1989) y adaptado a *B. germanica* por Pascual *et al.* (1992) y Romañá *et al.* (1995). Se utilizaron 20-hidroxiecdisona (20E) (SIGMA) y 20E-acetilcolinesterasa (Cayman) como patrón y trazador enzimático, respectivamente. El antiserum (AS 4919, facilitado por el Prof. Porcheron, Université de Paris) se utilizó diluido 1:50.000. Las lecturas de absorbancia a 450 nm se realizaron en espectrofotómetro Multiscan Plus II (Labsystems). El antiserum presenta la misma afinidad por la ecdisona y por la 20E (Porcheron *et al.*, 1989), pero dado que las curvas patrón se obtuvieron utilizando 20E, los resultados se expresan como equivalentes de 20E.

**3. CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN
DE LOS cDNAs DE BgHR3 Y
BgFTZ-F1**

3.1. ANTECEDENTES

Tal y como se ha descrito en la introducción de la presente memoria, el objetivo principal de esta tesis doctoral es la caracterización del eje regulador EcR- HR3 - FTZ-F1 en el insecto hemimetábolo *B. germanica*. Este eje ha sido caracterizado en detalle en el díptero *D. melanogaster* y en el lepidóptero *M. sexta*. Así, en estos insectos se ha demostrado que la 20E tras unirse a su receptor, EcR, activa la expresión de *Hr3*, que a su vez, induce la expresión de *ftz-fl* (Horner *et al.*, 1995; White *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 1997; Lan *et al.*, 1999; Hiruma y Riddiford, 2003; Riddiford *et al.*, 2003). Estos factores desempeñan funciones esenciales durante la embriogénesis, muda y metamorfosis de estos insectos (Carney *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 1997, 1999; White *et al.*, 1997; Yamada *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 1997; Guichet *et al.*, 1997; Broadus, 1999).

En el presente capítulo abordamos, pues, el clonaje y la caracterización estructural de los receptores nucleares que conforman el eje previamente descrito. Llegados a este punto, cabe mencionar que en los últimos años se ha clonado, en nuestro laboratorio, una isoforma del receptor de ecdisona que se ha denominado BgEcR-A. Es por ello que el objetivo experimental del presente capítulo se centró en el clonaje de los ortólogos de *Hr3* y de *Ftz-fl* de *B. germanica*.

3.2. RESULTADOS

3.2.1. Clonaje de tres cDNAs ortólogos de HR3 en *B. germanica*

El clonaje del ortólogo de HR3 en *B. germanica* se llevó a cabo mediante la técnica de RT-PCR seguido por 5' y 3'RACE. En primer lugar, se diseñaron oligonucleótidos degenerados en base motivos conservados de los dominios de unión a DNA (DBD) de secuencias de HR3 de otras especies de insectos. Mediante RT-PCR se obtuvo un primer clon de 134 nucleótidos. El análisis de la secuencia confirmó que se trataba de un fragmento de un receptor nuclear de la familia de *Hr3/Ror*.

A partir de esta secuencia parcial, y mediante la utilización de las técnicas de 5' y 3'RACE, tal y como se describe en el apartado 2.5, se obtuvieron las secuencias completas de tres cDNAs correspondientes a los ortólogos de HR3 de *B. germanica*, y que se denominaron BgHR3-A, BgHR3-B₁ y BgHR3-B₂ (la estructura de las tres isoformas se representa en la figura 3.1). Los cDNAs presentan un tamaño de 3.503 nucleótidos (correspondientes a 607 aminoácidos), 3.790 nucleótidos (651 aminoácidos) y 2.367 nucleótidos (530 aminoácidos) para BgHR3-A, BgHR3-B₁ y BgHR3-B₂, respectivamente (figura 3.2). Para confirmar la traducibilidad de los cDNAs, se utilizó la técnica de transcripción/traducción *in vitro* de un RNA parental (TNT) tal y como se describe en el apartado 2.11. Esta técnica nos permitió comprobar que los tres cDNAs codifican para proteínas de peso molecular similar al estimado de forma teórica. La isoforma BgHR3-A presenta un peso molecular de 68,05 kDa, la isoforma BHR3-B₁ de 72,90 kDa y la isoforma BgHR3-B₂ de 59,22 kDa.

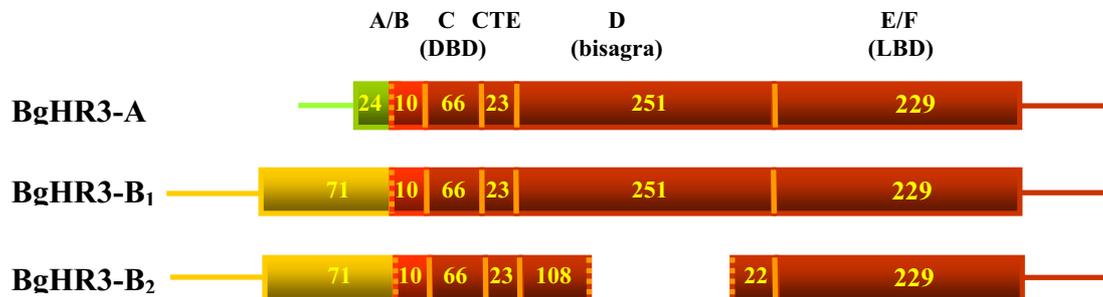


Figura 3.1.- Representación esquemática de las tres isoformas de HR3 de *B. germanica*. Los dominios funcionales se indican sobre BgHR3-A. Los números indican el número de aminoácidos de cada dominio.

Las tres secuencias presentan la organización modular característica de los miembros de la familia de los receptores nucleares (figura 3.1). BgHR3-A posee una región 5' no traducida de 207 nucleótidos, mientras que las isoformas BgHR3-B₁ y BgHR3-B₂ comparten la región 5' no traducida de 362 nucleótidos, así como la

totalidad de la región A/B. La región A/B, donde reside la función de transactivación independiente de ligando, está formada por 34 aminoácidos en la isoforma BgHR3A y 81 aminoácidos en las isoformas BgHR3B₁ y B₂. Los últimos 10 aminoácidos son iguales en las tres isoformas.

Las diferencias observadas en las regiones A/B fueron las que nos permitieron clasificar las tres isoformas de BgHR3 siguiendo el criterio establecido por Eystathioy *et al.* (2001) (figura 3.3A). Tras la región A/B se encuentra el DBD, formado por 66 aminoácidos y que es idéntico en las tres isoformas. El DBD es la región responsable de la unión del receptor nuclear al DNA diana. Los miembros de la familia de *Hr3*, tanto en insectos como en vertebrados, se unen como monómeros a elementos específicos de respuesta en el DNA. Estos elementos de respuesta están compuestos por un núcleo 5'-AGGTCA-3' precedido por una región rica en adeninas y timinas. En el reconocimiento de esta secuencia participan una secuencia de 5 aminoácidos, denominada *caja-p*, situada dentro del DBD (negrita en la figura 3.2), y la región de extensión carboxi-terminal (CTE), formada por 23 aminoácidos y que se encuentra a continuación del DBD (doble subrayado en la figura 3.2).

Entre la región CTE y el inicio del LBD se encuentra la región bisagra, cuya función consiste en favorecer la conformación tridimensional de la proteína. Esta región es idéntica (251 aminoácidos) en las isoformas BgHR3-A y BgHR3-B₁, mientras que en la isoforma BgHR3-B₂ aparece una delección de 121 aminoácidos (subrayada en la figura 3.2).

Por último se encuentra el LBD, compuesto por 330 aminoácidos y que es idéntico en las tres isoformas. En este dominio encontramos la región de transactivación dependiente de ligando denominada AF-2 (indicado en negrita y cursiva en la figura 3.2) que tiene funciones de unión a ligando y de dimerización.

A continuación se compararon las secuencias clonadas con las de HR3 de otras especies de insectos y de vertebrados, y se encontró que las regiones de mayor similitud son el DBD (entre un 96 % y un 74 %) y la región CTE (entre un 100 % y un 73 %) (figura 3.3B), regiones directamente implicadas en el reconocimiento del elemento de

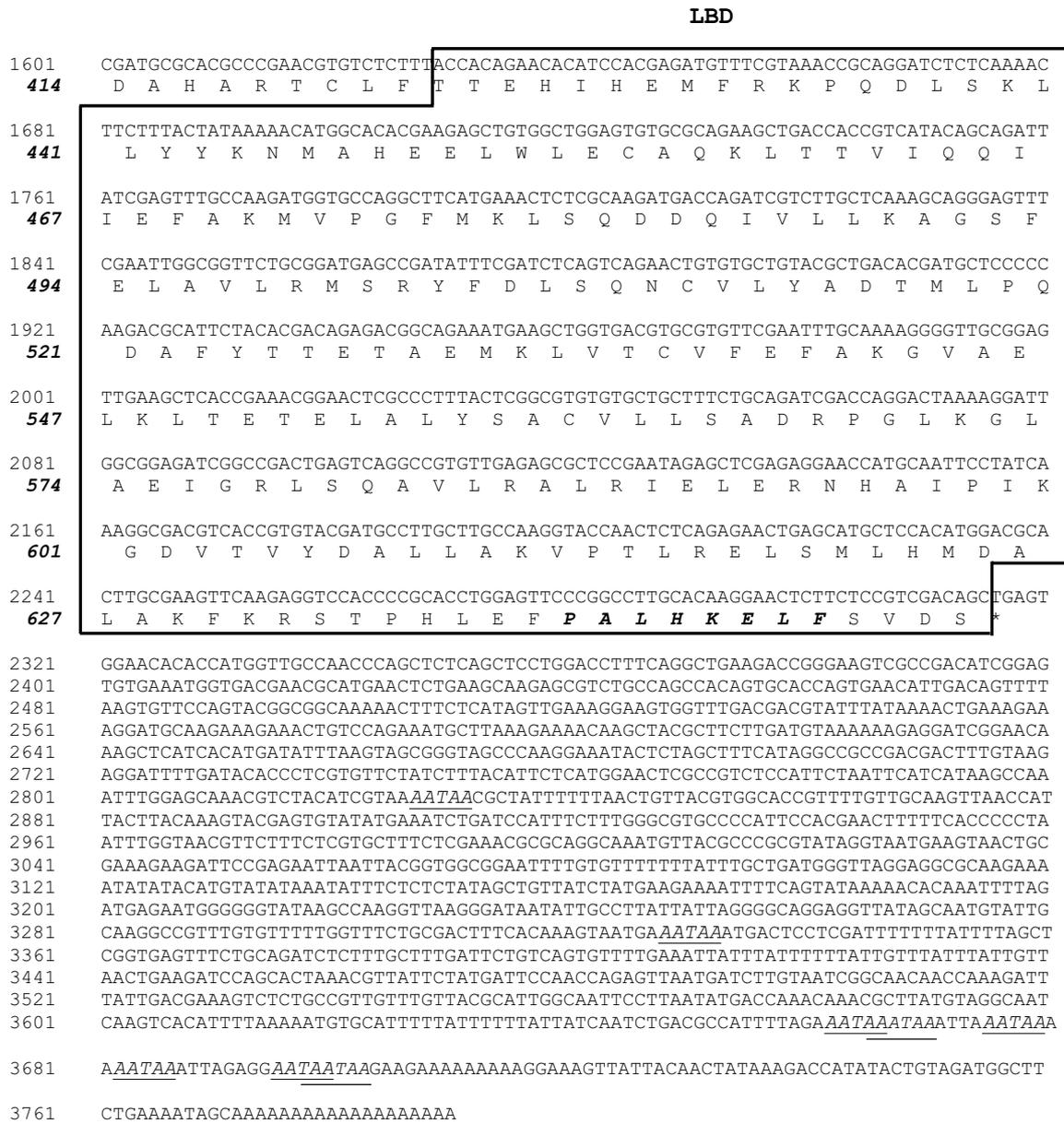


Figura 3.2.- Secuencias nucleotídicas y aminoácidas de las tres isoformas del receptor nuclear HR3 de *B. germanica*. (A) Regiones 5'UTR y A/B correspondientes a la isoforma BgHR3-A. (B) cDNA completo de la isoforma BgHR3-B₁. La delección presente en la isoforma BgHR3-B₂ se indica mediante subrayado. Tanto el dominio de unión a DNA (DBD) como el dominio de unión a ligando (LBD) están recuadrados e indicados. Dentro del DBD la *caja-p* está resaltada en negrita. La extensión carboxi terminal (CTE) del DBD se indica con un doble subrayado. Dentro del LBD se indica la región AF-2 en cursiva y negrita. En la región 3'UTR se han indicado las señales de poliadenilación mediante cursiva y subrayado. Los codones de paro se representan con un asterisco.

respuesta del DNA. Por el contrario, la región bisagra presenta el menor grado de similitud con las diferentes especies de insectos (entre el 40 % y el 17 %) y con las de vertebrados (entre el 13 % y el 4 %). Cabe destacar que la región bisagra de BgHR3 es como mínimo el doble de grande que la de cualquier otro miembro de la familia *Hr3/Ror*.

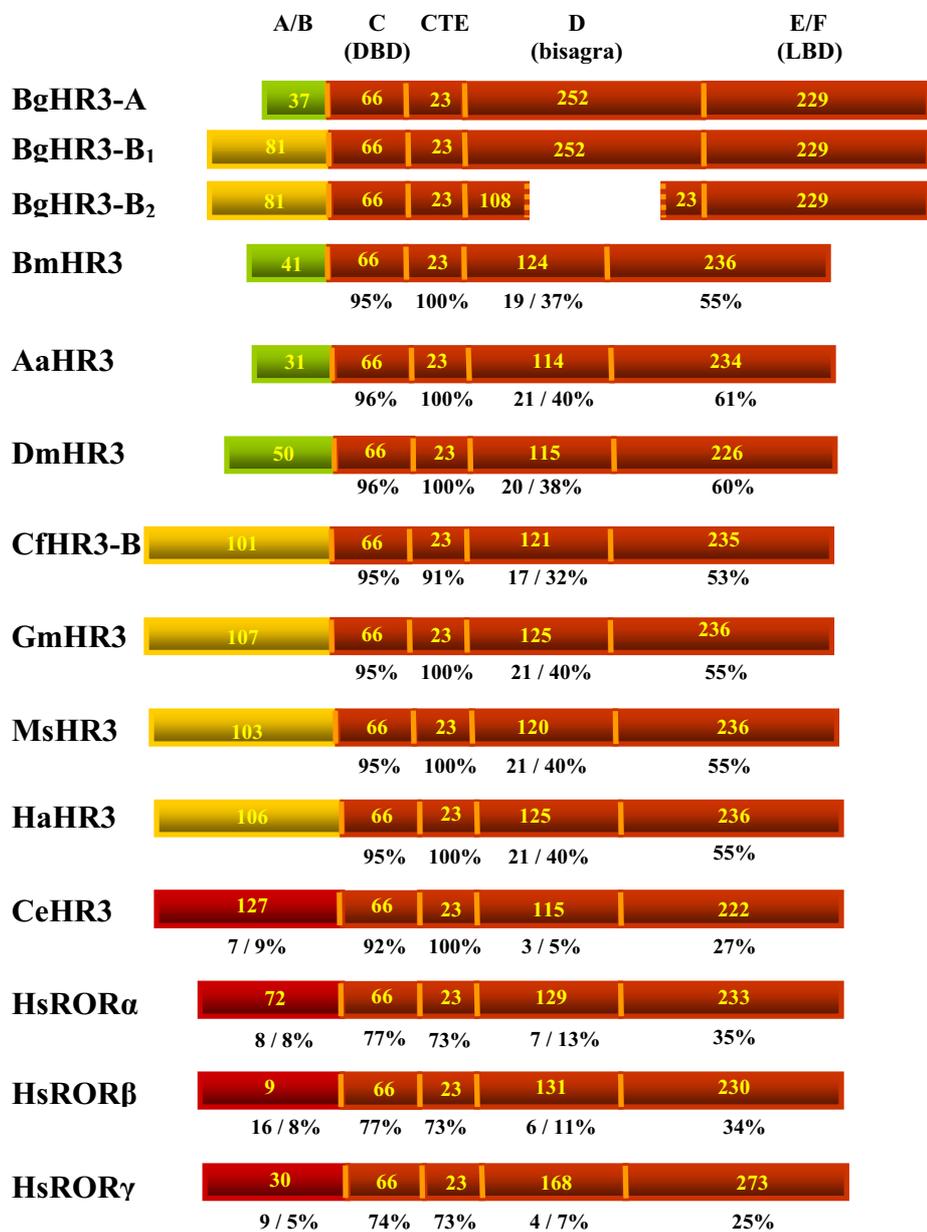
Finalmente, el LBD de las isoformas de BgHR3 presenta poca similitud con el resto de secuencias analizadas. El menor grado de similitud lo encontramos con *C. elegans*, CeHR3, y con las isoformas de *H. sapiens*, HsROR α , HsROR β y HsROR γ (figura 3.3B). Sin embargo, en la región C-terminal del LBD, encontramos el dominio AF-2, compuesto por ocho aminoácidos, que se encuentra muy conservado entre todos los miembros de la familia *Hr3/Ror*.

Figura 3.3.- Comparación de los dominios estructurales de las isoformas de HR3 de *B. germanica* con diferentes miembros de la subfamilia *Hr3/Ror* de receptores nucleares. (A) Comparación de la región A/B de BgHR3-A, BgHR3-B₁ y BgHR3-B₂ con sus ortólogos de insectos. Los porcentajes indican el grado de similitud respecto a BgHR3. En la región bisagra se diferencia entre las isoformas BgHR3-A y BgHR3-B₁, respecto a BgHR3-B₂. (B) Comparación de los dominios estructurales de las isoformas de HR3 de *B. germanica* con diferentes miembros de la subfamilia *Hr3/Ror* de receptores nucleares. Las secuencias aminoacídicas se alinearon en base a la máxima similitud entre los receptores nucleares BgHR3-A₁, BgHR3-B₁ y BgHR3-B₂ de *B. germanica*, BmHR3 de *B. mori* (Eystathioy *et al.*, 2001), AaHR3 de *Aedes aegypti* (Kapitskaya *et al.*, 2000), DmHR3 de *D. melanogaster* (Koelle *et al.*, 1992), CfHR3-B y CfHR3-C de *Coristoneura fumiferana* (Palli *et al.*, 1996, 1997), GmHR3 de *G. melonella* (Jindra *et al.*, 1994), MsHR3 de *M. sexta* (Palli *et al.*, 1992), HaHR3 de *H. armigera* (Zhao, *et al.*, 2004), CeHR3 de *C. elegans* (Kostrouch *et al.*, 1995) y HsROR α , HsROR β , y HsROR γ de *H. sapiens* (Giguere *et al.*, 1994, Paravicini, *et al.*, 1996., Hirose, *et al.*, 1994). Los dominios estructurales se encuentran indicados sobre BgHR3-A. Los números dentro de cada dominio indican el número de aminoácidos y los porcentajes indican el grado de similitud respecto a BgHR3. Aquellos dominios en los que las secuencias de las tres isoformas no coinciden, se indican los porcentajes de identidad respecto a cada una de ellas: BgHR3-A y BgHR3-B₁/B₂, en la región A/B, y BgHR3-A/B₁ y BgHR3-B₂, en la región D, respectivamente.

A

| | BgHR3-A ₁ | BgHR3-B ₁ y B ₂ |
|---------|----------------------|---------------------------------------|
| BmHR3-A | 26% | 17% |
| AaHR3-A | 26% | 18% |
| DmHR3-A | 18% | 14% |
| CfHR3-B | 9% | 17% |
| GmHR3-B | 9% | 16% |
| MsHR3-B | 9% | 15% |
| HaHR3-B | 9% | 14% |
| CfHR3-C | 12% | 11% |

B



3.2.2. Clonaje de dos cDNAs correspondientes a los homólogos de FTZ-F1 en *B. germanica*

Para el clonaje de los cDNAs homólogos de FTZ-F1 de *B. germanica* se siguió la estrategia descrita anteriormente para el clonaje de BgHR3. Así, mediante la aplicación de la técnica de RT-PCR con oligonucleótidos degenerados basados en las secuencias conservadas de FTZ-F1 de otros insectos, se obtuvo un fragmento inicial de 134 nucleótidos. El análisis de esta secuencia confirmó que se trataba de un fragmento del homólogo de FTZ-F1 de *B. germanica*. Seguidamente, mediante el uso de 5' y 3'RACE, se completaron dos secuencias correspondientes a los homólogos de FTZ-F1 de *B. germanica* y que denominamos BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B (figuras 3.4 y 3.5).

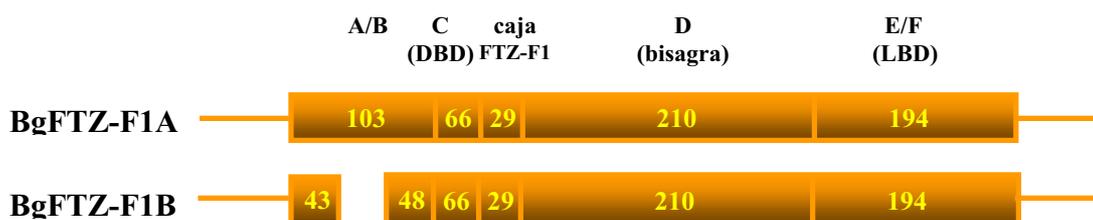


Figura 3.4.- Representación esquemática de las dos isoformas de FTZ-F1 de *B. germanica*. Los dominios funcionales se indican sobre BgFTZ-F1A. Los números indican el número de aminoácidos de cada dominio.

BgFTZ-F1A presenta un tamaño de 2.366 nucleótidos, mientras que BgFTZ-F1B de 2.327 nucleótidos, que corresponden a una única pauta de lectura de 602 y 598 aminoácidos, respectivamente. Al igual que en el caso anterior, la confirmación de la traducibilidad de ambas secuencias se realizó mediante la técnica de la transcripción-traducción *in vitro*, obteniéndose proteínas de peso molecular similar al teórico, 65,57 kDa para BgFTZ-F1A y 64,18 kDa para BgFTZ-F1B.

1 TGTCTACAGACCTACATTTATACTGCGTTCATTTTTTAAATATCACGTACAGAAGAAGATTTTGTGAAGCCTTGGCA
 81 CAGAGGAATAGTTCAGGGCTTTTGAAGCTCTGAGTTGGAAGAATCGGGTTCAACATAGACGGATTACTGCCCAAACAT
1 M

161 GCATGAGGAGTCAACCAGTAGGCCAATGAGCGTTCACGCTCGGTTGCCACTACCACCTCAACCCACAGCTACAGACC
2 H E E S T S R P M S V P S S V A T T T T Q P T A T D H

241 ACAATGCAAGCGAGCTACAAGTGCATTCTTCTAGTTCTGCAGGTTCCGCCCTATATAGTCTACACAGCGAATCAGAG
29 N A S E L Q V S F S S S A G S A L Y S L H S E S E

321 GAAGCCGAGGTGGTGGTTCGACCATGGAGGTGCCCGCCGCGGCGAGCTATCAGGCGTCGCCGGGCGTCTCCGCCGCGAC
55 E A G G G G S T M E V A A A G S Y Q A S P G V S A A T

DBD

401 GGTGGCCGTCGTACGGGCATGACAGGAGGAGACCTCCCGACACGAAGGAGGCATCGAAGAGCTCTGCCCCGTCTGCG
82 V A V V T G M T G G D L P D T K E G I E E L C P V C G

481 GAGACAAGGTCTCGGGTACCACTACGGCTCCTCACGTGCGAGTCTGCAAAGGATTCTTCAAGAGGACAGTCAAAAC
108 D K V S G Y H Y G L L T C E S C K G F F K R T V Q N

561 AAGAAGTCTACACATGCGTCGCCGAAAGGAGTGTGCACATCGACAAGACGCAGAGGAAGCGGTGCCATATTGCCGCTT
134 K K V Y T C V A E R S C H I D K T Q R K R C P Y C R F

641 CCAGAAGTGCCTCGACGTCGGCATGAAACTTGAAGCTGTTCGCGCAGACCCGATGCGCGGCGGAGAAACAAATTCGGCC
161 Q K C L D V G M K L E A V R A D R M R G G R N K F G P

721 CGATGTACAAGAGGGACAGAGCCGCAAGTTGAGATGATGCGGCAACGCCAGATAGCAGTGCAGACGCTCAGAGGATCG
188 M Y K R D R A R K L Q M M R Q R Q I A V Q T L R G S

801 CACAGCCTCGGGGATAACGTGACCTTGAGCTACCCCCAGGAGGAGGGGCGGGACTTCCCCGTTCGCGAGTCTGCACAT
214 H S L G D N V T L S Y P Q A G G A G T S P F A S L H I

881 AAAGCAAGAGATCCAGATCCCGCAAGTATCGTCTGAGTGCATCGCCCCGACTCCTCCCCAGCCCCATCGCCGTGGCCC
241 K Q E I Q I P Q V S S L T S S P D S S P S P I A V A L

961 TAGGCCAAGCGGGGGCGGCTCCATCCCCGAGCCTCGAGCGCCGCCAGCAGGGCACTCTCCACATCATCGGGGGCGGG
268 G Q A G A A S I P G A S S A G Q Q G T L H I I G G G

1041 ACACCGAGCACTGCCAACCCACGGTCTGAGCAGCGAGAGCAAACCTGTGGACCGCGGCGTGAACCCACGACGCCCTC
294 T P S T A N P T V L S S E S K L W T A A S N P T T P S

1121 CCCGCACTCCCTGTCCCCGAAGACGTTCCACTTCGACAACGTGTTACCCAACGAGGATCCACCCCACTGCGCCTTCCG
321 P H S L S P K T F H F D N V L P N G G S T P S A P S A

1201 CCCCCAACGCCAACCGGGGGGGCACCAGCCACCACCACCAGGGCCCTCCTCCGTCAAGTATTCCCCCATCATTCGG
348 P N A N A G G G T G T T T T G P S S V K Y S P I I R

1281 GACTTTGTTCAAACCTGTGGACGATCGCGAGTGGCAGAAGTCTGTTTCGAACTCTTGAGAACCAGACGTACAATCAGTG
374 D F V Q T V D D R E W Q K S L F E L L Q N Q T Y N Q C

LBD

1361 TGAGGTGGACCTGTTTGAAGTCTGTGCAAAGTGTGACAGAAATTTGTTCTCTCAGGTCGACTGGGCGAGGAATCCG
401 E V D L F E L M C K V L D Q N L F S Q V D W A R N S V

1441 TCTTCTCAAGGACCTCAAGGTGGACGACCAGATGAAGCTGTTGCAGCATTCGTGGTCCGACATGTTGGTCTGGACCAC
428 F F K D L K V D D Q M K L L Q H S W S D M L V L D H

1521 ATGCACCAGCGCATGCACAACAACCTCCCTGACGAGACGACGCTGCCAACGGACAGAAGTTCGACCTCTGTGCTCGG
454 M H Q R M H N N L P D E T T L P N G Q K F D L L C L G

1601 CCTCCTCGGGGTGCCACCCTCGCAGACCCTTCAGCGACCTCATGGCCAAGTTCAGGACCTCAAGTTCGACGTCACCG
481 L L G V P T L A D H F S D L M A K L Q D L K F D V T D

1681 ACTACATCTGCGTCAAGTTCCTGCTCTTCTCAACCCCGAGGTTTCGAGGCATCATGAACCGGAGGCACGTGCAGGAAGGC
508 Y I C V K F L L L L N P E V R G I M N R R H V Q E G

```

1761 TACGATCAAGTGGCAACAGGCACATGACTACACAGTCAATTGCTACCTCAAATCCAGGACAAGTTTACGAACTACT
534 Y D Q V Q Q A L M D Y T V N C Y P Q I Q D K F T K L L

1841 GTCGTGCTCCCAGAAATCCACCACATGGCCAGTAGAGGGGAGGAGCATCTGTACCACAAACTGCAATGGTGGAGCCC
561 L V L P E I H H M A S R G E E H L Y H K H C N G G A P

1921 CCACGCAAACACTGCTCATGGAGATGCTACATGCCAAACGGAAATAGCATCCGCACGCTCCAAGATCCAAGGCAACCGTT
588 T Q T L L M E M L H A K R K *

2001 GTTAACTGAAATGAATTGTTGACAAAGTCCCKCGAGTCTAAGGCCGGTCCCTCAAATCTCGCGTTGGTTCTAATCAGTTC
2081 GTCCAGCCGCATCATCACGTAGGAGCTGCCACAGTGGTGATTGGTGTAGGCCTTGGCAGCGGAGTAGGTGTTTCAGGTGG
2161 TCGGTTGGTTACCAAGTGTGCGCGTAGTCAGTGTGGACAAGATGGGCATTATGCGAGTTACCTATAACGCAGCAAGTGCA
2241 ATACAAAACGCTGGCAAACACATTGGCTTCTGTACTTTAAAAAAAAGAGAACTCATAGCACAGTGAAAGACTACT
2321 GGAATGTCATATTTTATATGCCTGTTGACTTTTTTTTTAAAGAAAG

```

Figura 3.5.- Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las dos isoformas del receptor nuclear FTZ-F1 de *B. germanica*. cDNA completo de la isoforma BgFTZ-F1A. La delección presente en la isoforma BgFTZ-F1B se indica mediante subrayado. Tanto el dominio de unión a DNA (DBD) como el dominio de unión a ligando (LBD) están recuadrados e indicados. Dentro del DBD la *caja-p* está resaltada en negrita. La caja FTZ-F1 se indica con un doble subrayado. Dentro del LBD se indica la región AF-2 en cursiva y negrita. Los codones de paro se representan con un asterisco.

Un análisis estructural detallado demostró que ambas secuencias son idénticas, con la excepción de una inserción/delección de 36 nucleótidos en la región A/B que no produce cambios en la pauta de lectura (figuras 3.4 y 3.5). La región A/B presenta 103 aminoácidos en BgFTZ-F1A y 91 aminoácidos en BgFTZ-F1B. El DBD está compuesto por 66 aminoácidos en ambas isoformas y es donde encontramos la *caja-p* (indicada en negrita en la figura 3.5), que junto con la caja FTZ-F1, formada por 29 aminoácidos (doble subrayado en la figura 3.5), son las responsables de la unión de la proteína a sus elementos de respuesta en el DNA (Ueda *et al.*, 1992). A continuación encontramos la región bisagra, que consta de 210 aminoácidos. Finalmente, en la región carboxi-terminal de la proteína, encontramos el LBD formado por 194 aminoácidos, con el dominio de transactivación independiente de ligando, AF-2 (indicada en negrita y cursiva en la figura 3.5). Tras el codón de parada se encuentra la región 3' no codificante formada por 402 nucleótidos y en la que no encontramos secuencias de poliadenilación, lo que sugiere que se trataría de una región 3' no codificante incompleta.

