

## Tesis de Posgrado

# Mecanismos moleculares involucrados en la esclerotización de la cutícula de los insectos

Wappner, Pablo

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Wappner, Pablo. (1995). Mecanismos moleculares involucrados en la esclerotización de la cutícula de los insectos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2764\\_Wappner.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2764_Wappner.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Wappner, Pablo. "Mecanismos moleculares involucrados en la esclerotización de la cutícula de los insectos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2764\\_Wappner.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2764_Wappner.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Mecanismos moleculares  
involucrados en la esclerotización  
de la cutícula de los insectos**

**Autor:** Pablo Wappner

**Director:** Luis A. Quesada-Allué

**Lugar de Trabajo:** Instituto de Investigaciones Bioquímicas  
“Fundación Campomar”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires

Año 1995

*a Graciela (la Tana)*

*a Marquitos*

*a mis padres*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mi Director de Tesis, el Dr. Luis A. Quesada-Allué, por su permanente apoyo, por las horas compartidas en el laboratorio, por haberme iniciado en el mundo de la investigación y por la libertad con la que permitió llevar a cabo los trabajos de la Tesis.*

*A mi Consejera de Estudios, la Dra. Juana Tandecarz, como así también a los Dres Clara Krisman y Marcelo Dankert por sus consejos y colaboración.*

*A los miembros del Consejo Directivo de la Fundación Campomar por haberme permitido la realización de este trabajo en el Instituto.*

*A la Universidad de Buenos Aires por haberme otorgado las becas que me posibilitaron llevar a cabo la tarea.*

*A mis profesores, los Dres. Héctor Maldonado, Daniel Goldstein, Carlos Lantos, Claudio Bidau, Esteban Hasson, Claudio Lazzari, Luis Ielpi y Ricardo Wolosiuk que contribuyeron en forma decisiva a mi formación.*

*En forma especial, a mi profesor de Fisiología de Insectos, el Dr. Josué Núñez, por su invaluable ayuda y enriquecedora discusión.*

*A la memoria del Dr. Osvaldo Reig que a través de sus clases de Macroevolución influyó fuertemente sobre mi modo de ver la biología.*

*A los Dres. Karl Kramer y Ted Hopkins por su hospitalidad y valiosa colaboración.*

*A la Dra. Fanny Manso por su cariño, desinteresado apoyo y constante interés en el desarrollo del trabajo.*

*Al Dr. Jorge Cladera por su colaboración en los estudios genéticos previos a la concreción de esta Tesis.*

*A mi amigo y compañero de laboratorio, Alejandro Rabossi, por su ayuda, su generosidad y por todos los años compartidos.*

*A mi amigo, Edu Cafferatta, por estar siempre presente en las buenas y en las malas durante todos estos años y por haber dibujado magistralmente varias de las figuras de la Tesis.*

*A Graciela Boccaccio, por haberme ayudado con las figuras de la Tesis durante largas horas e infinita paciencia.*

*A Marta Bravo por su dedicada asistencia en el manejo de los cromatógrafos.*

*A todo el personal técnico y administrativo del Instituto por su valiosa colaboración.*

*A Alejandro Lifschitz por su dedicada ayuda en el tipeo de la bibliografía y compaginación de la Tesis.*

*A mis muchos buenos amigos del Instituto por el tiempo que disfrutamos juntos.*

## *Nota del tesista*

*El problema de los mecanismos moleculares que condujeron a la aparición de las grandes novedades evolutivas a lo largo de la historia de los seres vivos es, a mi criterio, uno de los mas interesantes dentro del espectro de las ciencias biológicas y sin embargo permanece relativamente poco abordado por investigadores de distintas áreas.*

*El exoesqueleto cuticular de los artrópodos representa un claro ejemplo de novedad evolutiva y la pregunta que me movilizaba al comenzar este trabajo de Tesis era ¿cómo surgió la cutícula esclerotizada de los artrópodos en la historia evolutiva de los invertebrados? Considerando que la fisiología y el plan general de organización corporal de los artrópodos dependen en buena parte de las propiedades de su cutícula, preguntarse por el origen de la cutícula resultaba parecido a preguntarse sobre el origen del phylum.*

*Es difícil sopesar qué proporción del valor de una investigación original reside en lo interesante que sea una buena pregunta y qué proporción está dada por la pericia con la cual se lleva a cabo. Por eso, estoy convencido que la Tesis debe incluir, no sólo los resultados alcanzados, sino también un planteamiento claro de los interrogantes que la impulsaron y una descripción del marco conceptual en el que se trabajó.*

*Si bien la pregunta de origen era ambiciosa, contábamos con una hipótesis de trabajo para contrastar, la cual trataré de desarrollar a lo largo la Introducción. Creo que los resultados alcanzados en la Tesis permitieron generar algunas de las herramientas necesarias para atacar el problema y, en el proceso, se hicieron aportes significativos a la fisiología de la cutícula de los insectos, contribuyéndose a la comprensión de los mecanismos involucrados en el proceso de esclerotización cuticular.*

## **Resumen de los aportes originales de esta Tesis** (en orden de importancia, según nuestro criterio)

- 1- Se describió el primer mutante de insectos que falla en la exportación de materiales desde la epidermis hacia el exoesqueleto cuticular.
- 2- Se logró medir por primera vez la actividad de una nueva enzima, la N- $\beta$ -alanildopamina sintetasa, y se avanzó en su caracterización bioquímica. Esta es la enzima responsable de la síntesis del precursor principal de la esclerotización de la cutícula marrón de los insectos. Se propone que habría jugado un rol decisivo en la evolución de los artrópodos.
- 3- Se demostró que, contrariamente a lo que se acepta entre los investigadores del área, la dramática deshidratación que sufre la cutícula durante el proceso de esclerotización no se debe a la incorporación de catecolaminas. Se propone un modelo alternativo que explica el fenómeno de la pérdida de agua cuticular.
- 4- Se identificó el defecto metabólico de dos mutantes de cutícula melanizada de *Ceratitis capitata*, encontrándose que uno de ellos es defectivo en el aminoácido  $\beta$ -alanina y que el otro es defectivo para la N- $\beta$ -alanildopamina sintetasa.
- 5- Se contribuyó a la descripción de las primeras etapas de la metamorfosis de *Ceratitis capitata*.

## ABREVIATURAS

<b>BALA</b>	$\beta$ -alanina
<b>BHT</b>	Butil-hidroxitolueno
<b>cpm</b>	Cuentas por minuto
<b>COMT</b>	Catecol-O-metiltransferasa
<b>DNA</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>DA</b>	Dopamina
<b>EDTA</b>	Acido diaminoetilén-tetra-acético
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta performance
<b>kD</b>	Kilodaltons
<b>MAO</b>	Monoamino oxidasa
<b>NADA</b>	N-acetildopamina
<b>NBAD</b>	N- $\beta$ -alanildopamina
<b>NBANE</b>	N- $\beta$ -alanilnorepinefrina
<b>NBAO</b>	N- $\beta$ -alanil octopamina
<b>NBASer</b>	N- $\beta$ -alanilserotonina
<b>NBATy</b>	N- $\beta$ -alaniltiramina
<b>NBATri</b>	N- $\beta$ -alanil triptamina
<b>Oct</b>	Octopamina
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenil-metilsulfonio
<b>PTU</b>	Feniltiourea
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>Ser</b>	Serotonina
<b>Syn</b>	Sinefrina
<b>Tir</b>	Tirosina
<b>Tri</b>	Triptamina
<b>Tris</b>	Tri(hidroximetil)-aminometano
<b>Trp</b>	Triptofano
<b>Tyr</b>	Tiramina

# Indice

<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>I- Presentación del problema</b>	<b>2</b>
1- El concepto de novedad evolutiva	2
2- Los mecanismos y los ritmos de la evolución	4
3- Las interacciones entre los genes eucariontes	7
4- La biología del desarrollo y las novedades evolutivas	10
5- La cutícula de los insectos como novedad evolutiva	14
6- Estructura de la cutícula de los insectos	16
6.1- La epicutícula	17
6.2- La procutícula	17
7- El proceso de muda y la deposición de la cutícula	20
8- La formación del pupario de los dípteros ciclorrafos	22
9- La esclerotización de la cutícula de los insectos	25
9.1- Nomenclatura	25
9.2- Bases químicas de la esclerotización	26
9.3- Metabolismo de los agentes esclerotizantes	28
9.4- Biosíntesis de catecolaminas	29
9.5- Derivatización de las catecolaminas	32
10- La cutícula de los invertebrados inferiores	36
10.1- Composición de la cutícula	36
10.2- La esclerotización fuera del Phylum Arthropoda	38
10.3- ¿Cuál fue entonces la adquisición evolutiva de los artrópodos?	40
11- Las aminos biogénicas como transmisoras de información	41
12- Nuestra hipótesis general de trabajo	46
<b>II- Nuestro modelo experimental: la mosca del Mediterráneo</b>	
<b><i>Ceratitis capitata</i> (Wied.)</b>	<b>48</b>
13- La especie	48
14- El ciclo de vida de <i>Ceratitis capitata</i>	49
14.1- El estadio embrionario	52
14.2- Los estadios larvales	52
14.3- El estadio pre-pupal	53
14.4- El proceso de pupación	53
14.5- Los estadios pupal y de adulto farado	55
14.6- El proceso de ecdisis	57
15- Mutantes cuticulares de <i>Ceratitis capitata</i>	58

<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>61</b>
1- Insectos	62
1.1- Cepas de <i>Ceratitis capitata</i>	62
1.2- Mantenimiento de los imagos	62
1.3- Ovipuesta y recolección de huevos	62
1.4- Cría de larvas y recolección de pupas	64
1.5- Sincronización de los cultivos	64
2- Microinyección de pre-pupas	65
3- Inyección y uso de la [ <sup>14</sup> C]β-alanina	65
4- Análisis de proteínas cuticulares	66
5- Ensayos de resistencia mecánica de los puparios	67
5.1- Preparación de la pieza cuticular	67
5.2- Dispositivo de medición	68
6- Determinación del peso y del contenido de agua de los puparios	68
7- Experimentos de ligación de larvas	68
8- Obtención de mosaicos genéticos <i>niger</i> /salvaje	69
9- Síntesis orgánica de sustancias patrón	69
9.1- Síntesis de N-β-alanildopamina	69
9.2- Síntesis de N-β-alanilDOPA	70
10- Análisis de catecolaminas	71
10.1- A partir de extractos de pupario	71
10.2- A partir de extractos de hemolinfa	71
11- Fenoloxidasas cuticulares y tanificación <i>in vitro</i> de los puparios	73
12- Determinación de β-alanina endógena	73
13- Medición de la actividad NBAD sintetasa	74
13.1- <i>In vivo</i>	74
13.2- <i>In vitro</i>	74
14- Medición de la actividad NBAD hidrolasa	77
<b>RESULTADOS</b>	<b>78</b>
<b>1- El comportamiento pre-puparial de la larva y la pupariación de <i>Ceratitis capitata</i></b>	<b>79</b>
1.1- La transición hacia el estadio pre-pupal.	79
1.1.1- Salto de la larva y etapa de deambulación	79
1.1.2- Inmovilización progresiva y morfogénesis del pupario	80
1.2- Encogimiento y estabilización de la cutícula	81
1.3- El tiempo cero de la metamorfosis	82
1.4- La pigmentación del pupario	83
1.5- Proteínas pupariales	85

<b>2- El mutante <i>White pupa</i> de <i>Ceratitis capitata</i></b>	<b>86</b>
2.1- La esclerotización del pupario salvaje y mutante	87
2.2- La ultraestructura del pupario del mutante es anormal.	89
2.3- Las catecolaminas de <i>white pupa</i> se acumulan en la hemolinfa	91
2.3.1- Niveles de catecolaminas en el pupario	91
2.3.2- Niveles de catecolaminas en la hemolinfa	94
2.4- La batería de enzimas cuticulares de <i>white pupa</i> está intacta	96
2.5- Experimentos de ligación de larvas	99
<b>3- La deshidratación de la cutícula durante la esclerotización</b>	<b>100</b>
3.1- En el mutante <i>white pupa</i> la cutícula se deshidrata normalmente.	101
<b>4- El mutante <i>Black pupa</i> es defectivo en <math>\beta</math>-alanina</b>	<b>104</b>
4.1- Contenido endógeno de $\beta$ -alanina	104
4.2- Recuperación del fenotipo por inyección de $\beta$ -alanina	106
4.3- Concentraciones endógenas de catecolaminas	109
<b>5- El mutante <i>niger</i> es defectivo para la NBAD sintetasa</b>	<b>114</b>
5.1- <i>niger</i> no es capaz de utilizar la $\beta$ -alanina para la esclerotización	114
5.2- Análisis de catecolaminas endógenas	116
5.3- Presencia de un compuesto desconocido en el mutante <i>niger</i> .	119
5.4- El mutante <i>niger</i> es defectivo para la síntesis de NBAD <i>in vivo</i>	121
<b>6- La N-<math>\beta</math>-alanildopamina sintetasa</b>	<b>122</b>
6.1- Desarrollo del ensayo de actividad	123
6.2- Características y requerimientos de la NBAD sintetasa	125
6.2.1- Requerimientos básicos de la actividad enzimática	125
6.2.2- Dependencia de cationes divalentes	127
6.2.3- Dependencia de la temperatura	129
6.2.4- Dependencia del pH	130
6.2.5- Metales inhibitorios	131
6.2.6- Estudios cinéticos	132
6.2.7- Especificidad de sustrato	135
6.3- La NBAD sintetasa se expresa sólo durante la esclerotización	144
6.4- Actividad NBAD sintetasa en el mutante <i>niger</i>	145
6.5- Actividad NBAD hidrolasa	146
6.6- La NBAD sintetasa se expresa en la epidermis	148
 <b>DISCUSION</b>	 <b>151</b>
1- La esclerotización del pupario de <i>Ceratitis capitata</i> .	152
2- El mutante <i>white pupa</i> y la exportación de catecolaminas	153
3- La deshidratación de la cutícula de los insectos	156
4- Un modelo alternativo para explicar la deshidratación de la cutícula	157
5- El mutante <i>Black pupa</i> es deficiente en $\beta$ -alanina	164

---

6- El mutante <i>niger</i> es incapaz de sintetizar N- $\beta$ -alanildopamina	166
7- La N- $\beta$ -alanildopamina sintetasa en la esclerotización	169
8- La N- $\beta$ -alanildopamina sintetasa y el sistema nervioso	170
9- La N- $\beta$ -alanildopamina sintetasa y el éxito evolutivo de los insectos	174
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>176</b>
<b>PROYECCION FUTURA</b>	<b>181</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>185</b>

# **Introducción**

# I- Presentación del problema

## 1- El concepto de "Novedad Evolutiva"

*"Durante los frecuentes arranques de ira que sufren especialmente los machos, los esfuerzos de sus sentimientos internos provocan que los flúidos fluyan con mas fuerza hacia esa parte de la cabeza; en algunos se deposita allí una secreción córnea, y en otros una secreción ósea mezclada con una secreción córnea, que da lugar a protuberancias: de este modo tenemos el origen de los cuernos."*

Esta afirmación de Lamarck ejemplifica cómo el interés por el origen de los nuevos órganos existe desde el surgimiento de las propias teorías evolutivas (Darwin, 1872; Müller y Wagner, 1991). Si bien la explicación que brindó Lamarck no era la correcta y probablemente tampoco hoy en día se sepa en detalle cómo se forman los cuernos de los bueyes, la pregunta sobre el origen de estructuras novedosas durante la evolución sigue siendo una de las mas apasionantes de la biología.

Mayr (1960) proporciona una buena definición para **novedad evolutiva**: "toda nueva estructura o propiedad que se adquiere y que permite cumplir una nueva función".

La pregunta que nos compete es cuáles son los mecanismos bioquímicos y moleculares que permitieron la aparición de novedades en la evolución. Si bien éste es un problema poco abordado, se pueden hacer algunas especulaciones al respecto. *A priori*, parece difícil imaginarse cómo surgen "de la nada" estructuras o funciones totalmente novedosas que en los organismos ancestrales estaban ausentes. En principio, una aproximación posible es considerar que una estructura o una "maquinaria" pre-existente en el organismo ancestral cambió su función, adquiriendo un nuevo rol en el organismo derivado. De este modo, la novedad no habría surgido "de la nada" sino a partir de la modificación de una entidad pre-existente.

Otra alternativa es que sí se haya creado una nueva estructura o maquinaria que antes no existía de modo alguno (Gould y Vrba, 1982). Se sabe que mutaciones en genes que controlan el desarrollo de los organismos pluricelulares pueden suprimir la represión de la expresión de baterías completas de otros genes, lo cual conduce a la formación de estructuras completas (se discute mas adelante).

En el caso en el que una estructura o una maquinaria metabólica pre-existente haya dado origen a una novedad evolutiva, dicha entidad pre-existente podrá sufrir un cambio en su función, adoptando una función

diferente de la original. Alternativamente, podrá tratarse de una estructura que no cumplía ninguna función en el organismo primitivo y que adquiere ahora un rol, merced a una modificación en su morfología, o en su especificidad temporal y espacial de expresión (Gould y Vrba, 1982).

Un posible tercer mecanismo relacionado con los dos anteriores es que ocurra la duplicación de una estructura o maquinaria dada, para que la forma duplicada adquiriera luego, una función novedosa. De este modo, la función original no se perdería y un nuevo rol se adicionaría al espectro de aptitudes del organismo en cuestión. Mas adelante, volveremos sobre este punto, ya que es directamente pertinente a nuestra hipótesis de trabajo.

El requisito que toda novedad evolutiva debe cumplir es que ésta conduzca a que el organismo logre ventajas adaptativas de importancia que permitan un salto cualitativo en algún aspecto de su adecuación biológica. Por lo tanto, la novedad debe permitirle al organismo cumplir cierta función que no podían cumplir sus ancestros, o debe permitirle conquistar cierto nicho ecológico que originalmente le estaba vedado (Mayr, 1960). Podemos concluir, por lo tanto, que la novedad evolutiva es un factor fundamental en el proceso especiogénico, como así también en el surgimiento de taxones de rango supra-específico (Eldredge y Cracraft, 1980; Wagner y Müller, 1991).

Cuando nos preguntamos sobre el origen de dichas novedades evolutivas, surgen una multitud de preguntas fascinantes sobre los mecanismos moleculares que dieron origen a estas novedades. *¿Cómo surge la cefalización en la historia evolutiva?; ¿Cómo surge la notocorda? ¿Qué mecanismos permitieron la aparición de la maquinaria bioquímica de fijación de Nitrógeno?*

Notablemente, los biólogos evolutivos modernos parecen prestar atención preferentemente a las relaciones filogenéticas entre los organismos vivos. El problema de los mecanismos por los cuales surgen los taxones de rango superior es un tema abordado con mucha menor frecuencia (Eldredge, 1982); y en los casos en los que se lo hace, se lo encara desde la óptica de la genética de poblaciones, prestando atención preferencial a las circunstancias ecológicas que podrían haber favorecido los procesos de especiación (Barton y Charlesworth, 1984; Carson y Templeton, 1984). Permanece poco abordado el problema de los posibles mecanismos bioquímicos y moleculares que pudieron haber dado lugar a los cambios evolutivamente trascendentes.

*¿Cómo surgió la cutícula esclerotizada de los artrópodos en la evolución ?* es la pregunta directriz de este trabajo de investigación. Considerando que la fisiología y la adaptación de los artrópodos al medio terrestre depende en una alta proporción de las propiedades físico-químicas de su cutícula la

pregunta formulada es equivalente a *¿Cómo surgieron los artrópodos en la evolución?*

Usando herramientas de la biología comparada, la bioquímica y la biología molecular del desarrollo, este tipo de preguntas enormes y aparentemente difíciles de abarcar pueden, hoy en día, ser abordadas. Trataremos de desarrollar, a lo largo del resto de la Introducción, el marco teórico y el razonamiento que condujeron a nuestra hipótesis de trabajo y a nuestro diseño experimental. Los resultados alcanzados en esta Tesis son apenas una parte del proceso de fabricación de las herramientas necesarias para poder abordar de lleno la pregunta de fondo que nos interesa.

## **2- Los mecanismos y los ritmos de la evolución**

La esencia del darwinismo reside en la afirmación de que la Selección Natural es la fuerza rectora de la evolución, ya que genera un individuo adaptado escogiendo, de entre las múltiples variantes surgidas al azar, aquella que mejor le permitirá sobrevivir y reproducirse en el ambiente en el que se encuentra (Darwin, 1859). De este modo se explica cómo la naturaleza elige de entre las variantes pre-existentes, pero poco se dice sobre el origen de dichas variantes.

Entre 1930 y 1940, las ciencias biológicas “duras” como la genética mendeliana, en auge por aquella época, se fusionaron con las tradiciones darwinistas de la historia natural y le asignaron a las mutaciones genéticas el papel generador de la variabilidad darwiniana. De este modo, surgía la Teoría Sintética de la Evolución que asignaba a la selección natural el papel de ir mejorando paulatinamente los caracteres de una especie a partir de las variantes genéticas presentes en las poblaciones (Dobzhansky, 1955). Estas variantes se generaban continuamente por mutaciones que iban diversificando de este modo la variabilidad disponible.

Como corolario de la Teoría Sintética, se desprende, por un lado, que toda la diversidad biológica que observamos en la naturaleza es producto de una adaptación a las necesidades del ambiente y, por otro, que la evolución va actuando lenta, gradual y sostenidamente en su proceso de optimización de los fenotipos a sus correspondientes nichos ecológicos. En este contexto, el único rol del azar es el de generar estas pequeñas variaciones aleatorias que paulatinamente van modelando los caracteres de los seres vivos.

La Teoría Sintética no dice nada sobre los caracteres que surgen azorosamente y se mantienen sólo porque no son perjudiciales para el organismo. Tampoco considera la posible existencia de estructuras que aparecen como mero sub-producto de alguna otra que sí tiene valor

adaptativo. Existen múltiples ejemplos en la naturaleza de estructuras cuya existencia se explica sólo por razones históricas; es decir, que están allí donde están por alguna razón inherente a la evolución del resto del organismo (Gould, 1977). Intuitivamente, este marco teórico parece ser insuficiente para explicar la variabilidad natural observada que es, en esencia, discontinua (Bateson, 1894; Eldredge, 1982).

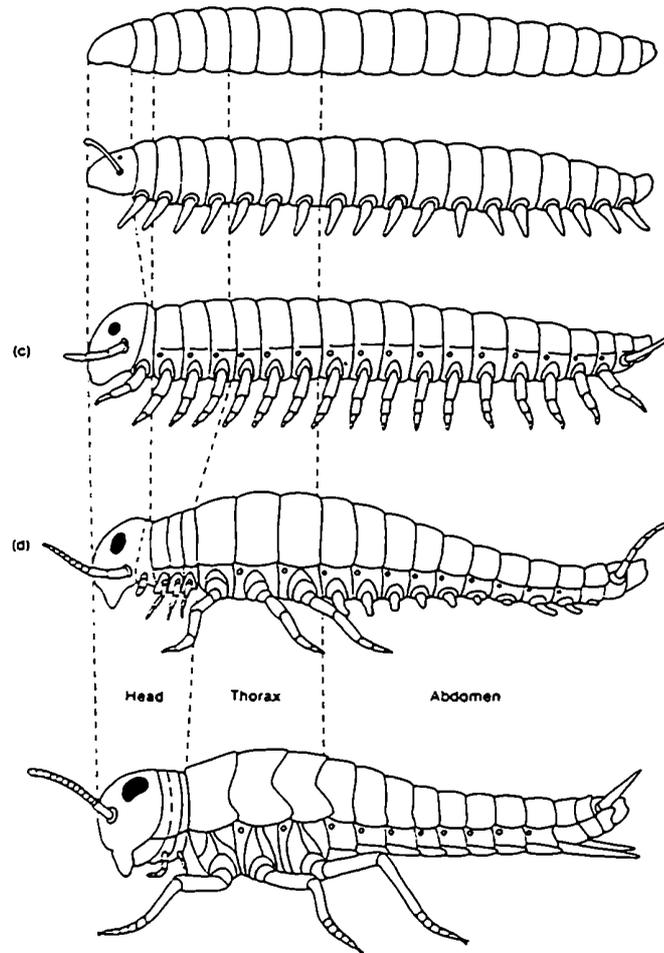
Tomando como ejemplo a los animales, existen planes generales de organización corporal altamente estereotipados que difieren entre los diferentes grupos taxonómicos de orden superior (phyla, clases, órdenes, etc.) Por ejemplo, el *Bauplan* de los insectos se caracteriza por la presencia de tres tagmas: cabeza, tórax y abdomen, tres pares de patas y dos pares de alas en el tórax, una serie de apéndices exclusivamente cefálicos y una cutícula esclerotizada que oficia de exoesqueleto en el que se insertan los músculos. Este *Bauplan* difiere de el de otras clases del Phylum Arthropoda, como los miriápodos o los arácnidos. El Phylum *Arthropoda* tiene, a su vez, un *Bauplan* de orden superior que difiere enormemente de el de otros phyla filogenéticamente próximos. El Phylum *Anelida*, por ejemplo, está constituido básicamente por especímenes ápodos, y sus desplazamientos se basan en los cambios de la presión hidrostática en las diferentes regiones del cuerpo que producen los músculos circulares (ver Fig 1)

Lo que pretendo ilustrar con estos ejemplos, es básicamente lo siguiente: 1) que la variabilidad biológica de los organismos de la naturaleza es esencialmente discontinua y que dichas discontinuidades son difícilmente explicables sólo mediante la variación lenta, gradual y continua que propone la Teoría Sintética de la Evolución -el problema de los famosos "eslabones perdidos"- y 2) que dichas discontinuidades de la naturaleza se ordenan en forma jerárquica, es decir que existen discontinuidades de mayor o menor importancia que se corresponden con el rango de los taxones en cuestión (phylum, clase, orden, etc.).

Los adaptacionistas a ultranza intentan explicar estas discontinuidades en el marco de la Teoría Sintética. Proponen que lo que observamos hoy en día es una representación muy incompleta de lo que existió alguna vez. Sostienen que las discontinuidades aparentes se deben a que, a lo largo del tiempo, las formas intermedias de animales, plantas y otros organismos se han ido extinguiendo.

Sin embargo, el registro fósil de algunos yacimientos geológicos especialmente completos indica que la situación no parece haber sido ésa. Si bien muchas de las especies fósiles de dichos yacimientos se hallan hoy en día extinguidas, los fósiles encontrados muestran aproximadamente el mismo patrón de discontinuidades que observamos actualmente en la

naturaleza (Stanley, 1982). Es decir, no puede afirmarse que las especies fósiles sean los eslabones perdidos de la evolución que faltan en las especies modernas. Las discontinuidades parecen, por lo tanto, ser la consecuencia inevitable de los mecanismos inherentes al proceso evolutivo.



**Figura 1-** Evolución hipotética de los planes de organización corporal del linaje de los invertebrados que conduce a los insectos. (a) Plan general de organización de los anélidos; (b) de los onicóforos; (c) de los miriápodos; (d) de un insecto apterigota; (e) de un insecto pterigota. (tomado de Raff y Kaufman, 1983).

Frente a esta panorámica el paleontólogo norteamericano Stephen Jay Gould propuso la Teoría de los Equilibrios Discontinuos (Gould y Eldredge, 1977), que propone que las especies ya establecidas no cambian sustancialmente en su fenotipo durante períodos de su vida geológica los cuales pueden comprender muchos millones de años. Por lo tanto, la

mayor parte del cambio evolutivo se concentraría en acontecimientos geológicamente instáneos.

Esto implica que el surgimiento de nuevas especies es un fenómeno infrecuente y esencialmente ramificante. De este modo, la especie primitiva sigue existiendo, mientras que la especie nueva pasa a coexistir con ella, lo cual conlleva a la aparición de una discontinuidad en la naturaleza (Eldredge, 1982). Según esta teoría, la evolución progresaría de a saltos que estarían separados por largos períodos de estasis (Stanley, 1982). Durante estos períodos de estasis sólo se observan cambios de menor importancia que sí obedecerían a las reglas de la Teoría Sintética de la Evolución, pero a los cuales no se les puede atribuir el surgimiento de nuevos taxones.

¿Por qué son tan esporádicos estos eventos de cambio evolutivo significativo para la especiación? Se sugirió que los organismos poseen fuertes limitaciones para experimentar grandes cambios y estas limitaciones estarían dadas por los complejos mecanismos celulares que controlan el desarrollo ontogénico (Raff y Kaufman, 1983). Esto significa que los mecanismos de desarrollo no son lo suficientemente plásticos para soportar modificaciones en algunos de sus elementos, sin que estas modificaciones causen el desmembramiento de todo el proceso de desarrollo. Cuando, por azar, alguna rara variante resulta ser viable, las consecuencias sobre la morfología o la fisiología del individuo adulto resultan ser drásticas y el individuo resultante presenta diferencias importantes con respecto al que le dio origen (Raff y Kaufman, 1983). Este tipo de modificaciones en los programas genéticos de desarrollo son sin lugar a dudas fuente de surgimiento de nuevas especies y de taxones de rango supra-específico.

Este escenario parece ser mas propicio para explicar el desarrollo de la vida sobre la tierra. Tiene la virtud de explicar la presencia de múltiples estructuras no-funcionales presentes en los organismos (Gould y Vrba, 1982) y, por sobre todo, la existencia de una naturaleza plagada de discontinuidades morfológicas y funcionales que ordena a los distintos grupos de seres vivos de una manera jerárquica (Gould, 1983).

### **3- Los genes de los organismos eucariontes superiores conforman una compleja red funcional de interacciones recíprocas**

Antiguamente, antes de que la biología molecular permitiera entrever las complejas interacciones que existen entre los genes de los eucariontes

superiores, los genetistas se referían a dos categorías de genes: los genes estructurales y los genes reguladores. Hoy en día, el panorama ya no es tan sencillo; si bien hay genes que sin lugar a dudas pueden ser catalogados de “estructurales” por codificar enzimas que sintetizan productos fenotípicamente conspicuos (por ej., para los pigmentos florales), dichas enzimas a menudo controlan directa o indirectamente la expresión de otros genes, por lo cual se los podría también considerar genes reguladores.

En general, todos los procesos que ocurren dentro de una célula están controlados por una multitud de genes que interactúan entre sí constituyendo una red regulatoria en la que coexisten fenómenos de activación en cadena, efectos cooperativos, sinérgicos, antagónicos y sutiles interacciones en las que el resultado final depende de las dosis en las que se encuentran los múltiples elementos del sistema.

Una característica distintiva de las interacciones entre genes es que, a menudo, se organizan en forma jerárquica. En este sentido, uno de los sistemas mejor conocidos es el que controla el desarrollo de los metazoarios.

Desde mediados de este siglo, se han venido estudiando primero genéticamente y más tarde molecularmente, las interacciones entre los genes que controlan el desarrollo embrionario de la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* (Lewis, 1978; Nüsslein-Volhard, 1991; McGinnis y col., 1984; Scott y col., 1989; Gehring y col., 1994). Quedó claramente establecido que estos genes se controlan unos a otros de un modo jerárquico conformando una pirámide de interacciones regulatorias (Fig. 2). Este tipo de organización se ha estudiado en gran detalle en el sistema que controla la regionalización antero-posterior del embrión, la cual finaliza con la diferenciación de los distintos segmentos del insecto. Los genes de la parte superior de la pirámide controlan la polaridad antero-posterior del embrión. Mutaciones en este tipo de genes conducen a la generación de especímenes sin parte posterior y con dos cabezas o sin cabeza y con dos colas (Nüsslein-Volhard, 1991). Bajo el control de estos genes de polaridad se encuentra toda una cascada de genes reguladores de distintas categorías que se expresan en franjas del embrión que son cada vez más angostas a medida que se va bajando de jerarquía en la pirámide (Fig. 2).

Es fácil imaginarse que los mutantes de los genes que conforman esta pirámide regulatoria tienen fenotipos altamente aberrantes. Algunos carecen de regiones completas que pueden comprender varios segmentos y otros se caracterizan por el cambio de identidad de los segmentos. Las mutaciones que cambian la identidad de un segmento, convirtiéndolo en un segmento diferente, se denominan mutaciones homeóticas y provocan que

un segmento dado exprese estructuras morfológicas que corresponden a un segmento diferente. Por ejemplo *antennapedia*, una de estas mutaciones homeóticas, produce patas en el lugar de la cabeza donde deberían formarse antenas (Fig. 3).

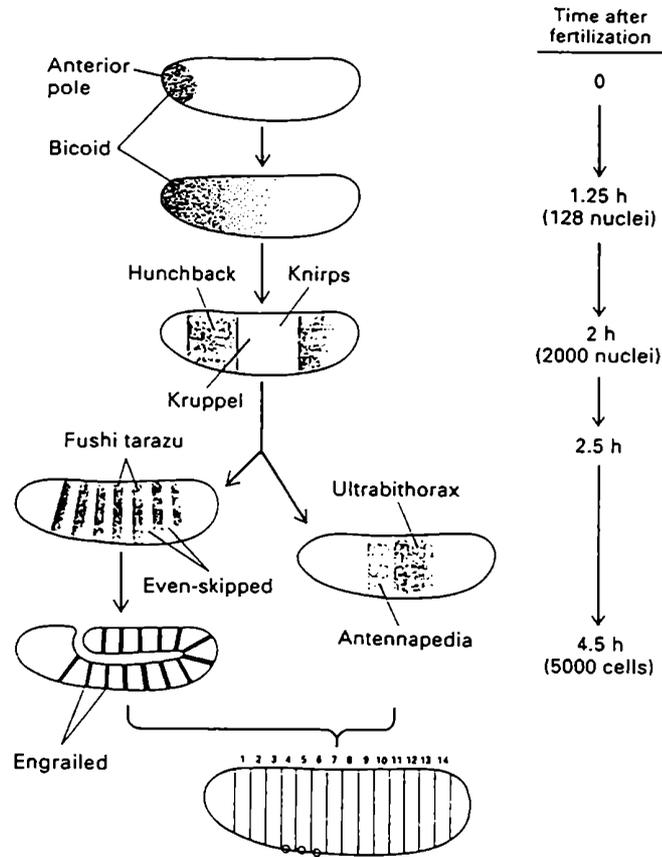


Figura 2- Esquema que representa la organización jerárquica de las interacciones regulatorias entre los genes que controlan la diferenciación a lo largo del eje antero-posterior del embrión durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*.

Queda claro por lo tanto que, en los organismos eucariontes superiores, los genes se relacionan entre sí de una manera jerárquica conformando redes de interacciones de las cuales finalmente emergen los fenotipos. Existen genes maestros que promueven o reprimen la expresión de toda una batería de otros genes determinando dónde y cuándo se debe expresar dicha batería de genes. Cuando dichos genes mutan, el lugar y el tiempo de

dicha batería de genes. Cuando dichos genes mutan, el lugar y el tiempo de expresión pueden llegar a modificarse haciendo que la estructura o maquinaria que controlan se exprese en un contexto espacial y temporal diferente.

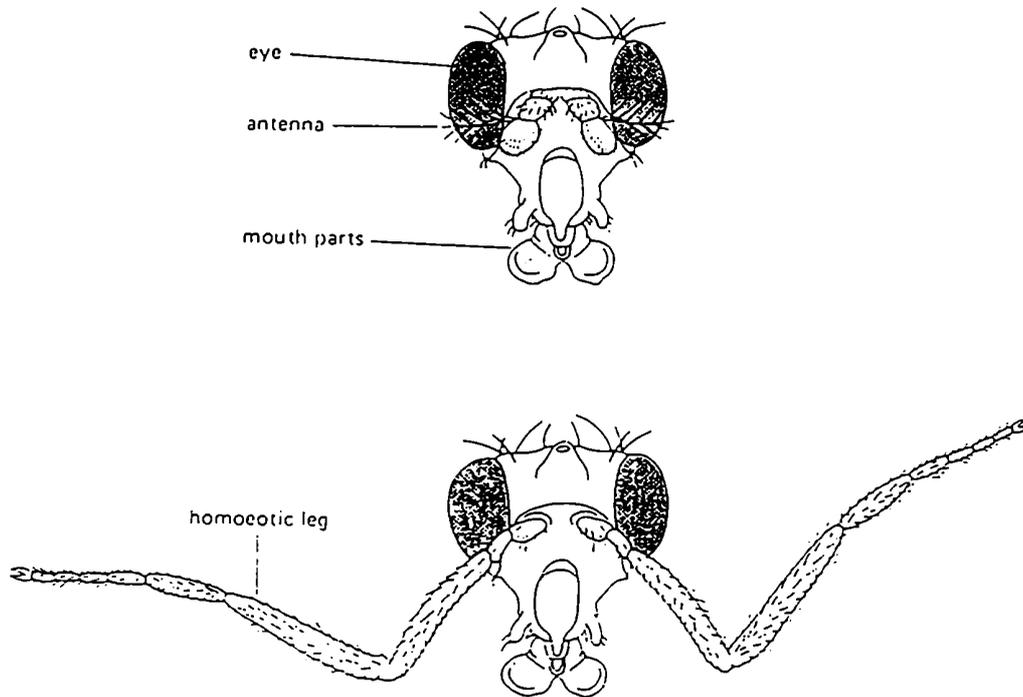


Figura 3- Fenotipo del mutante *antennapedia* (arriba) caracterizado por la expresión de un par de patas protorácicas normales en la posición de la cabeza donde normalmente hay antenas (abajo).

#### 4- El aporte de la Biología del Desarrollo al problema del surgimiento de las novedades evolutivas.

Conceptualmente, hace tiempo que se viene discutiendo que las modificaciones en los mecanismos que controlan el desarrollo son una fuente potencial para el surgimiento de novedades evolutivas. Antes de mediados de siglo, Goldschmidt (1940; 1948) ya había hablado de las “macromutaciones” como generadoras de variantes evolutivamente

importantes. Según Goldschmidt, estas “macromutaciones” habrían sido la causa del surgimiento de lo que dio en llamar los “monstruos esperanzados”. Estos habrían sido especímenes mutantes con características marcadamente diferentes de las del ancestro que le dio origen, pero con muy baja probabilidad de supervivencia. Goldschmidt sugirió que, en el raro caso en el que un “monstruo esperanzado” consiguiera sobrevivir y reproducirse, habría logrado establecerse una novedad evolutiva en la naturaleza, potencialmente generadora de un nuevo taxón. Ya antes de principios de siglo, Bateson (1894) había descrito el primer mutante homeótico en *Drosophila melanogaster*. Hacia la década del '50, Lewis, caracterizó genéticamente estos mutantes de desarrollo con aberraciones morfológicas extremas (Lewis, 1978; 1994) encontrando, por lo tanto, un correlato genético a la teoría de Goldschmidt.

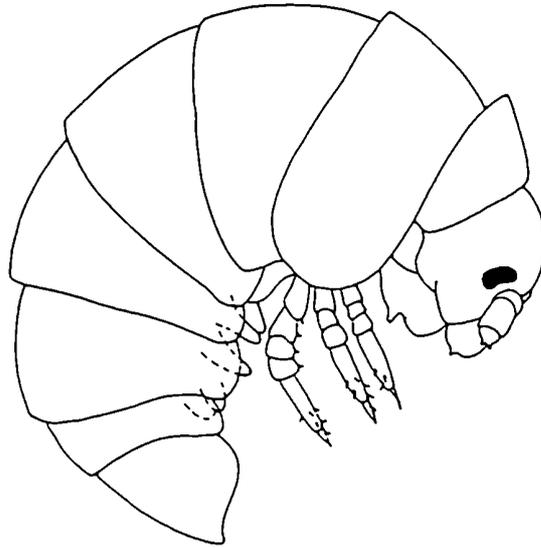
Independientemente, y bastante tiempo mas tarde, investigadores que trabajaban en el estudio de la morfología comparada de diversos grupos de vertebrados propusieron que los cambios en la duración relativa y en el orden de los diferentes eventos del desarrollo son factores potenciales de generación de especies nuevas (Alberch, 1980; Oster y Alberch, 1982). En invertebrados, también se les asignó a las heterocronías un papel fundamental en la aparición de taxones nuevos (Raff y Kaufman, 1983). Se acepta que los insectos apterigotas primitivos surgieron a partir de una mutación heterocrónica. Esta mutación habría consistido en la adquisición de la madurez sexual por parte de una larva de un ancestro miriápodo. Se cree que este evento neoténico habría dado lugar a toda la Clase Insecta (Fig. 4) (Raff y Kaufman, 1983).

Queda, por lo tanto, ejemplificado el enorme potencial especiogénico que tienen estos cambios en el *tempo* de desarrollo -las heterocronías- en el proceso evolutivo.

Mientras tanto, en forma totalmente independiente, la genética del desarrollo producía avances de gran trascendencia utilizando a la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* como organismo modelo. La dilucidación de las interacciones entre los genes homeóticos de esta mosca fueron el primer gran éxito en el camino hacia la comprensión de los mecanismos genéticos que regulan el desarrollo de los organismos pluricelulares (Lewis, 1978; Lewis, 1994).

Poco después, con el advenimiento de las técnicas de biología molecular, se comenzaron a clonar y estudiar los genes que controlan el desarrollo de *Drosophila* (Bender y col., 1983; Scott y col., 1983; Scott y Weiner, 1984; McGinnis y col., 1984). Rápidamente, se comenzaron a comprender cada vez mejor sus interacciones moleculares y funciones bioquímicas (sección anterior).

**Figura 4-** Morfología de la larva recién emergida de un milpiés del género *Glomeris*. Su organización corporal es muy parecida a la de los insectos apterigotas más primitivos. Por eso se postula que el origen de los insectos habría estado determinado por un evento neoténico en el que una larva de este tipo habría logrado alcanzar la madurez sexual sin variar sustancialmente su plan de organización corporal. (tomado de Raff y Kaufman, 1983).



Paralelamente a estos avances, comenzaban a identificarse los genes que controlan el desarrollo de los vertebrados (Carrasco y col., 1984) y el de otros organismos filogenéticamente muy distantes (McGinnis y col, 1984; Kenyon y Want, 1991).

Sólo muy recientemente, la vertiente de conocimiento proveniente de la biología evolutiva se fusionó con la de la biología molecular del desarrollo. Se empezó a comprender que las complejas interacciones regulatorias entre los genes que controlan el desarrollo podrían ser el blanco de modificaciones generadoras de grandes cambios morfológicos y funcionales que pudieron haber sido la base de eventos especiogénicos y de generación de taxones de rango supra-específico.

De este modo, se registraron los primeros avances de importancia con respecto a los mecanismos moleculares que condujeron a la aparición de novedades evolutivas (Patel y col., 1989 A; B; 1992, 1994; ). Comenzó a comprenderse que, a nivel genético, existe una asombrosa conservación de algunos de los mecanismos que determinan los patrones generales del desarrollo de los animales (Manak y Scott, 1994). Por ejemplo, el sistema de genes homeóticos que controla la diferenciación de las distintas regiones del cuerpo a lo largo del eje antero-posterior de los animales se sabe que se ha conservado estructural y funcionalmente a lo largo de 600 millones de

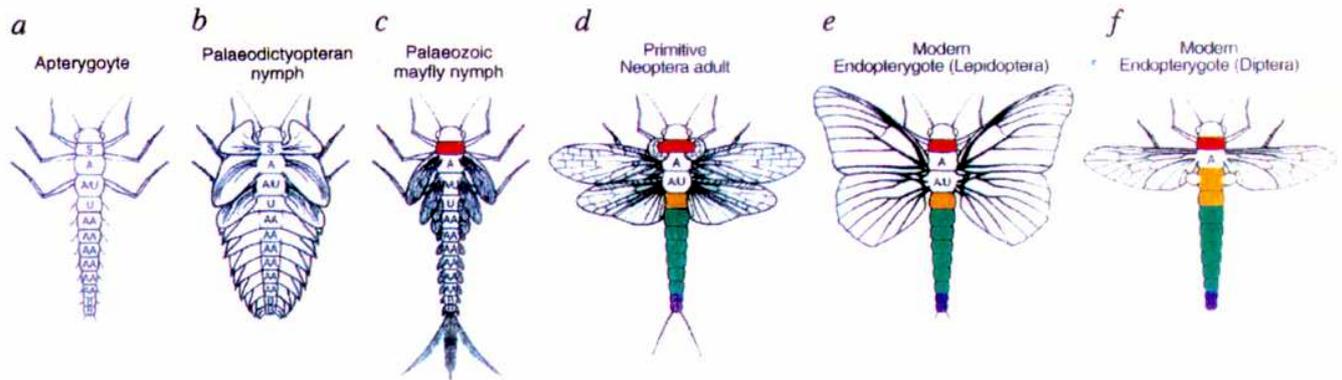
años (Tear y col., 1988; Akam y col., 1988; Averof y Akam, 1993; Akam y col., 1994; Beeman y col., 1993; Holland y col., 1992; García-Fernández y Holland., 1994; McGinnis y col., 1990; Malicki y col., 1990). Contrariamente, el sistema genético que determina la polaridad dorso-ventral de los animales no se conserva, ni siquiera entre órdenes emparentados dentro de la misma clase. Por lo tanto, este sistema parece ser altamente plástico en términos evolutivos (Patel, 1994).

En el último año, por primera vez y, en lo que a mi criterio representa un hito en la historia de la biología evolutiva, el grupo de Sean Carroll en Wisconsin logró identificar los cambios genéticos particulares que habrían sido responsables de ciertas novedades morfológicas adquiridas por los dípteros (Carroll, 1994; Warren y col., 1994; Williams y Carroll, 1993). Las larvas de mosca (Diptera) son ápodas, mientras que las larvas de muchas especies de mariposa, considerado un grupo de insectos más primitivo, tienen apéndices rudimentarios. El grupo de Carroll demostró que la batería de genes que da origen a las patas en la larva de la mariposa no se expresa en las larvas de mosca por estar reprimida debido a la acción de genes homeóticos del complejo *ultrabitorax*. En la mariposa, los genes del complejo *Ultrabitorax* aparentemente no se expresan en el sitio donde se forman las patas de las larvas permitiendo así su formación (Panganiban y col., 1994).

En otro estudio, el mismo grupo encontró que la formación de las alas responde a un parámetro semejante. El registro fósil muestra que los insectos pterigotas (alados) primitivos tenían alas rudimentarias (expansiones tergales) en todos los segmentos del tórax y también del abdomen (Carroll y col., 1995) (ver Fig 5). El análisis de la expresión de los genes homeóticos a lo largo de la filogenia de los insectos mostró que la reducción del número de alas durante la evolución se debe aparentemente a que estos genes fueron adquiriendo la capacidad de reprimir la expresión de la maquinaria genética encargada de generar las alas y que esa capacidad de represión se habría dado en segmentos cada vez más anteriores a lo largo del proceso evolutivo (Carroll y col., 1995). De este modo, en los insectos modernos el número de pares de alas habría quedado reducido a sólo uno o dos, quedando éstas suprimidas en el resto de los segmentos por causa de la represión ejercida por los genes homeóticos (Warren y Carroll, 1995; Carroll y col., 1994) (ver Fig. 5).

Este tipo de estudios muestra claramente que los mecanismos evolutivos involucrarían la variación de las interacciones regulatorias entre los genes, conduciendo de este modo a la modificación de la especificidad de expresión de maquinarias bioquímicas y estructuras morfológicas completas. Por lo tanto, baterías de genes y estructuras morfológicas

completas pueden reprimirse y desaparecer; activarse y aparecer; o duplicarse para expresarse en otro lugar del organismo o en otro tiempo del desarrollo.



**Figura 5-** Evolución de la capacidad de represión de los genes homeóticos sobre la formación de las alas durante la evolución de los insectos pterigotas. En colores se muestra cuáles son los segmentos en los que los genes homeóticos adquieren la capacidad de reprimir la formación de alas. (tomado de Carroll y col., 1995)

Esta clase de enfoque conduce de lleno al corazón de la problemática que nos interesa: entender las bases moleculares -en definitiva las bases mecánicas- del surgimiento de novedades en la historia evolutiva..

## 5- La cutícula de los insectos como novedad evolutiva

Los insectos se encuentran, sin lugar a dudas, entre los grupos de seres vivos más exitosos que habitan sobre la tierra. Hasta la fecha, se han descrito unas 250.000 especies diferentes y se calcula que podría haber más de un millón (Rockstein, 1973). Esta formidable diversificación no puede ser interpretada sino como una consecuencia del éxito evolutivo alcanzado por los insectos.

Este grupo de artrópodos colonizó los hábitats y nichos ecológicos más variados, incluyendo a diferentes hábitats terrestres y acuáticos, a los que habría que sumarle diversas formas de vida simbiótica y parasítica sobre distintas plantas y animales. Pueden encontrarse insectos viviendo en la

nieve de los picos montañosos o de la antártida, en aguas termales a 60 °C, en los lechos de los ríos, en el desierto, en las costas marinas o en productos alimenticios desecados. Es decir, los insectos están adaptados a virtualmente todos los nichos alimentarios, temperaturas, humedades y situaciones ecológicas en las que alguna forma de vida puede existir.

Una de las grandes ventajas adaptativas de los insectos por sobre sus ancestros anélidos, que presentan un endoesqueleto hidrostático, es que los insectos poseen un exoesqueleto cuticular mucho más rígido, resistente e impermeable que les permite defenderse de la desecación y las agresiones del medio. Asimismo, la cutícula les ha dado acceso a nuevas formas de locomoción permitiéndoles dispersarse y reproducirse de un modo mucho más eficiente. Por lo tanto, las propiedades de la cutícula de los insectos son probablemente, el determinante fundamental del éxito adaptativo del taxón. Como dijera Neville (1975) “Si se me preguntara cuál es el sistema que domina el modo de vida de los insectos, diría que sin lugar a dudas es la cutícula”.

La diferente combinación de los componentes de la cutícula y su distinto grado de esclerotización en las diversas regiones del cuerpo le confieren una amplia gama de propiedades mecánicas cruciales para la función que debe cumplir en cada caso. La cutícula posee características que le permitieron a los insectos adaptarse eficientemente al vuelo. Primeramente, debe tenerse en cuenta que cumple la función de exoesqueleto, brindando puntos de inserción a los músculos encargados de mover las alas; en segundo lugar, cierto tipo de cutículas especialmente elásticas presentes en la base de las alas es utilizada para almacenar energía potencial durante el vuelo que, de otro modo, se perdería. Otra propiedad importante es una relación muy favorable entre su resistencia y su peso, lo cual hace que las alas -constituidas primordialmente por cutícula- demanden menor energía para su aceleración y desaceleración durante el vuelo (Neville, 1975).

Una segunda forma de locomoción utilizada por varios órdenes de insectos, muy favorecida por las propiedades elásticas de la cutícula, es el salto. También en este caso, la función de la cutícula es la de almacenar la energía potencial generada por los músculos, la cual es liberada repentinamente produciendo el salto.

Una adquisición fundamental para que los insectos pudieran conquistar el medio terrestre, colonizando en él todos los hábitats imaginables, es la impermeabilidad de su cutícula. La presencia de lípidos altamente hidrofóbicos en sus capas más externas, incluyendo ceras, y la estructura que le confieren sus componentes mayoritarios -quitina y proteínas- hacen

que los insectos resistan la desecación hasta límites muy superiores a los alcanzados nunca por sus ancestros de cutícula blanda y permeable al agua. En términos de protección, las cutículas altamente esclerotizadas dificultan la tarea de los predadores y de los parásitos que pretenden penetrarla.

Considerando que la cutícula es una estructura extracelular relativamente rígida que recubre externamente al insecto en toda su superficie, los insectos han debido desarrollar adicionalmente un sistema que les permita mudar periódicamente su exoesqueleto para poder crecer en tamaño. La muda, a su vez, permite que eventualmente el insecto cambie de forma. Este cambio de forma se evidencia dramáticamente en los insectos con metamorfosis completa -holometábolos-, los cuales pueden explotar nichos ecológicos completamente diferentes durante los estadios larvales y durante el estadio adulto. De este modo, los estadios larvales se adaptan para alimentarse en forma eficiente acumulando reservas a partir de medios de rápida descomposición, mientras que el estadio adulto se especializa en la reproducción y la dispersión de la población.

Queda claro que la cutícula de los insectos es una novedad evolutiva mayor, la cual permitió que este grupo se adaptara a las exigencias del hábitat de un modo decisivo para su éxito evolutivo. Considerando que los invertebrados inferiores tienen tegumentos provistos de cutícula con propiedades muy diferentes a las de los insectos, cabe preguntarse ¿qué componentes de la cutícula de los insectos representan adquisiciones evolutivas y qué componentes son compartidos por sus ancestros?

Volveremos sobre esta pregunta mas adelante, en la sección 10.

## 6- Estructura de la cutícula de los insectos

La cutícula es una estructura extracelular estratificada secretada por la epidermis, que recubre toda la superficie del cuerpo del animal actuando como exoesqueleto y como tegumento protectorio.

Estudios de microscopía óptica han permitido determinar la existencia de dos grandes divisiones estructurales: una capa externa delgada y amorfa denominada **epicutícula**, y una capa interna mucho mas gruesa llamada **procutícula** (Wigglesworth, 1939). Con el advenimiento de la microscopía electrónica, se pudo determinar la estructura fina de estas dos capas cuticulares (ver Fig. 7).

### 6.1- La epicutícula

La **epicutícula** es fundamental para la economía hídrica del insecto como barrera hidrófuga y tiene una composición altamente hidrofóbica, siendo algunos de sus componentes sumamente resistentes a los procesos extractivos. A pesar de tener un espesor de entre 0,1 y 3  $\mu\text{m}$ , pueden diferenciarse dos sub-capas dentro de la epicutícula, aunque en ciertas especies se diferencian hasta cinco. La superficie de la epicutícula, vista al microscopio electrónico, muestra una multitud de formas micro-esculpidas con geometrías de lo mas variadas. Esta capa, la mas externa de la epicutícula, es la llamada capa de cemento. Por ser resistente a muchos de los procesos extractivos que se han intentado, la capa de cemento tiene una composición altamente incierta. Por estudios de microscopía e histoquímica se cree que está compuesta por proteínas tanificadas y ceras de muy alto peso molecular (Hepburn, 1985).

Por debajo de la capa de cemento, se encuentra la capa de ceras. En algunos insectos ésta es la capa mas externa ya que carecen de la capa anterior; la composición de las ceras es muy variable y sumamente adaptable a las exigencias ecológicas del hábitat. Se cree que la capa de ceras se secreta desde la epidermis a través de poro-canales poco tiempo antes de la ecdisis y su principal función es la de impedir la pérdida de agua a través de la cutícula.

Siguiendo hacia adentro, la próxima capa es la epicutícula externa. Esta capa de naturaleza proteica es resistente al fluido ecdisial y, al microscopio electrónico, presenta una estructura tri-laminar de unos 180 Å de espesor. Durante la secreción de la nueva cutícula, la epicutícula externa se va depositando en parches que posteriormente se fusionan determinando las dimensiones finales y la forma definitiva del exoesqueleto (Neville, 1975). Continuando hacia adentro, encontramos finalmente la epicutícula interna. Esta capa estaría compuesta por proteínas esclerotizadas por puentes fenólicos. Se reportó en ella la presencia de fenoloxidasas cuticulares insolubles (Weis-Fogh, 1970).

### 6.2- La procutícula

La **procutícula** es la capa interna, mucho mas gruesa que la epicutícula. Está constituida principalmente por quitina (Quesada-Allué, 1982; Quesada-Allué y col., 1976; Kramer y Koga, 1986; Cabib, 1972) y proteínas (Boccaccio y Quesada-Allué, 1989; 1994; Cox, 1987; Wappner y Quesada-Allué, 1993). La procutícula, a su vez se divide en dos regiones:

la capa mas interna es la denominada **endocutícula** con un espesor de entre 10 y 200  $\mu\text{m}$  y una capa externa mas delgada llamada **exocutícula** que es la región donde se lleva a cabo el proceso de esclerotización.

La **procutícula** está compuesta principalmente por quitina y proteínas. La combinación de estas dos sustancias es la que le confiere a la cutícula las propiedades mecánicas tan particulares que la han llevado a compararla con materiales bifásicos tan resistentes como la fibra de vidrio. La quitina, representa entre un 25 y un 50% del peso seco de la cutícula, se encuentra en forma de fibrillas lo cual le confiere al mismo tiempo flexibilidad y resistencia ténsil (Hadley, 1986). Cada fibrilla está constituida por 9 o mas cadenas de quitina. Químicamente, la quitina es una molécula polimérica lineal constituida por monómeros de N-acetilglucosamina y, en menor proporción, de glucosamina. Las cadenas adyacentes de quitina están unidas entre sí por puentes de hidrógeno constituyendose así las microfibrillas quitinosas (Hackman, 1974).

Las proteínas cuticulares se encuentran en contacto íntimo con los filamentos de quitina, constituyendo una matriz amorfa que une a dichos filamentos confiriendo, de este modo, cierto grado de rigidez a la cutícula. La combinación de quitina y proteínas le permite a la cutícula soportar esfuerzos mecánicos de importancia sin llegar a fracturarse.

Las propiedades mecánicas de la cutícula no dependen sólo de las sustancias que la componen, sino que también de un ordenamiento espacial muy peculiar de la quitina y las proteínas en la procutícula. Las microfibrillas se ordenan en planos paralelos a la superficie cuticular constituyendo láminas. Las láminas, a su vez, se superponen unas sobre otras dando lugar a la formación de lamelas. Las microfibrillas se orientan siempre en un plano paralelo a la superficie cuticular pero, en el plano perpendicular a ella, van variando su orientación entre una lámina y la siguiente de manera que terminan configurando un patrón helicoidal dentro de cada lamela. De este modo, una lamela representa un giro de  $180^\circ$  con respecto a la orientación de sus microfibrillas (ver Fig. 6)(Locke, 1974). Este arreglo espacial le confiere a la cutícula propiedades de resistencia y elasticidad uniforme en todas las direcciones dentro del plano paralelo a su superficie, lo cual le otorga un notable valor adaptativo en su función como exoesqueleto (Hepburn, 1976). El mecanismo de generación de este patrón helicoidal durante la secreción de la cutícula se desconoce por completo.

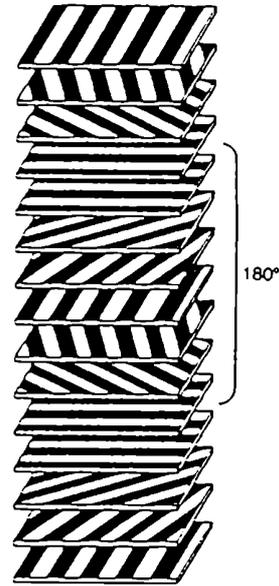


Figura 6- Disposición espacial de las microfibrillas de quitina, determinando dentro de cada lamela un arreglo helicoidal (tomado de Hadley, 1986).

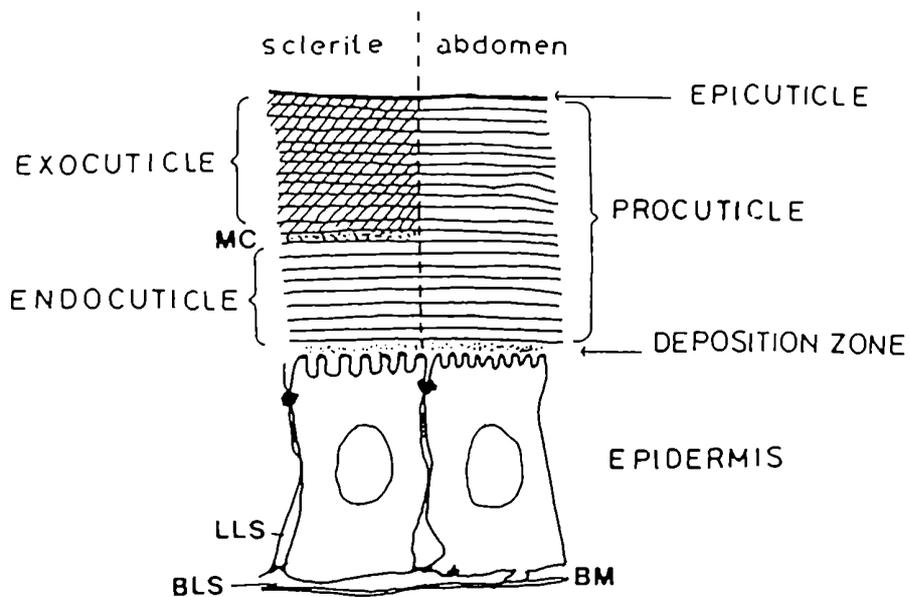


Figura 7- Esquema de la estructura de la cutícula vista en corte transversal. Se observan las diferentes capas que constituyen el integumento (tomado de Quesada-Allué, 1987).

Como se mencionó mas arriba, por fuera de la **endocutícula** se encuentra una segunda región denominada **exocutícula** cuya estructura y composición son muy semejantes a la de la **endocutícula**. La diferencia fundamental entre ambas regiones es que la exocutícula es mucho mas resistente a la degradación por parte de las quitinasas y proteasas del fluido ecdisial que actúan durante la muda debido en parte a que es la región en la que se lleva a cabo el proceso de esclerotización. Luego de la ecdisis, la exuvia que el insecto abandona corresponde casi exclusivamente a la **exo** y a la **epicutícula**.

## 7- El proceso de muda y la deposición de la cutícula

Como se mencionó mas arriba, el carácter extracelular y la naturaleza relativamente rígida la cutícula ofrecen una limitación al crecimiento del insecto. La evolución ha resuelto este problema haciendo que los artrópodos desechen y reemplacen en forma periódica esta cutícula por una mas grande. Una ventaja adicional de este sistema de desarrollo es que ofrece la posibilidad de variar no sólo el tamaño de la cutícula -y del cuerpo del insecto- sino que también puede variar su morfología e incluso su plan de organización corporal. Esto permite que, en distintos estadios del ciclo de vida, el insecto se adapte a nichos ecológicos diferentes. En los insectos holometábolos (con metamorfosis completa) estas diferencias entre estadios llegan a su máxima expresión.

El remplazo periódico de la cutícula involucra la sincronización de una serie de eventos bioquímicos y moleculares merced a los cuales la vieja cutícula debe ser parcialmente degradada y la nueva cutícula debe ser sintetizada. El armado de una nueva cutícula involucra la síntesis de sus componentes, la secreción de los mismos a través de la cara apical de la epidermis, el ensamblaje extracelular *in situ*, la expansión del insecto para lograr el nuevo tamaño corporal y por último, la esclerotización de la cutícula. La coordinación de todos estos eventos involucra la inducción concertada de una multitud de genes que, directa o indirectamente, están relacionados con las maquinarias bioquímicas involucradas en cada uno de estos procesos. Se sabe bien que la coordinación de todos estos eventos está regulada hormonalmente. La muda de los insectos se induce por aumento en la concentración circulante de ecdisteroides, dentro de los cuales el mas importante es la 20-OH-ecdisona, conocida como hormona de la muda (ver Fig. 8).

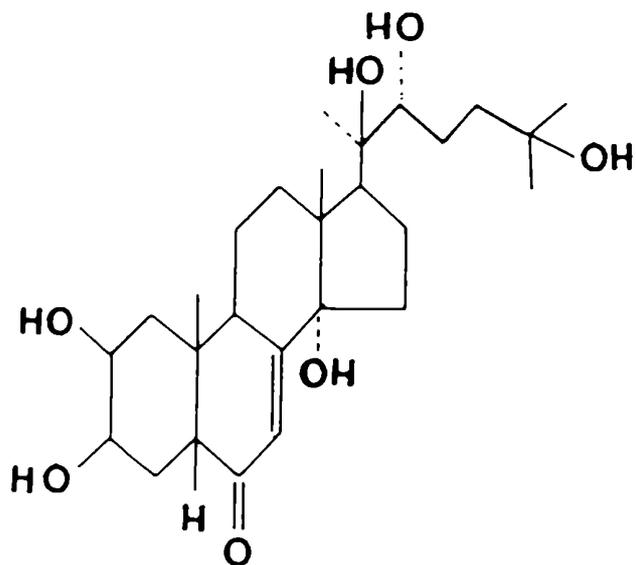


Figura 8- Estructura química de la 20-OH-ecdisona

Esta hormona esteroide tiene un receptor nuclear y se sabe que el complejo hormona-receptor activa la expresión de grupos de genes involucrados en la muda y en la metamorfosis (Koelle y col., 1991).

Así como la 20-OH-ecdisona es la que determina cuándo el insecto va a mudar su cutícula, existe otro grupo de hormonas, las hormonas juveniles que condicionan el tipo de muda que se va a desencadenar (ver Fig.9).

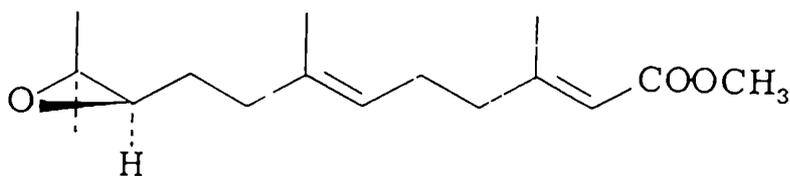


Figura 9- Estructura química de la hormona juvenil

En insectos holometábolos, se sabe que, si cuando se llega al pico de ecdisona existen niveles altos de hormona juvenil, se produce la síntesis de

una nueva cutícula larval. Si el estímulo de ecdisona se produce en presencia de bajos tenores de hormona juvenil, la epidermis quedará programada para sintetizar una cutícula pupal o de adulto; es decir se desencadenará el proceso de metamorfosis. De este modo, la ecdisona y la hormona juvenil actúan concertadamente para determinar cuándo se producirá la muda y las características de dicha muda.

