



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Detoxificación de xenobióticos y
señalización neuroendocrina en la
regulación de procesos biológicos en insectos***

Tesista: Volonté, Mariano

Directora: Ons, Sheila

Año: 2024

Resumen

Desde hace décadas, el control de insectos perjudiciales está principalmente enfocado en el uso de insecticidas neurotóxicos. Entre ellos, los piretroides son uno de los más utilizados debido a sus propiedades toxicológicas favorables, alta efectividad y poder residual. Si bien los insecticidas sintéticos son un método efectivo en la reducción de poblaciones de insectos, resulta imperiosa la necesidad de encontrar nuevas estrategias con menor impacto ambiental, seguras para la salud humana y animal, y selectivas en cuanto a la especie a controlar. La resistencia a insecticidas que se observa por parte de especies plaga hace que la búsqueda de nuevas herramientas resulte urgente.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) sugiere implementar un manejo integrado de insectos vectores. En esa estrategia, resulta fundamental realizar un monitoreo de resistencia a insecticidas, así como comprender los mecanismos biológicos subyacentes a este fenómeno. Entre los mecanismos descritos, los más estudiados son las mutaciones en el sitio blanco, el aumento del metabolismo detoxificante y las modificaciones cuticulares. Más recientemente se ha sugerido el papel de familias proteicas que actuarían como secuestradores de xenobióticos. Estas familias son las *chemosensory proteins* (CSP) y *odorant binding proteins* (OBP), que previamente habían sido involucradas únicamente en la olfacción en insectos.

El estudio de las familias encargadas de detoxificar xenobióticos, tanto de la dieta como provenientes del ambiente, es fundamental para aumentar el conocimiento sobre el fenómeno complejo y multifactorial de resistencia y detoxificación en insectos, así como para encontrar posibles blancos para complementar o suplantar a los neurotóxicos, hacia un control integrado de insectos perjudiciales. Con tal fin, se ha sugerido que el sistema neuroendocrino, que incluye a los neuropéptidos y sus receptores, es una fuente interesante de blancos para insecticidas de nueva generación, dado que está involucrado en la regulación de todos los procesos vitales. Por lo tanto el estudio de la estructura, función y bioquímica del sistema neuropeptidérgico de insectos es relevante en entomología básica, y tiene como campo de aplicación el control de insectos perjudiciales. Por lo

antes expuesto, resulta relevante estudiar los mecanismos de detoxificación, así como comprender los mecanismos de regulación neuroendocrina.

En cuanto a los estudios neuroendocrinos, nos hemos focalizado en los procesos de ecdisis y reproducción. La ecdisis es la etapa final de la muda, donde el insecto se libera de la cutícula de la etapa anterior del ciclo vital, y emerge con una cutícula nueva. La realización exitosa de la ecdisis resulta vital para la supervivencia durante el desarrollo post-embrionario de los insectos. Si bien en especies con metamorfosis completa (holometábolos) la cascada peptidérgica que regula la ecdisis ha sido bien descrita, se dispone de muy poca información sobre la regulación neuroendocrina de la ecdisis para especies con metamorfosis incompleta, o hemimetábolos. Usamos *Rhodnius prolixus* como un modelo experimental para probar dos hipótesis: (1) el papel de los neuropéptidos que regulan la ecdisis en Holometabola se conserva en insectos hemimetábolos; y (2) los neuropéptidos que regulan la ecdisis tienen un rol en la regulación de la reproducción durante la etapa adulta. Para ello utilizamos como herramienta experimental el silenciamiento génico por RNA de interferencia (RNAi), a fin de estudiar genes precursores de neuropéptidos. Nuestros resultados revelaron un papel central del neuropéptido orcokina (OK) en la regulación de la ecdisis.