La comparación de los diferentes dominios con los de sus ortólogos en otras especies de insectos y vertebrados muestran que las máximas similitudes se encuentran

| | A/B | C caja (DBD) FTZ-F1 | | D (bisagra) | E/F (LBD) | |
|-----------------------------------|-----|---------------------|------|-------------|-----------|-----|
| BgFTZ-F1A | 103 | 66 | 29 | 210 | 194 | |
| BgFTZ-F1B | 43 | 48 | 66 | 29 | 210 | 194 |
| BmFTZ-F1 | 90 | 66 | 29 | 119 | 231 | |
| | 22% | 94% | 94% | 30% | 76% | |
| MsFTZ-F1 | 97 | 66 | 29 | 113 | 273 | |
| | 19% | 96% | 100% | 30% | 68% | |
| DmFTZ-F1β | 282 | 66 | 29 | 189 | 233 | |
| | 3% | 98% | 100% | 24% | 73% | |
| AaFTZ-F1β | 336 | 66 | 29 | 173 | 232 | |
| | 3% | 96% | 100% | 36% | 79% | |
| MeFTZ-F1 | 32 | 66 | 29 | 140 | 274 | |
| | 13% | 95% | 93% | 12% | 52% | |
| CeNHR-25 | 13 | 66 | 29 | 186 | 266 | |
| | 1% | 81% | 69% | 10% | 17% | |
| HsLRH-1 | 85 | 66 | 29 | 119 | 238 | |
| | 6% | 86% | 84% | 7% | 41% | |
| HsSF-1 | 12 | 66 | 29 | 114 | 236 | |
| | 3% | 86% | 81% | 8% | 32% | |

Figura 3.6.- Comparación de los dominios estructurales de las isoformas de FTZ-F1 de *B. germanica* con diferentes miembros de la subfamilia FTZ-F1/SF-1 de receptores nucleares. Las secuencias aminoacídicas se alinearon en base a la máxima similitud entre los receptores nucleares BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B de *B. germanica*, BmFTZ-F1 de *B. mori* (Sun *et al.*, 1994, modificada según Schwartz *et al.*, 2001), AaFTZ-F1 de *A. aegypti* (Li *et al.*, 2000), Dm β FTZ-F1 de *D. melanogaster* (Lavorgna *et al.*, 1991, modificada según Schwartz *et al.*, 2001), MsFTZ-F1 de *M. sexta* (Weller *et al.*, 2001), MeFTZ-F1 de *M. ensis* (Chan y Chan, 1999), CeNHR25 de *C. elegans* (Gissendanner y Sluder, 2000) y HsLRH-1, y HsSF-1 de *H. sapiens* (Wong *et al.*, 1996; Oba *et al.*, 1996). Los dominios estructurales se encuentran indicados sobre BgFTZ-F1-A. Los números dentro de cada dominio indican el número de aminoácidos y los situados bajo cada dominio indican el porcentaje de similitud respecto a BgFTZ-F1. En el dominio A/B se indican los porcentajes de identidad respecto a BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B.

en el DBD y en la caja FTZ-F1. BgFTZ-F1A y B comparten hasta un 98 % de los aminoácidos presentes en el DBD con sus ortólogos de insectos, y un 100 % de la caja FTZ-F1 (figura 3.6), confirmando la importancia de estas regiones en el reconocimiento del DNA. El menor grado de similitud se encuentra al comparar las regiones bisagra (hasta un 36 % con el resto de insectos y entre un 7 % y un 10 % entre las secuencias de vertebrados). Al igual que ocurre en BgHR3, la región bisagra de BgFTZ-F1 es mayor que la del resto de especies comparadas. Por último, también encontramos un alto grado de similitud entre los LBDs de los diferentes insectos (entre el 68 % y el 79 % de similitud) (figura 3.6). La región AF-2, presente en el extremo N-terminal de este dominio (indicada en **negrita y cursiva** en la figura 3.5), es idéntica en todas las secuencias analizadas.

3.3. DISCUSIÓN

En el presente capítulo hemos descrito el clonaje y análisis estructural de tres isoformas del receptor nuclear HR3 (BgHR3-A, BgHR3-B₁ y BgHR3-B₂) así como dos del receptor nuclear FTZ-F1 (BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B) de *B. germanica*.

3.3.1. BgHR3

Las tres isoformas de BgHR3 muestran la organización modular, de dominios discretos, característica de los miembros de la familia de los receptores nucleares (figura 3.3B). El grado de similitud entre las regiones A/B de estos cDNAs con las correspondientes de sus ortólogos de insectos (figura 3.3A) nos permitió clasificar las diferentes isoformas de BgHR3 siguiendo el criterio establecido por Eystathioy *et al.* (2001).

Un análisis detallado de las secuencias de BgHR3 de *B. germanica* muestra que las regiones donde se encuentran las mayores similitudes respecto a sus ortólogos son el DBD y la región CTE. Guiguere y colaboradores (1994, 1995) realizaron un análisis detallado del receptor nuclear ROR α , ortólogo en vertebrados de HR3, y demostraron

que este receptor se unía a un elemento de respuesta *consenso* en el DNA compuesto por una región central 5'-PuGGTCA-3' precedida por una región de cinco nucleótidos rica en adeninas y timinas. En el reconocimiento del DNA intervienen tanto la *caja-p*, uniéndose a la secuencia conservada 5'-PuGGTCA-3', como la región CTE, que se encargaría de reconocer la secuencia rica en adeninas y timinas (Guiguere *et al.*, 1995). Ambas regiones están altamente conservadas en todas las especies de insectos estudiadas. En nuestro caso, las tres isoformas de BgHR3 también presentan una *caja-p* y una región CTE muy conservadas, lo que sugiere que reconocerían elementos de respuesta en el DNA similares a los descritos en otras especies.

Al contrario de lo que ocurre con el DBD, la similitud del LBD entre las diferentes especies de insectos es baja, a excepción de la región AF-2. En *D. melanogaster* (White *et al.*, 1997) y en *B. mori* (Swevers *et al.*, 2002) se ha comprobado que HR3 interacciona con el receptor nuclear E75 mediante sus dominios AF-2. En esta interacción, E75 actúa como un co-represor de HR3, bloqueando su capacidad de transactivación. La similitud encontrada entre la región AF-2 de BgHR3-A, BgHR3-B₁ y BgHR3-B₂ con sus ortólogos de insectos sugeriría que mediante esta región podría interaccionar también con E75 u otros cofactores.

3.3.2. BgFTZ-F1

En insectos, únicamente se han caracterizado los ortólogos de FTZ-F1 de cuatro especies, *D. melanogaster* (Lavorgna *et al.*, 1991), *Aedes aegypti* (Li *et al.*, 2000), *B. mori* (Sun *et al.*, 1994) y *M. sexta* (Weller *et al.*, 2001). En el díptero *A. aegypti* y en los lepidópteros *B. mori* y *M. sexta*, solamente se ha clonado una isoforma de este receptor nuclear, mientras que en *D. melanogaster* se han caracterizado dos isoformas α FTZ-F1 y β FTZ-F1, que difieren únicamente en la zona N-terminal de su región A/B (Ueda *et al.*, 1990; Lavorgna, *et al.*, 1991, 1993). En *B. germanica* hemos clonado dos cDNAs que codifican ortólogos del receptor nuclear FTZ-F1. Dada la baja similitud entre las regiones A/B de los FTZ-F1s de *B. germanica* y *D. melanogaster*, nos fue imposible clasificar las secuencias homólogas de nuestra cucaracha como α o β -FTZ-F1, pasando a denominarlas BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B. Los cDNAs que codifican para las dos

isoformas de BgFTZ-F1 difieren, únicamente, en una inserción/delección de 36 nucleótidos en la región A/B. En insectos, este tipo de isoformas se ha descrito en otros miembros de la familia de los receptores nucleares como son LmRXR-S y LmRXR-L de *L. migratoria* (Hayward *et al.*, 1999, 2003).

Al igual que ocurre con BgHR3, la comparación de las secuencias aminoacídicas de BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B con las de sus ortólogos mostró que las regiones más conservadas eran el DBD y los 29 aminoácidos adyacentes a éste, conocidos como caja FTZ-F1 (Ueda *et al.*, 1992). Varios estudios han demostrado que los miembros de la familia FTZ-F1 se unen como monómeros al elemento de respuesta *consenso* 5'-PyCAAGGPyCPu-3'. La *caja-p* reconocería la región 5'-AGGPyCPu-3' y la caja FTZ-F1 se encargaría de la unión a las tres primeras bases 5'-PyCA-3' (Ueda y Hirose, 1991; Ueda *et al.*, 1992). Tanto la *caja-p* como la caja FTZ-F1 de BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B presentan un alto grado de conservación, lo que sugiere que el elemento de respuesta en el DNA que reconocerían sería similar a los descritos en otras especies.

FTZ-F1, al igual que HR-3, interacciona con otras proteínas mediante la región AF-2 del LBD. Así, por ejemplo, en *D. melanogaster*, se ha caracterizado la interacción de este dominio de FTZ-F1 con el dominio LXXL de la proteína FTZ (Yu *et al.*, 1997; Guichet *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001) y con el co-represor Bonus (Beckstead *et al.*, 2001). De igual modo, en experimentos *in vitro* y en línea celular, se ha demostrado que SF-1, ortólogo de FTZ-F1 en mamíferos, interacciona con proteínas de la familia SRC y CBP/p300 mediante el dominio AF-2 (Ito *et al.*, 1998; Monte *et al.*, 1998; Borud *et al.*, 2002). Las dos isoformas del receptor nuclear FTZ-F1 de *B. germanica* presentan un dominio AF-2 idéntico al presente en *D. melanogaster* (Lavorgna *et al.*, 1993), *B. mori* (Sun *et al.*, 1994), *M. sexta* (Weller *et al.*, 2001) y *A. aegypti* (Li *et al.*, 2000), y solo difiere en un residuo si se comparan con LRH-1 o SF-1 de *H. sapiens* (Wong *et al.*, 1996; Oba *et al.*, 1996) sugiriendo que la interacción mediante este dominio con cofactores, así como su función biológica, se ha conservado entre una especie primitiva, como es *B. germanica*, con respecto a insectos evolucionados, como dípteros y lepidópteros, e incluso con vertebrados.

3.1. ANTECEDENTES

Tal y como se ha descrito en la introducción de la presente memoria, el objetivo principal de esta tesis doctoral es la caracterización del eje regulador EcR- HR3 - FTZ-F1 en el insecto hemimetábolo *B. germanica*. Este eje ha sido caracterizado en detalle en el díptero *D. melanogaster* y en el lepidóptero *M. sexta*. Así, en estos insectos se ha demostrado que la 20E tras unirse a su receptor, EcR, activa la expresión de *Hr3*, que a su vez, induce la expresión de *ftz-fl* (Horner *et al.*, 1995; White *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 1997; Lan *et al.*, 1999; Hiruma y Riddiford, 2003; Riddiford *et al.*, 2003). Estos factores desempeñan funciones esenciales durante la embriogénesis, muda y metamorfosis de estos insectos (Carney *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 1997, 1999; White *et al.*, 1997; Yamada *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 1997; Guichet *et al.*, 1997; Broadus, 1999).

En el presente capítulo abordamos, pues, el clonaje y la caracterización estructural de los receptores nucleares que conforman el eje previamente descrito. Llegados a este punto, cabe mencionar que en los últimos años se ha clonado, en nuestro laboratorio, una isoforma del receptor de ecdisona que se ha denominado BgEcR-A. Es por ello que el objetivo experimental del presente capítulo se centró en el clonaje de los ortólogos de *Hr3* y de *Ftz-fl* de *B. germanica*.

3.2. RESULTADOS

3.2.1. Clonaje de tres cDNAs ortólogos de HR3 en *B. germanica*

El clonaje del ortólogo de HR3 en *B. germanica* se llevó a cabo mediante la técnica de RT-PCR seguido por 5' y 3'RACE. En primer lugar, se diseñaron oligonucleótidos degenerados en base motivos conservados de los dominios de unión a DNA (DBD) de secuencias de HR3 de otras especies de insectos. Mediante RT-PCR se obtuvo un primer clon de 134 nucleótidos. El análisis de la secuencia confirmó que se trataba de un fragmento de un receptor nuclear de la familia de *Hr3/Ror*.

A partir de esta secuencia parcial, y mediante la utilización de las técnicas de 5' y 3'RACE, tal y como se describe en el apartado 2.5, se obtuvieron las secuencias completas de tres cDNAs correspondientes a los ortólogos de HR3 de *B. germanica*, y que se denominaron BgHR3-A, BgHR3-B₁ y BgHR3-B₂ (la estructura de las tres isoformas se representa en la figura 3.1). Los cDNAs presentan un tamaño de 3.503 nucleótidos (correspondientes a 607 aminoácidos), 3.790 nucleótidos (651 aminoácidos) y 2.367 nucleótidos (530 aminoácidos) para BgHR3-A, BgHR3-B₁ y BgHR3-B₂, respectivamente (figura 3.2). Para confirmar la traducibilidad de los cDNAs, se utilizó la técnica de transcripción/traducción *in vitro* de un RNA parental (TNT) tal y como se describe en el apartado 2.11. Esta técnica nos permitió comprobar que los tres cDNAs codifican para proteínas de peso molecular similar al estimado de forma teórica. La isoforma BgHR3-A presenta un peso molecular de 68,05 kDa, la isoforma BHR3-B₁ de 72,90 kDa y la isoforma BgHR3-B₂ de 59,22 kDa.

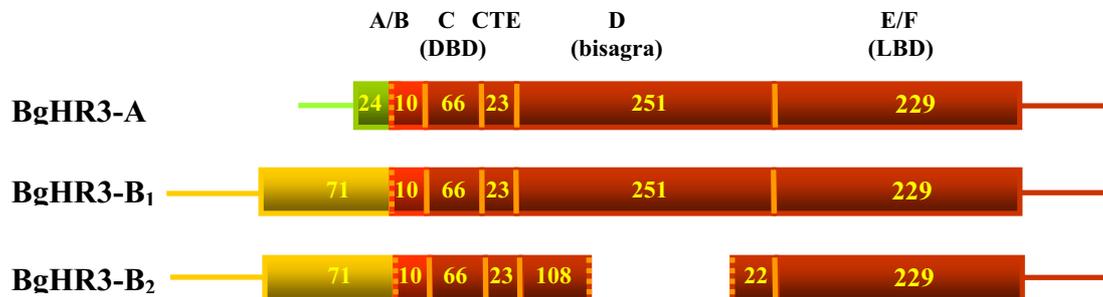


Figura 3.1.- Representación esquemática de las tres isoformas de HR3 de *B. germanica*. Los dominios funcionales se indican sobre BgHR3-A. Los números indican el número de aminoácidos de cada dominio.

Las tres secuencias presentan la organización modular característica de los miembros de la familia de los receptores nucleares (figura 3.1). BgHR3-A posee una región 5' no traducida de 207 nucleótidos, mientras que las isoformas BgHR3-B₁ y BgHR3-B₂ comparten la región 5' no traducida de 362 nucleótidos, así como la

totalidad de la región A/B. La región A/B, donde reside la función de transactivación independiente de ligando, está formada por 34 aminoácidos en la isoforma BgHR3A y 81 aminoácidos en las isoformas BgHR3B₁ y B₂. Los últimos 10 aminoácidos son iguales en las tres isoformas.

Las diferencias observadas en las regiones A/B fueron las que nos permitieron clasificar las tres isoformas de BgHR3 siguiendo el criterio establecido por Eystathioy *et al.* (2001) (figura 3.3A). Tras la región A/B se encuentra el DBD, formado por 66 aminoácidos y que es idéntico en las tres isoformas. El DBD es la región responsable de la unión del receptor nuclear al DNA diana. Los miembros de la familia de *Hr3*, tanto en insectos como en vertebrados, se unen como monómeros a elementos específicos de respuesta en el DNA. Estos elementos de respuesta están compuestos por un núcleo 5'-AGGTCA-3' precedido por una región rica en adeninas y timinas. En el reconocimiento de esta secuencia participan una secuencia de 5 aminoácidos, denominada *caja-p*, situada dentro del DBD (negrita en la figura 3.2), y la región de extensión carboxi-terminal (CTE), formada por 23 aminoácidos y que se encuentra a continuación del DBD (doble subrayado en la figura 3.2).

Entre la región CTE y el inicio del LBD se encuentra la región bisagra, cuya función consiste en favorecer la conformación tridimensional de la proteína. Esta región es idéntica (251 aminoácidos) en las isoformas BgHR3-A y BgHR3-B₁, mientras que en la isoforma BgHR3-B₂ aparece una delección de 121 aminoácidos (subrayada en la figura 3.2).

Por último se encuentra el LBD, compuesto por 330 aminoácidos y que es idéntico en las tres isoformas. En este dominio encontramos la región de transactivación dependiente de ligando denominada AF-2 (indicado en negrita y cursiva en la figura 3.2) que tiene funciones de unión a ligando y de dimerización.

A continuación se compararon las secuencias clonadas con las de HR3 de otras especies de insectos y de vertebrados, y se encontró que las regiones de mayor similitud son el DBD (entre un 96 % y un 74 %) y la región CTE (entre un 100 % y un 73 %) (figura 3.3B), regiones directamente implicadas en el reconocimiento del elemento de

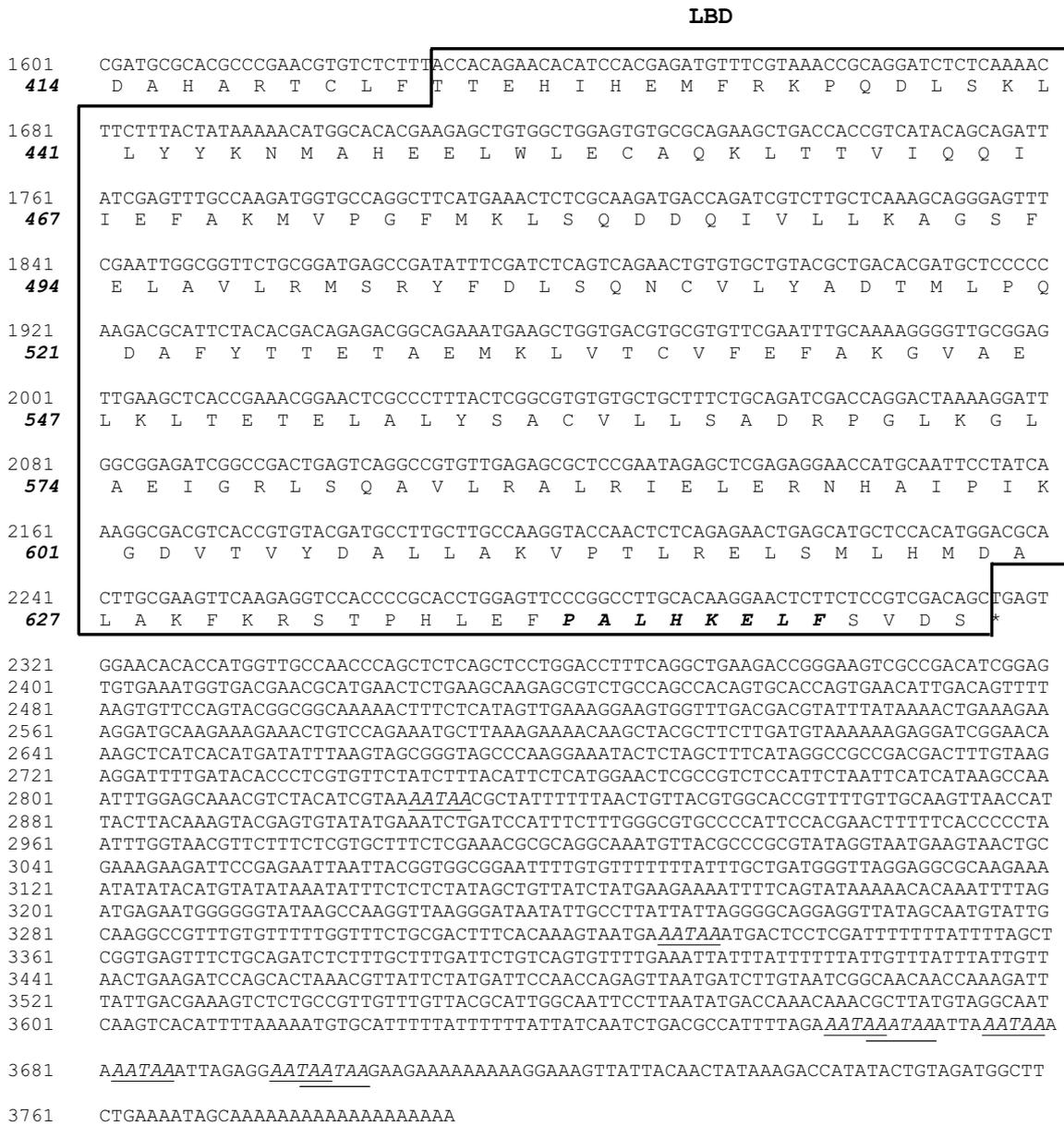


Figura 3.2.- Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las tres isoformas del receptor nuclear HR3 de *B. germanica*. (A) Regiones 5'UTR y A/B correspondientes a la isoforma BgHR3-A. (B) cDNA completo de la isoforma BgHR3-B₁. La delección presente en la isoforma BgHR3-B₂ se indica mediante subrayado. Tanto el dominio de unión a DNA (DBD) como el dominio de unión a ligando (LBD) están recuadrados e indicados. Dentro del DBD la *caja-p* está resaltada en negrita. La extensión carboxi terminal (CTE) del DBD se indica con un doble subrayado. Dentro del LBD se indica la región AF-2 en cursiva y negrita. En la región 3'UTR se han indicado las señales de poliadenilación mediante cursiva y subrayado. Los codones de paro se representan con un asterisco.

respuesta del DNA. Por el contrario, la región bisagra presenta el menor grado de similitud con las diferentes especies de insectos (entre el 40 % y el 17 %) y con las de vertebrados (entre el 13 % y el 4 %). Cabe destacar que la región bisagra de BgHR3 es como mínimo el doble de grande que la de cualquier otro miembro de la familia *Hr3/Ror*.

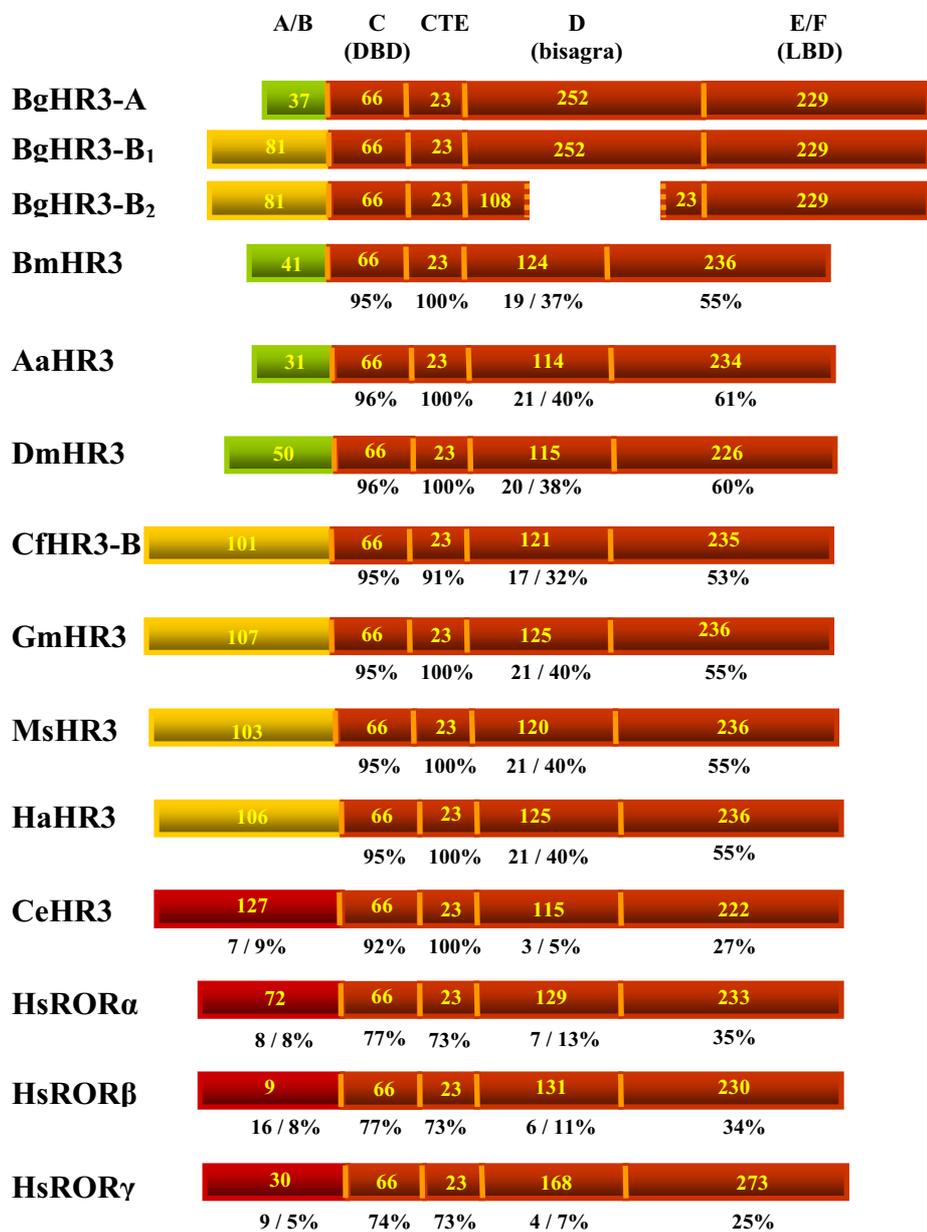
Finalmente, el LBD de las isoformas de BgHR3 presenta poca similitud con el resto de secuencias analizadas. El menor grado de similitud lo encontramos con *C. elegans*, CeHR3, y con las isoformas de *H. sapiens*, HsROR α , HsROR β y HsROR γ (figura 3.3B). Sin embargo, en la región C-terminal del LBD, encontramos el dominio AF-2, compuesto por ocho aminoácidos, que se encuentra muy conservado entre todos los miembros de la familia *Hr3/Ror*.

Figura 3.3.- Comparación de los dominios estructurales de las isoformas de HR3 de *B. germanica* con diferentes miembros de la subfamilia *Hr3/Ror* de receptores nucleares. (A) Comparación de la región A/B de BgHR3-A, BgHR3-B₁ y BgHR3-B₂ con sus ortólogos de insectos. Los porcentajes indican el grado de similitud respecto a BgHR3. En la región bisagra se diferencia entre las isoformas BgHR3-A y BgHR3-B₁, respecto a BgHR3-B₂. (B) Comparación de los dominios estructurales de las isoformas de HR3 de *B. germanica* con diferentes miembros de la subfamilia *Hr3/Ror* de receptores nucleares. Las secuencias aminoacídicas se alinearon en base a la máxima similitud entre los receptores nucleares BgHR3-A₁, BgHR3-B₁ y BgHR3-B₂ de *B. germanica*, BmHR3 de *B. mori* (Eystathioy *et al.*, 2001), AaHR3 de *Aedes aegypti* (Kapitskaya *et al.*, 2000), DmHR3 de *D. melanogaster* (Koelle *et al.*, 1992), CfHR3-B y CfHR3-C de *Coristoneura fumiferana* (Palli *et al.*, 1996, 1997), GmHR3 de *G. melonella* (Jindra *et al.*, 1994), MsHR3 de *M. sexta* (Palli *et al.*, 1992), HaHR3 de *H. armigera* (Zhao, *et al.*, 2004), CeHR3 de *C. elegans* (Kostrouch *et al.*, 1995) y HsROR α , HsROR β , y HsROR γ de *H. sapiens* (Giguere *et al.*, 1994, Paravicini, *et al.*, 1996., Hirose, *et al.*, 1994). Los dominios estructurales se encuentran indicados sobre BgHR3-A. Los números dentro de cada dominio indican el número de aminoácidos y los porcentajes indican el grado de similitud respecto a BgHR3. Aquellos dominios en los que las secuencias de las tres isoformas no coinciden, se indican los porcentajes de identidad respecto a cada una de ellas: BgHR3-A y BgHR3-B₁/B₂, en la región A/B, y BgHR3-A/B₁ y BgHR3-B₂, en la región D, respectivamente.

A

| | BgHR3-A ₁ | BgHR3-B ₁ y B ₂ |
|---------|----------------------|---------------------------------------|
| BmHR3-A | 26% | 17% |
| AaHR3-A | 26% | 18% |
| DmHR3-A | 18% | 14% |
| CfHR3-B | 9% | 17% |
| GmHR3-B | 9% | 16% |
| MsHR3-B | 9% | 15% |
| HaHR3-B | 9% | 14% |
| CfHR3-C | 12% | 11% |

B



3.2.2. Clonaje de dos cDNAs correspondientes a los homólogos de FTZ-F1 en *B. germanica*

Para el clonaje de los cDNAs homólogos de FTZ-F1 de *B. germanica* se siguió la estrategia descrita anteriormente para el clonaje de BgHR3. Así, mediante la aplicación de la técnica de RT-PCR con oligonucleótidos degenerados basados en las secuencias conservadas de FTZ-F1 de otros insectos, se obtuvo un fragmento inicial de 134 nucleótidos. El análisis de esta secuencia confirmó que se trataba de un fragmento del homólogo de FTZ-F1 de *B. germanica*. Seguidamente, mediante el uso de 5' y 3'RACE, se completaron dos secuencias correspondientes a los homólogos de FTZ-F1 de *B. germanica* y que denominamos BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B (figuras 3.4 y 3.5).



Figura 3.4.- Representación esquemática de las dos isoformas de FTZ-F1 de *B. germanica*. Los dominios funcionales se indican sobre BgFTZ-F1A. Los números indican el número de aminoácidos de cada dominio.

BgFTZ-F1A presenta un tamaño de 2.366 nucleótidos, mientras que BgFTZ-F1B de 2.327 nucleótidos, que corresponden a una única pauta de lectura de 602 y 598 aminoácidos, respectivamente. Al igual que en el caso anterior, la confirmación de la traducibilidad de ambas secuencias se realizó mediante la técnica de la transcripción-traducción *in vitro*, obteniéndose proteínas de peso molecular similar al teórico, 65,57 kDa para BgFTZ-F1A y 64,18 kDa para BgFTZ-F1B.

1 TGTCTACAGACCTACATTTATACTGCGTTCATTTTTTAAATATCACGTACAGAAGAAGATTTTGTGAAGCCTTGGCA
 81 CAGAGGAATAGTTCAGGGCTTTTTGAAGCTCTGAGTTGGAAGAATCGGGTTCAACATAGACGGATTACTGCCCAAACAT
1 M

161 GCATGAGGAGTCAACCAGTAGGCCAATGAGCGTTCACGCTCGGTTGCCACTACCACCTCAACCCACAGCTACAGACC
2 H E E S T S R P M S V P S S V A T T T T Q P T A T D H

241 ACAATGCAAGCGAGCTACAAGTGCATTCTTCTAGTTCTGCAGGTTCCGCCCTATATAGTCTACACAGCGAATCAGAG
29 N A S E L Q V S F S S S A G S A L Y S L H S E S E

321 GAAGCCGAGGTTGGTGGTTCGACCATGGAGGTGCCCGCCGCGGCGAGCTATCAGGCGTCGCCGGGCGTCTCCGCCGCGAC
55 E A G G G G S T M E V A A A G S Y Q A S P G V S A A T

DBD

401 GGTGGCCGTCGTACGGGCATGACAGGAGGAGACCTCCCGACACGAAGGAGGCATCGAAGAGCTCTGCCCCGTCTGCG
82 V A V V T G M T G G D L P D T K E G I E E L C P V C G

481 GAGACAAGGTCTCGGGTACCACTACGGCTCCTCACGTGCGAGTCTGCAAAGGATTCTTCAAGAGGACAGTCAAAAC
108 D K V S G Y H Y G L L T C E S C K G F F K R T V Q N

561 AAGAAGTCTACACATGCGTCGCCGAAAGGAGTTGTACATCGACAAGACGCAGAGGAAGCGGTGCCATATTGCCGCTT
134 K K V Y T C V A E R S C H I D K T Q R K R C P Y C R F

641 CCAGAAGTGCCTCGACGTCGGCATGAAACTTGAAGCTGTTGCGCGAGACCGCATGCGCGGCGGAGAAACAAATTCGGCC
161 Q K C L D V G M K L E A V R A D R M R G G R N K F G P

721 CGATGTACAAGAGGGACAGAGCCGCAAGTTGAGATGATGCGGCAACGCCAGATAGCAGTGCAGACGCTCAGAGGATCG
188 M Y K R D R A R K L Q M M R Q R Q I A V Q T L R G S

801 CACAGCCTCGGGGATAACGTGACCTTGAGCTACCCCCAGGAGGAGGGGCGGGACTTCCCCGTTCGCGAGTCTGCACAT
214 H S L G D N V T L S Y P Q A G G A G T S P F A S L H I

881 AAAGCAAGAGATCCAGATCCCGCAAGTATCGTCTGAGTGCATCGCCCCGACTCCTCCCCAGCCCCATCGCCGTGGCCC
241 K Q E I Q I P Q V S S L T S S P D S S P S P I A V A L

961 TAGGCCAAGCGGGGGCGGCTCCATCCCCGAGCCTCGAGCGCCGCCAGCAGGGCACTCTCCACATCATCGGGGGCGGG
268 G Q A G A A S I P G A S S A G Q Q G T L H I I G G G

1041 ACACCGAGCACTGCCAACCCACGGTCTGAGCAGCGAGAGCAAACCTGTGGACCGCGGCGTGAACCCACGACGCCCTC
294 T P S T A N P T V L S S E S K L W T A A S N P T T P S

1121 CCCGCACTCCCTGTCCCCGAAGACGTTCCACTTCGACAACGTGTTACCCAACGAGGATCCACCCCACTGCGCCTTCCG
321 P H S L S P K T F H F D N V L P N G G S T P S A P S A

1201 CCCCCAACGCCAACCGGGGGGGCACCAGCCACCACCACCAGGGCCCTCCTCCGTCAAGTATCCCCCATCATTCGG
348 P N A N A G G G T G T T T T G P S S V K Y S P I I R

1281 GACTTTGTCAAACCTGTGGACGATCGCGAGTGGCAGAAGTCTGTTTCGAACTCTTGAGAACCAGACGTACAATCAGTG
374 D F V Q T V D D R E W Q K S L F E L L Q N Q T Y N Q C

LBD

1361 TGAGGTGGACCTGTTTGAAGTCTGTGCAAAGTGTGACAGAAATTTGTTCTCTCAGGTCGACTGGGCGAGGAATCCG
401 E V D L F E L M C K V L D Q N L F S Q V D W A R N S V

1441 TCTTCTCAAGGACCTCAAGGTGGACGACCAGATGAAGCTGTTGACGATTCGTGGTCCGACATGTTGGTCTGGACCAC
428 F F K D L K V D D Q M K L L Q H S W S D M L V L D H

1521 ATGCACCAGCGCATGCACAACAACCTCCCTGACGAGACGACGCTGCCAACGGACAGAAGTTCGACCTCTGTGCTCCG
454 M H Q R M H N N L P D E T T L P N G Q K F D L L C L G

1601 CCTCCTCGGGGTGCCACCCTCGCAGACCCTTCAGCGACCTCATGGCCAAGTTGCAGGACCTCAAGTTCGACGTCACCG
481 L L G V P T L A D H F S D L M A K L Q D L K F D V T D

1681 ACTACATCTGCGTCAAGTTCCTGCTCTCTCAACCCGAGGTTTCGAGGCATCATGAACCGGAGGCACGTGCAGGAAGGC
508 Y I C V K F L L L L N P E V R G I M N R R H V Q E G

```

1761 TACGATCAAGTGGCAACAGGCACATCGGACTACACAGTCAATTGCTACCTCAAATCCAGGACAAGTTTACGAACTACT
534 Y D Q V Q Q A L M D Y T V N C Y P Q I Q D K F T K L L
1841 GTCGTGCTCCCAGAAATCCACCACATGGCCAGTAGAGGGGAGGAGCATCTGTACCACAAACTGCAATGGTGGAGCCC
561 L V L P E I H H M A S R G E E H L Y H K H C N G G A P
1921 CCACGCAAACACTGCTCATGGAGATGCTACATGCCAAACGGAAATAGCATCCGCACGCTCCAAGATCCAAGGCAACCGTT
588 T Q T L L M E M L H A K R K *
2001 GTTAACTGAAATGAATTGTTGACAAAGTCCCKCGAGTCTAAGGCCGGTCCCTCAAATCTCGCGTTGGTTCTAATCAGTTC
2081 GTCCAGCCGCATCATCACGTAGGAGCTGCCACAGTGGTGATTGGTGTAGGCCTTGGCAGCGGAGTAGGTGTTTCAGGTGG
2161 TCGGTTGGTTACCAAGTGTGCGCGTAGTCAGTGTGGACAAGATGGGCATTATGCGAGTTACCTATAACGCAGCAAGTGCA
2241 ATACAAAACGCTGGCAAAACACATTGGCTTCTGTACTTTAAAAAAAAGAGAACTCATAGCACAGTGAAAGACTACT
2321 GGAATGTCATATTTTATATGCCTGTTGACTTTTTTTTTAAAGAAAG

```

Figura 3.5.- Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las dos isoformas del receptor nuclear FTZ-F1 de *B. germanica*. cDNA completo de la isoforma BgFTZ-F1A. La delección presente en la isoforma BgFTZ-F1B se indica mediante subrayado. Tanto el dominio de unión a DNA (DBD) como el dominio de unión a ligando (LBD) están recuadrados e indicados. Dentro del DBD la *caja-p* está resaltada en negrita. La caja FTZ-F1 se indica con un doble subrayado. Dentro del LBD se indica la región AF-2 en cursiva y negrita. Los codones de paro se representan con un asterisco.