Una vez estimulada la epidermis para que produzca la nueva cutícula, la secuencia de eventos que se suceden es la siguiente: primero, se produce el proceso de apólisis, es decir, la epidermis se separa de la vieja cutícula, creándose el espacio ecdisial que aparentemente contiene un fluido rico en enzimas degradativas. Luego, comienza la digestión de la vieja cutícula y la deposición de las capas proteicas de la nueva epicutícula. En este estadio, se observa una activa endocitosis de los componentes de la vieja cutícula que ha sido degradada, los cuales habrán de ser re-utilizados para la síntesis de la nueva cutícula. Asimismo se observa una activa exocitosis de los componentes de la nueva cutícula. A continuación, se produce la deposición de la procutícula y aproximadamente al mismo tiempo finaliza la digestión de la vieja cutícula. Cuando finaliza la deposición de la procutícula, se produce la ecdisis, es decir, el abandono por parte del insecto de los restos de la vieja cutícula. Inmediatamente después de la ecdisis, el insecto aumenta su volumen corporal por incorporación de aire o de agua, expandiendo de este modo la cutícula. A continuación, ésta se esclerotiza, adquiriendo su rigidez y coloración definitivas. En forma concomitante con la esclerotización, a través de los poro-canales se secreta la capa de ceras que recubre exteriormente la cutícula y esta impregnación con lípidos continúa incluso una vez que la esclerotización ha finalizado (Quesada-Allué, 1987). Mas adelante, veremos que, durante la formación del pupario de los dípteros ciclorrafos, esta secuencia de eventos está profundamente alterada ya que la vieja cutícula se esclerotiza varios días después de haber sido secretada.

## **8- La formación del pupario de los dípteros ciclorrafos**

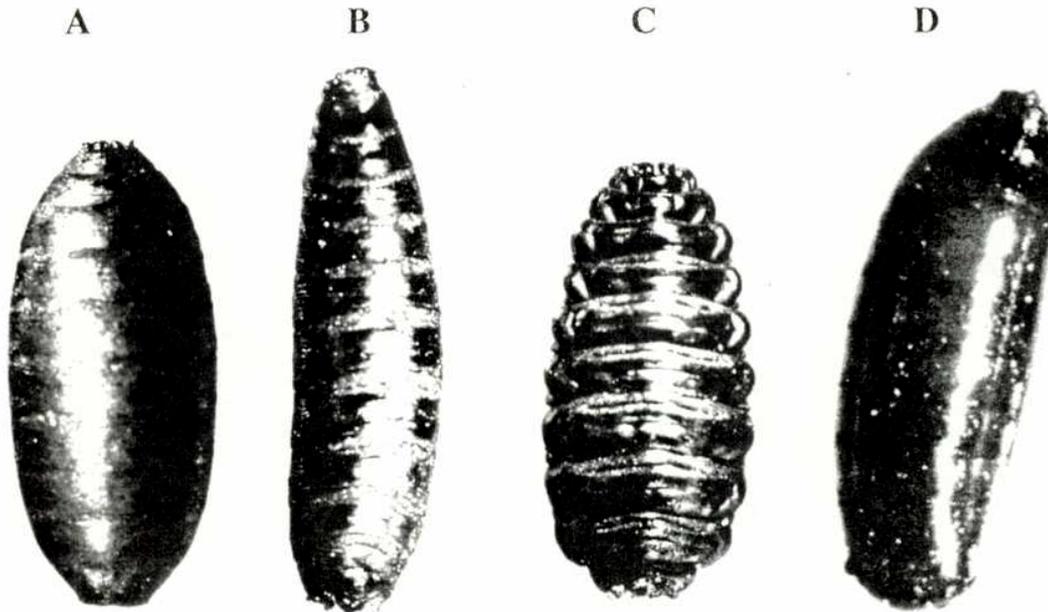
Como se comentó mas arriba, la metamorfosis de los insectos holometábolos les permite a éstos explotar nichos ecológicos distintos en diferentes estadios del ciclo de vida. Los dípteros ciclorrafos en particular, presentan larvas de tipo vermiforme adaptadas a una alimentación activa en medios que se descomponen relativamente rápido, como carnes o frutas. El estadio adulto de este grupo de insectos está adaptado al vuelo y por lo tanto, a la dispersión y a la reproducción de la especie.

Por lo tanto, el plan general de organización corporal de la larva y del adulto difieren en forma dramática, por lo cual la metamorfosis involucra una complicada serie de procesos de degradación y síntesis de tejidos. En la mayoría de los órdenes de insectos holometábolos, al finalizar el último estadio larval, se produce una muda que genera la cutícula pupal, la cual generalmente se esclerotiza. En este sentido, los dípteros ciclorrafos son la excepción. Este grupo ha desarrollado una adaptación única dentro de los insectos holometábolos. Dicha adaptación consiste en que el estadio pupal transcurre íntegramente dentro de una carcasa protectora que protege al insecto durante toda la metamorfosis. Dicha estructura protectora se denomina pupario y es el producto de la transformación que sufre la cutícula de la larva de tercer estadio en su transición hacia el estadio prepupal. Al final del tercer estadio, la cutícula larval -que es blanda y flexible- no es remplazada por una nueva cutícula, sino que se esclerotiza dando lugar al pupario. Tanto el estadio pupal como parte del estadio adulto transcurren, por lo tanto, dentro del pupario. Como consecuencia de esto, la ecdisis de la pupa y del adulto ocurren en forma simultánea.

La obvia ventaja adaptativa del pupario es la de proteger al insecto de los predadores y las condiciones adversas del medio en un período en el que necesita estar inmóvil y por lo tanto, es mucho más vulnerable. En la sección de Resultados se estudió en forma detallada el proceso de pupariación en la mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata*.

La formación del pupario comprende varias etapas diferentes (Zdarek y Fraenkel, 1972); primero, la larva de tercer estadio retrae los tres primeros segmentos del cuerpo que contienen a los ganchos bucales. Luego, la larva se acorta y ensancha, adoptando forma de barril; en este momento, la cutícula no es lisa sino que está plegada debido al acortamiento del cuerpo de la larva (ver sección de Resultados). Más tarde, la cutícula se vuelve gradualmente lisa, llegándose a la etapa en que se encuentra totalmente estirada. Este momento en la literatura es habitualmente denominado "pupario blanco" (Zdarek, 1985) y en muchos casos, en forma errónea se lo denomina "pupa blanca". Poco después de este estadio, comienza la esclerotización del pupario, la cual se evidencia por el aumento de rigidez cuticular y la adquisición gradual de la típica coloración marrón-rojiza. El proceso de pupariación como un todo, y los eventos particulares que lo conforman, están regulados hormonalmente a distintos niveles. Diferentes tipos de evidencias demuestran que la ecdisona dispara el programa general de pupariación (Berreur y Fraenkel, 1969; Seligman y col., 1977). Los sub-programas que componen el proceso global de pupariación involucran procesos que son fisiológicamente independientes ya que pueden ser inhibidos por diversas drogas y venenos

en forma selectiva (Zdarek y Fraenkel, 1972). La inyección de tetrodoxina o de veneno de abeja lleva a que el pupario se esclerotice normalmente sin que ocurra la retracción de los tres segmentos anteriores ni la adopción de la forma ovoide (Fig 10-B). La raniiodina y la eserina inhiben selectivamente el encogimiento de la cutícula, por lo cual la mosca forma un pupario con la cutícula plegada (Zdarek y Fraenkel, 1972).(Fig. 10-C). Inyectando un análogo de ecdisona, se forma un pupario normal pero sin la retracción de los los tres segmentos anteriores (Fig 10-D). La inyección de  $\alpha$ -metil- $\alpha$ -hidrazino- $\beta$ -(3,4- dihidroxifenil) monohidrato propiónico -  $\alpha$ -MHD - inhibe la decarboxilación de la DOPA inhibiendo por lo tanto la esclerotización (Bodnaryk, 1970); en este caso, la morfogénesis del pupario se produce normalmente (Zdarek y Fraenkel, 1972).



**Figura 10-** Efecto de diferentes drogas y venenos sobre la pupariación de la mosca de la carne *Sarcophaga bullata*. Panel (A) pupario normal esclerotizado, (B) pre-pupa inyectada con veneno de abeja mostrando un pupario esclerotizado pero con morfología de larva, (C) pre-pupa inyectada con ryanioidina, mostrando un pupario con la típica forma ovoide, la cutícula esclerotizada pero plegada porque no alcanzó a encogerse antes del estadio "pupario blanco", (D) Prepupa inyectada con 2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,14  $\alpha$ -trihidroxi-5 $\beta$ -colests-7-en-6-ona -análogo de la  $\beta$ -OH-ecdisona- mostrando que el pupario se formó sin que ocurriera la retracción de los tres segmentos anteriores.(Tomado de Zdarek y Fraenkel, 1972).

Desde el punto de vista del control endócrino, la inmovilización de la larva previa a la adquisición de la forma ovoide (Fraenkel y col., 1972), la retracción de los tres segmentos anteriores (Seligman y col., 1977) y la tanificación del pupario (Zdarek y Fraenkel, 1969) son inducidos por hormonas peptídicas, presuntamente secretadas por el sistema nervioso (Zdarek y Fraenkel, 1969; Fraenkel y col., 1972; 1977; Sivasubramanian y col., 1974). Se demostró que la retracción de los segmentos anteriores y la tanificación están controlados por factores independientes. El factor que induce la inmovilización de la larva podría ser el mismo que controla la retracción de los segmentos anteriores (Zdarek, 1985). Por otra parte, el encogimiento de la cutícula que conduce al pupario liso estaría controlado directamente por el sistema nervioso a través de los terminales que inervan la epidermis (Sivasubramanian y col., 1974).

Recientemente, se demostró en la mosca Tse-Tse *Glossina morsitans* que el comienzo de la esclerotización del pupario también está controlado por el sistema nervioso central (Zdarek y Denlinger, 1992). Se trata de un control negativo por el cual el cerebro, a través del sistema nervioso periférico, inhibe el comienzo de la esclerotización hasta el momento en el cual la morfogénesis del pupario ha sido completada. En este momento -en el estadio pupario blanco- la inhibición central se anula y la esclerotización comienza. Individuos denervados en la parte posterior del cuerpo comienzan la esclerotización del pupario en dicha región del cuerpo antes que en la parte anterior (Zdarek y Denlinger, 1992).

## 9- La esclerotización de la cutícula de los insectos

### 9.1- Nomenclatura

La esclerotización es el proceso por el cual la cutícula de los insectos aumenta su rigidez, insolubilidad, resistencia a la degradación y, por el que a menudo, se vuelve coloreada. Cuando este aumento de rigidez viene acompañado por la adquisición de una típica coloración marrón-rojiza, se habla de tanificación cuticular. A lo largo de esta Tesis, utilizaremos el término esclerotización para referirnos al aumento de rigidez cuticular y el término tanificación para referirnos a la esclerotización específicamente acompañada por la adquisición del color marrón-rojizo.

El término melanización -formación de melanina- se utiliza cuando la cutícula adquiere color negro lo cual denota la deposición de este pigmento. Esclerotización y melanización no son eventos excluyentes,

puede haber melanización y esclerotización en forma simultánea. Por el contrario, tanificación y melanización sí son excluyentes y, como veremos en la sección de Resultados, la concentración relativa de ciertos metabolitos será determinante para decidir cuál de ambos procesos tendrá lugar.

## 9.2- Bases químicas de la esclerotización

Varias teorías han sido propuestas para explicar los cambios físico-químicos que ocurren en la cutícula durante la esclerotización y todavía hoy en día, existe polémica sobre qué es lo que realmente ocurre a nivel bioquímico. La teoría mas aceptada es la propuesta originalmente por Pryor (1940) quien, trabajando con cucarachas, demostró que las proteínas cuticulares se polimerizan formando uniones covalentes con quinonas de la cutícula. (en la literatura en inglés se usa el término “cross-linking” para referirse al fenómeno de unión covalente entre cadenas polipeptídicas mediado por quinonas que genera la polimerización de las proteínas cuticulares. Se utilizará esta expresión en inglés a lo largo del resto de la tesis). Casi al mismo tiempo que Pryor publicaba sus resultados en un extenso artículo de los *Proceedings of the Royal Society* de Londres, Fraenkel y Rudall (1940), a partir de un estudio en el que utilizaron dos especies de moscas, postularon, en un artículo no menos extenso publicado en la misma revista, que el aumento de rigidez de la cutícula de los insectos se debe a la dramática deshidratación de la cutícula que encontraron que ocurría durante la tanificación. En una nota que estos autores agregaron al final de su artículo después de haber conocido los resultados de Pryor, sostienen que la incorporación de quinonas a la cutícula y su reacción con las proteínas muy posiblemente sea simultáneamente la causa de la deshidratación cuticular que ellos habían descubierto.

Con el correr de los años, la teoría de Pryor fue casi universalmente aceptada y el problema de la deshidratación cuticular fue prácticamente olvidado. Hasta donde tenemos conocimiento, Vincent y Hillerton (1979; Hillerton y Vincent, 1979; Vincent, 1978) fueron los únicos que posteriormente defendieron la idea de que la deshidratación cuticular es la causa última de la esclerotización. Estos autores nunca negaron que la formación de uniones covalentes mediadas por quinonas exista en la cutícula, pero sostienen que la formación de dichas uniones conducen a la pérdida de agua que, en definitiva, es la causa del aumento de la rigidez cuticular.

Sin embargo, hasta donde sabemos, ni éstos ni ningún otro autor se ocuparon posteriormente de demostrar cuál es la causa de la deshidratación

de la cutícula durante la esclerotización. En la sección de Resultados se verá que nosotros obtuvimos datos que aportan a la resolución de este problema.

De cualquier manera, la bioquímica de las quinonas que hacen el cross-linking de proteínas cuticulares, como así también, el metabolismo de estas quinonas y sus precursores, ha sido motivo de estudios exhaustivos por parte de numerosos investigadores (para revisiones, ver Brunet, 1980; Hopkins y Kramer, 1992; Kramer y Hopkins, 1987; Andersen, 1985; 1979; Wright, 1987; Sugumaran, 1988).

Debido a la dificultad para extraer por métodos químicos las sustancias que efectivamente participan del cross-linking de las proteínas cuticulares, los estudios siempre estuvieron basados en los productos obtenidos luego de hidrolizar química o enzimáticamente las cutículas esclerotizadas (Lipke y Georghegan, 1971; Sugumaran y Lipke, 1982; 1983). Estos resultados permitieron inferir que las proteínas están unidas entre sí por uniones C-C entre residuos de tirosina (Grün y Peter, 1984; Sugumaran y col., 1982) y uniones C-N entre residuos lisilos, histidilos y  $\beta$ -alanilos (Hackman y Goldberg, 1977; Sugumaran y Lipke, 1982). Los residuos de cisteína están virtualmente ausentes de la cutícula de los insectos (Hopkins y Kramer, 1992) por lo cual es poco probable que existan uniones C-S. También existen evidencias, aunque indirectas, de uniones C-O (Lipke y col., 1981). En cuanto a las uniones a la quitina, lograron extraerse complejos quitina-proteína de cutículas de insectos, pero la estructura de las uniones químicas no pudo ser determinada (Sugumaran y col., 1982).

La demostración inequívoca de que el cross-linking mediado por quinonas verdaderamente ocurre estuvo dada por los estudios de Resonancia Magnética Nuclear de Estado Sólido sobre muestras de cutícula esclerotizada de insectos (Schaefer y col., 1987). Estos estudios revelaron que aproximadamente dos tercios de las uniones en las que participan los nitrógenos de las histidinas involucran a los carbonos fenólicos de las quinonas y aproximadamente un tercio de ellos al carbono  $\beta$  de las quinonas (Fig. 11) (Schaefer y col., 1987).

Experimentos de cross-linking *in vitro* usando proteínas cuticulares de *Manduca sexta* permitieron demostrar la formación de multímeros de estas proteínas mediada por precursores de las quinonas cuticulares y catalizada por di-fenoloxidasas de distinto origen (Grün y Peter, 1984).

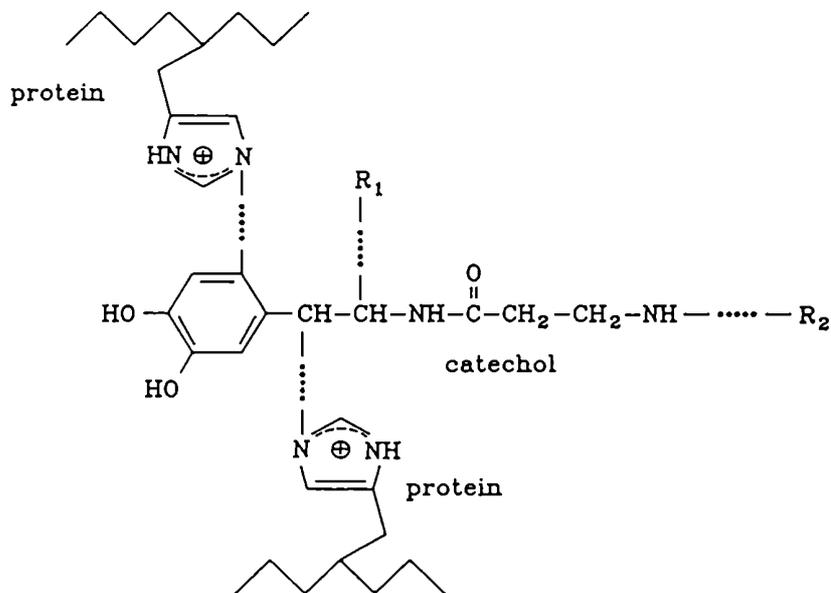


Figura 11- Sitios de cross-linking en la cutícula esclerotizada de *Manduca sexta*, deducidos a partir de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Estado Sólido. El precursor de esclerotización de la figura es N-β-alanildopamina. Las estructuras de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> no fueron identificadas. (Tomado de Hopkins y Kramer, 1992).

### 9.3- Metabolismo de los agentes esclerotizantes

Los precursores solubles de las quinonas que actúan como agentes esclerotizantes son ciertas catecolaminas N-aciladas. Existe amplio consenso de que, entre estas moléculas derivadas de la dopamina, las más importantes son la N-acetildopamina (NADA) (Karlson y Sekeris, 1962) y la N-β-alanildopamina (NBAD) (Hopkins y col., 1982). Mientras que la NADA parece estar asociada con la esclerotización incolora, la NBAD parece ser el precursor principal de la tanificación cuticular de los insectos (ver Fig. 12) (Hopkins y Kramer, 1992; Andersen, 1985).

No está claro en qué tejido se sintetizan las principales catecolaminas involucradas en la esclerotización. Existen datos de que, al menos algunas, se sintetizan en la epidermis (Hirsh, 1989; Maranda y Hodgetts, 1977; Krueger y col., 1989).

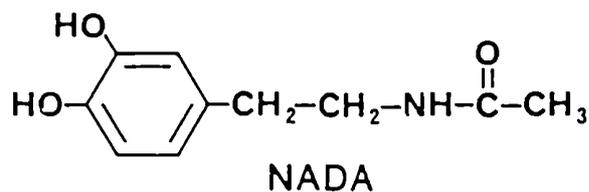
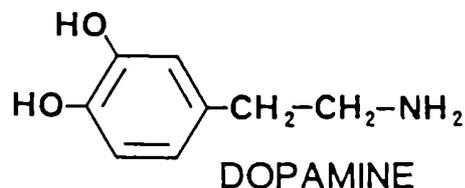
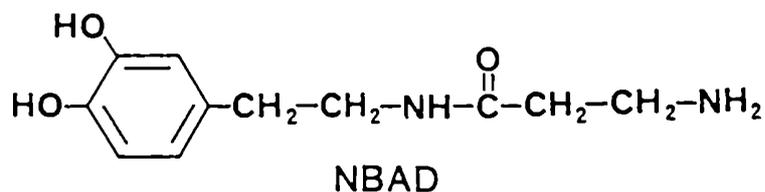


Figura 12- Estructura química de la dopamina, la N-acetildopamina (NADA) y la N-β-alanildopamina (NBAD), principales precursores de los agentes esclerotizantes de la cutícula de los insectos.



A pesar de ello, la concentración de catecolaminas en la hemolinfa los insectos estudiados es también muy alta. En este compartimento, las catecolaminas no se encuentran libres sino que están en forma de conjugados (Kramer y Hopkins, 1987). De este modo, la disponibilidad de sustrato para la esclerotización estaría dada por la hidrólisis de estos conjugados (Hopkins y Kramer, 1992). La dopamina, la NBAD y la NADA fueron encontradas como glucósidos en la hemolinfa de *Manduca sexta* (Hopkins y col, 1982; 1984). En esta especie, el metabolismo de los glucósidos está controlado hormonalmente; la 20-OH-ecdisona induce a la enzima que los hidroliza en el cuerpo graso (Ahmed y col., 1983). Por otra parte, la hormona juvenil actuaría como efector negativo de la tirosina glucosil sintetasa (Ahmed y col., 1983). Por lo tanto, la regulación de los niveles de sustrato para la esclerotización a través del metabolismo

de los conjugados parece tener gran importancia como mecanismo de control del proceso de esclerotización.

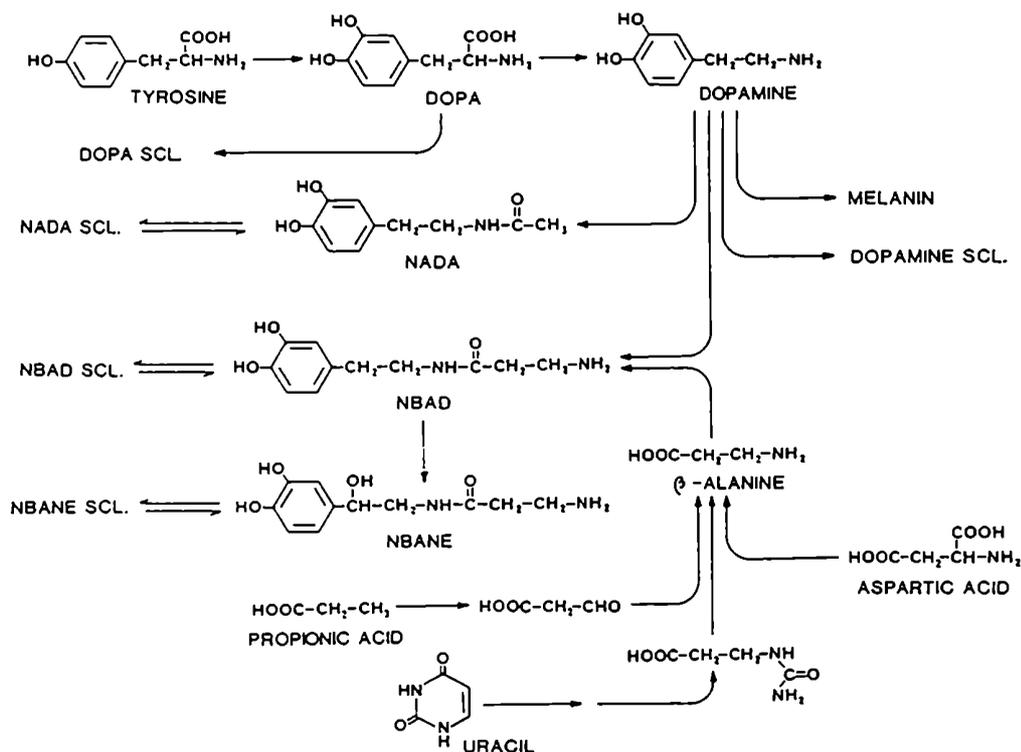
#### 9.4- Biosíntesis de catecolaminas

La biosíntesis de las catecolaminas precursoras de los agentes que esclerotizan la cutícula involucra tres pasos catalizados enzimáticamente: la hidroxilación de la tirosina para dar DOPA, la decarboxilación de la DOPA para dar dopamina y la acilación de la dopamina con acetato o con  $\beta$ -alanina para dar N-acetildopamina (NADA) o N- $\beta$ -alanildopamina respectivamente (ver Fig. 13). La dopamina, por otra parte, puede entrar en una vía alternativa que involucra su oxidación seguida de una serie de reacciones de polimerización que conducen a la síntesis del pigmento melanina (ver Fig. 13) (Ujvary y col., 1987).

La primera reacción de la vía de síntesis de catecolaminas es la hidroxilación de la tirosina para dar DOPA. La enzima que cataliza esta reacción en insectos es la tirosina hidroxilasa (Neckmeyer y Quinn, 1989). El gen que codifica para esta enzima fue aislado de *Drosophila* por homología de secuencias con la enzima de rata y su ubicación en el genoma de la mosca coincidió con la de un gen llamado *pale* que afecta la tanificación de la cutícula (Neckmeyer y Quinn, 1989). Se sabe además, que enzimas con actividad de di-fenoloxidasas también catalizan la hidroxilación de la tirosina (Aso y col., 1985; Morgan y col., 1990). Existen evidencias de que estas enzimas están presentes en la epidermis (Mitsui y col., 1976), pero sin embargo se sabe que en la hemolinfa y en otros tejidos, también se sintetizaría DOPA a partir de tirosina (Kramer y Hopkins, 1987).

La decarboxilación de la DOPA es la segunda reacción de la vía. En los estadios en los que existen altos niveles de síntesis de DOPA, se registró también alta actividad de DOPA decarboxilasa. Por ese motivo, no es habitual que este aminoácido di-hidroxilado se acumule en el insecto (Hopkins y Kramer, 1992). La DOPA decarboxilasa es, sin lugar a dudas, la enzima más estudiada de las que participan del metabolismo de las catecolaminas (Clark y col., 1978; Fragoulis y Sekeris, 1975; Scholnick y col., 1983; Hirsh, 1989). En la epidermis, su expresión está regulada a nivel transcripcional por 20-OH-ecdisona y hormona juvenil (Wirtz y Hopkins, 1977; Hopkins y Wirtz, 1976; Hiruma y Riddiford, 1986; 1990). El tercer paso en la síntesis de catecolaminas de insectos es la acilación de la dopamina ya sea con acetato o con  $\beta$ -alanina. La enzima que sintetiza NADA, la N-acetiltransferasa, fue caracterizada con bastante detalle

(Maranda y Hodgetts, 1977; Marsh y Wright, 1980; Shampengtong y col., 1987). Por el contrario, la NBAD sintetasa hasta el momento fue ensayada sólo *in vivo* y en sistemas de cultivo de tejidos, pero nunca en un sistema libre de células (Krueger y col., 1989; 1990). Por lo tanto, es muy poco lo que se sabe sobre las características y requerimientos de esta enzima clave en la síntesis del principal precursor para la tanificación de la cutícula de los insectos. Como se verá en la sección de Resultados, nosotros hicimos aportes significativos en este sentido.



**Figura 13-** Vías metabólicas hipotéticas de la biosíntesis de catecolaminas en insectos NADA, N-acetildopamina; NBAD, N-β-alanildopamina; NBANE, N-β-alanilnorepinefrina; SCL, esclerotizada (tomado de Ujvary y col., 1987).

Las reacciones que conducen a la síntesis de melanina en insectos son muy similares a las descritas en vertebrados (Fig. 14)(Kramer y col., 1983; Aso y col., 1984; Hori y col., 1984): La síntesis comienza con la oxidación de la dopamina catalizada por di-fenoloxidasas para dar la orto-quinona correspondiente. Luego, continúa con una ciclización espontánea para dar el leucoaminocromo, el cual se vuelve a ser oxidado por di-fenoloxidasas para dar para-quinona iminas. El paso siguiente es la conversión DOPA quinona imina para dar 5,6-dihidroxi-indol. Esta reacción está catalizada por el factor de conversión de DOPA quinona imina, enzima que fue parcialmente purificada y caracterizada en *Manduca sexta* (Fig 14)(Aso y col., 1984).

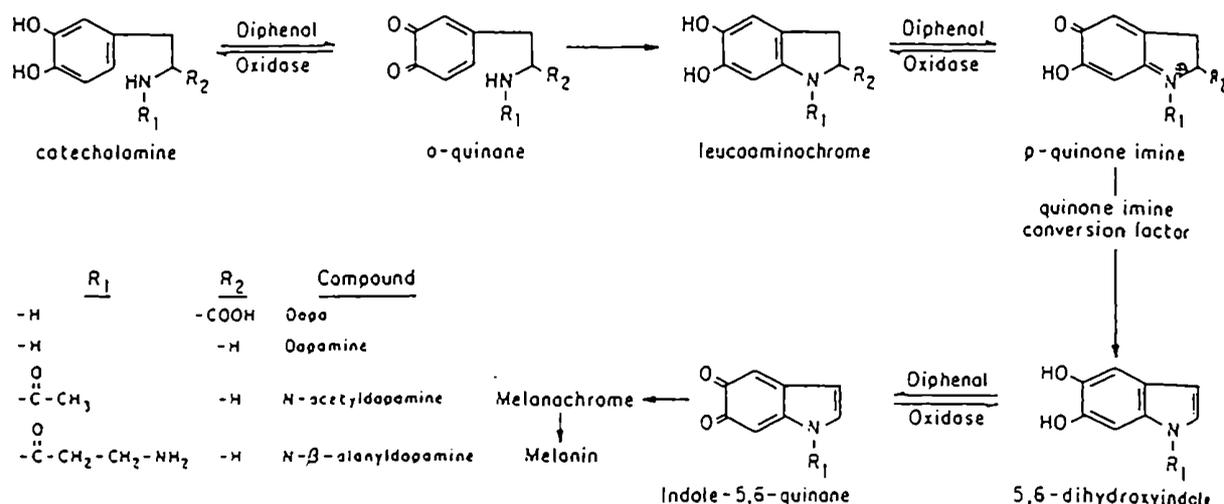


Figura 14- Biosíntesis de melanina en insectos (tomado de Aso y col., 1984).

### 9.5- Derivatización de las catecolaminas

Una vez que las catecolaminas se han sintetizado, éstas deben ser exportadas desde o a través de la epidermis hacia la cutícula donde posteriormente son transformadas en moléculas de mucha reactividad con grupos funcionales de las proteínas generando, de este modo, el cross-

linking. Muy poco se sabe sobre los mecanismos de exportación de catecolaminas a la cutícula (Koepe y Mills, 1972; Koepe y Gilbert, 1974); como se verá en la sección de Resultados, en esta Tesis se describe el primer mutante de insectos con un defecto en la maquinaria de exportación de catecolaminas a la cutícula.

Las transformaciones que sufren las catecolaminas una vez exportadas a la cutícula, fueron y siguen siendo motivo de debate (Brunet, 1980; Hopkins y Kramer, 1992; Sugumaran, 1988).

Inicialmente, se plantearon dos mecanismos posibles que conducen al cross-linking de las proteínas cuticulares por medio de moléculas derivadas de las catecolaminas. Estos dos mecanismos propuestos fueron la esclerotización mediada por el anillo quinónico y la  $\beta$ -esclerotización mediada por dehidro-quinonas (Andersen, 1974)(ver Fig. 15).

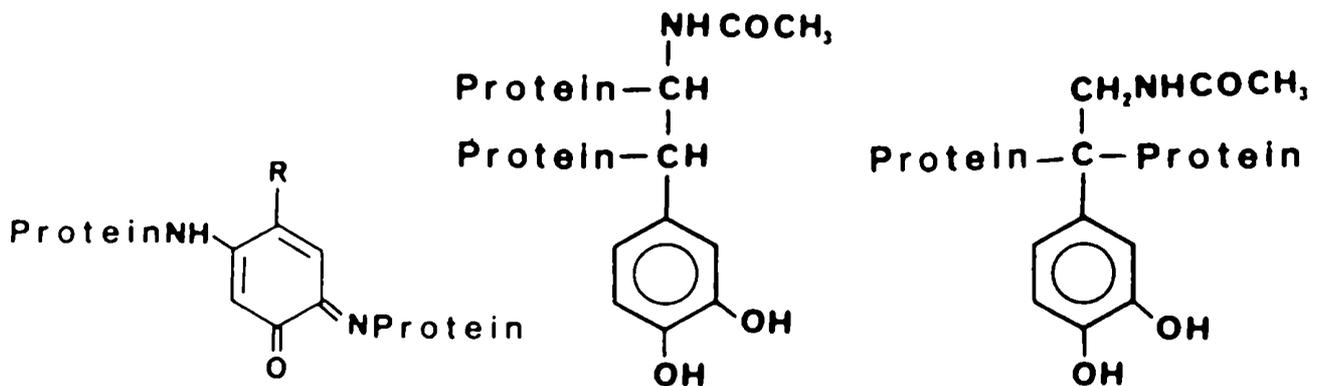
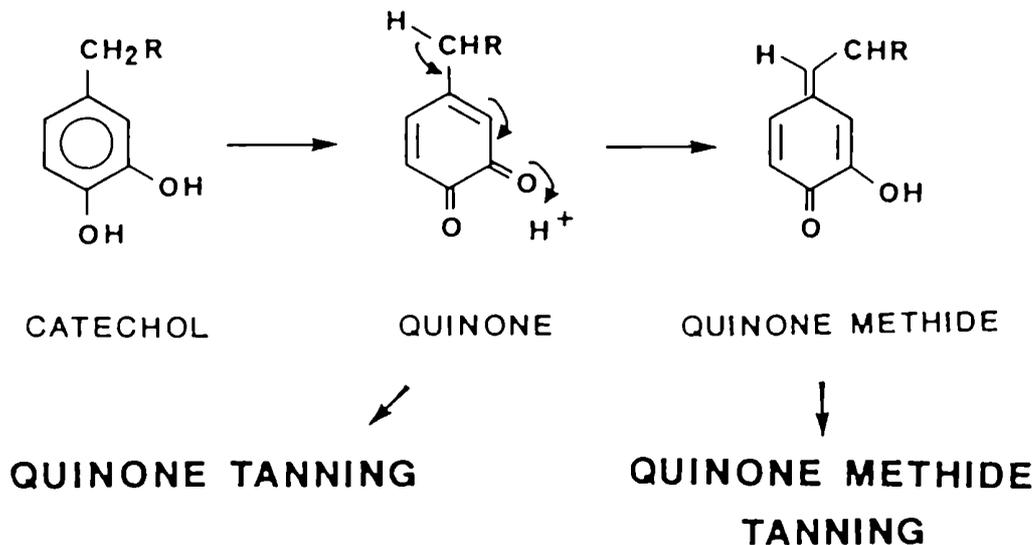


Figura 15- Estructuras resultantes luego de la esclerotización de las proteínas cuticulares mediada por quinonas. Izquierda, proteínas unidas al anillo fenólico; centro, proteínas unidas a los carbonos  $\alpha$  y  $\beta$  del catecol ; derecha, proteínas unidas al carbono  $\alpha$  del catecol (tomado de Sugumaran y Lipke, 1983).

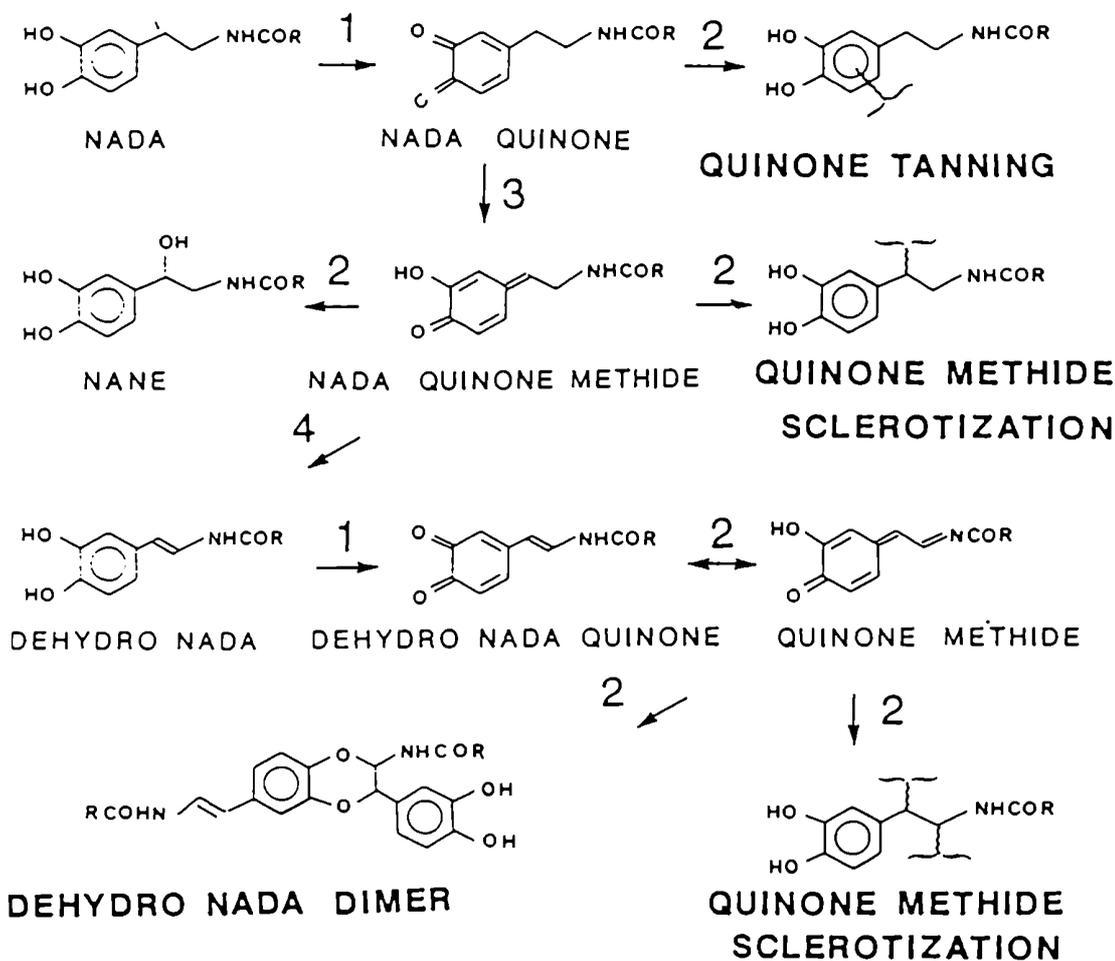
Algunos años mas tarde, Sugumaran (1988) demostró que existe un tercer tipo de derivado presente en la cutícula -los metidos de quinonas- que, por su alta reactividad espontánea (ver Fig.16), pueden mediar el cross-linking de las proteínas cuticulares a través del carbono  $\beta$  de las quinonas.

En los últimos años, los grupos de Sugumaran y Andersen aportaron una abrumadora masa de pruebas que demuestra que existen dos isomerasas cuticulares específicas que interconvierten estas diferentes formas de quinonas entre sí, generando todos los agentes esclerotizantes de alta

quinonas entre sí, generando todos los agentes esclerotizantes de alta reactividad que habían estado en discusión en los últimos años. Por lo tanto, todos estos compuestos existen y se interconvierten unos en otros (Andersen, 1989-A; B; C; Saul y Sugumaran, 1988; 1989-A; B; 1990; Saul y col., 1991; Sugumaran, 1988; Sugumaran y col., 1987; 1988-A; B; 1989-A; B; 1990; 1992; Ricketts y Sugumaran, 1994). En la Figura 17 se muestra este conjunto de reacciones cuticulares que Sugumaran llamó “El mecanismo unificado para la esclerotización de la cutícula de los insectos” el cual todavía genera resistencia entre muchos de los investigadores del área.



**Figura 16-** Dos mecanismos diferentes para la esclerotización de la cutícula de los insectos. Una di-fenoxidasasa oxida las catecolaminas a sus quinonas correspondientes y posteriormente una tautomerasa convierte estas quinonas en metidos de quinonas. Tanto las quinonas, como los metidos de quinona, reaccionan con grupos funcionales de las proteínas cuticulares generando el cross-linking (tomado de Saul y Sugumaran, 1988).



**Figura 17-** "Mecanismo unificado para la esclerotización de la cutícula de los insectos" según Sugumaran. El precursor NADA es oxidado por fenoloxidasas (1) a su correspondiente quinona que participa en la esclerotización mediada por el anillo quinónico (2). La quinona se convierte en metido de quinona por acción de una isomerasa (3); este tipo de moléculas se une a los grupos funcionales de las proteínas a través de su carbono  $\beta$  en una reacción espontánea (2). Una isomerasa específica de metidos de quinonas convierte al metido de quinona en dehidro-NADA (4). El dehidro-NADA es a su vez, oxidado por una di-fenoloxidasa (1) para dar dehidro-NADA quinona, la cual reacciona espontáneamente para dar la llamada  $\alpha$ - $\beta$ -esclerotización inicialmente propuesta por Andersen (1974). El mismo esquema se aplica también para NBAD, el otro agente esclerotizante de importancia de la cutícula de los insectos (tomado de Ricketts y Sugumaran, 1994).

Finalmente, queda por mencionar a las di-fenoloxidasas de la cutícula encargadas de oxidar los diferentes precursores a quinonas. Las di-fenoloxidasas de los insectos fueron motivo de exhaustivos y detallados estudios durante toda la segunda mitad de este siglo y se sabe que intervienen en tres procesos fundamentales de la fisiología del animal. Dos de ellos están relacionados con la cutícula -la esclerotización y la síntesis de melanina- y el tercer proceso es la cicatrización de heridas (Brunet, 1980; Barrett, 1987; Barrett y Andersen, 1981; Thomas y col., 1989; Ritzki y col., 1985; Andersen, 1989-C; Andersen, 1978; Seybold y col., 1975; Mitchell y Weber, 1965; Mitchell, 1966; Pentz y col., 1990).

Existen dos grandes familias de fenoloxidasas: la primera es la de las tirosinasas que son capaces de oxidar monofenoles u orto-difenoles pero no para-di-fenoles; y la segunda familia es la de las lacasas que puede oxidar orto o para-di-fenoles, pero no monofenoles (Andersen, 1985). Existe coincidencia en que las tirosinasas, que son enzimas dependientes de cobre, participarían de los procesos de cicatrización de heridas y en la melanización de la cutícula. Las lacasas también son dependientes de cobre y se diferencian de las tirosinasas porque son inhibibles por monóxido de carbono. Este último grupo de fenoloxidasas se encontraría exclusivamente en la cutícula y participaría en el proceso de esclerotización. Tanto las lacasas como las tirosinasas se encuentran como zimógenos *in vivo* y existe una compleja cascada de activación de dichos zimógenos que es gatillada por diversos estímulos dependiendo del contexto fisiológico en el que actúen (Andersen, 1978; Seybold y col., 1975).

## **10- La cutícula de los invertebrados inferiores: algunas similitudes y diferencias con el exoesqueleto de los insectos**

### *10.1- Composición de la cutícula*

Como se mencionó mas arriba, los invertebrados vermiformes se desplazan merced a los cambios de presión de su endoesqueleto hidrostático. Esto lo logran gracias a la pared del cuerpo formada por músculos circulares y longitudinales y a una cutícula altamente elástica. Desde los asquelmintos, que son pseudocelomados, y por lo tanto, invertebrados sumamente primitivos, hasta los anélidos, que se encuentran entre los ancestros directos de los artrópodos, esta cutícula preponderantemente elástica está compuesta por varias isoformas de colágeno embebidas en una matriz de quitina (Richards, 1984; Bird, 1984).

Se puede, por lo tanto, considerar que, si bien existen diferencias fundamentales entre los artrópodos y sus ancestros en cuanto a la composición de las proteínas cuticulares, y en cuanto a la ultraestructura de la cutícula, existe también una coincidencia básica en los componentes cuticulares fundamentales. Tanto la cutícula de los insectos como la de los invertebrados vermiformes está compuesta principalmente por quitina y proteínas.

Este hecho se evidencia en la similitud funcional que presentan los invertebrados inferiores y las larvas ápodas de los dípteros ciclorrafos en cuanto su plan general de organización corporal. En ambos casos, los individuos son vermiformes, ápodos, con endoesqueleto hidrostático y se desplazan merced a los cambios de presión de la hemolinfa por la acción de los músculos de la pared corporal. En ambos casos, las propiedades elásticas de las cutículas son fundamentales para su forma de locomoción y en el plan de organización corporal. En ambos casos, las cutículas blandas y permeables al agua los hace susceptibles a la desecación en ambientes terrestres. En el caso de los invertebrados inferiores la cutícula permeable representa un estadio todavía primitivo en la adaptación de los animales al medio terrestre. Por el contrario, en el caso de las larvas de dípteros representa una adaptación ulterior al rápido aumento de biomasa merced al aprovechamiento de nichos alimentarios constituidos fundamentalmente por medios húmedos en descomposición.

En el estadio adulto, los insectos holometábolos, como así también los insectos hemimetábolos en todos sus estadios, están adaptados al ambiente terrestre debido, en buena parte, a las propiedades de su cutícula esclerotizada. Por lo tanto, la gran conquista del ambiente terrestre por parte de los insectos se debe fundamentalmente a las propiedades del exoesqueleto. Podemos entonces concluir que la diferencia básica entre las propiedades de la cutícula de las larvas de los dípteros y las de los estadios adultos se debe al proceso de esclerotización. La esclerotización es el proceso que la hace impermeable, resistente y le permite actuar como exoesqueleto. El resto de los componentes, si bien no son iguales, son básicamente parecidos. Por lo tanto, la verdadera novedad evolutiva que habría permitido a los artrópodos conquistar el medio terrestre no habría sido la cutícula en sí misma, sino el proceso de esclerotización mediado por quinonas.

¿Existe algún tipo de esclerotización de estructuras proteicas en los invertebrados inferiores? La respuesta es sí. Ciertas estructuras particulares de algunos invertebrados e incluso también de algunos cordados adquieren rigidez y dureza a través de un proceso que puede considerarse una esclerotización primitiva.

## 10.2- La esclerotización fuera del Phylum Arthropoda

Este proceso de esclerotización primitiva consiste en el cross-linking de proteínas mediada, no por catecolaminas o quinonas libres, sino por residuos de DOPA que forman parte de la cadena polipeptídica de las proteínas (Waite, 1977; 1990; Waite y Andersen, 1978; Waite y Rice-Ficht, 1987). Este tipo de esclerotización primitiva reúne los requisitos necesarios para ser una verdadera esclerotización: involucra el cross-linking covalente de proteínas, la presencia de catecoles, la presencia de di-fenoloxidasas que usan al aire como oxidante y la presencia de materiales de relleno ("fillers", según Waite, 1990), como la quitina (en los artrópodos), el colágeno (en el escualo comúnmente llamado pez perro), la celulosa (como en ciertos tunicados), minerales (en las valvas y rádulas de los moluscos) y otros. En la Figura 18, se muestra la distribución filogenética de la esclerotización mediada por quinonas dentro del reino animal.

En protozoarios, encontramos un ejemplo de esclerotización en *Haplosporidium malacobdellae* que produce una especie de barniz que recubre a las esporas (Waite, 1990). En cnidarios -en varias especies de corales- aparecen materiales del tipo de los cementos adhesivos que sufren esclerotización. Entre los platelmintos y los nematodos también existen numerosos casos (Dixon, 1965; Awan y Hominik, 1982). Entre los anélidos, existen numerosos ejemplos de poliquetos como en el cemento de los sabeláridos que forman arrecifes (Jensen y Morse, 1988) y también en las cubiertas de los huevos de las lombrices de tierra y las sanguijuelas (Knight y Hunt, 1974). Entre los cordados, existe esclerotización en las proteínas que participan en la cicatrización de heridas en los tunicados (Dorsett y col., 1987) y por último, en los peces cartilagosos, como las rayas y los tiburones, se la usa como parte constitutiva de la cubierta de los huevos (Koob y Cox, 1988).

Recientemente, se descubrió que en insectos también existen proteínas que contienen DOPA en su cadena polipeptídica. Un caso es el de las proteínas cuticulares de *Manduca sexta* (Okot Kotber y col., 1994) y el segundo caso es el de una proteína inhibidora de di-fenoloxidasas en *Musca domestica* (Daquiang y col., 1995). Aparentemente, en ambos casos, las proteínas se sintetizan inicialmente con residuos de tirosina, los cuales posteriormente son hidroxilados *in situ* para dar lugar a una DOPA-proteína.

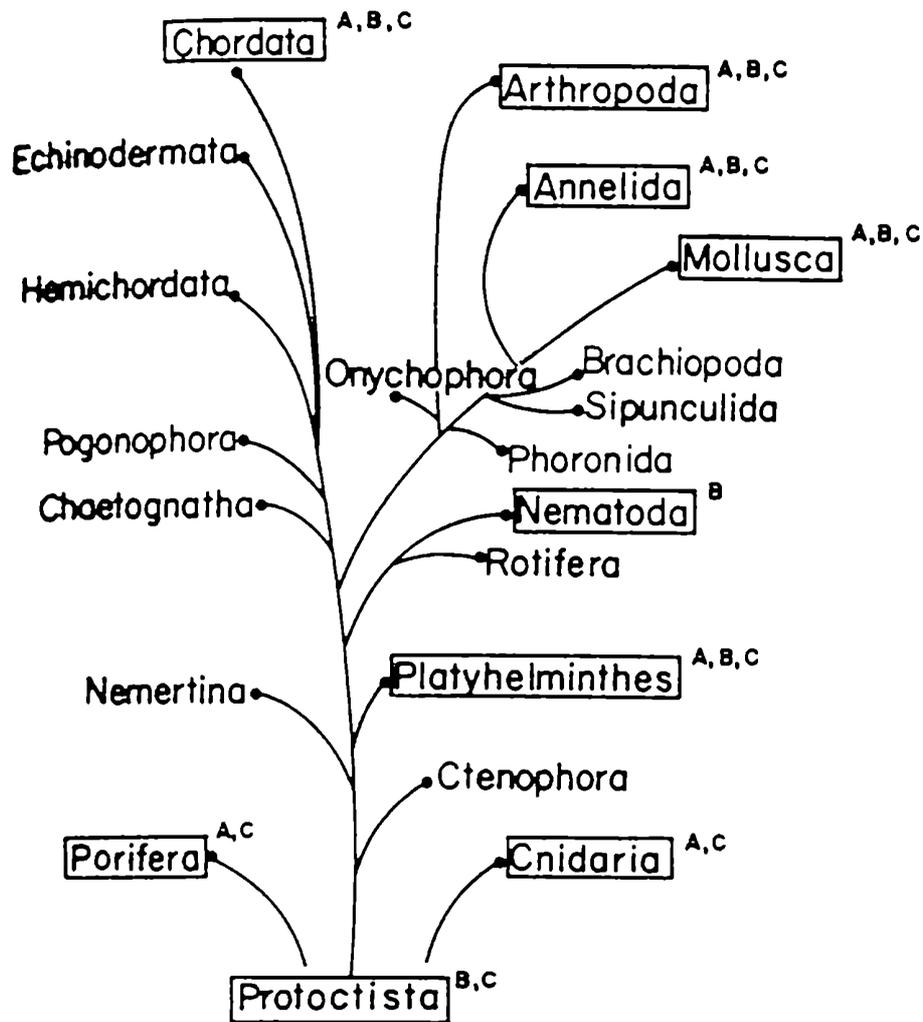


Figura 18- Distribución filogenética de la esclerotización mediada por quinonas en el reino animal. Los phyla recuadrados son los que presentan especies con estructuras esclerotizadas. La discriminación de los grupos se basó en tres criterios: (A) presencia de di-fenoles, (B) presencia de di-fenoloxidasas y (C) presencia de proteínas esclerotizadas (tomado de Waite, 1990).

En el caso de las proteínas cuticulares de *Manduca*, los residuos de DOPA sufrirían modificaciones enzimáticas similares a las de los catecoles libres de insectos y posteriormente participarían en el cross-linking de las proteínas que los contienen. Estudios llevados a cabo por el grupo de Sugumaran permitieron recientemente demostrar que, en efecto, existen las enzimas cuticulares capaces de sintetizar los intermediarios de esclerotización (Fig 17) utilizando como sustrato a los residuos de DOPA presentes en las DOPA-proteínas (Sugumaran y Ricketts, 1995). Los intermediarios que se forman en este caso, serían perfectamente análogos a los que se forman a partir de catecoles libres (Ricketts y Sugumaran, 1994).

### *10.3- ¿Cuál fue entonces la adquisición evolutiva de los artrópodos?*

Con los argumentos presentados, podemos concluir que la esclerotización cuticular no es, en sentido estricto, una adquisición evolutiva de los artrópodos. Parecería mas bien, que estos últimos explotaron a fondo un recurso pre-existente y ampliamente distribuido en el reino animal -la esclerotización- e hicieron de él una de las bases fundamentales de su plan de organización corporal.

Sintetizando, la situación parece haber sido la siguiente: los componentes estructurales básicos de la cutícula -quitina y proteínas- se habrían hallado presentes en los ancestros invertebrados de los artrópodos. La maquinaria enzimática esclerotizante -di-fenoloxidasas e isomerasas- estaría ampliamente distribuida a lo largo de toda la filogenia de los animales y, por lo tanto, también habría estado presente en los ancestros de los artrópodos.

¿Cuál es entonces la adquisición evolutiva fundamental que le permitió a los artrópodos hacer un uso mucho mas amplio de las estructuras cuticulares esclerotizadas?

La respuesta estaría en las catecolaminas libres N-aciladas. La ventaja adaptativa de éstas frente a los catecoles derivados de aminoácidos que forman parte de la cadena polipeptídica de las proteínas es obvia. Mientras que la esclerotización de las DOPA-proteínas sólo puede ser controlada a través de la regulación de las di-fenoloxidasas y otras enzimas cuticulares, el proceso de esclerotización dependiente de catecolaminas libres ofrece otras etapas posibles de control. Estas etapas son: 1) la biosíntesis de las catecolaminas; se sabe que, en insectos, la síntesis de catecolaminas está controlada hormonalmente. 2) La síntesis e hidrólisis de conjugados de

catecolaminas en la hemolinfa, procesos que también se sabe que están controlados hormonalmente. 3) La exportación de catecolaminas a la cutícula a través de la epidermis; nada se sabe sobre este paso obligado en el proceso de la esclerotización (nosotros aportamos datos en este sentido). 4) La regulación de las fenoloxidasas y otras enzimas cuticulares que sintetizan los agentes esclerotizantes.

En síntesis, parecería ser que la aparición de las catecolaminas N-aciladas en la evolución otorgó posibilidades regulatorias y versatilidad al proceso de esclerotización que le habría permitido que este proceso se convirtiese en uno de los pilares básicos del *Bauplan* de los insectos.

Nuestra pregunta inicial sobre el origen de la cutícula de los artrópodos se ha ido acotando hasta quedar finalmente reducida a *¿cómo surgieron las catecolaminas esclerotizantes de la cutícula en la historia evolutiva?*

## **11- Función de las catecolaminas y otras aminas biogénicas como transmisores de información.**

El metabolismo de las catecolaminas y otras aminas biogénicas ha sido exhaustivamente estudiado en vertebrados debido a la función que cumplen estas moléculas como hormonas y neurotransmisores.

Entre ellas, las más importantes son la norepinefrina (o noradrenalina) y la epinefrina (o adrenalina). Estas dos catecolaminas, sintetizadas en la médula de la glándula adrenal, son hormonas de respuesta fisiológica rápida a requerimientos metabólicos urgentes. Ambas tienen efecto estimulador sobre la glucogenólisis y sobre la lipólisis (Grodsky, 1977). Por otra parte, se sabe que la dopamina, la norepinefrina, la octopamina y la serotonina cumplen funciones como neurotransmisores y neuromoduladores en el sistema nervioso central.

En vertebrados, existen sistemas de inactivación de estas aminas que permiten el cese de la señal y la posterior excreción de las moléculas inactivadas, ya sea cuando actúan como hormonas o en su función de neurotransmisores. La inactivación se lleva a cabo por una serie de oxidaciones de la cadena lateral de las aminas y de metilaciones en los grupos fenólicos (ver Fig. 19). Las enzimas involucradas en el proceso son la monoamino-oxidasa para las reacciones de oxidación (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa para las reacciones de metilación (COMT) (Grodsky, 1977). Los niveles de dichas enzimas son particularmente altos en el hígado, donde las hormonas circulantes son normalmente inactivadas. El orden en el que actúan estas dos las enzimas en dicho tejido es variable dependiendo del sistema experimental. En el sistema nervioso central, en

cambio, la inactivación se realiza preponderantemente a través de la MAO, ya que la expresión de la COMT es muy baja.

Como vimos en secciones anteriores, en los insectos, la dopamina y sus formas aciladas cumplen una función fundamental como precursores de agentes esclerotizantes de la cutícula. También se sabe que la dopamina, la norepinefrina, la octopamina y la serotonina se hallan presentes en el sistema nervioso central de los insectos, cumpliendo funciones de neurotransmisores y/o neuromoduladores (Brown y Nestler, 1985; Owen y Bouquillon, 1992; Nagao y Tanimura, 1988; Livingstone y Tempel, 1983; Evans y col., 1980; McFarlane y col., 1990). Se sabe que mutantes de *Drosophila* que hacen termosensible a la enzima DOPA decarboxilasa, necesaria para la síntesis de dopamina y serotonina en el sistema nervioso central, muestran disminuida su capacidad de aprendizaje asociativo en las condiciones de temperatura restrictiva (Tempel y col., 1984; Wright, 1987).

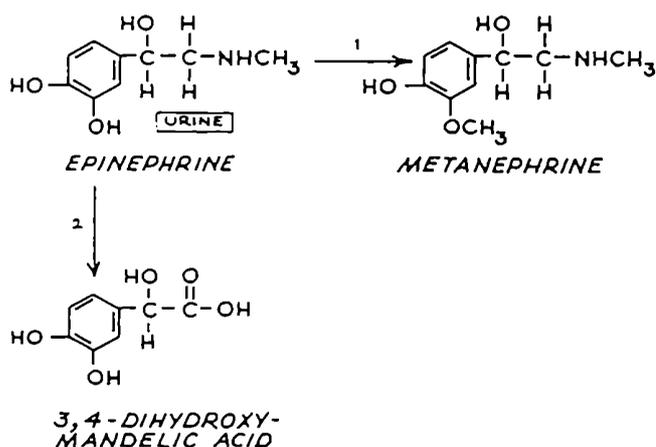


Figura 19- Vías de inactivación de las catecolaminas en los vertebrados. (1), Metilación catalizada por la catecol-O-metiltransferasa (COMT) y (2), oxidación catalizada por la monoamino oxidasa (MAO) (tomado de Grodsky, 1977).

Se sabe que las enzimas inactivantes MAO y COMT están ausentes o expresadas en muy baja cantidad en el sistema nervioso central de los insectos. En general se acepta que la inactivación de estos mensajeros químicos se produce por reacciones de acilación (Brown y Nestler, 1985).

En este sentido, la N-acetiltransferasa fue exhaustivamente estudiada en el sistema nervioso central de diversos insectos (Murdock y Omar, 1981; Martin y col., 1989; Mir y col., 1981). Se sugirió que la N-acetiltransferasa del sistema nervioso es la misma que sintetiza la N-acetildopamina destinada a la esclerotización de la cutícula (Maranda y Hodgetts, 1977). Sin embargo, Evans y colaboradores (1980) demostraron que las actividades enzimáticas en ambos tejidos presentan especificidades diferentes sobre distintos sustratos como dopamina, norepinefrina, octopamina, tiramina y otros. Esto representa una evidencia fuerte de que existirían dos isoformas diferentes de la N-acetiltransferasa que se expresarían respectivamente en la epidermis y en el sistema nervioso central.

Si bien el sistema de inactivación de catecolaminas informacionales en el sistema nervioso central de los vertebrados depende básicamente de la MAO y la COMT, la acetilación catalizada por acetiltransferasas específicas de aril-alquilaminas también existe y es importante en este grupo de animales (Smith, 1990). El sustrato de estas acetiltransferasas no son las catecolaminas, sino otras aminas biogénicas estrechamente emparentadas: los derivados de la triptamina. El ejemplo más importante de esta reacción en los vertebrados es la acetilación de serotonina (5-hidroxi-triptamina). Esta reacción no sólo es importante como modo de inactivación de este mensajero químico del sistema nervioso, sino que también lo es en la vía sintética de la melatonina (ver Fig. 20). Esta hormona secretada por la glándula pineal controla el ciclo reproductivo en la rata (Axelrod y Weissbach, 1961) y su síntesis se regula en forma circadiana y en respuesta al fotoperíodo (Ellison y col., 1972). Precisamente, la regulación circadiana de la síntesis de melatonina está dada por variaciones en la actividad de la serotonina acetiltransferasa (Ellison y col., 1972).

Queda claro entonces, que la acetilación de aminas biogénicas es una reacción enzimática ampliamente utilizada por los seres vivos para sintetizar o inactivar moléculas informacionales en tejidos nerviosos y no nerviosos. Los insectos, además de utilizar la N-acetiltransferasa para este propósito, la utilizan en la epidermis para sintetizar agentes esclerotizantes del exoesqueleto.

Es muy poco lo que se sabe sobre la síntesis en el sistema nervioso del otro precursor principal de la esclerotización de la cutícula de los insectos, la N-β-alanildopamina (NBAD). Krueger y col. (1990), a partir de experimentos en un sistema de cultivo de tejidos, demostraron que esta sustancia se sintetiza en el sistema nervioso de larvas de *Manduca sexta*, en los ganglios abdominales.

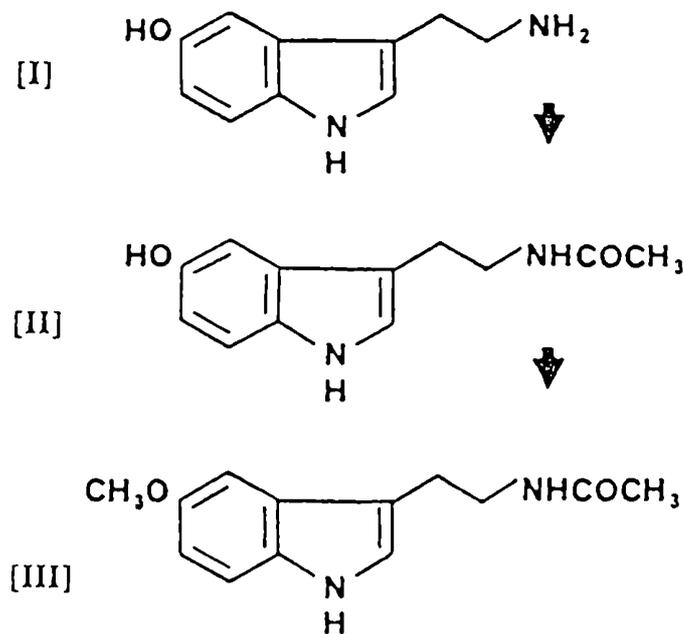


Figura 20- Vía de síntesis de melatonina en vertebrados La serotonina (I) es acetilada por una N-acetiltransferasa para dar N-acetilserotonina (II). Esta sustancia es metilada por la hidroxindol O-metiltransferasa para dar melatonina (III) (Tomado de Smith, 1990).

Una segunda evidencia de que el NBAD podría cumplir un rol en el sistema nervioso central de los insectos está dada por datos genéticos. El mutante *ebony* de *Drosophila melanogaster*, defectivo en NBAD (Jacobs, 1985) y que como consecuencia de ello acumula cantidades anormalmente altas de  $\beta$ -alanina y dopamina (Hodgetts y Konopka, 1973), muestra serias anomalías neurofisiológicas y de comportamiento. Los electroretinogramas de los mutantes homocigotas para este gen son anormales, su fototaxis está reducida (Hotta y Benzer, 1969) y el cortejo de los machos que conduce al apareamiento es poco eficiente (Crossley y Zuill, 1970). No se sabe si estas anomalías en el mutante *ebony* se deben a la falta de NBAD en el cerebro o al exceso de alguno de sus precursores dopamina y  $\beta$ -alanina.

No se sabe si la NBAD cumple alguna función en el tejido nervioso y tampoco se sabe si, *in vivo*, la NBAD sintetasa realmente sintetiza NBAD en dicho tejido. En la sección de Resultados se verá que tenemos datos que indican que, al menos *in vitro*, la NBAD sintetasa no es específica para la dopamina sino que puede utilizar también otras aminas biogénicas como sustrato para sintetizar  $\beta$ -alanilderivados. Sobre la función que podría cumplir dicha sintetasa en el sistema nervioso, existen dos posibilidades que *a priori* deben ser consideradas: la primera es que el  $\beta$ -alanilderivado en cuestión actúe como neurotransmisor o neuromodulador; y la segunda es que sea el producto de la inactivación de la  $\beta$ -alanina y/o la amina biogénica, las cuales sí se sabe que cumplen la funciones de neurotransmisores en insectos. En cualquiera de los casos, la NBAD sintetasa sería una enzima importante en la neurofisiología del insecto, ya sea sintetizando o inactivando moléculas informacionales y en cualquiera de los casos, la disrupción de esta actividad enzimática produce anomalías neurofisiológicas y comportamentales de importancia.

Hasta donde tenemos conocimiento, no existen conjugados de  $\beta$ -alanina con aminas biogénicas en los vertebrados.

Como se ha discutido mas arriba, la cutícula de los invertebrados inferiores carece de catecolaminas libres N-aciladas como NBAD y NADA; por lo tanto, las posibilidades de controlar el proceso de esclerotización son muy restringidas.