En el caso de Holometábola, OK está poco estudiado. Dados nuestros resultados en hemimetábolos, decidimos estudiar el papel de este neuropéptido en la regulación de la ecdisis y comportamientos innatos de moscas adultas de la especie *Drosophila melanogaster*. Utilizamos las herramientas genéticas disponibles en esta especie para investigar el papel de OK en la regulación de diferentes comportamientos innatos, como la ecdisis, la oviposición y el cortejo. El silenciamiento del gen OK mediado por ARNi provocó una desinhibición del comportamiento de cortejo en machos, incluida la aparición de cortejo macho-macho, que rara vez se observa en las moscas de tipo salvaje. Además, la expresión disminuída de este gen provocó una menor producción de huevos en los primeros cuatro días. A diferencia de lo observado en heterópteros en nuestro trabajo previo, no observamos efectos significativos en la ecdisis. La OK está emergiendo como una importante familia de neuropéptidos en la regulación de la fisiología de insectos de diferentes ordenes. En el caso de la mosca de la fruta, nuestros resultados sugieren un papel importante en el éxito reproductivo.

Por otra parte, en el presente trabajo se realizó un análisis comparativo del complemento de enzimas detoxificantes en 5 especies de hemípteros con diferentes hábitos de alimentación. Para ello se llevaron a cabo análisis bioinformáticos en el fitófago del suborden Auchenorrhyncha *Nilaparvata lugens* y en 4 especies heterópteras, los fitófagos *Halyomorpha halys* y *Nezara viridula*, y los hematófagos *R. prolixus* (Reduviidae) y *Cimex lectularius* (Cimicidae). Con estos resultados se reforzaron hipótesis previas en cuanto a detoxificación de compuestos químicos y el fenómeno de resistencia, además de identificar candidatos interesantes para continuar el estudio en relación a determinadas expansiones y reducciones o ausencia de algunas familias de enzimas detoxificantes.

Siguiendo en relación a la detoxificación de xenobióticos, focalizamos en la familia de proteínas quimiosensoriales (CSP) de las especies de interés mencionadas anteriormente y sumamos al insecto depredador *Orius laevigatus* de la familia Anthocoridae, al triatomino *Triatoma infestans* y a los dípteros *D. melanogaster* y *Anopheles gambiae* que sirvieron principalmente para caracterizar y seleccionar genes ortólogos candidatos para estudios futuros. Nuestros resultados indican que el repertorio de CSP de los triatominos está conservado respecto de otros hemípteros. Además, a partir de las caracterizaciones bioinformáticas, realizamos análisis moleculares y fisiológicos para estudiar la estructura y función del complemento de CSP en la especie modelo transmisora del agente causante de la enfermedad de Chagas: *R. prolixus*. Nuestros hallazgos sugieren que las CSP no sólo son proteínas transportadoras de moléculas odorantes o de función relacionada a detoxificación sino que presentan roles asociados con la oviposición y supervivencia de hembras adultas en esta especie.

En conjunto, la presente Tesis aporta resultados originales acerca de la detoxificación y la regulación endocrina en insectos, con campo de aplicación en el control de insectos perjudiciales.

Palabras clave: Enzimas detoxificantes, Proteínas quimiosensoriales, Resistencia a insecticidas, Neuropeptidos, ARN de interferencia, Filogenia, Ecdisis, Reproducción, Eclosión, Oviposición.

Agradecimientos

Este trabajo fue posible por el apoyo directo o indirecto de muchas personas de las que me encuentro rodeado y por las que siento un profundo agradecimiento.

En primer lugar quiero agradecer a mi directora Shei, porque desde el primer momento confió en mí, ofreciéndome no sólo un lugar de trabajo sino también brindando todo su conocimiento, optimismo, dedicación, compromiso y las herramientas necesarias para sortear cada obstáculo para llegar hasta acá.

A mis compañeros del CREG gracias por todos estos años compartidos, con mates buenos y chistes malos. Les agradezco desde el punto de vista científico por los debates constructivos, la ayuda desinteresada y el conocimiento compartido, pero aún más desde lo humano donde considero que más aprendí. Quiero agradecer especialmente a Naty, Lu, Jose e Ivi que desde el primer día se brindaron completamente para enseñarme y apoyarme en todo, con muchas risas y algunos retos, aportando siempre su punto de vista con amistad y una o más manos cuando fue necesario.