Un análisis estructural detallado demostró que ambas secuencias son idénticas, con la excepción de una inserción/delección de 36 nucleótidos en la región A/B que no produce cambios en la pauta de lectura (figuras 3.4 y 3.5). La región A/B presenta 103 aminoácidos en BgFTZ-F1A y 91 aminoácidos en BgFTZ-F1B. El DBD está compuesto por 66 aminoácidos en ambas isoformas y es donde encontramos la *caja-p* (indicada en negrita en la figura 3.5), que junto con la caja FTZ-F1, formada por 29 aminoácidos (doble subrayado en la figura 3.5), son las responsables de la unión de la proteína a sus elementos de respuesta en el DNA (Ueda *et al.*, 1992). A continuación encontramos la región bisagra, que consta de 210 aminoácidos. Finalmente, en la región carboxi-terminal de la proteína, encontramos el LBD formado por 194 aminoácidos, con el dominio de transactivación independiente de ligando, AF-2 (indicada en negrita y cursiva en la figura 3.5). Tras el codón de parada se encuentra la región 3' no codificante formada por 402 nucleótidos y en la que no encontramos secuencias de poliadenilación, lo que sugiere que se trataría de una región 3' no codificante incompleta.

La comparación de los diferentes dominios con los de sus ortólogos en otras especies de insectos y vertebrados muestran que las máximas similitudes se encuentran

| | A/B | C caja (DBD) FTZ-F1 | | D (bisagra) | E/F (LBD) | |
|-----------------------------------|-----|---------------------|------|-------------|-----------|-----|
| BgFTZ-F1A | 103 | 66 | 29 | 210 | 194 | |
| BgFTZ-F1B | 43 | 48 | 66 | 29 | 210 | 194 |
| BmFTZ-F1 | 90 | 66 | 29 | 119 | 231 | |
| | 22% | 94% | 94% | 30% | 76% | |
| MsFTZ-F1 | 97 | 66 | 29 | 113 | 273 | |
| | 19% | 96% | 100% | 30% | 68% | |
| DmFTZ-F1β | 282 | 66 | 29 | 189 | 233 | |
| | 3% | 98% | 100% | 24% | 73% | |
| AaFTZ-F1β | 336 | 66 | 29 | 173 | 232 | |
| | 3% | 96% | 100% | 36% | 79% | |
| MeFTZ-F1 | 32 | 66 | 29 | 140 | 274 | |
| | 13% | 95% | 93% | 12% | 52% | |
| CeNHR-25 | 13 | 66 | 29 | 186 | 266 | |
| | 1% | 81% | 69% | 10% | 17% | |
| HsLRH-1 | 85 | 66 | 29 | 119 | 238 | |
| | 6% | 86% | 84% | 7% | 41% | |
| HsSF-1 | 12 | 66 | 29 | 114 | 236 | |
| | 3% | 86% | 81% | 8% | 32% | |

Figura 3.6.- Comparación de los dominios estructurales de las isoformas de FTZ-F1 de *B. germanica* con diferentes miembros de la subfamilia FTZ-F1/SF-1 de receptores nucleares. Las secuencias aminoacídicas se alinearon en base a la máxima similitud entre los receptores nucleares BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B de *B. germanica*, BmFTZ-F1 de *B. mori* (Sun *et al.*, 1994, modificada según Schwartz *et al.*, 2001), AaFTZ-F1 de *A. aegypti* (Li *et al.*, 2000), Dm β FTZ-F1 de *D. melanogaster* (Lavorgna *et al.*, 1991, modificada según Schwartz *et al.*, 2001), MsFTZ-F1 de *M. sexta* (Weller *et al.*, 2001), MeFTZ-F1 de *M. ensis* (Chan y Chan, 1999), CeNHR25 de *C. elegans* (Gissendanner y Sluder, 2000) y HsLRH-1, y HsSF-1 de *H. sapiens* (Wong *et al.*, 1996; Oba *et al.*, 1996). Los dominios estructurales se encuentran indicados sobre BgFTZ-F1-A. Los números dentro de cada dominio indican el número de aminoácidos y los situados bajo cada dominio indican el porcentaje de similitud respecto a BgFTZ-F1. En el dominio A/B se indican los porcentajes de identidad respecto a BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B.

en el DBD y en la caja FTZ-F1. BgFTZ-F1A y B comparten hasta un 98 % de los aminoácidos presentes en el DBD con sus ortólogos de insectos, y un 100 % de la caja FTZ-F1 (figura 3.6), confirmando la importancia de estas regiones en el reconocimiento del DNA. El menor grado de similitud se encuentra al comparar las regiones bisagra (hasta un 36 % con el resto de insectos y entre un 7 % y un 10 % entre las secuencias de vertebrados). Al igual que ocurre en BgHR3, la región bisagra de BgFTZ-F1 es mayor que la del resto de especies comparadas. Por último, también encontramos un alto grado de similitud entre los LBDs de los diferentes insectos (entre el 68 % y el 79 % de similitud) (figura 3.6). La región AF-2, presente en el extremo N-terminal de este dominio (indicada en **negrita y cursiva** en la figura 3.5), es idéntica en todas las secuencias analizadas.

3.3. DISCUSIÓN

En el presente capítulo hemos descrito el clonaje y análisis estructural de tres isoformas del receptor nuclear HR3 (BgHR3-A, BgHR3-B₁ y BgHR3-B₂) así como dos del receptor nuclear FTZ-F1 (BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B) de *B. germanica*.

3.3.1. BgHR3

Las tres isoformas de BgHR3 muestran la organización modular, de dominios discretos, característica de los miembros de la familia de los receptores nucleares (figura 3.3B). El grado de similitud entre las regiones A/B de estos cDNAs con las correspondientes de sus ortólogos de insectos (figura 3.3A) nos permitió clasificar las diferentes isoformas de BgHR3 siguiendo el criterio establecido por Eystathioy *et al.* (2001).

Un análisis detallado de las secuencias de BgHR3 de *B. germanica* muestra que las regiones donde se encuentran las mayores similitudes respecto a sus ortólogos son el DBD y la región CTE. Guiguere y colaboradores (1994, 1995) realizaron un análisis detallado del receptor nuclear ROR α , ortólogo en vertebrados de HR3, y demostraron

que este receptor se unía a un elemento de respuesta *consenso* en el DNA compuesto por una región central 5'-PuGGTCA-3' precedida por una región de cinco nucleótidos rica en adeninas y timinas. En el reconocimiento del DNA intervienen tanto la *caja-p*, uniéndose a la secuencia conservada 5'-PuGGTCA-3', como la región CTE, que se encargaría de reconocer la secuencia rica en adeninas y timinas (Guiguere *et al.*, 1995). Ambas regiones están altamente conservadas en todas las especies de insectos estudiadas. En nuestro caso, las tres isoformas de BgHR3 también presentan una *caja-p* y una región CTE muy conservadas, lo que sugiere que reconocerían elementos de respuesta en el DNA similares a los descritos en otras especies.

Al contrario de lo que ocurre con el DBD, la similitud del LBD entre las diferentes especies de insectos es baja, a excepción de la región AF-2. En *D. melanogaster* (White *et al.*, 1997) y en *B. mori* (Swevers *et al.*, 2002) se ha comprobado que HR3 interacciona con el receptor nuclear E75 mediante sus dominios AF-2. En esta interacción, E75 actúa como un co-represor de HR3, bloqueando su capacidad de transactivación. La similitud encontrada entre la región AF-2 de BgHR3-A, BgHR3-B₁ y BgHR3-B₂ con sus ortólogos de insectos sugeriría que mediante esta región podría interaccionar también con E75 u otros cofactores.

3.3.2. BgFTZ-F1

En insectos, únicamente se han caracterizado los ortólogos de FTZ-F1 de cuatro especies, *D. melanogaster* (Lavorgna *et al.*, 1991), *Aedes aegypti* (Li *et al.*, 2000), *B. mori* (Sun *et al.*, 1994) y *M. sexta* (Weller *et al.*, 2001). En el díptero *A. aegypti* y en los lepidópteros *B. mori* y *M. sexta*, solamente se ha clonado una isoforma de este receptor nuclear, mientras que en *D. melanogaster* se han caracterizado dos isoformas α FTZ-F1 y β FTZ-F1, que difieren únicamente en la zona N-terminal de su región A/B (Ueda *et al.*, 1990; Lavorgna, *et al.*, 1991, 1993). En *B. germanica* hemos clonado dos cDNAs que codifican ortólogos del receptor nuclear FTZ-F1. Dada la baja similitud entre las regiones A/B de los FTZ-F1s de *B. germanica* y *D. melanogaster*, nos fue imposible clasificar las secuencias homólogas de nuestra cucaracha como α o β -FTZ-F1, pasando a denominarlas BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B. Los cDNAs que codifican para las dos

isoformas de BgFTZ-F1 difieren, únicamente, en una inserción/delección de 36 nucleótidos en la región A/B. En insectos, este tipo de isoformas se ha descrito en otros miembros de la familia de los receptores nucleares como son LmRXR-S y LmRXR-L de *L. migratoria* (Hayward *et al.*, 1999, 2003).

Al igual que ocurre con BgHR3, la comparación de las secuencias aminoacídicas de BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B con las de sus ortólogos mostró que las regiones más conservadas eran el DBD y los 29 aminoácidos adyacentes a éste, conocidos como caja FTZ-F1 (Ueda *et al.*, 1992). Varios estudios han demostrado que los miembros de la familia FTZ-F1 se unen como monómeros al elemento de respuesta *consenso* 5'-PyCAAGGPyCPu-3'. La *caja-p* reconocería la región 5'-AGGPyCPu-3' y la caja FTZ-F1 se encargaría de la unión a las tres primeras bases 5'-PyCA-3' (Ueda y Hirose, 1991; Ueda *et al.*, 1992). Tanto la *caja-p* como la caja FTZ-F1 de BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B presentan un alto grado de conservación, lo que sugiere que el elemento de respuesta en el DNA que reconocerían sería similar a los descritos en otras especies.

FTZ-F1, al igual que HR-3, interacciona con otras proteínas mediante la región AF-2 del LBD. Así, por ejemplo, en *D. melanogaster*, se ha caracterizado la interacción de este dominio de FTZ-F1 con el dominio LXXL de la proteína FTZ (Yu *et al.*, 1997; Guichet *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001) y con el co-represor Bonus (Beckstead *et al.*, 2001). De igual modo, en experimentos *in vitro* y en línea celular, se ha demostrado que SF-1, ortólogo de FTZ-F1 en mamíferos, interacciona con proteínas de la familia SRC y CBP/p300 mediante el dominio AF-2 (Ito *et al.*, 1998; Monte *et al.*, 1998; Borud *et al.*, 2002). Las dos isoformas del receptor nuclear FTZ-F1 de *B. germanica* presentan un dominio AF-2 idéntico al presente en *D. melanogaster* (Lavorgna *et al.*, 1993), *B. mori* (Sun *et al.*, 1994), *M. sexta* (Weller *et al.*, 2001) y *A. aegypti* (Li *et al.*, 2000), y solo difiere en un residuo si se comparan con LRH-1 o SF-1 de *H. sapiens* (Wong *et al.*, 1996; Oba *et al.*, 1996) sugiriendo que la interacción mediante este dominio con cofactores, así como su función biológica, se ha conservado entre una especie primitiva, como es *B. germanica*, con respecto a insectos evolucionados, como dípteros y lepidópteros, e incluso con vertebrados.

**4. ANÁLISIS DEL DESARROLLO
NINFAL DE *B. GERMANICA*.
PATRONES DE EXPRESIÓN Y
REGULACIÓN HORMONAL DE
BgEcR-A, *BgHR3* y *BgFTZ-F1***

4.1. ANTECEDENTES

Una vez clonados y caracterizados estructuralmente los ortólogos de HR3 y FTZ-F1 en *B. germanica*, nuestro siguiente objetivo consiste en establecer los patrones de expresión de BgEcR-A, BgHR3-A, BgHR3-B₁ y BgHR3-B₂ así como de BgFTZ-F1-A y BgFTZ-F1-B en los principales tejidos involucrados en el desarrollo ninfal, esto es, la glándula protorácica, tejido responsable de la síntesis de ecdisteroides, la epidermis, que se encarga de la síntesis de la nueva cutícula poco antes de cada muda y el cuerpo graso, principal órgano biosintético del insecto responsable de la síntesis de la mayoría de proteínas hemolinfáticas. Previamente pretendemos establecer el marco endocrino que controla el desarrollo ninfal. Para ello, cuantificaremos los niveles de ecdisteroides y de HJIII circulantes. Los diferentes análisis se llevarán a cabo en hembras de penúltima (quinta) y última (sexta) fase ninfal.

Dado que la expresión de estos genes está controlada por la 20E en insectos evolucionados, como *D. melanogaster* o *M. sexta* (Karim y Thummel, 1992; Jindra *et al.*, 1996; Huet *et al.*, 1995; Langelan *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 1994; Hiruma y Riddiford, 2001) pretendemos, por último, estudiar la regulación que ejercen la 20E y la HJIII sobre la expresión de estos factores. Para ello, hemos desarrollado un sistema de incubaciones *in vitro* de cuerpos grasos procedentes de ninfas recién emergidas a sexta fase.

4.2. RESULTADOS

4.2.1. Niveles circulantes de ecdisteroides y de HJIII durante el desarrollo ninfal de *B. germanica*

El primer objetivo del presente capítulo consistió en caracterizar el marco endocrino, esto es, la concentración de las dos hormonas principales, los ecdisteroides y la HJIII en la hemolinfa de hembras de penúltima y última fase ninfal. Los ecdisteroides

se cuantificaron mediante la técnica de ELISA, tal y como se describe en el apartado 2.24. Como se aprecia en la figura 4.1, los niveles circulantes de ecdisteroides durante la primera mitad de ambas fases larvianas fueron muy bajos, oscilando entre 0,017 ng/ μ de hemolinfa y 0,1 ng/ μ de hem olinfa. Sin embargo, en la segunda mitad de ambas fases ninfales los niveles de ecdisteroides aumentaron notablemente presentando, en ambos casos, un claro perfil cíclico con valores máximos de 2,7 ng/ μ de hem olinfa a día 5 de la penúltima fase ninfal y de 1,9 ng / μ a día 6 de la última fase ninfal.

Por su parte, los niveles circulantes de HJIII se determinaron en colaboración con el grupo del Prof. Karl Treiblmayr (Universität Salzburg). Los niveles de HJIII son prácticamente constantes durante la quinta fase ninfal, oscilando entre 19 pmol/ml de hemolinfa a día 1 y 68 pmol/ml de hemolinfa a día 5. Por el contrario, justo al entrar en la sexta fase ninfal los niveles de HJIII descendieron hasta 11 pmol/ml y fueron indetectables durante el resto de la fase ninfal.

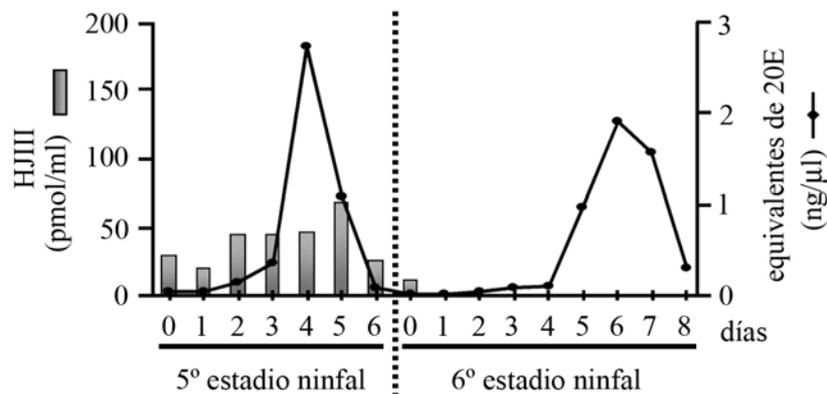


Figura 4.1.- Niveles hemolinfáticos de 20-hidroxicdisona (20E) y de hormona juvenil III (HJIII) durante los dos últimos estadios ninfales de *B. germanica*. Los ecdisteroides hemolinfáticos se expresan como ng de equivalentes de 20E por μ de hem olinfa. Los niveles circulantes de HJIII se expresan como pmol de HJIII por ml de hemolinfa.

4.2.2. Patrones de expresión de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 durante el desarrollo ninfal de *B. germanica*

Tras definir el marco endocrino, se analizaron los patrones de expresión de BgEcR-A, de las tres isoformas de BgHR3, así como de las dos isoformas de BgFTZ-F1 en glándulas protorácicas, epidermis y cuerpos grasos en hembras de quinta y sexta fase ninfal. La determinación de los niveles de mRNA se llevó a cabo mediante RT-PCR/Southern-blot.

Tal y como se muestra en la figura 4.2, en la glándula protorácica, los niveles de expresión de BgEcR-A se mantienen prácticamente constantes en ambas fases ninfales. Por su parte, las tres isoformas de BgHR3 se expresan exclusivamente al final de cada fase ninfal, coincidiendo con el incremento de los ecdisteroides. Dado que los niveles de amplificación de BgHR3-B₁ fueron extremadamente bajos y que BgHR3-B₁ y BgHR3-B₂ presentan el mismo patrón de expresión, se sintetizó una nueva pareja de oligonucleótidos que nos permitió la amplificación conjunta de ambas isoformas (BgHR3-B). Los niveles de BgHR3B fueron idénticos a los obtenidos al amplificar ambas isoformas de forma individualizada. Por último, los patrones de expresión de las dos isoformas de BgFTZ-F1 presentan una dinámica inversa a la de BgHR3. Así, los niveles son altos durante los días en que los niveles de los ecdisteroides circulantes son bajos y desaparecen cuando la concentración de ecdisteroides aumenta. Remarcablemente, durante los dos últimos días de cada fase, exactamente cuando los niveles de ecdisteroides decrecen bruscamente, la expresión de ambos mensajeros vuelve a incrementar de forma significativa. Como en el caso anterior, y dado que BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B se expresan siguiendo el mismo patrón, se diseñó una nueva pareja de oligonucleótidos que nos permitió obtener un único fragmento de amplificación correspondiente a ambos transcritos (BgFTZ-F1-com). La amplificación obtenida mediante estos oligonucleótidos coincidió con las obtenidas para las dos isoformas de forma independiente (figura 4.2).

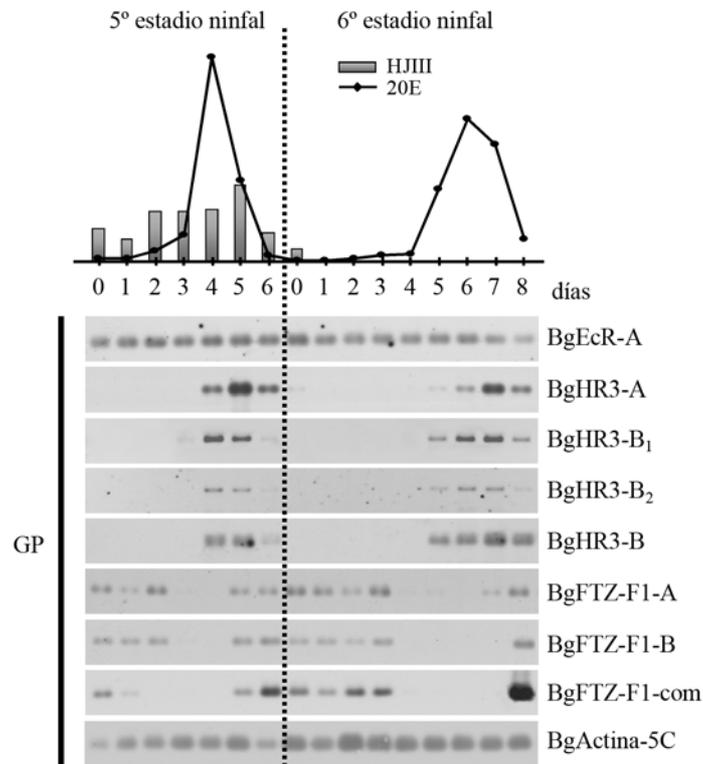


Figura 4.2.- Patrones de expresión de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 en glándulas protorácicas durante los dos últimos estadios ninfales de *B. germanica*. La amplificación específica de cada RNA se llevó a cabo mediante RT-PCR/Southern-blot a partir de la misma cantidad de RNA extraído de glándulas protorácicas (GP) de hembras de quinta y sexta fase ninfal. Como referencia se utilizaron los niveles de BgActina5C. Los Southern-blots son representativos de tres réplicas. En la parte superior se añaden los niveles circulantes de ecdisteroides y de HJIII presentados en la figura 4.1.

A continuación, se establecieron los patrones de expresión de estos transcritos en la epidermis y en el cuerpo graso (figura 4.3). Los niveles de BgEcR-A, BgHR3-A y BgHR3-B, así como los de BgFTZ-F1-com fueron prácticamente idénticos a los descritos en la glándula protorácica.

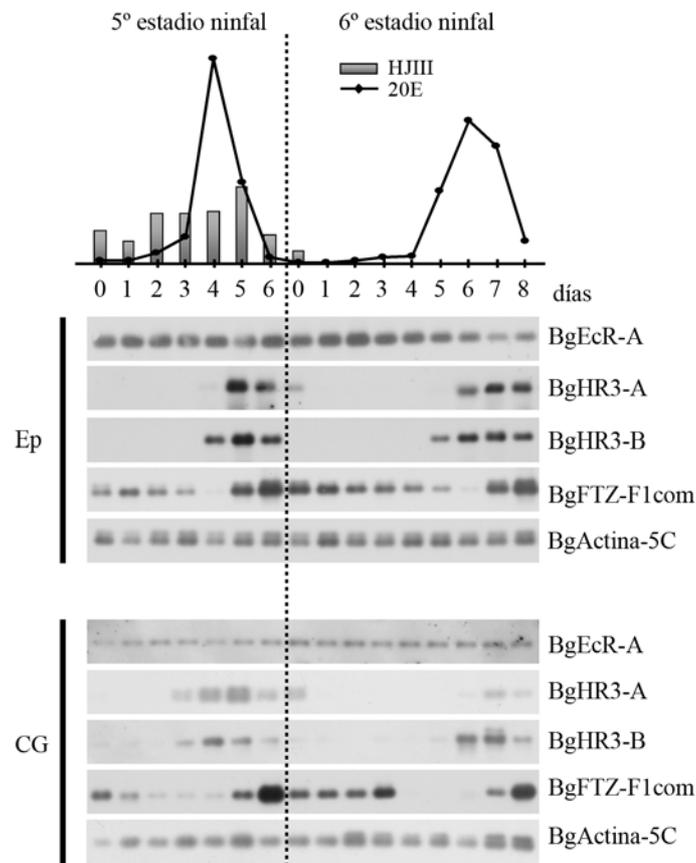


Figura 4.3.- Patrones de expresión de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 en epidermis y cuerpos grasos durante los dos últimos estadios ninfales de *B. germanica*. La amplificación específica de cada RNA se llevó a cabo mediante RT-PCR/Southern-blot a partir de la misma cantidad de RNA extraído de epidermis (Ep) y cuerpos grasos (CG) de hembras de quinta y sexta fase ninfal. Como referencia se utilizaron los niveles de BgActina-5C. Los Southern-blots son representativos de tres réplicas. En la parte superior se añaden los niveles circulantes de ecdisteroides y de HJIII presentados en la figura 4.1.

4.2.3. Regulación hormonal *in vitro* de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1

La dinámica de expresión de los factores estudiados durante el desarrollo ninfal sugiere que la 20E podría controlar la expresión de BgHR3 y de BgFTZ-F1 y que

no tendría ningún efecto sobre la expresión de BgEcR-A. Para comprobar esta hipótesis, establecimos un sistema de incubaciones *in vitro* de cuerpos grasos de hembras recién emergidas a sexta fase ninfal. El análisis molecular de la expresión de los diferentes factores se realizó mediante RT-PCR/Southern-blot.

En primer lugar se incubaron cuerpos grasos con dos dosis de 20E (5×10^{-6} M y 5×10^{-7} M), durante intervalos crecientes de tiempo. Tal y como se muestra en la figura 4.4, la expresión de BgEcR-A y BgFTZ-F1 no varió en presencia de 20E en el medio de cultivo. En cambio, BgHR3-A y BgHR3-B se activaron claramente, presentado, en ambos casos, un máximo de expresión tras 10 h de exposición a la hormona. Además, la activación de ambos transcritos mostró una clara dependencia a la dosis de la hormona.

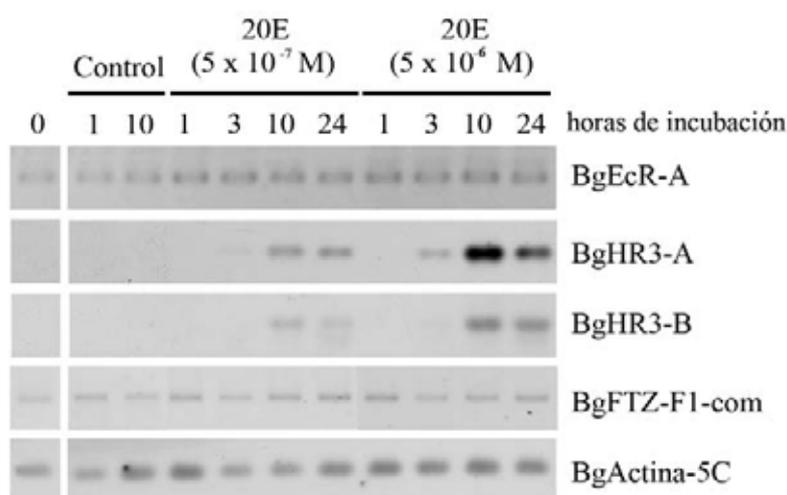


Figura 4.4.- Efecto de dosis crecientes de 20E sobre la expresión de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 en cultivos *in vitro* de cuerpos grasos de ninfas de *B. germanica*. Cuerpos grasos de ninfas de sexta fase fueron incubados con diferentes concentraciones de 20E durante intervalos crecientes de tiempo. Tras la incubación se extrajo el RNA total de los cuerpos grasos y se analizaron los niveles de expresión de los diferentes transcritos mediante RT-PCR/Southern-blot. Como referencia se cuantificaron los niveles de BgActina-5C. Los Southern-blots son representativos de dos réplicas.

Para determinar si el efecto de la 20E sobre la expresión de BgHR3-A y BgHR3-B era directo se utilizó la cicloheximida (Chx), un potente inhibidor de la síntesis proteica. Se incubaron cuerpos grasos de ninfas de sexta fase en presencia de 10^{-4} M de Chx (dosis que inhibe reversiblemente la síntesis proteica en cuerpos grasos de hembras adultas de *B. germanica*, véase Comas *et al.*, 2001, o en presencia de 20E y Chx combinadas durante diferentes intervalos de tiempo. Como puede apreciarse en la figura 4.5, la inducción de BgHR3-A y BgHR3-B por la 20E es directa, ya que la presencia conjunta de Chx y 20E en el medio de cultivo, incrementa considerablemente la inducción de ambos transcritos si se compara con el efecto producido únicamente por la presencia de 20E.

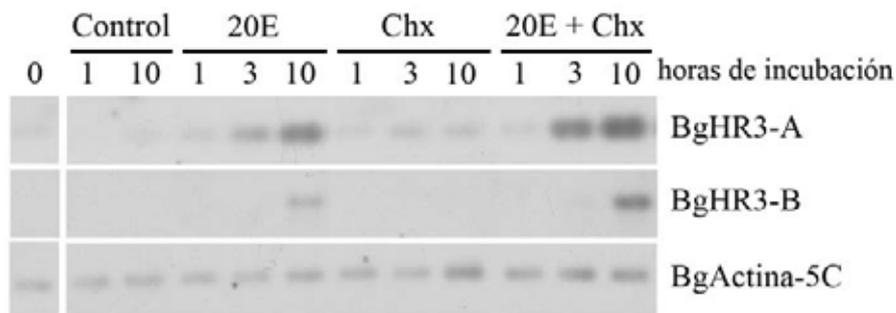


Figura 4.5.- Efecto de la 20E y de la cicloheximida (Chx) en los niveles de expresión de BgHR3 en cultivos *in vitro* de cuerpos grasos de ninfas de *B. germanica*. Los cuerpos grasos de hembras recién emergidas de sexta fase ninfal se incubaron en presencia de 20E (5×10^{-6} M), Chx (10^{-4} M) o ambos a la vez durante diferentes periodos de tiempo. Tras las incubaciones, se realizó RT-PCR/Southern-blot sobre la misma cantidad de RNA. Como referencia se utilizaron los niveles de BgActin5C. Los Southern-blots son representativos de dos réplicas.

Por último, se analizó el papel que ejerce la HJIII sobre la expresión de los genes estudiados. Para ello se incubaron cuerpos grasos de ninfas de sexta fase con 2×10^{-6} M de HJIII, o con una combinación de HJIII y de 20E (5×10^{-6} M), durante

intervalos crecientes de tiempo (figura 4.6). La presencia de HJIII no ejerció ningún efecto sobre la expresión de BgEcR-A, BgHR3-B y BgFTZ-F1com. Sin embargo, esta hormona fue capaz de inducir la expresión de BgHR3-A tras 24 h de incubación.