A esta altura cabe preguntarse si existen estas catecolaminas N-aciladas en el sistema nervioso central de los invertebrados inferiores. Se sabe que las principales aminas biogénicas, dopamina, norepinefrina, octopamina y serotonina están presentes en el sistema nervioso de virtualmente todos los grupos de invertebrados, tanto protostomados como deuterostomados (Saavedra y col., 1974; Robertson, 1975). Hasta donde sabemos, no existen referencias sobre la existencia de N-acetildopamina o N- $\beta$ -alanildopamina en invertebrados no-artrópodos.

En síntesis: la N-acetildopamina y la N- $\beta$ -alanildopamina, como agentes esclerotizantes de la cutícula, serían una adquisición evolutiva de los artrópodos. Las enzimas que los sintetizan están presentes tanto en el integumento como en el sistema nervioso central de los insectos. En el sistema nervioso, NADA sería simplemente la forma inactivada de la dopamina; la NBAD sintetasa se sabe que es importante en el sistema nervioso, pero no está claro qué función cumple.

Por otra parte, se sabe que la N-acetiltransferasa está ampliamente distribuida entre los vertebrados cumpliendo funciones de inactivación de aminas biogénicas informacionales y participando en la síntesis de la

melatonina. En invertebrados inferiores, si bien las principales aminas biogénicas están presentes en el sistema nervioso de los diferentes grupos, no han sido encontradas ni NADA ni NBAD.

## 12- Nuestra hipótesis general de trabajo

Como se señaló mas arriba, el objetivo último del trabajo ha sido **determinar cuáles fueron los mecanismos moleculares que condujeron a la aparición de la maquinaria de esclerotización de la cutícula de los artrópodos durante la evolución de los invertebrados.**

**La hipótesis general es que una maquinaria pre-existente (para la síntesis de moléculas informacionales) se utilizó para una función completamente distinta (la síntesis de moléculas estructurales) ampliando enormemente las posibilidades de expansión del phylum.**

Las premisas sobre las cuales se basó nuestra hipótesis son las siguientes:

- 1] Las reacciones de N-acilación de la dopamina para dar N-acetildopamina y N- $\beta$ -alanildopamina representan una adquisición clave para el surgimiento de la maquinaria esclerotizante de la cutícula de los artrópodos. De esta adquisición, depende buena parte de la adecuación biológica del phylum.
- 2] La expresión en el sistema nervioso de las enzimas que catalizan estas reacciones de acilación sería evolutivamente mas primitiva que su expresión en la epidermis.
- 3] Un cambio en la especificidad temporal y espacial de expresión habría conducido a que estas enzimas se expresaran en la epidermis bajo el control del sistema endócrino. Esto último es un requisito esencial para que el proceso de esclerotización esté sincronizado con el resto de la muda.

**Por lo tanto, nuestra hipótesis sobre el modo en que se desarrollaron los acontecimientos evolutivos podría enunciarse del modo siguiente:**

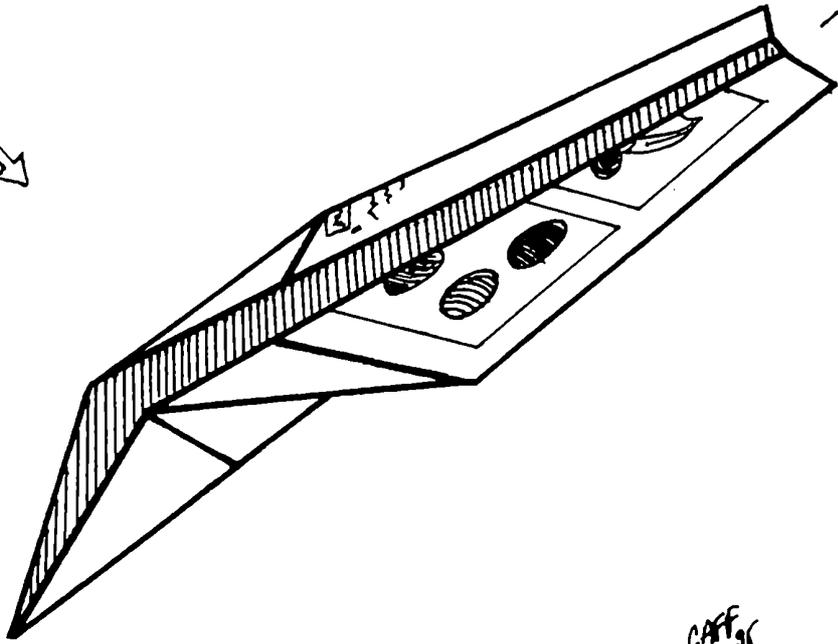
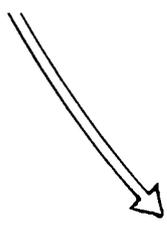
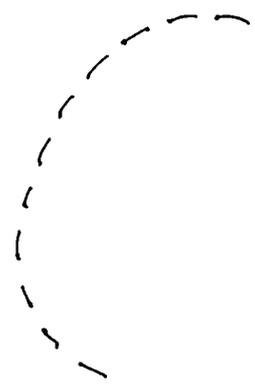
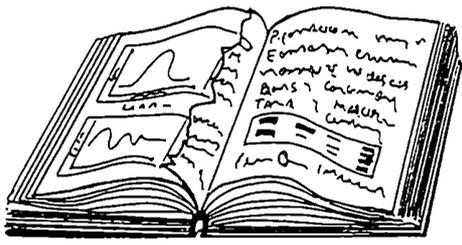
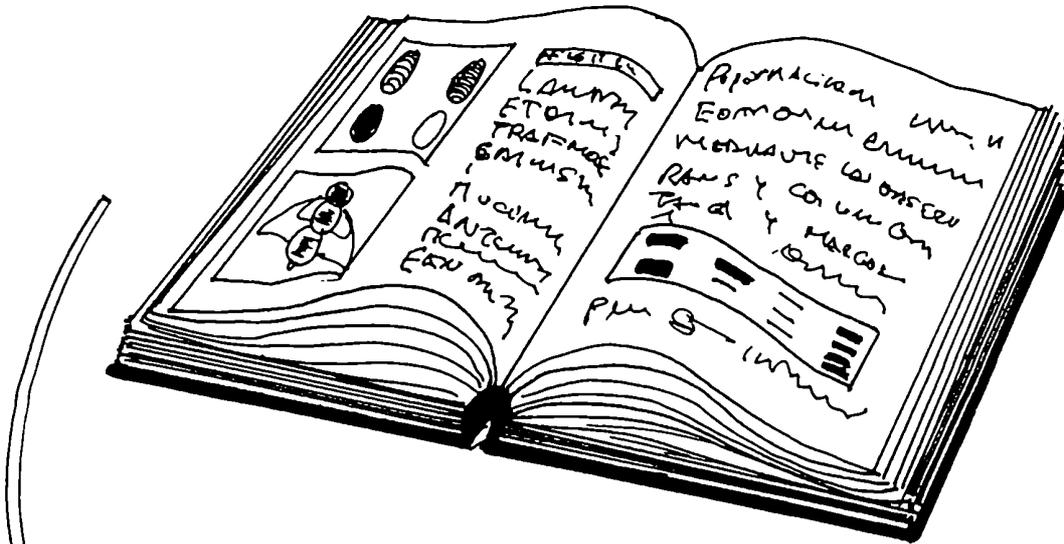
**Las enzimas que sintetizan NADA y NBAD existían en el sistema nervioso central de los ancestros de los artrópodos; mutaciones que afectaron a la especificidad de expresión de estas enzimas permitió que ellas comenzaran a expresarse en la epidermis bajo el control del sistema endócrino que regula el proceso de muda. Este cambio en la especificidad de expresión habría conducido a la adquisición de la maquinaria esclerotizante por parte de los artrópodos primitivos.**

De las dos enzimas que catalizan la acilación de la dopamina, elegimos como modelo a la N-β-alanildopamina sintetasa. Un motivo es que la NBAD es el catecol que se asocia con la esclerotización coloreada que conduce a la típica cutícula marrón-rojiza de los insectos. El otro motivo es que esta enzima nunca fue medida antes en un sistema libre de células y por lo tanto, permanecía sin ser caracterizada. Toda información que pudiera obtenerse sobre ella resultaba altamente novedosa.

Como se señaló mas arriba, los resultados alcanzados en esta Tesis constituyen sólo las etapas previas para poder atacar de lleno el problema.

---

**Figura 21-** Cambio de la función de maquinarias o estructuras durante el proceso evolutivo. Un elemento pre-existente usado para transmitir información es cambiado de contexto y reutilizado para cumplir una función estructural. (Ver lámina en la próxima página).



CARF 96

## II- Nuestro modelo experimental: la mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata* (Wied.)

Como modelo de esclerotización cuticular, se utilizó el pupario de la mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata*. En los últimos años, hemos ido adquiriendo en el laboratorio un amplio conocimiento de los eventos morfológicos y bioquímicos que se suceden durante la metamorfosis de la especie y además, contábamos con una batería de mutantes que afectan específicamente a la esclerotización de la cutícula de diferente manera y a lo largo de los diversos estadios del ciclo de vida de la mosca. La mayoría de estos mutantes fueron generados en el Instituto de Genética del INTA de Castelar por el grupo de la Dra. Fanny Manso y caracterizados genéticamente por este tesista en su Seminario de Licenciatura.

### 13- La especie

La mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata* es un díptero ciclorrafo perteneciente a la familia de los tefrítidos. El adulto tiene unos 5 mm de largo y alas en delta con zonas de color naranja, gris, negro y pardo (ver Fig. 22). Los dos sexos de *Ceratitis capitata* son relativamente buenos voladores pudiendo dispersarse con facilidad en un radio de unos 2,5 Km. Se cree que la especie es originaria del continente africano y que durante los últimos siglos, se dispersó por toda la zona del Mediterráneo (Quesada-Allué y col., 1994).

*Ceratitis capitata* es una de las mayores plagas a nivel mundial de frutas y hortalizas, por lo cual provoca importantes pérdidas económicas (Saul, 1986). A pesar de ello, existen relativamente pocos estudios sobre la biología de su desarrollo (Christenson y Foote, 1960; Chrysantis y col., 1981; Rhum y Calkins, 1981; Shoukry y Hafez, 1979). Hasta antes de los aportes hechos por nuestro laboratorio en el área, no existía una descripción detallada de los cambios bioquímicos y morfológicos que se suceden durante la metamorfosis.

Tanto en el campo como en el laboratorio, la larva de tercer estadio emerge del alimento y salta hasta alcanzar un sustrato seco. Luego, dos programas de desarrollo parcialmente superpuestos -pupariación y pupación- son disparados por estímulos hormonales y expresados por las células epidérmicas dando lugar a la metamorfosis.

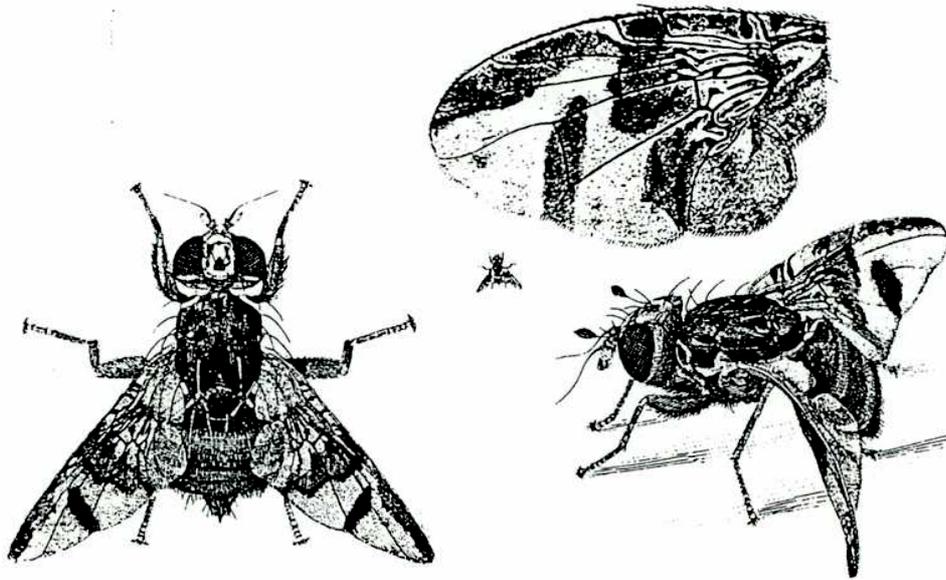


Figura 22- Morfología del imago de *Ceratitidis capitata*. Izquierda: hembra mostrando el ovipositor triangular con el que perfora la cubierta de las frutas. Derecha: Macho, mostrando las cerdas fronto-orbitales modificadas como paletas.

#### 14- El ciclo de vida de *Ceratitidis capitata*

La epidermis de los dípteros es un excelente modelo para estudiar la regulación de la expresión génica en sistemas eucariontes. Este tejido responde a las variaciones en los tenores de 20-OH-ecdisona y hormona juvenil, activando así diferentes programas de desarrollo. A nivel molecular, los llamados programas de desarrollo son secuencias sincronizadas de expresión génica interrelacionadas y ordenadas en un contexto funcional.

Con el objeto de comprender los mecanismos bioquímicos y moleculares que intervienen en los diferentes programas de desarrollo, durante los últimos años, hemos venido estudiando en nuestro laboratorio los eventos morfológicos y bioquímicos que jalonan el proceso de metamorfosis de la mosca del Mediterráneo *Ceratitidis capitata* (Rabossi y col., 1991; 1992.;

1994; Rabossi, 1991; Boccaccio y Quesada-Allué, 1989; 1994; Boccaccio, 1991; Quesada-Allué y col., 1995).

Las distintas etapas del ciclo de vida de la mosca del Mediterráneo están esquematizadas en la Figura 23. Inicialmente, las hembras insertan los huevos dentro de la fruta valiéndose de un robusto ovipositor (Fig, 22, izquierda). En el interior de la fruta, se produce todo el desarrollo embrionario, como así también los tres estadios larvales. Los estadios pre-pupal, pupal y el de adulto transcurren fuera de la fruta.

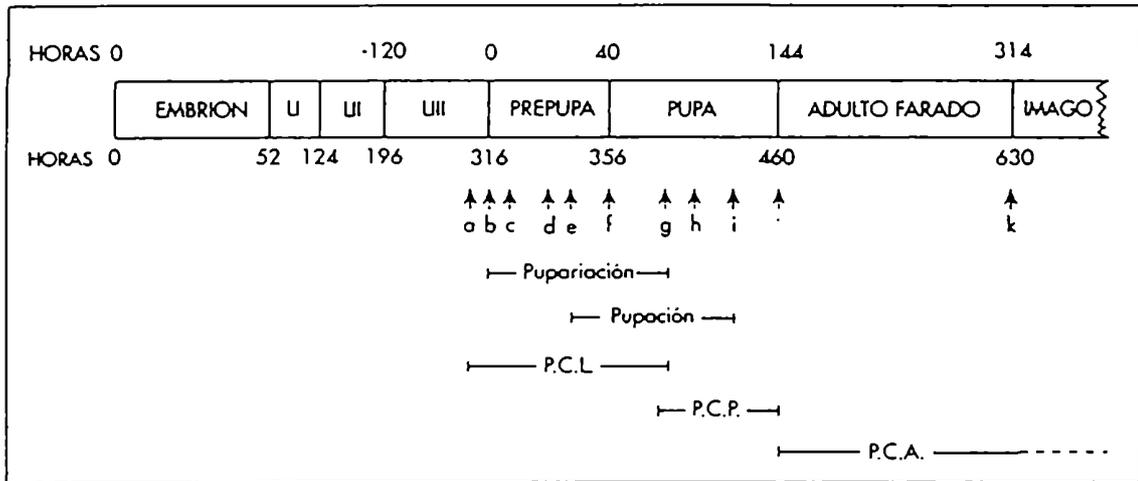
Según el criterio de nuestro laboratorio, cada muda comienza con la apóllisis (separación de la epidermis de la vieja cutícula) y termina con la ecdisis (rotura y desprendimiento de la vieja cutícula) cuando ésta existe (Rabossi y col., 1994). Siempre según nuestro criterio, cada uno de los estadios empieza con la deposición de la correspondiente nueva cutícula (Rabossi y col., 1991; 1992).

Al igual que en otros dípteros ciclorrafos, en *Ceratitis capitata* existen tres estadios larvales en los que el insecto va aumentando de peso y de tamaño merced a las sucesivas mudas. Al completar el tercer estadio, la larva salta del alimento buscando un sustrato apropiado para iniciar la pupariación. El comportamiento pre-puparial y el proceso de pupariación de *Ceratitis capitata* se describen en detalle en la sección de Resultados.

Dentro del pupario transcurre el resto del proceso de metamorfosis; es decir, los estadios prepupal, pupal y de adulto farado. De este modo, el adulto farado se encuentra rodeado por tres envolturas cuticulares; de adentro hacia afuera, la primera es la propia cutícula del adulto; la segunda es la cutícula pupal y la tercera es la vieja cutícula larval convertida en pupario.

Hemos definido el comienzo del estadio pre-pupal en el momento en que se inicia el proceso de pupariación y su finalización cuando comienza la deposición de la cutícula pupal; este evento determina el comienzo del estadio pupal. A nuestro criterio, dicho estadio finaliza cuando se secreta y deposita la cutícula del adulto farado. De este modo, el estadio adulto está dividido en dos períodos, el primero de ellos -el de adulto farado- transcurre en el interior del pupario, mientras que el segundo -el de adulto exarado- comienza después de la ecdisis imaginal, y transcurre enteramente fuera del pupario. En este estadio, la especie se reproduce y se dispersa.

Encontramos que el ciclo de vida de *Ceratitis capitata* tiene una duración total de 25 días a 23°C desde la ovipuesta hasta la emergencia del imago (desarrollo embrionario: 52 hs; etapa larval: 264 hs; etapa adentro del pupario: 312 hs)(Rabossi y col., 1992).



- a- salto de larva III del alimento (-8 hs.)
- b- pupario blanco rugoso. Inicio de la pupariación. Inicio del estadio de Prepupa. (0 hs.)
- c- pupario blanco liso.
- d- coloración definitiva del pupario
- e- apólis larval-pupal. Inicio de la pupación
- f- comienzo del estadio Pupal. Pupa criptocefálica.
- g- final de la pupariación. Sólo trazas de las proteínas cuticulares larvales. Se comienza a detectar la PCG-100.
- h- eversión de cabeza y apéndices torácicos. Pupa fanerocefálica.
- i- final de la pupación. Patrón definitivo de PCP. Proporciones definitivas de cabeza, tórax y abdomen.
- j- muda de pupa a adulto farado. Desaparición de PCG-100, cambio en el patrón de proteínas cuticulares.
- k- emergencia del imago.

**Figura 23-** Resumen de los principales eventos macroscópicos y moleculares durante el ciclo de vida de *Ceratitis capitata* a 23°C. P.C.L.=Patrón de proteínas cuticulares larvales; P.C.P.=Patrón de proteínas cuticulares pupales; Patrón de proteínas cuticulares del adulto. (Tomado de Rabossi, 1991).

#### 14.1- El estadio embrionario

El estadio embrionario de *Ceratitis capitata* tiene una duración de 47 horas a 26°C. Como marcadores de las distintas etapas de la embriogénesis se han usado tres marcadores morfológicos: la migración de las células polares como marcador de la embriogénesis temprana; la involución de la cabeza para la embriogénesis media y la esclerotización de las piezas bucales para la etapa tardía (Cladera y Manso, 1988). La migración de las células polares desde el espacio vitelino hacia el interior del embrión ocurre alrededor de 7 horas después de la ovipuesta. La involución de la cabeza, rasgo típico de los embriones de los dípteros ciclorrafos, ocurre entre las 17 y las 27 horas posteriores a la ovipuesta. La esclerotización de los ganchos bucales comienza a las 37 horas y progresa a lo largo del resto del estadio embrionario (Cladera y Manso, 1988).

#### 14.2- Los estadios larvales

El cuerpo de las larvas es cilíndrico y ahusado hacia el extremo cefálico. Se distinguen 11 segmentos de aproximadamente igual tamaño, además de la cabeza que es retráctil (ver Fig. 24).

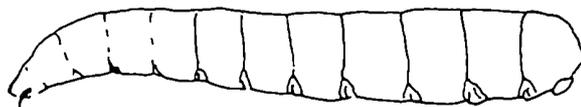


Figura 24- Vista lateral de una larva de tercer estadio de *Ceratitis capitata* (tomado de Quesada-Allué y col., 1994).

La larva de primer estadio es de color blanco-ámbar y tiene una longitud media de alrededor de 1 mm. La larva de segundo estadio es de color amarillento con una longitud de aproximadamente 4 mm. Los espiráculos posteriores están esclerotizados presentando una coloración marrón-rojiza.

La larva de tercer estadio mide entre 7 y 9 mm de longitud. Los espiráculos anteriores son fácilmente visualizables por su coloración marrón-rojiza y presentan de 10 a 14 túbulos pequeños en una hilera irregular.

#### *14.3- El estadio pre-pupal*

Las transformaciones propias de la transición del tercer estadio larval hasta el comienzo del estadio pre-pupal fueron motivo de observaciones detalladas por parte de este tesista, por lo cual se describen en detalle en la sección de Resultados.

Hemos definido el comienzo del estadio en el momento en el que la larva encuentra su posición definitiva en el terreno, se inmoviliza, adopta la típica forma de barril y comienza la esclerotización del pupario; a nuestro criterio, el estadio finaliza con la deposición de las primeras capas de la cutícula pupal unas 36 horas luego del comienzo del estadio (Rabossi y col., 1991; Boccaccio y Quesada-Allué 1989; 1994). Consideramos que el proceso de metamorfosis comienza con el estadio pre-pupal.

No conocemos estudios histológicos realizados durante las 20 primeras horas de la metamorfosis de *Ceratitis*. Durante este período asumimos que comienzan los procesos de histólisis de los órganos larvales y, probablemente, de muerte celular programada de la epidermis larval (Rabossi y Quesada-Allué, manuscrito enviado).

Durante este estadio se ensambla la nueva epidermis pupal, los apéndices y otras estructuras presentes en el adulto a partir de los discos imaginales de la cabeza y del tórax, como así también, a partir de los histoblastos abdominales.

#### *14.4- El proceso de pupación*

El proceso de pupación es el que lleva a la formación de la pupa y nosotros consideramos que se inicia con la apólisis larval-pupal (se separa la cutícula de la epidermis) (Jenkin y Hinton, 1966) y que finaliza con la evaginación de la cabeza y de los discos imaginales torácicos (Ashburner, 1989).

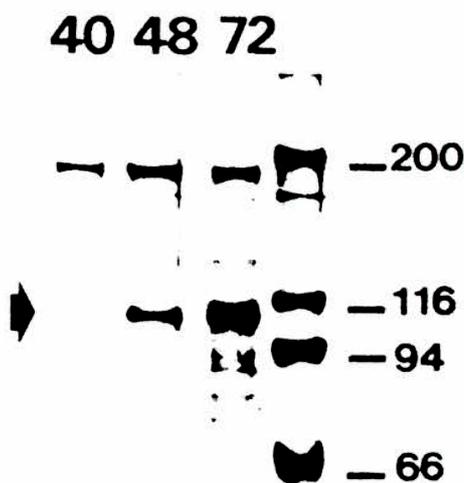
En *Ceratitis capitata* hemos estimado que la apólisis comienza 20,5 horas después del comienzo de la pupariación (Rabossi y col., 1992). Vimos que la eversión de la cabeza y de los miembros comienzan a las 48 horas y dicho proceso finaliza a las 72 horas luego del comienzo de la pupariación

(Rabossi y col., 1994). Asimismo, en nuestro laboratorio se comprobó que en este horario, también se alcanza el patrón definitivo de proteínas cuticulares pupales (Boccaccio, 1991)(ver Fig. 25). Por lo tanto el proceso de pupación comienza a las 20 horas y finaliza a las 72 horas, siempre tomando como referencia el comienzo de la pupariación (ver Fig. 27).

El estudio de las proteínas cuticulares pupales reveló que éstas recién se depositan en cantidad suficiente para ser detectadas por tinción de "Coomasie Blue" a las 46-48 hs luego del inicio de la pupariación, cuando se detecta un polipéptido mayoritario de 100 KDa (Fig. 25). Este polipéptido que se llamó PCG-100 es el principal marcador bioquímico del estadio pupal y representa mas del 85% del total de las proteínas cuticulares pupales (PCP)(Boccaccio y Quesada-Allué, 1989; 1990).

La síntesis de PCG-100 fue estudiada mediante experimentos de radiomarcación *in vivo* con [ $^{35}$ S]metionina y aislada de extractos totales mediante inmunoprecipitación con antisueros anti-PCG-100. Se determinó que la síntesis de este polipéptido se inicia alrededor de las 44 hs luego del comienzo de la pupariación y se deposita sólo 10 minutos después de su síntesis (Boccaccio y Quesada-Allué, 1994).

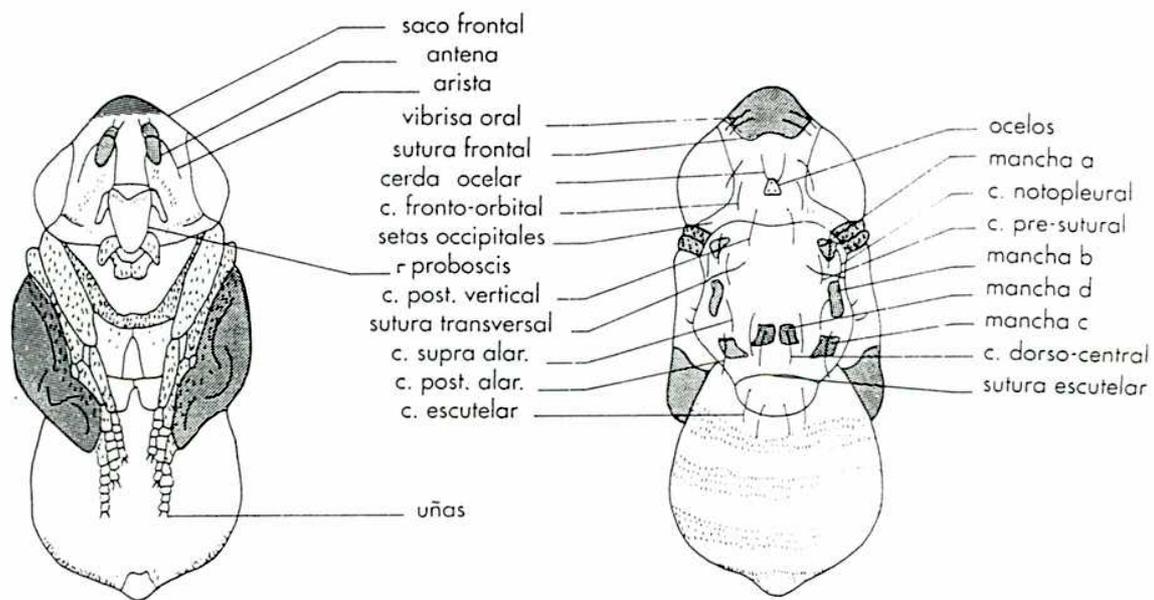
**Figura 25-** Perfil electroforético de las proteínas cuticulares pupales extraídos con SDS 1%; 48 horas luego del inicio de la pupariación se observa la glicoproteína cuticular pupal de 100 KDa (PCG-100) (flecha). Gel de poliacrilamida 7,5% con SDS. Los números 40, 48 y 72 indican las horas transcurridas luego del inicio de la pupariación. Los números de la derecha corresponden a los marcadores de peso molecular. (Tomado de Boccaccio, 1991)



### 14.5- Los estadios pupal y de adulto farado

Durante los estadios pupal y de adulto farado, hemos visto en el laboratorio que se sucede una complicada serie de cambios morfológicos (Rabossi, 1991). Estos cambios consisten en la aparición y pigmentación de diversas estructuras, como así también en cambios de la pigmentación de los ojos (Rabossi y col., 1992).

En la Figura 26 mostramos la anatomía externa del adulto farado de *Ceratitis*, indicando el nombre y ubicación de las estructuras que fueron utilizadas como marcadores. En la Tabla 1, se pueden ver los cambios morfológicos que ocurren durante las diferentes etapas de la metamorfosis.



**Figura 26-** Anatomía externa del adulto farado de *Ceratitis capitata* 12 días después del inicio de la pupariación indicando las estructuras que se tomaron como marcadores (vista dorsal y ventral de la hembra). C= cerda; a,b,c,d= manchas del tórax (publicado en Rabossi y col., 1991).

color de ojos	Ivory	Pale	Yellow	Yellow	Buff	Saturn Red	Grena- dine R	Scarlet	Terra cotta	Adult	Adult
antenas		□	□	□	□	□	□	□	■	■	■
saco frontal		□	□	□	□	□	□	□	■	■	■
uñas			□	□	□	□	□	□	□	■	■
rostro						□	□	□	■	■	■
ocelos						■	■	■	■	■	■
cerdas de la cabeza							□	■	■	■	■
cerdas del tórax							□	■	■	■	■
manchas torácicas								■	■	■	■
color de las alas								■	■	■	■
pelos de las patas								■	■	■	■
pelos del abdomen								■	■	■	■
color de los tergitos									■	■	■

Referencias: ■: coloración definitiva, ■: coloración parcial □: sin coloración, blanco: no se reconoce bajo la lupa.

**Tabla 1-** Aparición y coloración de las principales estructuras estudiadas durante la metamorfosis de *Ceratitis capitata*. Se considera como criterio de aparición al momento en que estas estructuras son reconocibles bajo lupa. (publicado en Rabossi y col., 1994).

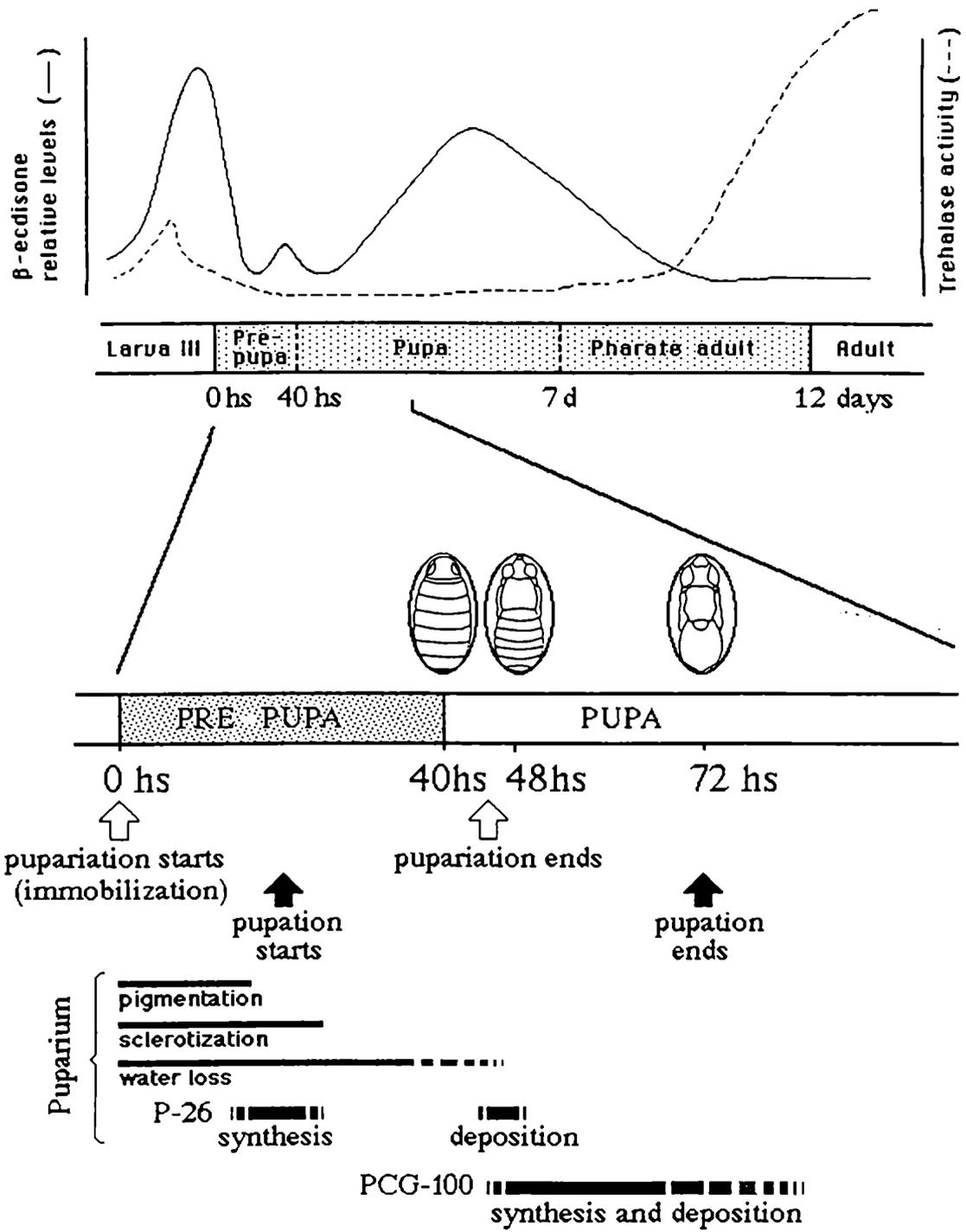
#### 14.6- El proceso de ecdisis

Hemos determinado que 312 horas luego del comienzo de la pupariación finaliza el estadio de adulto farado, al producirse la emergencia del imago. El imago recién emergido presenta las alas plegadas, las cuales se extenderán unos pocos minutos mas tarde. El proceso de oscurecimiento del cuerpo prosigue durante dos o tres horas y en la parte dorsal del torax aparece el dibujo definitivo característico de *Ceratitis capitata* (Quesada Allué y col., 1994).

En la Figura 27, se muestra el esquema integrativo de nuestro laboratorio para las primeras 72 horas de la metamorfosis de *Ceratitis capitata*.

---

**Figura 27-** Esquema integrativo de la metamorfosis de *Ceratitis capitata*. Los niveles de  $\beta$ -OH-ecdisona fueron inferidos de datos de *Drosophila melanogaster* en los mismos estadios del desarrollo. Todo el resto de los datos fueron producidos en nuestro laboratorio. PCG-100: glicoproteína mayoritaria de 100 KDa; P-26: proteína mayoritaria de pupario de 26 KDa (publicado en Quesada-Allué y col., 1994) (ver lámina en la próxima página).



## 15- Mutantes que afectan el proceso de esclerotización de *Ceratitis capitata*

Al igual que para cualquier otro proceso bioquímico, para estudiar los mecanismos moleculares que participan en la esclerotización de los insectos, es de gran utilidad contar con mutaciones que interfieran con los distintos caminos metabólicos que participan del proceso.

En *Ceratitis capitata*, existen una serie de mutaciones que afectan a la esclerotización cuticular. Algunas de ellas son particularmente interesantes y útiles para los estudios bioquímicos, debido al hecho de que no existen mutantes parecidos en *Drosophila melanogaster*.

En las etapas previas a la concreción de esta Tesis, en el Seminario de Licenciatura, el trabajo de este tesista estuvo centrado en la caracterización genética de estos mutantes que afectan a la coloración de la cutícula de *Ceratitis capitata* en diversos estadios de su ciclo de vida (Wappner, 1989).

Las mutaciones estudiadas fueron ubicadas en cuatro genes distintos:

1] *Black pupa*, con tres alelos semidominantes generados por mutagénesis química en el INTA de Castelar y un alelo recesivo aislado de la naturaleza (Rossler y Koltin, 1976) controla el color del pupario. Las mutaciones en este gen confieren color negro al pupario pero no afectan ni a las estructuras cuticulares de la larva ni a las del adulto (Fig. 28-B).

2] *dark dorsal abdomen*, con tres alelos recesivos generados por mutagénesis química en el INTA de Castelar controla la coloración de la cutícula del adulto. Las mutaciones en el gen confieren coloración oscura a la cutícula del adulto, pero no afectan a las estructuras cuticulares de la larva ni al pupario (Fig.28-C).

3] *white pupa*, con un solo alelo recesivo aislado de la naturaleza (Rossler, 1979), controla la coloración del pupario; de modo que cuando está mutado, el pupario resulta incoloro. Tanto las estructuras cuticulares de la larva como las del adulto son normales en estos mutantes (Fig.28-D).

4] *niger*, con un alelo recesivo generado por mutagénesis química en el INTA de Castelar (Manso y Lifschitz, 1979) y otro alelo recesivo generado por irradiación con rayos X en la IAEA (Viena), controla la coloración de las estructuras cuticulares de todos los estadios de *Ceratitis capitata*. Mutaciones en este gen confieren una cutícula mas oscura a lo largo de todo el ciclo de vida. Los espiráculos posteriores de la larva son

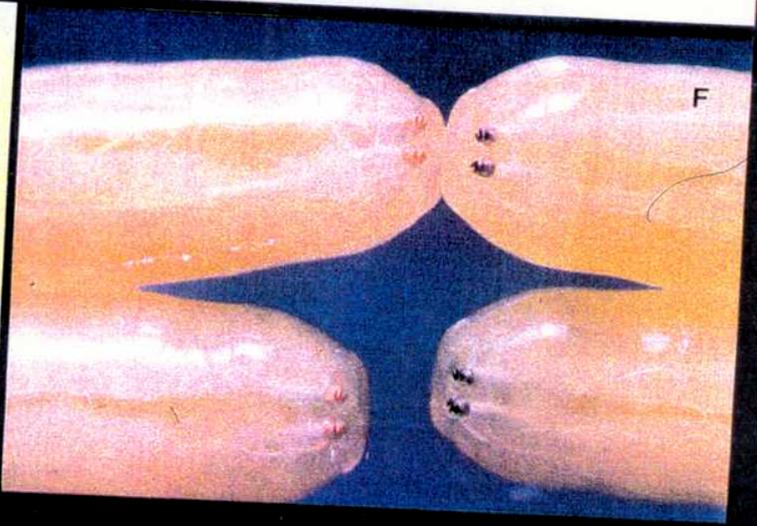
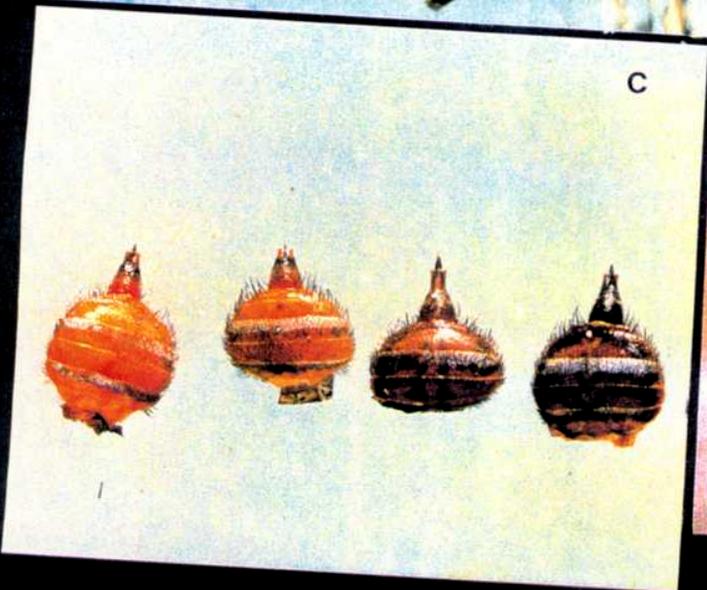
negros (Fig. 28- E), el pupario también es negro y la cutícula del adulto es mucho mas oscura que la del tipo salvaje (Fig. 28-F).

Durante el Seminario de Licenciatura del tesista, además de determinar las relaciones de dominancia y alelismo entre las mutaciones, se pudieron establecer las relaciones de ligamiento entre los genes individualizados. Los genes *niger* y *dark dorsal abdomen* mapean en el mismo cromosoma, mientras que *Black pupa* y *white pupa* están en otros dos grupos de ligamiento diferentes. Aparentemente, el grupo de ligamiento donde mapean *niger* y *dark dorsal abdomen* es el cromosoma 2 y los de *white pupa* y *Black pupa* son respectivamente los cromosomas 5 y 3.

En nuestro laboratorio, los estudios se han centrado sobre las primeras horas de la metamorfosis de *Ceratitis capitata*, en las cuales se produce el proceso de pupariación. Por lo tanto, los estudios sobre el proceso de esclerotización se centraron inicialmente en la caracterización bioquímica y fisiológica de los tres mutantes de *Ceratitis* con anomalías en la esclerotización del pupario.

---

Figura 28- (A) Fenotipo del pupario y del imago de la cepa salvaje; nótese que, en ambos casos, la cutícula es mayormente de color marrón-rojizo. (B) Fenotipo del imago y del pupario del alelo  $B^n$  del mutante *Black pupa*; mientras que el pupario es de color negro, el imago presenta una cutícula normal. (C) Fenotipo cuticular de los diferentes alelos de *dark dorsal abdomen*, en la fotografía se muestran los abdómenes disecados de los distintos mutantes; de izquierda a derecha se ordenan el alelo salvaje y los alelos de *dark dorsal abdomen*, *dda*<sup>79</sup>, *dda*<sup>84</sup> y *dda*<sup>97</sup>. (D) Fenotipo del pupario del mutante *white pupa*; nótese que, comparándolo con el de la cepa salvaje, es casi totalmente incoloro. (E) Fenotipo del pupario y del adulto del mutante *niger* (alelo *nig*<sup>1</sup>); como se puede observar, el pupario es negro y las estructuras cuticulares del adulto son mucho mas oscuras que las del tipo salvaje. (F) Fenotipo de la larva del mutante *niger* (derecha) y del tipo salvaje (izquierda); nótese que los espiráculos posteriores de la larva son mucho mas oscuros que los del tipo salvaje (ver lámina en la página siguiente).



# Materiales y Métodos

## **1- Insectos**

### **1.1- Cepas de *Ceratitis capitata*.**

Como cepa de referencia, se utilizó la cepa salvaje de laboratorio "ARG-17" mantenida por más de 140 generaciones por Manso y Lifschitz en el Instituto de Genética del INTA de Castelar y en nuestro laboratorio desde 1986.

Las moscas fueron criadas en nuestro laboratorio según métodos descritos anteriormente (Terán, 1977; Quesada-Allué y col., 1994) o gentilmente proporcionadas por Fanny Manso del Instituto de Genética del CICA-INTA, Castelar a quien agradecemos. Los mutantes *niger*, *Black pupa* y *white pupa* fueron tomados de la colección del mismo instituto.

### **1.2- Mantenimiento de los imagos**

Los imagos de ambos sexos fueron mantenidos en números no superiores a 60 en frascos de vidrio de 400 ml o no superiores a 300 en frascos de 2750 ml. Las moscas fueron alimentadas con una mezcla de sacarosa-levadura (3:1) y el agua se suministró como gel de agar al 1%. Para los frascos de 400 ml se utilizaron recipientes con agar de 1 ml, que se renovaron 2 veces por semana; para los frascos de 2750 ml, el agar se colocó en recipientes de 25 ml, los cuales fueron renovados 1 vez por semana.

### **1.3- Ovipuesta y recolección de huevos**

Se estima que las hembras vírgenes pueden alcanzar la madurez sexual a partir de las 72 hs (Quesada-Allué y col., 1994). Para la ovipuesta y recolección de huevos, se utilizó el método puesto a punto por F. Manso y E. Lifschitz del INTA-Castelar. En este método se emplean frutas artificiales de plástico coloreado de aprox. 4 cm de diámetro a las cuales se les realizó múltiples perforaciones con una aguja incandescente. Las frutas tienen un orificio de 1,5-2,0 cm de diámetro donde se coloca un corcho que sujeta un pedazo de gomaespuma mojado para mantener el interior de la fruta saturado de humedad. Se hace colgar este dispositivo hacia el interior del frasco, suspendido por un alambre de la boca como se ve en la Fig 29.

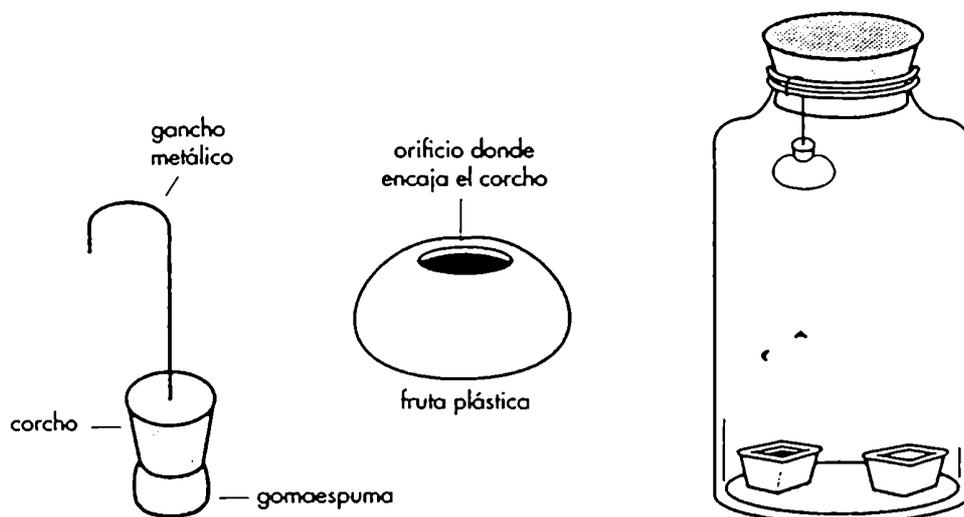


Figura 29- Fruta artificial utilizada para la recolección de huevos de *Ceratitis capitata* (tomado de Quesada-Allué y col., 1994)

Para obtener una sincronización razonable, se tomó un período de ovipuesta de entre 1 y 3 horas y después se retiraron las frutas; para la recolección de huevos, se quitó el corcho y se juntaron los huevos con de 1 ml de agua destilada. La suspensión conteniendo los huevos de *Ceratitis* se filtró con papel de filtro. Después del filtrado, se agruparon los huevos con una espátula en un área de papel no superior a 1-1,5 cm de diámetro, se recortó la misma y se la apoyó sobre el medio de cultivo para larvas (ver Fig. 30).

Es importante garantizar que el papel permanezca siempre húmedo porque de lo contrario, los huevos se secan y los embriones mueren. Para cultivos pequeños (50-200 huevos) se utilizaron cubetas con 25 ml de medio de cultivo, mientras que para cultivos grandes (hasta 1000 huevos), se usaron cubetas con 60 ml de medio.

El medio de cultivo utilizado está basado en el utilizado por Terán (1977) con algunas modificaciones introducidas por F. Manso (Quesada-Allué, 1994).

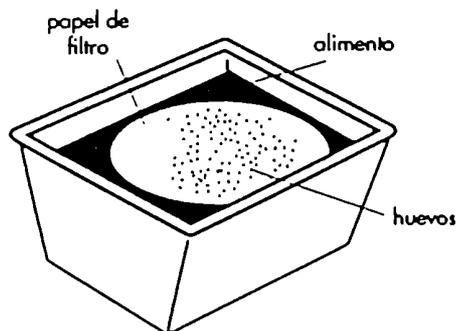


Figura 30- Huevos de *Ceratitis capitata* colocados sobre el medio de cultivo para larvas. (tomado de Quesada-Allué y col., 1994)

#### 1.4- Cría de larvas y recolección de pupas

Los tres estadios larvales se desarrollaron en el medio de cultivo donde fueron colocados los huevos, que debió mantenerse húmedo, especialmente durante los primeros días del período larval. Las cubetas se depositaron en el fondo de un frasco, sobre un lecho de arena fina tamizada. Al finalizar el tercer estadio, las larvas abandonaron el medio de cultivo saltando a la arena.

A los 3-5 días después del salto se tamizó la arena para separar las pupas, que se colocaron en frascos vacíos con tapa de gomaespuma. En dichos frascos, se mantuvieron los adultos cuando éstos emergieron. De ser necesario, los granos de arena adheridos se eliminaron por lavado con agua destilada.

#### 1.5- Sincronización de los cultivos

Los cultivos fueron sincronizados utilizando el “Tiempo Cero” de la metamorfosis, definido como en Rabossi y col., 1992. En este momento anatómica y fisiológicamente bien definido las larvas dejan de saltar, se quedan completamente inmóviles y ya no responden de modo alguno a la estimulación mecánica (se describe en detalle en la sección de Resultados).

Las edades de los animales en esta Tesis están todas referidas a dicho tiempo cero.

## **2- Micro-inyección de pre-pupas**

Luego del salto de la larva, se esperó hasta el momento de la inmovilización definitiva (Tiempo Cero). El momento fisiológico de la inyección debe ser preciso (con un error aproximado de no más de 10 minutos), de otro modo, el animal no logra completar su desarrollo y muere. En dicho momento fisiológico, las pre-pupas presentan todavía una cutícula rugosa debido a que la presión interna del hemocele aún no se ha incrementado.

El aparato de microinyección fue construido y generosamente cedido por el Dr. Josué Nuñez, a quien agradecemos especialmente. Se compone de una aguja de acero fabricada a partir de un capilar de 90  $\mu\text{m}$  de luz y 215  $\mu\text{m}$  de diámetro externo y 15 mm de largo. La aguja está adosada a una cánula de plástico, la que a su vez se conecta a una jeringa de tipo Hamilton de 5  $\mu\text{l}$  de capacidad. Las sustancias a inyectar fueron disueltas en solución de Ringer (Chen, 1968). Se hizo penetrar la aguja a través del último surco intersegmental y en los casos en los que se observó reflujó de hemolinfa, el animal fue descartado.

## **3- Inyección y uso de la [ $^{14}\text{C}$ ]β-alanina como precursor radioactivo**

Pre-pupas de Tiempo Cero de la cepa salvaje y del mutante *niger* fueron microinyectadas con 0,5  $\mu\text{l}$  de [ $^{14}\text{C}$ ]β-alanina (54,5 mCi/mmol) e inmediatamente después, se las colocó en recipientes individuales de 25 ml herméticamente cerrados que contenían cada uno una tira de papel Whatman 3 mm embebida en KOH 1 M. Se agregó 1 ml de agua destilada para que la humedad dentro de los viales se mantuviera a saturación (ver Fig 31). Luego de 24 horas, se retiraron las tiras de papel, previamente individualizadas y se las secó bajo una lámpara infrarroja. Las pre-pupas correspondientes fueron disecadas inmediatamente sobre trozos rectangulares de papel Whatmann 3 mm y el contenido del cuerpo de las pre-pupas fue extendido sobre el papel con una espátula pequeña y secado como se indicó más arriba. Los puparios fueron exhaustivamente lavados con agua destilada, y secados sobre papel de filtro. Los puparios, y los correspondientes papeles con el contenido del cuerpo y con el [ $^{14}\text{C}$ ]CO<sub>2</sub>

precipitado como carbonato fueron contados en viales de centelleo líquido a los que se les agregó previamente líquido de centelleo. Se utilizó un contador 1214 Rackbeta Pharmacia. Cada determinación fue repetida con 10 pre-pupas independientes.

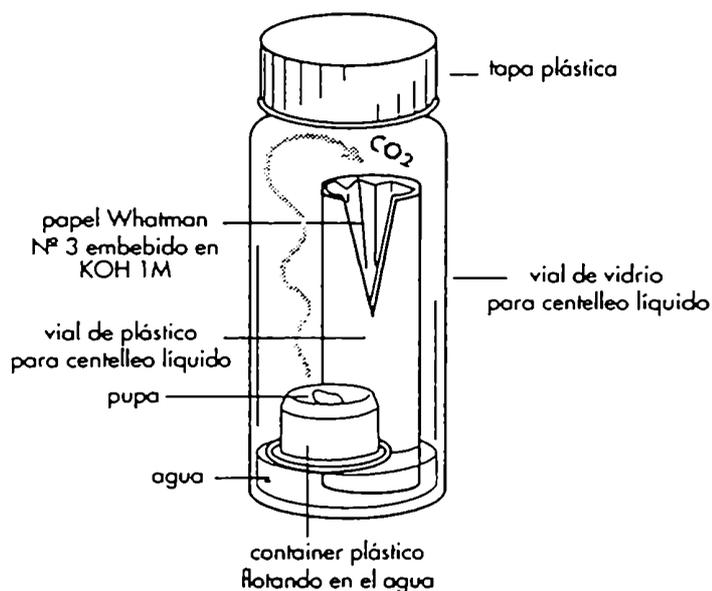


Figura 31- Dispositivo utilizado para medir el dióxido de carbono radioactivo eliminado por respiración (publicado en Wappner y col., 1994)

#### 4- Análisis de proteínas cuticulares

Las proteínas cuticulares fueron extraídas con SDS 1% (10µl por cutícula individual) a temperatura ambiente durante toda la noche o bien a 60°C durante 2 horas (Boccaccio y Quesada -Allué, 1989; Boccaccio y Quesada-Allué, 1994).

Se hicieron geles laminares verticales de poliacrilamida con SDS según el método de Anderson y col.(1973). Las electroforesis fueron desarrolladas a temperatura ambiente a 50 V (voltaje constante) o a 40 mAmp (amperaje constante). Para visualizar las proteínas, los geles fueron teñidos con Azul de Coomasie.

## 5- Ensayos de resistencia mecánica de los puparios

### 5.1- Preparación de la pieza cuticular

Se cortaron transversalmente puparios de modo de separar los segmentos 8º y 9º del resto del insecto teniendo especial cuidado de no fracturar la estructura cuticular durante la disección. Los anillos fueron sumergidos en agua destilada saturada en PTU y BHT y, con la ayuda de una aguja doblada, se limpió la cutícula de tejidos adheridos. Las anillos de pupario fueron secados sobre un papel absorbente e inmediatamente se colocaron con la parte esternal hacia abajo en el dispositivo mostrado en la Figura 32.

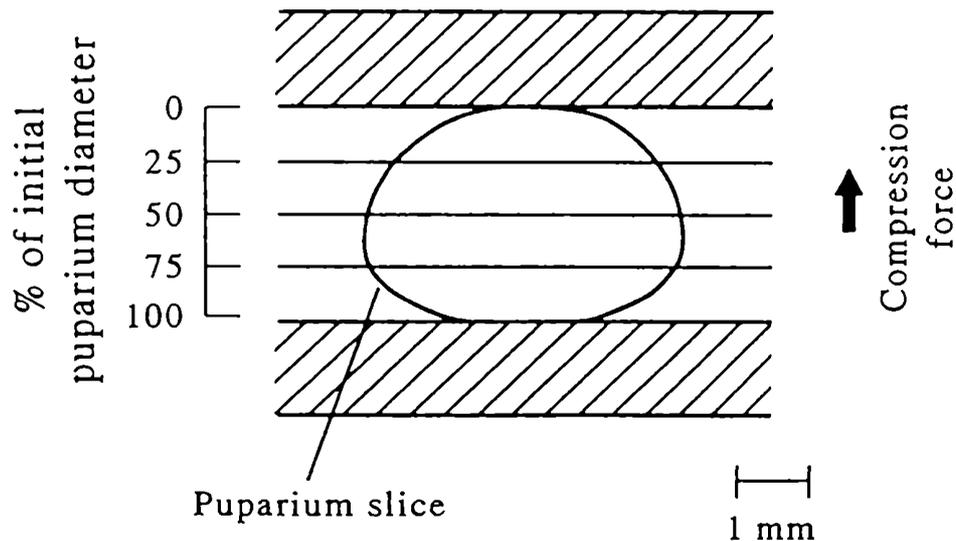


Figura 32- Dispositivo para medir la resistencia de los puparios a la compresión dorso-ventral. El aparato fue construido a partir de una balanza de un plato. La carga aplicada sobre el plato de la balanza es proporcional a la fuerza vertical ejercida por el brazo de la balanza al comprimir el anillo de pupario (dibujo de Eduardo Cafferata) (publicado en Wappner y col., 1995)

## **5.2. Dispositivo de medición**

Para construir el dispositivo de medición, se utilizó una balanza de un plato. La pieza cuticular fue colocada de modo tal que el fiel de la balanza, al subir, la comprimiera dorso-ventralmente. Se registró la fuerza necesaria para reducir el diámetro de cada anillo de cutícula hasta el 50% de su diámetro original. Estos valores fueron medidos agregando arena lentamente sobre el plato de la balanza, mientras se observaba con lupa la pieza cuticular colocada delante de una escala graduada a intervalos de 0,25 mm. Se midieron 12 cutículas para cada punto y las medias fueron comparadas mediante el ensayo *t* de Student.

## **6- Determinación del peso y del contenido de agua de los puparios**

Los puparios se disecaron en agua destilada saturada con PTU y BHT y se eliminaron los restos de epidermis raspando con una aguja doblada. Los puparios fueron aplastados entre 2 papeles Whatman N°3 y nuevamente enjuagados con agua destilada y secados entre 2 papeles de filtro.

Dos minutos después de prensar cada uno de los puparios entre papeles, se determinó su "peso húmedo" en una balanza digital Mettler AE-240. Es importante controlar el tiempo transcurrido entre el prensado de los puparios entre papeles y su pesaje, ya que la pérdida de peso por evaporación es muy significativa.

Luego de ser pesadas, las cutículas individualizadas fueron secadas bajo una lámpara infrarroja de 250 Watts a 30 cm de distancia durante 30 minutos. Comprobamos que este tiempo es suficiente para alcanzar un peso constante (no continúan deshidratándose). Los puparios individualizados fueron pesados nuevamente y el valor obtenido fue considerado el "peso seco". El contenido de agua de los puparios fue calculado restando los pesos húmedos a los pesos secos.

## **7- Experimentos de ligación de larvas**

Se tomaron larvas después del salto, a distintos tiempos antes del comienzo de la pupariación y se las ligó con hilo de coser entre el 7º y el 9º segmento. La edad de las mismas se estimó a partir del grado de inmovilización que presentaban los especímenes. Este método permite diferenciar con poco

margen de error una larva de -60 minutos de otras de -15 o -5 minutos (el tiempo 0 es el comienzo del proceso de pupariación). La coloración resultante fue observada 6 y 16 horas luego de la ligación.

## 8- Obtención de mosaicos genéticos *niger*/salvaje

La obtención de mosaicos genéticos se hizo en colaboración con la Dra. F. Manso del Instituto de Genética, CICA-INTA, Castelar.

Se hicieron cruzamientos recíprocos entre las cepas *niger* y salvaje. Una semana mas tarde se colectaron huevos de ambos cruzamientos durante un tiempo de 1 a 3 horas. Los huevos fueron irradiados con rayos X durante 6 segundos con una intensidad de 12,5 Rads/segundo (el aparato fue regulado en 120 Kw a 15 mA). Los huevos fueron luego colocados sobre el medio de cultivo para larvas y se dejaron transcurrir los estadíos larvales. Promediando el estadío pupal, los puparios fueron observados bajo lupa binocular con el objeto de detectar anomalías en la coloración de la cutícula.

## 9- Síntesis orgánica de sustancias patrón

### 9.1- Síntesis de N-β-alanildopamina

Como la N-β-alanildopamina no está disponible comercialmente, se la debió sintetizar en el laboratorio. Para ello se procedió según el procedimiento de Yamasaki y col (1990) con leves modificaciones según se detalla a continuación:

Se secó dimetilformamida (DMF) por agregado de bolitas de Sephadex y se le hizo burbujear nitrógeno gaseoso durante 30 minutos. A continuación se disolvieron 0.96 g de Dopamina.HCl en 17.5 ml de DMF y 1.72 g de éster de N-α-butil-oxicarbonil-β-alanina-N-hidroxisuccimida en 17.5 ml del mismo solvente y, a la solución de β-alanina así derivatizada, se le agregaron 0.55 ml de N-metil morfolina. Luego, se mezclaron ambas soluciones en un balón bajo atmósfera de nitrógeno y se los dejó agitando con barra magnética durante 48 horas en hielo. Al cabo de las 48 horas, todavía en el baño de hielo, se agregaron 0.26 ml de 1-(2-amino-etil-piperazina) y se dejó equilibrar la solución a temperatura ambiente durante una hora con agitación. A continuación, se agregaron 0.52 ml de 1-(2-amino-etil-piperazina) y se agitó durante una hora. Luego de ello, se agregaron 100 ml de acetato de etilo y 100 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el producto

resultante se extrajo 3 veces con 30 ml de acetato de etilo, luego de lo cual, se mezclaron todas las fases orgánicas de las tres extracciones. Dicha fase orgánica se lavó 3 veces con 30 ml de una solución saturada de NaCl y luego se la secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bajo atmósfera de nitrógeno durante toda la noche. El extracto de EtoAc fue concentrado en un Rotavapor hasta 10 ml y los cristales blancos que se formaron fueron filtrados y secados al vacío durante 4 hs. (si no cristaliza se puede precipitar con éter). El sólido seco fue disuelto en 4 ml de HCl 4N en 1,4-dioxano y se lo dejó durante 3 horas a temperatura ambiente. La solución fue luego evaporada al vacío para dar un polvo blanco que fue filtrado y lavado en éter. El NBAD se secó con sílica gel al vacío durante toda la noche.

## 9.2- Síntesis de N-β-alanil DOPA

Esta sustancia no había sido sintetizada nunca previamente. Se puso a punto un método de síntesis basado en el método descrito para la síntesis de N-β-alanildopamina por Morgan y col.(1987).

Se disolvieron 98 mg de L-DOPA en 6 ml de tetraborato de potasio 10%, el cual previamente había sido burbujeado con nitrógeno; se agregaron 4 ml de una suspensión preparada con éster de N-α-butil-oxicarbonil-β-alanina-N-hidroxisuccimida en tetraborato de potasio 10% y se mantuvo la solución bajo atmósfera de nitrógeno con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. El pH se ajustó periódicamente a 9,8 con hidróxido de sodio, ya que durante la reacción el pH tiende a bajar. Luego de sintetizada la unión, se desbloqueó el compuesto por agregado de ácido clorhídrico concentrado hasta pH 1 y posterior incubación a temperatura ambiente con agitación durante 30 minutos, siempre bajo atmósfera de nitrógeno. Luego se precipitó el tetraborato en hielo durante 15 minutos y se filtró la solución con filtro Millipore de 0,2 μm. El producto de reacción fue separado por filtración en gel utilizando una columna BioGel P-2 equilibrada en ácido fórmico 5% y adosada a un detector de absorbancia a 280 nm. Se colectaron fracciones de 5 ml y una pequeña alícuota de las fracciones con absorbancia a 280 nm, convenientemente diluída, fue analizada por HPLC con detección electroquímica (ver punto 10).

## 10- Análisis de catecolaminas

### 10.1- A partir de extractos de pupario

Se usaron 6 puparios en la preparación de cada uno de los extractos. Los puparios fueron disecados y limpiados como se detalló mas arriba y posteriormente se los homogenizó en un Potter Evelheim con 300  $\mu$ l de HCl 1,2 M , ácido ascórbico 5 mM y 6 mg/ml de  $\alpha$ -metil DOPA como estándar interno. A continuación, se centrifugaron los homogenatos en una centrífuga Eppendorf y se transfirió el sobrenadante a otro tubo que contenía 200  $\mu$ l de Tris-HCl 1M, pH 8,6 con ácido ascórbico 5 mM y 25 mg de alúmina ácida de calidad cromatográfica. La adsorción a alúmina se llevó a cabo durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación. Luego de una breve centrifugación, se descartó el sobrenadante y la alúmina fue lavada dos veces con agua bi-destilada. Finalmente, las catecolaminas fueron desadsorbidas agrgando 100  $\mu$ l de ácido acético 1M sobre la alúmina y agitando luego durante 15 minutos. La suspensión fue centrifugada brevemente y el sobrenadante recuperado. El extracto de catecolaminas fue liofilizado y guardado a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. La mezcla de catecolaminas fue analizada por HPLC con detección electroquímica con un detector (Hewlett Packard) regulado en 0,7 Voltios. Se utilizó una columna de fase reversa C-18 (Alltech). Para identificar inequívocamente los picos del cromatograma, se utilizaron dos fases móviles diferentes. La composición de la fase móvil I fue la siguiente: octil sulfato de sodio 0,09 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,1 mM, ácido fosfórico 0,1 M, metanol 10% (v/v) y el pH fue ajustado a 3. La composición de la fase móvil II fue octilsulfato de sodio 0,25 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  1 mM, cloruro de potasio 2,5 mM, ácido fosfórico 0,6% (v/v) y 6% de acetonitrilo ajustado a pH 2,2. En todos los casos,  $\alpha$ -Metil-DOPA fue usado como estándar interno.

### 10.2- A partir de extractos de hemolinfa

Seis pupas fueron atravesadas de lado a lado con un alfiler entomológico e inmediatamente se las depositó sobre una malla de nylon trabada sobre la parte superior de un tubo Eppendorf conteniendo un cristal de feniltiourea en el fondo (ver Fig. 33). El tubo fue centrifugado a 4000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5415 C durante 4 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . De este modo, se obtuvieron entre 4 y 8  $\mu$ l de hemolinfa libres de cuerpo graso, los cuales fueron medidos y colectados con una micropipeta de vidrio de 2  $\mu$ l. La hemolinfa fue mezclada con 300  $\mu$ l de HCl 1,2 M conteniendo ácido

ascórbico 5 mM y 6 mg/ml de  $\alpha$ -metil DOPA. La hemolinfa fue homogenizada rápidamente a mano en un Potter Evelheim luego de lo cual se centrifugó durante 15 minutos en una centrífuga Eppendorf. Los sobrenadantes fueron incubados durante 10 minutos a 100°C en atmósfera de nitrógeno para hidrolizar posibles conjugados lábiles. Luego de una corta centrifugación, las muestras fueron transferidas a un tubo conteniendo 300  $\mu$ l de buffer Tris-HCl 1M, pH 8,6 con ácido ascórbico 5mM y 40 mg de alúmina ácida de calidad cromatográfica. A continuación, se agitó durante 15 minutos para adsorber las catecolaminas, se centrifugó durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante. La alúmina fue lavada 2 veces con agua destilada durante 2 minutos con agitación y finalmente se desadsorbieron las catecolaminas con 100  $\mu$ l de ácido acético 1M con agitación durante 15 minutos. El extracto de catecolaminas fue liofilizado y analizado como en el punto anterior.