Agradezco a CONICET por la beca con la que pude realizar esta tesis; A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por los recursos para la investigación; A la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP por el lugar de trabajo y la posibilidad de formarme, primero como Licenciado y ahora como Doctor. A todos los compañeros y colaboradores de los trabajos científicos publicados, en especial al Dr. John Ewer con su grupo de trabajo, principalmente Cata y Vale, por hacerme sentir tan cómodo en mi estadía.

Quiero agradecer a mis amigos, que son un pilar fundamental para mí. A los de toda la vida y a los que fui encontrando en el camino, muchas veces gracias al fútbol y Boca. Gracias por estar siempre para levantarme el ánimo con un consejo, compartiendo un mate, una birra o un asadito, ayudando a liberar y despejar muchas de las tensiones diarias o mejorar los días malos.

A toda mi familia por ser incondicional y tirar siempre para adelante, principalmente a mi viejo por apoyarme en todo y mis hermanos por tantas enseñanzas en la vida. A mi vieja, que donde esté seguramente está orgullosa

viendo que logré lo que me propuse desde chiquito. A la yaya por pregonar con el ejemplo que la vida hay que disfrutarla a pesar de las adversidades.

A Mikita por bancarme siempre y acompañarme en todo proyecto con su mejor sonrisa y el amor de cada día. Gracias por incentivarme en los momentos de incertidumbre y apoyarme incondicionalmente para continuar por este camino, sin vos y Galito todo sería más difícil y menos divertido.

Introducción general	10
1.1 Insectos de importancia médica y agrícola	11
1.2 Control de insectos perjudiciales	15
1.3 Mecanismos biológicos de resistencia a insecticidas	17
Materiales y métodos	28
2.1 Insectos	29
2.2 Técnicas de Biología Molecular	30
2.2.1 Extracción de ARN	30
2.2.2 Síntesis de ADNc	30
2.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR) y cuantitativa (qPCR)	31
2.2.4 Síntesis de ARN de doble cadena	32
2.2.5 Silenciamiento génico por ARN de interferencia (ARNi)	32
2.3 Ensayos fisiológicos y conductuales en <i>D. melanogaster</i>	33
2.3.1 Ecdisis	33
2.3.2 Cortejo, cópula y oviposición	34
2.4 Ensayos fisiológicos y conductuales en <i>R. prolixus</i>	36
2.4.1 Control de silenciamiento, ecdisis y supervivencia	36
2.4.2 Cortejo, cópula y oviposición	36
2.5 Histoquímica	38
2.6 Análisis estadístico	38
2.7 Técnicas bioinformáticas	38
2.7.1 Identificación de genes y análisis de secuencias	38
2.7.2 Búsqueda e identificación de proteínas quimiosensoriales en bases de datos genómicas y transcriptómicas	39
2.7.3 Análisis filogenético	41
2.7.4 Análisis de duplicación y enriquecimiento	42
2.7.5 Análisis de clusters	43
Capítulo 1:	45
Regulación neuroendocrina en procesos clave del ciclo de vida de insectos	45
1.1 Introducción	46
1.1.1 Estructura y función de los neuropéptidos	46
1.1.2 Regulación neuroendocrina de la ecdisis y su relación con la reproducción	48
1.1.3 Orcokininas en insectos	51
1.2 Hipótesis	53
1.3 Objetivos	53
1.4 Resumen de la metodología utilizada	53
1.5 Resultados	54
1.5.1 Neuropéptidos en la ecdisis de <i>R. prolixus</i>	54