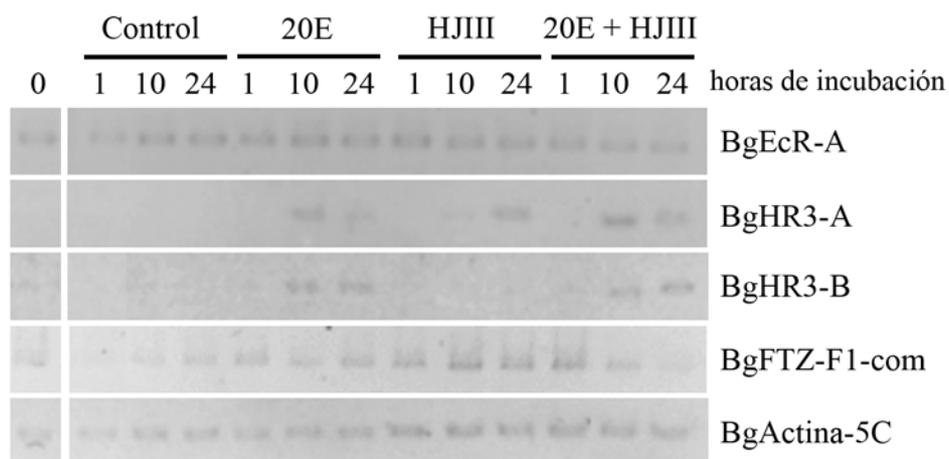


Figura 4.6.- Efecto de la 20E y de la HJIII en los niveles de expresión de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 en cultivos *in vitro* de cuerpos grasos de ninfas de *B. germanica*. Los cuerpos grasos de hembras recién emergidas de sexta fase ninfal se incubaron en presencia de 20E (5×10^{-6} M), HJIII (2×10^{-6} M) o ambas hormonas a la vez durante diferentes periodos de tiempo. Tras las incubaciones, se realizó RT-PCR/Southern-blot sobre la misma cantidad de RNA. Como referencia se utilizaron los niveles de BgActina5C. Los Southern-blots son representativos de dos réplicas.

4.3. DISCUSIÓN

En el presente capítulo hemos establecido el marco endocrino presente en la penúltima y última fase ninfal de *B. germanica* y hemos determinado el patrón de expresión de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 en ambos periodos. Finalmente, mediante la utilización de un sistema de cultivo *in vitro* de cuerpos grasos, hemos analizado el efecto de la 20E y la HJIII sobre la expresión de estos tres receptores.

4.3.1 Niveles hemolinfáticos de ecdisteroides y de HJIII durante el desarrollo ninfal de *B. germanica*

La dinámica de los niveles de 20E y de HJIII presentes en las dos fases ninfales analizadas es la que se observa en la mayoría de los insectos. El pico de ecdisteroides al final de cada fase ninfal es la señal endocrina que determina la muda. Proceso que permite crecer al insecto y así progresar a lo largo de los diferentes estadios ninfales hasta adquirir el tamaño adulto definitivo. El cariz de esta muda viene determinado por la presencia o ausencia de la HJIII cuando se produce este pico de ecdisteroides. Así, la presencia de HJIII durante toda la quinta fase ninfal de *B. germanica* determina la muda ninfal. Por el contrario, en la sexta fase ninfal los niveles de HJIII son indetectables, de manera que el pico de ecdisteroides se produce en ausencia de esta hormona determinando la muda imaginal. Tanto la cinética como la concentración de los ecdisteroides hemolinfáticos cuantificados en *B. germanica* son similares a los descritos en diferentes insectos hemimetábolos, como en la cucaracha *Nauphoeta cinerea* (Lanzrein *et al.*, 1985), en el grillo *Gryllus bimaculatus* (Erstenlauer y Hoffmann, 1995) y en la langosta *Schistocerca gregaria* (Tafik *et al.*, 1996). De igual modo, los niveles circulantes de HJIII detectados en *B. germanica* son coincidentes con los encontrados en diferentes especies de insectos hemimetábolos, como por ejemplo en las cucarachas *N. cinerea* (Lanzrein *et al.*, 1985) y *Diploptera punctata* (Tobe *et al.*, 1985).

4.3.2 Análisis de BgEcR-A en el desarrollo ninfal de *B. germanica*

El perfil de expresión de BgEcR-A en la glándula protorácica, epidermis y cuerpo graso a lo largo de los dos estadios ninfales es prácticamente constante y muy similar al descrito para las dos isoformas de su heterodímero, BgR~~K~~-S y BgR~~K~~-L (Maestro *et al.*, 2005). Este hecho sugiere que en *B. germanica* el receptor funcional de la 20E es necesario a lo largo de todo el desarrollo ninfal. Esta expresión difiere por completo del complejo perfil de expresión que presentan las diferentes isoformas de EcR en los insectos holometábolos. Así por ejemplo, en *D. melanogaster*, DmEcR-A se expresa exclusivamente durante el inicio de la metamorfosis, mientras que tanto

DmEcR-B1 como DmEcR-B2 se expresan abundantemente al final del segundo y del tercer estadio larvario (Sullivan y Thummel, 2003). En *M. sexta*, la expresión de MsEcR-B1 predomina a lo largo de todo el desarrollo larvario y pupal, mientras que MsEcR-A solo se expresa durante periodos concretos del desarrollo embrionario en los que se produce la síntesis de la nueva cutícula y durante las transiciones larva-pupa y pupa-adulto (Jindra *et al.*, 1996).

La expresión prácticamente constitutiva de BgEcR-A sugiere que no está sujeta a regulación hormonal. Efectivamente, esta hipótesis fue confirmada mediante incubaciones *in vitro* de cuerpos grasos de hembras de sexta fase ninfal. La presencia en el medio de incubación de 20E y/o HJIII no produjo ningún efecto sobre la expresión del receptor (figuras 4.5 y 4.6). Esta característica contrasta con lo que sucede en insectos holometábolos, en los que la 20E regula la expresión de las diferentes isoformas de EcR. En glándulas salivales de larvas de tercer estadio de *D. melanogaster* las diferentes isoformas de EcR son inducidas de forma directa por la 20E (Karim y Thummel, 1992). Lo mismo sucede en la epidermis de *M. sexta* (Jindra *et al.*, 1996), en la glándula de la seda de *Galeria mellonella* (Jindra y Riddiford, 1996), en cuerpos grasos de hembras adultas de *A. aegypti* (Wang *et al.*, 2002), en glándulas salivares de *Ceratitis capitata* (Veras *et al.*, 2002) así como en líneas celulares de *Choristoneura fumiferana* (Kothapalli *et al.*, 1995; Perera *et al.*, 1999).

4.3.3 Análisis de BgHR3 en el desarrollo ninfal de *B. germanica*

En todas las especies de insectos donde se han caracterizado factores de transcripción de la familia de HR3, se ha comprobado que su expresión está controlada por la 20E (Palli *et al.*, 1992, 1996; Jindra *et al.*, 1994; Horner *et al.*, 1995; Langelan *et al.*, 2000, Kapitskaya *et al.*, 2000). Efectivamente, en *B. germanica*, los perfiles de expresión de BgHR3-A y BgHR3-B (como suma de la expresión de BgHR3-B₁ y BgHR3-B₂) muestran una clara activación que coincide temporalmente con el incremento de los niveles circulantes de ecdisteroides, tanto en glándulas protorácicas, como en epidermis y en cuerpos grasos (figuras 4.2 y 4.3). Mediante incubaciones de cuerpos grasos de ninfas de sexta fase se confirmó que la inducción de BgHR3-A y

BgHR3-B se debía a la acción de la 20E (figura 4.4). Además, mediante el uso de la Chx, un potente inhibidor de la síntesis proteica, se ha demostrado que la activación inducida por la 20E es directa (figura 4.5). Este efecto difiere de los obtenidos en diferentes especies de insectos holometábolos. Así, en incubaciones *in vitro* de diferentes órganos larvarios (Horner *et al.*, 1995) y glándulas salivales (Huet *et al.*, 1995) de *D. melanogaster*, en la epidermis de *M. sexta* (Langelan *et al.*, 2000) y en la glándula de la seda de *G. melonella* (Jindra y Riddiford, 1996), se ha demostrado que la inducción máxima de HR3 requiere, además de 20E, la síntesis *de novo* de otras proteínas.

4.3.4 Análisis de BgFTZ-F1 en el desarrollo ninfal de *B. germanica*

Al igual que ocurre con HR3, el patrón de expresión de FTZ-F1 solo había sido determinado en insectos holometábolos. En todos ellos se había comprobado que su expresión durante el desarrollo larvario está claramente restringida a los periodos en los que se produce el brusco descenso de los ecdisteroides circulantes, esto es, al final de cada fase larvaria (Eda *et al.*, 1990; Sun *et al.*, 1994; Yamada *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2001; Sullivan y Thummel, 2003). En este sentido, en *B. germanica*, los perfiles de expresión de BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B se parecen a los descritos en insectos holometábolos. Los niveles máximos de expresión de BgFTZ-F1 en todos los tejidos analizados coinciden con el brusco descenso de los ecdisteroides circulantes que se produce al final de cada fase ninfal. La única diferencia respecto a los insectos holometábolos es que la expresión es significativamente alta durante los periodos en que los ecdisteroides circulantes son bajos (figuras 4.2 y 4.3). Respecto a su regulación hormonal, en las especies holometábolos se ha demostrado mediante cultivos *in vitro* de diferentes órganos larvarios, que la expresión de FTZ-F1 se regula negativamente por la 20E (Sun *et al.*, 1994; Hiruma y Riddiford, 2001). En nuestro modelo, sin embargo, no hemos podido demostrar una inhibición transcripcional de BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B por la 20E (figuras 4.4 y 4.6). Esto se debe, probablemente a que el sistema de incubaciones que utilizamos no nos permitió mantener los cuerpos grasos en

incubación durante más de 24h debido a la contaminación del medio de cultivo. Es por ello que, aunque el perfil de expresión de BgFTZ-F1-com pudiera sugerir una tendencia a la inhibición, no podemos concluir que la 20E ejerza un efecto inhibitor sobre la transcripción de este transcrito.

**5. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS
FACTORES BgEcR-A, BgHR3 y
BgFTZ-F1 DURANTE EL
DESARROLLO NINFAL DE *B.*
GERMANICA MEDIANTE RNAi *IN*
*VIVO***

5.1. ANTECEDENTES

La síntesis de ecdisteroides, principalmente la 20E, durante las etapas ninfales se produce en la glándula protorácica, un órgano altamente especializado que se sitúa en la región torácica del insecto. La 20E, por su parte, controla el proceso de la muda que permite, en último término, el crecimiento progresivo del insecto. La muda es un proceso extremadamente complejo que requiere de la coordinación secuencial de diferentes eventos, desde la síntesis de una nueva cutícula, digestión y ruptura de la antigua, hasta el endurecimiento y la pigmentación de la nueva cutícula. Todos estos procesos tienen lugar durante los últimos días de cada fase ninfal, de forma paralela a un pico de 20E. En *D. melanogaster*, se ha demostrado mediante mutagénesis, que varios factores de la cascada de respuesta a 20E están implicados en regular estos procesos, especialmente DmHR3 y DmFTZ-F1 β (véase por ejemplo Lam y Thummel, 2000).

El objetivo del presente capítulo es analizar el papel regulador que los diferentes receptores nucleares objeto de estudio, BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1, desempeñan durante el desarrollo ninfal de *B. germanica*, y especialmente en el proceso de la muda. Para ello, hemos utilizado la técnica del RNA de interferencia (RNAi) *in vivo* mediada por la inyección intraabdominal de RNAs de doble cadena (dsRNA) de cada uno de los genes a estudiar. Recientemente la técnica del RNAi ha sido aplicada, no sólo a organismos modelo, como *D. melanogaster* (Kennerdell y Carthrew, 2000) o *C. elegans* (Montgomery *et al.*, 1998), sino también en organismos no modelo, como *Periplaneta americana* (Marie *et al.*, 2000), *Anopheles gambiae* (Blandin *et al.*, 2002), *Aedes aegypti* (Shin *et al.*, 2003) o *Tribolium castaneum* (Bucher *et al.*, 2002; Tomoyasu y Denell, 2004).

En el presente capítulo estudiaremos, en definitiva, los diferentes fenotipos que se obtengan tras el silenciamiento de la expresión de cada uno de los genes descritos en hembras de sexta fase ninfal mediante RNAi *in vivo*.

5.2. RESULTADOS

5.2.1. Puesta a punto de la técnica del RNAi en *B. germanica*

El primer paso para llevar a cabo el análisis funcional de los receptores nucleares objeto de estudio consistió en comprobar si la técnica del RNAi *in vivo* funcionaba en nuestro insecto modelo *B. germanica*. Previamente, Marie y colaboradores (2000) aplicaron con éxito dicha técnica en la cucaracha *P. americana*. En nuestro caso, el gen elegido para silenciar su expresión fue el de la vitelogenina (BgVg, número de acceso en el GenBank: CAA06379). Se eligió este gen porque durante la última década ha sido objeto de estudios detallados en nuestro laboratorio (Martín *et al.*, 1995, 1998; Comas *et al.*, 2000). La activación del gen de la BgVg se produce exclusivamente en el cuerpo graso de hembras adultas, iniciándose 24 h después de la muda imaginal y adquiriendo sus máximos niveles a mitad del ciclo gonadotrófico (Martín *et al.*, 1998). Una vez liberada a la hemolinfa, la BgVg se incorpora en los oocitos en desarrollo, donde actuará como proteína de reserva durante la embriogénesis. Para la síntesis del dsRNA de la BgVg (dsBgVg) se utilizó un fragmento de 732 nucleótidos, entre el aminoácido 746 y el 990 tal y como se describe en el apartado 2.18. Como control se utilizó una secuencia no codificante del vector pSTBlueI (dsControl). Para generar la interferencia, se inyectó 1 µg de dsBgVg o dsControl en la cavidad abdominal de hembras adultas exactamente tras la muda imaginal, es decir, antes de la activación del gen de la BgVg. Transcurridos cinco días, se disecaron los cuerpos grasos, se extrajo el RNA, y se analizaron los niveles de transcrito de BgVg mediante Northern-blot. Los resultados muestran que, mientras que las hembras tratadas con dsControl presentaban niveles similares a los esperados en hembras adultas de 5 días, el mRNA de la BgVg era indetectable en las hembras tratadas con dsBgVg (figura 5.1A). También se analizaron los fenotipos de las hembras interferidas analizando por SDS-PAGE la proteína hemolinfática y cuantificando la proteína ovárica. Remarcablemente, la proteína BgVg no se detectaba en la hemolinfa de hembras interferidas con dsBgVg (figura 5.1B). Finalmente, se comprobó que el contenido proteico de los oocitos basales de las hembras tratadas con dsBgVg disminuía

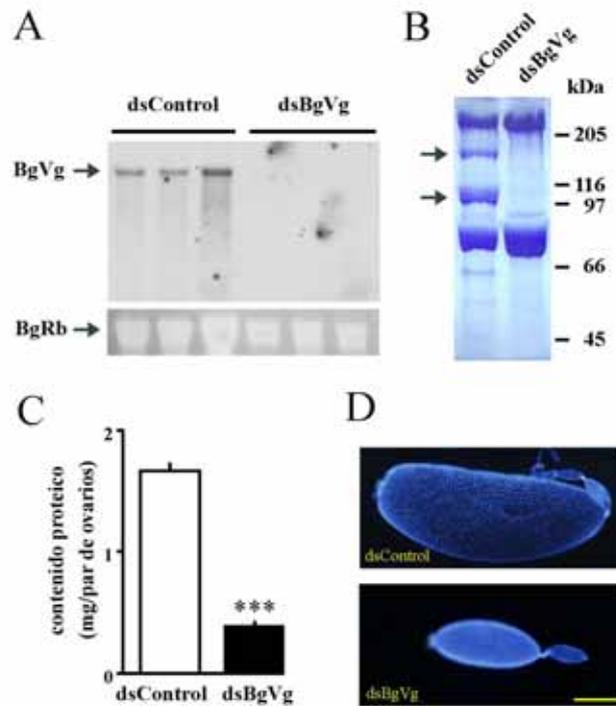


Figura 5.1.- Efecto del silenciamiento mediado por dsRNA del gen de la vitelogenina (BgVg) en hembras adultas de *B. germanica*. Se inyectó dsRNA de BgVg (dsBgVg) o de una secuencia inespecífica del vector pSTBlueI (dsControl) a hembras tras la muda imaginal. Los cuerpos grasos, ovarios, y hemolinfa de estos insectos se disecaron a los 5 días del tratamiento. (A) Northern blot de RNA total (5 µg) de cuerpo graso utilizando sonda específica para la BgVg. La porción del gel que contenía el RNA ribosomal (BgRb) se tiñó con bromuro de etidio como control de que en todos los carriles se había cargado la misma cantidad de RNA. (B) SDS-PAGE de la hemolinfa. Los marcadores de peso molecular se indican a la derecha, y las subunidades de BgVg a la izquierda. (C) Contenido proteico total de los ovarios. Las líneas verticales indican el ESM (n=10). Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (t de Student): $p < 0,0001$. (D) Tinción con DAPI de los oocitos. Barra de escala: 500µm.

un 77% respecto a los controles (figura 5.1C), lo que provocaba una dramática reducción del tamaño del oocito basal (figura 5.1D).

5.2.2. El RNAi *in vivo* en ninfas de *B. germanica* reduce los niveles de mensajero de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1

Tras comprobar que la técnica de RNAi *in vivo* funcionaba en *B. germanica*, se utilizó esta técnica para llevar a cabo el análisis funcional de los genes BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 durante el desarrollo ninfal de la especie. Las regiones seleccionadas para la síntesis de los correspondientes dsRNAs en cada uno de los receptores nucleares se muestran en la figura 5.2. Para comprobar la especificidad del dsRNA, la interferencia se realizó sobre dos regiones diferentes de los transcritos y se analizó el fenotipo asociado (tabla 5.1, apartado 5.2.4), no mostrando diferencias significativas según la región que se utilizaba para realizar la interferencia.

En primer lugar, se analizó la reducción del mensajero de BgEcR-A en la glándula protorácica y en el cuerpo graso con la epidermis dorsal adherida. Para ello, se inyectó 1g de dsBgEcR-A o de dsControl, como control negativo, en hembras de 0 días de sexta y última fase ninfal y se analizaron los niveles de transcrito de BgEcR-A 8 días más tarde mediante RT-PCR/Southern-blot. Los resultados presentados en la figura 5.3A muestran que los niveles de mRNA de BgEcR-A disminuían claramente en los dos tejidos analizados.

A continuación se analizó el efecto del tratamiento con RNAi sobre la expresión de BgHR3 y de BgFTZ-F1. Para ello se inyectó 1 g de dsBgHR3 o de dsBgFTZ-F1 y se analizaron los niveles de estos transcritos en glándulas protorácicas a los 7 y 8 días de tratamiento con dsBgHR3 o dsBgFTZ-F1, respectivamente. Se escogieron estos días debido a que eran los que presentaban la máxima expresión de cada transcrito, respectivamente (ver figura 4.2). En ambos casos, la reducción de los niveles de transcrito fue muy significativa (figura 4.3B y C).

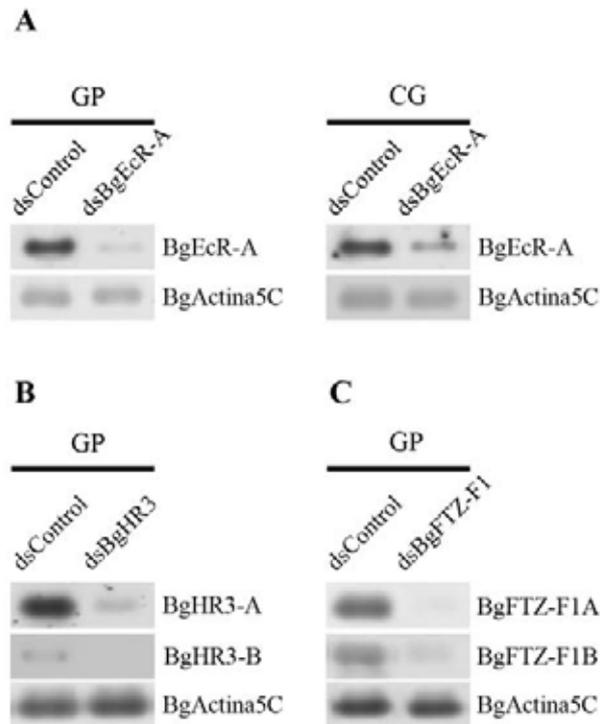


Figura 5.3.- Efecto del silenciamiento mediado por dsRNA de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 en hembras de sexta fase ninfal de *B. germanica*. Se inyectaron dsRNAs de BgEcR-A (dsBgEcR-A), de BgHR3 (dsBgHR3), de BgFTZ-F1 (dsBgFTZ-F1), o de una secuencia inespecífica del vector pSTBlueI (dsControl) a hembras recién emergidas de sexta fase ninfal. (A) Niveles de expresión de BgEcR-A medidos por RT-PCR/Southern blot en glándulas protorácicas (B) y cuerpos grasos (CG) a los 8 días del tratamiento con dsBgEcR-A. (B) Niveles de expresión de BgHR3-A y BgHR3-B estudiados por RT-PCR/Southern blot en glándulas protorácicas tras 7 días de tratamiento con dsBgHR3. (C) Niveles de expresión de BgFTZ-F1A y FTZ-F1B estudiados por RT-PCR/Southern blot en glándulas protorácicas a los 8 días del tratamiento con dsBgFTZ-F1. Los niveles BgActina5C se utilizaron como referencia. Los Southern-blot son representativos de seis réplicas.

5.2.3. Regulación de la expresión *in vivo* de BgHR-3 y BgFTZ-F1 por la 20E en glándulas protorácicas

La drástica reducción de los niveles de mensajero de BgEcR-A, uno de los componentes del receptor funcional de la 20E, en ninfas de sexta fase interferidas con dsBgEcR-A, nos permitió el análisis *in vivo* de la regulación que dicha hormona ejerce sobre la expresión de BgHR3 y BgFTZ-F1. Para ello, se inyectó 1 μ g de dsBgEcR-A en hembras recién emergidas de sexta fase ninfal, y se analizó mediante RT-PCR/Southern-blot, los niveles de mensajero de BgHR3 y BgFTZ-F1 en glándulas protorácicas entre los días 6 - 8, esto es, cuando la expresión de BgHR3 y BgFTZ-F1 es máxima en este tejido. Tal y como se muestra en la figura 6.4 los niveles de mRNA de BgHR3 eran claramente inferiores en los individuos interferidos para BgEcR-A. Por el contrario, los niveles de expresión de BgFTZ-F1 no presentaban variaciones al deprimir la expresión de BgEcR-A.

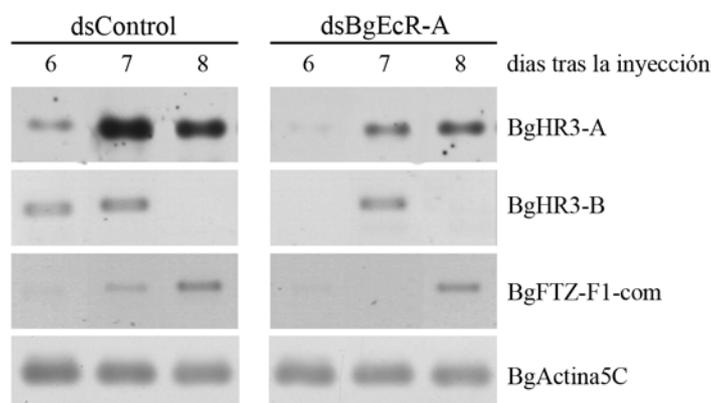


Figura 5.4.- Efecto del silenciamiento mediado por dsRNA de BgEcR-A en la expresión de BgHR3 y BgFTZ-F1. Se inyectó dsRNA de BgEcR-A (dsEcR-A) o de una secuencia no específica (dsControl) a hembras recién emergidas de sexta fase ninfal y se recopilaron las glándulas protorácicas de estos individuos tras 6, 7 y 8 días de tratamiento. El RNA obtenido a partir de una glándula protorácica se analizó mediante RT-PCR/Southern blot utilizando sondas específicas. Los niveles BgActina5C se utilizaron como referencia. Los Southern blot son representativos de tres réplicas.

5.2.4. Análisis fenotípico de las ninfas interferidas para BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1

Una vez comprobado que la inyección de dsRNA *in vivo* reducía drásticamente los niveles de los correspondientes receptores nucleares, se analizó el fenotipo que presentaban las ninfas interferidas. En los tres casos, presentaban un comportamiento normal durante todo el estadio ninfal, sin embargo, al final de la fase, el 58% de las ninfas interferidas para dsBgEcR-A, el 94% de dsBgHR3 y el 75% de dsBgFTZ-F1 no podían completar correctamente la muda imaginal (tabla 5.1). En todos los casos, las ninfas intentaban llevar a cabo el proceso de écdisis, pero lo hacían con movimientos descoordinados. Finalmente, tras 24–48 h permanecían inmóviles y morían (figura 5.5A). En algunos casos, las ninfas interferidas con dsBgFTZ-F1 rompían la exuvia pero eran incapaces de completar totalmente la écdisis y morían transcurridas 24-48h (figura 5.5A). Tanto para BgHR3, como para BgFTZ-F1 sintetizamos dsRNA en diferentes regiones (figura 5.2) y comprobamos que el fenotipo era similar, independientemente de la región utilizada en la interferencia (tabla 5.1).

Tabla 5.1.- Porcentaje de mudas ninfa-adulto completas e incompletas que presentan las ninfas de *B. germanica* de sexta fase tratadas con los diferentes dsRNAs. n=número total de animales.

| Tratamiento | n | % muda completa | %muda incompleta | % "arrestados" |
|---------------|-----|-----------------|------------------|----------------|
| dsControl | 83 | 100% | 0% | 0% |
| dsBgEcR-A | 188 | 43% | 0% | 57% |
| dsBgHR3 | 68 | 6% | 0% | 94% |
| dsBgHR3(2) | 15 | 0% | 0% | 100% |
| dsBgFTZ-F1 | 72 | 25% | 29% | 46% |
| dsBgFTZ-F1(2) | 22 | 36% | 23% | 59% |

El análisis fenotípico detallado de las ninfas que no podían mudar mostró que presentaban duplicación de las estructuras de origen ectodérmico. En la región cefálica se observaba la duplicación de las mandíbulas, las antenas, las lacinias, las maxilas y la hipofaringe (figura 5.5 B-F). Además, las ninfas presentaban el sistema traqueal doble, con la traquea ninfal situada en el lumen de la traquea adulta (figura 5.5H), e igualmente presentaban duplicación del estomodeo y del proctodeo, que son regiones del sistema digestivo de origen ectodérmico (figura 5.5G).

Por último, se analizó la estructura de la cutícula de las ninfas interferidas mediante secciones histológicas de la cutícula abdominal, poco antes de la muda imaginal. En ninfas control de 8 días se observaba la cutícula ninfal y la adulta perfectamente formadas (figura 5.6). En el mismo día del desarrollo, las ninfas tratadas con dsBgEcR-A, dsBgHR3 o dsFTZ-F1 presentaban una estructura cuticular idéntica. Tanto la endocutícula y la exocutícula ninfal como la incipiente cutícula adulta eran claramente visibles (figura 5.6). Tras 24 h, en las hembras interferidas se producía la digestión total de la endocutícula ninfal e incluso la esclerotización de la nueva exocutícula adulta (figura 5.6).

5.2.5. La interferencia de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 produce alteraciones en los niveles de ecdisteroides hemolinfáticos

El hecho de que la mayoría de las hembras interferidas con dsBgEcR-A, dsBgHR-3 o dsBgFTZ-F1 no completaran el proceso de écdisis, sugería que estos ejemplares podían presentar alteraciones en los niveles de ecdisteroides circulantes, ya que estas hormonas son críticas en el control de dicho proceso. Con el fin de comprobar esta hipótesis, se determinaron los niveles de ecdisteroides circulantes en hembras controles e interferidas para los tres receptores nucleares durante los días 5 - 8 de sexta fase ninfal, esto es, cuando se produce el pico de ecdisteroides. Las ninfas interferidas con dsBgEcR-A y con dsFTZ-F1 presentaban unos niveles circulantes de ecdisteroides claramente inferiores a los que presentaban las ninfas tratadas con dsControl (figura 5.7 A, C). La reducción máxima fue de un 66% en el caso de dsBgEcR-A a día 6 ($0,6 \pm 0,2$

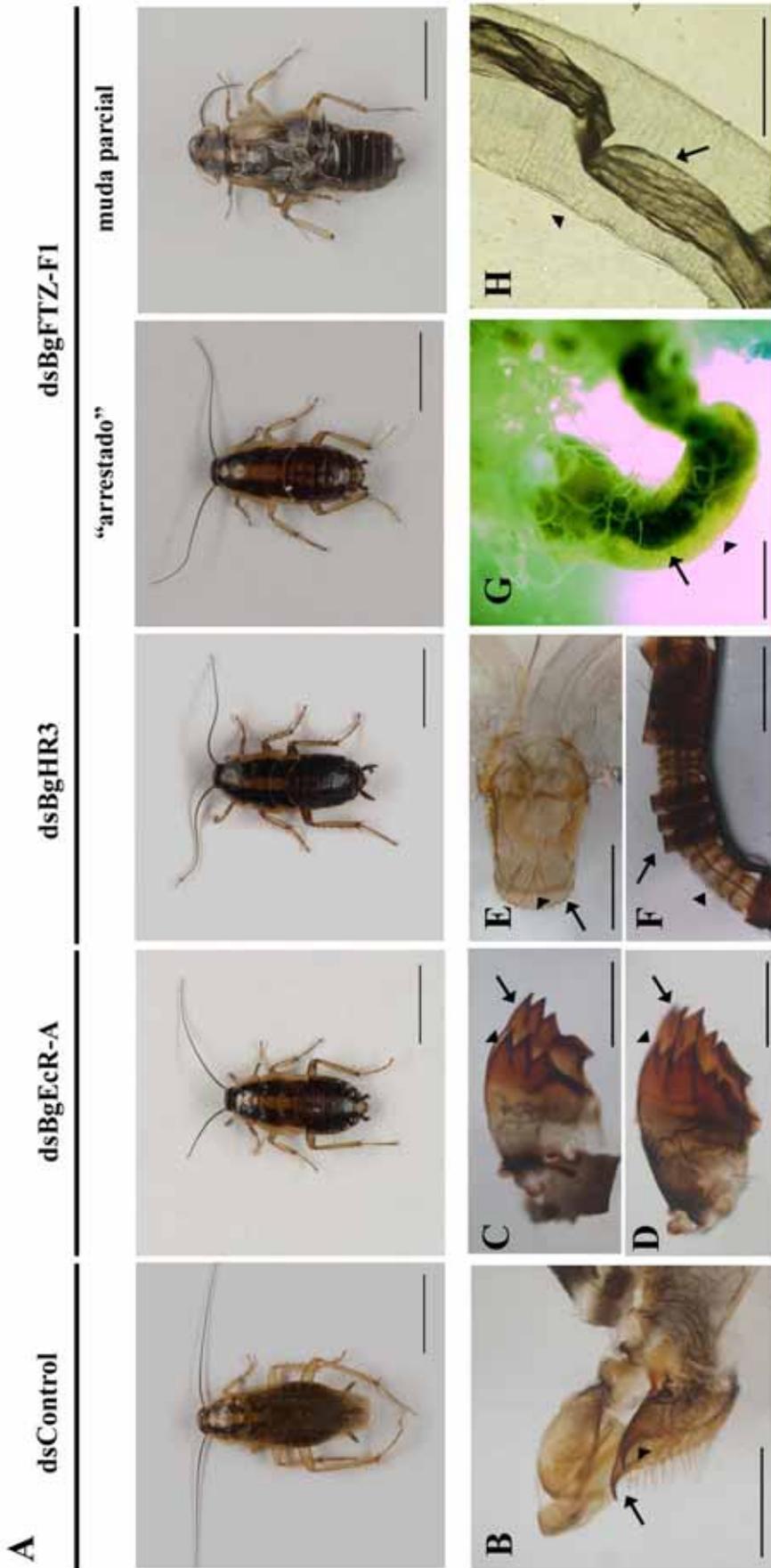


Figura 5.5.- Efecto sobre la muda debido al silenciamiento mediado por dsRNA de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 en hembras de sexta fase ninfal de *B. germanica*. Se inyectaron dsRNAs de BgEcR-A (dsBgEcR-A), de BgHR3 (dsBgHR3), de BgFTZ-F1 (dsBgFTZ-F1), o de una secuencia inespecifica del vector pSTBlueI (dsControl) a hembras recién emergidas de sexta fase ninfal. (A) De izquierda a derecha: individuo tratado con dsControl 1 día después de la muda imaginal mostrando el aspecto normal de una hembra adulta; ninfa tratada con dsEcR-A, dsBgHR3 y dsBgFTZ-F1 con su desarrollo detenido durante el proceso de muda y ninfa tratada con dsBgFTZ-F1 mostrando muda incompleta. Los individuos tratados con dsBgEcR-A (B-H), dsBgHR3 y dsBgFTZ-F1 presentan duplicación de estructuras de origen ectodérmico: maxilas (B), mandíbulas (C y D), hipofaríngeas (E), antenas (F), proctodeo (G) y tráqueas (H). Las flechas indican la estructura ninfal, y las puntas de flecha, la estructura adulta. Barras de escala: 5 mm en A; 500 μ m en B-F; 1 mm en G y 200 μ m en H.