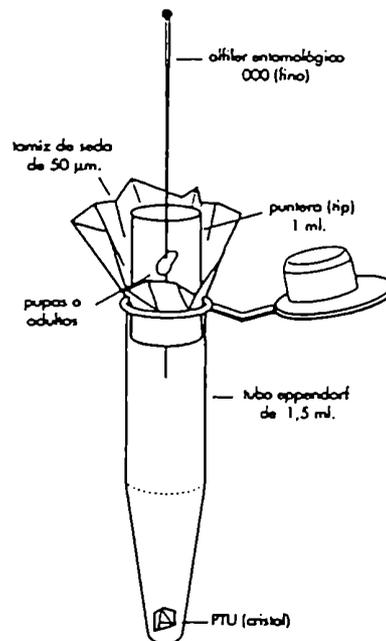


Figura 33- Dispositivo empleado para la extracción de hemolinfa libre de cuerpo graso a partir de larvas o pre-pupas de *Ceratitis capitata* (publicado en Wappner y col., 1994)

## 11- Medición de fenoloxidasas cuticulares y tanificación *in vitro* de los puparios.

Las fenoloxidasas cuticulares se midieron de un modo similar al descrito por Andersen (1979). Las cutículas se disecaron 2 horas luego del comienzo de la pupariación en tetraborato de potasio 1% frío y se las limpió como se detalló mas arriba. El exceso de agua fue absorbida con papel de filtro e inmediatamente se pesaron los puparios, los cuales fueron guardados en tetraborato de potasio 1% a 40°C durante varias horas. Para medir la actividad enzimática, dos miligramos de cutícula fueron incubados a 23°C con agitación en 6 ml de una solución que contenía ácido ascórbico 0,0015%, Na<sub>2</sub>EDTA 0,03% y el sustrato en una concentración de 0,3 mM en buffer acetato de sodio 0,2 M a pH 5,5. Los sustratos utilizados fueron dopamina, N-β-alanildopamina y N-acetildopamina. La reacción de oxidación se midió siguiendo la disminución de absorbancia a 265 nm. Para ello, cada 5 minutos, se tomó una alícuota de la mezcla de reacción y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Gilford. Luego de cada medición, la alícuota fue regresada a la mezcla de reacción. El tiempo total registrado en cada reacción fue de 25 minutos. Se compararon los espectros UV de la mezcla de reacción antes y después de cada incubación. Se hicieron controles sin agregar cutícula para determinar la velocidad de oxidación espontánea. Para estar seguros de que realmente estábamos midiendo fenoloxidasas insolubles, 10 minutos luego de comenzada la incubación, se tomó una alícuota de la mezcla de reacción y se comprobó que, en dicha alícuota, no hubo oxidación subsecuente.

Media hora después del comienzo de la incubación, se agregaron a la mezcla de reacción otros 200 µl de solución de sustrato en una concentración de 10 mM y media hora mas tarde (una hora luego del comienzo de la incubación), se observó la coloración resultante. Los puparios tanificados o melanizados *in vitro* fueron guardados en etanol 70% a 40°C y posteriormente fotografiados.

## 12- Determinación de β-alanina endógena

Se tomaron prepupas sincronizadas de 3 horas de edad y se las molió en un mortero en nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino. El polvo fue liofilizado y guardado a -20°C hasta el momento de su análisis. Para el análisis, se hidrolizaron 10 mg de polvo en 250 µl de HCl 1,2 N a 100°C durante 2 horas. Estas condiciones de hidrólisis son teóricamente suficientes para romper las uniones β-alanina-catecol en la N-β-

alanildopamina y la N- $\beta$ -alanilnorepinefrina, pero dejarían mayormente intactas las uniones peptídicas de las proteínas. Esto disminuye considerablemente la contaminación con aminoácidos libres. Luego de hidrolizadas, las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante se pasó por una columna sephadex G-25. La  $\beta$ -alanina fue determinada en un analizador automático de aminoácidos (Applied Biosystems). Se utilizó  $\beta$ -alanina radiomarcada como estándar interno para calcular la eficiencia de la extracción que nunca fue menor al 82%.

### 13- Medición de la actividad NBAD sintetasa

#### 13.1- *in vivo*

Para cada ensayo, seis pre-pupas fueron inyectadas en el Tiempo Cero con [ $^{14}\text{C}$ ] $\beta$ -alanina y mantenidas durante 3 horas a 23 °C. A continuación, las pre-pupas fueron homogeneizadas en 400  $\mu\text{l}$  de buffer TrisHCl 50 mM, pH 7,6. Luego de centrifugarlo, el material soluble fue deslipidificado con un volumen de cloroformo. Para ello se emulsionó el cloroformo por agitación violenta en un vórtex. Los extractos fueron centrifugados y se recuperó la fase acuosa con pipeta Pasteur con cuidado de no tomar la interfase de proteínas, la cual fue descartada junto con el cloroformo. Las proteínas remanentes fueron precipitadas por agregado de 20  $\mu\text{l}$  de ácido perclórico 40% y posterior centrifugación. Los sobrenadantes se analizaron en cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando una columna de fase reversa C-18 como se indicó mas arriba; se colectaron fracciones de 0,5 ml y se midió en ellas la radioactividad por centelleo líquido. Se comparó la movilidad de los picos radioactivos, así obtenidos, con la de estándares sintéticos de distintas catecolaminas. Se utilizó  $\alpha$ -metil-DOPA como estándar interno para calcular la eficiencia de la extracción.

#### 13.2- *in vitro*

##### 13.2.1- Preparación del extracto enzimático

Las prepupas de la edad deseada, ya sea vivas o mantenidas congeladas a -70°C, fueron homogeneizadas en buffer borato de sodio 50 mM pH 8,4, conteniendo  $\text{MgCl}_2$  10 mM, glicerol 10%, di-tiotreitol 1mM, PMSF 100 mg/ml, Pepstatina A 1 mg/ml, Leupeptina 2 mg/ml, E-64 1 mg/ml y

feniltiourea a saturación. En la homogeneización, se conservó una relación entre el peso de los insectos y el volumen de buffer de 1/2. El homogenato fue centrifugado a 16.000 x g y el sobrenadante fue parcialmente purificado por fraccionamiento por precipitación con sulfato de amonio. La fracción con actividad enzimática se obtuvo entre 30 y 70% de saturación de dicha sustancia. Para los experimentos de caracterización de los requerimientos y propiedades de la enzima se hizo una preparación enzimática a partir de pre-pupas de 3 horas de edad. Dicha preparación fue guardada en alícuotas a -70°C y cada alícuota fue desechada luego de haber sido descongelada y utilizada. En estas condiciones, no se registró disminución de la actividad enzimática a lo largo de aproximadamente 9 meses (hasta el momento de escribir la Tesis).

### *13.2.2- Ensayo de actividad*

Las reacciones estándar fueron llevadas a cabo a 22°C en buffer borato 50 mM, pH 8.4, durante un tiempo de 5 minutos. La mezcla de reacción contenía dopamina 10 mM, ATP 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 3 x 10<sup>5</sup> cpm de [1-<sup>14</sup>C]β-alanina (54 mCi/mmol) y 3 μl de extracto enzimático (32 mg/ml de proteínas) en un volumen final de 50 μl. Las reacciones fueron detenidas con ácido perclórico 40% a una concentración final del 2%.

Luego de detenida la reacción, las mezclas fueron centrifugadas y el sobrenadante o bien congelado a -20°C hasta su análisis, o bien analizado inmediatamente.

Para el análisis del producto de reacción, primero se alcalinizó la solución con 4 volúmenes de buffer Tris-Cl 1M, pH 8,7; luego se agregaron 150 mg de alúmina cromatográfica ácida (Sigma) y la suspensión fue incubada durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación para adsorber las catecolaminas a la alúmina. La suspensión fue colocada en una columna y el percolado se recogió en un vial de vidrio de 25 ml. La alúmina fue lavada con 3 ml de buffer Tris-Cl 0,1M, pH 8,7 y este lavado fue recogido en el mismo vial que el percolado. Luego, la alúmina fue lavada con 30 ml del mismo buffer (comprobamos que con este volumen se lava toda la radioactividad no-adsorbida) y finalmente, las catecolaminas se eluyeron con 3 ml de ácido acético 1M. El eluido fue recogido en un segundo vial de centelleo; a los viales conteniendo el percolado y el eluido, se les agregó 10 ml de líquido de centelleo y la radioactividad fue medida en un contador Pharmacia 1214 Rackbeta (ver Fig. 34). La radioactividad presente en el eluido fue atribuida al producto formado, [<sup>14</sup>C]NBAD (ver sección de resultados).

## COLUMNAS DE ALUMINA

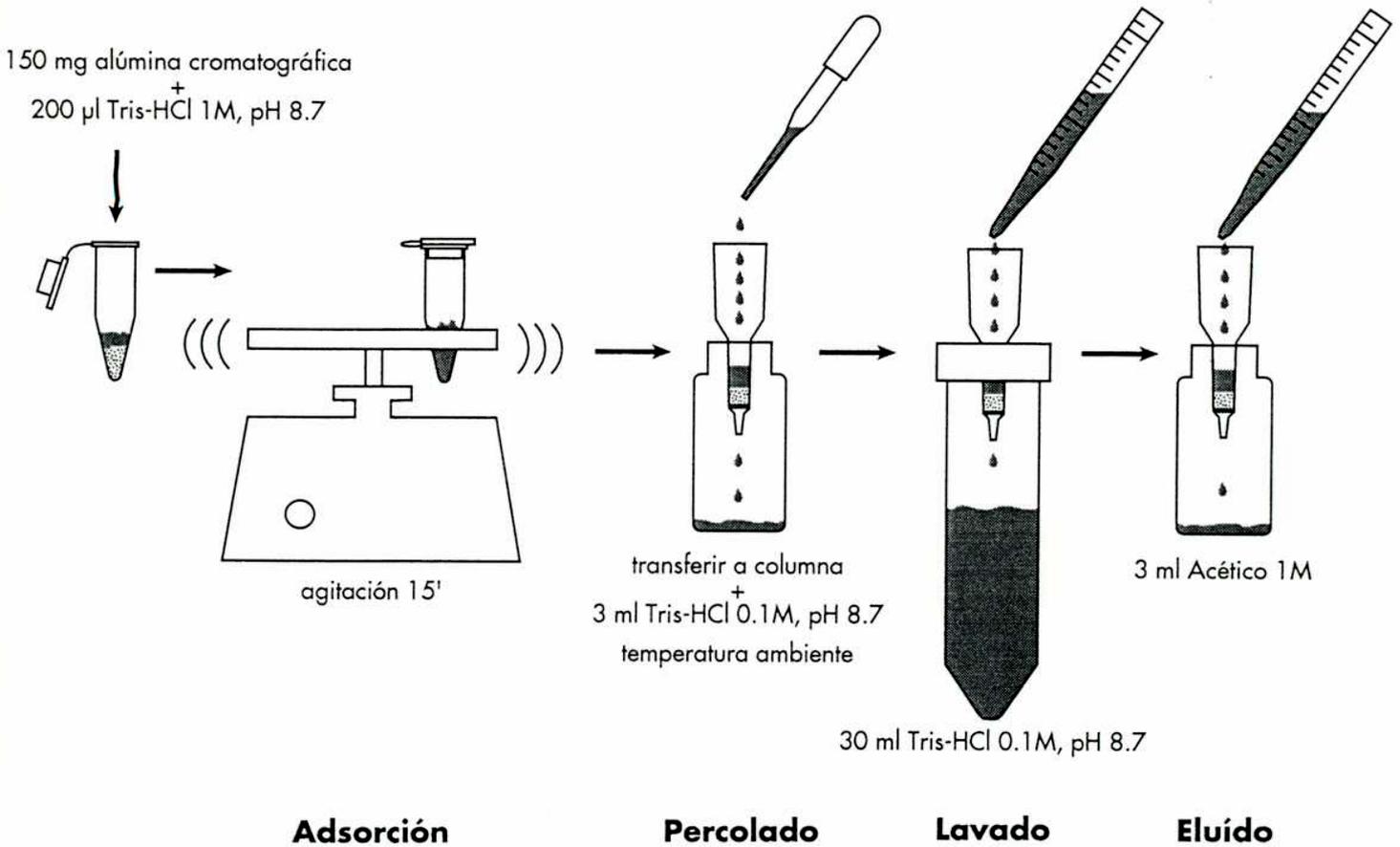


Figura 34- Ensayo de actividad desarrollado para la NBAD sintetasa

En ciertas ocasiones se utilizó un segundo ensayo de actividad llevado a cabo en un volúmen final de 300  $\mu$ l, lo cual permitió agregar 6 veces mas volúmen de extracto enzimático. En este ensayo se procedió igual que en el anterior, pero la reacción fue detenida con EDTA pH 8,0 a una concentración final de 20 mM. De este modo, como el pH de la solución es alcalino, no es necesario agregar buffer Tris-Cl y se puede adsorber a alúmina directamente. La desventaja de este segundo método, es que el

análisis de los productos de reacción debe realizarse inmediatamente luego de detenida la reacción, ya que las catecolaminas no son estables a pH alcalino durante tiempos prolongados.

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry y col. (1951).

#### **14- Medición de la actividad NBAD hidrolasa**

Se usó como sustrato [ $^{14}\text{C}$ ]NBAD sintetizado y enzimáticamente purificado en una columna de alúmina como se detalló en el punto anterior. La fracción eluída de dicha columna, conteniendo [ $^{14}\text{C}$ ]NBAD en 3 ml de ácido acético 1 M fue liofilizada y resuspendida en 200  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada saturada en PTU. El homogenato para medir la actividad enzimática fue preparado en buffer fosfato 50 mM pH 7,2 conteniendo las mismas sustancias que en el punto anterior pero sin  $\text{Mg}^{2+}$  y con EDTA 50 mM. Para medir la actividad, se incubaron 5  $\mu\text{l}$  de este extracto en presencia del sustrato radioactivo y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  20 mM. La incubación se efectuó a  $37^\circ\text{C}$ ; la reacción se detuvo con ácido perclórico y los productos de reacción fueron analizados del mismo modo que en el punto anterior. El curso de la reacción fue seguido tanto por la aparición de radioactividad no-adsorbida a alúmina ( $\beta$ -alanina), como así también por la desaparición de radioactividad adsorbida (NBAD).

# Resultados

Al comienzo de los trabajos conducentes a esta Tesis, se trabajó junto a otros integrantes del laboratorio en el estudio del ciclo de vida de *Ceratitis capitata* para definir en la forma mas objetiva posible los diferentes estadios y especialmente, los procesos que jalonan el proceso de metamorfosis.

En este sentido, el trabajo de este tesista se concentró en el comienzo del estadio pre-pupal, sobre el estudio del proceso de pupariación. Para poder analizar los eventos bioquímicos que conforman dicho proceso y caracterizar los mutantes de pigmentación puparial, primero fue necesario describir en detalle los cambios externos que sufre la larva en su transición hacia el estadio pre-pupal. Como se verá a lo largo de la sección de Resultados, esta descripción morfológica fina de los eventos que se suceden durante la pupariación resultó indispensable para llevar a cabo muchos de experimentos de la Tesis.

## **1- El comportamiento pre-puparial de la larva y la pupariación de *Ceratitis capitata***

### **1.1- Comportamiento de la larva durante la transición hacia el estadio pre-pupal.**

#### *1.1.1- Salto de la larva y etapa de deambulaci3n*

Se sabe, por estudios en otras especies de dípteros, que, a partir de cierto momento del último (tercer) estadio larval, el insecto deja de alimentarse, vacía el contenido intestinal remanente y comienza una etapa de deambulaci3n en la que la larva se desplaza sin un rumbo definido. La duraci3n de esta etapa depende de las condiciones del medio ambiente y es muy variable entre una especie y otra (Zdarek y Denlinger, 1991; Denlinger y Zdarek, 1994).

En *Ceratitis capitata*, sabemos, por datos de nuestro laboratorio, que el vaciamiento del contenido intestinal remanente y el inicio de la etapa de deambulaci3n estaría controlada por factores circadianos.

En la mosca mediterránea, la etapa de deambulaci3n comienza cuando la larva emerge a la superficie del medio de cultivo (o, en la naturaleza, a la superficie de la fruta) y salta en búsqueda de un sustrato propicio para pupariar. Esta modalidad de locomoci3n -por medio de saltos- es una característica muy poco frecuente dentro de los invertebrados vermiformes

y, en el caso de la larva de *Ceratitis*, obedece a un patrón altamente estereotipado de comportamiento (Fig 35-A)(Maitland, 1990).

Hemos observado que luego de su primer salto, la larva puede continuar saltando por un período hasta de horas, a menos que encuentre rápidamente un sitio adecuado para pupariar. En este caso, puede quedar inmóvil inmediatamente después de haber abandonado el alimento con su primer salto. Sin embargo, incluso en este último caso, la larva conserva durante un período de entre 5 y 9 horas la capacidad de desplazarse cuando se la estimula mecánicamente (esta Tesis y Quesada-Allué y col., 1994).

### *1.1.2- Inmovilización progresiva y morfogénesis del pupario*

Hemos podido determinar que la capacidad de locomoción por medio de saltos no se conserva durante todo este período. La eficacia y potencia del salto van disminuyendo paulatinamente y, alrededor de 4 horas después del primer salto, la larva ya no es capaz de seguir saltando. Observamos que si en este momento se la estimula mecánicamente, la larva aún conserva la capacidad de desplazarse por medio de movimientos telescópicos del cuerpo. Posteriormente, existe una etapa en la que responde a la estimulación mecánica sólo con contracciones de los músculos longitudinales del cuerpo pero sin lograr desplazarse de modo alguno. Finalmente, la larva llega a un estadio en el que ya no responde a los estímulos mecánicos. Este es el momento que denominamos el de la "inmovilización definitiva de la larva". Entre 60 y 75 minutos antes de este momento, la larva adquiere progresivamente forma de barril merced a la retracción de los tres segmentos anteriores del cuerpo, lo cual conduce a una reducción de aproximadamente el 20% de la longitud total del cuerpo. Se sabe, por estudios en otras especies de dípteros, que la inmovilización definitiva de la larva y la adquisición de la forma de barril están controladas independientemente por sendos factores hormonales (Fraenkel y col., 1977). En *Ceratitis capitata* existen mutaciones que, en forma específica, interfieren con la adquisición de la forma de barril (F. Manso, comunicación personal), de modo que el mutante forma un pupario que, bajo todo punto de vista, parece normal pero muestra una morfología típicamente larval. Esto indicaría que, también en *Ceratitis*, los diferentes componentes del comportamiento que precede a la pupariación estarían controlados independientemente.

Pudimos comprobar que la pérdida progresiva de movilidad va acompañada por cambios notables en la superficie de la cutícula. Alrededor de 3 horas después del primer salto, la cutícula se recubre de una

substancia brillante y pegajosa. No pudimos determinar el origen, la composición y la función de esta substancia, pero ésta podría ser análoga a una substancia también de naturaleza desconocida secretada a través del ano en la larva de *Glossina morsitans* en un estadio del desarrollo equivalente (Nash y col., 1976).

## 1.2- Encogimiento y estabilización de la cutícula

Hemos podido comprobar que en el momento de la inmovilización definitiva de la larva, debido al acortamiento de la longitud total del cuerpo, la cutícula se pliega de manera tal que cada uno de los segmentos toma forma convexa. Luego, la cutícula se encoge hasta quedar totalmente lisa y estirada. Otros investigadores informaron que el encogimiento de la cutícula que ocurre en las larvas de los dípteros en este momento comprime el cuerpo del insecto conduciendo a un aumento de la presión en el hemocele (Zdarek y col., 1979). Estos mismos investigadores comunicaron que, después de haberse encogido la cutícula, ésta se estabiliza en su estado encogido; es decir, ya no es posible estirla hasta sus dimensiones anteriores ni siquiera tratándola con agua a 100 grados durante varios minutos (Zdarek, 1985). Nosotros pudimos comprobar que dicho proceso de estabilización implica un aumento de la rigidez cuticular que permite que un anillo de cutícula seccionado del insecto pueda mantener su forma ovalada sin colapsarse (ver mas adelante). El proceso de estabilización cuticular precede al comienzo de la esclerotización y es totalmente independiente de catecolaminas (Zdarek y Fraenkel, 1972; esta Tesis y Wappner y col., 1995).

En *Ceratitis*, observamos que la estabilización viene acompañada por la pérdida de brillo de la superficie cuticular que, si bien se opaca, no muestra aún indicios de adquisición de color marrón-rojizo. Una cutícula estabilizada puede ser fácilmente diferenciada de una que aún no lo está. Si se corta transversalmente el insecto cuando la cutícula todavía no se ha estabilizado, la cutícula colapsa por su propio peso ya que la forma del animal se mantiene sólo merced a su presión hidrostática interna. Si se secciona el insecto luego de que la cutícula se ha estabilizado, ésta no se colapsará manteniendo una sección transversal aproximadamente circular, comprobándose de este modo que la plasticidad original de la cutícula se ha perdido. Pudimos comprobar que el proceso de estabilización de la cutícula es extremadamente rápido ya dura entre 10 y 15 minutos. A pesar de que el encogimiento y la estabilización de la cutícula fueron descriptos hace

largo tiempo (Fraenkel y Rudall, 1940), posteriormente el proceso de estabilización fue poco discutido en la literatura (Zdarek y Fraenkel, 1972). La naturaleza química de estas transformaciones es absolutamente desconocida.

Estudios en *Sarcophaga bullata* y en *Calliphora erythrocephala*, en los que se utilizaron diferentes venenos e inhibidores específicos, permitieron demostrar que el encogimiento y la estabilización de la cutícula están controlados en forma independiente ya que ambos procesos, como así también el proceso de esclerotización (ver mas adelante) pueden ser inhibidos en forma selectiva (Zdarek y Fraenkel, 1972).

### 1.3- El Tiempo Cero de la metamorfosis

Hemos definido el **Tiempo Cero** de la metamorfosis de *Ceratitis capitata* (esta Tesis y Rabossi y col., 1991) en el momento de la inmovilización definitiva de la larva (cuando ya no responde a estímulos mecánicos). En particular, en este momento, la cutícula no se ha encogido aún por completo, de manera que sigue siendo levemente rugosa y la presión interna del hemocele todavía no se ha incrementado (Rabossi y col., 1992). Por razones de índole experimental debimos adoptar este **Tiempo Cero** que es ligeramente anterior (en unos 10 o 15 minutos) al estadio "Pupario Blanco" descrito en la literatura (Zdarek, 1985; Zdarek y Friedmann, 1986), en el cual la cutícula es totalmente lisa y la presión del hemocele ya se ha incrementado. En nuestro caso, la micro-inyección de pre-pupas no es posible en el estadio "Pupario Blanco" descrito por Zdarek (1985) porque la presión del hemocele es demasiado alta y, apenas se penetra la cutícula con la aguja, comienza a perderse hemolinfa. El **Tiempo Cero** de la metamorfosis es, por convención, el comienzo del proceso de pupariación y también del estadio prepupal (ver Fig. 35-B). En todos nuestros estudios en los que se ha medido algún parámetro a lo largo del desarrollo, dicho **Tiempo Cero** fue tomado como punto de referencia. Para sincronizar el ciclo de vida de los insectos, por lo tanto, se utilizó siempre este momento fisiológico.

En las larvas de todos los mutantes estudiados, tanto el comportamiento pre-puparial como el **Tiempo Cero** son en todo idénticos a los del tipo salvaje.

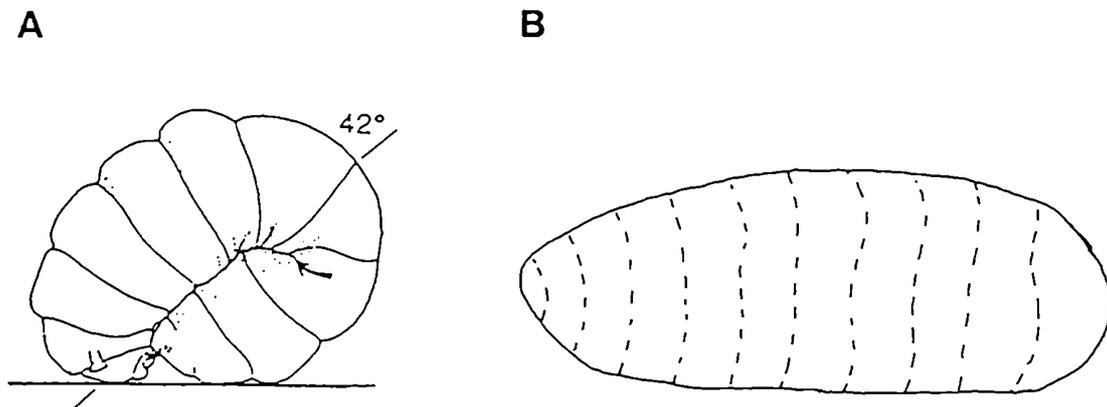


Figura 35- (A) Mecanismo del salto de la larva de *Ceratitis capitata*. Los ganchos bucales se prenden a la cutícula que está por debajo de los espiráculos posteriores de modo que la larva forma un anillo. Posteriormente, una serie de contracciones musculares llevan a la acumulación de fuerza elástica por parte de la cutícula. Esta fuerza se libera cuando los ganchos se sueltan, produciéndose así el salto. (tomado de Maitland, 1990). (B) Pre-pupa en el tiempo cero, cuando la cutícula ya se ha encogido y la presión del hemocele aumentó (Publicado en Quesada-Allué y col., 1994)

#### 1.4- La pigmentación del pupario en la cepa salvaje y en los mutantes melánicos.

Observamos que, tanto en la cepa salvaje como en los mutantes melánicos *Black pupa* y *niger*, luego de que la morfogénesis y la estabilización del pupario se han completado, la cutícula comienza inmediatamente a colorearse. Por el contrario, en el mutante *white pupa* no se observó un incremento en la pigmentación luego del Tiempo Cero de manera que en las prepupas de esta cepa la cutícula sigue siendo incolora incluso cuando el proceso de pupariación ha terminado.

En la figura 36, se observa claramente que la coloración del pupario del tipo salvaje difiere desde un comienzo de la de los dos mutantes melánicos. Mientras que la cutícula salvaje exhibe, en todo momento, coloraciones de la gama del ámbar, el amarillo, y el naranja hasta terminar en el marrón rojizo; *Black pupa* y *niger* progresan por la gama de los grises, y los pardo-verdosos hasta llegar a la coloración negra final (Fig, 36). La coloración final del pupario se alcanza, tanto en el tipo salvaje como en los

mutantes melánicos, alrededor de 16 horas luego del Tiempo Cero. Esta diferencia visual en el progreso de la tanificación indica que las diferencias observadas en el color final de los puparios no se deben a “intensidades” o a “gradaciones” en el proceso de esclerotización, sino que, por el contrario, se deben a diferencias cualitativas en los procesos bioquímicos que subyacen a la esclerotización.

En la Figura 36, puede verse también que los puparios de *Black pupa* y *niger* desarrollan la pigmentación de un modo muy parecido.

---

**Figura 36-** Proceso de pupariación de *Ceratitis capitata*. Centro: cepa salvaje; izquierda: mutante *Black pupa*; derecha: mutante *niger*. En el panel superior se muestra el aspecto de los puparios de las tres cepas en el tiempo cero, cuando la morfogénesis del pupario se ha completado pero la esclerotización aún no ha comenzado. En el panel central se muestran los puparios de 8 horas cuando el proceso de esclerotización ya se encuentra bastante avanzado en la cepa salvaje. En los mutantes *Black pupa* y *niger*, la melanización ya se hace evidente. En el panel inferior se observan los mismos puparios a las 12 horas, cuando ya casi se han alcanzado las coloraciones definitivas (Publicado en Quesada-Allué y col., 1995) (ver lámina en la próxima página).

**B**

**wt**

**nig**



**0 hs.**



**8 hs.**



**12 hs.**



## 1.5 Proteínas pupariales

Antes de comenzar con los estudios de la esclerotización del pupario, consideramos necesario analizar los patrones de proteínas pupariales y su variación temporal durante el proceso de pupariación. Asimismo, resultaba relevante determinar si existían diferencias evidentes entre las distintas cepas en cuanto a la composición de proteínas cuticulares del pupario. Se extrajo este tipo de proteínas con SDS 1% a temperatura ambiente (Métodos) a diferentes tiempos durante la pupariación y en los distintos mutantes.

Los resultados indicaron que en la cepa salvaje, muchos de los polipéptidos de la cutícula larval pueden ser extraídos del pupario hasta 32-36 horas luego del Tiempo Cero, hacia el final del estadio pre-pupal (Fig 37). Aproximadamente en el momento en que comienza a sintetizarse la cutícula pupal, la extractabilidad de las proteínas pupariales con SDS 1% a temperatura ambiente disminuye de pronto (Fig 37, 40 hs). Sin embargo, si la extracción proteica se realiza a 60°C en SDS 5%, todavía se liberan proteínas larvales (no se muestra). Esto podría atribuirse a la desecación del pupario que conduciría eventualmente a la insolubilización de estas proteínas, pero no se puede descartar la posibilidad que se vuelvan insolubles por el proceso de esclerotización (esta Tesis y Rabossi y col., 1991).

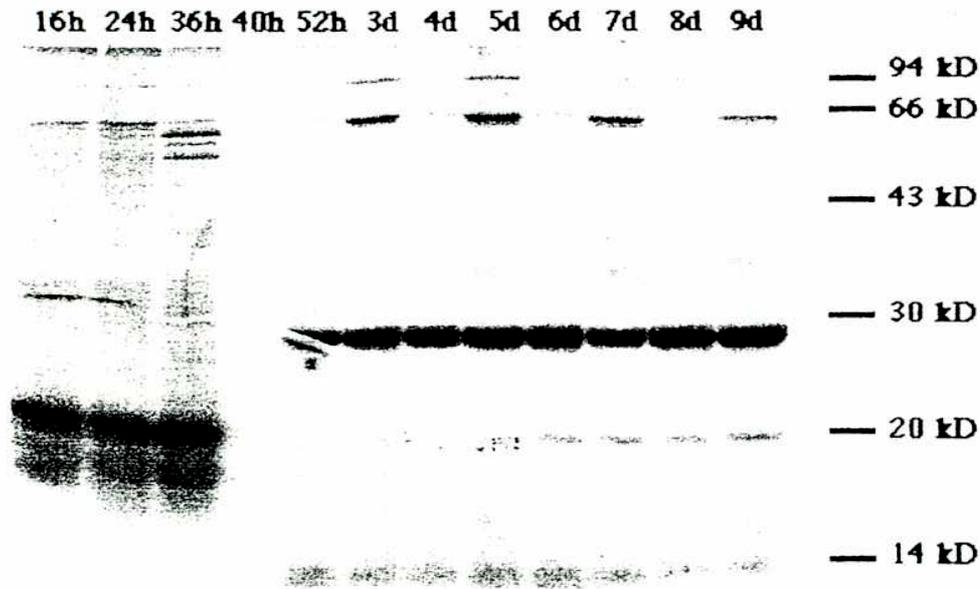
En la Figura 37, se muestra que entre las 42 y las 52 horas se detectan nuevas proteínas que se incorporan al pupario. En este sentido, los polipéptidos mas relevantes son uno fuertemente metacromático de aparentemente 26 KDa y otros dos polipéptidos con pesos moleculares aparentes de 19 y 15 KDa (Fig. 37)(esta Tesis y Rabossi y col., 1991). Estas proteínas adicionadas al pupario pueden ser extraídas a lo largo de toda la metamorfosis, incluso luego de la emergencia del imago.

Boccaccio y Quesada-Allué (1994) determinaron que estos polipéptidos pupariales se sintetizan *de novo* entre las 24 y las 30 horas pero se depositan en el pupario recién a las 46 horas luego del Tiempo Cero. Esto implica que, luego de su síntesis, las proteínas permanecen en un compartimento desconocido durante varias horas hasta el momento de su exportación. Consideramos probable que estas proteínas sean componentes residuales del fluido ecdisial que recubren el pupario internamente cuando dicho fluido se ha secado. Si éste fuera el caso, habría que considerar la posibilidad de que contribuyan a la impermeabilización o a alguna otra transformación físico-química del pupario.

La deposición de estos polipéptidos que se adicionan al pupario representa para nosotros el marcador bioquímico del final del proceso de pupariación,

el cual, por lo tanto, consideramos completado a las 46-48 horas luego del Tiempo Cero.

Los mutantes de coloración de pupario no mostraron diferencias cualitativas de ningún tipo en la evolución del patrón de proteínas pupariales.



**Figura 37-** Patrón electroforético de proteínas cuticulares pupariales. Las proteínas cuticulares extraídas de puparios individuales (uno por carril) se analizaron en geles de poliacrilamida 15% con SDS teñidos con "Coomasie Blue". Los números en la parte superior de la figura indican la edad a partir del tiempo cero. Hasta las 36 horas, el patrón es idéntico al de la cutícula larval (Boccaccio y Quesada-Allué, 1989); a partir de las 40 horas el patrón cambia por completo. Los números de la derecha indican el peso molecular de los marcadores.

## 2- *White pupa*, el primer mutante de insectos con un defecto en la maquinaria de exportación cuticular de catecolaminas.

Se sabe que las catecolaminas necesarias para la esclerotización de la cutícula son sintetizadas por la epidermis (Maranda y Hodgetts, 1977;

Hirsh, 1989; Krueger y col., 1989; Hiruma y Riddiford, 1990). Sin embargo, en el período previo a la esclerotización cuticular, las catecolaminas se acumulan en la hemolinfa en forma de sulfatos o de glucósidos, dependiendo de la especie de que se trate (Kramer y Hopkins, 1987; Hopkins y Kramer, 1991). Al comienzo de la esclerotización, son exportadas a la cutícula por mecanismos desconocidos (Hopkins y Kramer, 1992).

La coloración de las cutículas esclerotizadas de los insectos oscila desde las tonalidades marrones muy claras hasta las marrones oscuras o negras. Las cutículas duras claras o casi incoloras se esclerotizan utilizando NADA como principal precursor, mientras que las cutículas marrón-rojizas dependen de NBAD para su esclerotización (Hopkins y col., 1982; Hopkins y Kramer, 1992).

El mutante *white pupa* de *Ceratitis capitata* posee un pupario incoloro mientras que las estructuras cuticulares del adulto presentan una esclerotización normal (Rossler, 1979). En esta sección se discute la distribución y la función de las catecolaminas en este mutante en comparación con la cepa salvaje, como así también las diferencias estructurales y mecánicas de los puparios de ambas cepas.

## **2.1-La esclerotización del pupario salvaje y demostración de que el pupario del mutante *white pupa* no se esclerotiza**

En la caracterización del mutante *white pupa* era importante dirimir, primeramente, si éste esclerotiza su pupario a través del mecanismo conocido como esclerotización incolora o si, por el contrario, el mutante no esclerotiza la cutícula de modo alguno. Para estimar el aumento de rigidez de los puparios de la cepa salvaje y del mutante *white pupa* de *Ceratitis capitata* durante el proceso de pupariación, se puso a punto un método para medir la resistencia del pupario a la compresión dorso-ventral hasta alcanzar el 50% de su diámetro original (ver Materiales y Métodos). A este efecto, se comparó dicho mutante con la cepa salvaje en distintos momentos a lo largo del estadio pre-pupal.

Para medir este parámetro mecánico, se utilizó un anillo de cutícula compuesto por el octavo y el noveno segmento de la pre-pupa.

Al Tiempo Cero, los puparios no habían desarrollado todavía la rigidez suficiente para llevar a cabo el ensayo, ya que el anillo de cutícula se colapsaba por su propio peso. Apenas unos 15 minutos más tarde, la cutícula ya se había estabilizado y era lo suficientemente rígida como para mantener la forma ovalada del anillo. Creemos que se trata del proceso de

estabilización del pupario mencionado por Zdarek y Fraenkel (1972) que es anterior al comienzo de la esclerotización. Tanto Zdarek y Fraenkel (1972) como nosotros (esta Tesis y Wappner y col., 1995) hemos demostrado que fisiológicamente, la estabilización de la cutícula está regulada en forma independientemente de la esclerotización.

Luego de la estabilización, fue posible llevar a cabo el ensayo de compresión dorso-ventral y, como se muestra en la Fig. 38, la rigidez del pupario salvaje aumenta rápidamente a medida que la esclerotización progresa. Aproximadamente a las 24 horas, la rigidez del pupario salvaje alcanza su valor máximo. Cabe destacar que este momento coincide con el tiempo en el que el pupario adquiere también su coloración definitiva. Contrariamente, el pupario del mutante *white pupa* no mostró ningún aumento significativo en su rigidez luego de la estabilización. De esto se concluye que, si bien en *white pupa* el proceso de estabilización no estaría afectado, resulta claro que la esclerotización no ocurre.

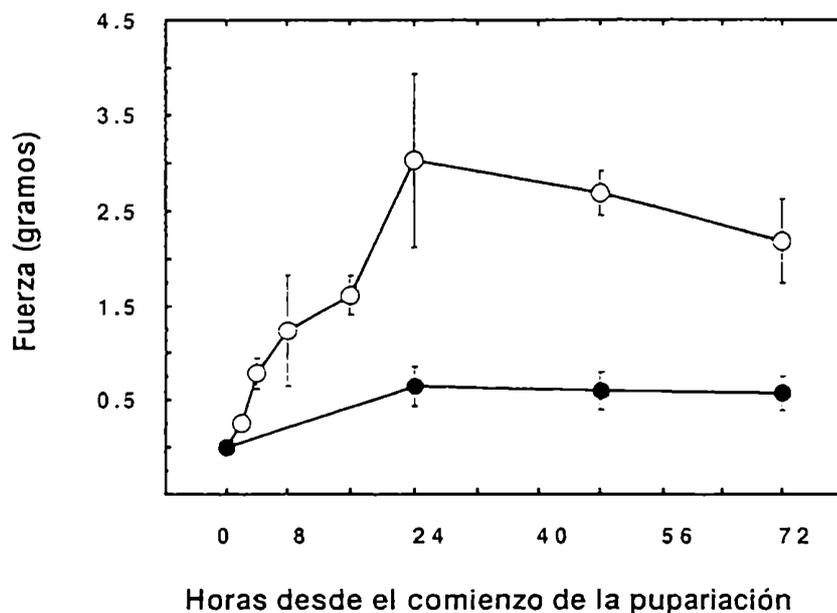


Figura 38- Resistencia ejercida por anillos de pupario de la cepa salvaje y del mutante *white pupa* a la compresión dorso-ventral hasta alcanzar el 50% de su diámetro original. Las determinaciones se realizaron a distintos tiempos después del comienzo de la pupariación. Cada punto representa la media de, al menos, 12 determinaciones. (Publicado en Wappner y col., 1995).

## 2.2- Vista al microscopio electrónico, la ultraestructura del pupario del mutante es anormal.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido de las secciones transversales del pupario del mutante y de la cepa salvaje mostraron la existencia de diferencias muy notables. La cutícula salvaje aparece altamente esclerotizada, con sus lamela fundidas en una estructura densa y compacta (Fig 39-A). La cutícula de *white pupa* parece estar formada por dos regiones diferentes. Los dos tercios mas internos parecen estar compuestos por lamelas finas, bien definidas y que parecen no estar esclerotizadas, ya que se separaron cuando la cutícula fue fracturada (Fig. 39-B). Las lamelas del mutante parecen estar conectadas por una matriz fibrosa. La región externa del pupario está compuesta por una secreción densa y amorfa, y sin la estructura lamelar visible en la cutícula salvaje.

---

**Figura 39-** Micrografía electrónica de barrido de la sección transversal del pupario de (A) la cepa salvaje y (B) el mutante *white pupa*. La parte superior de las micrografías corresponde a la región externa de la cutícula.(micrografía tomada por T. Hopkins de la Universidad de Kansas; publicado en Wappner y col., 1995) (ver página siguiente).



**2.3- *white pupa* no tiene catecolaminas en el pupario, pero éstas se acumulan en la hemolinfa**

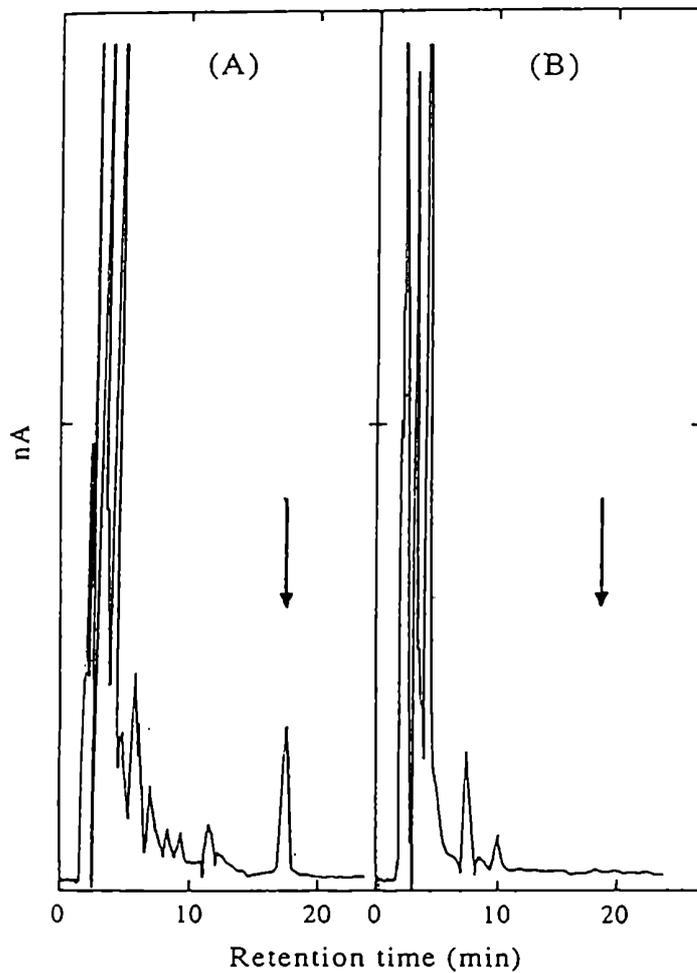
*2.3.1- Niveles de catecolaminas en el pupario de la cepa salvaje y del mutante white pupa*

*A priori*, la incapacidad del mutante *white pupa* de esclerotizar su cutícula podía deberse a dos causas posibles:

1- A la falta de catecolaminas en la cutícula.

2- A un defecto en alguna de las enzimas cuticulares que convierten a las catecolaminas en agentes esclerotizantes.

Para determinar si un defecto en las catecolaminas cuticulares podía ser la causa de la falta de esclerotización, se aislaron puparios salvajes y del mutante *white pupa* de 48 horas (totalmente esclerotizados) y se determinó el contenido de dopamina, NADA y NBAD. En la Figura 40-B se muestra que el perfil de catecolaminas del pupario del mutante carece de NBAD, que es el precursor del principal agente esclerotizante del pupario de la cepa salvaje (Fig. 40-A).



**Figura 40-** Perfil de HPLC usando una columna de C-18 de fase reversa y detección electroquímica. Se muestra el patrón de catecolaminas extraídas de puparios de (A) la cepa salvaje y (B) el mutante *white pupa*. La flecha indica el tiempo de retención de la N-β-alanildopamina. Se usó la fase móvil II y α-Metil-DOPA fue utilizada como estándar interno (publicado en Wappner y col., 1995).

Como se muestra en la Tabla 2, el contenido de NBAD del pupario salvaje fue muy superior al de *white pupa* y las concentraciones de dopamina y NADA resultaron ser bastante bajas en la cutícula de ambas cepas.

**TABLA 2-** Niveles de catecolaminas en los puparios esclerotizados de *Ceratitis capitata* 48 horas después del comienzo de la pupariación. Los valores están expresados en pmoles/mg de cutícula (NBAD, N-β-alanildopamina; DA, dopamina; NADA, N-acetildopamina; tr, trazas).

	NBAD	DA	NADA
salvaje	42.8 ± 3.2	4.4 ± 0.8	tr
<i>white pupa</i>	tr	3.5 ± 0.4	tr

El bajo contenido de catecolaminas en la cutícula de *white pupa* pudo ser corroborado por estudios de Resonancia Magnética Nuclear de estado sólido. En la Figura 41 se muestra el espectro de RMN de la abundancia natural de <sup>13</sup>C en el pupario salvaje, en el pupario del mutante y la diferencia entre ambos espectros.

Se observa, por los picos entre 20 y 105 ppm, que la quitina es, de lejos, el componente orgánico más abundante en ambas cutículas. En el pupario salvaje, esta sustancia representa el 86 % del total del material y en *white pupa*, constituye alrededor del 93% del total. Hay un 10 y un 5% de proteínas y un 3 y un 1% de catecoles en el pupario de ambas cepas respectivamente. La ancha señal negativa en la resta de los espectros (Fig. 41, parte superior) que se observa entre 30 y 50 ppm, como así también la señal negativa visible a 175 ppm indican que el pupario salvaje tiene mucha más BALA, presumiblemente en forma de NBAD, que el pupario del mutante (Schaefer y col., 1987). La ancha señal aromática negativa que se encuentra entre 110 y 150 ppm indica que el contenido de catecoles cuticulares también es muy inferior en la cepa mutante en comparación con el tipo salvaje.

Quedó por lo tanto demostrado que el mutante *white pupa* tiene niveles muy bajos de catecolaminas en la cutícula. Al mismo tiempo, este resultado provee la primera evidencia genética de que la estabilización, cuyas bases moleculares no se conocen, y la esclerotización que depende de catecolaminas, son procesos fisiológicamente independientes. Este hecho había sido demostrado por Zdarek y Fraenkel (1972) mediante experimentos farmacológicos.

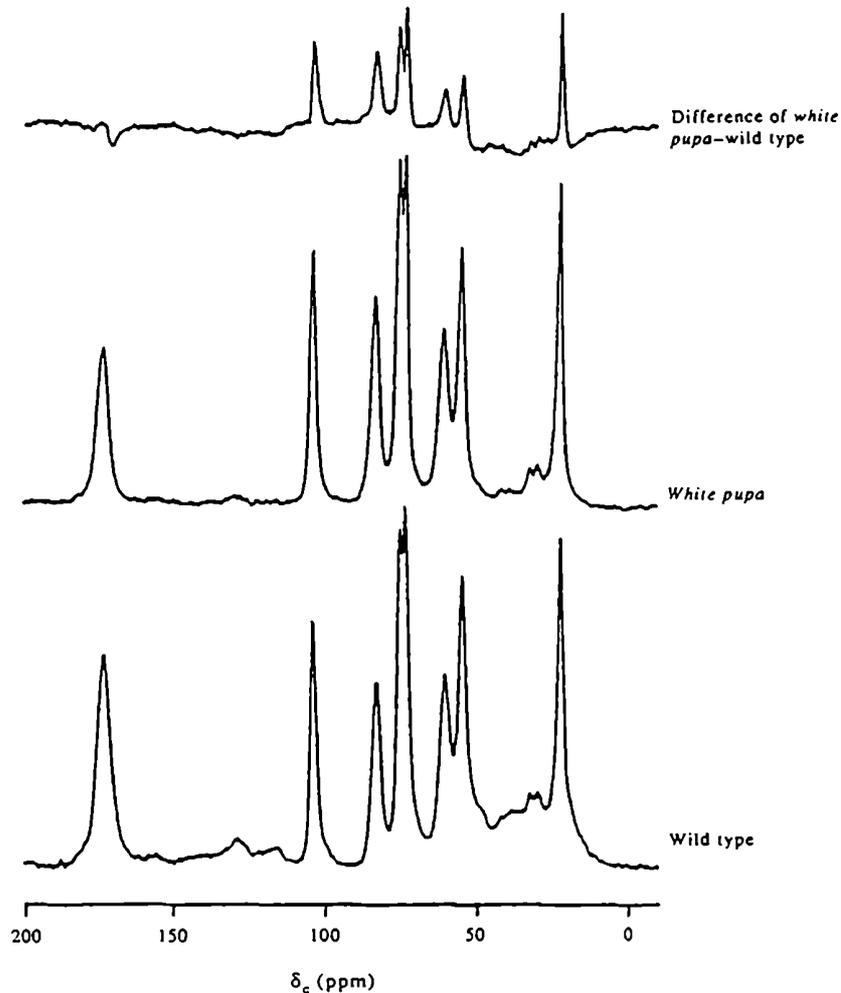


Figura 41- Espectro de RMN, de la abundancia natural de  $^{13}\text{C}$ , de puparios esclerotizados de *Ceratitis capitata*. Espectro inferior, cepa salvaje; espectro del centro, *white pupa*; parte superior, diferencia de los espectros donde el espectro de la cepa salvaje fue sustraído al de *white pupa*. (publicado en Wappner y col., 1995).

### 2.3.2- Niveles de catecolaminas en la hemolinfa

Llamativamente, en la hemolinfa, la situación resultó ser totalmente inversa; las concentraciones de las tres catecolaminas medidas en el mutante *white pupa* fueron alrededor de 10 veces superiores a las de la cepa salvaje (Fig. 42) durante todo el intervalo del desarrollo estudiado.

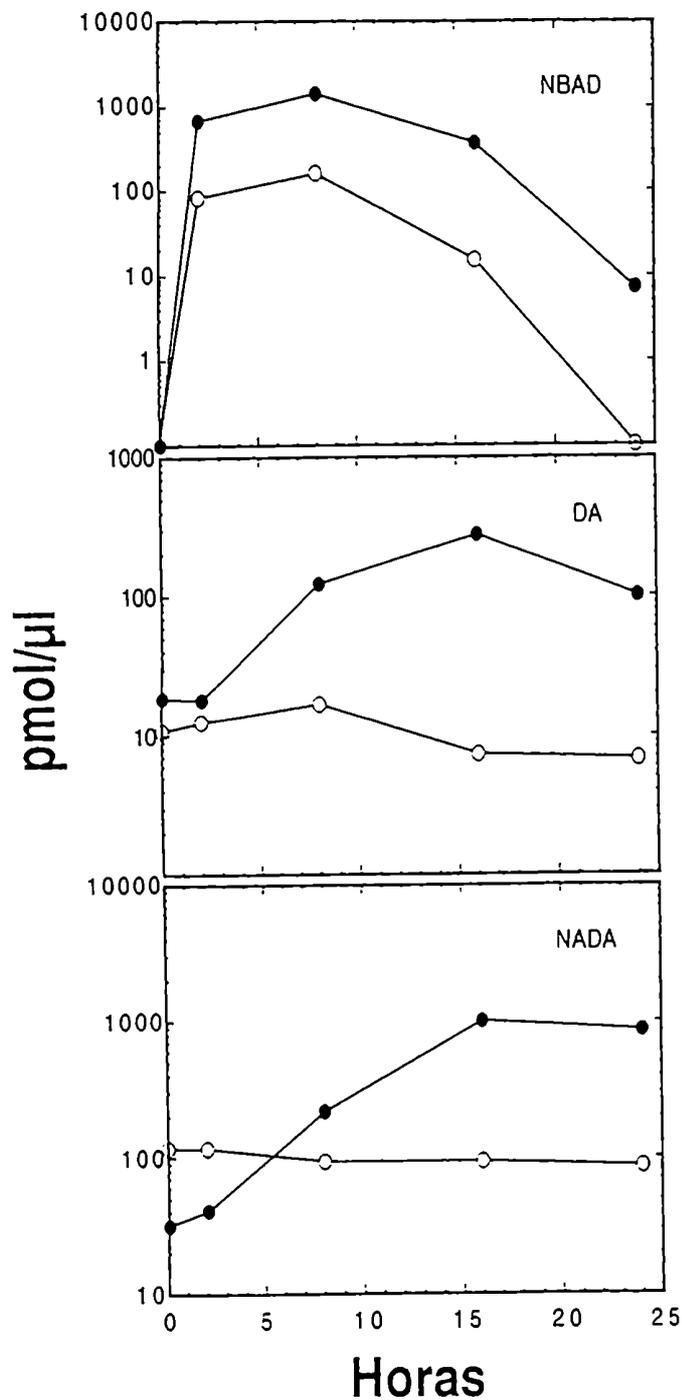


Figura 42- Perfil temporal de las concentraciones de catecolaminas en la hemolinfa durante el desarrollo pre-pupal de *Ceratitis capitata*. El tiempo cero es el comienzo de la pupariación. Círculos vacíos, cepa salvaje; llenos, *white pupa*.. NBAD, N-β-alanildopamina; DA, dopamina; NADA, N-acetildopamina. Las concentraciones se midieron en HPLC y se calcularon por extrapolación a valores de estándares. α-metilDOPA se usó como estándar interno para calcular el porcentaje de recuperación de las catecolaminas, el cual nunca fue inferior al 77%. Cada punto representa la media de 2 determinaciones. (publicado en Wappner y col., 1995).

Este hecho, sumado a los datos de niveles de catecolaminas en la cutícula, indicarían que, en *white pupa*, las catecolaminas se sintetizan normalmente pero fracasan en ser exportadas a la cutícula a través de la epidermis (Wappner y col., 1995).

**Cabe destacar que éste sería el primer mutante de transporte epidérmico descrito en insectos hasta la fecha.**

#### **2.4- La batería de enzimas cuticulares de *white pupa* está intacta**

Ciertos mutantes de *Drosophila melanogaster* incapaces de esclerotizar la cutícula son defectivos en difenoloxidasas, mostrando niveles elevados de catecolaminas totales en el cuerpo (Ritzki y col., 1985). Por este motivo decidimos investigar si la causa de la falta de esclerotización del pupario se debía además a un defecto en alguna fenoloxidasa cuticular específica de estadio. Se incubaron puparios de la cepa salvaje y del mutante *white pupa*, en presencia de ácido ascórbico, con NBAD, dopamina o NADA y se determinó la velocidad de oxidación de dichos sustratos a través de la disminución de la absorbancia a 265 nm (Andersen, 1979). Los resultados mostraron que las fenoloxidasas cuticulares insolubles de puparios de 2 horas de edad no exhiben diferencias entre la cepa salvaje y la mutante con ninguna de las catecolaminas utilizadas como sustrato (ver Fig. 43). En ambos casos la preferencia de la enzima, a juzgar por la velocidad relativa de oxidación de cada uno de los sustratos es NBAD>DA>NADA.

Durante los ensayos de actividad de fenoloxidasas cuticulares, pudo observarse que luego de una hora de incubación con NBAD o NADA, las cutículas del mutante *white pupa* adquirieron un color marrón claro como el de las cutículas parcialmente esclerotizadas de prepupas salvajes de 8 horas de edad (Fig. 44 C y D). En el caso en el que la dopamina se usó como sustrato, las cutículas del mutante tomaron un color marrón oscuro o negro, parecido al de los mutantes melánicos *Black pupa* y *niger* (Fig. 44-E). Estos resultados *in vitro* indican que, cuando las catecolaminas logran acceder al pupario, la esclerotización o la melanización se producen normalmente indicando, por lo tanto, que la batería de enzimas cuticulares de *white pupa* está intacta.

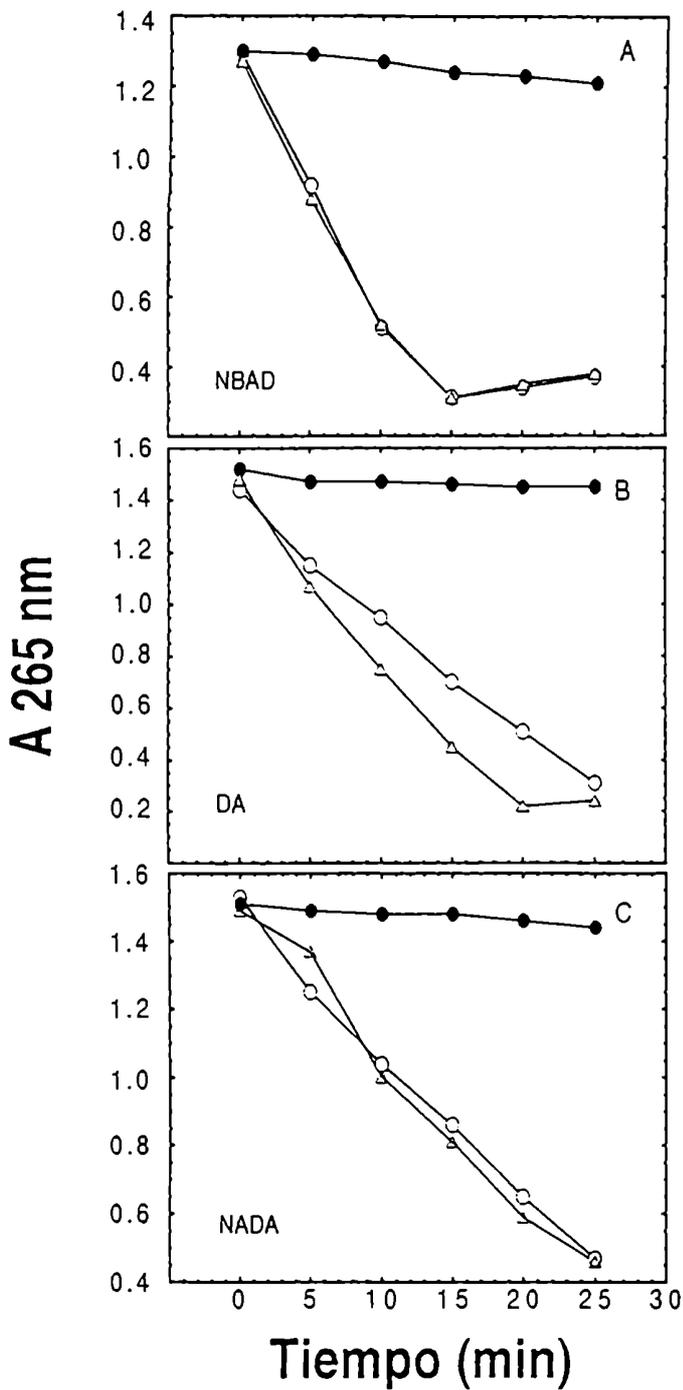


Figura 43- Actividad de fenoloxidasas cuticulares de puparios de 2 horas de *Ceratitis capitata*. Se incubaron trozos de cutícula (2 mg) con los diferentes sustratos en presencia de ácido ascórbico. Se midió la disminución de la absorbancia a 265 nm. Círculos vacíos, cepa salvaje; triángulos, mutante *white pupa*; círculos llenos, controles sin cutícula. Los sustratos fueron: (A) N-β-alanildopamina; (B) dopamina; (C) N-acetildopamina. La mezcla de reacción contenía 0,0015% ácido ascórbico; 0,03% Na<sub>2</sub>EDTA; y 0,3 mM del sustrato correspondiente en buffer acetato pH 5,5. (publicado en Wappner y col., 1995).

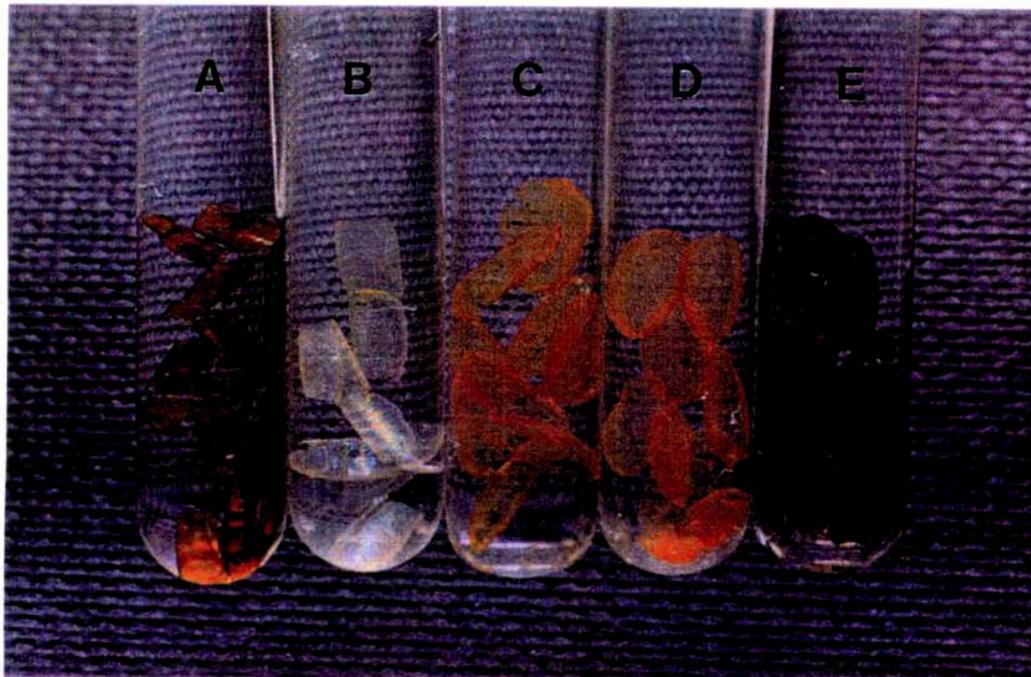


Figura 44- Experimento de tanificación *in vitro* de puparios del mutante *white pupa* de *Ceratitis capitata*. Dos horas luego del comienzo de la pupariación, las cutículas fueron disecadas y limpiadas de epidermis remanente. (A) Pupario totalmente esclerotizado de la cepa salvaje que muestra una coloración marrón rojiza. (B) Pupario incoloro del mutante *white pupa*. (C) Pupario de *white pupa* incubado con N- $\beta$ -alanildopamina 0,3 mM. (D) Pupario de *white pupa* incubado con N-acetildopamina 0,3 mM. Los puparios en (C) y (D) muestran un color similar a puparios salvajes luego de 8 horas del comienzo de la pupariación (Fig 36). (E) Pupario de *white pupa* incubado con dopamina 0,3 mM. Este pupario muestra una coloración entre marrón oscura y negra, lo cual indica que hubo melanización (publicado en Wappner y col., 1995).

## 2.5- Regulación de la pupariación en *Ceratitis capitata*. Experimentos de ligación de larvas

Zdarek y Denlinger (1992) describieron en la mosca Tse-Tse *Glossina morsitans* un fenómeno que llamaron inhibición anterior de la esclerotización del pupario. Estos autores demostraron que, una vez que las células epidérmicas han quedado "sensibilizadas" por la ecdisona para comenzar con la esclerotización y todas las enzimas necesarias para el proceso se hallan inducidas, comienza a funcionar un segundo sistema de regulación fina del proceso. Este mecanismo involucraría una inhibición originada en el cerebro, conducida por los cordones nerviosos y con blanco en las células epidérmicas. Por medio de este sistema, la esclerotización del pupario se mantiene arrestada y no comienza hasta el momento en el que esta inhibición se anula cuando el proceso de morfogénesis del pupario se ha completado.

Puesto que *Glossina morsitans* es una mosca vivípara, resultaba interesante investigar la existencia del fenómeno en una mosca no vivípara como *Ceratitis capitata*. Por otra parte, existía la posibilidad de que la ausencia de esclerotización del pupario en el mutante *white pupa* se debiera a que la putativa inhibición anterior no fuera anulada en el momento fisiológico correcto, persistiendo ésta aún después de que la inmovilización y morfogénesis del pupario han sido completadas.

En la Tabla 3 se muestra que, en *Ceratitis capitata*, efectivamente existe el fenómeno de inhibición anterior de la esclerotización del pupario durante una ventana de tiempo bastante estrecha ubicada entre 30 y 15 minutos antes del comienzo de la pupariación. Recién cuando se ligaron larvas en este intervalo de edades se observó esclerotización exclusivamente en la parte posterior del cuerpo. Cuando se ligaron larvas alrededor de 5 minutos antes del Tiempo Cero la esclerotización se produjo mayormente en ambas mitades del cuerpo indicando que la inhibición anterior ya se ha suprimido.

Sin embargo, ninguna de las larvas del mutante *white pupa* que fueron ligadas esclerotizó su pupario ni en la parte anterior ni en la parte posterior del cuerpo (no se muestra). Esto implica que el defecto de este mutante no consiste en una falla en la anulación de la inhibición de la esclerotización por parte del cerebro cuando la morfogénesis del pupario se ha completado.

**TABLA 3-** Efecto sobre la tanificación de la ligación de larvas salvajes a distintos tiempos antes de la inmovilización definitiva .

<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Posterior (Nº insectos)</b>	<b>Completa (Nº insectos)</b>	<b>Ausente (Nº insectos)</b>
-120 a 90	2	2	11
-30 a 15	12	4	
-5	4	11	1

**Posterior**= Esclerotización sólo en la parte posterior; **Completa**= Esclerotización en ambas mitades del cuerpo; **Ausente**= Ambas mitades del cuerpo sin esclerotizar. Los **tiempos** representan el momento en el que las larvas fueron ligadas en minutos antes del comienzo de la pupariación (tiempo cero). Las observaciones volcadas en esta tabla fueron realizadas 6 horas después del comienzo de la pupariación.