1.5.2	Neuropéptidos en la reproducción de <i>R. prolixus</i>	57
1.5.3	Neuropéptidos en la descendencia de <i>R. prolixus</i>	59
1.5.4	Estudios funcionales sobre el papel de orcoquinina en ecdisis y reproducción en <i>D. melanogaster</i>	61
1.5.5	Orcokinina en la ecdisis de <i>D. melanogaster</i>	63
1.5.6	Orcokinina en el comportamiento de cortejo y cópula de <i>D. melanogaster</i>	64
1.5.7	Papel de Orcokinina en la oviposición de <i>D. melanogaster</i>	68
1.6	Discusión	69
Capítulo 2:		73
Análisis comparativo de superfamilias génicas relacionadas con la detoxificación en cinco especies de hemípteros perjudiciales		73
2.1	Introducción	74
2.1.1	Familias génicas involucradas en detoxificación y resistencia a insecticidas	74
2.1.2	Detoxificación en hemípteros	76
2.2	Hipótesis	79
2.3	Objetivo	79
2.4	Resumen de la metodología utilizada	79
2.5	Resultados	79
2.5.1	Citocromos P450	83
2.5.1.1	Clan mitocondrial	85
2.5.1.2	Clan CYP2	86
2.5.1.3	Clan CYP3	87
2.5.1.4	Clan CYP4	89
2.5.2	Carboxilcolinesterasas	91
2.5.3	Glutación transferasas	94
2.5.4	Clusters genómicos y evolución de superfamilias de genes de detoxificación	97
2.6	Discusión	101
Capítulo 3:		103
Identificación y análisis genómico y filogenético de proteínas quimiosensoriales en <i>Triatoma infestans</i>		103
3.1	Introducción	104
3.1.1	Sistema quimiosensorial	104
3.1.2	CSP	105
3.1.3	Genómica de <i>T. infestans</i>	107
3.2	Hipótesis	109
3.3	Objetivos	109
3.4	Resumen de la metodología utilizada	109
3.5	Resultados	109
3.5.1	Identificación y curación de secuencias	109
3.5.2	Análisis filogenético	115
3.5.3	Análisis de clusters	119
3.6	Discusión	122
Capítulo 4:		124
Análisis funcional de CSP en <i>Rhodnius prolixus</i>		124
4.1	Introducción	125

4.1.1 Fisiología y CSP en <i>R. prolixus</i>	125
4.2 Hipótesis	128
4.3 Objetivo	128
4.4 Resumen de la metodología utilizada	129
4.5 Resultados	129
4.5.1 CSP en reproducción y supervivencia de <i>R. prolixus</i>	129
4.6 Discusión	134
Discusión general y conclusiones	136
Bibliografía	140
Anexo I: Material suplementario	170
Material suplementario general	171
Tablas	171
Material suplementario al Capítulo II	172
Tablas	172
Figuras	174
Información suplementaria electrónica	181
Material suplementario al capítulo III	182
Tablas	182
Anexo II: Protocolos utilizados	204
Protocolos detallados	205
Extracción de ARN	205
Tratamiento con DNAsa	205
Síntesis de ADNc	206
PCR convencional	206
PCR en tiempo real	207
Ciclado	207
Síntesis de ARNdc	208
Electroforesis en gel de agarosa	209
Inmunohistoquímica	209
Soluciones	210

1.1 Insectos de importancia médica y agrícola

Los insectos aparecieron por primera vez hace aproximadamente 480 millones de años en el Ordovícico, junto con la evolución de las primeras plantas terrestres (Prokop *et al.*, 2023). Pertenecientes al filo Arthropoda, los insectos son la forma predominante de vida animal en el planeta, debido en gran medida a estrategias exitosas de desarrollo post-embionario y reproducción, que les han permitido colonizar todos los ambientes terrestres (Zitnan, 2012). Son relativamente pequeños y su tamaño oscila entre 1 mm y 20 cm aproximadamente, con un exoesqueleto duro compuesto principalmente de quitina; poseen un cuerpo segmentado con cabeza, tórax y abdomen. En la cabeza poseen antenas, ojos y órganos de alimentación. En el tórax contienen 2 pares de alas (algunos 1 sólo par) y 3 pares de patas. Respiran a través de un sistema de pequeños tubos denominados tráqueas que se comunican con el exterior a través de los espiráculos; su aparato reproductor se encuentra en el abdomen (Gullan y Cranston, 2000).