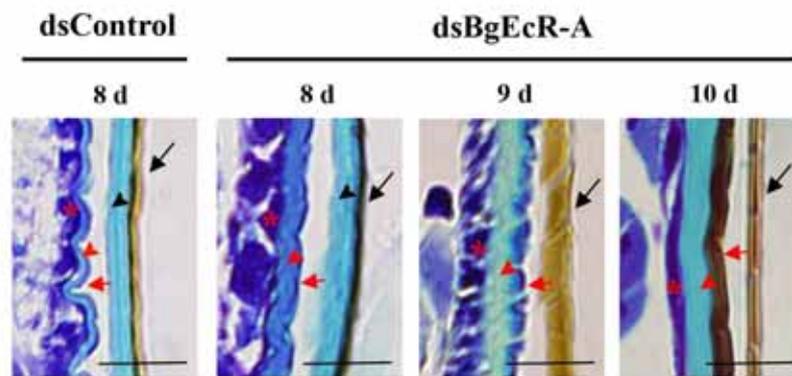


Figura 5.6.- Secciones histológicas de ninfas interferidas con dsRNA de BgEcR-A. Se inyectó dsRNA de BgEcR-A o de una secuencia inespecífica del vector pSTBlueI (dsControl) a hembras recién emergidas de sexta fase ninfal. Se realizaron secciones histológicas de la cutícula abdominal tras 8-10 días de tratamiento. Se indican: epicutícula (flecha), endocutícula (punta de flecha) y epidermis (asterisco). Las flechas y puntas de flecha en negro indican la epi- y la endocutícula ninfales. Las flechas, y puntas de flecha en rojo indican la epi- y la endocutícula adultas. Barras de escala: 50 μ m.

ng equivalentes 20E/ μ en la hem olinfa de ninfas interferidas, comparado con $1,8 \pm 0,2$ ng equivalentes 20E/ μ en la hem olinfa de las ninfas control) y de un 83% en el caso de las ninfas interferidas con dsFTZ-F1 a día 7 ($0,2 \pm 0,1$ ng equivalentes 20E/ μ hemolinf, comparado con $1,0 \pm 0,2$ ng equivalentes 20E/ μ hem olinfa). Por el contrario, las ninfas interferidas con dsBgHR3, presentaban un ciclo de ecdisteroides circulantes similar al que presentaban las ninfas controles aunque con concentraciones superiores en todos los días analizados, alcanzando a día 6 un incremento del 64% ($2,9 \pm 0,6$ ng equivalentes 20E/ μ hem olinfa comparado con $1,7 \pm 0,2$ ng equivalentes 20E/ μ hem olinfa) (figura 5.7B).

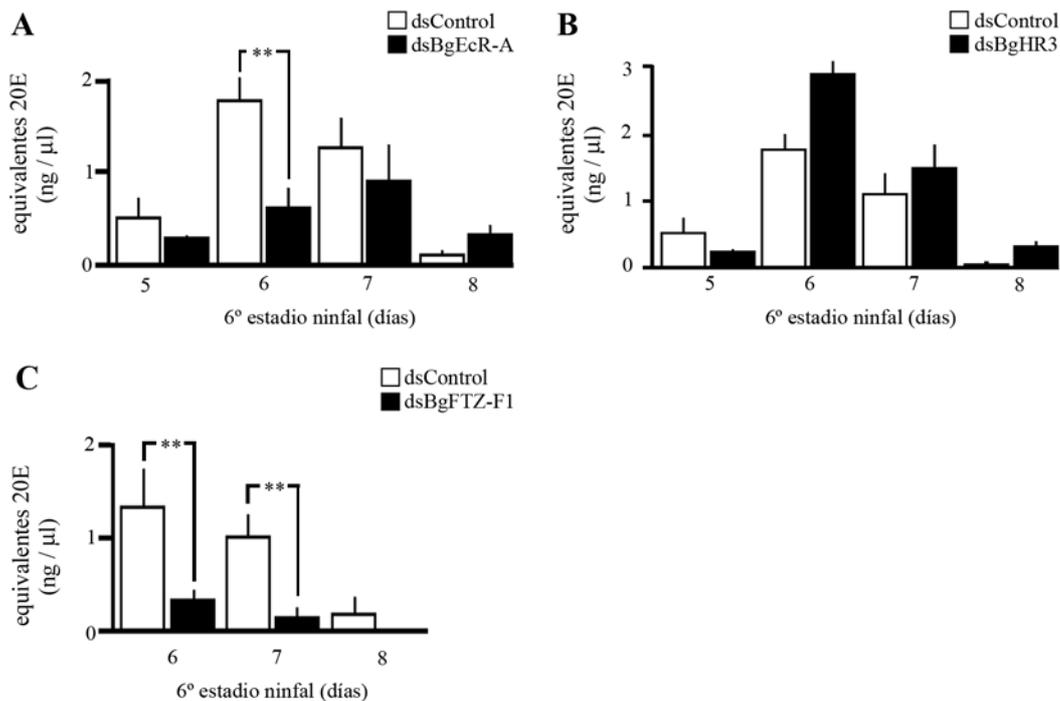


Figura 5.7.- Efecto del silenciamiento mediado por dsRNA de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 en los niveles de ecdisteroides circulantes. Se inyectaron dsRNAs de BgEcR-A (dsBgEcR-A), BgHR3 (dsBgHR3), BgFTZ-F1 (dsBgFTZ-F1), o de una secuencia inespecífica del vector pSTBlueI (dsControl) en hembras recién emergidas de sexta fase ninfal. Se recogió hemolinf a los 5-8 días de tratamiento y se determinaron los niveles de ecdisteroides mediante ELISA. (A) Niveles de 20E en hembras tratadas con dsBgEcR-A. (B) Niveles de 20E en hembras tratadas con dsBgHR3. (C) Niveles de 20E en hembras tratadas con dsBgFTZ-F1. Las barras verticales indican el ESM (n =5-15). Los asteriscos indican diferencias significativas (*t* de Student): $p < 0,005$.

5.2.6. Análisis fenotípico de las hembras adultas interferidas para BgEcR-A y BgFTZ-F1 durante el desarrollo ninfal

A pesar de los problemas para completar correctamente el proceso de la muda, la mitad de las ninfas tratadas con dsBgEcR-A y la cuarta parte de las tratadas con dsFTZ-F1 mudaban a adulto (tabla 5.1 y figuras 5.8A y 5.9A). Este hecho nos permitió estudiar las funciones que ambos factores ejercen sobre diferentes procesos asociados a la muda imaginal, como son la extensión de las alas y la degeneración de la glándula protorácica.

Todas las ninfas tratadas con dsBgEcR-A que mudaban a adulto presentaban claras deformaciones en las alas, tanto en las anteriores, como en las posteriores (figura 5.8A, B). Estos defectos mostraban diferentes grados de severidad (figura 5.8B). Además, en algunos casos, las hembras adultas tenían el metatarso más corto que los controles, aunque formado correctamente (figura 5.8A). Por su parte, las ninfas interferidas con dsBgFTZ-F1 que mudaban a adulto también presentaban deformaciones en las alas. En este caso, las alas se desplegaban bien pero no se posicionaban correctamente, y se orientaban de forma oblicua al abdomen sin llegar a cubrirlo (figura 5.9A). Todos los individuos tratados con dsBgEcR-A que mudaban, pese a ser capaces de desprenderse completamente de la exuvia, presentaban las quetas de los tres pares de patas claramente deformadas (figura 5.9B).

El siguiente proceso que se analizó fue la degeneración de la glándula protorácica. En las hembras adultas, la glándula protorácica sufre un dramático proceso de degeneración que se inicia poco después de la muda imaginal. Tras 48 h, la glándula pierde turgencia y densidad celular, quedando reducida a un eje muscular central rodeado por un pequeño número de células. Sin embargo, en las hembras adultas interferidas para BgEcR-A o BgFTZ-F1, la glándula protorácica no degeneraba, y presentaba una turgencia y grosor de sus ramas similares a las de una glándula protorácica ninfal, incluso tras 7 días de la muda imaginal (figura 5.10A, B). Para

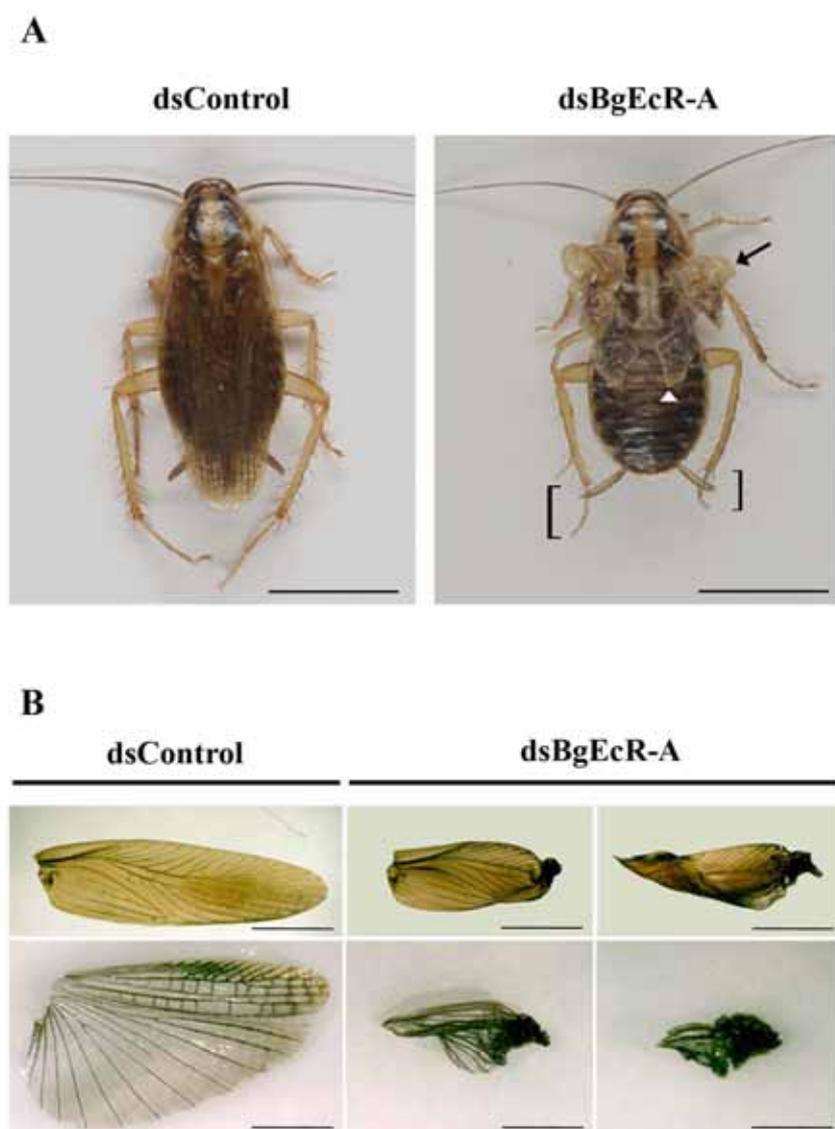


Figura 5.8.- Efecto del silenciamiento mediado por dsRNA de BgEcR-A en la extensión del ala en hembras de sexta fase ninfal de *B. germanica*. Se inyectó dsRNA de BgEcR-A (dsBgEcR-A) o de una secuencia inespecífica del vector pSTBlueI (dsControl) a hembras recién emergidas de sexta fase ninfal. (A) Individuo tratado con dsControl (izquierda) 1 día después de la muda imaginal mostrando el aspecto normal de una hembra adulta e individuo de la misma edad tratado con dsBgEcR-A (derecha) mostrando defectos severos en la extensión del primer par de alas (flecha) y del segundo par de alas (punta de flecha). Algunos insectos presentan los tarsos de longitud inferior a los controles (corchetes). (B) Primer par de alas (imágenes superiores) y segundo par de alas (imágenes inferiores) de individuos tratados con dsControl (izquierda) muestran una extensión normal, mientras que, las alas de los individuos interferidos con dsBgEcR-A muestran defectos moderados (centro) o defectos más severos (derecha) en la extensión. Barra de escala: 5 mm.

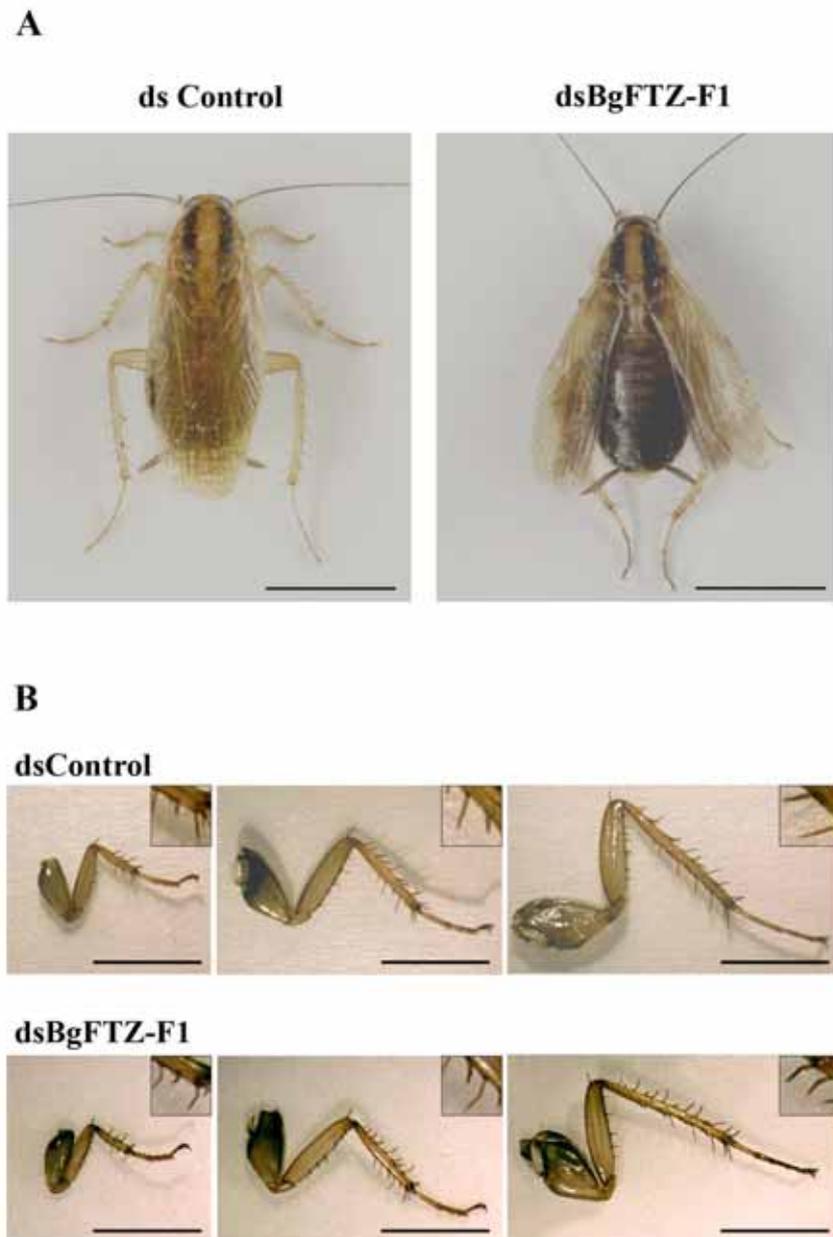


Figura 5.9.- Efecto sobre la muda debido al silenciamiento mediado por dsRNA de BgFTZ-F1 en hembras de sexta fase ninfal de *B. germanica*. Se inyectó dsRNA de BgFTZ-F1 (dsBgFTZ-F1) o de una secuencia inespecífica del vector pSTBlueI (dsControl) a hembras recién emergidas de sexta fase ninfal. (A) Individuo tratado con dsControl 1 día después de la muda imaginal mostrando el aspecto normal de una hembra adulta (derecha) e individuo de la misma edad tratado con dsEcR-A en el que encontramos las alas mal posicionadas y las quetas de las patas torcidas. (B) De izquierda a derecha: primer, segundo y tercer par de patas de hembra tratada con dsControl (imágenes superiores), en las que pueden observarse quetas con aspecto normal, o con dsBgFTZ-F1 (imágenes inferiores), en las que se observan todas las quetas torcidas. Barras de escala: 5mm en A y 2,5mm en B.

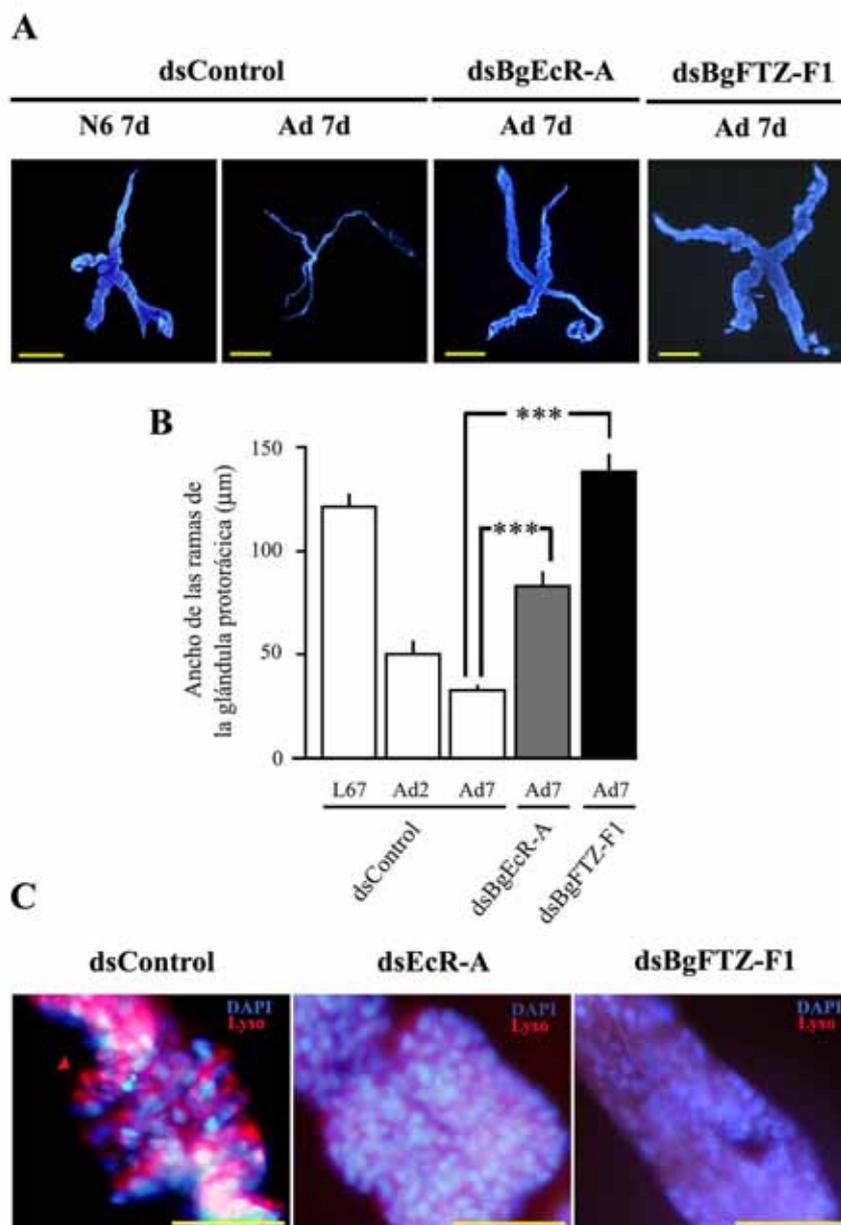


Figura 5.10.- Efecto del silenciamiento mediado por dsRNA de BgEcR-A y BgFTZ-F1 en la degeneración de la glándula protorácica en hembras de sexta fase ninfal de *B. germanica*. (A) Tinción con DAPI de glándulas protorácicas de ninfas tratadas con dsRNA a día 0 de sexta fase ninfal. De izquierda a derecha: glándula protorácica de ninfa de 7 días (N6 7d) tratada con dsControl mostrando apariencia normal; glándula protorácica de hembra adulta de 7 días (Ad 7d) tratada con dsControl mostrando reducción de la masa celular; glándula protorácica de hembra adulta de 7 días, tratada con dsBgEcR-A sin signos aparentes de degeneración; y, glándula protorácica de hembra adulta de 7 días (Ad 7d) tratada con dsBgFTZ-F1 en la que no se observan signos de degeneración. (B) Utilización de la medida del ancho de rama como parámetro del grado de degeneración de la glándula protorácica en hembras tratadas con dsControl, dsBgEcR-A o dsBgFTZ-F1 a diferentes días. Las barras verticales indican el ESM (n = 9-18). Los asteriscos indican diferencias significativas (*t* de Student): $p < 0,0002$. (C) Utilización del marcador fluorescente LysoTracker como marcador de autofagia. De izquierda a derecha: glándula protorácica de hembra adulta de tres días, tratada a día 0 de sexta fase ninfal con dsControl, mostrando un gran marcaje; glándula protorácica de hembra adulta de tres días, tratada con dsBgEcR-A a día 0 de sexta fase ninfal, sin incorporación de marcaje; y, glándula protorácica de hembra adulta de tres días, tratada con dsBgFTZ-F1 a día 0 de sexta fase ninfal, presentando marcaje inespecífico y difuso por LysoTracker. Barras de escala: 200 µm en A-D, 50 µm en F y H.

confirmar este resultado, se utilizó el marcador LysoTracker Red que se une específicamente a los lisosomas, orgánulos que aparecen de forma muy abundante en la degeneración de tejidos por procesos de autofagia (Rusten *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2004). Las glándulas protorácicas de hembras control de tres días, presentaban un claro marcaje por LysoTracker Red, confirmando la degeneración de la glándula por autofagia. Por el contrario, las glándulas protorácicas de hembras de la misma edad tratadas con dsBgEcR-A o dsBgFTZ-F1 no presentaban marcaje (figura 5.10C).

5.3. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este capítulo demuestran que nuestro insecto modelo, *B. germanica*, es sensible al silenciamiento *in vivo* mediado por dsRNA, tanto en estadios ninfales (silenciamiento de los receptores nucleares objeto de estudio), como en el estadio adulto (silenciamiento del gen de la BgVg). La principal ventaja de esta técnica es su fácil aplicación, así como su reproducibilidad y especificidad. Además, el alto grado de silenciamiento observado en los diferentes tejidos del insecto indica que el efecto de la interferencia es sistémico, produciendo una interferencia global en el individuo.

5.3.1. Función de la 20E sobre la expresión de BgHR3 y BgFTZ-F1 en glándulas protorácicas *in vivo*

Debido a la imposibilidad de manipulación genética, la regulación transcripcional de HR3 y FTZ-F1 por 20E *in vivo* no se ha podido estudiar en ningún insecto, salvo en *D. melanogaster* en la que se ha demostrado que la 20E activa de forma directa a DmHR3 y reprime la expresión de DmFTZ-F1 β (Li y Bender, 2000). Gracias a la técnica del RNAi *in vivo* hemos podido extender este análisis a un insecto más primitivo. Así, en ninfas interferidas con dsEcR-A, los niveles de mRNA de las diferentes isoformas de BgHR3 eran más bajos que en las ninfas control, confirmando los resultados obtenidos previamente mediante incubaciones *in vitro* de cuerpos grasos

de ninfas de sexta fase (ver figuras 4.4, 4.5 y 4.6). Este resultado coincide con los obtenidos en *D. melanogaster*, en los que no se detecta la proteína DmHR3 en mutantes de DmEcR-A (Li y Bender, 2000). Respecto a BgFTZ-F1, los diferentes experimentos realizados *in vitro* no pudieron demostrar inequívocamente que su expresión estaba controlada por la 20E (ver figuras 4.4 y 4.6). Por su parte, los niveles de BgFTZ-F1 no variaron en ninfas de sexta fase interferidas para BgEcR-A respecto a las tratadas con dsControl, lo que sugiere que en *B. germanica* BgFTZ-F1 no se regula negativamente por 20E.

5.3.2. BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 intervienen en el desarrollo ninfal de *B. germanica* controlando los niveles de ecdisteroides hemolinfáticos

La consecuencia más clara de la reducción de los niveles de BgEcR-A, BgHR3 o BgFTZ-F1 durante el último estadio ninfal de *B. germanica*, era la incapacidad para que las ninfas interferidas completasen el proceso de muda. De forma muy significativa, todos los individuos que no mudaban presentaban duplicación de las estructuras de origen ectodérmico. Este fenotipo es característico de los mutantes de *D. melanogaster* de genes implicados en la síntesis de ecdisteroides, como *molting defective* (Neubueser *et al.*, 2005), *ecdysoneless* (Gaziova *et al.*, 2004) o *dare* (Freeman, *et al.*, 1999). Esta coincidencia indicaría que la interferencia de los tres receptores nucleares en *B. germanica* provocaría una alteración en los niveles de ecdisteroides circulantes, que en último término controlan el proceso de muda. Efectivamente, la cuantificación de los ecdisteroides circulantes en las ninfas interferidas mostraba que los individuos tratados con dsEcR-A presentaban niveles inferiores de ecdisteroides a la que presentaban las ninfas controles. Las ninfas tratadas con dsFTZ-F1 mantenían el perfil presente en hembras control, pero con niveles claramente más bajos. En cambio, las ninfas tratadas con dsBgHR3 presentaban unos niveles superiores a los controles (figura 5.7). En *D. melanogaster* se ha descrito la implicación de varios miembros de la cascada de factores de transcripción inducida por 20E en la regulación de la síntesis de ecdisteroides. Así, por ejemplo, el mutante de *E75* presenta una gran reducción de los niveles de ecdisteroides circulantes en larvas de segundo estadio (Bialecki *et al.*, 2002), mientras

que la expresión ectópica del gen temprano *Broad-complex-Z3* (*BR-Z3*) en glándulas protorácicas de larvas de segundo estadio provoca reducción de los niveles de ecdisteroides en estos individuos (Zhou *et al.*, 2004). Por último, en larvas de *D. melanogaster* que presentan clones mutantes para *βFTZ-F1* en la glándula protorácica, se observa una gran disminución en los niveles de *disembodied* (*dib*) y *phantom* (*phm*), dos enzimas claves de la vía de síntesis de ecdisteroides (Parvy *et al.*, 2005).

Llegados a este punto, la pregunta que surge es ¿por qué variaciones tan diferentes de los ecdisteroides circulantes afectan tan claramente al proceso de muda? Al analizar secciones histológicas de la cutícula de los individuos que no habían podido completar la muda se observó que las ninfas interferidas eran capaces de sintetizar la nueva cutícula, así como de digerir la endocutícula antigua, pero eran incapaces de desprenderse correctamente de la exuvia. Así pues, las alteraciones en los niveles de ecdisteroides circulantes afectaban especialmente al proceso de la écdisis. La écdisis es el proceso que permite al insecto desprenderse de la exuvia, lo cual se produce mediante una secuencia de movimientos altamente coordinados. En diferentes especies de lepidópteros (especialmente *M. sexta*) se ha comprobado que estos movimientos se encuentran finamente controlados por una serie de péptidos que son sintetizados en el sistema nervioso central (como la hormona de eclosión: EH), y en unas células altamente especializadas situadas en el sistema traqueal denominadas células Inka (como la hormona de pre-écdisis: PETH, o como la hormona de écdisis ETH). Tanto, la síntesis como la liberación de estos péptidos a la hemolinfa están bajo el estricto control de los ecdisteroides circulantes. Así por ejemplo, durante el rápido incremento de los niveles de ecdisteroides se produce la síntesis de PETH y ETH en las células Inka, mientras que cuando los niveles de ecdisteroides caen bruscamente al final de cada estadio, estos péptidos se liberan a la hemolinfa (para una revisión detallada del tema, véase Zitnan y Adams, 2005). Cultivos *in vitro* de células Inka de *M. sexta* han demostrado que la adquisición de competencia por parte de éstas células para liberar ETH requiere la eliminación de la 20E del medio de cultivo (Kingan y Adams, 2000). Este requisito, además, es necesario para la activación de FTZ-F1 (Hiruma y Riddiford, 2001). El hecho de que la ventana de expresión de FTZ-F1 en *M. sexta*, (Hiruma y Riddiford, 2001) coincida con el momento en que las células Inka adquieren

competencia para secretar ETH (Kingan y Adams, 2000), sugiere la implicación directa de FTZ-F1 en este proceso. Podemos concluir, pues, que la interferencia con dsBgEcR-A, dsBgHR3 o dsBgFTZ-F1 produce una clara alteración de los niveles de ecdisteroides circulantes, que podría producir la desregulación en la síntesis y/o liberación de los péptidos encargados del control de la écdisis. Los resultados presentados, además, sugieren que no se precisan niveles elevados de ecdisteroides para llevar a cabo la síntesis de una nueva cutícula y la digestión de la ninfal, es decir para que se lleve a cabo el proceso de apólis.

5.3.3. BgEcR-A y BgFTZ-F1 intervienen en diferentes procesos de la hembra adulta de *B. germanica*

Las ninfas tratadas con dsBgEcR-A y dsBgFTZ-F1 que completaban la muda imaginal nos permitieron estudiar procesos que se ven afectados por estos dos factores de transcripción durante la vida adulta, en concreto la aparición de las alas y la degeneración de la glándula protorácica. Los individuos interferidos con dsBgEcR-A que mudaban a adulto presentaban claros defectos en la extensión de los dos pares de alas, especialmente en el segundo par. Varios estudios en *D. melanogaster* han demostrado que la extensión de las alas está regulada por neuropéptidos, especialmente por el péptido cardioactivo de crustáceos (CCAP) y por el bursicón. Ambos péptidos se sintetizan en el sistema nervioso central y se liberan a la hemolinfa tras la écdisis, controlando directamente la extensión de las alas de la mosca (Park *et al.*, 2003; Dewey *et al.*, 2004). Basándonos en el modelo de *D. melanogaster*, hipotetizamos que la extensión de las alas forma parte del programa general de la muda, y que, como consecuencia, se encuentra claramente afectado por el descenso en los niveles de BgEcR-A en *B. germanica*.

Por su parte, las ninfas tratadas con dsBgFTZ-F1 también presentaban alas mal posicionadas, aunque correctamente extendidas. Además, presentaban todas las quetas de sus patas torcidas. En estas ninfas, los movimientos que permiten liberarse de la exuvia se encontraban muy afectados. Esto produce que las ninfas que eran capaces de liberarse completamente de la exuvia precisaban más tiempo del normal para llevar a

cabo este proceso, de manera que la esclerotización de las alas y de las quetas de las patas se producía cuando el individuo aún no había completado totalmente la écdisis (figura 5.9).