### **3- La deshidratación de la cutícula durante la esclerotización es independiente de catecolaminas**

Se sabe desde hace tiempo que el proceso de esclerotización cuticular de los insectos está siempre acompañado por una dramática pérdida de agua por parte de la cutícula (Fraenkel y Rudall, 1940). En la bibliografía, se acepta que esta deshidratación se debe a un aumento en la hidrofobicidad cuticular debido a la entrada de catecolaminas durante la esclerotización (Brunet, 1980; Hopkins y Kramer, 1992). Por consiguiente, se considera que tanto la esclerotización como la deshidratación de la cutícula dependen de la incorporación de catecolaminas. Sin embargo, hasta la fecha no existen evidencias experimentales que sustenten esta teoría.

Como Brunet (1980), puntualizó en su revisión sobre la esclerotización de la cutícula, queda todavía por determinarse si las catecolaminas son las que desplazan al agua de la cutícula o si por el contrario, existe un sistema externo, como podría ser un transportador epidérmico específico, que bombea agua fuera de la cutícula hacia el hemocele. Hasta donde sabemos,

luego de que Brunet formulara su pregunta en la revisión, el problema no fue nunca abordado. Sin embargo, el modelo del desplazamiento por catecolaminas fue siempre dado por cierto en la literatura.

En la sección anterior se mostró que el mutante *white pupa* de *Ceratitis capitata* presenta un defecto en el mecanismo de exportación de catecolaminas. El pupario de este mutante resultó, por lo tanto, ideal para investigar el problema de la deshidratación cuticular.

### **3.1- En el mutante *white pupa* la cutícula se deshidrata normalmente.**

Aprovechando la existencia del mutante *white pupa*, se pudo estudiar el proceso de deshidratación en un contexto en el que las catecolaminas no se incorporan a la cutícula y que, por lo tanto, permite diseccionar genéticamente los procesos de esclerotización y de deshidratación cuticular.

Para cuantificar la pérdida de agua cuticular durante la pupariación, se midió el peso seco y el peso húmedo de los puparios, al principio y al final de dicho proceso. Es importante destacar que, durante todo el intervalo de tiempo analizado, la cutícula pupal todavía no ha sido depositada (ver Fig. 27 en la Introducción) y, por lo tanto, durante todo el período, la cutícula larval se mantuvo en contacto directo ya sea con la epidermis o cuando ésta se separa, con el fluido ecdisial. Esto es importante para descartar la posibilidad de que la pérdida de agua se deba simplemente a deshidratación pasiva por exposición al aire.

El peso seco del pupario salvaje se incrementó en casi un 25% a lo largo de la pupariación, mientras que el del mutante *white pupa* no mostró ninguna variación. Esto seguramente se debe al defecto de *white pupa* para incorporar catecolaminas (Wappner y col., 1995) y posiblemente también proteínas (Charalambidis y col., 1994) al pupario (se retoma el problema en la Discusión).

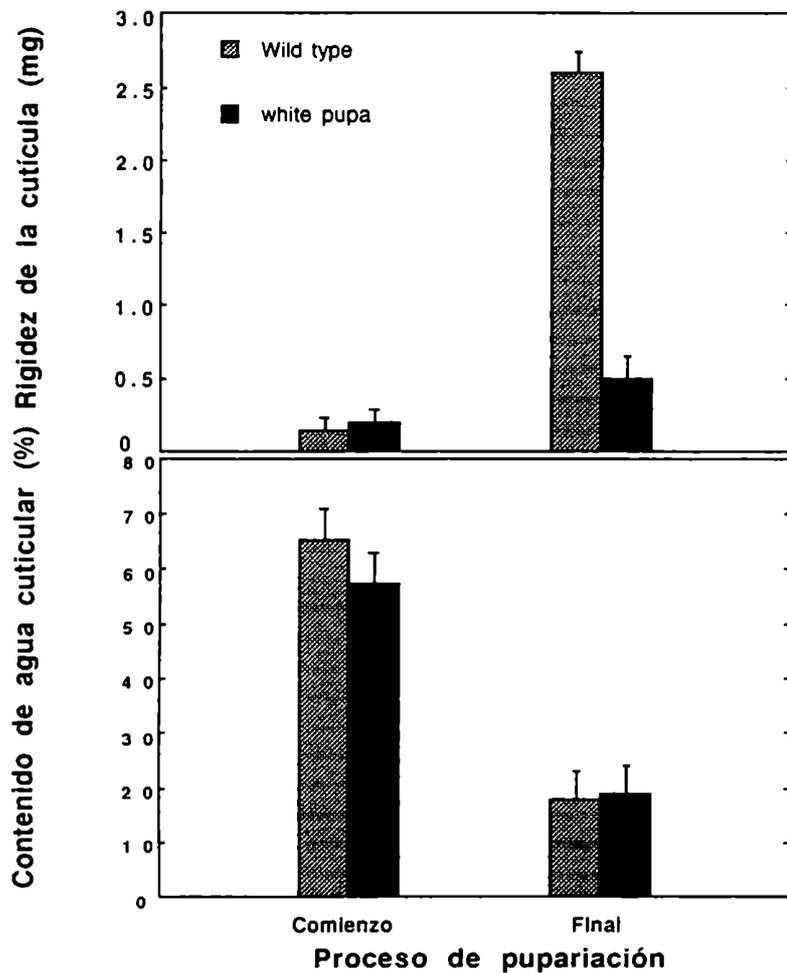
En la Tabla 4, se muestra que el contenido inicial de agua y, sorprendentemente, también la deshidratación sufrida por las cutículas del mutante y del salvaje durante la pupariación fue muy semejante.

**TABLA 4-** Variación del contenido de agua de puparios individuales al comienzo y al final de la pupariación en la cepa salvaje y en el mutante *white pupa*.

	tiempo cero (mg/pupario)	48 horas (mg/pupario)	diferencia (mg/pupario)
salvaje	0,70 ± 0,13	0,12 ± 0,02	0,58 ± 0,13
<i>white</i>	0,59 ± 0,23	0,11 ± 0,03	0,48 ± 0,23
<i>niger</i>	0,67 ± 0,08	0,09 ± 0,22	0,58 ± 0,08

Como se ve en la Figura 45 (panel inferior), tanto el pupario salvaje como el de *white pupa*, que inicialmente estaban altamente hidratados (65,6% y 57,8% de contenido de agua respectivamente), sufrieron una dramática deshidratación hasta alcanzar un 18,2% y un 19,3% de agua respectivamente al final de la pupariación. Estos datos de pérdida de agua cuticular fueron parecidos a los hallados anteriormente en el pupario de la Mosca de la Carne *Sarcophaga bullata* (Fraenkel y Rudall, 1940).

Nuestros resultados están en clara contradicción con el modelo que postula que el agua es desplazada por las catecolaminas que se incorporan a la cutícula durante la esclerotización, ya que hemos demostrado que la deshidratación cuticular se produce normalmente en un mutante que no incorpora catecolaminas a la cutícula.



**Figura 45- Panel superior:** Fuerza necesaria para comprimir un anillo de pupario hasta el 50% de su diámetro dorso-ventral. Los datos que se muestran son medias de al menos 5 determinaciones independientes. **Panel inferior:** pérdida de agua cuticular durante la pupariación. El contenido de agua del pupario se estimó como la diferencia entre el peso húmedo y el peso seco. Los valores están expresados como porcentajes del peso húmedo de la cutícula y representan la media de, al menos, 12 determinaciones independientes. (Wappner y Quesada-Allué, manuscrito en prensa).

#### **4- El mutante *Black pupa* es defectivo en el aminoácido $\beta$ -alanina**

Los pigmentos negros de las cutículas de insectos son melaninas que se forman por reacciones de polimerización de precursores que, a su vez, son producto de oxidación de la dopamina. Estudios en la polilla *Manduca sexta*, el escarabajo *Tribolium castaneum*, la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* y la cucaracha *Blatella germanica* (Hopkins y col., 1984; Jacobs, 1985; Kramer y col., 1984; Roseland y col., 1987; Czapla y col., 1989; 1990 A,B,C), muestran una correlación entre altos niveles de dopamina en la cutícula y la formación de melanina. Por otro lado, se sabe que la síntesis de NBAD está directamente involucrada en la esclerotización de las proteínas cuticulares dando como resultado una cutícula de color marrón (Hopkins y col., 1982; Kramer y Hopkins, 1987; Hopkins y Kramer, 1992).

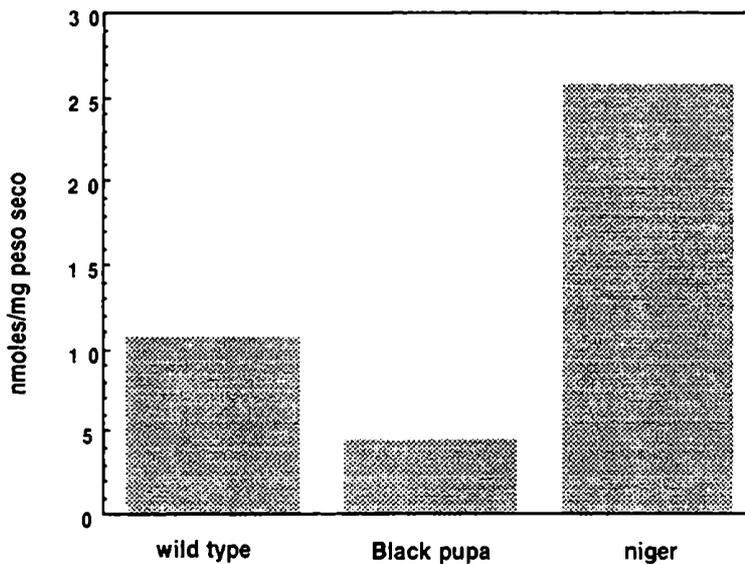
Existen mutaciones en *Ceratitis capitata* que generan puparios melánicos (Wappner, 1989; Wappner y col., 1991; Rossler y Koltin, 1976; Manso y Lifschitz, 1979). Uno de estos mutantes, *niger*, resultó ser recesivo y un segundo mutante melánico, *Black pupa*, es semidominante (Lifschitz, 1985; Wappner, 1989). El fenotipo de los puparios homocigotas para *niger* son indistinguibles de los homocigotas para *Black pupa*, ya que en ambos casos se observa una excesiva melanización. En la primera sección de Resultados, se describió el proceso de pupariación de la cepa salvaje y de los mutantes melánicos encontrándose que, desde un principio, las coloraciones que adoptan ambos tipos de puparios son diferentes. Esto indica que los procesos bioquímicos que tienen lugar en los puparios melánicos son diferentes de los del tipo salvaje.

En esta sección, se identifica cuál es el defecto bioquímico que causa el fenotipo melánico del mutante *Black pupa*, dilucidando, por lo tanto, cuáles son las bases de la determinación del color del pupario de *Ceratitis capitata*.

##### **4.1- El contenido endógeno de $\beta$ -alanina de *Black pupa* es muy inferior al de la cepa salvaje**

Como se señaló en la Introducción, se sabe que mutantes melánicos de otras especies son defectivos en la síntesis de BALA (Hodgetts, 1972; Hodgetts and Choi, 1974; Kramer et al, 1984; Czapla et al., 1989). Para determinar si el fenotipo del mutante *Black pupa* de *Ceratitis capitata* estaba causado

por un defecto en BALA, se midieron los niveles de este aminoácido en homogenatos de cuerpo entero de pre-pupas de 3 horas de edad. Como se muestra en la Figura 46, el contenido de BALA de la cepa salvaje fue de 10,8 nmoles/mg de peso seco, lo cual representa un 3,4 % del contenido total de aminoácidos. Por su parte, el contenido de BALA en el mutante *Black pupa* fue de sólo 4,5 nmoles/mg de peso seco (1,7% del total de aminoácidos)(Wappner y col., manuscrito en prensa). El mutante *Black pupa*, por lo tanto, resultó tener cerca de la mitad de BALA endógena de la de la cepa salvaje. Por otra parte, el mutante *niger* mostró niveles de catecolaminas mucho mayores, cercanos al doble de los de la cepa salvaje (se discute en la sección correspondiente a este mutante).



**Figura 46-** Contenido endógeno de  $\beta$ -alanina de prepupas de 3 horas en la cepa salvaje y en los mutante melánicos *Black pupa* y *niger* de *Ceratitis capitata*.

#### 4.2- *Black pupa* recobra el fenotipo salvaje luego de una inyección de $\beta$ -alanina

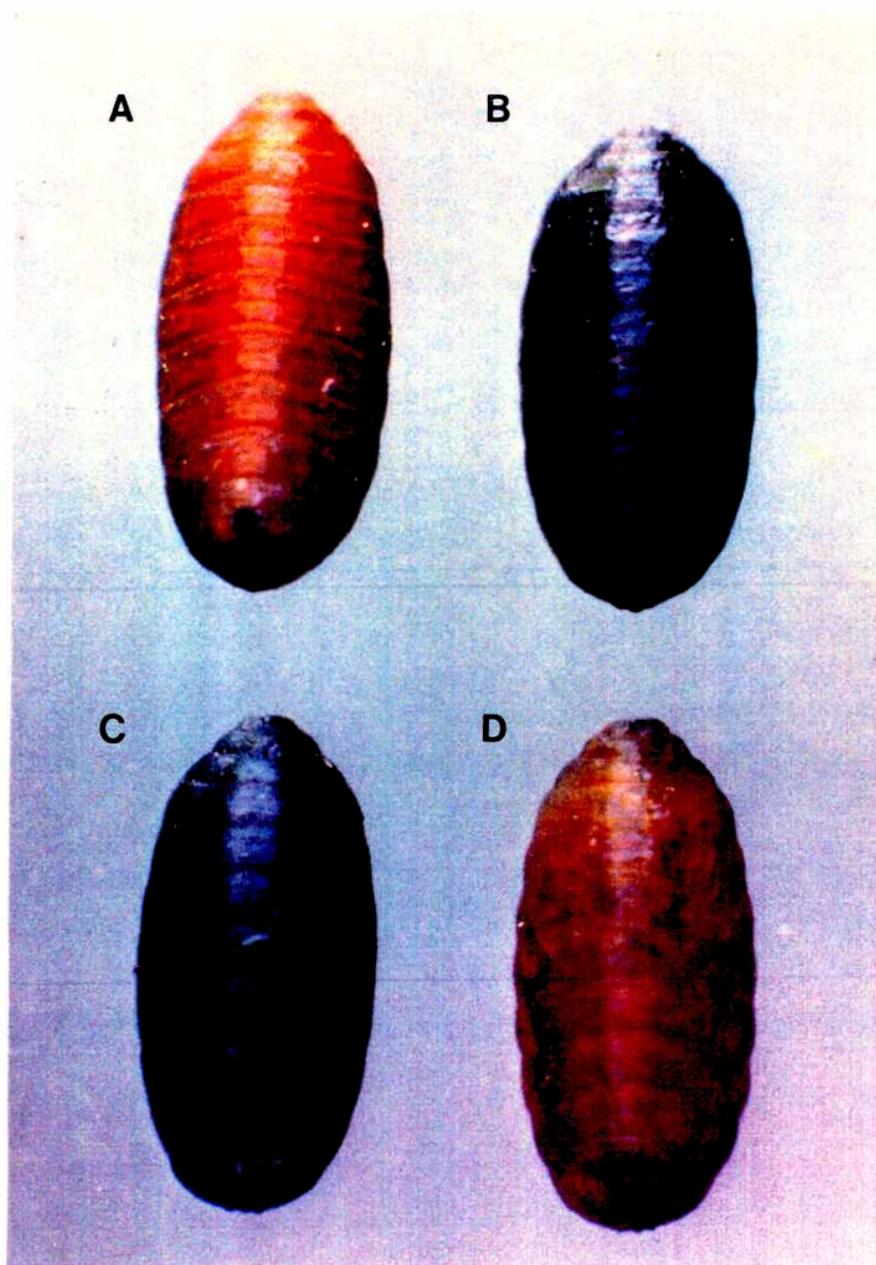
Como el mutante *Black pupa* resultó tener niveles disminuidos de  $\beta$ -alanina era importante determinar si ésta era realmente la causa del fenotipo melánico del pupario. Para ello, se microinyectaron prepupas de la cepa mutante con BALA. Como se muestra en la Tabla 5, la administración de BALA por encima de cierto umbral fue suficiente para que el mutante recuperara la tanificación normal.

Como se ve en la Figura 47-D, el mutante *Black pupa* recuperó totalmente el fenotipo salvaje cuando se lo inyectó con 18  $\mu$ g de BALA (Wappner y col., manuscrito en prensa). Cuando se inyectaron entre 5,3 y 10,6  $\mu$ g de BALA se obtuvo un fenotipo de coloración intermedia similar al del heterocigota. Cuando se inyectaron 3,6  $\mu$ g o menos no se observaron variaciones en el fenotipo del mutante (Tabla 5). Cuando L-alanina o solución salina (Chen, 1968) fueron inyectadas como controles negativos, tampoco se observaron cambios en el fenotipo. Los dos alelos disponibles de *Black pupa*, *B<sup>n</sup>* y *BP*, fueron comparados y ambos se comportaron en forma idéntica frente a las microinyecciones con BALA.

En forma similar, se intentó revertir el fenotipo del mutante mediante una inyección con N- $\beta$ -alanildopamina; sin embargo, con dosis de hasta 200  $\mu$ g por animal no se registró ningún cambio fenotípico.

Como se sugirió previamente para otras especies de insectos (Ujvary y col., 1987; Kramer y Hopkins, 1987; Hopkins y Kramer, 1992), un defecto en la síntesis de BALA y, por lo tanto también de NBAD, lleva a la acumulación de altas cantidades de dopamina libre, la cual entraría en la vía biosintética alternativa que conduce a melanina. Si esto fuera cierto en *Ceratitis capitata*, el suministro exógeno de dopamina inyectada en la cepa salvaje debería inducir melanización, produciendo, de este modo, fenocopias del mutante *Black pupa*.

Esto fue lo que en efecto ocurrió; cuando se inyectaron 92  $\mu$ g por insecto de dopamina en la cepa salvaje, el pupario se melanizó por completo (Fig. 47-C). La inyección de 72  $\mu$ g dio por resultado un fenotipo intermedio, mientras que la inyección de 47  $\mu$ g no produjo cambio fenotípico aparente (Tabla 5). La inyección de una solución saturada de DOPA o de solución salina tampoco produjeron cambios en el fenotipo.



**Figura 47-** Manipulación del fenotipo cuticular en pre-pupas de la cepa salvaje y del mutante *Black pupa* mediante micro-inyecciones de dopamina y  $\beta$ -alanina. (A) Cepa salvaje (marrón rojizo); (B) *Black pupa* (negro); (C) pre-pupa salvaje inyectada con 92  $\mu$ g de dopamina (negro); (D) mutante *Black pupa* inyectado con 18  $\mu$ g de  $\beta$ -alanina (marrón rojizo). Los lugares de inyección se ven en la base de los puparios por la presencia de un punto negro (Wappner y col., manuscrito en prensa).

Para confirmar que la pigmentación final del pupario es el resultado de las concentraciones relativas de dopamina y BALA, se co-inyectaron diversas cantidades de ambos metabolitos. Se pudo verificar que la BALA co-inyectada junto con dopamina en la cepa salvaje, inhibió la inducción de fenocopias del mutante melánico en forma dependiente de la relación de concentraciones de ambos metabolitos (Tabla 5). De forma similar, la reversión a salvaje del fenotipo de *Black pupa*, que se inducía con BALA, fue parcialmente bloqueada por la co-inyección de dopamina (Tabla 5).

**Tabla 5-** Efecto de microinyecciones de dopamina y la  $\beta$ -alanina en el fenotipo de prepupas salvajes y melánicas. Los fenotipos fueron registrados 24 horas luego de las inyecciones.

<b>Cepa inyectada</b>	<b>Dopamina <math>\mu</math>g/animal</b>	<b><math>\beta</math>-alanina <math>\mu</math>g/animal</b>	<b>Fenotipo observado</b>
<b>Salvaje</b>	47	0	marrón-rojizo
	72	0	intermedio
	92	0	negro
	72-183	18	intermedio
	183	53	marrón-rojizo
	0	53	marrón-rojizo
<b><i>Black pupa</i></b>	0	3,6	negro
	0	5,3-10,6	intermedio
	0	18	marrón-rojizo
	072-183	18	intermedio
	183	53	marrón-rojizo
	183	0	negro
<b><i>niger</i></b>	0	214	negro

### 4.3- Las concentraciones endógenas de catecolaminas en *Black pupa* están alteradas

Es bien sabido que la  $\beta$ -alanina se conjuga con dopamina para dar NBAD, el cual es uno de los precursores principales de la esclerotización de la cutícula de los insectos (Hopkins y col., 1982; Hopkins y Kramer, 1992). Por lo tanto, se espera que mutantes defectivos en BALA sean además, defectivos en NBAD. En este caso, se esperaría que luego de la inyección de  $\beta$ -alanina, los mutantes no sólo recuperaran el fenotipo normal, sino también los niveles normales de NBAD.

Para investigar si esto realmente ocurre en el mutante *Black pupa*, se midieron los niveles endógenos de catecolaminas en dicho mutante inyectado ya sea con solución salina o inyectado con BALA. Los datos obtenidos se compararon con las concentraciones de catecolaminas obtenidas en la cepa salvaje. En la Figura 48, se muestran los patrones cromatográficos de catecolaminas, obtenidos a partir de homogenatos totales de las cepas mencionadas, como así también los del mutante *niger* (los datos correspondientes a este mutante se discuten en la próxima sección). Los picos principales en el cromatograma de la cepa salvaje corresponden a dopamina, N-acetildopamina y NBAD. En la Figura 48, puede observarse que el mutante *Black pupa* tiene un contenido de NBAD de 6 a 8 veces menor que el de la cepa salvaje y que el contenido de dopamina es de 15 a 30 veces mayor (Tabla 6).

Cuando se inyectaron 50  $\mu$ g de BALA/insecto en el mutante *Black pupa*, no sólo se recuperó el fenotipo salvaje, sino que también se restauró el perfil normal de catecolaminas, ya que se incrementó la concentración de NBAD y los niveles de dopamina se redujeron significativamente (Fig. 48; Tabla 6). Los niveles de NADA resultaron ser mucho más altos en el mutante *Black pupa* que en la cepa salvaje (Fig. 48). Las pre-pupas de la cepa salvaje inyectadas con BALA no mostraron cambios con respecto a los niveles de dopamina y NBAD.

En el mutante *niger*, se vio que el perfil de catecolaminas endógenas fue muy parecido al de *Black pupa*. Sin embargo la inyección de  $\beta$ -alanina no produjo la recuperación ni del fenotipo salvaje (Tabla 5), ni del perfil normal de catecolaminas endógenas (Fig. 48). En la Figura 48 puede verse que cuando se inyectó al mutante *niger* con  $\beta$ -alanina se produjo la inducción de una sustancia desconocida que eluye entre la dopamina y la N-acetildopamina. Este punto en particular se discutirá más adelante en la sección correspondiente al mutante *niger*.

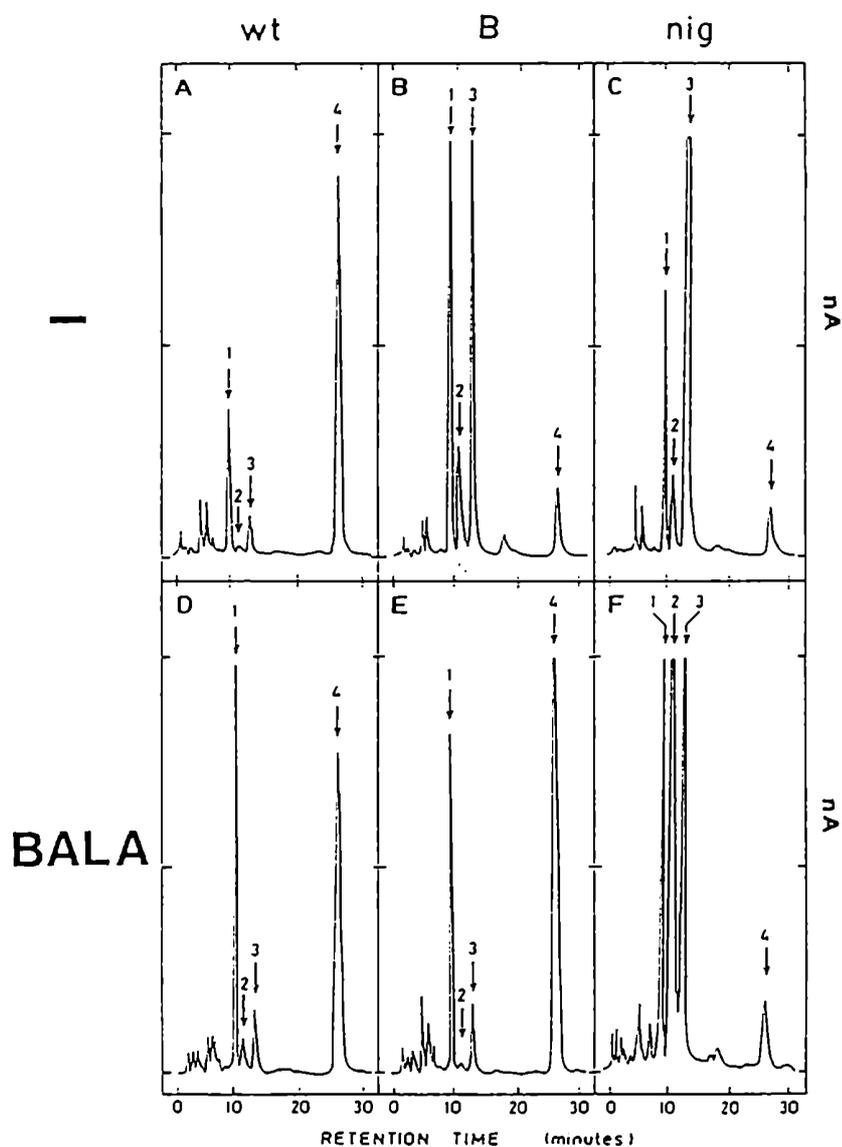
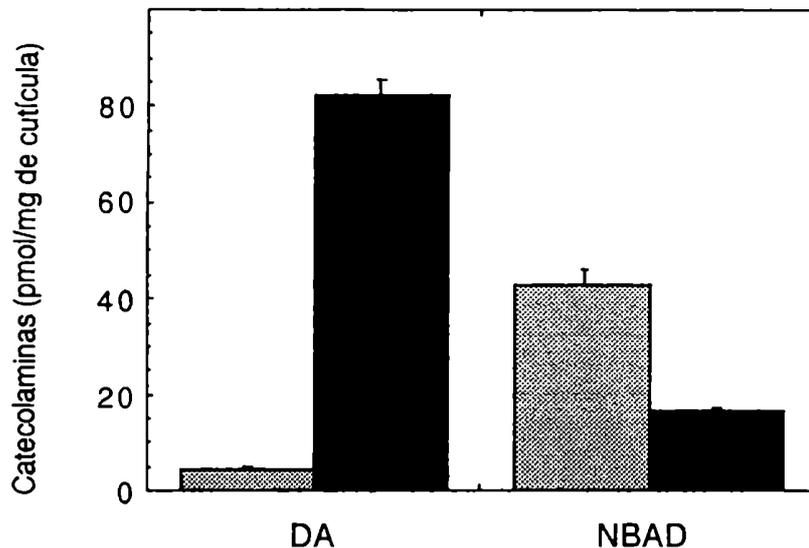


Figura 48- Perfil de catecolaminas en extractos de cuerpo entero de prepupas de 3 horas resueltas por HPLC utilizando una columna de fase reversa (Métodos). Picos: 1, Dopamina; 2, compuesto desconocido; 3, N-acetildopamina; 4, N- $\beta$ -alanildopamina. Panel A, Cepa salvaje; panel B, mutante *Black pupa*; panel C, mutante *niger*; panel D, salvaje inyectado con 50  $\mu$ g de  $\beta$ -alanina; panel E, *Black pupa* inyectado con 50  $\mu$ g de  $\beta$ -alanina; panel F, *niger* inyectado con 50  $\mu$ g de  $\beta$ -alanina. (Wappner y col., manuscrito enviado).

Tabla 6- Concentración de catecolaminas en extractos de cuerpo entero de prepupas de la cepa salvaje y del mutante *Black pupa* de *Ceratitis capitata*. Los valores están expresados en  $\mu$ moles/prepupa. Las inyecciones fueron de 50  $\mu$ g de  $\beta$ -alanina/animal.

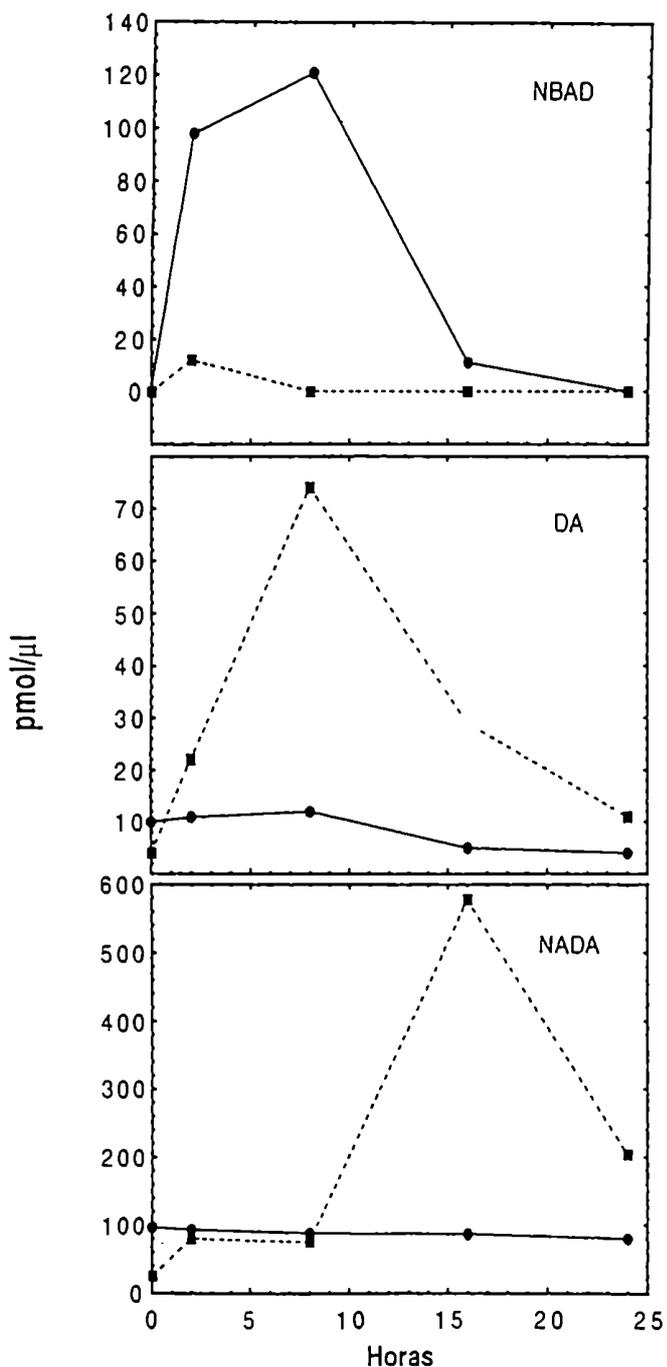
Cepa	Inyección de $\beta$ -alanina	Dopamina	NBAD
Salvaje	no	0,08 $\pm$ 0,00	3,02 $\pm$ 0,35
	si	0,16 $\pm$ 0,03	3,96 $\pm$ 0,59
<i>Black pupa</i>	no	1,17 $\pm$ 0,14	0,43 $\pm$ 0,08
	si	0,18 $\pm$ 0,05	3,63 $\pm$ 1,18
<i>niger</i>	no	2,40 $\pm$ 0,08	0,54 $\pm$ 0,13
	si	2,05 $\pm$ 0,58	0,88 $\pm$ 0,21

A esta altura, era importante determinar si el perfil anormal de catecolaminas que encontramos en homogenatos totales del mutante *Black pupa*, se observaba también en el pupario y en la hemolinfa o, si por el contrario, existía alguna anomalía en la distribución de las catecolaminas como la encontrada en el mutante *white pupa*. Se analizaron las catecolaminas extraídas de puparios a las 48 horas luego del comienzo de la pupariación (cuando la pupariación ya se ha completado) en la cepa salvaje y en el mutante *Black pupa*. En el pupario de *Black pupa*, la concentración de N- $\beta$ -alanildopamina (NBAD) resultó ser mucho mas baja que en la cepa salvaje, mientras que la concentración de dopamina es mucho mayor que la de la cepa salvaje (Fig. 49).



**Figura 49-** Composición de catecolaminas extraídas de puparios 48 horas después del inicio de la esclerotización. Columnas grises, cepa salvaje; columnas negras, *Black pupa*. Da, dopamina; NBAD, N-β-alanildopamina. Las concentraciones se calcularon comparando las catecolaminas extraídas de cutícula con estándares resueltos por HPLC. α-metilDOPA se usó como estándar interno para calcular la eficiencia de la recuperación de las catecolaminas. Cada punto es la media de dos determinaciones hechas sobre grupos de 6 puparios. (Wappner y col., manuscrito en prensa)

Las concentraciones de catecolaminas en la hemolinfa fueron medidas durante todo el proceso de pupariación. Los resultados, en general, mostraron un panorama similar al de los datos del pupario y a los de los homogenatos de cuerpo entero. Estos indicaron que el mutante *Black pupa* tiene niveles aumentados de dopamina en comparación con el tipo salvaje, mientras que la concentración de NBAD, es mucho menor que la del tipo normal a lo largo de todo el período del desarrollo estudiado (Fig. 50). La concentración de NADA también resultó ser mucho mas alta en el mutante (Fig. 50)



**Figura 50-** Variación de las concentraciones de catecolaminas en la hemolinfa durante el proceso de pupariación. El tiempo cero es el comienzo de la pupariación. Círculos, cepa salvaje; cuadrados, mutante *Black pupa*. Panel superior, N-β-alanildopamina; medio, dopamina; inferior, N-acetildopamina. Las concentraciones fueron calculadas por comparación con estándares resueltos por HPLC. α-metilDOPA fue usada como estándar interno para calcular la eficiencia de la recuperación de la alúmina. Cada punto representa la media de dos determinaciones. (Wappner y col., manuscrito enviado).

## **5- El mutante *niger* es defectivo para la NBAD sintetasa.**

Diversos mutantes melánicos de distintas especies de insectos han sido caracterizados desde el punto de vista bioquímico. Los mutantes *black* y *ebony* de *Drosophila melanogaster* (Jacobs, 1985; Wright, 1987), como así también, el mutante *Black* del escarabajo de la harina *Tribolium castaneum* (Kramer y col., 1984; Roseland y col., 1987), contienen bajos niveles de N-β-alanildopamina (NBAD) en extractos preparados a partir del cuerpo entero del correspondiente insecto. Sin embargo, hasta donde sabemos y a pesar de la existencia de pre-anuncios (Wright, 1987), en ninguno de dichos mutantes se ha estudiado efectivamente la síntesis de NBAD.

Como se describió en la sección correspondiente al mutante *white pupa*, la NBAD es el principal precursor de esclerotización del pupario de *Ceratitis capitata* (Wappner y col., 1995). En la sección anterior, se mostró que el mutante *Black pupa* presenta niveles disminuidos de NBAD y niveles elevados de dopamina. Se encontró que la causa de esta composición anormal de catecolaminas es una deficiencia en los niveles del aminoácido β-alanina (BALA). Cuando este aminoácido se administró artificialmente por microinyección pudo comprobarse que, tanto el fenotipo salvaje como el patrón normal de catecolaminas, fueron recuperados (Wappner y col., en prensa).

Se describen en esta sección los estudios sobre el metabolismo de BALA y de NBAD en un segundo mutante melánico llamado *niger* y se los compara con los parámetros de la cepa salvaje.

### **5.1- *niger* no es capaz de utilizar la β-alanina para la esclerotización**

Al igual que en *Black pupa*, en el mutante *niger* se intentó restablecer el fenotipo salvaje mediante la inyección de BALA o NBAD. Sin embargo, las inyecciones de BALA no produjeron ningún cambio fenotípico, ni siquiera cuando se utilizaron dosis hasta 10 veces mayores que las que fueron efectivas en el mutante *Black pupa*. Al igual que en *Black pupa*, la inyección de NBAD, hasta concentraciones de 200 μg por animal, tampoco produjo cambios fenotípicos en el mutante *niger*.

Para intentar dilucidar cuál es el defecto bioquímico del mutante *niger*, estudiamos el destino de la BALA en dicho mutante y en la cepa salvaje 24 horas después de inyecciones de  $[^{14}\text{C}]\beta$ -alanina al comienzo de la pupariación.

Como se ve en la Figura 51, la incorporación de radioactividad al pupario del mutante melánico fue mucho menor que la registrada en el tipo salvaje. En *niger*, la mayor parte de la radioactividad fue eliminada por respiración como  $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$ . La radioactividad remanente en el cuerpo del insecto fue similar en ambas cepas. Es interesante destacar que, en individuos heterocigotas, la incorporación de marca ( $62,4\% \pm 1,7$ ) fue similar a la de la cepa salvaje (no se muestra). Considerando, que fenotípicamente, este gen es recesivo (Manso y Lifschitz, 1979; Wappner, 1989), es interesante que, desde el punto de vista genético, existe concordancia entre los datos bioquímicos y el fenotipo observado.

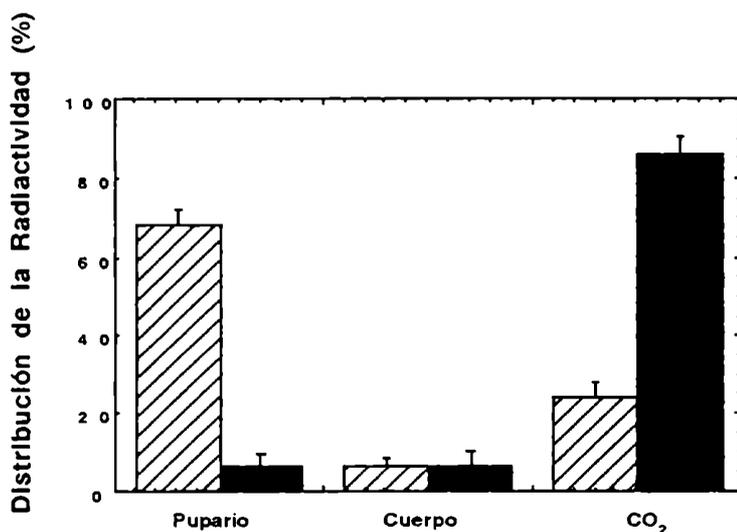
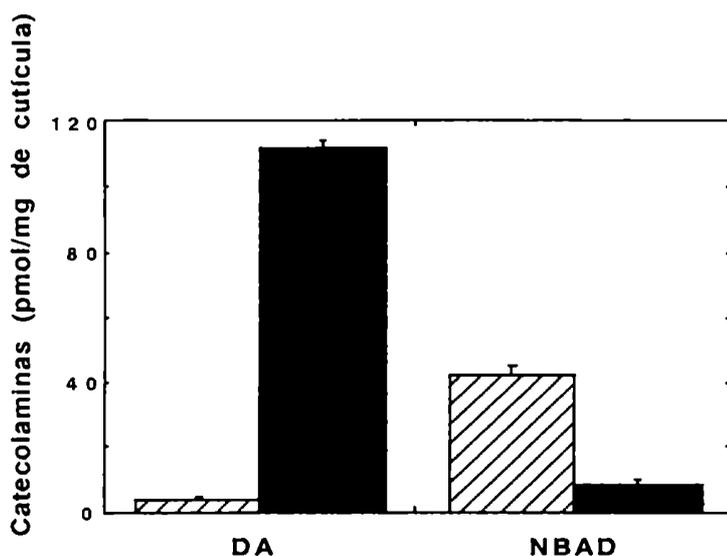


Figura 51- Utilización de  $\beta$ -alanina en la cepa salvaje y en el mutante *niger*. La radioactividad se midió en cada una de las fracciones 24 horas después de la inyección con  $[^{14}\text{C}]\beta$ -alanina. Columnas rayadas, cepa salvaje; columnas llenas mutante *niger*. (Wappner y col., manuscrito enviado)

## 5.2- Análisis de catecolaminas endógenas

Los análisis de catecolaminas purificadas a partir de homogenatos totales del mutante *niger* mostraron un patrón parecido al observado en el mutante *Black pupa*. Es decir, *niger* mostró niveles aumentados de dopamina y niveles disminuidos de NBAD, en relación con la cepa salvaje (Fig 48). Para investigar una posible anomalía en la distribución de las catecolaminas fue necesario medir las catecolaminas extraíbles de la cutícula, como así también las catecolaminas presentes en la hemolinfa a lo largo de todo el proceso de pupariación. Como se ve en la Figura 52, el contenido de dopamina en el pupario del mutante *niger* resultó ser unas 20 veces mayor que el del tipo salvaje. Los niveles de NBAD, en cambio, fueron unas 5 veces menores. En la cutícula de ambas cepas, sólo se detectaron trazas de N- $\beta$ -alanilnorepinefrina (NBANE) y N-acetildopamina (NADA).



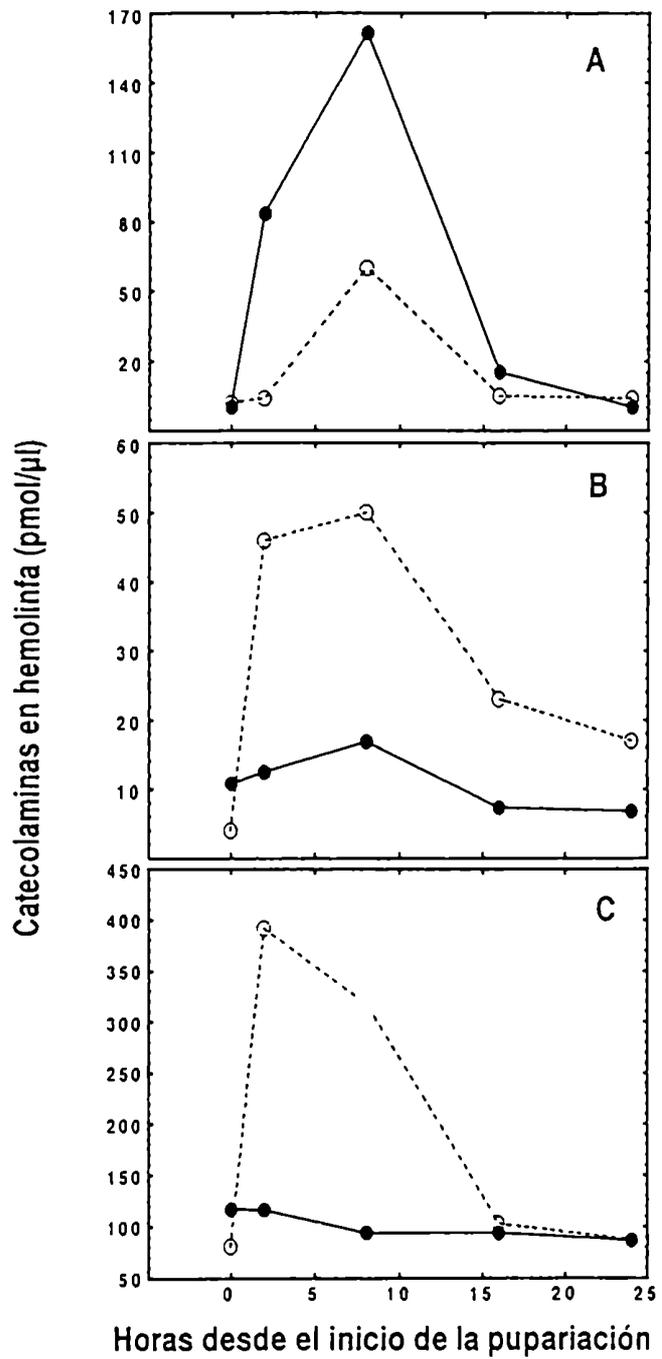
**Figura 52-** Catecolaminas extraídas de puparios 48 horas después del inicio de la esclerotización. Columnas ralladas, cepa salvaje; columnas llenas, mutante *niger*. DA, dopamina; NBAD, N- $\beta$ -alanildopamina. Las concentraciones se calcularon comparando las catecolaminas extraídas de la cutícula con estándares resueltos por HPLC.  $\alpha$ -metilDOPA se usó como estándar interno para calcular la eficiencia de la recuperación de las catecolaminas. Cada punto es la media de dos determinaciones hechas sobre grupos de 6 puparios. (Wappner y col., manuscrito enviado)

En la la Figura 53 se muestra que, en la hemolinfa, la situación resultó ser semejante. El contenido de dopamina en el mutante *niger* fue mucho más elevado que en la cepa salvaje durante toda la pupariación (Fig. 53-B) y los niveles de NBAD fueron siempre muy inferiores (Fig 53-A). La concentración de NADA fue notablemente alta en ambas cepas, pero, en el mutante melánico, fue muy superior (Fig. 53-C). Al igual que en el pupario, la NBANE fue hallada sólo en trazas.

Es interesante destacar que, aparte de altas cantidades de dopamina, el mutante *niger* mostró también concentraciones considerables de DOPA (no se muestra). Probablemente, la acumulación de DOPA sea consecuencia directa de los altos niveles de dopamina, ya que el equilibrio de reacción de la descarboxilación de DOPA podría estar desplazado hacia la acumulación de sustrato.

---

**Figura 53-** Variación de las concentraciones de catecolaminas en la hemolinfa durante el proceso de pupariación. El tiempo cero es el comienzo de la pupariación. Círculos abiertos, cepa salvaje; círculos llenos, mutante *niger*. Panel (A), N-β-alanildopamina; (B), dopamina; (C), N-acetildopamina. Las concentraciones fueron medidas por HPLC y calculadas comparando las catecolaminas de hemolinfa con estándares. α-metilDOPA fue usada como estándar interno para calcular la eficiencia de extracción que en ningún caso fue menor que el 75%. Cada punto representa la media de dos determinaciones (Wappner y col., manuscrito enviado) (ver Figura en la próxima página).



### 5.3- Presencia de un compuesto desconocido en el mutante *niger*.

Como se mostró en la Figura 48, en el perfil de catecolaminas del mutante *niger* se detectó un compuesto cuya movilidad no coincidió con la de ninguno de los estándares utilizados ni con ninguna de las catecolaminas descritas en insectos hasta la fecha. Se pensó, por lo tanto, que debido a la acumulación anormal de DOPA, en el mutante podría estar formándose N-β-alanilDOPA (ver Fig. 54), una sustancia que hasta el momento, no había sido nunca encontrada en insectos.

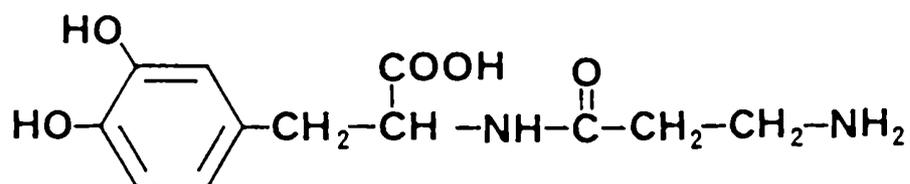


Figura 54- Estructura de la N-β-alanilDOPA. Hasta el momento, esta sustancia no ha sido encontrada en insectos.

Para verificar esta posibilidad, necesitábamos un estándar sintético que pudiera ser comparado con el compuesto incógnita en cuanto a su tiempo de retención en HPLC.

Como no existían reportes de que la N-β-alanilDOPA haya sido sintetizada anteriormente, nosotros lo intentamos basándonos en los conceptos generales del método de síntesis de N-β-alanildopamina utilizado por Morgan y colaboradores (1987).

El procedimiento que finalmente dio resultado fue el siguiente: Primero se unió L-DOPA con la β-alanina derivatizada (N-α-butiloxycarbonil-β-alanina-N-hidroxisuccimida) en tetraborato de potasio 10% que bloquea los grupos oxidrilo de los di-fenoles. Luego de sintetizada la unión, se desbloqueó el compuesto por agregado de ácido clorhídrico concentrado hasta llegar a pH 1,0. El producto de reacción fue separado por filtración en gel utilizando una columna BioGel P-2. Se colectaron fracciones, de las cuales se analizaron alícuotas por HPLC. Dos de las fracciones de la

columna BioGel P-2 resultaron contener una sustancia desconocida pura por criterio de HPLC. Su espectro de masa (realizado por el Dr. K. Kramer del Departamento de Agricultura de Estados Unidos en Manhattan, Kansas) mostró un peso molecular coincidente con el esperado para la N-β-alanilDOPA (ver Fig. 55).

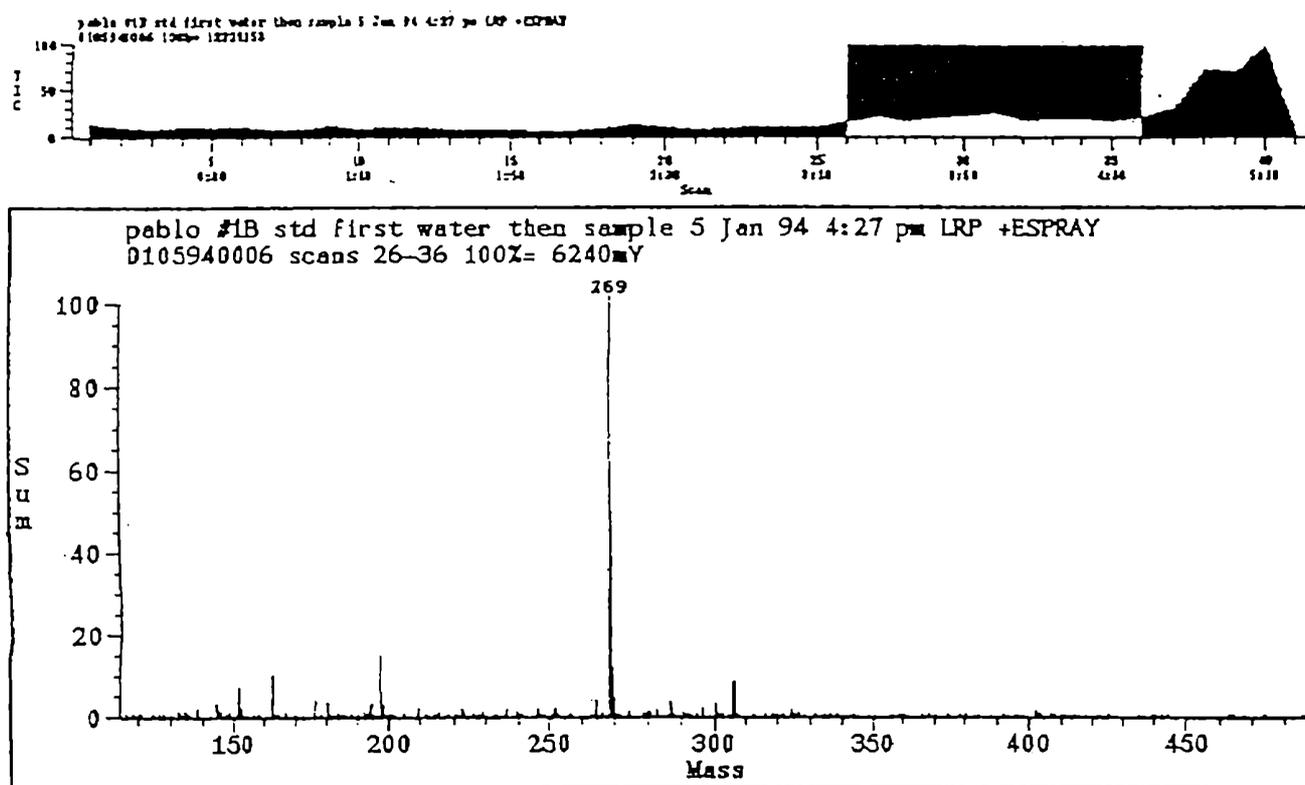


Figura 55- Espectro de Masa de la sustancia sintetizada. El peso molecular de 269 Da coincide con el que se espera para la N-β-alanilDOPA

Cuando se comparó en HPLC el tiempo de retención de la N- $\beta$ -alanilDOPA con el del compuesto desconocido, se vio que ambos no coincidieron. Por lo tanto, el sustancia incógnita no era N- $\beta$ -alanilDOPA. El compuesto desconocido fue purificado en una columna preparativa de HPLC, pero los intentos de hidrolizarlo y analizar las partes que lo componen resultaron infructuosos.

#### 5.4- El mutante *niger* es defectivo para la síntesis de NBAD *in vivo*

Los datos de concentración de catecolaminas, como así también la imposibilidad de recuperar el fenotipo salvaje por inyección de BALA, sugerían que el mutante *niger* era incapaz de sintetizar NBAD a partir de sus precursores,  $\beta$ -alanina y dopamina. Para estudiar esta posibilidad, se analizó *in vivo* la síntesis de esta sustancia. Para esto, se utilizó BALA radioactiva como sustrato, la cual fue microinyectada al comienzo de la pupariación. Luego de una incubación de tres horas, se extrajeron y analizaron las catecolaminas radio-marcadas.

En la Figura 56, se muestra que, en la cepa salvaje, aparecieron dos picos radiactivos en el cromatograma de HPLC. Utilizando dos fases móviles diferentes (ver métodos), el tiempo de retención de las dos sustancias coincidió, respectivamente con los de la BALA (sustrato) y la NBAD (producto). Otras  $\beta$ -alanil-catecolaminas, como por ejemplo, N- $\beta$ -alanil-norepinefrina no se sintetizaron en cantidades detectables. Cuando se analizó, de este modo, la síntesis de NBAD en el mutante *niger* (Fig. 56), se encontró que la conversión de BALA en NBAD fue alrededor de 10 veces menor que en la cepa salvaje. Este resultado indica fuertemente que el mutante *niger* es defectivo en la enzima que sintetiza NBAD.

En la próxima sección se muestra que la actividad enzimática medida en un sistema libre de células, también está muy reducida en el mutante *niger*.

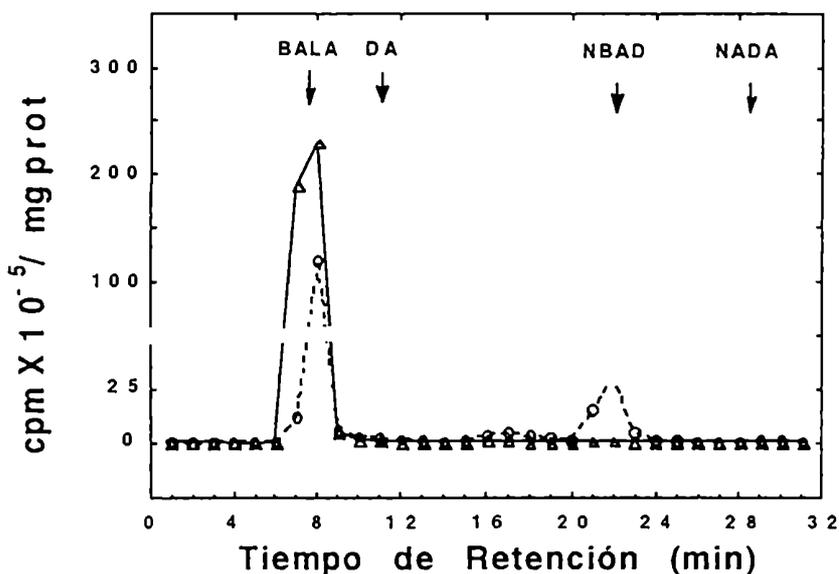


Figura 56- Actividad NBAD sintetasa *in vivo*. Se muestran las catecolaminas radiomarcadas luego de inyectar [ $^{14}\text{C}$ ] $\beta$ -alanina al comienzo de la pupariación; perfil de HPLC utilizando una columna de fase reversa C-18. Se utilizó la fase móvil II (ver Materiales y Métodos). Línea punteada: cepa salvaje; línea llena: mutante *niger*. BALA:  $\beta$ -alanina; DA: dopamina; NBAD: N- $\beta$ -alanildopamina; NADA: N-acetildopamina. Las cuentas por minuto (cpm) están referidas a 1 mg de proteína. Cada experimento fue repetido al menos dos veces con cada una de las fases móviles.  $\alpha$ -metildOPA se utilizó como estándar interno en el experimento *in vivo* para calcular la eficiencia de la extracción.

## 6- N- $\beta$ -alanildopamina sintetasa, la enzima clave en la síntesis del principal agente esclerotizante de la cutícula de los insectos

El último paso en la biosíntesis de las catecolaminas involucradas en la esclerotización cuticular es la acilación de la dopamina, ya sea con acetato o con  $\beta$ -alanina (BALA) para dar respectivamente NADA o NBAD (Brunet, 1980; Kramer y Hopkins, 1987; Wright, 1987) (ver Fig. 13 en la Introducción) que son los precursores de los dos principales agentes esclerotizantes de la cutícula de los insectos (Karlson y Sekeris, 1962;

Hopkins y col., 1982). NADA ha sido asociada con la esclerotización de cutículas no-coloreadas, mientras que NBAD estaría involucrada en procesos de esclerotización asociados con la típica coloración marrón-rojiza de la mayoría de las cutículas de insecto (Andersen, 1979; 1989-C). Si bien la enzima que sintetiza NADA ha sido estudiada en forma exhaustiva (Maranda y Hodgetts, 1977; Shampengtong y col., 1987), llamativamente, se sabe poco sobre la síntesis de NBAD (Krueger y col., 1989; 1990) y, por lo tanto, no existen estudios publicados sobre las características de la NBAD sintetasa.

NBAD es el principal precursor de agentes esclerotizantes del pupario de *Ceratitis capitata* (Wappner y col., 1995), por lo tanto, resultaba probable que la enzima que lo sintetiza fuera muy activa en esta especie. En la sección anterior demostramos que el mutante melánico *niger* es defectivo para la síntesis de NBAD. En esta sección, se presenta el desarrollo del ensayo de actividad para la NBAD sintetasa, la descripción de sus propiedades y requerimientos aparentes y una caracterización cinética preliminar de esta actividad. Asimismo, al final de la sección se compara la actividad enzimática en la cepa salvaje con la del mutante *niger*.

## 6.1- Desarrollo del ensayo de actividad

En la sección anterior, mostramos que se pudo medir la NBAD sintetasa *in vivo* analizando los productos de síntesis por HPLC. Para avanzar en la caracterización de la actividad enzimática, fue necesario desarrollar un ensayo de actividad rápido y sencillo. Si utilizábamos BALA radiactiva como sustrato, el ensayo debía estar basado en la separación de BALA (sustrato) de NBAD (producto).

Considerando que la BALA es un aminoácido y la NBAD es una catecolamina, decidimos aprovechar la capacidad que tiene este último grupo de moléculas de unirse diferencialmente a alúmina bajo pH alcalino (>8.3) y de despegarse a pH ácido (<3.0). De este modo, esperábamos que la NBAD, pero no la BALA, se adsorbiera a alúmina y poder de este modo determinar la cantidad de producto formado midiendo la radioactividad unida.

El ensayo que resultó eficaz es el siguiente: luego de detener la reacción con ácido y separar las proteínas por centrifugación, se alcaliniza el pH de la solución con buffer Tris-HCl pH 8.7 concentrado. A la solución resultante, se le agrega alúmina y se la incuba con agitación; la suspensión luego se coloca en una columna y se recoge el percolado. A continuación, se lava exhaustivamente la alúmina con buffer Tris-HCl pH 8.7 diluido y

las sustancias adsorbidas se eluyen con ácido acético 1 M (ver los detalles en la sección de Materiales y Métodos).

Para determinar si el ensayo funcionaba, tanto el percolado como el eluido fueron analizados por HPLC. Como se muestra en la Figura 57, toda la radioactividad del percolado corresponde a BALA, mientras que el 100% de radioactividad del eluido corresponde a NBAD.

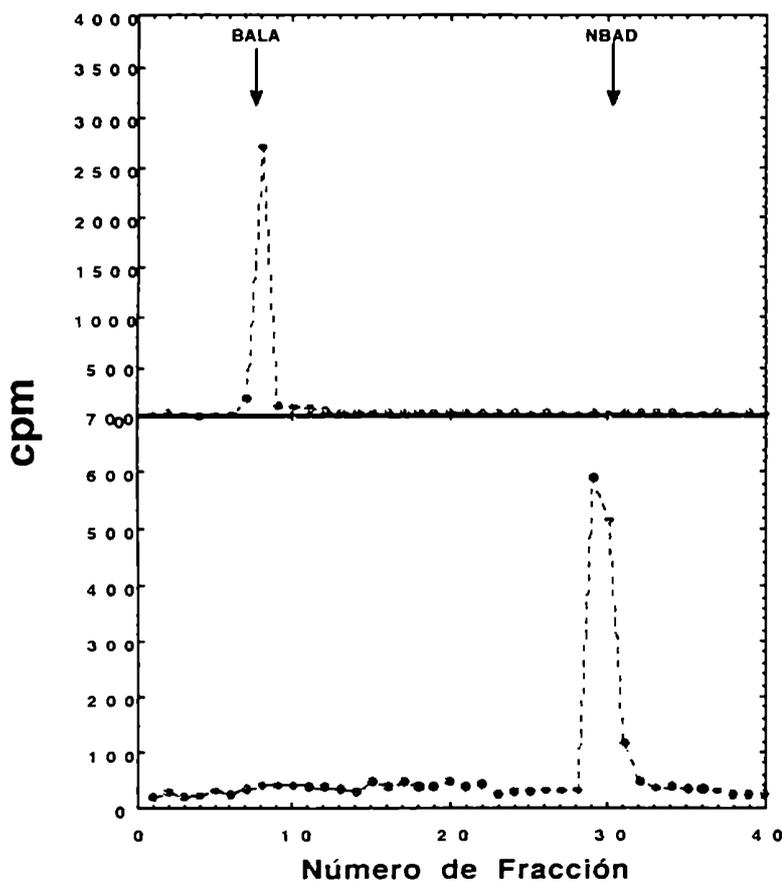


Figura 57- Ensayo de actividad de la NBAD sintetasa. Panel superior: Perfil cromatográfico de HPLC-fase reversa del material radioactivo no-adsorbido a la columna de alúmina. Panel inferior: perfil cromatográfico de HPLC-fase reversa del material adsorbido y eluido con ácido acético 1M de la columna de alúmina. Ambos perfiles fueron obtenidos utilizando la fase móvil II (ver Materiales y Métodos). BALA:  $\beta$ -alanina; NBAD: N- $\beta$ -alanildopamina (Wappner y col., manuscrito enviado).

Teníamos, por lo tanto, un ensayo de actividad rápido y sencillo que nos permitiría comenzar la caracterización de esta enzima nunca antes descrita y clave para la esclerotización de la cutícula de los insectos.

## **6.2- Características y requerimientos de la NBAD sintetasa**

Si bien, la enzima no exhibió pérdida de actividad al ser congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$ , resultó ser extremadamente inestable, incluso cuando se la conservaba en hielo en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (ver Materiales y Métodos). Se intentó estabilizarla por agregado de glicerol, polietilenglicol, agentes reductores, diferentes sales y manteniéndola a diferentes valores de pH, pero sin éxito. Por este motivo, los intentos de purificarla resultaron básicamente infructuosos y finalmente, se optó por proceder a su caracterización a partir de una fracción ligeramente enriquecida mediante un fraccionamiento con sulfato de amonio.

### *6.2.1- Requerimientos básicos aparentes de la actividad enzimática*

Como se muestra en la Tabla 7, la síntesis de NBAD requirió  $\text{Mg}^{2+}$  y ATP como fuente de energía para la síntesis del enlace entre los sustratos, dopamina y  $\beta$ -alanina. Cuando se hizo la incubación en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , la actividad se redujo a niveles levemente superiores a los del blanco y cuando se agregó EDTA 1 mM, la actividad remanente fue abolida. Los agentes reductores no parecen modificar sustancialmente la actividad, ya que el agregado de di-tiotreitol o  $\beta$ -mercaptoetanol en una concentración de 1 mM no tuvieron efectos significativos.

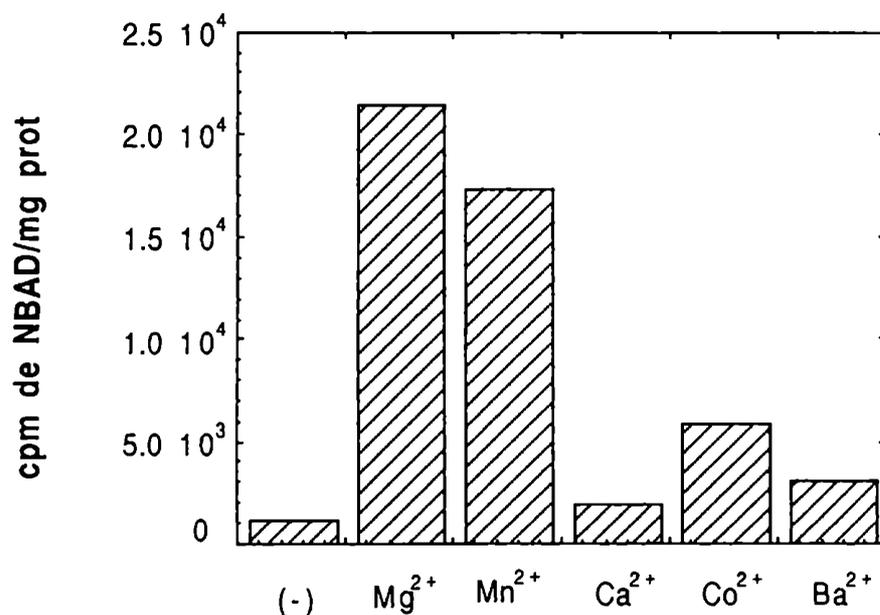
**Tabla 7-** Requerimientos básicos aparentes de la actividad NBAD sintetasa. En cada ensayo se agregaron 32  $\mu\text{g}$  de proteína del extracto enzimático. La incubaciones se realizaron en las condiciones estándar descritas en la sección de Materiales y Métodos con la modificación correspondiente indicada en cada caso.

Extracto enzimát.	ATP 1 mM	Mg <sup>2+</sup> 5 mM	EDTA 1 mM	DTT 1 mM	$\beta$ -Me 1 mM	NBAD 2 mM	Activ. relativa
-	+	+	-	-	-	-	0
+	+	+					100
+		+					3
+	+						7
+	+		+				0
+	+	+		+			107
+	+	+			+		96
+	+	+	-	-	-	+	115

La enzima no parece inhibirse por exceso de producto ya que el NBAD no-radiomarcado que se agregó en concentraciones de hasta 2 mM no inhibió la formación del producto radioactivo. Por el contrario, en la Tabla 7, se observa un aumento de un 15 % en la cantidad de producto formado al cabo de los 5 minutos de incubación. Con tiempos de incubación mas largos, el agregado de NBAD 2 mM a la mezcla de reacción produjo un aumento aún mayor en la acumulación de producto radioactivo (no se muestra). Esto probablemente se debió a que, al diluirse el NBAD radiomarcado con un gran exceso de NBAD no radioactivo, este último protejió al primero de la actividad que degrada NBAD (ver Fig. 74 al final de la sección de Resultados).

### 6.2.2- Dependencia de cationes divalentes

Para investigar si la sintetasa es activa con cationes distintos del  $Mg^{2+}$ , se reemplazó el  $Mg^{2+}$  por otros cationes divalentes.

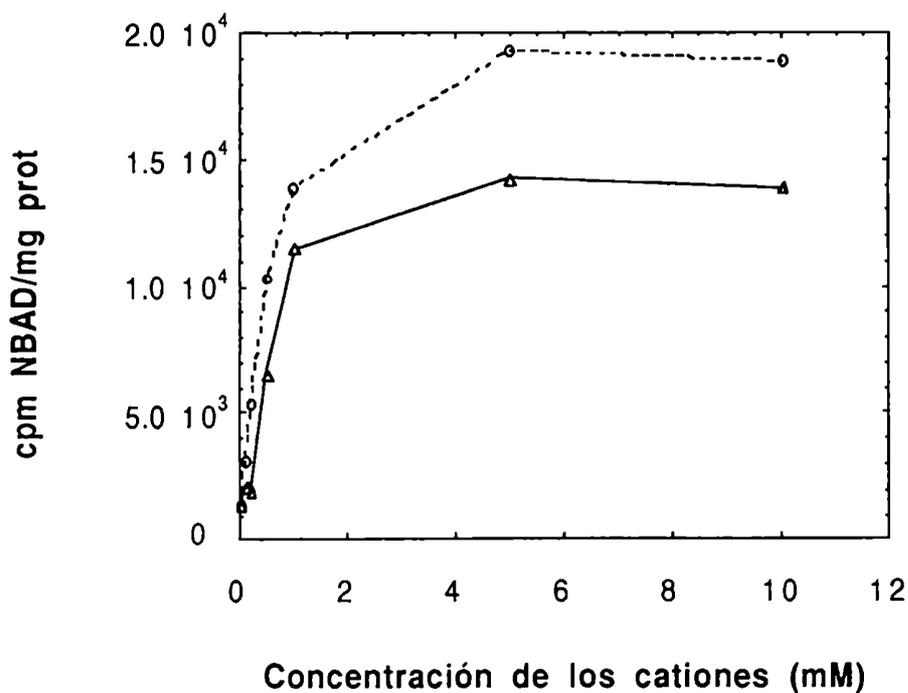


**Figura 58-** Efecto de cationes divalentes como activadores de la NBAD sintetasa. Las incubaciones se realizaron en las condiciones estándar descritas en la sección de Materiales y Métodos pero utilizando diferentes cationes divalentes en lugar del  $Mg^{2+}$ . La concentración de los cationes divalentes ensayados fue de 5mM en todos los casos y el contraión utilizado fue siempre  $Cl^{-}$ . (Experimento realizado en colaboración con Martín Pérez).

Como se ve en la Figura 58, la enzima fue capaz de funcionar con  $Mn^{2+}$  a un 75-80% de la eficiencia en comparación con el  $Mg^{2+}$ . Los demás cationes divalentes ensayados indujeron actividades mucho menores. La

actividad con  $\text{Ca}^{2+}$  fue de sólo un 10% de la registrada con  $\text{Mg}^{2+}$ , mientras que las actividades con  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  fueron del 14 y el 27% respectivamente (Fig. 58). El contra-ión utilizado fue, en todos los casos,  $\text{Cl}^-$ .

Con el objeto de estudiar cuantitativamente la actividad de la sintetasa en función de la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , se hicieron ensayos en los cuales se varió la concentración de dichos cationes entre 0,1 y 10 mM. Como se muestra en la Figura 59, la enzima mostró, ya con 0,1 mM de cualquiera de los dos cationes.

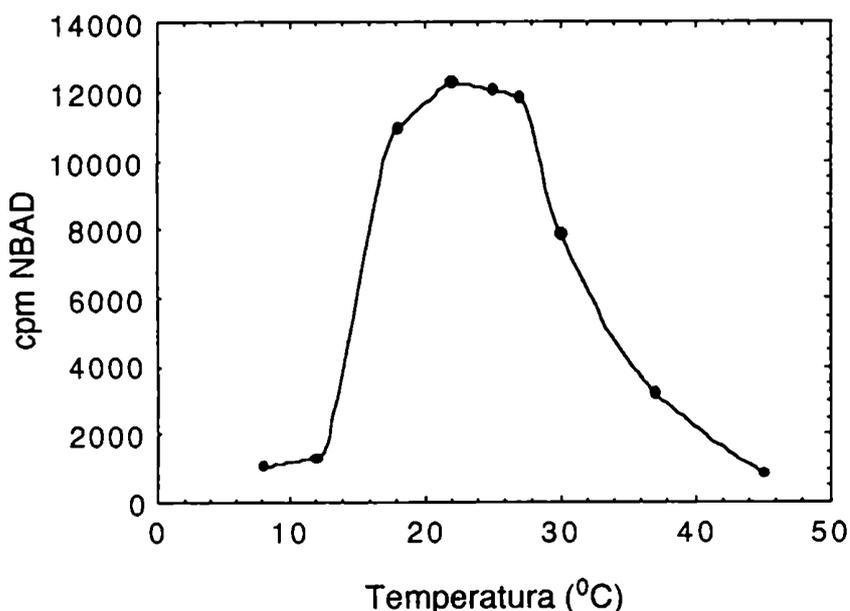


**Figura 59-** Actividad aparente de la NBAD sintetasa en función de las concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  (línea punteada) y  $\text{Mn}^{2+}$  (línea llena). Las incubaciones se realizaron en las condiciones estándar descritas en la sección de Materiales y Métodos pero utilizando  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$  en diferentes concentraciones. El contra-ión utilizado fue, en ambos casos  $\text{Cl}^-$  (experimento realizado en colaboración con Martín Pérez).

En ambos casos, se alcanzó la máxima actividad con una concentración de 5mM y la actividad con  $Mn^{2+}$  fue, en casi todo el rango de concentraciones ensayadas, entre un 70 y un 80% de la alcanzada con  $Mg^{2+}$ .

### 6.2.3- Dependencia de la temperatura

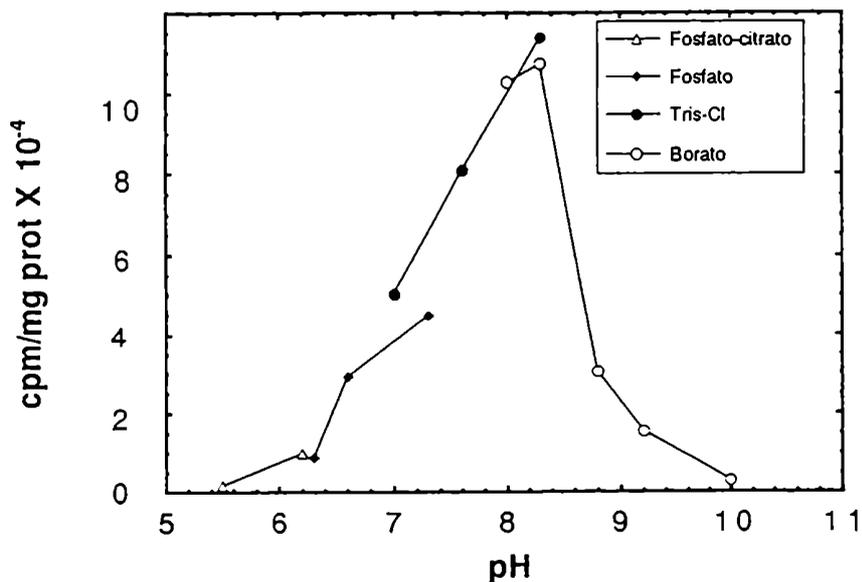
Cuando se estudió la dependencia de la actividad en función de la temperatura, se encontró que existe un rango que va de 18 a 25°C en el que la actividad parece ser máxima (ver Fig. 60). A 8 y 12°C, como así también a temperaturas de 45 °C la enzima resultó ser mucho menos activa.



**Figura 60-** Curva de temperatura de la NBAD sintética. Las incubaciones se realizaron en las condiciones estándar descritas en la sección de Materiales y Métodos pero variando la temperatura de incubación.

#### 6.2.4- Dependencia del pH

Cuando se estudió cómo variaba la actividad en función del pH, se encontró que el pH óptimo aparente de la actividad fue de alrededor de 8,4, aunque ésta se mantuvo bastante alta entre 7,2 y 8,4 (Fig 61). A valores de pH por debajo de 5,5 o por encima de 9,2 la actividad no fue detectable. Aparentemente, la actividad no varió con los diferentes tampones que se utilizaron en los valores de solapamiento de pH. Como se aprecia en la Figura 61, la actividad con buffer Fosfato-Citrato a pH 6,2 fue casi idéntica a la actividad con buffer Fosfato a pH 6,3; la actividad con buffer Fosfato a pH 7,2 fue similar a la actividad con buffer Tris-HCl a pH 7,1 y finalmente, las actividades a pH 8,2 de los buffers Tris-HCl y Borato fueron muy parecidas.



**Figura 61-** Curva de pH para la actividad NBAD sintética. La incubación se realizó en las condiciones estándar descritas en la sección de Materiales y Métodos pero variando los tampones de incubación. En todos los casos, la fuerza iónica de los tampones fue de 50 mM.

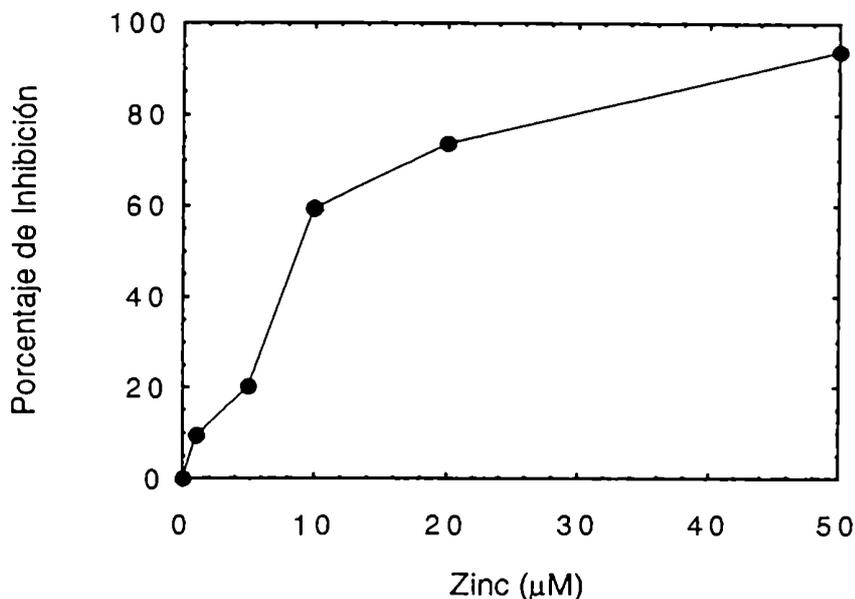
### 6.2.5- Metales inhibitorios

Se ensayó la actividad inhibitoria de diversos metales y se encontró que el cadmio, el zinc, el níquel y el mercurio, agregados en concentraciones de 5 mM exhibieron un fuerte efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática (Tabla.8).

**Tabla 8-** Inhibición de la actividad NBAD sintetasa por parte de diversos metales. Las incubaciones se realizaron en las condiciones estándar descritas en la sección de Materiales y Métodos pero con el agregado de diferentes metales. La concentración final de todos los metales ensayados fue de 5 mM y se usó  $\text{Cl}^-$  como contraión en todos los casos. (Experimento realizado en colaboración con Martín Perez).

<b>Metal</b> <b>(5 mM)</b>	<b>NBAD</b> <b>radiactiva</b> <b>(cpm)</b>
control	15519
Zinc	290
Níquel	1095
Cadmio	304
Mercurio	328

El efecto de los cationes  $\text{Zn}^{2+}$  fue estudiado en mayor detalle cuando se midió la actividad enzimática en un amplio rango de concentraciones. Como se muestra en la Fig,62, el  $\text{Zn}^{2+}$  resultó ser un poderoso inhibidor, ya que concentraciones superiores a 1  $\mu\text{M}$  produjeron niveles significativos de inhibición.



**Figura 62-** Curva de inhibición del  $Zn^{2+}$  sobre la actividad NBAD sintetasas. Las incubaciones se realizaron en las condiciones estándar descritas en la sección de Materiales y Métodos pero con el agregado de distintas concentraciones de  $ZnCl_2$  (Experimento realizado en colaboración con Martín Pérez).

### 6.2.6- Estudios cinéticos

Se varió la concentración de dopamina, manteniendo fija la concentración de  $\beta$ -alanina en 1 mM (a saturación) y se hicieron incubaciones de 5 minutos en las mismas condiciones de los experimentos de mas arriba. Se escogió un volumen de extracto enzimático de 3  $\mu$ l de manera que durante los 5 minutos de incubación, la velocidad de la reacción permaneciera constante, por lo cual las velocidades registradas pueden ser consideradas como velocidades iniciales (ver Fig 63).

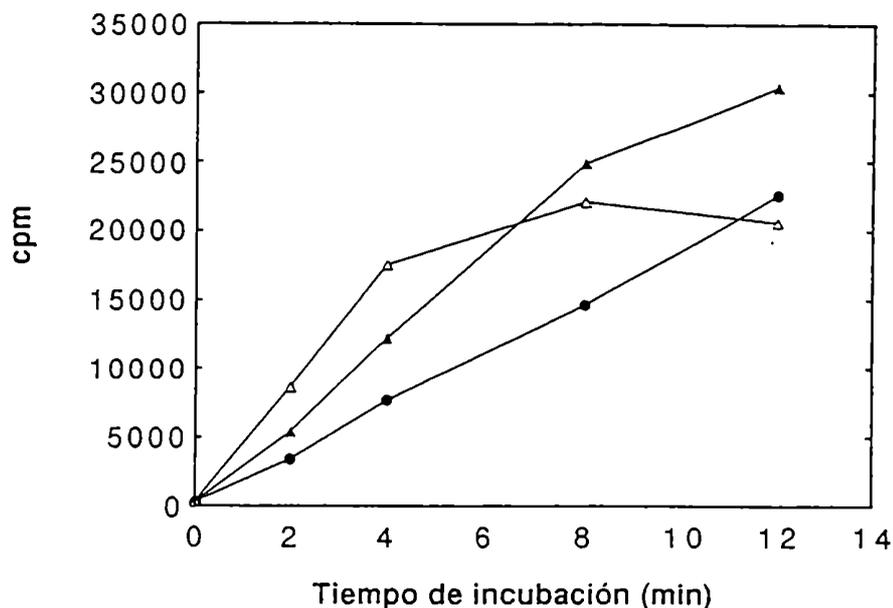


Figura 63- Acumulación de producto radioactivo en función del tiempo utilizando diferentes volúmenes de extracto enzimático. Círculos llenos, 1 µl de extracto; triángulos llenos, 3 µl de extracto; triángulos vacíos, 5 µl de extracto. La concentración proteica del extracto fue de 32 mg/ml. Las incubaciones se efectuaron en las condiciones estándar detalladas en Materiales y Métodos.

El agregado de β-alanina no-radioactiva en la mezcla de reacción hizo que el efecto de la dilución isotópica debiera ser tenido en cuenta. Por este motivo, se incrementó en 4 veces la cantidad de β-alanina radiomarcada que se adicionó a la mezcla de reacción ( $10^6$  cpm).

El gráfico de Lineweaver-Burk (1934) muestra que la  $K_M$  aparente para la dopamina resultó ser de aproximadamente 77 µM (Fig.64).

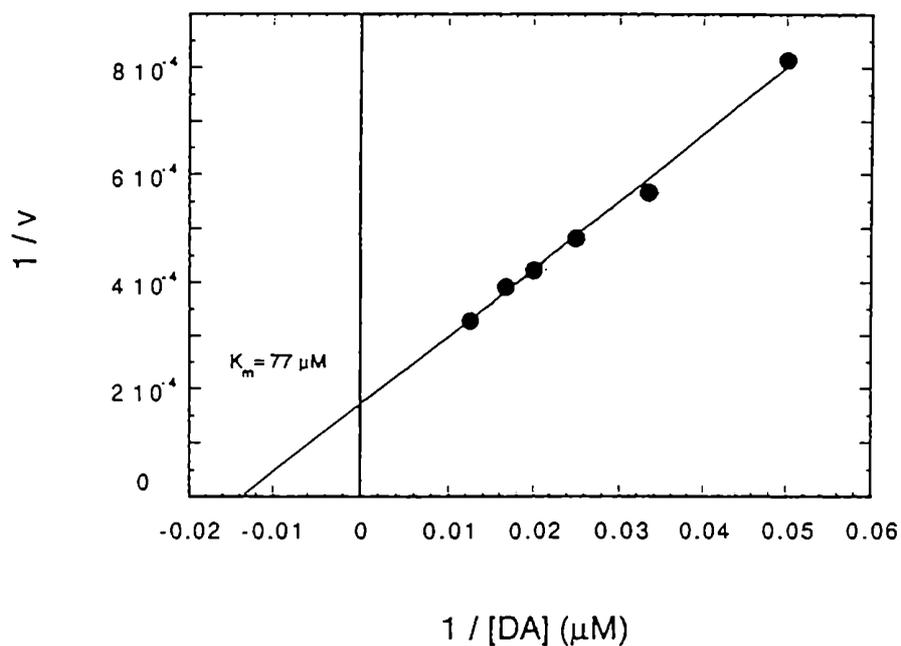


Figura 64- Gráfico de inversas Lineweaver-Burk para la actividad NBAD sintetasa. La velocidad de la reacción está expresada en cpm de [<sup>14</sup>C]NBAD formado por minuto y por miligramo de proteína. Las incubaciones se realizaron en las condiciones estándar descritas en la sección de Materiales y Métodos pero variando las concentraciones de dopamina.

Luego se trabajó variando la concentración de β-alanina. La dopamina se mantuvo en concentración saturante (1 mM); también en este caso se usaron 10<sup>6</sup> cpm de β-alanina por ensayo y los valores de [<sup>14</sup>C]NBAD obtenidos fueron corregidos multiplicando en cada caso por la concentración de β-alanina no-radioactiva agregada. El gráfico de Lineweaver-Burk (1934) muestra que la K<sub>M</sub> aparente medida para la dopamina fue de aproximadamente 170 μM (Fig.65).

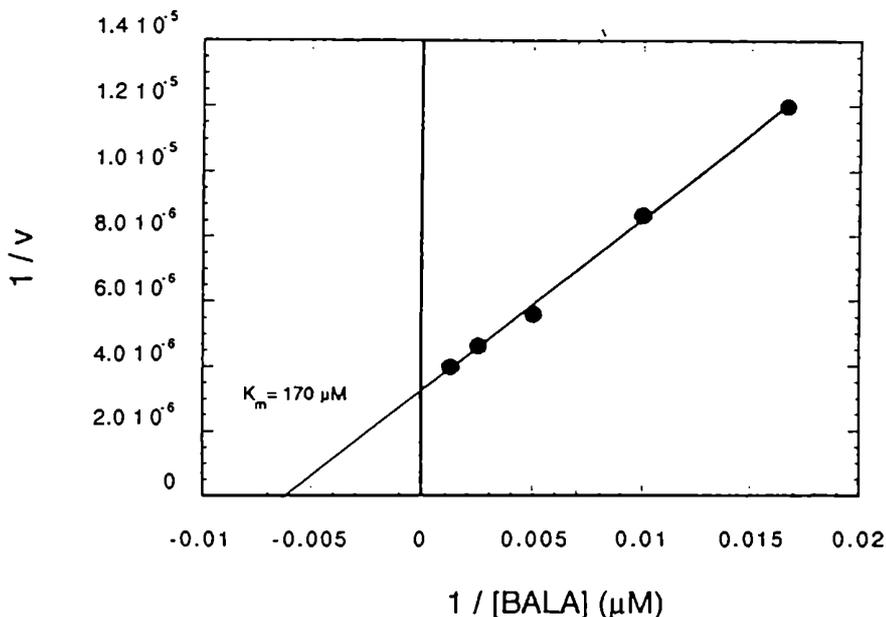


Figura 65- Gráfico de inversas de Lineweaver-Burk para la actividad aparente de la NBAD sintetasa. La velocidad de la reacción está expresada en cpm de  $[^{14}C]$ NBAD formado por minuto y por miligramo de proteína. Las incubaciones se realizaron en las condiciones estándar descritas en la sección de Materiales y Métodos pero variando las concentraciones de  $\beta$ -alanina no-radioactiva. Los valores de  $[^{14}C]$ NBAD fueron corregidos de acuerdo a la dilución isotópica.

### 6.2.7- Especificidad de sustrato

Resultados preliminares recientemente obtenidos en colaboración con Martín Pérez apoyan la hipótesis de que la actividad sintetizante de NBAD sintetasa cumpliría también una función en el sistema nervioso central de *Ceratitís capitata*.

Se realizaron experimentos destinados a evaluar la especificidad de sustrato, en los cuales se utilizaron otras aminas biogénicas como ligandos alternativos o como inhibidores competitivos de la reacción con dopamina. En cada uno de estos experimentos, se incubó la  $\beta$ -alanina

radiomarcada en presencia de dopamina y de una segunda amina biogénica no catecólica que fue agregada en una concentración diez veces superior a la de la dopamina. Los resultados indicaron que la tiramina, la octopamina, la triptamina y la serotonina competirían con la dopamina, inhibiendo la reacción de formación de NBAD. Por el contrario, la tirosina, la sinefrina y el triptofano no produjeron ningún efecto significativo (Fig. 66).

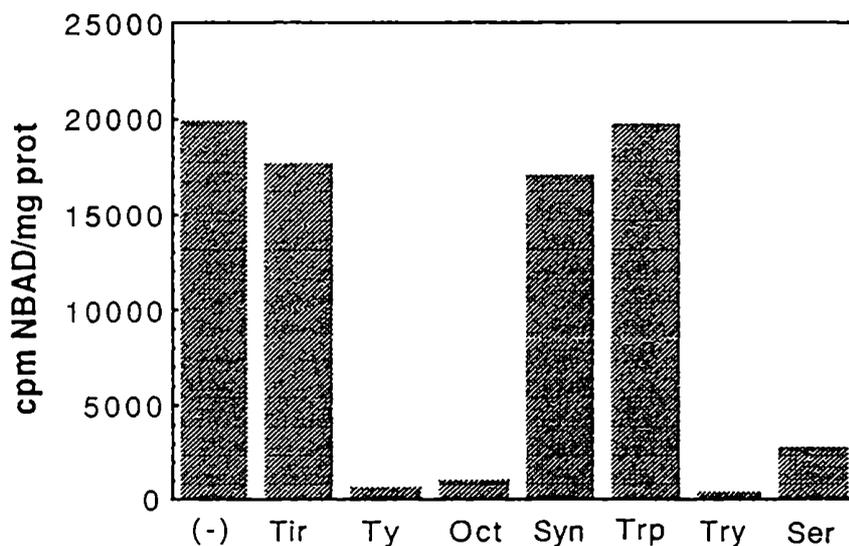


Figura 66- Inhibición de la síntesis de NBAD por diversas aminas biogénicas o aminoácidos. Tir, tirosina; Ty, tiramina; Oct, octopamina; Syn, sinefrina; Trp, triptofano; Try, triptamina; Ser, serotonina. Las incubaciones se realizaron en las condiciones estándar descritas en la sección de Materiales y Métodos para la síntesis de NBAD. Todas las aminas o aminoácidos fueron agregados en una concentración de 1 mM.

Nuestro ensayo enzimático basado en la adsorción específica de los  $\beta$ -alanil-catecoles a alúmina no sirve para detectar derivados monofenólicos o aminoindólicos de la  $\beta$ -alanina. Por lo tanto, con dicho ensayo, no fue posible dirimir si las aminas mencionadas actuaban como inhibidores de la enzima o si dichas aminas estaban siendo tomadas como sustratos alternativos, desplazando por su exceso a la dopamina en su reacción con  $\beta$ -alanina. Para distinguir entre estas dos posibilidades, analizamos por HPLC los productos de reacción luego de haber incubado cada una de las aminas mencionadas con [ $^{14}\text{C}$ ] $\beta$ -alanina, en ausencia de dopamina y en las mismas condiciones de reacción empleadas para la síntesis de NBAD.

En las Figuras 67, 68, 69 y 70, se puede ver que todas las aminas que inhibían la síntesis de NBAD en nuestro ensayo de actividad fueron capaces de dar conjugados radiomarcados que, al ser analizados por HPLC utilizando una columna de C-18, mostraron tiempos de retención que no coincidieron con los de ningún  $\beta$ -alanilconjugado conocido. Si bien resta confirmar la identidad química de estos  $\beta$ -alanil-conjugados, los datos sugieren fuertemente que la NBAD sintetasa sería capaz de sintetizar también  $\beta$ -alaniltiramina,  $\beta$ -alanil octopamina,  $\beta$ -alanil triptamina y  $\beta$ -alanil serotonina.

Nótese en las Figuras 67 y 68, como así también en la Figura 72, la presencia de dos picos que se repiten en todos los cromatogramas y que eluyen con tiempos de retención de 9,5 y 12 minutos respectivamente. El primero de dichos picos aumentó notablemente (2 a 3 veces) cuando la reacción de síntesis de  $\beta$ -alanil-conjugados se hizo utilizando octopamina como sustrato. Esto nos llevó a inferir que dicho pico correspondería a  $\beta$ -alanil octopamina. La presencia de este pico en los cromatogramas en los que se utilizaron otras aminas como sustrato sugiere que existen niveles endógenos de octopamina en el extracto enzimático que sirven como sustrato para la síntesis del conjugado radioactivo. El pico que eluyó a los 12 minutos también sería de un conjugado que se sintetizó a partir de algún sustrato endógeno pero en este caso, no tenemos indicios sobre su identidad química.

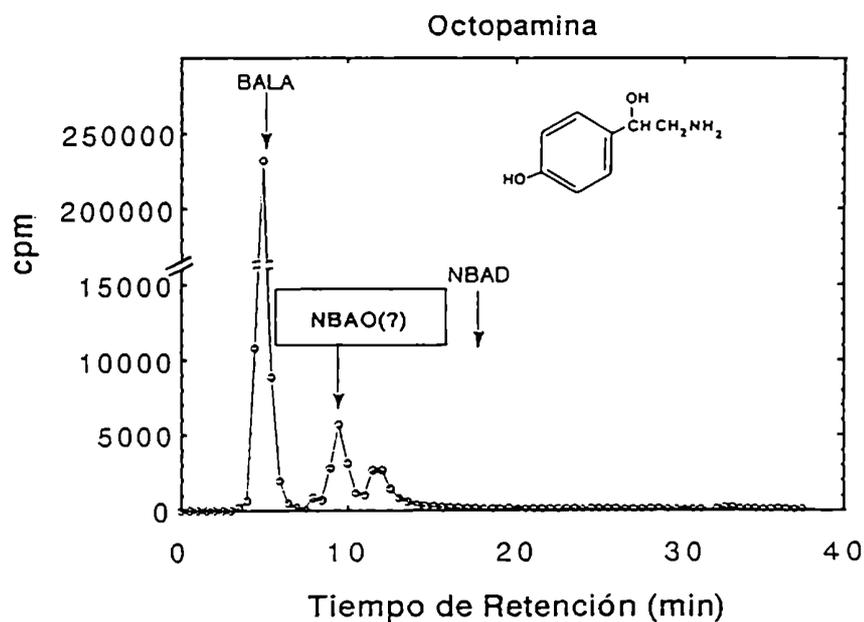
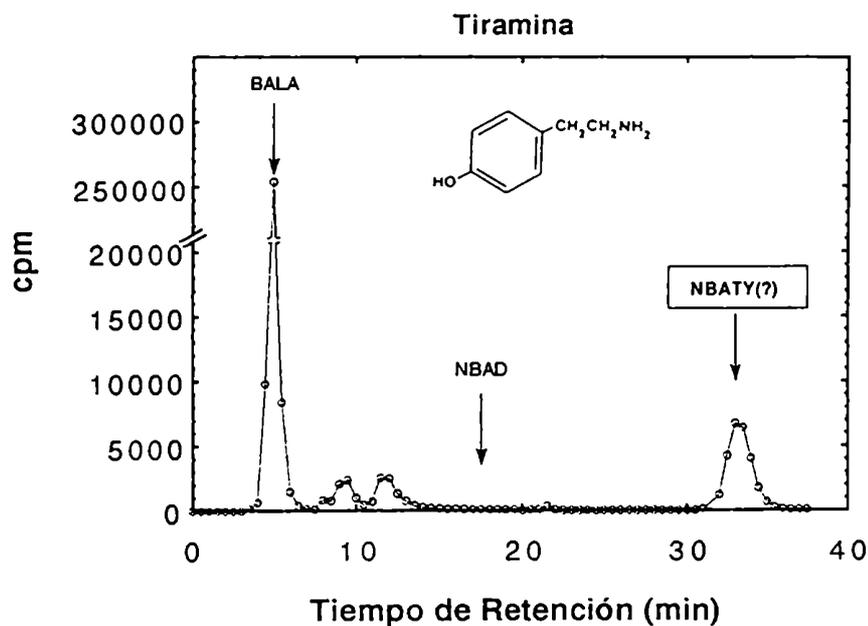
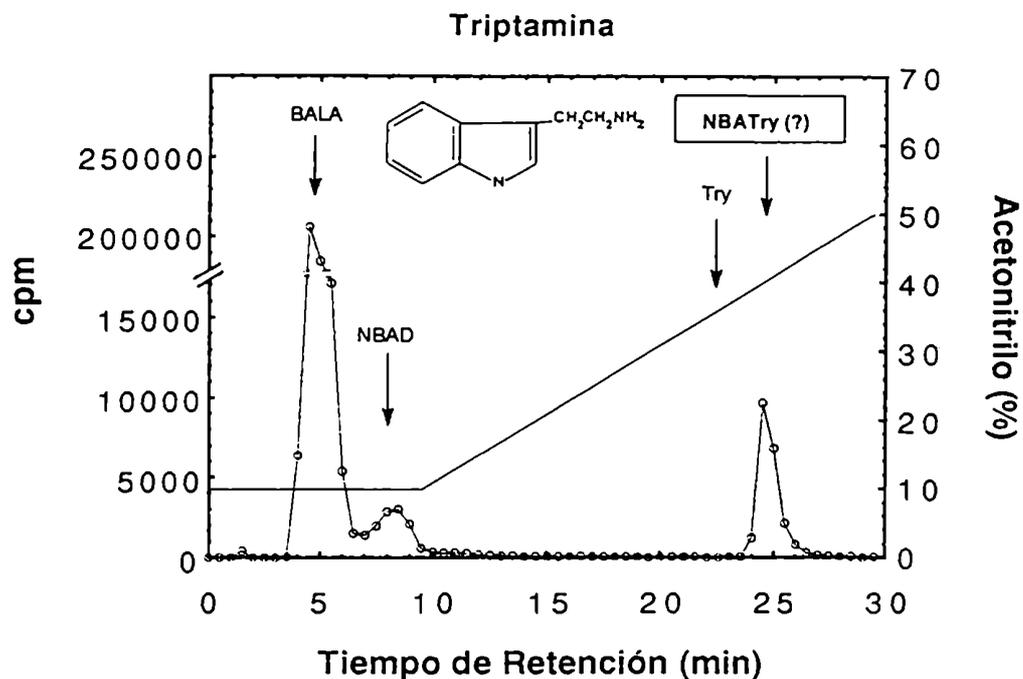


Figura 67- Cromatograma de HPLC-C18 de los productos radioactivos obtenidos luego de incubar [<sup>14</sup>C]β-alanina con una preparación enzimática de la cepa salvaje de *Ceratitis* en presencia de octopamina y en las mismas condiciones que para la síntesis de NBAD (Métodos). La reacción fue detenida con ácido perclórico y, luego de centrifugarla, la mezcla fue inyectada directamente en la columna de HPLC. NBAD, N-β-alanildopamina; NBAO, sustancia radiomarcada cuyo tiempo de retención no coincidió con el de ningún β-alanilderivado conocido. Probablemente se trate de β-alaniloctopamina. Se utilizó la fase móvil II (ver Materiales y métodos).



**Figura 68-** Cromatograma de HPLC-C18 de los productos radioactivos obtenidos luego de incubar [ $^{14}\text{C}$ ] $\beta$ -alanina con una preparaci3n enzimática de la cepa salvaje de *Ceratitis* en presencia de tiramina y en las mismas condiciones que para la sntesis de NBAD. La reacci3n fue detenida con ácido percl3rico y, luego de centrifugarla, la mezcla fue inyectada directamente en la columna. NBAD, N- $\beta$ -alanildopamina; NBATY, sustancia radiomarcada cuyo tiempo de retenci3n no coincidi3 con el de ning3n  $\beta$ -alanilderivado conocido. Probablemente se trate de  $\beta$ -alaniltiramina. Se utiliz3 la fase m3vil II (ver Materiales y m3todos).



**Figura 69-** Cromatograma de HPLC-C18 de los productos radioactivos obtenidos luego de incubar [ $^{14}\text{C}$ ] $\beta$ -alanina con una preparación enzimática de la cepa salvaje de *Ceratitis* en presencia de triptamina y en las mismas condiciones que para la síntesis de NBAD. La reacción fue detenida con ácido perclórico y, luego de centrifugarla, la mezcla fue inyectada directamente en la columna. NBAD, N- $\beta$ -alanildopamina; Try, triptamina NBATry, sustancia radiomarcada cuyo tiempo de retención no coincidió con el de ningún  $\beta$ -alanilderivado conocido. Probablemente se trate de  $\beta$ -alaniltryptamina. Se utilizó la fase Móvil II (ver Materiales y Métodos) pero con una concentración inicial de acetonitrilo de 10% y, a partir de los 10 minutos, un gradiente hasta el 50%.

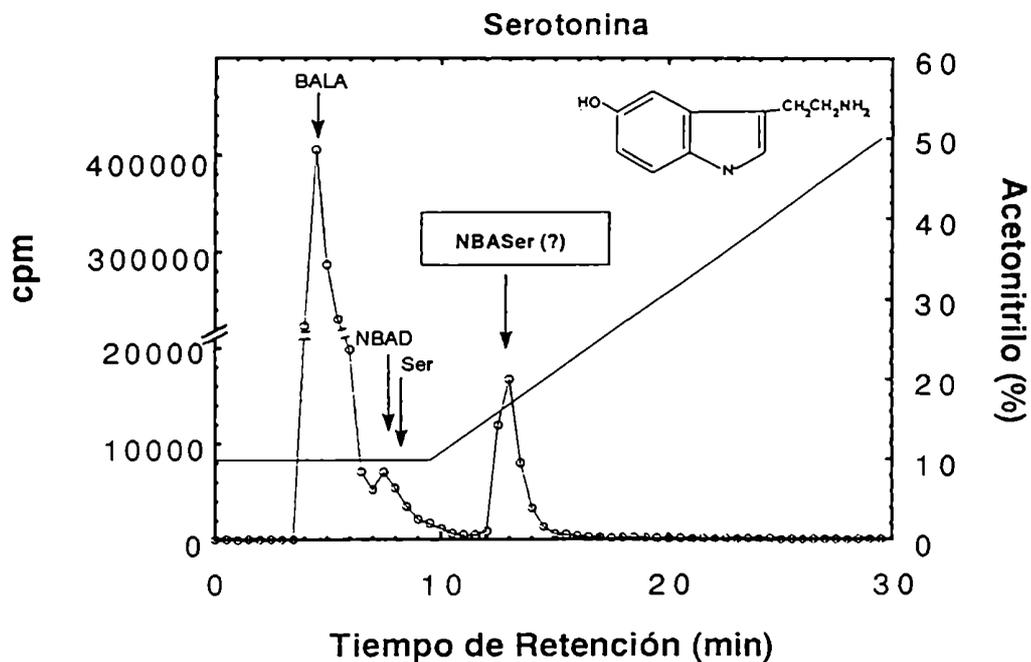


Figura 70- Cromatograma de HPLC-C18 de los productos radioactivos luego de incubar [ $^{14}\text{C}$ ] $\beta$ -alanina con una preparación enzimática de la cepa salvaje de *Ceratitis* en presencia de serotonina y en las mismas condiciones que para la síntesis de NBAD. La reacción fue detenida con ácido perclórico y, luego de centrifugarla, la mezcla fue inyectada directamente en la columna. NBAD, N- $\beta$ -alanildopamina; NBASer, sustancia radiomarcada cuyo tiempo de retención no coincidió con el de ningún  $\beta$ -alanilderivado conocido. Probablemente se trate de  $\beta$ -alanilserotonina. Se utilizó la fase móvil II (ver Materiales y métodos) pero con una concentración inicial de acetonitrilo de 10% y, a partir de los 10 minutos, un gradiente hasta el 50%.

En otro experimento, se utilizaron como posibles sustratos diversos difenoles en reemplazo de la dopamina. Se empleó el mismo ensayo de

actividad que para la síntesis de NBAD basado en la detección de la radioactividad que se une en forma específica a alúmina.

Como se aprecia en la Figura 71, aparentemente, la norepinefrina fue el único difenol reconocido como sustrato por la enzima.

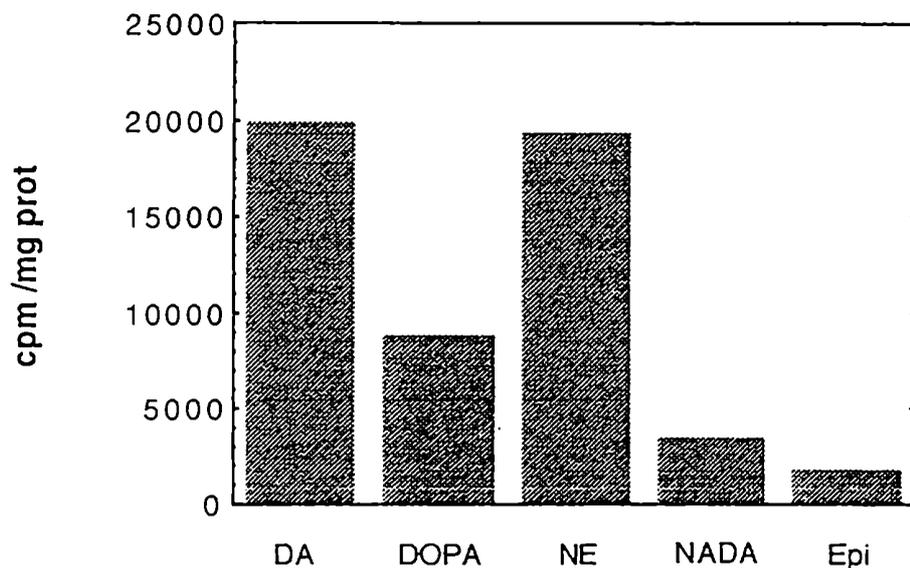
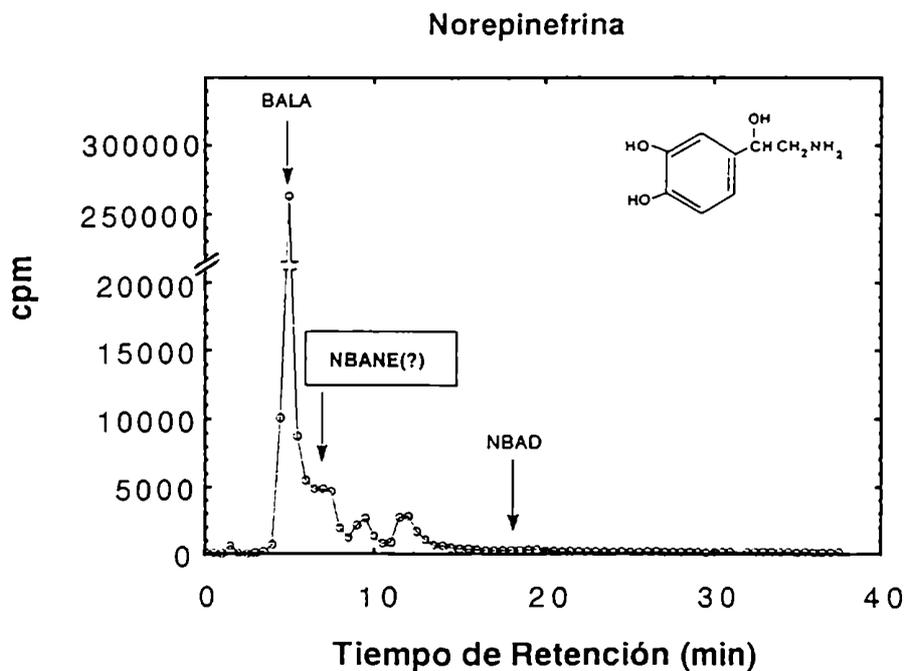


Figura 71- Ensayo de síntesis de  $\beta$ -alanilcatecols en los que se incubó [ $^{14}\text{C}$ ] $\beta$ -alanina en presencia de varios difenoles. DA, dopamina; Ne norepinefrina; Epi, epinefrina; NADA, N-acetildopamina. Las incubaciones se realizaron en las condiciones estándar descritas en la sección de Materiales y Métodos pero reemplazando la dopamina con una concentración diez veces mayor de los difenoles indicados.

Por HPLC, pudimos comprobar que, en efecto, el producto radioactivo de la reacción tiene una movilidad diferente que la NBAD, sugiriendo que el producto que se formó es  $\beta$ -alanilnorepinefrina (Fig. 72). Mas aún, cuando se incubó [ $^{14}\text{C}$ ] $\beta$ -alanina en presencia de dopamina y una concentración diez veces mayor de norepinefrina, se comprobó por HPLC que la síntesis de NBAD se inhibió, mientras que la del derivado de norepinefrina prevaleció (no se muestra). También, en este caso, queda por ser confirmada que el producto radioactivo sea  $\beta$ -alanilnorepinefrina.

La L-DOPA, también se comportó como un sustrato de baja afinidad en el ensayo de reacción (Fig. 71); sin embargo, el análisis del producto radioactivo por HPLC mostró un tiempo de retención idéntico al del NBAD (no se muestra), indicando que probablemente la DOPA se decarboxiló a dopamina antes de reaccionar con la  $\beta$ -alanina. El análisis químico de este producto radioactivo permitirá en el futuro confirmar si esta presunción es correcta.

Otros dos orto-difenoles ensayados, la epinefrina y la N-acetildopamina, no se comportaron como sustratos de la enzima. Dichos difenoles tampoco resultaron ser inhibidores, ya que no interfirieron con la síntesis de NBAD cuando se los puso en competencia con la dopamina (no se muestra).



**Figura 72-** Cromatograma de HPLC-C18 de los productos radioactivos obtenidos luego de incubar  $[^{14}\text{C}]\beta$ -alanina con una preparación enzimática de la cepa salvaje de *Ceratitis* en presencia de norepinefrina y en las mismas condiciones que para la síntesis de NBAD. La reacción fue detenida con ácido perclórico y, luego de una centrifugación, la mezcla fue inyectada directamente en la columna. NBAD, N- $\beta$ -alnil dopamina; NBANE, sustancia radiomarcada cuyo tiempo de retención no coincidió con el de ningún  $\beta$ -alanil derivado conocido. Probablemente se trate de  $\beta$ -alanil norepinefrina

Sintetizando entonces los experimentos de especificidad de sustrato, podemos concluir que la NBAD sintetasa aparentemente admite como sustrato no sólo a la dopamina sino también a la norepinefrina, la octopamina, la serotonina, la tiramina y la triptamina. Considerando que las cuatro primeras aminas son conocidos neurotransmisores del sistema nervioso central de los insectos, nuestros resultados sugieren indirectamente que la NBAD cumpliría un rol también en el sistema nervioso (ver Discusión).

### **6.3- La NBAD sintetasa se expresa mayormente durante la esclerotización**

Como las catecolaminas del integumento son necesarias solamente al final de cada muda, era importante determinar si, como sería de esperar, esta enzima clave para la esclerotización está regulada a lo largo del desarrollo, concretamente en este caso durante el proceso de pupariación.

La Figura 73 muestra que, 8 horas antes del comienzo de la pupariación, durante el estadio "larva de salto" (ver la primera sección de resultados y Rabossi y col., 1992), la actividad enzimática no fue detectada. Al Tiempo Cero (comienzo de la pupariación), la actividad aumentó abruptamente y alcanzó el máximo a las 7 horas. Luego, la actividad decreció y, a las 20 horas, alcanzó valores cercanos a los del blanco. Esto implica que la expresión y/o activación de la enzima está restringida a una ventana de tiempo relativamente angosta, que coincide con el momento en que se esclerotiza la cutícula.

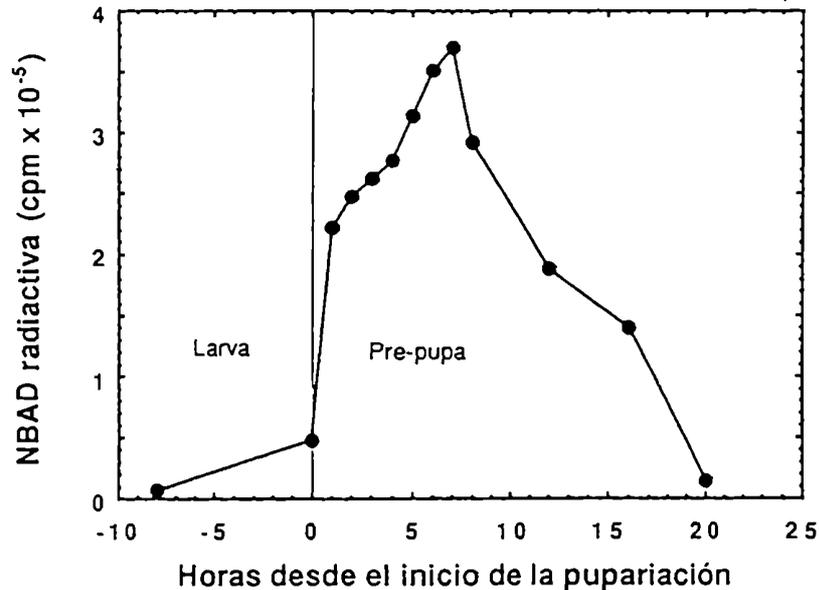


Figura 73- Perfil de actividad aparente de la N-β-alanildopamina sintetasa a lo largo del desarrollo en pre-pupas de *Ceratitis capitata*. Las edades están expresadas en horas a partir del comienzo de la pupariación. Los homogenatos se prepararon como en los experimentos anteriores y las incubaciones se realizaron en las condiciones estándar descritas en la sección de Materiales y Métodos.

#### 6.4- En el mutante *niger*, la síntesis de NBAD en sistema libre de células está muy disminuida

En la punto 5 de Resultados se presentaron diversas líneas de evidencias que sugerían fuertemente que el mutante *niger* de *Ceratitis capitata* era incapaz de sintetizar NBAD. Faltaba, por lo tanto, medir la enzima en un sistema libre de células en preparaciones enzimáticas del mutante *niger* y compararlas con las de la cepa salvaje.

Se hicieron preparaciones enzimáticas de ambas cepas a partir de pre-pupas de 3 horas de edad como se detalló en Materiales y Métodos y se hicieron ensayos de actividad en las condiciones estándar.

Como se puede ver en la Figura 74, la actividad enzimática de la cepa salvaje resultó ser unas 4 veces superior a la del mutante *niger*.

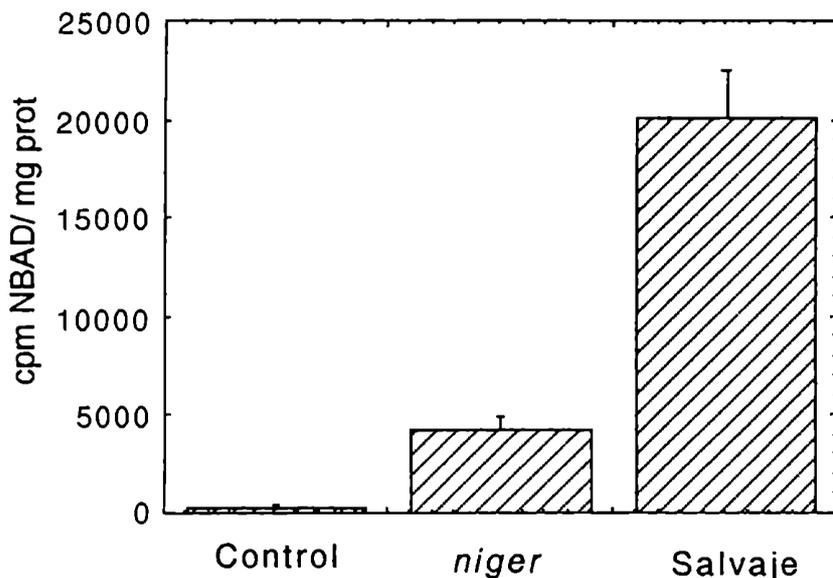


Figura 74- Actividad de síntesis de NBAD en un sistema libre de células en extractos preparados a partir de la cepa salvaje y del mutante *niger*. El control es una mezcla de reacción incubada sin enzima.

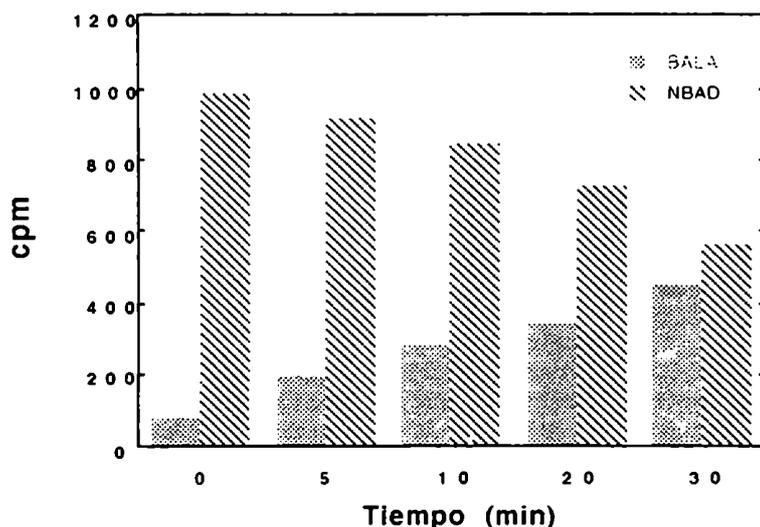
### 6.5- La actividad NBAD hidrolasa de la cepa salvaje y del mutante *niger* no difieren entre sí

Los resultados presentados mas arriba indicaban aparentemente que el mutante *niger* era defectivo para la N- $\beta$ -alanildopamina sintetasa. Sin embargo, considerando que el extracto enzimático en el que se midió la actividad de síntesis contenía también muchas otras proteínas, cabía todavía la posibilidad de que el defecto aparente en la síntesis de NBAD se debiera a la actividad incrementada de una hipotética NBAD hidrolasa. Esta enzima nunca se había medido, ni tampoco había sido descrita en sistema biológico alguno. Por lo tanto, trabajamos en la puesta a punto de las

condiciones para medir esta enzima previsible pero nunca medida. Puesto que la actividad NBAD sintetasa se inhibe totalmente en presencia de EDTA y en ausencia de ATP, en estas condiciones era esperable que pudiéramos medir la putativa enzima que hidroliza el NBAD. Para ello, se utilizó como sustrato NBAD radiomarcado, el cual fue sintetizado enzimáticamente y purificado por adsorción a alúmina. (Como se mostró en la Figura 60, en estas condiciones, la única sustancia radiomarcada que se adsorbe a alúmina es el NBAD).

Como se ve en la Figura 75, a medida que la reacción progresó, disminuyó la cantidad de radioactividad adsorbida a alúmina (NBAD), mientras que, en forma proporcional, aumentó la cantidad de radioactividad no adsorbida (BALA). Si bien este resultado no es concluyente, sugiere que fuertemente que está presente y activa una hidrolasa específica de NBAD.

En la Figura 76, se aprecia que el mutante *niger* y la cepa salvaje mostraron una actividad de hidrolasa semejante. Confirmamos, por lo tanto que *niger* es defectivo para la N-β-alanildopamina sintetasa, enzima clave para la síntesis del principal precursor de agentes esclerotizantes de la cutícula.



**Figura 75-** Ensayo de la actividad hidrolásica de NBAD. Progresión temporal de la reacción de hidrólisis de NBAD. [<sup>14</sup>C]NBAD fue incubado con una preparación enzimática de la cepa salvaje en ausencia de ATP y con EDTA 20 mM.

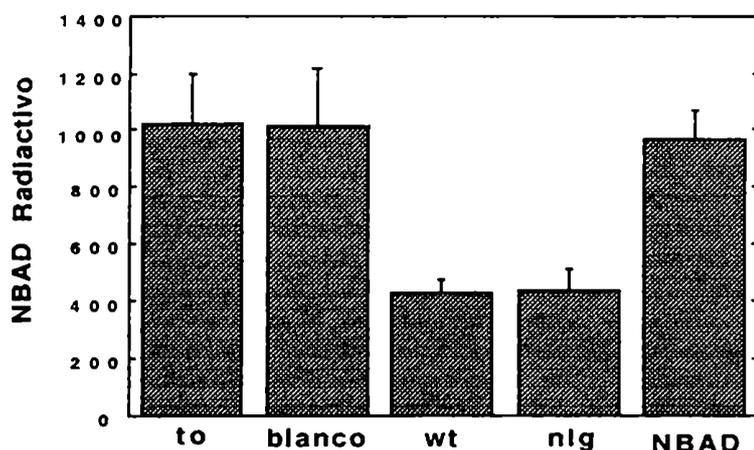


Figura 76- Actividad aparente de la NBAD hidrolasa en pre-pupas de 2 horas de edad de la cepa salvaje y el mutante *niger*. to: comienzo de la reacción; Blanco: mezcla de reacción incubada sin enzima; wt: extracto de la cepa salvaje; nlg: extracto del mutante *niger*. NBAD: extracto salvaje con NBAD 2 mM en la mezcla de reacción.

## 6.6- La N-β-alanildopamina sintetasa parece expresarse preponderantemente en la epidermis

Puesto que la N-β-alanildopamina sintetasa no había sido purificada ni caracterizada, mucho menos se sabía si su expresión se produce en la epidermis o en algún otro órgano. Los datos presentados en las secciones anteriores indican que *niger* es defectivo para esta enzima. Un modo de indagar si la expresión de esta enzima es o no epidérmica es tratar de producir mosaicos genéticos *niger*/salvaje por inducción con rayos X sobre individuos heterocigotas durante la embriogénesis temprana (ver detalles de la metodología empleada en la sección de Materiales y Métodos).

La lógica del experimento es la siguiente: si la expresión de la enzima estuviera localizada en algún órgano interno, como por ejemplo el cuerpo graso, y éste secretara el producto a la hemolinfa, el mosaico genético no se observaría en el fenotipo del pupario. Si la expresión de la enzima fuera preponderantemente epidérmica, deberíamos ver parches mutantes y salvajes sobre el pupario.

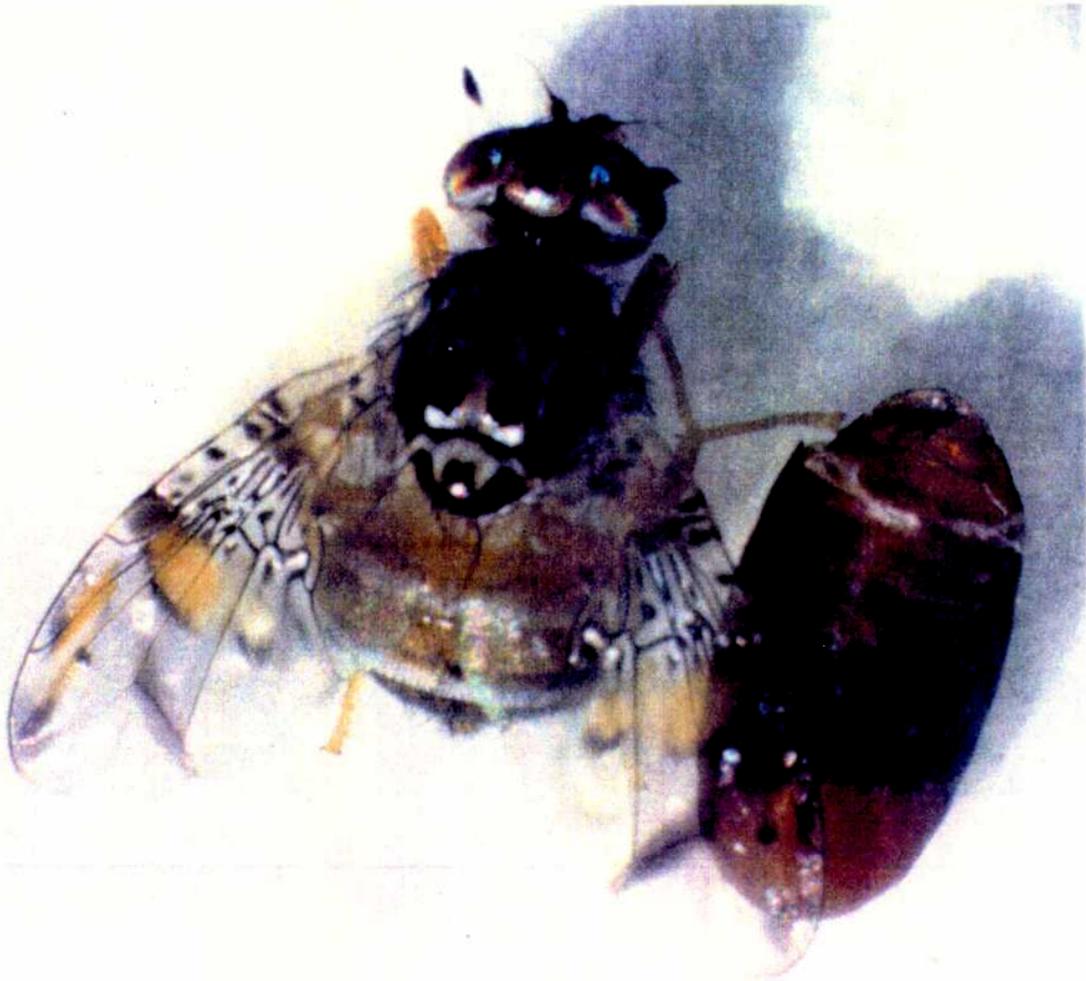
En la Fig. 77 se muestra que esto último fue lo que en efecto ocurrió; las áreas con coloración oscura, en general, oscilaron entre el 5 y el 15% del área total del pupario.

En la Tabla 9 se muestra la frecuencia de mosaicos observada, como así también, la cantidad de puparios mostrando zonas de necrosis por efecto de la irradiación y la cantidad de puparios totalmente negros, que podrían ser producto de una recombinación muy temprana en la etapa de blastodermo sincicial, probablemente antes de la migración de núcleos a la periferia del embrión. Asumimos por lo tanto, que la NBAD se sintetiza en la epidermis en contacto con la cutícula que va a ser esclerotizada.

Tabla 9- Generación de mosaicos cuticulares *niger*/salvaje luego de irradiar embriones heterocigotas generados a partir de cruzamientos recíprocos entre el mutante y la cepa salvaje. Los números en la tabla indican las características de la progenie de cada uno de estos cruzamientos. Los puparios fueron observados 24 horas después

	normal	mosaico
♂ wt x ♀ <i>nig</i>	2401	13
♂ <i>nig</i> x ♀ wt	2763	6
♂ wt x ♀ wt	1838	0

wt: cepa salvaje; *nig*: mutante *niger*.



**Figura 77-** Vista dorsal del pupario de un mosaico genético *niger*/salvaje y del imago que emergió de él. Como se aprecia en la foto, el parche de células mutantes ocuparía en este caso alrededor de un 15% de la superficie total del pupario.

# Discusión

## 1- La esclerotización del pupario de *Ceratitis capitata*.

Los análisis de catecolaminas cuticulares de la cepa salvaje revelaron que la N- $\beta$ -alanildopamina (NBAD) es el precursor de agentes esclerotizantes que se extrae en mayor cantidad del pupario de *Ceratitis capitata*. Cabe considerar que las catecolaminas extraíbles del pupario en las condiciones que hemos utilizado -ácido relativamente diluído a temperatura ambiente- corresponden sólo a la fracción que todavía no ha sido derivatizada por la batería de enzimas cuticulares y, por lo tanto, no ha participado todavía del cross-linking de las proteínas. Por lo tanto, se debe ser cauteloso cuando se comparan cuantitativamente las diferentes catecolaminas extraídas de la cutícula ya que existe la posibilidad de que algunas catecolaminas sean derivatizadas mas rápidamente que otras por las enzimas cuticulares.

La correlación entre cutículas marrones con la esclerotización dependiente de NBAD, por un lado y de cutículas incoloras con la esclerotización dependiente de N-acetildopamina (NADA), por otro, fue claramente establecida con anterioridad (Andersen, 1985; Hopkins y Kramer, 1992). A partir de ello, uno debería esperar que el pupario de *Ceratitis* se esclerotizara utilizando exclusivamente NBAD como precursor. Sin embargo, en la hemolinfa, se encontraron altas concentraciones no sólo de NBAD sino también de NADA, indicando que esta catecolamina podría también participar en la esclerotización del pupario de esta mosca. Los resultados de nuestros experimentos de tanificación *in vitro* apoyan esta posibilidad, ya que la cutícula se tanificó por agregado de cualquiera de los dos catecoles, indicando que ambos son sustrato de las enzimas cuticulares. Si bien las fenoloxidasas cuticulares mostraron preferencia por el NBAD como sustrato, la actividad con NADA fue también alta; sustentando también este dato, la posible participación del NADA en la esclerotización.

Todos estos resultados tomados en conjunto sugieren que tanto NBAD como NADA participarían en la esclerotización del pupario de *Ceratitis capitata* y que la NBAD es probablemente la mas importante de las dos en dicho proceso.

## 2- El mutante *white pupa* no es capaz de exportar catecolaminas a la cutícula

Hemos mostrado que el mutante *white pupa* no esclerotiza su pupario incoloro, ya que luego de la estabilización inicial, no se midió un incremento sustancial de la rigidez. El pupario salvaje, por el contrario, aumenta su rigidez rápidamente hasta alcanzar, a las 24 horas, un valor 5 veces mayor que el del mutante *white pupa*.

Zdarek y Fraenkel (1972) proporcionaron evidencias fisiológicas de que la estabilización y la esclerotización del pupario son procesos sucesivos controlados independientemente, ya que las drogas que inhiben a la esclerotización no interfieren con la estabilización del pupario. El hecho de que *white pupa* pueda estabilizar el pupario pero no sea capaz de esclerotizarlo extiende los resultados de dichos autores y representa, además, una evidencia genética de que la estabilización y la esclerotización son procesos independientes.

Las observaciones del pupario de *white pupa* al microscopio electrónico de barrido revelaron la existencia de importantes anomalías estructurales que se correlacionan con la falta de esclerotización en el mutante. Las lamelas de la cutícula salvaje aparecieron fusionadas uniformemente en una rígida estructura esclerotizada. Las lamelas de la cutícula del mutante, por el contrario, estaban unidas de un modo lábil a capas de materiales no esclerotizados.

Estas observaciones son concordantes con los bajos niveles de catecolaminas encontrados en el pupario de *white pupa* a partir de los análisis por HPLC luego de extraerlas con HCl 1M. Los análisis de Resonancia Magnética Nuclear de Estado Sólido proporcionaron información directa sobre la abundancia relativa de los distintos componentes orgánicos de los puparios de ambas cepas y permitió corroborar que el pupario de *white pupa* tiene un bajo contenido en catecoles. La cutícula de *white pupa* además resultó tener una mayor proporción de quitina y una menor cantidad de proteínas que la cepa salvaje. La baja proporción de proteínas en el pupario de *white pupa* había sido comunicada previamente por Charalambidis y col. (1994). En nuestro laboratorio, el análisis electroforético de proteínas pupariales extraíbles con SDS 1% no reveló diferencias cualitativas entre *white pupa* y la cepa salvaje (Boccaccio, 1991).