El segundo fenotipo observado en todos los individuos tratados con dsBgEcR-A y dsBgFTZ-F1 que mudaban a adulto es que la glándula protorácica no degeneraba (figura 5.10). En la mayoría de los insectos, incluyendo *B. germanica* (Romaña *et al.*, 1995), *D. melanogaster* (Dai y Gilbert, 1991) y *M. sexta* (Dai y Gilbert, 1997), la glándula protorácica degenera en el estadio adulto. En insectos control, las células de la glándula protorácica presentaban una gran cantidad de lisosomas a las 72 h de la muda imaginal (figura 5.10C), sugiriendo que la destrucción de la glándula se produce mediante autofagia. Transcurridos 7 días tras la muda imaginal, la glándula queda reducida a un simple eje muscular rodeado por un pequeño número de células (figura 5.10A). En los individuos tratados con dsEcR-A o dsBgFTZ-F1 el proceso de degeneración estaba totalmente bloqueado, de forma que no se detectaba la aparición de lisosomas en estos insectos tras 72 h de la muda imaginal (figura 5.10C). Pese a que ambos factores no se han relacionado en la degeneración de la glándula protorácica en ningún otro insecto, sí que se han vinculado con la destrucción de otros órganos durante el inicio de la metamorfosis. Por ejemplo, la 20E regula la muerte celular de las glándulas salivares de *D. melanogaster* durante la fase de prepupa (para una revisión, véase Thummel, 2001; Yin y Thummel, 2005). En este modelo de muerte celular se han identificado hasta cuatro genes de la cascada de respuesta a la ecdisona que están directamente implicados en la degeneración de la glándula, *βFTZ-F1*, *BR-C*, *E74* y *E93*. En este modelo, *βFTZ-F1* actúa como el factor crítico de competencia induciendo la activación de *BR-C*, *E74A* y *E93*. Estos genes, en colaboración con *EcR*, controlan la expresión de genes inductores de apoptosis, como *ark* (homólogo de *APAF-1/CED-4*), la caspasa *dronc*, y dos genes inductores de muerte celular, *reaper (rpr)* y *head involution defective (hid)* (Jiang *et al.*, 2000; Lee y Baehrecke, 2001).

**6. PAPEL DE BgEcR-A, BgHR3 Y
BgFTZ-F1 EN LA EMBRIOGÉNESIS
DE *B. GERMANICA***

6.1. ANTECEDENTES

En los insectos hemimetábolos estudiados hasta la fecha, la morfogénesis se lleva a cabo durante el primer 40% del desarrollo embrionario. Durante este periodo, el embrión pasa de ser un acumulo de células indiferenciadas, a una versión en miniatura del organismo adulto, perfectamente segmentado y con todos los apéndices desarrollados. Los principales procesos de proliferación y diferenciación celular que tienen lugar en el embrión de los insectos primitivos durante este periodo inicial de la embriogénesis son, la formación de la blástula, de la banda germinal y de la membrana serosa y el posterior desarrollo de los segmentos cefálicos y torácicos con sus correspondientes apéndices (antenas y patas). Posteriormente se desarrollan los segmentos abdominales y, finalmente, se produce el cierre dorsal (para una visión general de la embriogénesis de insectos hemimetábolos, véase Davis y Patel, 2002).

En los insectos hemimetábolos, esta dramática reorganización morfológica ocurre en presencia de varios picos de 20E y en ausencia total de HJ (para una revisión, véase Truman y Riddiford, 2002). Este marco endocrino es totalmente diferente al que se da en la embriogénesis de los insectos holometábolos más desarrollados, como dípteros y lepidópteros, donde sólo se detecta un pico de 20E que aparece simultáneamente a uno de HJ alrededor del 50% del desarrollo (véase Kozlova y Thummel, 2003; Sullivan y Thummel, 2004).

El objetivo principal de este capítulo consiste en el análisis funcional de cada uno de los receptores nucleares que estamos analizando, BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1, durante el desarrollo embrionario de *B. germanica*. Para ello, pretendemos eliminar selectivamente la función de cada uno de dichos factores mediante la técnica del RNAi parental. Esta técnica se basa en el hecho de que cuando se inyecta el dsRNA en el abdomen de una hembra adulta al final del ciclo gonadotrófico, este dsRNA es incorporado al interior del oocito y actúa posteriormente inactivando al correspondiente mRNA cuando se expresa durante la embriogénesis (Bucher *et al.* 2005). Como pasos previos para completar el objetivo principal, caracterizaremos en detalle los niveles de

20E y de HJIII durante la embriogénesis de *B. germanica*, y analizaremos los patrones de expresión de los receptores nucleares objeto de estudio.

6.2. RESULTADOS

6.2.1. Niveles de ecdisteroides y de HJIII durante el desarrollo embrionario

El primer paso en el estudio de la embriogénesis de *B. germanica* consistió en la caracterización del contenido de ecdisteroides y de HJIII en embriones de la cucaracha a lo largo de los 17 días que dura el proceso. La cuantificación de los ecdisteroides se llevó a cabo en colaboración con la Dra. Núria Pascual, y los niveles de HJIII se determinaron con la ayuda del Prof. Karl Treiblmayr, tal y como ya hemos mencionado en el apartado 4.2.1.

Como puede verse en la figura 6.1, los ecdisteroides embrionarios presentan dos claros picos. El primero se observa entre los días 5-7, es decir, entre un 30-40 % del desarrollo embrionario, con unos niveles máximos a día 6 de 155 pg de 20E por embrión. El segundo pico, mucho más acusado, se produce entre los días 11-15, esto es, entre un 65-90 % de la embriogénesis, con niveles máximos de 731 pg de 20E por embrión, a día 13.

Respecto a los niveles de HJIII, esta hormona solo pudo ser detectada durante la segunda mitad de la embriogénesis, entre un 50-90 % del desarrollo, oscilando entre valores de 0,56 pmol/embrión, a día 15 y 1,89 pmol/embrión, a día 10. Los niveles de HJIII vuelven a ser indetectables 48 h antes de la eclosión (figura 6.1).

6.2.2. Caracterización de la embriogénesis temprana (morfogénesis) de *B. germanica*

Tras establecer el marco endocrino durante el desarrollo embrionario, caracterizamos el proceso de la morfogénesis que tiene lugar durante la embriogénesis temprana de *B. germanica*, esto es durante los primeros siete días del proceso. Para ello,

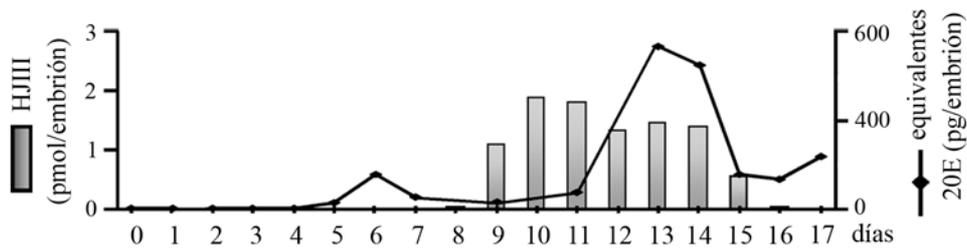


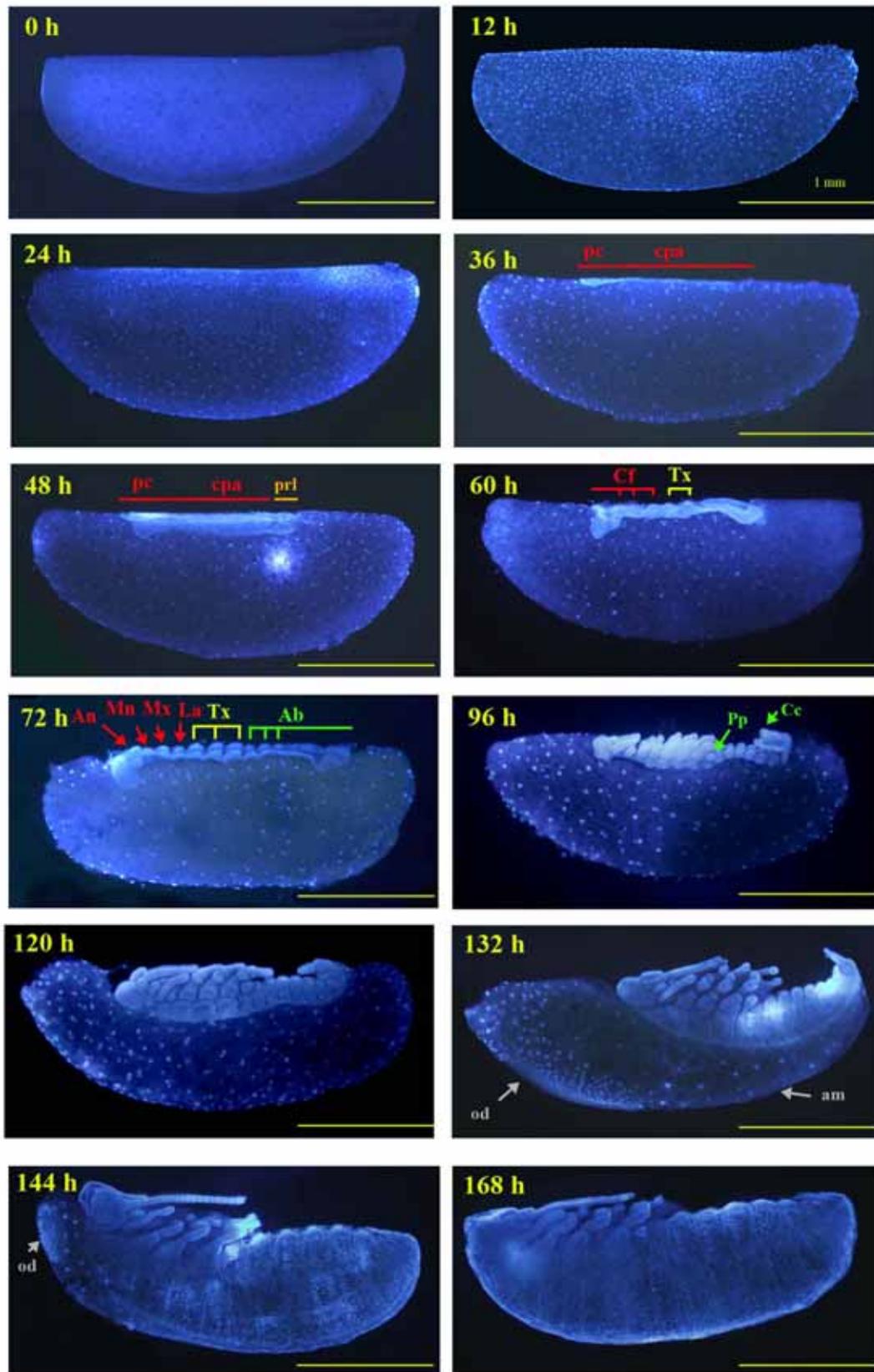
Figura 6.1.- Contenido de ecdisteroides y de hormona juvenil durante el desarrollo embrionario de *B. germanica*. Los ecdisteroides (línea continua) se representan como pg de 20E por embrión. Los niveles de HJIII (columnas) se expresan como pmol de HJIII por embrión.

teñimos embriones extraídos de sus respectivas ootecas y sin la cubierta coriónica, mediante tinción con dihidrocloruro 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que revela específicamente la presencia de DNA. La embriogénesis de *B. germanica*, como en la mayoría de insectos hemimetábolos, es de tipo *banda germinal pequeña*, es decir, el rudimento germinal solo ocupa una pequeña porción del embrión. Los resultados obtenidos en nuestras condiciones de cría, a 30°C, se presentan en la figura 6.2. Durante las primeras 12-24 h del desarrollo embrionario, el núcleo que se encuentra en el interior del embrión se divide sin que se produzca la división de la pared celular, formándose las enérgidas (núcleos con una porción de citoplasma asociado), las cuales migran hacia la superficie del embrión donde formarán el blastodermo (figura 6.2, 0-24 h). Las enérgidas no se sitúan uniformemente a lo largo de toda la superficie del embrión, sino que se observa una mayor densidad en la zona ventral, lo que origina un blastodermo polarizado (figura 6.2, 12 h). A las 36 h, las enérgidas migran hacia la región ventral del embrión donde se condensan y proliferan hasta formar una monocapa celular que dará lugar al primordio embrionario, o banda germinal. En esta fase del desarrollo, 36-48 h después del inicio del proceso, la banda germinal consta únicamente del protocéfalo (pc), que dará lugar a las regiones pre-antenas y antenas de la cabeza, y por el cuerpo postantenal (cpa), a partir del cual se originarán el resto de segmentos cefálicos, esto es, las mandíbulas, maxilas y el labio, y por la zona de

proliferación indiferenciada (prl), a partir de la cual se diferenciarán progresivamente los diferentes segmentos torácicos y abdominales (figura 6.2, 36-48 h). A las 60 h de desarrollo, las antenas se alargan, y comienzan a diferenciarse los segmentos cefálicos y torácicos. Por el contrario, la zona de proliferación, desde donde se generarán los diferentes segmentos abdominales, permanece totalmente indiferenciada (figura 6.2, 60 h). Tras 72 h de desarrollo embrionario, todos los segmentos cefálicos y torácicos están claramente diferenciados y, además, se distinguen los primeros segmentos abdominales (figura 6.2, 72h).

Por otra parte, entre 48-72 h del desarrollo, las enérgidas que no han formado el rudimento germinal propiamente dicho, se diferenciarán formando los tejidos extraembrionarios, esto es, dos membranas celulares denominadas amnion y serosa, que cubren la banda germinal y todo el embrión respectivamente. Las células que forman la serosa son claramente visibles a partir de las 48 h del desarrollo embrionario, puesto que inician un proceso de poliploidia que resulta en un incremento considerable del tamaño nuclear (figura 6.2, 60 h y figura 6.3). Tras 96 h, se produce el crecimiento progresivo

Figura 6.2.- Morfología del embrión durante la embriogénesis temprana de *B. germanica* mediante tinción con DAPI. De izquierda a derecha, y de arriba a abajo: embrión de 0 h en el que aún no se han producido divisiones del cigoto. Embrión de 12 h en el que se pueden observar las primeras enérgidas que formarán el blastodermo. Embrión de 24 h que presenta condensación de las enérgidas en su zona ventral. Embriones de 36 h y 48 h, respectivamente, en los que se observa la banda germinal en la que se pueden distinguir las regiones del protocéfalo (pc), el cuerpo postantenal (cpa) y la zona de proliferación (prl). Embrión de 60 h en el que se distingue la región cefálica (Cf) y los dos primeros segmentos torácicos (Tx). Embrión de 72 h en el que se distinguen los segmentos cefálicos: antenas (An), mandíbulas (Mn), maxilas (Mx) y labio (Lb), los tres segmentos torácicos y los tres primeros segmentos abdominales. Embrión de 96 h en el que se puede ver la totalidad de los segmentos abdominales, de los que únicamente se desarrollan el primer segmento abdominal, como pleuropodia (Pp), y el último segmento abdominal, que forma los cercos (Cc). Embrión de 120 h en el que se distinguen los segmentos de las extremidades, y se puede observar que el embrión se desarrolla lateralmente empezando a cubrir el vitelo. Embrión de 132 h situado en la región caudal tras haber realizado el proceso de katatrepsis, y en el que se pueden observar el órgano dorsal (od), así como la membrana amniótica (am) que ha dejado de cubrir el embrión. Embrión de 144 h que presenta completado el cierre dorsal en su región dorso-posterior, pero no así en la región anterior donde pueden observarse los restos del órgano dorsal. Embrión de 168 h que ha completado el cierre dorsal. Barras de escala: 1mm.



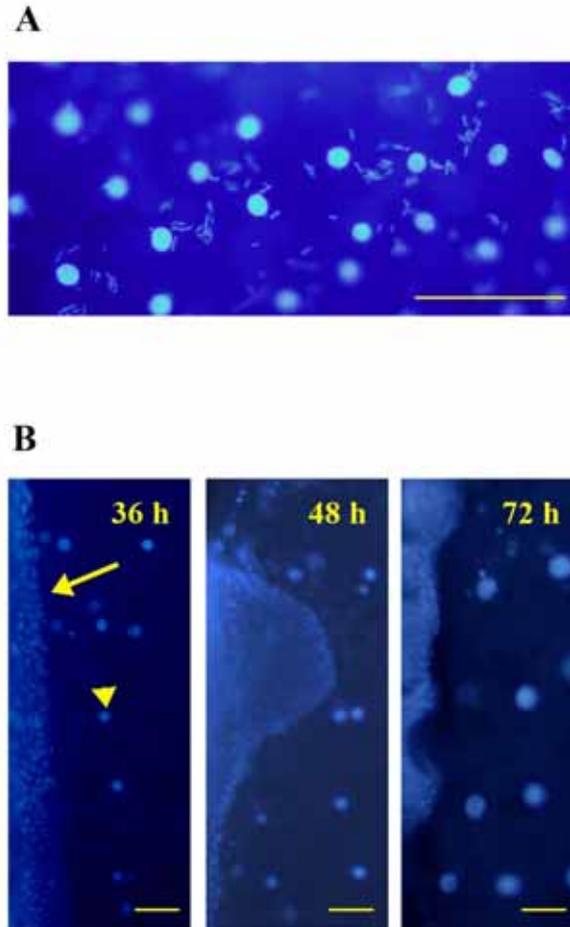


Figura 6.3.- Morfología de las enérgidas y de las células embrionarias durante las primeras etapas del desarrollo embrionario de *B. germanica*. (A) Enérgidas en la superficie de un embrión a las 24 h del desarrollo embrionario reveladas mediante la tinción de DAPI. Junto a las enérgidas se puede apreciar el DNA correspondiente a los endosimbiontes presentes en la superficie. (B) Las células que originan la membrana serosa sufren un proceso de poliploidia. De izquierda a derecha: embriones de 36 h en los que puede apreciarse la diferencia de tamaño entre las células que forman el rudimento germinal (flecha), y aquellas que darán lugar a la membrana serosa (punta de flecha). Embriones de 48 h y 72 h, respectivamente, en los que puede observarse el crecimiento, por poliploidia, del tamaño nuclear de las enérgidas que dan lugar a la serosa. Barra de escala: 50 μm .

de los segmentos cefálicos, que darán lugar a las mandíbulas, maxilas y labio, así como de los segmentos torácicos. Por su parte, el abdomen inicia un proceso de rápida diferenciación de sus segmentos. En el primer segmento abdominal se desarrolla la pleuropodia (Pp), y en el último segmento se forma los cercos (Cc) (figura 6.2, 96 h). Finalmente, tras 120 h de embriogénesis, los segmentos de las extremidades se diferencian, y el embrión crece lateralmente empezando a envolver el vitelo (figura 6.2, 120 h). A partir de ese momento se inicia el cierre dorsal, proceso mediante el cual el embrión envuelve completamente al vitelo del embrión. En primer lugar, el embrión se desplaza a una posición más caudal, en un movimiento que se denomina katatrepsis (figura 6.2, 132 h). En ese momento se produce la fusión del amnion y la serosa, formando el denominado órgano dorsal (od) que progresivamente desaparece durante el proceso del cierre dorsal (figura 6.2, 144-168 h). Durante este proceso, el embrión crece lateralmente desde la región ventral hasta la dorsal, produciéndose finalmente el cierre dorsal. Este cierre no se produce de forma simultánea en todo el embrión. De hecho, el cierre dorsal se inicia en la región caudal y progresa hacia la región anterior (figura 6.2, 144-168 h), completándose tras 168 h, 7 días, de embriogénesis, momento en el que se produce la deposición de la cutícula proninfa.

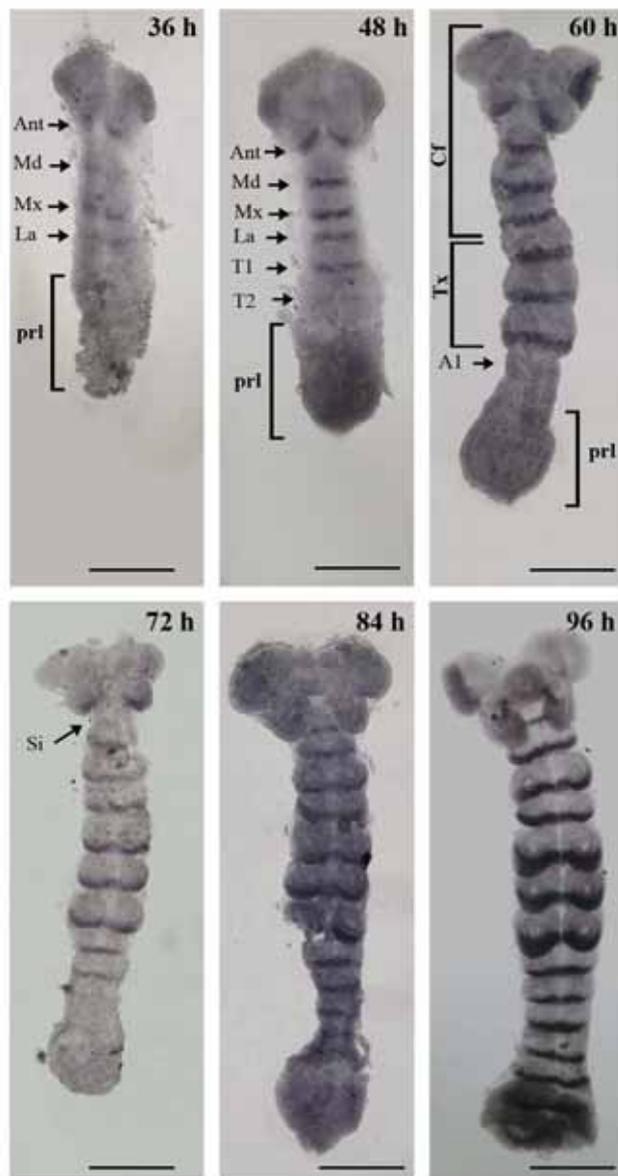
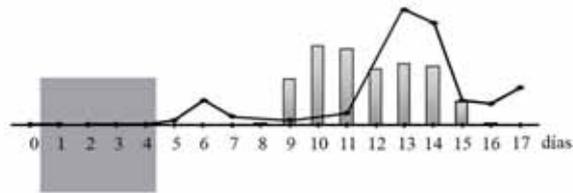
6.2.3. Análisis del proceso de segmentación durante la morfogénesis de *B. germanica*

Tras establecer los principales cambios morfogenéticos que tienen lugar durante la embriogénesis temprana de *B. germanica*, se caracterizó en detalle la cinética de especificación de los diferentes segmentos que conforman la cabeza, el tórax y el abdomen del insecto. El proceso de segmentación acontece entre un 9-25 % del desarrollo embrionario, esto es, entre 36-96 h tras el inicio del estadio. Uno de los genes más importantes en el control de dicho proceso es *engrailed* (*eng*). Este gen homeótico codifica una proteína que se expresa en la zona posterior de cada uno de los segmentos que se diferencian. Tanto su estructura como su función están altamente conservadas y se ha podido utilizar como marcador de la segmentación en un gran número de especies

de insectos, tanto en aquellos que presentan un desarrollo de banda germinal corto como largo (DiNardo *et al.*, 1985; Poole *et al.*, 1985). En nuestro caso, hemos llevado a cabo inmunocitoquímica de embriones de *B. germanica* utilizando el anticuerpo monoclonal 4D-9 generado contra la proteína engrailed de *D. melanogaster*, ya que se ha utilizado con éxito para determinar la expresión de engrailed en otras especies.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.4. Tal y como hemos descrito en el apartado anterior, la banda germinal se forma a las 36 h del inicio del desarrollo embrionario. Al analizar la expresión de engrailed en estas bandas germinales, comprobamos que esta proteína se expresa en bandas discretas, de cuatro a cinco células, a ambos lados de los tres segmentos cefálicos (mandíbulas, maxilas y labio) y del primordio de la antena (figura 6.4, 36 h). A medida que la banda germinal se desarrolla, entre 48-60 h, la expresión de engrailed aparece progresivamente en los tres segmentos torácicos (figura 6.4, 48-60h). A partir de ese momento, la expresión de engrailed se hace evidente de forma secuencial en los diferentes segmentos abdominales, así como en el segmento intercalar de la región cefálica, a partir del cual se originará el tritocerebro y diferentes regiones de la cápsula cefálica (figura 6.4, 72-84 h). Finalmente, tras 96 h de desarrollo, todos los segmentos del insecto expresan engrailed (figura 6.4, 96h).

Figura 6.4.- Análisis del proceso de segmentación durante la morfogénesis de *B. germanica* mediante inmunocitoquímica de engrailed (eng). En la parte superior se añaden los niveles de ecdisteroides y de HJIII presentados en la figura 6.1. Se indica el periodo en el que se ha realizado la inmunocitoquímica de eng. En la parte inferior se muestran, de izquierda a derecha y de arriba a abajo: banda germinal de 36 h en la que se observa marcaje de eng en los segmentos cefálicos, antenas (An), mandíbulas (Mn), maxilas (Mx) y labio (Lb) y se indica la región de proliferación (prl). Banda germinal de 48 h en la que se observa marcaje en eng en los segmentos cefálicos y en los dos primeros segmentos torácicos (T1 y T2). Embrión de 60 h en el que el marcaje de eng se detecta en todos los segmentos cefálicos (Cf) y torácicos (Tx), así como en el primer segmento abdominal (A1). Embrión de 72 h en el que la expresión de eng se hace visible en el segmento intercalar (Si) de la región cefálica y en varios segmentos abdominales. Embriones de 84 h y 96 h, respectivamente, en los que la expresión de eng aparece progresivamente en todos los segmentos abdominales. Barra de escala: 200 μm .



6.2.4. Patrones de expresión de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 durante la embriogénesis de *B. germanica*

Una vez caracterizados los procesos de morfogénesis y segmentación, se llevó a cabo el estudio de los patrones de expresión, a lo largo del periodo embrionario, de los receptores nucleares objeto de estudio, mediante RT-PCR/Southern blot (figura 6.5).

Los niveles de transcrito de BgEcR-A, son muy elevados en embriones justo al inicio de la embriogénesis, lo que sugiere que su origen es materno. Tras 24 h y hasta el día 4, los niveles del transcrito disminuyen hasta prácticamente desaparecer. Coincidiendo con el primer pico de ecdisteroides, entre los días 5 a 7, el mRNA de BgEcR-A se vuelve a detectar y sus niveles se mantienen altos hasta el final de la embriogénesis.

Por su parte, la expresión de BgHR3-A y BgHR3-B (como suma de los niveles de BgHR3-B₁ y BgHR3-B₂) es alta durante tres periodos concretos, esto es, a día 2 (momento en el que no existe una elevación detectable de los niveles de ecdisteroides), y durante los dos picos de ecdisteroides, entre los días 5-7 y 10-15.

Finalmente, se analizaron los niveles de expresión de BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B. Dado los altos niveles de expresión de ambas isoformas, llevamos a cabo el análisis de ambos transcritos de forma individualizada. Al igual que en el caso de BgEcR-A, tanto BgFTZ-F1A como BgFTZ-F1B, son detectables en embriones a día 0, sugiriendo un origen materno. A día 1 los niveles de ambos transcritos disminuyen, pero 24 h después vuelven a incrementarse gradualmente, adquiriendo niveles máximos a día 9. A partir de entonces, ambos transcritos descienden hasta casi desaparecer al final de la embriogénesis.

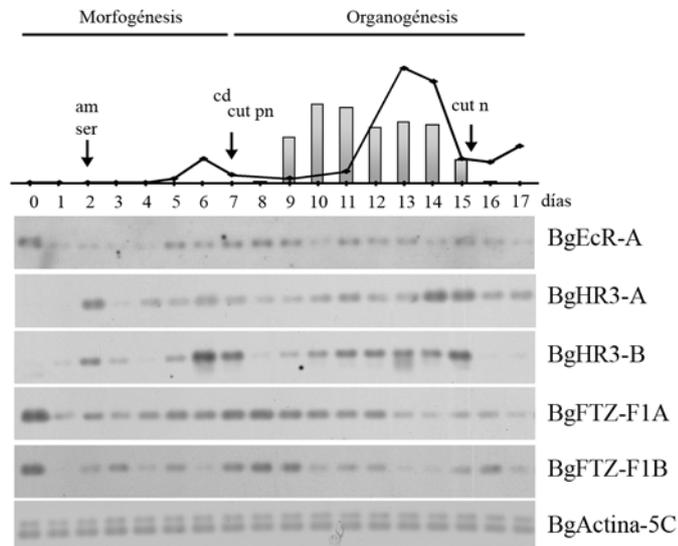


Figura 6.5.- Patrones de expresión de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 durante el periodo embrionario de *B. germanica*. La amplificación específica de cada RNA se llevó a cabo mediante RT-PCR/Southern-blot a partir de la misma cantidad de RNA extraído de ootecas a lo largo de todo el desarrollo embrionario. Como referencia se utilizaron los niveles de BgActin5C. Los Southern-blots son representativos de dos réplicas. En la parte superior se añaden los niveles circulantes de ecdisteroides y de HJIII presentados en la figura 6.1. Se indican los momentos en que se produce la formación de las membranas amnióticas (am) y serosa (ser), el cierre dorsal (cd), así como la deposición de la cutícula de la proninfa (cut pn) y de la cutícula ninfal (n).

6.2.5. El tratamiento de la hembra con dsBgEcR-A y dsFTZ-F1 y efecto sobre los embriones

En primer lugar, se estudió el papel de los dos factores de origen materno, esto es, BgEcR-A y BgFTZ-F1, en el desarrollo de la embriogénesis de *B. germanica*. Para ello se utilizó la técnica del RNAi parental *in vivo*. Así, se inyectó 1 µg de dsBgEcR-A o de dsBgFTZ-F1 en hembras adultas de 5 días, es decir 3 días antes de la extrusión de la ooteca. En ninguno de los dos casos se observaron defectos en la

oogénesis, ovulación y extrusión de la ooteca. A partir del inicio de la embriogénesis se disecaron los embriones de sus respectivas ootecas, se retiró la cubierta coriónica y se analizaron los embriones interferidos mediante la tinción de DAPI. El 58 % de los embriones interferidos con dsBgEcR-A no se desarrolló, mientras que en el 34 %, se pudieron detectar divisiones nucleares y migración de las enérgidas hacia la superficie del embrión aunque de forma anormal (tabla 6.1). Así, tras 12 h de desarrollo embrionario encontramos embriones que presentaban un número claramente inferior de enérgidas en su superficie cuando se comparaban con los embriones procedentes de hembras control (figura 6.6). Esta reducción en el número de enérgidas resultó en la aparición de bandas germinales con morfologías claramente anormales, mal posicionadas, y de tamaño netamente inferior al de los embriones control (figura 6.6). En ningún caso, los embriones pudieron progresar en el desarrollo. Por su parte, los embriones interferidos con dsBgFTZ-F1 presentaron un número y distribución normal de las enérgidas (figura 6.6). Sin embargo, tras 48 h de desarrollo, los rudimentos germinales que se formaron presentaban un tamaño muy inferior a los embriones control (figura 6.6). Estos embriones progresaron hasta las 96 h de desarrollo embrionario, presentando, sin embargo, considerables malformaciones que impidieron su posterior desarrollo (figura 6.6).

Tabla 6.1.- Porcentaje de embriones tratados con dsBgEcR-A o con dsFTZ-F1 que se desarrollan con o sin malformaciones, o que no se desarrollan. n= número total de embriones analizados.

| | Banda germinal se desarrolla | | Banda germinal no se desarrolla | n |
|-------------------|-------------------------------------|---------------------------|--|----------|
| | sin malformaciones | con malformaciones | | |
| dsBgEcR-A | 8% | 34% | 58% | 581 |
| dsBgFTZ-F1 | 4% | 43% | 52% | 121 |

6.2.6. Tratamiento de la hembra con dsBgHR3 y efecto sobre los embriones

El análisis funcional de BgHR3 durante la embriogénesis, se llevó a cabo siguiendo la misma estrategia descrita en el anterior apartado. En los embriones interferidos con dsBgHR-3, las divisiones nucleares que tienen lugar durante las primeras 12 h del desarrollo, así como la migración de las enérgidas hacia la superficie del embrión se produjo de forma correcta (figura 6.7). En el 40 % de los embriones interferidos, sin embargo, no se formó la banda germinal. Un 18 % de los embriones interferidos presentaron bandas germinales con problemas morfológicos. A los embriones que presentaron anomalías muy severas, y que por ello no progresaron en su desarrollo se les incluyó en la categoría *clase I* (18 %) (figura 6.7), mientras que aquellos embriones interferidos que pudieron formar banda germinal con un menor grado de afectación, y que por lo tanto pudieron progresar, se les denominó *clase II* (4 %) (figura 6.7). Principalmente, los embriones de *clase II* presentaron defectos en el desarrollo de la región cefálica, desde un nivel poco severo en el que únicamente se apreció una cierta reducción o pérdida de los lóbulos cefálicos (figuras 6.7 y 6.8), hasta embriones que presentaban la pérdida de todos los segmentos cefálicos (figuras 6.7 y 6.8).