Sorpresivamente, en la hemolinfa del mutante, se hallaron concentraciones de NBAD, NADA y dopamina unas 10 veces mayores que las del tipo salvaje revelando que, en *white pupa*, las catecolaminas parecen sintetizarse normalmente pero también parece que, en lugar de ser

transportadas a la cutícula, se acumulan en la hemolinfa. Hasta donde tenemos conocimiento, ésta es la primera vez que se describe un mutante de transporte cuticular en insectos.

Muy poco es lo que se sabe sobre los mecanismos responsables del transporte de catecolaminas a la cutícula (Koeppel y Gilbert, 1974). Tampoco se sabe cuál es el tejido en el que se sintetizan las catecolaminas en *Ceratitis capitata*. En la polilla del tabaco *Manduca sexta*, se determinó que las catecolaminas se sintetizan preponderantemente en la epidermis (Krueger y col., 1989; Shampengtong y col., 1987; Maranda y Hodgetts, 1977; Hirsh, 1989) aunque se encontraron niveles bajos de síntesis también en otros órganos, como el cuerpo graso y los ganglios nerviosos.

Si, en *Ceratitis*, la síntesis de catecolaminas también fuera preponderantemente epidérmica (como parece ser a partir de los mosaicos obtenidos con el mutante *niger*), el mutante *white pupa* sería defectivo para el transporte apical de las células epidérmicas. De este modo, las catecolaminas sintetizadas en la epidermis de *white pupa* serían secretadas a través de la cara baso-lateral hacia la hemolinfa mediante un mecanismo que no estaría alterado.

Decidimos investigar la posibilidad de que la incapacidad del mutante *white pupa* para exportar catecolaminas a la cutícula estuviera dada, no por un defecto estructural de algún posible transportador epidérmico vectorial, sino por alguna falla en la regulación del proceso debida a factores regulatorios hormonales o nerviosos. Zdarek y Denlinger (1992) demostraron mediante experimentos de ligación de larvas que, en la mosca tsé-tsé *Glossina morsitans*, la tanificación del pupario está arrestada por el sistema nervioso central hasta el momento en el que la morfogénesis del pupario termina. En este momento, la inhibición nerviosa se anula y la tanificación del pupario puede comenzar. Aparentemente, el blanco de dicha inhibición son las células epidérmicas en contacto con la cutícula que se va a esclerotizar (Zdarek y Denlinger, 1992). No se conocen las bases bioquímicas y celulares de esta inhibición, pero una posibilidad sería que ésta operara sobre la maquinaria de exportación epidérmica de catecolaminas. Por este motivo, creímos posible que el mutante *white pupa* no esclerotizara el pupario por tener una inhibición constitutiva de su sistema de exportación por no anularse a tiempo el mecanismo inhibitorio. Los experimentos de ligación de larvas poco antes del Tiempo Cero nos permitieron contrastar esta hipótesis revelando que era incorrecta. *white pupa* tampoco esclerotizó su pupario cuando las larvas fueron ligadas o denervadas en la parte posterior del cuerpo, indicando que su fenotipo no parece deberse a una inhibición constitutiva de la esclerotización. Sin embargo, logramos demostrar de paso que la inhibición central de la

esclerotización, en efecto, existe en *Ceratitis capitata*. Considerando que dicho fenómeno había sido comprobado sólo en *Glossina morsitans* que es una mosca vivípara, el nuestro es un hallazgo interesante por tratarse *Ceratitis* de la primera mosca ovípara en la que se describe el fenómeno de inhibición anterior (esta Tesis y Wappner y col., 1995).

Hasta donde tenemos conocimiento, hasta la fecha, no habían sido descritos mutantes de transporte de catecolaminas en insectos. Los mutantes descritos en *Drosophila* que son incapaces de esclerotizar la cutícula son o bien defectivos en fenoloxidasas (Ritzki y col., 1985) o bien defectivos para la síntesis de catecolaminas (Wright, 1987). Charalambidis y col. (1994) comunicaron que el pupario de *white pupa* es defectivo en proteínas cuticulares. Debemos entonces considerar la posibilidad de que el mecanismo epidérmico de exportación de catecolaminas sea responsable de exportar también otros componentes a la cutícula. En nuestros resultados, existen dos líneas de evidencias de que la exportación de proteínas efectivamente está afectada en el mutante *white pupa*. La primera está dada por los datos de composición de las cutículas a partir de los análisis por Resonancia Magnética Nuclear. Estos indicaron que en la cepa salvaje las proteínas representan un 10% del peso seco total del pupario, mientras que en *white pupa* representan sólo el 5%. La segunda línea de evidencias está dada por los datos de la variación del peso seco del pupario durante la pupariación en el mutante y en la cepa salvaje. En la cepa salvaje encontramos que el peso seco se incrementa en aproximadamente un 20% a lo largo de la pupariación. En el pupario de *white pupa* este incremento aparentemente no existe y el peso seco del pupario se mantiene constante hasta el final de la pupariación. De acuerdo a nuestros datos y a datos previos de la literatura (Schaefer y col., 1987) el contenido de catecolaminas de las cutículas esclerotizadas de los insectos oscila entre el 3 y el 5%. Por lo tanto, el incremento del 20% en el peso seco no se debería exclusivamente a la incorporación de catecolaminas sino también a la de otras sustancias durante la pupariación (proteínas, lípidos, etc.). Si esto es cierto, el transportador de catecolaminas defectivo en el mutante *white pupa* debería ser responsable del transporte también de otros componentes cuticulares.

El mutante *white pupa* de *Ceratitis capitata* nos brinda la posibilidad de intentar la caracterización bioquímica del sistema epidérmico de transporte de materiales a la cutícula, el cual hasta el momento, no se conoce en absoluto.

### **3- Nuestros datos contradicen el modelo clásico que explica la deshidratación de la cutícula de los insectos**

Si bien nunca fue demostrado experimentalmente, es consenso generalizado entre los investigadores del área (y así figura en los textos y revisiones especializadas) que la dramática deshidratación cuticular que ocurre durante la esclerotización se debería al desplazamiento físico-químico del agua por parte de las catecolaminas que se incorporan a la cutícula y aumentan la hidrofobicidad de la matriz (Hopkins y Kramer, 1992; Andersen, 1985).

En la sección de Resultados se vió que nuestros datos demuestran claramente que esta asunción es errónea. El mutante *white pupa* de *Ceratitis capitata* es incapaz de incorporar catecolaminas a la cutícula y sin embargo, deshidrata la cutícula con toda normalidad. Esta simple observación deberá cambiar el concepto que se tiene sobre el proceso de deshidratación cuticular lo cual tiene importantes implicancias adicionales en lo que respecta a los mecanismos de esclerotización (esta Tesis y Wappner y Quesada-Allué, manuscrito en prensa).

Vincent y Hillerton (1979; Hillerton y Vincent, 1979) sostuvieron, contra la opinión de la mayoría de los especialistas, que el aumento de rigidez registrado durante la esclerotización de la cutícula de los insectos se debe principalmente a la pérdida de agua cuticular. Afirmaron que la deshidratación provocaría la desaparición de hidratos proteína-agua y el establecimiento de puentes de hidrógeno directos entre las proteínas cuticulares, con participación de la quitina. Por lo tanto, según estos autores, el cambio en las propiedades mecánicas de la cutícula no dependería de la formación de uniones covalentes mediadas por quinonas, sino que se debería al efecto cooperativo de muchas interacciones secundarias entre los propios componentes mayoritarios de la cutícula. Vincent y Hillerton no niegan que las catecolaminas se incorporen a la cutícula y formen uniones covalentes durante la esclerotización, pero sostienen que la formación de dichas uniones no es el motivo del aumento de rigidez cuticular. Según ellos, la función principal de dichas moléculas es la de deshidratar la cutícula provocando, por lo tanto, en forma indirecta el aumento de rigidez.

La enorme mayoría de los investigadores del área no ha compartido esta visión. Si bien están de acuerdo en que la entrada de catecolaminas es la causa de la deshidratación de la cutícula, opinan que el aumento de rigidez

se debe a la formación de uniones covalentes entre proteínas, mediadas por quinonas.

Nuestros datos contradicen el modelo de Vincent y Hillerton en cuanto que el mutante *white pupa* de *Ceratitis* deshidrata su pupario normalmente pero sin que éste incremente su rigidez. Queda claro, por lo tanto, que la deshidratación de la cutícula no es suficiente para provocar el cambio de sus propiedades mecánicas aunque probablemente sea una etapa necesaria en el proceso de esclerotización. En este sentido, nuestros datos están de acuerdo con la hipótesis ampliamente aceptada de que la formación de uniones covalentes mediada por quinonas es la verdadera causa de esclerotización.

Por otra parte, queda claro también, que la incorporación de catecolaminas a la cutícula no es necesaria para que ésta se deshidrate. Por lo tanto, en este aspecto, nuestros datos se contradicen tanto con el modelo de Vincent y Hillerton como con el modelo alternativo ampliamente aceptado.

El mecanismo responsable de la deshidratación cuticular sigue siendo, por lo tanto, desconocido. Está demostrado que no se trata de un fenómeno de desecación pasiva, ya que la cutícula es capaz de deshidratarse incluso cuando los insectos son mantenidos bajo el agua (Fraenkel y Rudall, 1940; 1947).

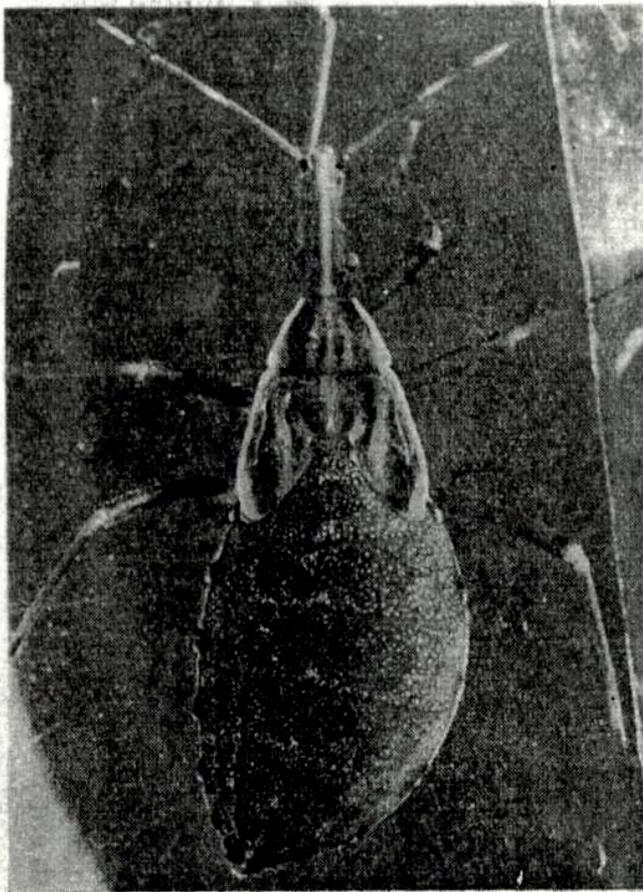
En la próxima sección, proponemos en forma tentativa un modelo que explicaría la deshidratación cuticular durante el proceso de esclerotización.

#### **4- Propuesta de un modelo alternativo para explicar la deshidratación de la cutícula de los insectos durante la esclerotización**

Mucho se ha investigado sobre el control de las propiedades mecánicas de la cutícula adominal de las vinchucas (Núñez, 1963; Reynolds, 1985; 1974; Madrell, 1966; Hackman y Goldberg 1987). Esta cutícula, a diferencia de la cutícula torácica nunca se esclerotiza y tiene la capacidad de incrementar rápidamente su plasticidad cuando estos insectos hematófagos se disponen a alimentarse. Esto representa una notable adaptación fisiológica ya que, de este modo, la cutícula abdominal es capaz de distenderse y el insecto puede bombear un gran volúmen de sangre dentro de su sistema digestivo. En ciertos estadios ninfales, la cantidad de sangre

que la vinchuca puede ingerir es equivalente a diez veces su peso corporal (Nuñez, 1963).

Ha sido claramente demostrado que el aumento de plasticidad que permite esta formidable distensión de la cutícula está controlado por el sistema nervioso. Si se secciona el cordón nervioso correspondiente a uno de los costados del abdomen, la cutícula puede distenderse sólo en el costado que está intacto. En el costado denervado, la cutícula ya no es capaz de incrementar la plasticidad cuticular impidiéndose así su distensión (Nuñez, 1963)(ver Fig.78).



**Figura 78-** Fotografía de una ninfa de 5<sup>o</sup> estadio de *Rhodnius prolixus* que fue denervada en su costado izquierdo y posteriormente alimentada con sangre. Nótese que los escleritos cuticulares sólo se distienden en el costado derecho que no está denervado (tomado de Nuñez, 1963).

A nivel molecular, se demostró que el aumento de plasticidad se debe a un aumento en el contenido de agua cuticular (Reynolds, 1975). El agua se intercalaría entre las macromoléculas de la cutícula (proteínas y/o quitina) reemplazando a las interacciones secundarias entre ellas por interacciones

con moléculas de agua. La disminución de estas interacciones entre macromoléculas sería la responsable del aumento de plasticidad cuticular. No se conocen los mecanismos bioquímicos y celulares que regulan el contenido de agua de la cutícula. Se sabe sin embargo, que el control nervioso sobre la epidermis está mediado por serotonina (Reynolds, 1974) y se sospecha que este neurotransmisor podría inducir la variación del contenido de agua y controlar la plasticidad cuticular a través de un cambio de pH de la cutícula (Reynolds, 1985). Experimentos *in vitro* llevados a cabo por Reynolds (1974; 1975; 1985) mostraron que pequeños cambios de pH son suficientes para variar en forma drástica la extensibilidad de la cutícula abdominal de *Rhodnius*. Un descenso de pH de 6,5 a 6 es suficiente para incrementar la extensibilidad cuticular entre 15 y 20 veces (ver Fig. 79).

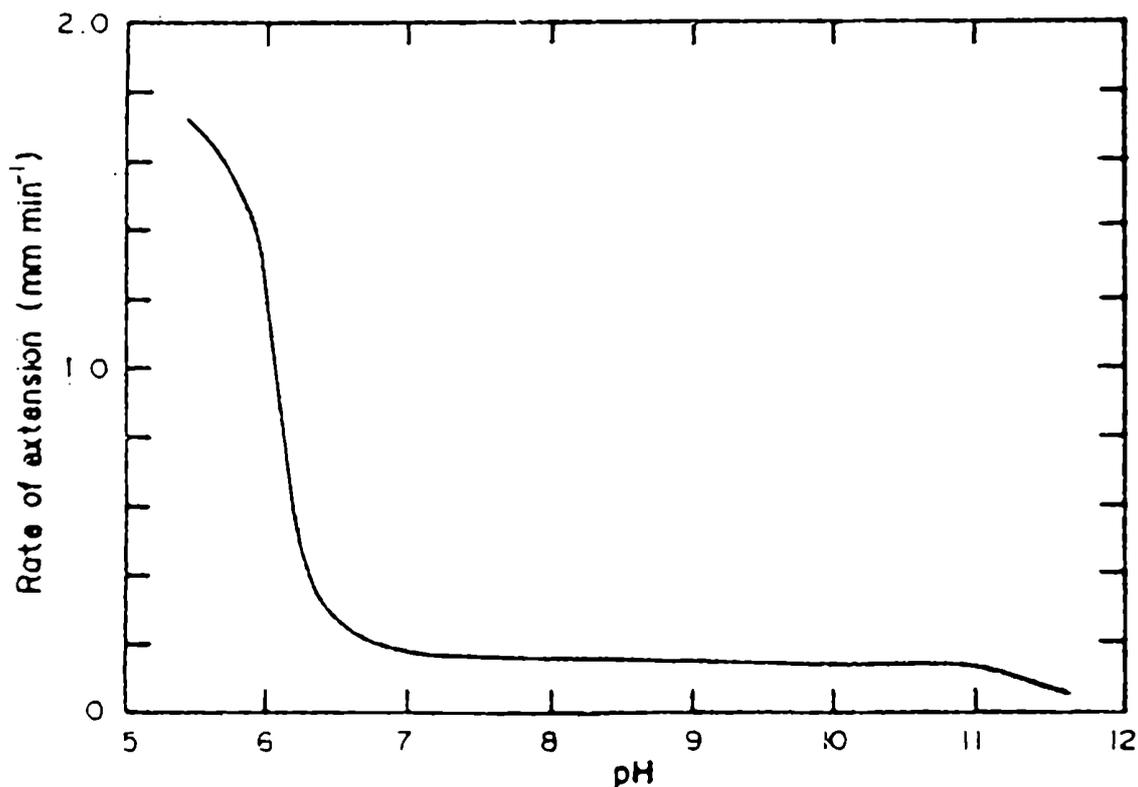


Figura 79- Efecto del pH sobre la extensibilidad de la cutícula abdominal de ninfas de 5º estadio de *Rhodnius prolixus*. (tomado de Reynolds, 1985).

No se sabe en qué forma el pH ácido interfiere en la interacción entre macromoléculas de la cutícula. El hecho de que media unidad de pH sea suficiente para producir un cambio tan drástico sugiere que el efecto debe ser bastante específico sobre alguna macromolécula en particular.

Es difícil medir el pH dentro de la cutícula, pero observaciones histoquímicas en las que se utilizó el indicador p-nitrofenol sugieren que, *in vivo*, este cambio de pH en efecto ocurre cuando se induce artificialmente el aumento de plasticidad por inyección de serotonina (Reynolds, 1975).

Por lo tanto, se cree que la epidermis, en respuesta a estímulos nerviosos en los que el neurotransmisor que interviene es serotonina, controla el pH de la cutícula, regulando de este modo su contenido de agua. Por lo tanto, el contenido de agua sería el que, en definitiva, determinaría las propiedades mecánicas de la cutícula (Reynolds, 1985; Quesada-Allué, 1987).

Si bien la cutícula abdominal de las ninfas de vinchuca y el pupario de las moscas son cutículas muy diferentes, ambas parecen compartir aspectos del mecanismo de regulación de sus propiedades mecánicas. Una similitud llamativa está dada por el hecho de que, en ambos casos, el sistema nervioso controla las propiedades de la cutícula. El encogimiento longitudinal de la cutícula puparial de los dípteros que precede al comienzo de la esclerotización está controlado a nivel nervioso ya que, la denervación del pupario en uno de sus costados lleva a que el reordenamiento molecular de la cutícula que provoca su encogimiento se produzca sólo en el costado sano (ver Fig 80) (Zdarek y Fraenkel, 1972; Zdarek, 1985).

Por otra parte, como se mencionó mas arriba, el gatillado de la tanificación del pupario está controlado por el sistema nervioso central, el cual ejerce una inhibición sobre las células epidérmicas que van a tanificar la cutícula hasta el momento en que la morfogénesis del pupario ha sido completada (Zdarek y Denlinger, 1992). Por lo tanto, es dable suponer que el sistema nervioso controle también otros aspectos del proceso de pupariación como así también de las propiedades de la cutícula de los dípteros.

Otra similitud importante entre la cutícula abdominal de los redúvidos y el pupario de los dípteros está dada por la variación de pH que tiene lugar en ambos casos. El único estudio que pudimos detectar sobre variaciones de

pH cuticular en sistemas que no fueran redúvidos es el de Krueger y col. (1988).



**Figura 80-** Formación del pupario de *Sarcophaga bullata* luego de haber sido denervada en su costado izquierdo. (tomado de Zdarek y Fraenkel, 1972)

Dichos autores estudiaron el proceso de calcificación del pupario de la mosca de la cara *Musca autumnalis*. Esta mosca, en lugar de esclerotizar el pupario, lo calcifica de una manera parecida a la de la cutícula los crustáceos. En dicho estudio se usaron microelectrodos de contacto para medir el pH de la cara interna de la cutícula durante la calcificación y se descubrió que la deposición de calcio en el pupario depende de un aumento de pH cuticular de 7,2 a 8,4. Lo que encontramos mas interesante en dicho trabajo son los datos del control negativo. Krueger y col. (1988) utilizaron como control negativo a *Musca domestica* que, como la gran mayoría de los dípteros ciclorrafos, no calcifica sino que esclerotiza su pupario. Dichos autores dicen en el trabajo que el pH del pupario de *Musca* no varía durante la esclerotización. Sin embargo, en la tabla a la cual hacen referencia, ¡se muestra un aumento estadísticamente significativo de media unidad de pH! Al comienzo de la esclerotización, el pH es de  $6,55 \pm 0,10$  y al final de dicho proceso es de  $7,20 \pm 0,10$  (ver en la Fig. 81 una fotocopia de la tabla del trabajo original).

Si en el pupario de *Musca*, operara un mecanismo de regulación similar al de la cutícula de vinchuca, el aumento de pH que se encontró durante la pupariación conduciría a la pérdida de agua. Comparando los datos de

*Musca* (Krueger y col., 1988) con el rango y los valores de las variaciones de pH de la cutícula de vinchuca durante el aumento de plasticidad (Reynolds, 1985), se ve que la variación de pH del pupario de *Musca* es parecida a la que ocurre en vinchuca y, por lo tanto, suficiente para explicar la pérdida de agua. El cambio de pH ocurre en la dirección esperada y los valores hallados son compatibles con los de los mecanismos conocidos en vinchuca.

Por lo tanto, nosotros proponemos que el aumento del contenido de agua de la cutícula abdominal de vinchuca durante la alimentación y la deshidratación del pupario de los dípteros durante la esclerotización están regulados de un modo similar, aunque en direcciones contrarias (esta Tesis y Wappner y Quesada-Allué, manuscrito en prensa).

R.A. Krueger et al.: Calcium transport and deposition in face fly

Table 3. The pH of the outer and the inner surfaces of larval cuticle during pupariation of *Musca autumnalis* and *M. domestica*

Stage <sup>a</sup>	Surface pH*			
	<i>M. autumnalis</i>		<i>M. domestica</i>	
	Outer pH	Inner pH	Outer pH	Inner pH
W	7.04 ± 0.13 <sup>A</sup>	7.20 ± 0.19 <sup>A</sup>	6.85 ± 0.10 <sup>A</sup>	6.88 ± 0.09 <sup>A</sup>
AR	7.47 ± 0.12 <sup>B</sup>	7.60 ± 0.14 <sup>B</sup>	6.75 ± 0.15 <sup>A</sup>	7.00 ± 0.13 <sup>A</sup>
P1	8.42 ± 0.12 <sup>C</sup>	7.90 ± 0.20 <sup>B</sup>	6.72 ± 0.18 <sup>A</sup>	6.55 ± 0.10 <sup>B</sup>
P3	8.18 ± 0.22 <sup>C</sup>	7.80 ± 0.06 <sup>B</sup>	6.82 ± 0.20 <sup>A</sup>	7.00 ± 0.15 <sup>A</sup>
A	8.38 ± 0.04 <sup>C</sup>	8.43 ± 0.14 <sup>C</sup>	7.05 ± 0.15 <sup>B</sup>	7.20 ± 0.10 <sup>C</sup>

\* Mean pH ± SE, n=3-4 (number of analysis of pooled tissues). letters denote significant differences (P ≤ 0.05) within a stage.

<sup>a</sup> See text for stage definitions

**Figura 81-** Tabla publicada por Krueger y col. (1988) mostrando la variación de pH en las superficies interna y externa de los puparios de *Musca autumnalis* y *Musca domestica*. W, larva en la etapa de deambulación; AR, pupario en formación con los segmentos anteriores ya retraídos; P1, comienzo de la pupariación; P3, pupariación avanzada; A, fin de la pupariación (apólisis). Las letras A, B, C indican si las diferencias son significativas (la misma letra indica que los valores no difieren significativamente y letras distintas indican que sí difieren). Nótese que durante la pupariación de *Musca domestica*, el pH de la cara interna de la cutícula aumenta significativamente en media unidad (comparar P1, P3 y A).

En la vinchuca, el proceso es reversible y depende de los requerimientos alimentarios del insecto. En la mosca, el proceso se haría irreversible debido a los procesos de estabilización y esclerotización mediada por quinonas que ocurren simultáneamente con la deshidratación (Fig 82).

Krueger y col.(1988) comentan en el mismo trabajo que la polilla *Manduca sexta* “*tampoco muestra una gran variación de pH durante la esclerotización de la cutícula pupal, ya que ésta es de sólo media unidad de pH*”. Dichos autores dicen que, al comienzo de la esclerotización, el pH es de 6,6 y al final del proceso llega a 7,2; lo cual es muy semejante a lo que ocurre en el pupario de *Musca*.

A pesar de que los datos sobre la variación de pH durante la esclerotización de la cutícula de los insectos son escasos, los resultados disponibles indican que existe un aumento de pH cuticular durante el proceso de esclerotización en al menos dos órdenes diferentes de insectos.

Por lo tanto, resulta atractivo postular como mecanismo general que la epidermis de los insectos controla el pH de la cutícula regulando, de este modo, su contenido de agua y, a través de la regulación del contenido de agua, las propiedades mecánicas de la cutícula (Fig. 82).

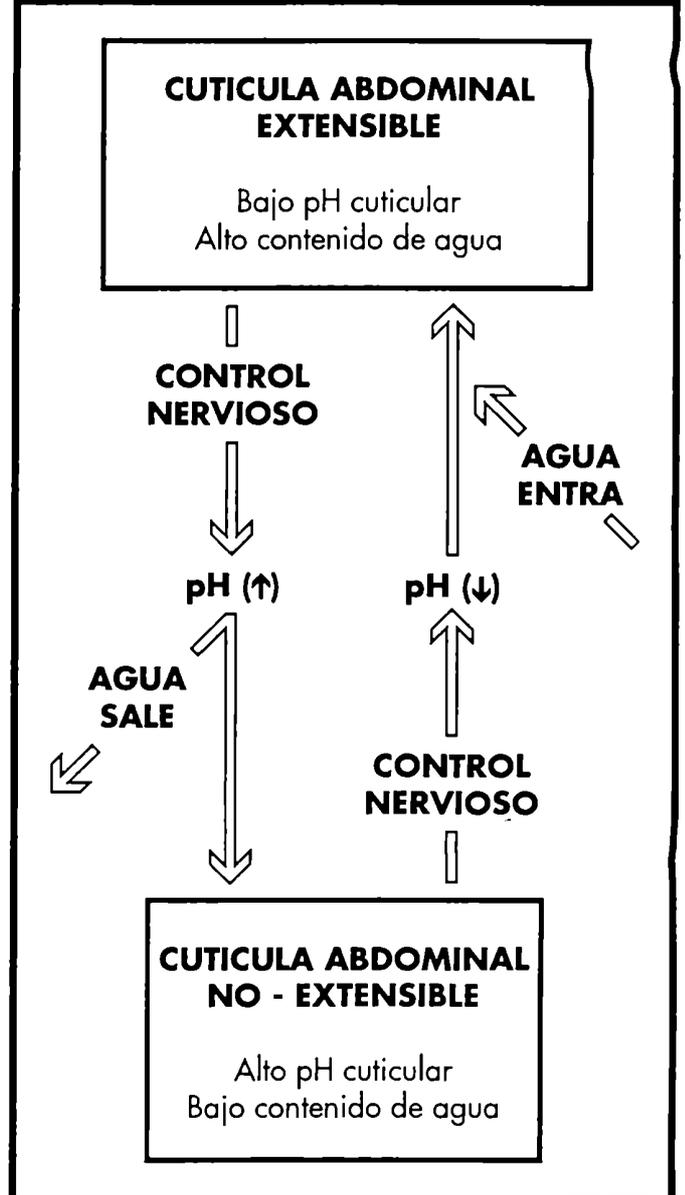
---

**Figura 82-** Modelo que explicaría la deshidratación cuticular durante el proceso de esclerotización del pupario de los dípteros. El modelo que proponemos se compara con el mecanismo ampliamente conocido por el cual se controlan las propiedades mecánicas de la cutícula abdominal de los redúvidos (ver lámina en la próxima página).

## PUPARIO DE LOS DIPTEROS



## CUTICULA DE LOS REDUVIDOS



## 5- El mutante *Black pupa* es deficiente en el aminoácido $\beta$ -alanina

Nuestros resultados han demostrado que, para adquirir el color normal del pupario esclerotizado, *Ceratitis capitata*, al igual que otras especies de insectos (Hopkins y col., 1984; Ujvary y col., 1987; Kramer y col., 1984; Roseland y col., 1987; Jacobs, 1985; Czaplá y col., 1989), requiere cierta concentración umbral de  $\beta$ -alanina para sintetizar N- $\beta$ -alanildopamina en cantidad suficiente.

Los experimentos de manipulación del fenotipo seguidos del análisis de los patrones de catecolaminas en homogenatos de cuerpo entero permitieron inferir que el fenotipo melánico del mutante *Black pupa* se debe a concentraciones reducidas de  $\beta$ -alanina. El análisis directo de las concentraciones endógenas de  $\beta$ -alanina confirmaron esta hipótesis, ya que los niveles detectados en *Black pupa* fueron aproximadamente la mitad de los de la cepa salvaje. (esta Tesis y Wappner y col., manuscrito en prensa). Los análisis de catecolaminas de homogenatos de cuerpo entero revelaron que la concentración de N- $\beta$ -alanildopamina en el mutante es muy baja, mientras que la de dopamina es mucho mas alta que la de la cepa salvaje. La concentración de ambas catecolaminas se normalizó cuando el mutante fue inyectado con  $\beta$ -alanina. Por lo tanto, el defecto de  $\beta$ -alanina del mutante sería la causa de los bajos niveles de N- $\beta$ -alanildopamina y del exceso de dopamina libre no acilada. Este exceso de dopamina no acilada entraría en la vía alternativa que conduce a la síntesis de melanina, generando por lo tanto, el pupario negro (esta Tesis y Wappner y col., manuscrito en prensa).

La determinación del color del pupario de *Ceratitis capitata* parece estar controlada en forma cuantitativa, ya que el color varía según las dosis de  $\beta$ -alanina y dopamina que se inyecten. Considerando que *Black pupa* es una mutación semidominante (Lifschitz, 1985; Wappner, 1989), la dependencia de dosis desde el punto de vista bioquímico es consistente con la dependencia de dosis genética del fenotipo. De este modo, el fenotipo del heterocigota es semejante al que se obtiene inyectando al mutante con una cantidad moderada de  $\beta$ -alanina o inyectando al tipo salvaje con una cantidad intermedia de dopamina.

En *Drosophila melanogaster*, el mutante *black* es defectivo en  $\beta$ -alanina por lo cual los adultos tienen la cutícula mas oscura. Sin embargo, en aquel caso el pupario, en este caso no es negro, sino que es mas pálido que el del salvaje. Cuando los adultos recién emergidos de *black* son inyectados con  $\beta$ -alanina, se recobra el fenotipo normal (Hodgetts, 1972; Hodgetts y Choi, 1974). Aparentemente, también en este mutante, el

Hodgetts y Choi, 1974). Aparentemente, también en este mutante, el exceso de dopamina libre sería "titulado" por la  $\beta$ -alanina inyectada de modo que se sintetizaría N- $\beta$ -alanildopamina. De este modo, la pigmentación negra se bloquearía por la síntesis de N- $\beta$ -alanildopamina, evitando así la acumulación de dopamina y la síntesis de melanina (Jacobs, 1985). Por lo tanto, las mutaciones *black* de *Drosophila* y *Black pupa* de *Ceratitis* serían homólogas (esta Tesis y Wappner y col., 1991).

La correlación entre melanización y altas concentraciones de dopamina acompañada de bajas concentraciones de N- $\beta$ -alanildopamina fue observada también en mutantes melánicos del escarabajo de la harina *Tribolium castaneum* (Roseland y col., 1987) y de la cucaracha *Blatella germanica* (Czapla y col., 1989). En el caso del mutante *black* de *Tribolium*, también ocurre reversión al fenotipo normal cuando se lo inyecta con  $\beta$ -alanina (Kramer y col., 1984).

La cantidad de  $\beta$ -alanina que se necesitó para inducir la reversión del fenotipo del mutante *Black pupa* de *Ceratitis* representa unas siete veces las concentraciones endógenas de la cepa salvaje. Para inducir la melanización de la cepa salvaje, se necesitó inyectar 8  $\mu$ g de dopamina por mg de peso húmedo del insecto. Considerando que los niveles endógenos son de alrededor de 100 ng por mg de peso húmedo, la cantidad inyectada está 2 órdenes de magnitud por encima de los niveles fisiológicos. En este sentido, dicho resultado es semejante al obtenido en experimentos de manipulación del fenotipo en la polilla *Manduca sexta* (Ujvary y col., 1987).

Las inyecciones de N- $\beta$ -alanildopamina no consiguieron revertir el fenotipo del mutante *Black pupa*. Esto probablemente se deba al hecho de que, si bien las concentraciones de N- $\beta$ -alanildopamina se recuperarían mediante su suministro exógeno, el exceso de dopamina libre no sería "titulado", de modo que no se impediría que este exceso de dopamina entre en la vía de síntesis de melanina.

La inyección de soluciones saturadas de DOPA en pre-pupas salvajes no indujo ningún cambio fenotípico. Esto sugiere que, en este estadio (3 horas de edad), la DOPA decarboxilasa no estaría lo suficientemente activa para generar la cantidad de dopamina suficiente para melanizar el pupario.

Los niveles de  $\beta$ -alanina del mutante *black* de *Drosophila* se deben a la hiper-actividad de la transaminasa de  $\beta$ -alanina, lo cual lleva a un elevado catabolismo de dicho aminoácido (Weber y col., 1992). En el caso del mutante *Black pupa* de *Ceratitis capitata*, tanto un defecto en la síntesis de  $\beta$ -alanina como un excesivo catabolismo podrían ser la causa de los bajos niveles del aminoácido. Estudios futuros permitirán dilucidar cuál de estas posibilidades es la que realmente tiene lugar en el mutante *Black pupa*. A

consideramos importante ahondar mas en la caracterización bioquímica de este mutante que resultó ser defectivo en  $\beta$ -alanina y que -por otra parte- es homólogo de un mutante descrito en *Drosophila melanogaster*.

## **6- El mutante *niger* es incapaz de sintetizar N- $\beta$ -alanildopamina a partir de sus precursores dopamina y $\beta$ -alanina.**

En esta Tesis se ha demostrado que el mutante *niger* de *Ceratitis capitata* no puede utilizar  $\beta$ -alanina para la síntesis de N- $\beta$ -alanildopamina (NBAD) y subsecuente esclerotización del pupario (esta Tesis y Wappner y col., manuscrito enviado). Nuestros resultados indican que la incapacidad para sintetizar NBAD conduciría a la acumulación de dopamina que, a su vez, provocaría melanización; generando, al igual que en el caso del mutante *Black pupa*, un pupario de color negro.

Los altos niveles de  $\beta$ -alanina encontrados en homogenatos de cuerpo entero de este mutante son consistentes con la incapacidad que mostró para incorporar [ $^{14}\text{C}$ ] $\beta$ -alanina al pupario durante la esclerotización. La  $\beta$ -alanina que no fue utilizada para la esclerotización cuticular entró en la vía catabólica y terminó siendo eliminada como dióxido de carbono.

Por lo tanto, el mutante *niger* sería homólogo al mutante *ebony* de *Drosophila melanogaster* (Jacobs y Brubaker, 1963; Jacobs, 1966; 1968; esta Tesis y Wappner y col., 1991).

Los análisis de catecolaminas cuticulares revelaron que los niveles de NBAD en el pupario del mutante son unas 4 o 5 veces menores que los del tipo salvaje mientras que los niveles de dopamina son unas 20 veces mayores.

Del mismo modo, los análisis de catecolaminas en hemolinfa a lo largo del proceso de pupariación revelaron que la concentración de NBAD es muy inferior a la del tipo salvaje durante todo el período estudiado. Por el contrario, las concentraciones de dopamina y N-acetildopamina (NADA) resultaron ser mucho mas altas que las de la cepa salvaje. Las altas concentraciones de dopamina y NADA probablemente sean consecuencia directa de los bajos niveles de NBAD, ya que la dopamina no conjugada con  $\beta$ -alanina se acetilaría para dar NADA o se mantendría no-acilada entrando en la vía metabólica que conduce a melanina.

Si bien los datos sobre la rigidez del pupario de los mutantes melánicos no fueron concluyentes (por eso no se mostraron), estamos en condiciones de afirmar que existe cierto grado de esclerotización cuticular que

afirmar que existe cierto grado de esclerotización cuticular que probablemente sea menor que el de la cepa salvaje pero que sin lugar a dudas es muy superior al del mutante *white pupa*. Creemos, por lo tanto, que la esclerotización de los puparios melánicos dependería fundamentalmente de NADA.

Por primera vez, se han podido medir diversos parámetros de la enzima que sintetiza NBAD. Tanto estas mediciones como los ensayos de síntesis *in vivo* mostraron que la síntesis de esta catecolamina en el mutante *niger* es mucho mas baja que en la cepa salvaje.

Llamativamente, los experimentos *in vitro* revelaron que la síntesis en *niger* es sólo 4 veces menor que la del tipo salvaje; mientras que, *in vivo*, la síntesis de NBAD en el mutante fue prácticamente indetectable. Una explicación probable para este hecho es que las condiciones del ensayo en el sistema libre de células son sumamente favorables para la actividad de la NBAD sintetasa y que, en dichas condiciones no-fisiológicas, la enzima defectuosa del mutante conservaría cierta actividad residual. Por el contrario, en condiciones fisiológicas, la enzima de *niger* sería totalmente inactiva.

La actividad de la NBAD hidrolasa (también medida por primera vez) resultó ser similar en el mutante y en el salvaje. Esto confirma que los bajos niveles de NBAD y el fenotipo melánico se deben, no a un exceso de hidrólisis de NBAD, sino a un defecto en la síntesis de dicha catecolamina.

La irradiación de embriones tempranos *nig/+* provocó la inducción de mosaicos con zonas melánicas en el pupario. El mecanismo genético responsable de la generación de los mosaicos, en nuestro caso, no fue estudiado. Los mecanismos posibles para la generación de mosaicos genéticos son el crossing-over somático, la no-disyunción mitótica y una delección en el cromosoma homólogo que lleva el alelo salvaje de *niger*. De cualquier manera, el hecho de que hayamos logrado inducir los mosaicos implica necesariamente que la NBAD sintetasa se expresa preponderantemente en la epidermis. Como se mencionó en la sección de Resultados, si la NBAD se sintetizara en otro órgano, y en este otro órgano se generaran mosaicos de expresión de la enzima, dichos mosaicos no se evidenciarían sobre el fenotipo cuticular.

Es probable que los patrones de manchas y dibujos negros que se observan en virtualmente todos los órdenes de insectos puedan estar relacionados con una expresión espacialmente restringida de la NBAD sintetasa en zonas particulares de la epidermis. De este modo, la cutícula se tanificaría sólo donde existe actividad de NBAD sintetasa y se melanizaría en las zonas en que la sintetasa está reprimida o inhibida. Esta hipótesis es consistente con el hecho de que *niger* sea capaz de expresarse en un

patrón de mosaico. Jacobs (1976) obtuvo resultados que apoyarían esta posibilidad. Inyectó  $\beta$ -alanina en el hemocele de adultos recién emergidos de poblaciones variegadas de *Drosophila melanogaster* y la radioactividad apareció sólo en las áreas tanificadas de la cutícula pero no en las áreas melanizadas. Como era de esperar, cuando Jacobs (1976) inyectó dopamina radiomarcada en dichas moscas, la marca radioactiva fue encontrada tanto en las áreas melanizadas como en las áreas tanificadas de la cutícula

El gen *yellow* de *Drosophila melanogaster* se sabe que controla los patrones de pigmentación de la cutícula (Biessmann, 1985) y ha sido bien establecido que se expresa en las zonas melánicas de la cutícula y se excluye de las zonas tanificadas (Walter y col., 1991). No se sabe cuál es la manera en que *yellow* controla el patrón de melanización de la cutícula de *Drosophila*. Resulta atractivo postular que *yellow* actúa como regulador en forma directa o indirecta sobre la actividad NBAD sintetasa, ya sea reprimiendo la transcripción o directamente como efector negativo de la enzima en las zonas que no se van a tanificar. El desarrollo de reactivos moleculares -anticuerpos y sondas- específicos para la NBAD sintetasa permitirá develar los mecanismos de la regulación de su expresión.

Al igual que el mutante *ebony* de *Drosophila melanogaster*, el mutante *niger* muestra anomalías comportamentales, tanto durante la ovipuesta como durante el cortejo sexual de los machos (F. Manso, comunicación personal). Si bien es difícil descartar que la estructura anómala de la cutícula sea la causa de estas anomalías comportamentales, éstas bien podrían deberse a alteraciones neurofisiológicas. En *ebony*, estas alteraciones del sistema nervioso fueron fehacientemente comprobadas ya que sus electro-retinogramas son anormales y el umbral de luz necesario para el comportamiento fototáctico está incrementado en 200 veces (Hotta y Benzer, 1969). Por lo tanto, considerando que el mutante *niger* de *Ceratitis* y el mutante *ebony* de *Drosophila* son muy probablemente homólogos (Wappner y col., 1991; Wright, 1987), las alteraciones del comportamiento de *niger* podrían deberse también a causas neurofisiológicas. Ello sugeriría indirectamente que la NBAD sintetasa podría cumplir una función importante en el cerebro de los insectos.

## **7- N- $\beta$ -alanildopamina sintetasa, la enzima fundamental en la síntesis del principal precursor de esclerotización de la cutícula marrón de los insectos**

Hemos desarrollado un ensayo de actividad rápido y sencillo para medir la NBAD sintetasa. El ensayo está basado en la capacidad de las catecolaminas de adsorberse a alúmina a pH alcalino y desadsorberse de la misma a pH ácido. Este ensayo nos permitió encarar la caracterización bioquímica de la enzima y dilucidar en forma preliminar algunas de sus propiedades.

La actividad NBAD sintetasa resultó ser dependiente de ATP y magnesio, aunque con manganeso, la enzima fue también bastante activa. Otros cationes divalentes como el calcio, el bario, y el cobalto no fueron capaces de producir una activación importante de la enzima. Sólo con el cobalto, se alcanzó una actividad del 27% de la que se registró con magnesio. Los agentes reductores ensayados -ditiotreitól y  $\beta$ -mercaptoetanol- no modificaron la actividad de la enzima sugiriendo que para su actividad no existen puentes disulfuro condicionantes. El zinc, el níquel, el mercurio y el cadmio resultaron ser fuertes inhibidores. Es interesante destacar que el zinc también es un inhibidor poderoso de otras enzimas del metabolismo de las catecolaminas. Tanto la DOPA decarboxilasa, enzima central en el metabolismo de las catecolaminas, como la N-acetiltransferasa, la enzima que sintetiza NADA, son fuertemente inhibidas por zinc (Black y Smarrelli, 1986; Shampengtong y col., 1987).

El pH óptimo aparente de la enzima resultó ser de 8,4 y su temperatura óptima de 22°C, lo cual es compatible con la estrategia ectotérmica de regulación de la temperatura de los insectos.

Hemos mostrado que la NBAD sintetasa está regulada en forma específica a lo largo del desarrollo. El patrón temporal de variación de la actividad enzimática coincide con los patrones de variación de las concentraciones de catecolaminas en la hemolinfa. El período de máxima actividad de la enzima coincidió con las primeras horas del proceso de pupariación, cuando la esclerotización se encuentra en pleno desarrollo. Esto denota que la expresión de esta enzima está regulada de modo que tal que la síntesis de NBAD ocurra en forma concertada con el resto de los eventos bioquímicos que forman parte del proceso de pupariación.

Si fuera cierta nuestra hipótesis de que la maquinaria biosintética de las catecolaminas aciladas en la epidermis de los insectos se originó a partir

de una maquinaria homóloga pre-existente en el sistema nervioso central, debería haber aparecido un sistema de control que regule la expresión de las enzimas epidérmicas de modo que se expresen en forma concertada con el resto de los componentes del proceso de muda. Este control del proceso de muda se sabe que, en última instancia, está coordinado por los niveles de ecdisteroides.

## **8- La N-β-alanildopamina sintetasa cumpliría una función importante en el sistema nervioso central de los insectos**

Se sabe que los principales neurotransmisores de los insectos son dopamina, octopamina, serotonina y, en menor medida, norepinefrina (Nagao y Tanimura, 1988; Livingstone y Tempel, 1983; Tempel y col., 1984; McFarlane y col., 1990).

Como se ve en la Figura 83, la síntesis de octopamina involucra, primero la decarboxilación de tirosina para dar tiramina y luego la β-hidroxilación de tiramina para dar octopamina. En el caso de la serotonina, el triptofano primero se hidroxila para dar 5-OH-triptofano, el cual posteriormente se decarboxila para dar serotonina (Fig. 83). Por otra parte, como se mencionó mas arriba, la síntesis de dopamina involucra la decarboxilación de la DOPA y la dopamina, a su vez, puede β-hidroxilarse para dar norepinefrina (Brown y Nestler, 1985).

A diferencia de los vertebrados, se acepta que en los insectos la inactivación de aminas biogénicas informacionales en el sistema nervioso se produce merced a la conjugación de dichas aminas con acetato en reacciones catalizadas por la N-acetiltransferasa.

A partir de nuestros resultados y de datos de la literatura, postulamos aquí que la conjugación de dichos mensajeros químicos con β-alanina podría ser un segundo mecanismo para su inactivación en el sistema nervioso.

Krueger y col.(1990) demostraron mediante experimentos en los que utilizaron un sistema de cultivo de tejidos que la NBAD sintetasa está activa en el sistema nervioso central de la polilla *Manduca sexta*. Por otra parte, el mutante melánico *ebony* de *Drosophila melanogaster*, que sería defectivo para esta enzima (Wappner y col., 1991; Wright, 1987), muestra severas anomalía neurofisiológicas y comportamentales (Hotta y Benzer, 1969). Esto parece ser cierto también para el mutante *niger* de *Ceratitis capitata* (F. Manso , comunicación personal) que demostramos

que es defectivo para la NBAD sintetasa (esta Tesis y Wappner y col., manuscrito enviado).

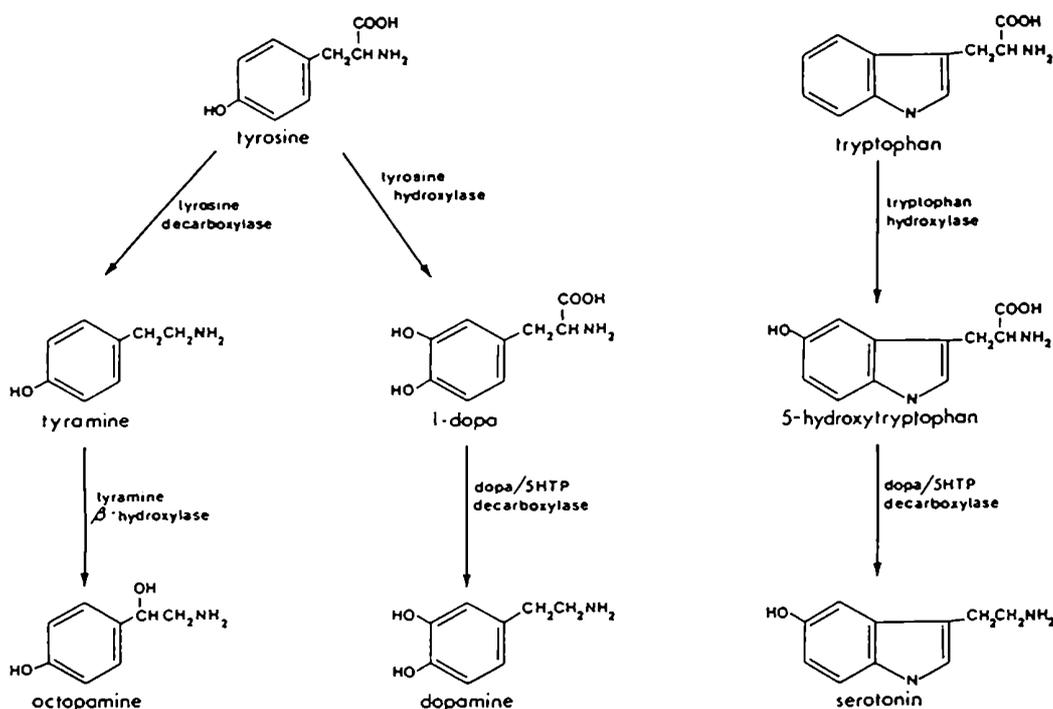


Figura 83- Biosíntesis de los principales neurotransmisores de los insectos (tomado de Livingstone y Tempel, 1983).

Una tercera evidencia, aunque indirecta, de la importancia de la NBAD sintetasa en el sistema nervioso de los insectos está dada por la especificidad de sustrato exhibida por la enzima preparada a partir de extractos de cuerpo entero de prepupas de *Ceratitis capitata*.

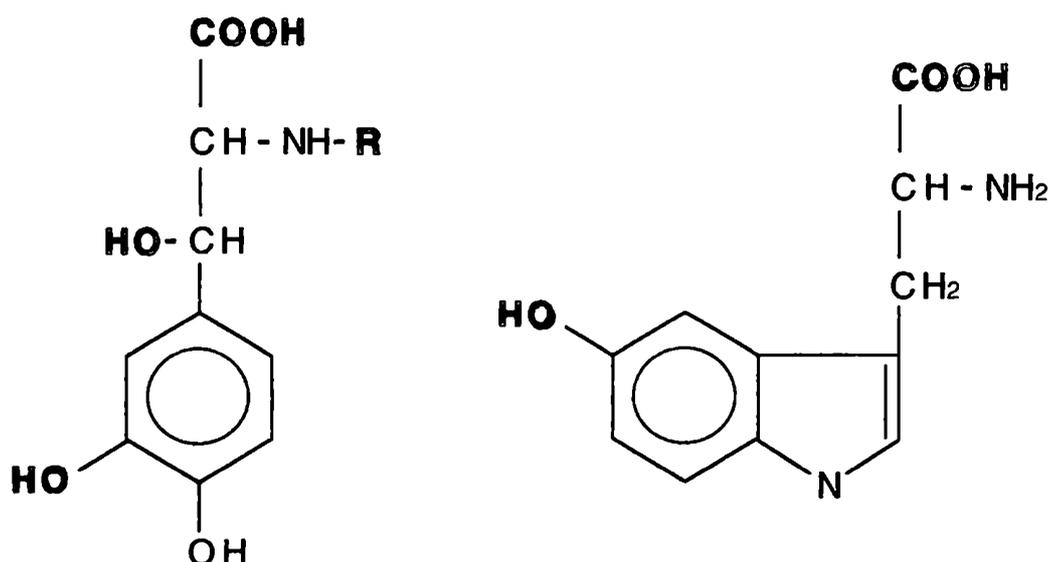
Los resultados obtenidos en esta Tesis parecen indicar que la enzima reconoce como sustratos no sólo a la dopamina, sino también a la norepinefrina, la tiramina, la octopamina, la triptamina, y la serotonina, siendo aparentemente capaz de sintetizar los correspondientes  $\beta$ -alanilconjugados. La dopamina, la octopamina, la serotonina y la

norepinefrina son los principales neurotransmisores del sistema nervioso de los insectos (Nagao y Tanimura, 1988) pero, de todos ellos, sólo la dopamina parecería estar presente en el integumento (Hopkins y Kramer, 1992). Por lo tanto, todas las aminas biogénicas importantes como mensajeros químicos del sistema nervioso de los insectos serían sustrato de la enzima (o grupo de isozimas) que sintetiza NBAD en la epidermis. La existencia de los otros  $\beta$ -alanilconjugados de los neurotransmisores de insectos (a excepción de NBAD) se comunican por primera vez en esta Tesis y por lo tanto, nada se sabe sobre la función que cumplirían en el sistema nervioso. Nuestra hipótesis es que, al igual que las formas acetiladas, estos conjugados de  $\beta$ -alanina representan formas inactivadas de los mensajeros químicos.

A partir de nuestros datos, puede establecerse un patrón de los requerimientos que debe cumplir una amina determinada para funcionar como sustrato de la enzima. Este patrón parece indicar que la enzima toma como sustratos tanto a mono como a di-fenoles estén o no  $\beta$ -hidroxilados siempre que éstos no estén carboxilados ni substituidos en el grupo amino (ver Fig 84). Por otra parte, la enzima funcionó también con triptamina y serotonina como sustratos, los cuales no son catecoles sino alquil-indolaminas; la presencia del oxidrilo en la posición 5 no interfiere con la actividad, pero tampoco en este caso, la forma carboxilada de la triptamina (el triptofano) puede ser reconocida como sustrato (ver Fig. 84).

Esta capacidad de utilizar catecoles o aminoindoles indistintamente como sustratos no es exclusiva de la NBAD sintetasa. Tanto la DOPA decarboxilasa como la N-acetiltransferasa, ambas enzimas importantes en la síntesis de precursores de esclerotización de la cutícula de los insectos, son activas en el sistema nervioso central (Hirsh, 1989; Murdock y Omar, 1981) y muestran una especificidad de sustrato análoga a la que encontramos en la NBAD sintetasa. La DOPA decarboxilasa cataliza la decarboxilación tanto de la DOPA para dar dopamina, como del 5-OH-triptofano para dar serotonina (Bray y col., 1988; Lundell y Hirsh, 1992; Morgan y col., 1986; Scholnick y col., 1986). La N-acetiltransferasa, enzima responsable de sintetizar la NADA para la esclerotización, en el sistema nervioso, puede acetilar además de dopamina, también norepinefrina, tiramina, octopamina, triptamina y serotonina (Evans y col., 1980; Mir y Vaughan, 1981; Murdock y Omar, 1981; Shampengtong y col., 1987; Martin y col., 1989). Está claro, por lo tanto, que la DOPA decarboxilasa interviene en la síntesis de componentes, tanto de la maquinaria esclerotizante como de componentes de la maquinaria informacional del sistema nervioso.

La N-acetiltransferasa y la N-β-alanildopamina sintetasa también tendrían una doble función. Son enzimas importantes en el proceso de esclerotización sintetizando NADA y NBAD para ser exportadas a la cutícula y por otra parte, en el sistema nervioso, intervendrían en el mecanismo de inactivación de las aminas biogénicas que actúan como neurotransmisores y neuromoduladores.



**Figura 84-** Características de la moléculas que servirían como sustrato a la NBAD sintetasa. En verde, se indican los grupos funcionales cuya presencia no interfiere con la actividad enzimática; en rojo, los grupos que le quitan a la molécula su condición de sustrato.

El hecho de que los cuatro principales neurotransmisores de los insectos sean sustrato de las dos enzimas que catalizan la acilación de la dopamina en el integumento para dar NADA y NBAD, sugiere la importancia de

estas enzimas en el sistema nervioso probablemente como inactivadoras de mensajeros químicos.

Por lo tanto, la batería completa de enzimas que cataliza la síntesis de precursores de la esclerotización en el integumento de los insectos estaría también activa en el sistema nervioso cumpliendo una función central en la neurofisiología del animal.

Si bien queda claro que la actividad NBAD sintetasa de extractos de cuerpo entero de *Ceratitis capitata* funciona indistintamente con dopamina y con otras aminas biogénicas como sustrato, no sabemos si, *in vivo*, la enzima que funciona en el sistema nervioso es la misma que cataliza la formación de NBAD en el integumento. Obligatoria, las pautas de regulación de la expresión génica en uno y en otro tejido deben ser distintas. Mientras que en el sistema nervioso la expresión muy probablemente sea constitutiva; en la epidermis está restringida al período en el que ocurre la esclerotización. Nuestras mediciones en homogenatos totales de *Ceratitis* mostraron un fuerte aumento de la actividad durante la esclerotización. Suponemos que, al igual que en el caso de la DOPA decarboxilasa (Hirsh, 1989), la actividad de la NBAD sintetasa en el sistema nervioso representaría un porcentaje muy pequeño de la actividad en el integumento (inferior al 5%). De este modo, cuando se mide la enzima en preparaciones de cuerpo entero, prevalecería la variación de la actividad que se expresa en la epidermis.

Estudios futuros permitirán determinar si son dos genes diferentes los que codifican para la NBAD sintetasa epidérmica y para la forma eventual del sistema nervioso. Del mismo modo, queda por determinarse si la especificidad de sustrato y otras propiedades bioquímicas de las formas expresadas en cada uno de los tejidos son iguales o diferentes. Ambas enzimas podrían estar codificadas por el mismo gen pero ser producto de diferentes modos de splicing o de modificaciones post-traduccionales específicas que determinen alguna diferencia bioquímica entre ellas. El clonado del gen y el estudio su regulación permitirán determinar cuáles son las bases moleculares de la especificidad de la expresión en cada uno de los tejidos.

## **9- La N-β-alanildopamina sintetasa como pieza clave del éxito evolutivo de los insectos**

La dopamina y otras aminas derivadas se encuentran ampliamente distribuidas tanto entre los invertebrados como entre los cordados, cumpliendo funciones, o bien informacionales (hormonas,

neurotransmisores y neuromoduladores), o bien formando parte de pigmentos en la epidermis. Las catecolaminas epidérmicas N-aciladas, como la NBAD y la NADA, en cambio, se encuentran exclusivamente en el Phylum Arthropoda, en el que son precursores de agentes esclerotizantes de la cutícula.

Se acepta que el éxito evolutivo de los insectos se debió, en gran medida, a las propiedades físico-químicas de la cutícula esclerotizada, ya que ésta no sólo actúa protegiendo al animal de las condiciones del medio ambiente, sino que también provee el soporte mecánico necesario para el anclaje de los músculos y sustentación del cuerpo. Tomando en cuenta que la cutícula marrón-rojiza típica de los insectos está siempre asociada con la esclerotización mediada por NBAD (Hopkins y Kramer, 1992), nosotros hipotetizamos que la aparición de la NBAD sintetasa expresada en la epidermis, fue una novedad evolutiva clave para la radiación de los insectos durante la era paleozoica.

Para poner a prueba nuestra hipótesis general de que la maquinaria esclerotizante evolucionó a partir de una maquinaria pre-existente en el sistema nervioso, primeramente habría que determinar cuán antigua es la NBAD sintetasa en el sistema nervioso de los invertebrados. Si la enzima se encontrara presente en el sistema nervioso de los invertebrados inferiores, será imprescindible estudiar en forma comparada en diversos taxones de invertebrados, los mecanismos moleculares que controlan la expresión del gen de la NBAD sintetasa en los diferentes tejidos. La determinación de las diferencias entre el control de la expresión del gen en la epidermis de los insectos y su control de la expresión en el sistema nervioso, como así también la determinación de las diferencias en la regulación entre los diferentes taxones de invertebrados podría permitir dilucidar cuáles fueron los eventos genéticos que permitieron la aparición de la maquinaria esclerotizante en la historia evolutiva de los invertebrados, a partir la maquinaria de síntesis e inactivación de moléculas informacionales en el sistema nervioso de los invertebrados inferiores (nuestra hipótesis se ilustra en la Figura 85; ver lámina en la página siguiente).

### **Figura 85- Modelo Hipotético de Cómo Habría Aparecido la Esclerotización Cuticular en la Evolución.**

En un ancestro hipotético de los artrópodos con cutícula blanda, la NBAD sintetasa (dibujada en rojo) se expresaba solamente en el sistema nervioso inactivando aminas biogénicas neurotransmisoras y/o neuromoduladoras. La inactivación de éstas se daría por conjugación con  $\beta$ -alanina (cuadrados azules). Durante el proceso evolutivo se habrían adicionado al gen de la NBAD sintetasa secuencias regulatorias específicas de epidermis (rectángulos verde y amarillo). Esto habría permitido que la enzima se exprese en la epidermis sintetizando N- $\beta$ -alanildopamina (NBAD), mediando así la esclerotización de la cutícula de los insectos. Una de las secuencias regulatorias del gen de la sintetasa es un elemento reconocible por el producto del gen *yellow*, que actuaría como represor (cuadrado amarillo).

(1) NBAD sintetasa, en esta Tesis fue medida por primera vez en un sistema libre de células y caracterizada parcialmente. La existencia de esta enzima en el sistema nervioso del ancestro de cutícula blanda es totalmente especulativa.

(2) Se propone que las aminas biogénicas, que funcionan como neurotransmisores en los invertebrados (dopamina, serotonina, etc.) fueron sustrato de la NBAD sintetasa en el sistema nervioso del ancestro hipotético. En esta Tesis presentamos evidencias de la formación de los correspondientes N- $\beta$ -alanilconjugados (3). Especulamos que esto pudo haber ocurrido también en el ancestro de cutícula blanda.

(4) Está demostrado que la NBAD sintetasa, en los insectos, se expresa preponderantemente en la epidermis (mosaicos *niger/salvaje* obtenidos en esta Tesis).

(5) Se sabe desde hace varios años que la N- $\beta$ -alanildopamina es el principal precursor de agentes esclerotizantes de la cutícula marrón de los insectos (Hopkins y col., 1982; Hopkins y Kramer, 1992). En esta Tesis se demuestra que también lo sería en el pupario de *Ceratitis capitata*.

(6) La expresión del gen de la sintetasa estaría restringido directa o indirectamente por los niveles de ecdisona a una angosta ventana de tiempo (esta Tesis). La secuencia regulatoria que mediaría este control por ecdisona está representada por el rectángulo verde.

(7) El exceso de dopamina da como consecuencia una cutícula melanizada de color negro. (demostrado en esta Tesis para los mutantes *Black pupa* y *niger* de *Ceratitis capitata* e informado previamente en otras especies de insectos por Hodgetts y Choi, 1974; Jacobs, 1985; Czaplá y col., 1989; Roseland y col., 1987).

(8) Proponemos aquí que el producto del gen *yellow* podría reprimir la expresión de la NBAD sintetasa en las regiones melanizadas de las cutículas que presentan patrones variegados de pigmentación. Los mosaicos *niger/salvaje* (esta Tesis) demuestran que, en las zonas de la epidermis en las que la NBAD sintetasa no se expresa la cutícula se melaniza. Se sabe que el gen *yellow* controla el patrón de pigmentación de la cutícula de *Drosophila melanogaster*, expresándose solamente en las zonas melanizadas de la cutícula (Walter y col., 1991). No se conoce el mecanismo molecular subyacente.

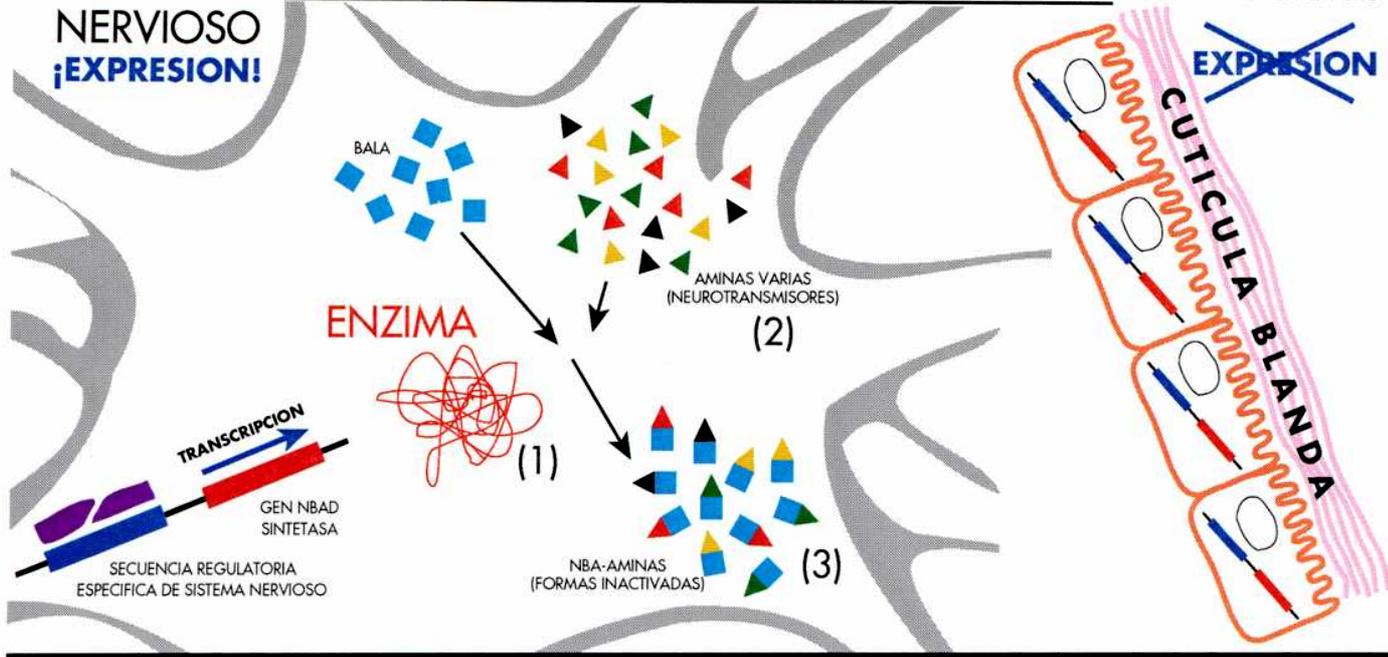
(9) Por experimentos de síntesis en sistemas de cultivo de tejidos se vio que la NBAD sintetasa se expresa en el sistema nervioso de los insectos (Krueger y col., 1990). En esta Tesis se aportan evidencias de que la enzima reconoce como sustratos a moléculas típicas del sistema nervioso.