Tabla 6.2.- Porcentaje de embriones tratados con dsBgHR3 en los que se desarrolla banda germinal (con o sin malformaciones) o en los que no se desarrolla. Aquellos embriones en los que se desarrolla banda germinal con malformaciones se clasificaron en dos categorías según si llegaban a formar un embrión segmentado con pérdida total o parcial de segmentos cefálicos (*clase II*), o si no llegan a formarlo (*clase I*). n = número total de embriones analizados

| | Banda germinal se desarrolla | | Banda germinal no se desarrolla | n |
|----------------|-------------------------------------|---|--|----------|
| | Sin malformaciones | Con malformaciones <i>Clase I</i> <i>Clase II</i> | | |
| dsBgHR3 | 42% | 18% 4% | 37% | 2.090 |

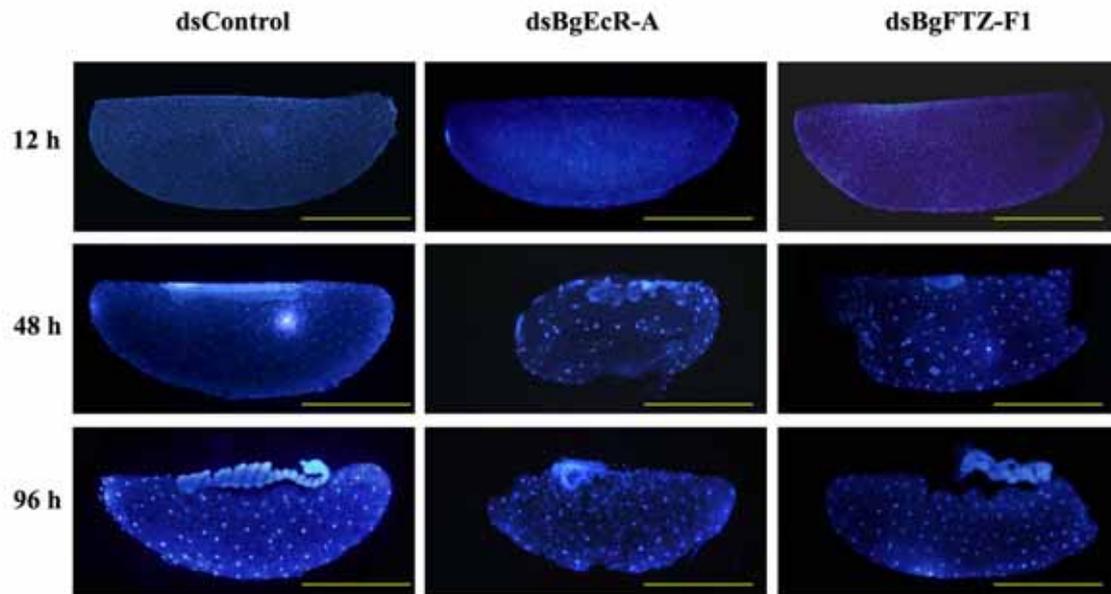


Figura 6.6.- Fenotipo de los embriones interferidos para dsBgEcR-A y dsBgFTZ-F1 durante la embriogénesis temprana de *B. germanica*. Embriones teñidos con DAPI. De izquierda a derecha y de arriba a abajo. Embrión control de 12 h en el que se pueden observar las primeras células que formarán el blastodermo. Embrión tratado con dsBgEcR-A de 12 h en el que las células presentan número inferior al normal. Embrión tratado con dsBgFTZ-F1 con distribución y aspecto normal de las células. Embrión de 48 h en el que se observa la banda germinal. Embriones de 48 h interferidos para dsBgEcR-A y dsBgFTZ-F1, respectivamente, en los que pueden observarse bandas germinales de longitud inferior al control y morfología anormal. Embrión control de 96 h en el que se puede ver la totalidad de los segmentos cefálicos, torácicos y abdominales. Embriones de 96 h interferidos para dsBgEcR-A y dsBgFTZ-F1, respectivamente, presentando considerables malformaciones. Barra de escala: 1 mm.

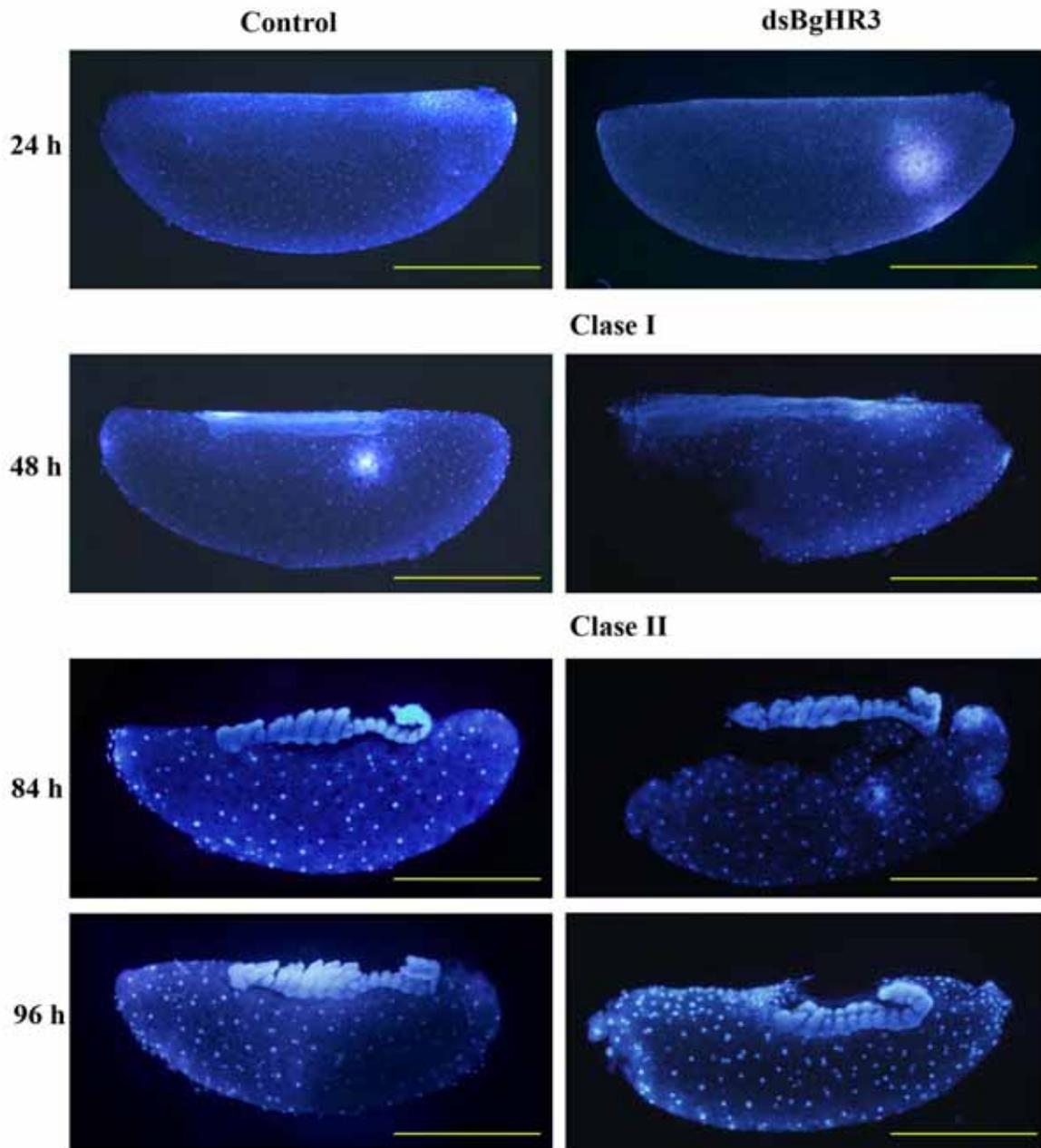


Figura 6.7.- Morfología de los embriones interferidos para BgHR3 durante la embriogénesis temprana de *B. germanica*. Todos los embriones se tiñeron con DAPI. En la columna de la izquierda muestran embriones control y en la derecha, embriones tratados con dsBHR3. En la primera fila se muestran embriones control y tratado con dsHR3 de 24 h que presenta condensación de las enérgidas en su zona ventral. En la segunda fila se muestra el fenotipo de los embriones interferidos para BgHR3 con morfología de clase I, en la que la banda germinal no se desarrolla correctamente. En la tercera y cuarta fila se muestran embriones interferidos para BgHR3 correspondientes al fenotipo de clase II en el que faltan algunos segmentos cefálicos (imagen superior), o la totalidad de ellos (imagen inferior). Barra de escala: 1mm.

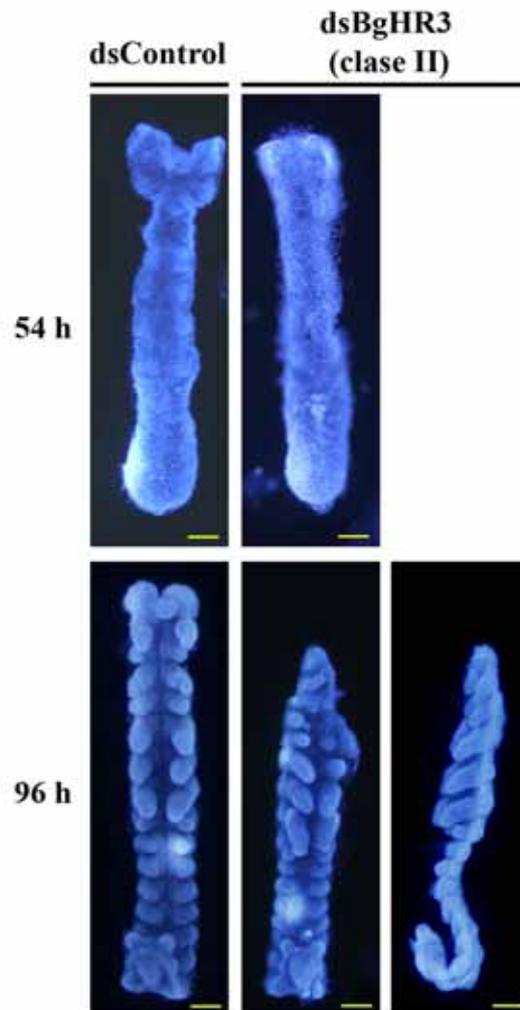


Figura 6.8.- Morfología de los embriones interferidos para BgHR3 pertenecientes a la clase II. Todos los embriones se tiñen con DAPI. En la fila superior se muestran embriones tras 54 h del desarrollo embrionario control (izquierda) e interferido con dsBgHR3 (derecha) en el que se observa una clara reducción de la masa celular en la región cefálica. En la fila inferior se muestran embriones de 96 h del desarrollo embrionario control (izquierda) e interferidos con dsBgHR3 mostrando pérdida del número de segmentos cefálicos; visión frontal del embrión (centro) y visión lateral (derecha). Barra de escala: 100 μ m.

A continuación se analizaron en detalle los embriones interferidos con dsBgHR3 mediante inmunocitoquímica de sus bandas germinales con el anticuerpo 4D-9 anti-engrailed (figura 6.9). Esta técnica nos permitió determinar si en estas bandas germinales se produce la diferenciación estructural de los diferentes segmentos cefálicos y torácicos, pese a que en algunos casos no se podían distinguir morfológicamente. Para ello, disecamos y analizamos embriones interferidos entre 48-96 h de la embriogénesis. Tal y como se puede apreciar en la figura 6.9 tanto en los embriones de *clase I* como los pertenecientes a la *clase II* se pudo apreciar claramente la expresión de engrailed. En las bandas germinales de *clase I*, se obtuvieron embriones que aunque presentaban defectos muy severos en el desarrollo cefálico, llegaron a diferenciar algún segmento (figura 6.9) o incluso se llevó a cabo correctamente la determinación de todos los segmentos de la región cefálica y torácica (figura 6.9). Confirmando este resultado, los embriones interferidos de *clase II* presentaron la segmentación claramente normal en todos los casos, lo que indicó que el problema en el desarrollo se debió a una pérdida moderada de volumen cefálico (figura 6.9) o a la ausencia total de la región cefálica y parte de la torácica (figura 6.9).

6.3. DISCUSIÓN

En el presente capítulo se ha ampliado la caracterización funcional de los receptores nucleares, BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1, durante el periodo embrionario. En primer lugar, se ha llevado a cabo un análisis detallado del proceso de embriogénesis en *B. germanica*, cuantificado los niveles de 20E y de HJIII, y detallando los procesos morfológicos y de segmentación que tienen lugar durante la embriogénesis temprana de este insecto, que presenta una embriogénesis de tipo banda germinal pequeña.

6.3.1. Niveles de ecdisteroides y de HJIII durante el desarrollo embrionario

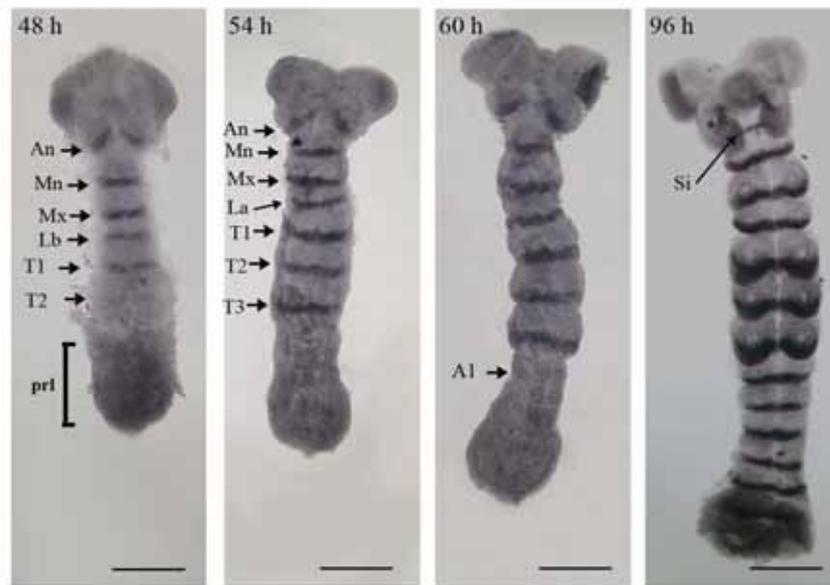
Los niveles de ecdisteroides embrionarios presentan dos claros picos en *B. germanica*. El primero se observa entre el 30 y el 40% del desarrollo embrionario, y el segundo pico se produce entre el 50 y el 90%. Por otro lado, la HJIII sólo es detectable en la segunda mitad del desarrollo (figura 6.1). Este marco endocrino coincide con los descritos en otros insectos primitivos, como por ejemplo *Locusta migratoria* (Hoffmann, 1980) o las cucarachas *Naphoeta cinerea* (Imboden, 1978; Lanzrein *et al.*, 1985) y *Blaberus craniifer* (Bullière *et al.*, 1979). Por el contrario, los insectos más evolucionados, como *D. melanogaster*, sólo presenta un pico de ecdisteroides, coincidente con el de HJ, entre el 25 y el 50% del desarrollo, y que está relacionado con la retracción de la banda germinal, la involución cefálica y la deposición de la cutícula (Chavez *et al.*, 2000; Kozlova y Thummel, 2003).

6.3.2. Caracterización del desarrollo embrionario temprano de *B. germanica*.

Para establecer las bases conceptuales sobre las que analizar la función que desempeñan los diferentes receptores nucleares, caracterizamos los diferentes parámetros morfológicos que se dan durante la embriogénesis temprana de

Figura 6.9.- Análisis del proceso de segmentación en embriones interferidos con dsBgHR3 mediante inmunocitoquímica de engrailed (eng). En el panel superior se muestran embriones control de 48-96 h de desarrollo embrionario y en el panel inferior se muestran individuos interferidos con dsBgHR3 en el mismo estadio del desarrollo. Los embriones interferidos se han clasificado en *clase I*, banda germinal con gran reducción de la masa celular de la región cefálica y *clase II*, embriones con reducción de la masa cefálica o pérdida de varios segmentos cefálicos. Flechas indican los segmentos cefálicos: antenas (An), mandíbulas (Mn), maxilas (Mx), labios (La) y segmento intercalar (Si), torácicos (T1, T2 y T3) y el primer segmento abdominal (A1). La región de proliferación del embrión (prl) se indica mediante corchete. Barra de escala: 200 µm.

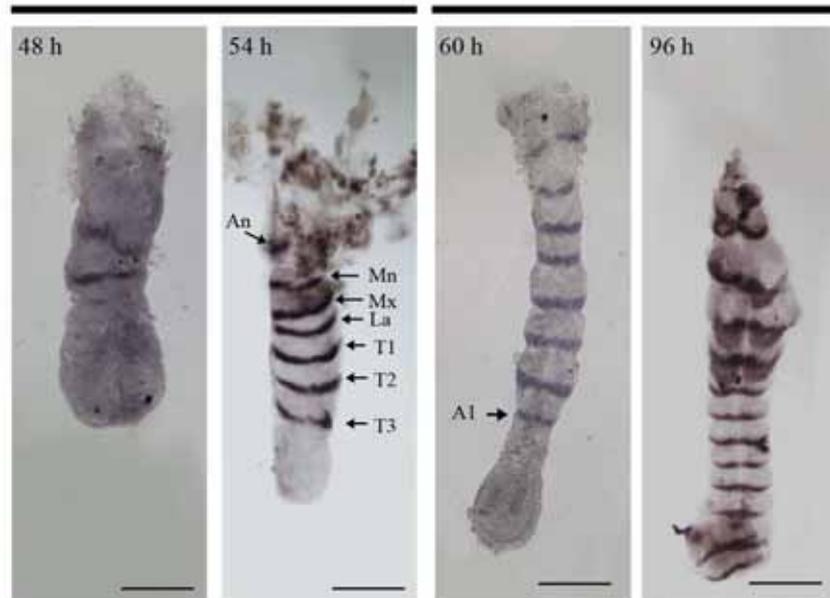
Control



dsBgHR3

clase I

clase II



B. germanica, esto es, entre los días 0-7 (0-40% del desarrollo) mediante la tinción de DAPI. Además, caracterizamos el patrón de segmentación de nuestro insecto modelo, que acontece entre el 9-25% del desarrollo, mediante inmunocitoquímica de la proteína homeótica engrailed. Los resultados obtenidos, resumidos en las figuras 6.2 y 6.3 muestran que las divisiones iniciales del núcleo y la migración de las enérgidas hasta la superficie para formar el blastodermo tienen lugar durante las primeras 12 h del desarrollo. En los insectos hemimetábolos, como *S. gregaria*, se ha demostrado que poco después de llegar a la superficie, las enérgidas se celularizan (Ho *et al.*, 1997). Por el contrario, en insectos más evolucionados, como *D. melanogaster*, las enérgidas no se celularizan y el blastodermo resultante es sincicial (Davis y Patel, 2002), lo que favorece que los primeros eventos en el desarrollo embrionario de estos insectos se produzcan por gradientes de proteínas y de mensajeros a lo largo de todo el embrión. En *B. germanica*, tras 24 h de desarrollo, determinadas células del blastodermo migran hacia la zona ventral del embrión donde condensarán y proliferarán originando la banda germinal. Las células del blastodermo que no forman este rudimento germinal, inician un proceso de poliploidia y de diferenciación, gracias a la acción del gen *zerknüll* (*Zen/Hox3*) (Falciani *et al.*, 1996; Dearden *et al.*, 2000), que dará lugar a las dos membranas extraembrionarias que rodearán a la banda germinal y al vitelo, esto es, la serosa y el amnion (para una revisión ver Sander *et al.*, 1985).

B. germanica, como todos los insectos primitivos, presenta un desarrollo embrionario denominado de banda germinal pequeña, en contraposición al que presentan los insectos más evolucionados, de banda germinal grande. Esta terminología hace referencia a la proporción del embrión que ocupa la banda germinal al formarse. Como puede apreciarse en la figura 6.2, la banda germinal de *B. germanica* solo representa una pequeña porción del total del embrión. Por el contrario, la banda germinal de *D. melanogaster* ocupa la totalidad de la superficie del embrión. La característica principal asociada a la embriogénesis de banda germinal pequeña es que una vez se forma el rudimento germinal, éste solo presenta los segmentos cefálicos y posteriormente se van diferenciando progresivamente los diferentes segmentos torácicos y abdominales desde una zona de proliferación diferenciada. Por el contrario, en la embriogénesis de banda germinal grande la diferenciación de todos los segmentos del

embrión se produce de forma simultánea. Esta diferencia se ha atribuido a la mayor cantidad de aporte de material de origen materno, tanto a nivel de mRNA como de proteína, que presentan los insectos evolucionados (para una revisión, véase Davis y Patel, 2002). A pesar de las diferencias descritas entre los diferentes insectos, el proceso de especificación de los diferentes segmentos está muy conservado, ya que la expresión de la proteína engrailed es igual en *B. germanica* (figura 6.4) que en otros insectos estudiados (Patel *et al.*, 1989; Patel, 1994; Brown *et al.*, 1994; Fleig, 1990; Schmidt-Ott, *et al.*, 1994; Coorley *et al.*, 1999; Marie y Bacon, 2000).

Todos los procesos morfogénéticos que hemos descrito se producen en presencia de, al menos, un pico de ecdisteroides y en ausencia de HJIII. Este marco endocrino es claramente diferente al que presentan los insectos holometábolos en los que la morfogénesis tiene lugar en presencia de un pico de ecdisteroides y de HJ simultáneamente (Sullivan y Thummel, 2003).

6.3.3. Expresión de BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 durante el desarrollo embrionario de *B. germanica*

La caracterización de los niveles de expresión de los diferentes receptores nucleares ha demostrado que la cascada de factores inducida por la 20E también está presente durante el desarrollo embrionario de los insectos primitivos.

En primer lugar, hemos demostrado que, al igual que ocurre en *D. melanogaster* (Bender *et al.*, 1997; Kozlova y Thummel, 2003), en *B. germanica* el mRNA de BgEcR-A es depositado de forma materna en el embrión (figura 6.5). Es interesante señalar, el análisis de la expresión de BgRXR-S, una de las dos isoformas del heterodímero de BgEcR que forman el receptor funcional de la 20E, muestra que su mRNA también es depositado de forma materna (Maestro *et al.*, 2005). La coincidencia en los patrones de expresión de BgEcR-A y BgRXR a lo largo de la embriogénesis de *B. germanica* sugiere que, como ocurre durante el desarrollo ninfal, el receptor de la 20E es necesario a lo largo de toda la embriogénesis de este insecto.

Por el contrario, BgHR3 se expresa por primera vez a día 2, coincidiendo con la formación de la banda germinal y la diferenciación de la serosa y del amnion (figura 6.4). Es interesante reseñar que la activación de BgHR3 a día 2 se produce sin variaciones en los niveles de ecdisteroides embrionarios. Existen dos posibilidades que expliquen este resultado. En primer lugar, la expresión de BgHR3 podría estar controlada por otras hormonas o por moléculas ecdiesteroidales que no pueden ser detectadas en nuestro ensayo enzimático. En segundo lugar, cabe la posibilidad de que los ecdiesteroides maternos se encuentren conjugados de forma que permanezcan inactivos en el vitelo del embrión. Estos ecdisteroides se activarían mediante la acción de determinados enzimas que se encuentran en el vitelo y serían utilizados inmediatamente por el heterodímero BgEcR-BgRXR durante las etapas iniciales del desarrollo embrionario. La presencia de ecdisteroides en forma inactiva conjugada ya se ha demostrado en otros insectos (Schöck y Perrimon, 2002; Sonobe y Yamada, 2004). Tras este primer pico, BgHR3 se expresa nuevamente coincidiendo con los dos picos de ecdisteroides, entre los días 4-7 y 11-15. Este patrón de expresión difiere claramente con el que presenta *D. melanogaster*, ya que en esta especie DmHR3 sólo se expresa a la mitad de la embriogénesis, coincidiendo con el único pico de ecdiesteroides (Lam *et al.*, 1997; Sullivan y Thummel, 2003).

Por último, hemos caracterizado el patrón de expresión de BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B. Los transcritos de ambos receptores nucleares, al igual que en el caso de BgEcR-A, son depositados en el embrión de forma materna. Posteriormente, la expresión de ambos receptores es alta durante la mitad de la embriogénesis hasta prácticamente desaparecer al final del estadio. Es interesante señalar que estos patrones de expresión no parecen estar relacionados con los niveles de ecdiesteroides embrionarios. Los elevados niveles de transcrito a día 0 sugieren que estos receptores desempeñan una función importante en las primeras etapas del proceso embrionario, al igual que ocurre en *D. melanogaster*. Así, en esta mosca, α FTZ-F1 actúa como cofactor de la proteína FTZ en la activación del propio gen *ftz* y de *engrailed* al inicio de la embriogénesis (Ueda *et al.*, 1990; Guichet *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1997; Florence *et al.*, 1997).

6.3.4. Análisis de la función de BgEcR-A y BFTZ-F1 durante la embriogénesis temprana de *B. germanica*

El análisis del papel que desempeñan los diferentes receptores nucleares en la embriogénesis de *B. germanica* se ha llevado a cabo mediante la técnica del RNAi parental. Así, cuando el dsRNA es inyectado en el abdomen de una hembra adulta al final del ciclo gonadotrófico, este dsRNA es incorporado en los oocitos donde actuará posteriormente inactivando al correspondiente mRNA cuando éste se exprese durante la embriogénesis (véase Bucher *et al.*, 2005).

La mayoría de embriones interferidos con dsBgEcR-A no iniciaron la embriogénesis. En aquellos que se produjo de forma correcta las primeras divisiones nucleares y la migración de las células germinales hasta la superficie del embrión (42 %) se formó la banda germinal, y de estos, en la mayoría esta banda germinal progresó incorrectamente quedando el proceso embrionario interrumpido a día 2, esto es, justo al inicio del crecimiento y diferenciación de la banda germinal. Remarcablemente, en este estadio del desarrollo embrionario se produce, en los embriones control, una fuerte activación de BgHR3, un gen que es dependiente de la acción directa de la 20E. Este es el primer caso en el que se demuestra que la 20E es necesaria en etapas tan tempranas del desarrollo embrionario en los insectos. En *D. melanogaster*, único modelo en el que se ha llevado a cabo un análisis funcional del papel que desempeña DmEcR durante la embriogénesis, ha sido muy difícil estudiar esta regulación ya que tanto el mRNA como la proteína DmEcR que se encuentra al principio de la embriogénesis es de origen materno (Talbot *et al.*, 1993). Así, los mutantes zigóticos de DmEcR mueren durante la embriogénesis presentando únicamente pequeños defectos cuticulares (Bender *et al.*, 1997), mientras que si se generan clones mutantes de DmEcR en los oocitos de hembras adultas, la progresión de la oogenesis se detiene provocando esterilidad en las hembras (Buszczak *et al.*, 1999).

En los últimos años, Kozlova y Thummel (2003) desarrollaron un sistema basado de Gal4-EcR(LBD) que les permitió analizar el patrón espacial y temporal de activación génica dependiente de los ecdisteroides presentes en el embrión. Curiosamente, la activación de Gal4-DmEcR(LBD) solo se detectó a partir del estadio

12, justo cuando los niveles de ecdisteroides son altos. En este estadio del desarrollo se inicia la retracción de la banda germinal y la superficie del embrión se cubre por la amnioserosa. Además la expresión de formas dominantes negativas de DmEcR en el inicio de la embriogénesis ha demostrado que estos embriones paran su desarrollo en el estadio 12 (Kozlova y Thummel, 2003). Todos estos resultados indican claramente que el primer evento controlado por los ecdisteroides en la embriogénesis de *D. melanogaster* es la retracción de la banda germinal durante el estadio 12. Por el contrario, en insectos primitivos como *B. germanica*, los ecdisteroides desempeñan funciones básicas durante el inicio de la embriogénesis, como son, la formación de la banda germinal y su elongación. Al variar evolutivamente el marco endocrino que controla ambos modelos de embriogénesis, se habría perdido el control de la embriogénesis temprana por parte de los ecdisteroides.

Por otra parte, hemos demostrado que aunque los transcritos de BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B, al igual que en el caso de BgEcR-A son de origen materno, su silenciamiento mediante RNAi no produjo ningún defecto hasta las 36-48 h desde el inicio del desarrollo embrionario. Así, aunque la migración de las células germinales se produce de forma correcta, la condensación y/o proliferación de éstas para formar la banda germinal está severamente afectada. En *D. melanogaster*, mutaciones en *ftz-f1* producen los mismos fenotipos embrionarios que los que se observan al mutar el gen homeótico *ftz* (Yu *et al.*, 1997). Así, aunque *ftz-f1* se expresa de forma ubicua en todo el embrión de la mosca, la pérdida de su función genera defectos específicos en la segmentación del embrión, lo que indica que su función primordial durante las primeras etapas de la embriogénesis de *D. melanogaster* es servir como cofactor de *ftz* (Guichet *et al.*, 1997, Yu *et al.*, 1997; Florence *et al.*, 1997). En *B. germanica* parece que las funciones que desempeña BgFTZ-F1, al igual que sucede con BgEcR-A, se producen en etapas más tempranas del desarrollo.

6.3.5.- Análisis de BgHR3 en el desarrollo embrionario de *B. germanica*.

Coincidiendo con su patrón de expresión, los embriones interferidos con dsBgHR3 no mostraron anomalías durante las 48 primeras horas del proceso embrionario, esto es, durante la formación del blastodermo. Sin embargo, dichos embriones mostraron claros problemas en la formación de la banda germinal a día 2. Aquellos embriones que pudieron formar la mencionada banda y la desarrollaron, mostraron defectos en la región torácica, y muy especialmente en la región cefálica, la cual llegaba incluso a estar totalmente ausente. Sin embargo, estos embriones no mostraron ningún defecto en el desarrollo del resto de segmentos. La morfogénesis de las partes anteriores de los embriones en *D. melanogaster*, está controlada por la acción del morfógeno *bicoid*, que se encarga de la activación de genes diana como *orthodenticle (otd)* y *hunchback (hb)* (Gao y Finkelstein, 1998) y de reprimir la traducción de *caudal* (St Johnston y Nüsslein-Volhart, 1992, Lall y Patel, 2001). Sorprendentemente *bicoid* solo ha sido identificado en dípteros superiores. De hecho el conocimiento de los genes implicados en el desarrollo de las estructuras anteriores, cabeza y tórax, en insectos primitivos es muy pobre. En los últimos años Scröder (2003), mediante la utilización de RNAi parental en *Tribolium castaneum*, demostró que los embriones interferidos para *otd-1* no desarrollan la cabeza, mientras que los interferidos para *hb* presentaban problemas en el desarrollo de los segmentos torácicos. Al igual que sucede en los embriones interferidos con dsBgHR3, los segmentos que se desarrollaban correctamente en los embriones de *T. castaneum* interferidos con dsotd y dshb presentaban un patrón de expresión de engrailed correcto. En resumen, estos resultados mostraron que en insectos primitivos, *otd* y *hb* forman parte del sistema de regulación ancestral encargado de especificar las partes anteriores del embrión y que ha sido sustituido, evolutivamente, por *bicoid* en los insectos más evolucionados. Nuestros resultados sugieren que BgHR3 podría estar interaccionando con el sistema *otd/hb*. Es el primer caso en el que se demuestra que la morfogénesis está controlada por las hormonas ecdisteroideas presentes en una determinada fase del desarrollo.

7. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo y expuestos en esta memoria se pueden deducir las siguientes conclusiones, todas ellas referidas a la especie *Blattella germanica*.

1. *Blattella germanica* posee un ortólogo de EcR-A (BgEcR-A), tres de HR3 (BgHR3-A, BgHR3-B₁ y BgHR3-B₂) y dos de FTZ-F1 (BgFTZ-F1A y BgFTZ-F1B). Todos estos factores se expresan durante el desarrollo ninfal en glándulas protorácicas, cuerpos grasos y epidermis y durante la embriogénesis.
2. La 20E induce de forma directa la expresión de las isoformas de BgHR3 mientras que no ejerce ninguna función reguladora sobre BgEcR-A y BgFTZ-F1.
3. La técnica del RNAi *in vivo* mediada por dsRNA funciona de forma reproducible y su efecto es sistémico y específico.
4. Los receptores nucleares BgEcR-A, BgHR3 y BgFTZ-F1 intervienen en el desarrollo ninfal controlando los niveles de ecdisteroides hemolinfáticos. Como consecuencia, estos receptores son necesarios para completar correctamente el proceso de écdisis, así como el de la extensión de las alas tras la muda imaginal.
5. Los receptores nucleares BgEcR-A y BgFTZ-F1 controlan la degeneración de la glándula protorácica tras la muda imaginal.
6. *Blattella germanica* presenta un desarrollo embrionario de banda germinal pequeña que se caracteriza por la especificación de los segmentos cefálicos y torácicos durante las primeras etapas de la embriogénesis y el posterior desarrollo secuencial de los segmentos abdominales.
7. BgEcR-A y BgFTZ-F1 son necesarios durante las primeras fases del desarrollo embrionario para la correcta formación de la banda germinal.

8. BgHR3 es necesario para el desarrollo completo de las regiones cefálicas del embrión.

8. BIBLIOGRAFIA

Ashburner, M. (1973). Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. I. Dependence upon ecdysone concentration. *Dev. Biol.* **35**, 47-61.

Ashburner, M., Chihara, C., Meltzer, P., Richards, G. (1974). Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**, 655-662.

Beckstead, R., Ortiz, J.A., Sanchez, C., Prokopenko, S.N., Chambon, P., Losson, R. y Bellen, H.J. (2001). Bonus, a *Drosophila* homolog of TIF1 proteins, interacts with nuclear receptors and can inhibit betaFTZ-F1-dependent transcription. *Mol. Cell.* **7(4)**, 753-765.

Bender, M., Imam, F.B., Talbot, W.S., Ganetzky, B y Hogness, D. (1997). *Drosophila* ecdysone receptor mutations reveal functional differences among receptor isoforms. *Cell* **91(6)**, 777-88.

Benton, M.J. y Ayala, F.J. (2003). Dating the tree of life. *Science* **300**,1698-1700.

Bergot, B.J., Baker, F.C., Cef, D.C., Jamieson, G. y Schooley, D.A. 1981. En *Juvenile hormone biochemistry* (Eds Pratt, G.E y Brooks, F.T), 33-45 (Elsevier, Amsterdam)

Bialecki, M., Shilton, A., Fichtenberg, C., Segraves, W.A. y Thummel, C.S. (2002). Loss of the ecdysteroid-inducible E75A orphan nuclear receptor uncouples molting from metamorphosis in *Drosophila*. *Dev. Cell* **3**, 209-220.

Blandin, S., Moita, L. F., Kocher, T., Wilm, M., Kafatos, F. C. y Levashina, E. A. (2002). Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: Targeted disruption of the *Defensin* gene. *EMBO Rep.* **3**, 852-856.

Borud, B., Hoang, T., Bakke, M., Jacob, A.L., Lund, J. y Mellgren, G. (2002). The nuclear receptor coactivators p300/CBP/cointegrator-associated protein (p/CIP) and transcription intermediary factor 2 (TIF2) differentially regulate PKA-stimulated transcriptional activity of steroidogenic factor 1. *Mol. Endocrinol.* **16**(4), 757-773.

Broadus, J., McCabe, J.R., Endrizzi, B., Thummel, C.S y Woodard, C.T. (1999). The *Drosophila* β FTZ-F1 orphan nuclear receptor provides competence for stage-specific responses to the steroid hormone ecdysone. *Mol. Cell* **3**, 143-149.

Brown, S.J., Patel, N.H. y Denell, R.E. (1994). Embryonic expression of the single engrailed gene of *Tribolium*. *Develop. Gen.* **15**, 7-18.

Bucher, G., Scholten, J. y Klingler, M. (2002). Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Curr. Biol.* **12**, R85-86.

Bucher, G., Farzana, L., Brown, S.J y Klingler, M. (2005). Anterior localization of maternal mRNAs in a short germ insect lacking *bicoid*. *Evol. Dev.* **7**(2), 142-9.

Bullière, D., Bullière, F. y De Reggi, M. (1979). Ecdysteroid titers during ovarian and embryonic development in *Blaberus craniifer*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **186**, 103-114.

Buszczak, M., Freeman, M.R., Carlson, J.R., Bender, M., Cooley, L. y Segraves, W.R. (1999). Early genes in the steroid response hierarchy regulate egg chamber maturation during *Drosophila* oogenesis. *Development* **126**, 1075-1082.

Butenandt, A. y Karlson, P. (1954). Über die Isolierung eines metamorphose-hormons der Insekten in kristallisierter Form. *Z. Naturforsch. Teil. B.* **9**, 389-391.

Carney, G.E., Wade, A.A., Sapra, R., Goldstein, E.S. y Bender, M. (1997). DHR3, an ecdysone-inducible early-late gene encoding a *Drosophila* nuclear receptor, is required for embryogenesis. *Proc. Nat.l Acad. Sc.i U S A.* **94**(22), 12024-12029.

Chan S.M y Chan K.M. (1999). Characterization of the shrimp eyestalk cDNA encoding a novel fushi tarazu-factor 1 (FTZ-F1). *FEBS Lett.* **454**, 109-114.

Chavez, V.M., Marques, G., Delbecque, J.P, Kobayashi, K., Hollingsworth M., Burr, J., Natzle, J.E. y O'Connor MB. The *Drosophila* disembodied gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. *Development.* **127**(19):4115-26.

Comas, D., Piulachs, M.D. y Bellés, X. (2000). The vitellogenin of *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae): nucleotide sequence of the cDNA and analysis of the protein primary structure. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **45**, 1-11.

Comas, D., Piulachs, M. D. y Bellés, X. (2001). Induction of vitellogenin gene transcription in vitro by juvenile hormone in *Blattella germanica*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **183**, 93-100.

Corley, L.S., Blankenship, J.R., Moore, A.J. y Moore, P.J. (1999). Developmental constraints on the mode of reproduction in the facultatively parthenogenetic cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Evo. and Dev.* **1**(2), 90-99.

Dai, J.D. y Gilbert, L.I. (1991). Metamorphosis of the corpus allatum and degeneration of the prothoracic glands during the larval-pupal-adult transformation of *Drosophila melanogaster*: a cytophysiological analysis of the ring gland. *Dev. Biol.* **144**, 309-326.

Dai, J.D. y Gilbert, L.I. (1997). Programmed cell death of the prothoracic glands of *Manduca sexta* during pupal-adult metamorphosis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**, 69-78.

Davis, G.K. y Patel, NH. (2002). Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation. *Annu Rev Entomol.* **47**, 669-99.

Dearden, P., Grbic, M., Falciani, F. y Akam, M. (2000). Maternal expression and early zygotic regulation of the *hox3/zen* gene in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Ev and Dev.* **5**, 261-270.

Dewey, E.M., McNabb, S.L., Ewer, J., Kuo, G.R., Takanishi, C.L., Truman, J.W. y Honegger, H.W. (2004). Identification of the gene encoding bursicon, an insect neuropeptide responsible for cuticle sclerotization and wing spreading. *Curr. Biol.* **14**, 1208-1213.

DiNardo, S., Kurner, J.M., Theis, J. y O'Farrell, P.H. (1985). Development of embryonic pattern in *D. melanogaster* as revealed by accumulation of the nuclear engrailed protein. *Cell* **1**, 59-69.

Eystathioy, T., Swevers, L. y Iatrou, K. (2001). The orphan nuclear receptor BmHR3A of *Bombyx mori*: hormonal control, ovarian expression and functional properties. *Mech. Dev.* **103**(1-2), 107-115.

Falciani, F., Hausdorf, B., Schröder, R., Akam, M., Tautz, D., Denell, R. y Brown, S. (1996). Class 3 *Hox* genes in insects and the origin of *zen*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**(16), 8479-8484.

Fleig, R. (1990). Engrailed expression and body segmentation in the honey-bee *Apis mellifera*. *Rou'x Arch. Dev. Biol.* **198**, 467-473.

Florence B., Guichet, A., Ephrussi, A. y Laughon, A. (1997). Ftz-F1 is a cofactor in Ftz activation of the *Drosophila engrailed* gene. *Development.* **124**(4), 839-47.

Forkman, M.A., Dush, M.K. y Marti, G.R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 8998-9002.

Freeman, M.R., Dobritsa, A., Gaines, P, Segraves, W.A. y Carlson, J.R. (1999). The *dare* gene: steroid hormone production, olfactory behavior, and neural degeneration in *Drosophila*. *Development*. **126**, 4591-4602.

Gao, Q. y Finkelstein, R. (1998). Targeting gene expression to the head: the *Drosophila orthodenticle* gene is a direct target of the *bicoid* morphogen. *Development* **125**(21), 4185-4193.

Gaziova, I., Bonnette, P.C., Henrich, V.C. y Jindra, M. (2004). Cell-autonomous roles of the *ecdysoneless* gene in *Drosophila* development and oogenesis. *Development* **131**, 2715-2725.

Gerstenlauer, B. y Hoffmann, K.H. (1995). Ecdysteroid release and ecdysteroid titer during larval-adult development of the Mediterranean field cricket, *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae). *Eur. J. Entomol.* **92**, 81-92.

Giguere V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans RM y Otulakowski G. (1994). Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev.* **8**(5), 538-53.

Giguere, V., McBroom, L.D. y Flock, G. (1995). Determinants of target gene specificity for ROR alpha 1: monomeric DNA binding by an orphan nuclear receptor. *Mol Cell Biol.* **15**(5), 2517-26.

Gissendanner C.R. y Sluder A.E. (2000). Nhr-25, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of ftz-fl, is required for epidermal and somatic gonad development. *Dev. Biol.* **221**(1), 259-272.

Glass, C.K. y Rosenfeld, M.G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* **14**, 121-141.

Guichet, A., Copeland, J.W., Erdelyi, M., Hlousek, D., Zavorszky, P., Ho, J., Brown, S., Percival-Smith, A., Krause, H.M. y Ephrussi, A. (1997). The nuclear receptor homologue Ftz-F1 and the homeodomain protein Ftz are mutually dependent cofactors. *Nature* **385**(6616), 548-52.

Hammer, G.D., Krylova, I., Zhang, Y., Darimont, B.D., Simpson, K. y Weigel, N.L. (1999). Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signalling in reproduction and stress. *Mol. Cell* **3**, 521-526.

Hayward, D.C., Bastiani, M.J., Trueman, J.W., Truman, J.W., Riddiford, L.M. y Ball, E.E. (1999). The sequence of *Locusta* RXR, homologous to *Drosophila* Ultraspiracle, and its evolutionary implications. *Dev. Genes E.* **209**, 564-571.

Hayward, D.C., Dhadialla, T.S., Zhou, S., Kuiper, M.J., Ball, E.E., Wyatt, G.R. y Walker, V.K. (2003). Ligand specificity and developmental expression of RXR and ecdysone receptor in the migratory locust. *J. Insect Physiol.* **49**, 1135-1144.

Hirose, T., Smith, R.J. y Jetten, A.M. (1994). ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**(3), 1976-83.

Hiruma, K. y Riddiford, L.M. (2001). Regulation of transcription factors MHR4 and β FTZ-F1 by 20-hydroxyecdysone during a larval molt in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Biol.* **232**, 265-274.

Hiruma, K. y Riddiford, L.M. (2003). Differential control of MHR3 promoter activity by isoforms of the ecdysone receptor and inhibitory effects of E75A and MHR3. *Dev Biol.* **272**(2), 510-21.

Ho, K., Dunin-Borkowski, O.M. y Akam, M. (1997). Cellularization in locust embryos occurs before blastoderm formation. *Development.* **124**, 2761-2768.

Hoffmann, J. Ecdysone and reproduction in adult female insects. *Reprod Nutr Dev.* **20**(2), 443-56.

Horner, M.A., Chen, T. y Thummel, C. (1995). Ecdysteroid regulation and DNA binding properties of *Drosophila* nuclear family members. *Dev Biol.* **168**, 490-502.

Huet, F., Ruiz, C., Richards, G. (1995). Sequential gene activation by ecdysone in *Drosophila melanogaster*: the hierarchy equivalence of early and early late genes. *Development* **121**, 1195-1204.

Imboden, H., Lanzrein B., Delbecque, J.P. y Lüscher, M. 1978. Ecdysteroids and juvenile hormone during embryogenesis in the ovoviviparous cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **36**, 628-6235.

Ito, M., Yu, R.N. y Jameson, J.L. (1998). Steroidogenic factor-1 contains a carboxy-terminal transcriptional activation domain that interacts with steroid receptor coactivator-1. *Mol Endocrinol.* **12**(2), 290-301.

Jiang, C., Lamblin, A.F., Steller, H. y Thummel, C.S. (2000). A steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Mol. Cell.* **5**, 445-455.

Jindra, M., Sehnal, F. y Riddiford, L.M. (1994). Isolation and developmental expression of the ecdysteroid-induced GHR3 gene of the wax moth *Galleria melonella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**, 763-773.

Jindra, M., Malone, F., Hiruma, K. y Riddiford, L.M. (1996). Developmental profiles and ecdysteroid regulation of the mRNAs for two ecdysone receptor isoforms in the epidermis and wings of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Biol.* **180**, 258-272.

Jindra, M. y Riddiford, L.M. (1996). Expression of ecdysteroid-regulated transcripts in the silk gland of the wax moth, *Galleria mellonella*. *Dev. Genes Evol.* **206**, 305-314.

Kageyama, Y., Matsuda, S., Hirose, S. y Ueda, H. (1997). Temporal regulation of the midprepupal gene FTZ-F1: DHR3 early late gene product s one of the plural positive regulators. *Genes Cells* **2**, 559-569.

Kallen, J.A., Schlaeppli, J.M., Bitsch, F., Geisse, S.M., Delhon, I y Fournier, B. (2002). X-ray structure of the hROR α LBD at 1.63Å: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of ROR α . *Structure (Camb.)* **10**, 1697-1707.

Kapitskaya, M.Z., Li, C., Miura, K., Segraves, W y Raikhel, A.S. (2000). Expression of the early-late gene encoding the nuclear receptor HR3 suggests its involvement in regulating the vitellogenic response to ecdysone in the adult mosquito. *Mol. Cell. Endocrinol.* **160**(1-2),25-37.

Karim, F.D. y Thummel, C.S. (1992). Temporal coordination of regulatory gene expression by the steroid hormone ecdysone. *EMBO J.* **11**, 4083-4093.

Kennerdell, J. R. y Carthrew, R. W. (2000). Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nature Biotech.* **17**, 896 –898.

Kingan, T.G. y Adams, M.E. (2000). Ecdysteroids regulate secretory competence in Inka cells. *J. Exp. Biol.* **203** (19), 3011-3018.

King-Jones, K. y Thummel, C.S. (2005). Nuclear receptors a perspective from *Drosophila*. *Nat. Rev. Genet.* **6**(4), 311-23.

Koelle, M.R., Talbot, W.S., Se Graves, W.A., Bender, M.T., Cherbas, P. y Hogness, D.S. (1991). The *Drosophila EcR* gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *67*(1), 59-77.

Koelle, M.R., Se Graves, W.A. y Hogness, D.S. (1992). DHR3: a *Drosophila* steroid receptor homolog. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* **89**(13), 6167-71.

Kothapalli, R., Palli, S.R., Ladd, T.R., Sohi, S.S., Cress, D., Dhadialla, T.S., Tzertzinis, G. y Retnakaran, A. (1995). Cloning and developmental expression of the ecdysone receptor gene from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Dev. Genet.* **17**, 319-330.

Kostrouch, Z., Kostrouchova y Rall, J.E. (1995). Steroid/thyroid hormone receptor genes in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**(1):156-9.

Kozlova, T. y Thummel, C.S. (2003). Essential roles for ecdysone signalling during *Drosophila* mid-embryonic development. *Science.* **301**, 1911–1914.

Krylova, I.N., Sablin, E.P., Moore, J., Xu, R.S., Waitt, G.M., MacKay, J.A., Juzumiene, D., Bynum, J.M., Madauss, K., Montana, V., Lebedeva, L., Suzawa, M., Williams, J.D., Williams, S.P., Guy, R.K., Thornton, J.W., Fletterick, R.J., Willson, T.M. y Ingraham, H.A. (2005). Structural analyses reveal phosphatidylinositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. *Cell*, **120**, 343-355.

Kurti, T.J. y Brooks, M.A. (1977). Isolation of cell lines from embryos of the cockroach *Blattella germanica*. *In Vitro* **13**, 11-17.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lall, S. y Patel, N. (2001). Conservation and divergence in molecular mechanisms of axis formation. *Ann. Rev. of Genetics* **35**, 407-437.

Lam, G.T., Jiang, G. y Thummel, C. (1997). Coordination of larval and prepupal gene expression by the DHR3 orphan receptor during *Drosophila* metamorphosis. *Development* **124**, 1757-1769.

Lam, G.T., Hall, B.L., Bender, M. y Thummel, C.S. (1999). DHR3 is required for the prepupal-pupal transition and differentiation of adult structures during *Drosophila* metamorphosis. *Dev. Biol.* **212**, 204-216.

Lam, G.T. y Thummel, C.S. (2000). Inducible expression of double-stranded RNA directs specific genetic interference in *Drosophila*. *Current Biology* **10**, 957-963.

Lan, Q., Hiruma, K., Hu, X., Jindra, M. y Riddiford, L.M. (1999). Activation of a delayed-early gene encoding MHR3 by the ecdysone receptor heterodimer EcR-B1-USP-1 but not by EcR-B1-USP-2. *Mol Cell Biol.* **19** (7), 4897-906.

Langelan, R. E., Fisher, J. E., Hiruma, K., Palli, S.L y Riddiford, L.M. (2000). Patterns of MHR3 Expression in the Epidermis during a Larval Molt of the Tobacco Hornworm *Manduca sexta*. *Dev. Biol.* **227**(2),481-94.

Lanzrein, B., Gentinetta, V., Abegglen, H., Baker, F.C., Miller, C.A. y Schooley, D.A., 1985. Titters of ecdysone, 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone III throughout the life cycle of a hemimetabolous insect, the viviparous cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Experientia* **41**, 913-917.

Laudet, V. y Bonneton, F. (2005). Evolution of nuclear receptors in insects. En *Comprehensive Molecular Insect Science Vol. 3* (eds Gilbert, L.I., Iatrou, K. and Gill, S.S.) 287-318 (Elsevier, Oxford).

Lavorgna, G., Ueda, H., Clos, J. y Wu, C. (1991). FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of *fushi tarazu*. *Science* **252**, 848-851.

Lavorgna, G., Karim., F.D., Thummel, C.S., y Wu,C. (1993). Potential role for a FTZ-F1 steroid receptor superfamily member in the control of *Drosophila* metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3004-3008.

Lee, C.Y. y Baehrecke, E.H. (2001). Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development*. **128**, 1443-1455.

Li, C., Kapitskaya, M.A., Zhu, J., Miura, K., Segraves, W. y Raikhel, A.S. (2000). Conserved molecular mechanism for the stage specificity of the mosquito vitellogenic response to ecdysone. *Dev. Biol.* **224**, 96-110.

Li, T-R y Bender, M. (2000). A conditional rescue system reveals essential functions for the ecdysone receptor (EcR) gene during molting and metamorphosis in *Drosophila*. *Development* **127**, 2897-2905.

Maestro, O., Cruz, J., Pascual, N., Martín, D. y Bellés, X. (2005). Differential expression of two RXR/ultraspiracle isoforms during the life cycle of the hemimetabolous insect *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae). *Mol. Cell. Endocrinol.* **238**, 27-37.

Marie, B., Bacon, J.P. y Blagburn, J.M. (2000). Double-stranded RNA interference shows that Engrailed controls the synaptic specificity of identified sensory neurons. *Curr. Biol.* **10**, 289-292.

Marie, B. y Bacon, J.P. (2000). Two engrailed-related genes in the cockroach: cloning, phylogenetic analysis, expression and isolation of splice variants. *Dev. Genes. Evol.* **210**, 436-448.

Martín, D., Piulachs, M.D. y Bellés, X. (1995). Patterns of haemolymph vitellogenin and ovarian vitellin in the German cockroach, and the role of juvenile hormone. *Physiol. Entomol.* **20**, 59-65.

Martín, D., Piulachs, M.D., Comas, D. y Bellés, X. (1998). Isolation and sequence of a partial vitellogenin cDNA from the cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae), and characterization of the vitellogenin gene expression. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **38**, 137-146.

Monte, D., DeWitte, F. y Hum, D.W. (1998). Regulation of the human P450scc gene by steroidogenic factor 1 is mediated by CBP/p300. *J Biol Chem.* **273**(8), 4585-4591.

Montgomery, M. K., Xu, S. y Fire, A. (1998). RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15502 -15507.

Munderloh, U.G. y Kurtti, T.J. (1989). Formulation of medium for tick cell culture. *Experimental & Applied Acarology* **7**, 219-229.

Neubueser, D., Warren, J.T., Gilbert, L.I. y Cohen, S.M. (2005). molting defective is required for ecdysone biosynthesis. *Dev. Biol.* **280**, 362-372.

Oba, K., Yanase, T., Nomura, M., Morohashi, K., Takayanagi, T. y Nawata, H. (1996). Structural characterization of human Ad4bp (SF-1) gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **226**, 261-267.

Palli, S.R., Hiruma, K. y Riddiford, L.M. (1992). An ecdysteroid-inducible *Manduca* gene similar to the *Drosophila DHR3* gene, a member of the steroid hormone receptor superfamily. *Dev. Biol.* **150**, 306-318.

Palli, S.R., Ladd, T.R., Sohi, S.S., Cook, B.J. y Retnakaran, A. (1996). Cloning and developmental expression of *Choristoneura* hormone receptor 3, an ecdysone-inducible gene and a member of the steroid hormone receptor superfamily. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**, 485-499.

Palli, S.R., Ladd, T.R. y Retnakaran, A. (1997). Cloning and characterization of a new isoform of *Choristoneura* hormone receptor 3 from the spruce budworm. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **35**(1-2), 33-44.

Paravicini, G., Steinmayr, M., Andre, E. y Becker-Andre, M. (1996). The metastasis suppressor candidate nucleotide diphosphate kinase NM23 specifically interacts with members of the ROR/RZR nuclear orphan receptor subfamily. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**(1), 82-7.

Park, J.H., Schroeder, A.J., Helfrich-Forster, C., Jackson, F.R. y Ewer, J. (2003). Targeted ablation of CCAP neuropeptide-containing neurons of *Drosophila* causes specific defects in execution and circadian timing of ecdysis behavior. *Development* **130**, 2645-2656.

Parvy, J.P., Blais, C., Bernanrd, F., Warren, J.T., Petryk, A., Gilbert, L.I., O'Connor, M.D. y Dauphin-Villemant, C. (2005). A role for β FTZ-F1 in regulating ecdysteroid titers during post-embryonic development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **282**(1), 84-94.

Pascual, N., Cerdà, X., Benito, B., Tomás, J., Piulachs, M. D. y Bellés, X. (1992). Ovarian ecdysteroids levels and basal oocyte development during maturation in the cockroach *Blattella germanica* (L.). *J. Insect Physiol.* **38**, 339-348.

Patel, N.H., Martín-Blanco, E., Coleman, K.G., Poole, S.J., Ellis, M.C., Kornberg, T.B. y Goodman, C.S. (1989). Expression of engrailed proteins in arthropods, annelids, and chordates. *Cell.* **58**, 955-968.

Patel, N.H. (1994). The evolution of arthropod segmentation: insights from comparisons of gene expression patterns. *Development*. 201-207.

Pelham, H.R. y Jackson, R.J. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* **67(1)**, 247-256.

Perera, S.C., Ladd, T.R., Dhadialla, T.S., Krell, P.J., Sohi, S.S., Retnakaran, A. y Palli, S.R. (1999). Studies on two ecdysone receptor isoforms of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Mol Cell Endocrinol.* **152(1-2)**, 73-84

Piulachs, M.D. (1987). Estudi morfològic i funcional dels *corpora allata* de *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae). *Tesis doctoral*. Universidad de Barcelona.

Poole, S.J., Kauvar, L.M., Drees, B. y Kornberg, T. (1985). The *engrailed* locus of *Drosophila*: structural analysis of an embryonic transcript. *Cell* **40**, 37-43.

Porcheron, P., Morinière, N., Grassi, J. y Pradelles, P. (1989). Development of an enzyme immunoassay for ecdysteroids using acetyl-cholinesterase as label. *Insect Biochem.* **19**, 117-122.

Riddiford, L. M (1993). Hormones and *Drosophila* development. In the development of *Drosophila melanogaster*, Volume II, M, Bate y A. Martínez Arias, ed. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 899-940.

Riddiford, L. M. (1994). Cellular and molecular actions of juvenile hormone. I. General considerations and premetamorphic actions. *Adv. Insect. Physiol.* **24**, 213-274.

Riddiford, L. M. (1996). Molecular aspects of juvenile hormone action in insect metamorphosis. En: Gilbert, L.I., Tata, J.R., Atkinson, B.G. (Eds.), *Metamorphosis:*

postembryonic Reprogramming of Gene Expresión in Amphibian and Insect Cells. *Academic Press*, San Diego, 223-251.

Riddiford, L.M., Hiruma, K., Zhou, X. y Nelson, C.A. (2003). Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol.* **33**(12), 1327-38.

Romañá, I., Pascual, N. y Bellés, X. (1995). The ovary is a source of circulating ecdysteroids in *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae) *Eur. J. Entomol.* **92**, 93-103.

Rusten, T.E., Lindmo, K., Juhasz, G., Sass, M., Seglen, P.O., Brech, A. y Stenmark, H (2004). Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Dev. Cell* **7**, 179-92.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sander, K., Gutzeit, H.O. y Jäckle, H. (1985). Insect embryogenesis: morphology, physiology, genetical and molecular aspects. En *Comprehensive Molecular Insect Science, Vol 1.* (ed. G.A. Kerkut y L.I. Gilbert), pp.319-385. Elsevier Pergamon.

Schwartz, C.J.E., Sampson, H.M., Hlousek, D., Percival-Smith, A., Copeland, J.W.R., Simmonds, A.J. y Krause, H.M. (2001). *The EMBO Journal* **20**, 510-519.

Scott, R.C., Schuldiner, O. y Neufeld, T.P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev. Cell.* **7**, 167-78.

Shin, S.W., Kokoza, V.A. y Raikhel, A.S. (2003). Transgenesis and reverse genetics of mosquito innate immunity. *J. Exp. Biol.* **206**, 3835-3843.

Schmidt-Ott, U., Sander, K. y Technau, G.M. (1994). Expression of engrailed in embryos of a beetle and five dipteran species with special reference to the terminal regions. *Rou'x Arch. Dev. Biol.* **203**, 298-303.

Schröder, R. (2003). The gene *orthodenticle* and *hunchback* substitute for *bicoid* in the beetle *Tribolium*. *Nature* **422**, 621-625.

Stehlin-Gaon, C., Willmann, D., Zeyer, D., Sanglier, S., Van Dorsselaer, A., Renaud, J.P., Moras, D. y Schule, R. (2003). All-trans retinoic acid is a ligand for the orphan nuclear receptor ROR β . *Nature Struct. Biol.* **10**, 820-825.

Scnöck, F. y Perrimon, N. (2003). Retraction of the *Drosophila* germ band requires cell-matrix interaction. *Genes Dev.* **17**(5), 597-602.

Sonobe, H. y Yamada, R. (2004). Ecdysteroids during early embryonic development in silkworm *Bombyx mori*: metabolism and functions. *Zoological Science* **21**, 503-516.

St Johnston, D. y Nüsslein-Volhard, C. (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell.* **68**(2), 201-19.

Sullivan, A.A. y Thummel, C.S. (2003). Temporal profiles of nuclear receptor gene expression reveal coordinate transcriptional responses during *Drosophila* development. *Mol. Endocrinol.* **17**, 2125-2137.

Sun, G. C., Hirose, S. y Ueda, H. (1994). Intermittent expression of BmFTZ-F1, a member of the nuclear hormone receptor superfamily during development of the silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Biol.* **162**, 626-437.

Suzuki, T., Kawasaki, H., Yu, R.T., Ueda, H. y Umesono, K. (2001). Segmentation gene product Fushi tarazu is an LXXLL motif-dependent coactivator for orphan receptor FTZ-F1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(22),12403-8.

Swevers, L., Ito, K. y Iatrou, K. (2002). The BmE75 nuclear receptors function as dominant repressors of the nuclear receptor BmHR3A. *J Biol Chem* **277**(44),41637-44.

Talbot, W.S., Swyryd, E.A. y Hogness, D.S. (1993). *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell*. **3**(7):1323-37.

Tawfik, A.I., Mat'hova', A., Sehnal, F. y Ismail, S.H. (1996). Hemolymph ecdysteroids in the solitary and gregarious larvae of *Schistocerca gregaria*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **31**, 427–438.

Tobe, S.S., Ruegg, R.P., Stay, B., Baker, F.C., Miller, C.A. y Schooley, D.A. (1985). Juvenile hormone titre and regulation in the cockroach *Diploptera punctata*. *Experientia* **41**, 1028–1034.

Tomoyasu, Y. y Denell, R.E. (2004). Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Dev. Genes Evol.* **214**, 575-578.

Thummel, C.S. (1995). From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of *Drosophila* nuclear receptor superfamily members. *Cell*. **83**, 871-877.

Thummel, C.S. (2001). Steroid-triggered death by autophagy. *BioEssays* **23**, 677-682.

Truman, J.W y Riddiford, L.M. (2002). Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects. *Annu Rev Entomol.* **47**, 467-500.

Ueda, H., Sonoda, S., Brown, J.L., Scott, M.P. y Wu, C. (1990). A sequence-specific DNA-binding protein that activates fushi tarazu segmentation gene expression. *Genes Dev.*, **4**, 624-635.

Ueda, H. y Hirose, S. (1991). Defining the sequence recognized with BmFTZ-F1, a sequence specific DNA binding factor in the silkworm, *Bombyx mori*, as revealed by direct sequencing of bound oligonucleotides and gel mobility shift competition analysis. *Nucleic Acids Res.* **19**(13), 3689-93.

Ueda, H., Sun, G-C., Murata, T y Hirose, S. (1992). A novel DNA-Binding motif abuts the zinc finger domain of insect nuclear hormone receptor FTZ-F1 and Mouse embryonal long terminal repeat-binding protein. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 5667-5672.

Umesono, K. y Evans, R.M. (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell.*, **57**, 1139-1146.

Verras, M., Gourzi, P., Zacharopoulou, A. y Mintzas, A.C. (2002). Developmental profiles and ecdysone regulation of the mRNAs for two ecdysone receptor isoforms in the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. *Insect Mol. Biol.* **11**(6), 553-565.

Wang, S.F., Li, C., Sun, G., Zhu, J. y Raikhel, A.S. (2002). Differential expression and regulation by 20-hydroxyecdysone of mosquito ecdysteroid receptor isoforms A and B. *Mol. Cell. Endocrinol.* **196**, 29-42.
11, 553-565.

Weller, J., Sun, G-C., Zhou, B., Lan, Q., Hiruma, K y Riddiford, L.M. (2001). Isolation and developmental expression of two nuclear receptors, MHR4 and β FTZ-F1, in the hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol.* **31**(8), 827-37.

White, K.P., Hurban, P., Watanabe, T. y Hogness, D. (1997). Coordination of *Drosophila* metamorphosis by two ecdysone-induced nuclear receptors. *Science*, **76** (5309), 114-117.

Wong, M., Ramayya, M.S., Chrousos, G.P., Driggers, P.H. y Parker, K.L. (1996). Cloning and sequence analysis of the human gene encoding steroidogenic factor 1. *J. Mol. Endocrinol.* **17** (2), 139-147.

Woodard, C.T., Baehrecke, E.H y Thumel, C.S. (1994). A molecular mechanism for the stage specificity of the *Drosophila* prepupal genetic response to ecdysone. *Cell.* **79**, 607-615.

Yamada, M., Murata, T., Hirose, S., Lavorgna, G., Suzuki, E. Y Ueda, H. (2000). Temporally restricted expression of transcription factor β FTZ-F1: significance for embryogenesis, molting and metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Development.* **127**, 5083-5092.

Yao, T.P., Forman, B.M., Jiang, Z., Cherbas, J.D., McKeown, M., Cherbas, P. y Evans, R.M. (1993). Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature.* **366**(6454), 476-9.

Yin, V.P. y Thummel, C.S. (2005). Mechanisms of steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 237-243.

Yu, Y., Li, W., Su, K., yussa, M., Han, W., Perrimon, N. y Pick, L. (1997). The nuclear hormone receptor Ftz-F1 is a cofactor for the *Drosophila* homeodomain protein Ftz. *Nature.* **385**, 552-555.

Zhao, X.F., Wang, J.X., Xu, X.L., Li, Z.M. y Kang, C.J. (2004). Molecular cloning and expression patterns of the molt-regulating transcription factor HHR3 from *Helicoverpa armigera*. *Insect Mol Biol.* **13**(4):407-12.

Zitnan, D. y Adams, M.E. (2005). Neuroendocrine regulation of insect ecdysis. En *Comprehensive Molecular Insect Science* (ed. L.I. Gilbert, K. Iatrou and S.S. Gill), **3**, 1-60. Elsevier Pergamon.

Zhou, X., Zhou, B., Truman, J.W. y Riddiford, L.M. (2004). Overexpression of broad: a new insight into its role in the *Drosophila* prothoracic gland cells. *J. Exp. Biol.* **207**, 1151-1161.