(10) Demostramos en esta Tesis que cuando la NBAD sintetasa no se expresa (mutante *niger*) se acumulan altos niveles de dopamina que conducen a la melanización de la cutícula.

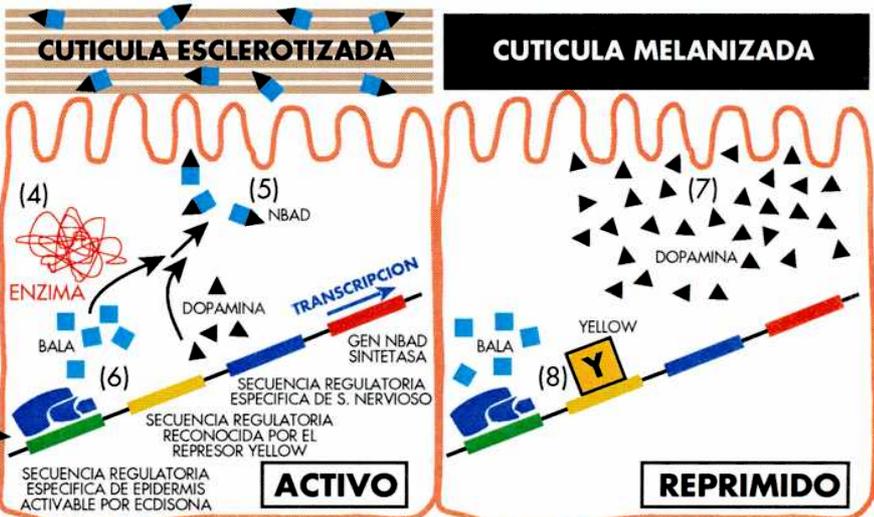
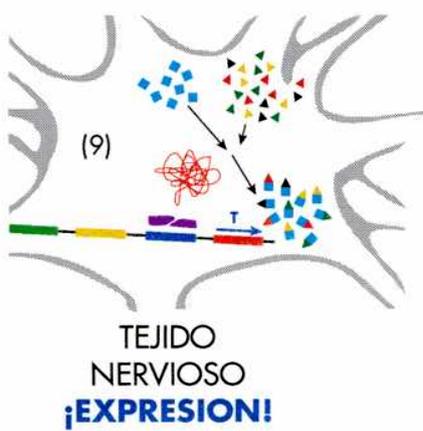
TEJIDO NERVIOSO ¡EXPRESION!

# ANCESTRO DE CUTICULA BLANDA

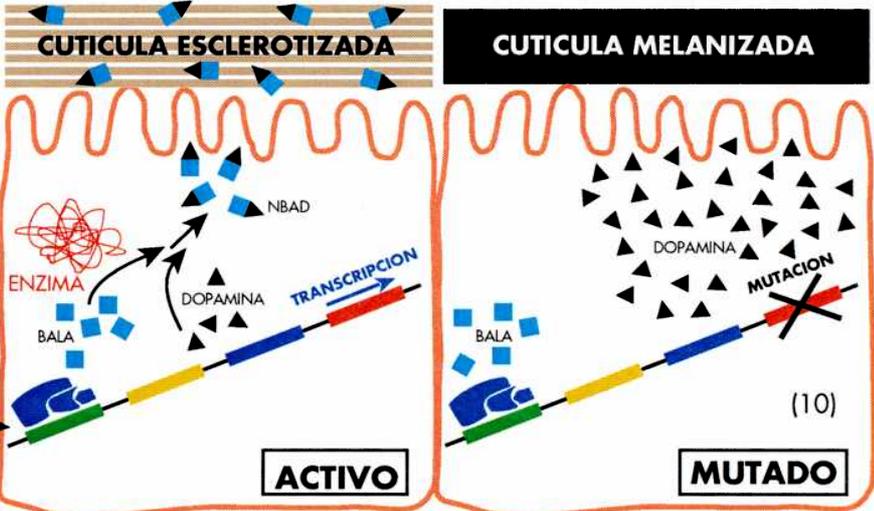
EPIDERMIS



## ARTROPODO



EPIDERMIS (INDIVIDUO VARIEGADO) ¡EXPRESION!



EPIDERMIS (INDIVIDUO MOSAICO) ¡EXPRESION!

# Conclusiones

## I- Hemos descrito el primer mutante de insectos con una deficiencia en la maquinaria de transporte de materiales a la cutícula

1) Demostramos que el mutante *white pupa* de *Ceratitis capitata* es incapaz de esclerotizar el pupario. Esto pudimos comprobarlo midiendo la rigidez de los puparios del mutante y de la cepa salvaje a lo largo del proceso de pupariación. Coincidentemente, la ultraestructura del pupario de *white pupa*, estudiada por microscopía electrónica de barrido resultó ser aberrante.

2) La incapacidad del mutante *white pupa* de esclerotizar su pupario se debe a la ausencia de catecolaminas en esta estructura cuticular. Esto fue verificado tanto mediante análisis químicos por Cromatografía Líquida de Alta Performance con detección electroquímica, como por estudios de Resonancia Magnética Nuclear de estado sólido. Estos últimos revelaron además, que *white pupa* presenta un contenido de proteínas en el pupario disminuido con respecto al del tipo salvaje.

3) La ausencia de catecolaminas en el pupario del mutante se debe a un defecto en la maquinaria epidérmica de transporte. La síntesis de catecolaminas parece ser normal pero, en lugar de ser transportadas a la cutícula, éstas se acumulan en la hemolinfa hasta alcanzar concentraciones 10 veces mayores que las de la cepa salvaje.

4) En el mutante, las enzimas insolubles de cutícula encargadas de derivatizar las catecolaminas para convertirlas en agentes esclerotizantes parecen estar intactas. La actividad de fenoloxidasas cuticulares resultó ser idéntica a la de la cepa salvaje con todos los sustratos que se ensayaron. Cuando se incubaron puparios del mutante en presencia de N-acetildopamina o N- $\beta$ -alanildopamina, se logró obtener esclerotización *in vitro*. De forma similar, cuando los puparios de *white pupa* fueron incubados con dopamina se logró obtener melanización *in vitro*. Estos resultados indican que todas las enzimas cuticulares del mutante necesarias para la esclerotización y la melanización están intactas y que cuando las catecolaminas logran acceder a la cutícula, la esclerotización o la melanización se producen.

**II- Hemos demostrado que contrariamente a lo que se creía, la deshidratación de la cutícula que ocurre durante la esclerotización es independiente de la incorporación de catecolaminas**

1) Medimos el contenido de agua del pupario del mutante *white pupa* y de la cepa salvaje a lo largo del proceso de pupariación. Encontramos que, a pesar de que el mutante no incorpora catecolaminas a la cutícula, la deshidratación de su pupario es idéntica a la del pupario de la cepa salvaje. Esto contradice un modelo ampliamente aceptado -para el que no existían pruebas experimentales- que postula que la deshidratación cuticular se debe al desplazamiento físico-químico del agua por parte de las catecolaminas que se incorporan a la cutícula y aumentan la hidrofobicidad de la matriz.

2) A partir de nuestros resultados y de datos de la literatura, elaboramos un modelo alternativo para explicar la deshidratación de la cutícula de los insectos durante la esclerotización. El modelo propone que, en forma parecida a lo que ocurre en la cutícula abdominal de las ninfas de vinchuca (cutícula que nunca se esclerotiza), el contenido de agua cuticular es controlado por la epidermis merced a la regulación del pH extracelular que ocurriría durante la esclerotización.

**III- Hemos estudiado por primera vez en sistema libre de células y caracterizado parcialmente a la N-β-alanildopamina sintetasa, enzima que sintetiza el principal precursor de agentes esclerotizantes de la cutícula marrón de los insectos.**

1) Desarrollamos un ensayo de actividad rápido y sencillo para medir la N-β-alanildopamina sintetasa. Hicimos una caracterización parcial de los requerimientos básicos y propiedades de la actividad enzimática. Encontramos que la actividad está restringida a una ventana de tiempo relativamente angosta que coincide con el período en el que ocurre la esclerotización. Ello implica que esta actividad enzimática está regulada por los mecanismos generales que controlan el proceso global de muda el cual, a su vez, depende de la variación temporal de las concentraciones de ecdisona.

2) Estudiamos la especificidad de sustrato de la NBAD sintetasa. Si bien queda por confirmarse la identidad química de los productos de reacción, nuestros resultados parecen indicar que la NBAD sintetasa admitiría como sustratos, en reemplazo de la dopamina a varias otras aminas biogénicas que cumplen la función de neurotransmisores. Esto provee una evidencia

indirecta de que la enzima cumpliría un rol en el sistema nervioso central posiblemente participando de la inactivación de estos mensajeros químicos.

3) Especulamos que la N- $\beta$ -alanildopamina sintetasa pudo haber sido una pieza clave en la aparición de la cutícula esclerotizada de los artrópodos durante la historia evolutiva de los invertebrados. Hipotetizamos que posiblemente se expresaba sólo en el sistema nervioso central del invertebrado ancestral de cutícula blanda y que cambios en secuencias que regulaban la expresión del gen permitieron que éste comenzara a expresarse en la epidermis bajo el control de la ecdisona. Este cambio de expresión habría sido fundamental para el surgimiento de la cutícula esclerotizada en la evolución.

#### **IV- Hemos caracterizado al mutante melánico *niger* de *Ceratitis capitata*, el cual resultó ser deficiente en la enzima que conjuga dopamina con $\beta$ -alanina para dar N- $\beta$ -alanildopamina**

1) El mutante *niger* resultó ser incapaz de utilizar la  $\beta$ -alanina para la esclerotización de la cutícula. Se inyectó [ $^{14}\text{C}$ ] $\beta$ -alanina como trazador en pre-pupas de la cepa salvaje y del mutante melánico. Se vio que, mientras que en la cepa salvaje la mayor parte de la radioactividad se recuperó del pupario esclerotizado, en el mutante *niger* la mayoría de la  $\beta$ -alanina radioactiva fue metabolizada y eliminada como dióxido de carbono.

2) La composición de catecolaminas de *niger* resultó ser anómala y semejante a la del mutante *Black pupa*. Tanto en cutícula como en hemolinfa, *niger* exhibió niveles disminuidos de N- $\beta$ -alanildopamina y niveles incrementados de N-acetildopamina y dopamina. El exceso de dopamina libre entraría en la vía de síntesis de melanina y sería en última instancia, la causante del color negro del pupario. En este sentido, el mutante *niger* de *Ceratitis capitata* sería homólogo al mutante *ebony* de *Drosophila melanogaster*.

3) Los experimentos de síntesis de N- $\beta$ -alanildopamina tanto *in vivo* como *in vitro* revelaron que el mutante *niger* no es capaz de llevar a cabo la reacción de conjugación de dopamina con  $\beta$ -alanina. El defecto en esta reacción de conjugación provocaría que el mutante tenga niveles incrementados de los sustratos dopamina y  $\beta$ -alanina.

**V- Hemos caracterizado al mutante melánico *Black pupa* de *Ceratitis capitata*, el cual resultó ser deficiente en el aminoácido  $\beta$ -alanina**

1) Mediciones directas de los niveles endógenos de  $\beta$ -alanina en la cepa salvaje y en el mutante *Black pupa* mostraron que los niveles de este último se encuentran reducidos a la mitad de los de la cepa salvaje. Cuando se inyectó  $\beta$ -alanina en el mutante se logró recuperar el fenotipo normal, indicando que el defecto en  $\beta$ -alanina es efectivamente la causa del fenotipo melánico del pupario de *Black pupa*.

2) El fenotipo cuticular del mutante y de la cepa salvaje fueron manipulados mediante inyecciones con distintas cantidades relativas de  $\beta$ -alanina y dopamina, demostrando que, del balance de concentraciones de estas dos sustancias, emerge la coloración final de la cutícula de *Ceratitis capitata*. Mientras que cantidades comparativamente altas de dopamina conducen a una cutícula melanizada de color negro, un exceso de  $\beta$ -alanina lleva a una cutícula esclerotizada de color marrón.

3) Se determinaron por HPLC las cantidades endógenas de catecolaminas en el pupario y en la hemolinfa del mutante y de la cepa salvaje a lo largo del desarrollo. Los datos mostraron que, en comparación con la cepa salvaje, tanto en la hemolinfa como en la cutícula, el mutante tiene niveles muy bajos de N- $\beta$ -alanildopamina y niveles muy altos de dopamina y N-acetildopamina. La falta de  $\beta$ -alanina sería la causa de bajos niveles de síntesis de N- $\beta$ -alanildopamina. De este modo, se acumularía un exceso de dopamina libre, el cual sería utilizado para la síntesis de N-acetildopamina y de melanina. La deposición de melanina sería la causa del color negro del pupario. El mutante *Black pupa* de *Ceratitis capitata* sería por lo tanto, homólogo al mutante *black* de *Drosophila melanogaster*.

# **Proyección Futura**

La presente Tesis ha dejado pendientes una multitud de interrogantes y abierto una serie de problemas que creemos que habría que encarar con las estrategias que se enumeran a continuación.

### **I- Sobre el mutante *white pupa* y el sistema epidérmico de transporte a la cutícula**

- 1) Estudios bioquímicos destinados a aislar y caracterizar el transportador epidérmico presuntamente dañado en el mutante *white pupa*.
- 2) Experimentos de detección diferencial por PCR de ARNs mensajeros de *white pupa* y de la cepa salvaje destinados a aislar el gen del putativo transportador epidérmico.

### **II) Sobre el problema de la deshidratación de la cutícula de los insectos durante la esclerotización**

Queda por demostrarse la validez del modelo alternativo que hemos propuesto para explicar la deshidratación de la cutícula durante la esclerotización. Dos tipos de experimentos quedan pendientes en este sentido.

- 1) Mediciones directas del pH cuticular durante la esclerotización y, con las mismas piezas de cutícula, determinación del contenido de agua. De este modo podría obtenerse una correlación ajustada y directa entre ambos parámetros.
- 2) Experimentos en los que se incubarían piezas de cutícula a diferentes valores de pH en tampones de baja fuerza iónica. Posteriormente se mediría el contenido de agua en dichas piezas cuticulares. De este modo podría establecerse una relación causa-efecto entre la variación del pH y el contenido de agua de la cutícula.

### **III- Sobre el mutante *niger* y la N-β-alanildopamina sintetasa**

- 1) Completar los estudios de especificidad de sustrato de la enzima. Primeramente habría que confirmar la identidad química de las nuevas β-alanil-aminas que hemos descubierto. Luego, mediante estudios cinéticos, habría que caracterizar el tipo de inhibición que ejercen las diferentes aminas biogénicas sobre la síntesis de NBAD para determinar fehacientemente que la misma enzima es la que sintetiza tanto la NBAD como los β-alanilconjugados de los neurotransmisores.

- 2) Determinar la actividad N- $\beta$ -alanildopamina sintetasa en tejido nervioso disecado y comparar las propiedades bioquímicas de la enzima con las de la forma epidérmica (también obtenida por disección). De este modo podría llegar a dirimirse si existen isoformas diferentes (posiblemente con distintas especificidades de sustrato) en la epidermis y en el sistema nervioso.
- 3) Encontrar el modo de estabilizar la actividad enzimática para poder intentar la purificación de la enzima.
- 4) Intentar el clonado del gen de la NBAD sintetasa a través de alguna de las siguientes estrategias:
  - a) Usando un anticuerpo contra la enzima purificada a homogeneidad, intentar aislar el gen de una genoteca de expresión.
  - b) Intentar el clonado directo mediante una estrategia de detección diferencial por PCR de ARNs mensajeros en *niger* y en la cepa salvaje.
  - c) Preparar una genoteca diferencial que permita identificar el gen. El gen *ebony*, aparentemente homólogo de *niger* en *Drosophila melanogaster* todavía no ha sido clonado.

#### **IV- Sobre la importancia de la N- $\beta$ -alanildopamina sintetasa en la evolución de los artrópodos**

Para poder contrastar nuestra hipótesis sobre el modo en que se desarrollaron los acontecimientos evolutivos, los experimentos deberían centrarse en el estudio de la regulación de la expresión del gen de la N- $\beta$ -alanildopamina sintetasa en los distintos tejidos y en los diferentes taxones. Los pasos a seguir serían los siguientes:

- 1) El estudio de la regulación de la expresión del o de los genes que codifican para esta enzima en la epidermis y en el sistema nervioso central de los insectos y otros artrópodos.
- 2) Utilizando anticuerpos específicos contra la enzima o sondas específicas para el gen, llevar a cabo estudios de biología comparada que permitan determinar si la enzima existe en los invertebrados inferiores.
- 3) Dependiendo de los resultados del punto (2), estudiar la regulación de la expresión del o de los genes en invertebrados inferiores y compararla con la de los artrópodos.

De este modo, sería teóricamente posible identificar molecularmente cuáles son los elementos en *cis* o en *trans* que controlan la expresión del gen de la N- $\beta$ -alanildopamina sintetasa en los diferentes tejidos y en los diferentes

taxones. El estudio de la evolución de estos elementos de control a lo largo de la filogenia de los invertebrados podría permitir determinar cuáles fueron los mecanismos moleculares por los que dichos genes comenzaron a expresarse en la epidermis, cayendo bajo el control del sistema endócrino junto con la batería de genes que participa en el proceso de muda.

#### V) Sobre el mutante *Black pupa*

1) Identificación del defecto bioquímico que produce niveles disminuidos de  $\beta$ -alanina en el mutante. Sería interesante determinar si los bajos niveles de este  $\beta$ -aminoácido se deben a un defecto en su síntesis o a su excesivo catabolismo.

2) Aislamiento y caracterización del gen responsable del defecto fenotípico (el gen homólogo no fue clonado en *Drosophila melanogaster* ni en ninguna otra especie). Podrían llevarse a cabo detección diferencial por PCR de ARNs mensajeros del mutante y de la cepa salvaje o alternativamente preparar una genoteca diferencial que permita identificar el gen.

# **Bibliografía**

- Ahmed R. F. , Hopkins T. L. and Kramer K. J. (1983) Tyrosine and tyrosine glucoside titres in whole animals and tissues during development of the tobacco hornworm *Manduca sexta* (L.) . *Insect. Biochem.* **13**, 369-379.
- Ahmed R. F. , Hopkins T. L. and Kramer K. J. (1983) Tyrosine glucoside hydrolase activity in tissues of *Manduca sexta* (L.): effect of 20-hydroxyecdysone. *Insect. Biochem.* **13**, 641-645.
- Akam M. Dawson I. and Tear G. (1988) Homeotic genes and the control of segment identity . *Development Suppl.* , 123-133.
- Akam M., Averof M. , Castelli-Gair J. , Dawes R. , Falciani F. and Ferrier D. (1994) The evolving role of Hox genes in arthropods. *Development Suppl.* , 209-215.
- Alberch P. (1980) Ontogenesis and morphological diversification . *Amer. Zool.* **20**, 653-667.
- Andersen S. O. (1974) Evidence for two mechanism of sclerotization in insect cuticle. *Nature* **251**, 507-508.
- Andersen S. O. (1978) Characterization of a trypsin-solubilized phenoloxidase from locust cuticle. *Insect Biochem.* **8** , 143-148.
- Andersen S. O. (1979) Biochemistry of insect cuticle. *Ann. Rev. Entomol.* **24**, 29-61.
- Andersen S. O. (1979) Characterization of the sclerotization enzyme(s) in locust cuticle. *Insect Biochem.* **9** , 233-239.
- Andersen S. O. (1985) Sclerotization and tanning of the cuticle. In *Comparative Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Edited by Kerkut G. A. and Gilbert L. J.) vol. 3, pp. 59-74, Pergamon Press, New York.
- Andersen S. O. (1989-A) Enzymatic activities in locust cuticle involved in sclerotization. *Insect Biochem.* **19**, 59-67.
- Andersen S. O. (1989-B) Enzymatic activities involved in incorporation of N-acetyldopamine into insect cuticle during sclerotization. *Insect Biochem.* **19**, 375-382.
- Andersen S. O. (1989-C) Oxidation of N- $\beta$ -alanyldopamine by insect cuticles and its role in cuticular sclerotization. *Insect Biochem.* **19**, 581-586.
- Ashburner M. (1989) *Drosophila*, a laboratory handbook . Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York .
- Aso Y. , Kramer K. J. , Hopkins T. L . and Whetzel S. Z. (1984) Properties of tyrosinase and DOPA quinone imine conversion factor from pharate pupal cuticle of *Manduca sexta* (L.) . *Insect. Biochem.* **14**, 463-472.
- Aso Y. , Kramer K. J. , Hopkins T. L. and Lookhart G. L. (1985) Characterization of haemolymph tyrosinase and a cuticular activator from *Manduca sexta* (L.) . *Insect. Biochem.* **15**, 9-17.

- Averof M. and Akam M. (1993) HOM/Hox genes of *Artemia*: implications for the origins of insect and crustacean body plans. *Curr. Biol.* 3, 73-78.
- Awan F. A. and Hominick W. M. (1982) Observations on tanning of the potato cyst-nematode. *Globodera rostochiensis*. *Parasitology* 85, 61-71.
- Axerold J. and Weissbach H (1961) Purification and properties of hydroxyindole-O-methyltransferase. *J. Biol. Chem* 236, 211-213.
- Barret F. M. and Andersen S. O. (1981) Phenoloxidasas in larval cuticle of the blowfly, *Calliphora Vicina*. *Insect. Biochem.* 17, 17-23.
- Barrett F. M. (1987) Penoloxidasas from larval cuticle of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*:: characterization, developmental changes, and inhibition by antiphenoloxidasas antibodies. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 5, 99-118.
- Barton N. H. and Charlesworth B. (1984) Genetic revolutions, founder effects, and specification. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15, 133-161.
- Bateson W. (1894) Materials for the study of variations. Macmillan and Co., London.
- Beeman R. W., Stuart J. J., Brown S. J. and Denell R. E. (1993) Structure and function of the homeotic gene complex (HOM-C) in the beetle *Tribolium castaneum*. *BioEssays* 15, 439-444.
- Bender W., Akam M., Karch F., Beachy P. A., Peifer M., Spierer P., Lewis P. A. and Hogness D. S. (1983) Molecular genetics of the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *Science* 221, 23-30.
- Berreur P. and Fraenkel G. (1969) Puparium formation in flies contraction to puparium induced by ecdisone. *Science* 164, 1182-1183.
- Biessmann H. (1985) Molecular analysis of the yellow gene (*y*) region of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Antl. Acad. USA* 82, 7369-7373.
- Bird A. F. (1984) Pseudocoelomata. In Biology of the integument (Edited by Bereiter-Ham J., Matoltsy A. G. and Sylvia Richards K.) vol 1, pp. 212-230, Springer-Verlag, New York.
- Black B. C. and Smarrelli J. (1986) A kinetic analysis of *Drosophila melanogaster* DOPA decarboxylase. *Biochim. Biophys. Acta* 870, 31-40.
- Boccaccio G. L. and Quesada-Allué L. A. (1989) In vivo biosynthesis of a stage-specific cuticle glycoprotein during early metamorphosis of the Medfly *Ceratitis capitata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 251-258.
- Boccaccio G. L. (1991) Síntesis de proteínas cuticulares durante la metamorfosis de la mosca Mediterránea *Ceratitis capitata*. Tesis de doctorado. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Boccaccio G. L. and Quesada-Allué L. A. (1994) Synthesis and deposition of PCG-100, the main pupal cuticle of the medfly *Ceratitis capitata*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 27, 217-234.

- Bodnaryk R. P. (1970) Effect of dopa-decarboxylase inhibition on the metabolism of  $\beta$ -alanyl-L-tyrosine during puparium formation in the fleshfly *Sarcophaga bullata* Parker. *Comp. Biochem.* **35**, 221-227.
- Bray S. J. , Johnson W. A. , Hirsh J. , Hebelein U. and Tjian R. (1988) A cis-acting element and associated binding factor required for CNS expression of the *Drosophila melanogaster* dopa decarboxylase gene. *The Embo journal* **7** , 177-188.
- Brown C. and Nestler C. (1985) Catecholamines and Indolalkylamines. In Comparative Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (Edited by Kerkut G. A. and Gilbert L. J.) vol. 11, pp. 435-497, Pergamon Press, New York.
- Brunet P. C. J. (1980) The metabolism of aromatic amino acids concerned in the cross linking of insect cuticle. *Insect Biochem.* **10** , 467-500.
- Cabib E. (1972) Chitin synthetase system from yeast. In *Methods in enzymology* (Edited by Ginsburg V. ) . Vol 28 , Academic Press , New York.
- Carrasco A. E. , McGinnis W. , Gehring W. J. and De Robertis E. M. (1984) Cloning of an *X. laevis* gene expressed during early embryogenesis coding for a peptide region homologous to *Drosophila* homeotic genes . *Cell* **37**, 409-414.
- Carroll S. B. , Gates J. , Keys D. , Paddock S. W. , Panganiban G. F. , Selgue J. and Williams J. A. (1994) Pattern formation and eyespot determination in butterfly wings . *Science* **265**, 109-114.
- Carroll S. B. (1994) Developmental regulatory mechanisms in the evolution of insect diversity. *Development Supple*, 217-223.
- Carroll S , Weatherbee S. and Langeland J. (1995) Homeotic genes and the regulation and evolution of insect wing number. *Nature* **375**, 58-61.
- Carson H. L and Templeton A. R. (1984) Genetic revolutions in relation to speciation phenomena: the founding of new populations . *Ann Rev. Ecol. Syst.* **15**, 97-131.
- Charalambidis N. D., Lambropoulou M. and Marmaras V. J. (1994) Mutation "white pupae" in the integument of *Ceratitis capitata* affect both defense and melanogenesis. *Dev. Comp. Immunol.* **18**, 193-200.
- Chen D. (1968). In *Experiments in Physiology and Biochemistry* (Edited by Kerkut G.A.) .Vol. 1, pp. 201-208. Academic Press. N. York.
- Christenson L. D. and Foote R. H. (1960) Biology of fruit flies . *Ann. Rev. Ent.* **5** , 171-192.
- Chrysanthis G. , Vassilis J. M. and Christodoulou C. (1981) Major Haemolymph proteins in *Ceratitis capitata* . Biosynthesis and secretion during development . *Wilhelm Roux's Archives* **190**, 33-39.
- Cladera J. L. and Manso F. C. (1988) The limit of tolerance to heat pulses during embryogenesis in *Ceratitis capitata*, Wiedemann (Diptera; Tephritidae) . *Insect. Sci. Applic.* **9**, 61-67 .

- Clark W. C., Pass P. S. , Venkataraman B. and Hodgetts R. B. (1978) Dopa decarboxylase from *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* 162, 287-297.
- Cox D. L. (1987) Analysis of the cuticular proteins of *Hyalophora cecropia* with polyclonal antibodies. *Insect. Biochem.* 17, 485-492.
- Crossley S. and Zuill E. (1970) Courtship behaviour of some *Drosophila melanogaster* mutante . *Nature* 225, 1064-1065.
- Czapla T. H. , Hopkins T. L. and Kramer K. J. (1989). Catecholamines in the cuticle of four strains of the German cockroach *Blattella germanica* . *Archs. Insect Biochem. Physiol.* 12, 145-156.
- Czapla T. H. , Hopkins T. L. and Kramer K. J. (1990-A). Catecholamines and related *o*-diphenols in cockroach hemolymph and cuticle during sclerotization and melanization: Comparative studies on the order Dictyoptera . *J. Comp. Physiol. B* 160, 175-181.
- Czapla T. H. , Hopkins T. L. and Kramer K. J. (1990-B) Catecholamines in the cuticle of four strains of the German cockroach *Blattella germanica* (L) during sclerotization and melanization. *Archs. Insect Biochem. Physiol.* 12, 145-156.
- Czapla T. H. , Hopkins T. L. and Kramer K. J. (1990-C) Cuticular strenght and pigmentation of five strains of adult *Blattella germanica* (L.) during sclerotization: Correlations with catecholamines,  $\beta$ -alanine and food deprivation. *J. Insect. Physiol.* 9, 647-654.
- Daquinang A. C. , Nakamura S. , Takao T. , Shimonishi Y. and Tsukamoto T. (1995) Primary structure of a potent endogenous dopa-containing inhibitor of phenol oxidase from *Musca domestica* . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 2964-2968.
- Darwin Ch. (1859) On the origin of species by means of natural selection, or preservation of favoured races in the struggle for life . Murray , London.
- Darwin Ch. (1872) Origin of Species . 6th ed. Oxford University , press reprint , Oxford (mencionado por Wagner y Müller, 1991).
- Denlinger D. L. and Zdárek J. (1994) Metamorphosis behavior of flies. *Ann. Rev. Entomol.* 39, 243-266.
- Dixon K. E. (1965) Structure and histochemistry of the cyst walls of metacercaria of *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 55, 215-226.
- Dobzhansky Th. (1955) A review of some fundamental concepts and problems of population genetics. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 20: 1-15.
- Dorsett L. C. , Hawkins C. J. , Grice J. A. , Lavin M. F. , Merefield P. M. , Parry D. L. and Ross I. L. (1987) Ferreascidin: a highly aromatic protein containing 3,4-dihydroxyphenylalanine from the blood cells of a stolidobranch ascidian. *Biochemistry* 26, 8078-8082.
- Eldredge N. and Cracraft J. (1980) Systematics and the evolutionary process . In *Phylogenetic patterns and the evolutionary process* . Columbia University Press .

- Eldredge N. (1982) La macroevolución . *Mundo Científico* 16, 793-803.
- Ellison N. , Weller J. L. and Klein D. C. (1972) Development of a circadian rhythm in the activity of pineal serotonin N-acetyltransferase . *J. Neurochem.* 19, 1335-1341.
- Evans P. H. , Soderlund D. M. and Aldrich J. R. (1980) *In vitro* N-acetylation of biogenic amines by tissues of the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner . *Insect. Biochem.* 10, 375-380.
- Fraenkel G. and Rudall K. M. (1940) A study of the physical and chemical properties of insect cuticles. *Proc. R. Soc. B* 129, 1-35.
- Fraenkel G. and Rudall K. M. (1947) The structure of insect cuticles *Proc. R. Soc. B* 134, 111-143.
- Fraenkel G. , Zdárek J. and Sivasubramanian P. (1972) Hormonal factors in the CNS and hemolymph of pupariating fly larvae which accelerate puparium formation and tanning . *Biol. Bull.* 143, 127-139.
- Fraenkel G. , Blechl A. , Herman P. and Seligman M. (1977) 3':5' -cyclic AMP and hormonal control of puparium formation in the fleshfly (*Sarcophaga bullata*) . *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74, 2182-2186.
- Fragoulis E. G. and Sekeris C. E. (1975) Purification and characteristics of DOPA-decarboxylase from the integument of *Calliphora vicina* larvae. *Arch. Biochem. Biophys.* 168, 15-25.
- Garcia-Fernandez J. and Holland P. (1994) Archetypal organization of the amphioxus Hox gene cluster. *Nature* 37, 563-566.
- Gehring W , Quian Y , Billeter M , Furukubo-Tokunaga K , Schier A, Resendez-Perez D , Affolter M , Otting G , Wurthrich K. (1994) Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78, 211-233.
- Goldschmidt R. (1940) The material basis of evolution . Yale University Press , New Haven.
- Goldschmidt R. (1948) Glow worms and evolution . *Rev. Sci.* 86, 607-612.
- Gould S. J. (1977) Ontogeny and phylogeny . Harvard Univ. Press, Cambridge.
- Gould S. J. and Eldredge N. (1977) Punctuated equilibria: the tempo and mode of evolution reconsidered . *Paleobiology* 3, 115-151.
- Gould S. J. and Vrba E. S. (1982) Exaptation, a missing term in the science of form . *Paleobiology* 8, 4-15.
- Gould S. J. (1983) El darwinismo y la expansión de la teoría de la evolución . *Interciencia* 8, 143-152.
- Grodsky G. M. (1977) The chemistry and functions of the hormones. In Review of Physiological Chemistry (16<sup>th</sup> edition) (Edited by Harper H. A.; Rodwell V. W. and Mayes P. A.) pp 462-515. Lange Medical Publications, Los Altos, California.

- Grun L. and Peter M. G. (1984) Incorporation of radiolabeled tyrosine, N-acetyldopamine, N- $\beta$ -alanyldopamine, and the arylphorin manducin into sclerotized cuticle of tobacco hornworm (*Manduca sexta*) pupae. *Z. Naturforsch* 39 C, 1066-1071.
- Hackman R. H. (1974) Chemistry of the insect cuticle. In *The Physiology of insecta* (Edited by Rockstein M.) vol. 6, pp. 215-270, Academic Press, New York and London.
- Hackman R. H. and Goldberg M. (1977) Molecular crosslinks in cuticle. *Insect Biochem* 7, 175-184.
- Hackman R. H. and Goldberg M. (1987) Comparative study of some expanding arthropod cuticles: the relation between composition, structure and function. *J. Insect Physiol.* 33, 39-50.
- Hadley N. F. (1986) The arthropod cuticle. *Scientific American* 255, 98-106.
- Hepburn H. R. (1976) *The insect integument*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
- Hepburn H. R. (1985) Structure of the integument. In *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry Pharmacology* (Edited by Kerkut G. A. and Gilbert L. J.) vol. 3, pp. 1-58, Pergamon Press, New York.
- Hillerton J. E. and Vincent J. F. V. (1979) The stabilization of insect cuticles. *Insect Biochem.* 25, 957-963.
- Hirsh J. (1989) Molecular genetics of dopa decarboxylase and biogenic amines in *Drosophila*. *Dev. Genet.* 10, 232-238.
- Hiruma K. and Riddiford L. M. (1986) Inhibition of DOPA decarboxylase synthesis by 20-hydroxyecdysone during the last larval moult of *Manduca sexta*. *Insect Biochem* 16, 225-231.
- Hiruma K. and Riddiford L. M. (1990) Regulation of dopa decarboxylase gene expression in the larval epidermis of the tobacco hornworm by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone. *Dev. Biol.* 138, 214-224.
- Hodgetts R. B. (1972). Biochemical characterization of mutants affecting the metabolism of  $\beta$ -alanine in *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* 18, 937-947.
- Hodgetts R. B. and Choi A. (1974).  $\beta$ -alanine and cuticle maturation in *Drosophila*. *Nature* 252, 710-711.
- Hodgetts R. B. and Konopka R. J. (1973). Tyrosine and catecholamine metabolism in a wild type *Drosophila melanogaster* and a mutant *ebony*. *Genetics* 79, 45-54.
- Holland P. W., Holland L. Z., Williams N. A. and Holland N. (1992) An amphioxus homeobox gene: sequence conservation, spatial expression during development and insights into vertebrate evolution. *Development* 116, 653-661.

- Hopkins T. L. and Wirtz R. A. (1976) Dopa and tyrosine decarboxylase activity in tissues of *Periplaneta americana* in relation to cuticle formation and ecdysis. *J. Insect Physiol.* **22**, 1167-1171.
- Hopkins T. L. and Kramer K. J. (1992) Insect cuticle sclerotization. *Ann. Rev. Entomol.* **37**, 273-302.
- Hopkins T. L., Morgan T. D. and Kramer K. J. (1984). Catecholamines in haemolymph and cuticle during larval, pupa and adult development of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* **14**, 533-540.
- Hopkins T. L., Morgan T. D., Aso Y. and Kramer K. J. (1982) N- $\beta$ -alanyldopamine: major role in insect cuticle tanning. *Science* **217**, 363-366.
- Hori M. , Hiruma K. and Riddiford L. M. (1984) Cuticular melanization in the tobacco hornworm larva . *Insect. Biochem.* **14**, 267-274.
- Hotta Y. and Benzer S. (1969) Abnormal electroretinograms in visual mutants of *Drosophila* . *Nature* **222**, 354-356.
- Jacobs M. E. (1966). Deposition of labeled beta-alanine in *ebony* and non *ebony* *Drosophila melanogaster* with notes on other amino acids. *Genetics* **53**, 777-784.
- Jacobs M. E. (1968).  $\beta$ -alanine use by *ebony* and normal *Drosophila melanogaster* with notes on glucose, uracil, DOPA and dopamine. *Biochem. Genet.* **1**, 267-275.
- Jacobs, M. E. (1976). Binding of  $\beta$ -alanine, dopamine and DOPA 1-C-14 by normal, *ebony* and dark *Drosophila melanogaster* cuticles. *Insect Biochem.* **6** , 497-499.
- Jacobs M. E. (1985). Role of beta-alanine in cuticular tanning, sclerotization and temperature regulation in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **6** , 509-515.
- Jacobs M. E. and Brubaker K. K. (1963). Beta-Alanine utilization of *ebony* and non *ebony* *Drosophila melanogaster*. *Science* **139** , 1282-1283.
- Jensen R. A. and Morse D. E. (1988) The bioadhesive of *Phragmatopoma californica* tubes: a silk-like cement containing L-DOPA. *J. comp. Physiol.* **158 B**, 317-324.
- Karlson P. and Sekeris C. E. (1962) N-acetyl-dopamine as sclerotizing agent of insect cuticle. *Nature* **195**, 183-184.
- Kenyon C. and Tamkun J. W. (1991) A cluster of Antennapedia-class homeobox genes in a nonsegmented animal. *Science* **253**, 516-517.
- Knight D. P. and Hunt S. (1974) Molecular and ultrastructural characterization of the egg capsule of the leech *Erpobdella octoculata* L. *Comp. Biochem. Physiol.* **47 A**, 871-880.
- Koelle M. R. , Talbot W. S. , Segraves W. A. , Bender M. T. , Cherbas P. and Hogness David (1991) The drosophila EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* **67**, 59-77.

- Koeppe J. K. and Mills R. R. (1972) Hormonal control of tanning by the american cockroach: probable bursicon mediated translocation of protein-bound phenols . *J. Insect. Physiol.* **18**, 465-469.
- Koeppe J. K. and Gilbert L. I (1974) Metabolism and protein transport of a possible pupal cuticle tanning agent in *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* **20**, 981-992.
- Koob T. J. and Cox D. L. (1988) Egg capsule catechol-oxidase from the little skate *Raja erinacea*. *Biol. Bull.* **175**, 202-211 (mencionado en Waite, 1990).
- Kramer K. J.; Nuntnarumit C., Aso Y, Hawley M. D. and Hopkins T. L. (1983) Electrochemical and enzymatic oxidation of catecholamines involved in sclerotization and melanization of insect cuticle. *Insect Biochem.* **13**, 475-479.
- Kramer K. J., Morgan T. D., Hopkins T. L., Roseland C. R., Aso Y., Beeman R. W. and Lookhart G. L. (1984). Catecholamines and  $\beta$ -alanine in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. Roles in cuticle sclerotization and melanization. *Insect Biochem.* **14**, 293-298
- Kramer K. J. and Koga D. (1986) Physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation . *Insect. Biochem.* **16**, 851-877.
- Kramer K. J. and Hopkins T. L. (1987). Tyrosine metabolism for insect cuticle tanning. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **6**, 279-301.
- Krueger R. A., Broce A. B., Hopkins T. L. and Kramer K. J. (1988) Calcium transport from malpighian tubules to puparial cuticle of *Musca autumnalis* *J. Comp. Physiol. B* **158**, 413-419.
- Krueger R. A., Kramer K. J., Hopkins T. L. and Speirs R. D. (1989) N- $\beta$ -alanyldopamine levels and synthesis in integument and other tissues of *Manduca sexta* (L.) during the larval-pupal transformation. *Insect Biochem.* **19**, 169-175.
- Krueger R. A., Kramer K. J., Hopkins T. L. and Speirs R. D. (1990). N- $\beta$ -alanyldopamine occurrence and synthesis in the central nervous system of *Manduca sexta* (L.). *Insect Biochem.* **20**, 605-610.
- Lewis E. B. (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila* . *Nature* **276**, 565-570 .
- Lewis E. B. (1994) Homeosis: the first 100 years. *Trends Genet* **10**, 341-343.
- Lifschitz E. (1985). New mutations in the Medfly *Ceratitis capitata*. Report Research; Coordination Meeting on Development; Sexing Mechanisms in Fruitfly. FAO/IAEA. Vienna (Mimeograph.).
- Lineweaver H. and Burk D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants . *J. Am. chem. Soc.* **56**, 658-666.
- Lipke H. and Geoghegan T. (1971) Enzymolysis of sclerotized cuticle from *Periplaneta americana* and *Sarcophaga bullata* . *J. Insect. Physiol.* **17**, 415-425 .

- Lipke H. , Strout K. , Henzel W , and Sugumaran M (1981) Structural proteins of sarcophagid larval exoskeleton. Composition and distribution of radioactivity derived from [7-<sup>14</sup>C] dopamine. *J. Biol. Chem.* **256**, 4241-4246.
- Livingstone M. S. and Tempel B. L. (1983) Genetic dissection of monoamine neurotransmitter synthesis in *Drosophila* . *Nature* **303**, 67-70.
- Locke M. (1974) The structure and formation of the integument in insects. In *The Physiology of Insecta* (Edited by Rockstein M. ) vol. 6 , pp. 123-213 , Academic Press , New York .
- Lowry, O. H. , Rosenbrough N. J. , Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lundel M. J. and Hirsh J. (1992) The *zfh-2* product is a potential regulator of neuron-specific DOPA decarboxylase gene expression in *Drosophila* . *Developmental Biology* **154**, 84-94.
- Macfarlane R. G. , Midgley J. M. , Watson J. M. and Evans P. D. (1990) The analysis of biogenic amines in the thoracic nervous system of the locust, *Schistocerca gregaria*, by gas-chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry (gc-nicims) . *Insect. Biochem* **20**, 305-311.
- McGinnis W. , Garber J. W. , Kuroiwa A. and Gehring W. J. (1984) A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans . *Cell* **37**, 403-408.
- McGinnis N. , Kuziora M. A. and McGinnis W. (1990) Human *hox-4.2* and *Drosophila deformed* encode similar regulatory specificities in *Drosophila* embryos and larvae. *Cell* **63**, 969-976.
- Maddrell S. H. P. (1966) Nervous control of the mechanical properties of the abdominal wall at feeding in *Rhodnius*. *J. Exp. Biol.* **44**, 59-68.
- Maitland D. P. (1992) Locomotion by jumping in the Mediterranean fruit-fly larva *Ceratitis capitata* . *Nature* **355**, 159-161.
- Malicki J. , Schughart K. and McGinnis W. (1990) Mouse *hox-2.2* specifies thoracic segmental identity in *Drosophila* embryos and larvae . *Cell* **63**, 961-967.
- Manak J. R. and Scott M. P. (1994) A class act: conservation of homeodomain protein functions . *Development Supple.*, 61-77.
- Manso S. and Lifschitz E. (1979). Two morphological mutations found in the Mediterranean fruitfly *Ceratitis capitata*.
- Mappouras D. G. and Fragoulis E. G. (1988) Purification and characterization of L-dopa decarboxylase from the white puparia of *Ceratitis capitata* . *Insect. Biochem.* **18**, 369-376.
- Marsh J. L. and Wright T. R. F. (1980) Developmental relationship between DOPA decarboxylase, dopamine acetyltransferase and ecdysome in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **80**, 379-387.

- Martin R. J. , Jahagirdar A. P. and Downer R. G. H. (1989) Partial characterization of N-acetyltransferase activity from cerebral ganglia and malpighian tubules of *Periplaneta americana* . *Insect. Biochem.* 19, 351-359.
- Mayr E (1960) The emergence of evolutionary novelties . In *Evolution after Darwin* (ed. Tax S. ), pp. 349-380 . Univ. Chicago Press, Chicago.
- Mir A. K. and Vaughan F. T. (1981) The conversion of N-acetyltyramine to N-acetyldopamine by *Schistocerca gregaria* thoracic ganglia. *Insect. Biochem.* 11, 571-577.
- Mitchell H. K. and Weber U. M. (1965) *Drosophila* phenol oxidase . *Science* 148, 964-965.
- Mitchell H. K. (1966) Phenol oxidases and *Drosophila* development . *J. Insect. Physiol.* 12, 755-765.
- Mitsui T and Riddiford L. M. (1976) Pupal cuticle formation by *Manduca sexta* epidermis in vitro: patterns of ecdysone sensitivity. *Dev. Biol.* 54, 172-186.
- Morgan B. A. , Johnson W. A. and Hirsh J. (1986) Regulated splicing produces different forms of dopa decarboxylase in the central nervous system and hypoderm of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* 5, 3335-3342.
- Morgan T. D., Hopkins T. L., Kramer K. J., Roseland C. R., Czaplak T.H., Tomer K. B. and Crow F. W. (1987) N-b-alanyl norepinephrine: biosynthesis in insect cuticle and possible role in sclerotization. *Insect biochem.* 17, 255-263.
- Morgan T. D. , Thomas B. R. , Yonekura M. , Czaplak T. H. , Kramer K. J. and Hopkins T. L. (1990) Soluble tyrosinases from parate pupal integument of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L). *Insect. Biochem.* 20, 251-260.
- Müller G. B. and Wagner G. P. (1991) Novelty in evolution: restructuring the concept . *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22, 229-256.
- Murdock L. L. and D. Omar (1981) N-acetyldopamine in insect nervous tissue . *Insect. Biochem.* 11, 161-166.
- Nagao T. and Tanimura T. (1988) Distribution of biogenic amines in the cricket central nervous system . *Analytical Biochemistry* 171, 33-40.
- Nash T. A. M. , Trewern M. A. and Moloo S. K. (1976) Observations on the free larval stage of *Glossina morsitans morsitans* Westw (Diptera, Glossinidae): the possibility of a larval pheromone . *Bull. Entomol.* 66, 17-24.
- Neckameyer W. S. and Quinn W. G. (1989) Isolation and characterization of the gene for *Drosophila* tyrosine hydroxylase . *Neuron* 2, 1167-1175.
- Neville A. C. (1975) *Biology of the arthropod cuticle* . Springer-Verlag , New York.
- Nüsslein-Volhard C. (1991) Determination of the embryonic axes of *Drosophila* . *Development Suppl.* 1-10.

- Núñez J (1963) Central nervous control of the mechanical properties of the cuticle in *Rhodnius prolixus*. *Nature* **199**, 621-622.
- Okot-Kotber B. M. , Morgan T. D. , Hopkins T. L. and Kramer K. J. (1994) Characterization of Two High Molecular Weight Catechol-containing Glycoproteins from Pharate Pupal Cuticle of the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta*. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* **24**, 787-802.
- Oster G. and Alberch P. (1982) Evolution and bifurcation of developmental programs. *Evolution* **36**, 444-459.
- Owen M. D. and Bouquillon A. I. (1992) The synthesis of L-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) in the cerebral ganglia of the cockroach, *Periplaneta americana* L. *Insect. Biochem.* **22**, 193-198.
- Panganiban G. , Nagy L. and Carroll S. B. (1994) The development and evolution of insect limb types. *Current Biology* **4**, 671-675.
- Patel N. H. , Martin-Blanco E. , Coleman K. G. , Poole S. J. , Ellis M. C. , Kornberg T. B. and Goodman C. S. (1989a) Expression of *engrailed* proteins in arthropods, annelids and chordates. *Cell* **58**, 955-968.
- Patel N. H. , Kornberg T. B. and Goodman C. S. (1989b) Expression of *engrailed* during segmentation in grasshopper and crayfish. *Development* **107**, 201-212.
- Patel N. H. , Bal . E. E. and Goodman C. S. (1992) Changing role of *evenskipped* during the evolution of insect pattern formation. *Nature* **357**, 339-342.
- Patel N. H. (1994) The evolutions of arthropod segmentation: insights from comparisons of gene expression patterns. *Development Suppl*, 201-207.
- Pentz S. E. , Black B. C. and Wright T. R. F. (1990) Mutations affecting phenol oxidase activity in *Drosophila*: *Quicksilver* and *tyrosinase-1*. *Biochem. Genet.* **28**, 151-171.
- Pryor M. G. M. (1940) On the hardening of the cuticle of insects. *Proc. R. Soc.* **128**, 378-393.
- Quesada-Allué L. A. , Marechal L. R. and Belocopitow E. (1976) Chitin synthesis in *Triatoma infestans* and other insects. *Acta physiol. lat.* **26**, 349-363.
- Quesada-Allué L. A. (1982) The inhibition of insect chitin synthesis by tunicamycin. *Biochem biophys. Res. Commun.* **105**, 312-319.
- Quesada-Allué L. A. (1987) Integument: structure and function In *Chaga's Disease Vectors* (edited by Brenner R. R. and Stoka A.) Vol. II pp. 77-94.
- Quesada-Allué L. A., Rabossi A. and Wappner P. (1994). Introducción a *Ceratitis* y cría en el laboratorio. In *La Mosca Mediterránea. Guía de Laboratorio*. (Ed. by L.A. Quesada-allué) Vol.1, pp. 15-31, YPF S.A. Press, Buenos Aires, Argentina.

- Quesada-Allué L. A. , Wappner P. , Boccaccio G. L. and Rabossi A. (1995) Metamorphosis in the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* . Proceedings from the Fourth International Symposium on Fruit Flies of economic importance, Sand Key, Florida. June, 1994. En prensa.
- Rabossi A. (1991) Marcadores morfológicos y moleculares durante la metamorfosis de la mosca del Mediterráneo, *Ceratitis capitata* Seminario de Licenciatura Universidad de Buenos Aires , Argentina.
- Rabossi A., Boccaccio G. L., Wappner P. and Quesada-Allué L. A. (1991). Morphogenesis and cuticular markers during the larval-pupal transformation of the medfly *Ceratitis capitata*. *Entomol. Exp. Appl.* **60**, 135-141.
- Rabossi A., Wappner P. and Quesada-Allué L. A. (1992). Larva to pharate adult transformation in the medfly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera; Tephritidae). *Can Ent.* **124**, 1139-1147.
- Rabossi A. , Quesada-Allué L. A and Wappner P. (1994). Desarrollo de *Ceratitis* . In *La Mosca Mediterránea. Guía de Laboratorio*. (Ed. by L.A. Quesada-allué) Vol.1, pp. 49-63, YPF S.A. Press, Buenos Aires, Argentina.
- Raff R. A. and Kaufman Thomas (1983) Embryos, genes and evolution. Macmillan Publishing , New York.
- Reynolds S. E. (1974) Pharmacological induction of plasticization in the abdominal cuticle of *Rhodnius*. *J.Exp. Biol.* **61**, 705-718.
- Reynolds S. E. (1975) The mechanism of plasticization of the abdominal cuticle in *Rhodnius*. *J. Exp. Biol.* **62**, 81-98.
- Reynolds S. E. (1985) Hormonal control of mechanical cuticle properties. In *Comparative Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Edited by Kerkut G. A. and Gilbert L. J.) vol. 8, pp. 335-351, Pergamon Press, New York.
- Richards K. S. (1984) Cuticle. In *Biology of the integument* (Edited by Bereiter-Ham J. , Matoltsy A. G. and Sylvia Richards K.) vol 1, pp. 310-319, Springer-Verlag, New York.
- Ricketts D. and Sugumaran M. (1994). 1,2-Dehydro-N- $\beta$ -alanyldopamine as a new intermediate in insect cuticular sclerotization. *J. Biol. Chem.* **269**, 22217-22221.
- Ritzki T. M., Ritzki R. M. and Bellotti R. A. (1985) Genetics of *Drosophila* phenoloxidase. *Mol Gen. Genet.* **201**, 7-13.
- Robertson H. A. (1975) Octopamine in the central nervous system of the annelid, *Lumbricus terrestris* . *Experientia* **31**, 1006-1008.
- Rockstein M. (1973) Biology of the insecta. In *The physiology of insecta* (Edited by Rockstein M.) vol. 1, pp. 3-9 , Academic Press , New York.
- Roseland C. R., Kramer K. J. and Hopkins T. L. (1987) Cuticular strength and pigmentation of rust-red and black strains of *Tribolium castaneum*. Correlation with catecholamine and  $\beta$ -alanine content. *Insect Biochem.* **17**, 21-28.

- Rossler Y. (1979) The genetics of the Mediterranean fruit fly: a white pupa mutant. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **72**, 583-589.
- Rossler Y. and Koltin Y. (1976). The genetics of the Mediterranean fruitfly *Ceratitis capitata*: three morphological mutations *Ann. Entomol. Soc. Am.* **69**, 604-608.
- Saavedra J. M. , Brownstein M. J. , Carpenter D. O. and Axerold J. (1974) Octopamine: presence in single neurons of aplysia suggest neurotransmitter function . *Science* **185**, 364-365.
- Saul S. J. , Dali H. and Sugumaran M. (1991) Quinone and quinone methide as transient intermediates involved in the side chain hydroxylation of N-acetyldopamine derivatives by soluble enzymes from *Manduca sexta* cuticle. *Arch. Insect. Biochem.* **16**, 123-138.
- Saul S. and Sugumaran M. (1988) A novel quinone: quinone methide isomerase generates quinone methides in insect cuticle *FEBS lett.* **237**, 155-158.
- Saul S. J. and Sugumaran M. (1989) Characterization of a new enzyme system that desaturates the side chain of N-acetyldopamine. *FEBS lett.* **251**, 69-73.
- Saul S. J. and Sugumaran M. (1990) Biosynthesis of dehydro-N-acetyldopamine by a soluble enzyme preparation from the larval cuticle of *Sarcophaga bullata* involves intermediary formation of N-acetyldopamine quinone and N-acetyldopamine quinone methide. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **15**, 237-254.
- Scott M. P. , Weiner A. J. , Hazeilrigg T. I. , Polisky B. A. , Pirota V. , Scalenghe F. and Kaufman T. C (1983) The molecular organization of the *Antennapedia* locus of *Drosophila* . *Cell* **35**, 763-776.
- Scott M. P. and Weiner J. (1984) Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the *Antennapedia*, *ultrabithorax*, and *fushi tarazu* loci of *Drosophila* . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4115-4119.
- Scott M. P. , Tamkun J. W. and Hartzell G. W. (1989) The structure and function of the homeodomain . *Biochem. biophys. Acta* **989**, 25-48.
- Schaefer J., Kramer K. J., Garbow J., Jacob G. S., Stejskal E. O., Hopkins T. L. and Speirs R. D. (1987) Aromatic cross-links in insect cuticles : detection by solid state  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR. *Science* **235**, 1200-1204.
- Scholnik S. B. , Morgan B. A. and Hirsh J. (1983) The cloned dopa decarboxylase gene is developmentally regulated when reintegrated into the *Drosophila* genome. *Cell* **34**, 37-45.
- Scholnik S. B. , Bray S. J. , Morgan B. A. , McCormick C. A. and Hirsh J. (1986) CNS and hypoderm regulatory elements of the *Drosophila melanogaster* dopa decarboxylase gene . *Science* **234**, 998-1002.
- Seligman M. , Blechl A. , Blech J. , Herman J. and Fraenkel G. (1977) Role of ecdysone, pupariation factors and cyclic AMP in formation and tanning of the puparium of the fleshfly *Sarcophaga bullata* . *Proc. Nat. Acad. Sci.* **74**, 4967-4701.

- Seybold W. D. , Meltzer P. S. and Mitchell H. K. (1975) Phenol oxidase activation in *Drosophila* : A cascade of reactions . *Biochem. Genet.* **13**, 85-108.
- Shampengtong L. , Wong K. P. and Ho B. C. (1987) N-acetylation of dopamine and tyramine by mosquito pupae (*Aedes togoi*). *Insect. Biochem.* **17**; 111-116.
- Shourky A. and Hafez M. (1979) Studies on the biology of the mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* . *Ent. exp. & appl.* **26**, 33-39.
- Sivasubramanian P. , Ducoff H. S. and Fraenkel G. (1974) Nature and role of proteinaceous hormonal factors acting during puparium formation in flies . *Biol. Bull.* **147**, 163-185.
- Smith T. J. (1990) Phylogenetic distribution and function of arylalkylamine N-acetyltransferase. *Bioessays* **12**, 30-33.
- Stanley S. M. (1982) Macroevolution and the fossil record . *Evolution* **36**, 460-473.
- Sugumaran M. (1988) Molecular mechanism for cuticular sclerotization. *Adv. Insect. Physiol.* **21**, 179-231.
- Sugumaran M. and Ricketts Dean (1995) Model Sclerotization Studies. 3. Cuticular Enzyme Catalyzed Oxidation of Peptidyl Model Tyrosine and Dopa Derivates. *Arch. Insect. Biochem.* **28**, 17-32.
- Sugumaran M. , Dali H. , Semensi V. and Hennigan B. (1987) Tyrosinase-catalyzed unusual oxidase dimerization of 1,2-dehydro-N-acetyldopamine. *J. Biol. Chem.* **262**, 10546-10549.
- Sugumaran M. , Hennigan B. , Semensi V. , Dali H. (1988-A) On the nature of nonenzymatic and enzymatic oxidation of the putative sclerotizing precursor 1,2-dehydro-N-acetyldopamine. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **8**, 89-100.
- Sugumaran M. , Henzel W. J. , Mulligan K. and Lipke H. (1982) Chitin-bound protein of sarcophagid larvae: metabolism of covalently linked aromatic constituents. *Biochemistry* **21**, 6509-6515.
- Sugumaran M. , Kundzicz H. , Bedell-Hogan D and Schinkmann K. (1989-A). Further studies on the mechanism of oxidation of N-acetyldopamine by the cuticular enzymes from *Sarcophaga bullata* and other insects. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **11**, 109-125.
- Sugumaran M. and Lipke H. (1983) Sclerotization of insect cuticle: A new method for studying the ratio of quinone and  $\beta$ -sclerotization . *Insect. Biochem.* **13**, 307-312
- Sugumaran M. and Lipke H. (1983) Quinone methide formation from 4-alkylcatechols: a novel reaction catalyzed by cuticular phenol oxidase. *FEBS Lett.* **155**, 65-68.
- Sugumaran M. , Saul S. and Dali H. (1990) On the mechanism of side chain oxidation of N- $\beta$ -alanyldopamine by cuticular enzymes from *Sarcophaga bullata*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **15**, 255-269.

- Sugumaran M. , Saul S. and Semensi V. (1988-B) On the mechanism of formation of N-acetyldopamine quinone methide in insect cuticle. *Arch. Insect. Biochem.* **9**, 269-281.
- Sugumaran M. , Saul S. and Semensi V. (1989-B) Trapping of transiently formed quinone methide during enzymatic conversion of N-acetyldopamine to N-acetylnorepinephrine. *FEBS lett.* **252**, 135-138.
- Sugumaran M. , Semensi V. , Kalyanaraman B. , Malcolm B. and Land E. (1992) Evidence for the formation of a quinone methide during the oxidation of the insect cuticular sclerotizing precursor 1,2-dehydro-N-acetyldopamine . *J. Biol. Chem.* **267**, 10355-10361.
- Tear G. , Bate C. M. and Martinez Arias (1988) A phylogenetic interpretation of the patterns of gene expression in *Drosophila* embryos. *Development Suppl*, 135-146.
- Tempel B. L. , Livingstone M. S. and Quinn W. G. (1984) Mutations in the dopa decarboxylase gene affect learning in *Drosophila* . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3577-3581.
- Terán H. (1977). Comportamiento alimentario y su correlación con la reproducción en hembras de *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera , Tripetidae) *Rev. Agronom. N. O. Arg.* **14**, 1-4.
- Thomas B. R., Yonekura M., Morgan T. D., Czaplá T. H., Hopkins T. L. and Kramer K. K. (1989) A trypsin-solubilized laccase from pharate pupal integument of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* **19**, 61-622.
- Ujvary I., Hiruma K., Riddiford L. M., Matolcsy G., Roseland C. R. and Kramer K. J. (1987). Role of  $\beta$ -alanine in pupal cuticle coloration in the tobacco Hornworm, *Manduca sexta*. Effects of  $\beta$ -alanine analogues on melanization and catecholamine levels. *Insect Biochem.* **17**, 389-399.
- Vincent J. F. V. (1978) Cuticle under attack. *Nature* **273**, 339-340.
- Vincent J. F. V. and Hillerton J. E. (1979) The tanning of insect cuticle- A critical review and a revised mechanism. *J. Insect Physiol.* **25**, 653-658.
- Waite J. H. (1977) Evidence for the mode of sclerotization in a molluscan periostracum. *Comp. Biochem. Physiol.* **58 B**, 157-162.
- Waite J. H. and Andersen S. O. (1978) DOPA in an insoluble shell protein of *Mytilus edulis*. *Biochem. biophys. Acta* **541**, 107-114.
- Waite J. H. and Rice-Ficht A. C. (1987) Presclerotized eggshell protein from the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Biochemistry* **26**, 7819-7825.
- Waite J. H. (1990) The phylogeny and chemical diversity of quinone-tanned glues and varnishes. *Comp. Biochem. Physiol.* **97 B**, 19-29.
- Walter M. F. , Black B. C. , Afshar G. , Kermabon A. Y. , Wright T. R. F. and Biessmann H. (1991) Temporal and spatial expression of the yellow gene in correlation with cuticle formation . *Dev. Biol.* **147**, 32-45.

- Wappner P. (1989) Caracterización genética y bioquímica de mutantes cuticulares de la mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata*. Seminario de Licenciatura. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Wappner P., Manso F., Cladera J. L. and Quesada-Allué L. A. (1991). Dark cuticle mutants of *Drosophila* and *Ceratitis* might be related. *Drosoph. Inf. Serv.* 70, 233
- Wappner P. and Quesada-Allué L. A. (1993) Cuticle proteins from abdomens of *Triatoma infestans* nymphs. *An Asoc. Quím. Argent.* 81, 111-115.
- Wappner P., Rabossi A., Boccacio G. L. y Quesada-Allué L. A. (1994). Métodos de interés utilizados en *Ceratitis*. In *La Mosca Mediterránea. Guía de Laboratorio*. (Ed. by L.A. Quesada-allué) Vol.1, pp. 33-48, YPF S.A. Press, Buenos Aires, Argentina.
- Wappner P., Kramer K. J., Hopkins T. L., Merritt M., Schaefer J. and Quesada-Allué L. A. (1995) *White pupa*: a mutant lacking catecholamines for tanning the puparium. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 365-373.
- Wappner P., Kramer K.J., Hopkins T. L., Cladera J. L., Manso F. and Quesada-Allué L.A. Pupa color reversion in wild type and melanic mutants of the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*). *J. Insect Physiol.* en prensa.
- Wappner P., Kramer K.J., Manso F., Hopkins T.L. and Quesada-Allué L.A. N- $\beta$ -alanyldopamine metabolism in wild type and *niger* mutant strains of the Medfly *Ceratitis capitata*. (enviado).
- Wappner P. and Quesada-Allué L. A. Water loss during insect cuticle sclerotization might be independent of catecholamines. *J. Insect Physiol.* en prensa.
- Warren R., Nagy L., Selegui J., Gates J. and Carroll S. (1994) Evolution of homeotic gene regulation and function in flies and butterflies. *Nature* 372, 458-461.
- Warren R. and Carroll S. (1995) Homeotic genes and diversification of the insect body plan. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 459-465.
- Weber J. P., Bolin R. J., Hixon M. S. and Serald A. (1992)  $\beta$ -Alanine transaminase activity in *black* and *suppressor of black* mutations of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. biophys. Acta* 1115, 181-186.
- Wigglesworth V. B. (1939) The integument. In *The principles of insect physiology*. Methuen & Co, London.
- Williams J. A. and Carroll S. B. (1993) The origin, patterning and evolution of insect appendages. *BioEssays* 15, 567-578.
- Wirtz R.A. and Hopkins T. L. (1977) Dopa and tyrosine decarboxylation in the cockroach *Leucophaea maderae* in relation to cuticle formation and ecdysis. *Insect. Biochem.* 7, 45-49.
- Wright T. R. F. (1987). The genetics of biogenic amine metabolism, sclerotization and melanization in *Drosophila melanogaster*. *Adv. in Genet.* 24, 127-222.

- 
- Yamasaki N., Aso Y. and Tsukamoto T. (1990). A convenient method for the preparation of N- $\beta$ -alanyldopamine as substrate of phenoloxidase. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 833.
- Zdárek J. and Fraenkel G. (1969) Correlated effects of ecdysone and neurosecretion in puparium formation (pupariation) in flies . *Proc. Nat. Acad. Sci.* **64**, 565-572.
- Zdárek J. and Denlinger D. L. (1992) Neural regulation of pupariation in tsetse larvae. *J. exp. Biol.* **173**, 11-24.
- Zdárek J. and Fraenkel G. (1972) The mechanism of puparium formation in flies. *J. Exp. Zool.* **179**, 315-324.
- Zdárek J. , Sláma K. and Fraenkel G. (1979) Changes in internal pressure during puparium formation in flies . *J. Exp. Zool.* **207**, 187-196.
- Zdárek J. (1985). Regulation of pupariation in flies. In *Comparative Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Edited by Kerkut G. A. and Gilbert L. J.) vol. 10, pp. 301-333, Pergamon Press, New York.
- Zdárek J. and Friedman S. (1986) Pupal ecdysis in flies: mechanisms of evagination of the head and expansion of the thoracic appendages . *J. Insect. Physiol.* **32**, 917-923.
- Zdárek J. and Denlinger D. L. (1991) Wandering behaviour and pupariation in tsetse larvae . *Physiol. Entomol.* **16**, 523-529.