La clase insecta se divide en 29 ordenes, los cuales pueden agruparse en 3 grupos (Holometábola, Hemimetábola y Ametábola) de acuerdo a su patrón de desarrollo. Los holometábolos son los más numerosos y tienen estadíos de larva, pupa y adulto; realizan una metamorfosis completa, con adaptaciones muy diferentes entre estadíos juveniles y adultos. Esto les otorga la ventaja de evitar la competencia intraespecífica por los mismos recursos. Los hemimetábolos por su parte tienen metamorfosis incompleta, la única diferencia entre ninfa y adulto es el desarrollo del aparato reproductor y de las alas. Los ametábolos son los más ancestrales; no poseen diferencias luego de la eclosión entre estadíos inmaduros y adultos, sólo varía el tamaño y el aparato genital (Eggleton, 2020).

Existen especies de insectos benéficas para el ser humano, tanto por su papel en la polinización, como por ser enemigos naturales de plagas, agentes de dispersión de semillas, formación del suelo, ciclo de nutrientes y descomposición (Farji-Brener y Werenkraut, 2017), alimento (Ramos-Elorduy, 2009), recursos terapéuticos (Costa Neto y Ramos-Elorduy, 2006), servicios culturales (arte y bienes de consumo), etc. Por otra parte, existen especies perjudiciales por el daño que ocasionan a cultivos, su actuación como vectores de agentes patógenos, etc. (p. ej.,

Losey y Vaughan, 2006; Kremen y Chaplin-Kramer, 2007, Elizalde 2020, Ramos 2020).

El 17% de las enfermedades infecciosas a nivel mundial son causadas por agentes patógenos vectorizados por insectos. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), estas enfermedades causan alrededor de 700.000 muertes por año. Los principales vectores son los mosquitos del género *Aedes* y *Anopheles* (dengue y malaria), el piojo *Pediculus humanus* (tifus), pulgas (peste negra), flebótomos (leishmaniasis), y triatominos, que transmiten *Trypanosoma cruzi*, el agente causante de la enfermedad de Chagas.

Todas las especies de triatominos (Hemiptera: Reduviidae) son potenciales vectores de *T. cruzi*, aunque algunos de ellos presentan características que aumentan su capacidad vectorial a humanos, tales como la adaptación al ámbito doméstico, el corto período de tiempo entre ingesta de sangre y defecación, el alto grado de antropofilia y la amplia distribución geográfica (Tellería y Tibayrenc 2017).

En América se distribuyen más de 150 especies de triatominos, sin embargo unas 10 a 15 tienen principalmente tendencia antropofílica y están normalmente implicadas en la transmisión de enfermedades; *Triatoma infestans* es la principal en el Cono Sur (Dias 2007), seguido por *Triatoma sordida*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* y *Panstrongylus megistus* (Guhl 2017). En la región andina, que incluye zonas de Bolivia, Perú, Colombia y Ecuador, el principal vector es *Rhodnius prolixus* aunque en algunas zonas se encuentran *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius ecuadoriensis* (Abad-Franch *et al.*, 2002; Cuba Cuba *et al.*, 2002). Hacia la región amazónica se han encontrado *Triatoma maculata*, *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus herreri* y *Rhodnius stali* en domicilios y peridomicilios (Aguilar *et al.*, 2007; Coura y Junqueira 2012).

En la región de América Central, debido a las campañas que han reducido significativamente la presencia de *R. prolixus*, el principal vector en la actualidad es *T. dimidiata*, aunque en Panamá predomina *Rhodnius pallescens* (Ponce 2007, Zeledón *et al.*, 2006). En cuanto a América del Norte, los principales vectores son *Triatoma barberi*, *T. dimidiata*, *Triatoma gerstaeckeri*, *Triatoma longipennis*, *Triatoma mazzotti*, *Triatoma mexicana*, *Triatoma pallidipennis*, *Triatoma phyllosoma* y *Triatoma picturata* (Cruz-Reyes y Pickering-López 2006).

Los triatominos son insectos hemimetábolos; su ciclo de vida comprende el huevo, 5 estadios ninfales y el adulto. El huevo desde la puesta hasta su eclosión

tarda aproximadamente 15 días; en algunas especies es de color blanco durante todo el desarrollo mientras que en otras es de color rosa. Las ninfas recién eclosionadas son también rosadas por un tiempo breve, hasta que los depósitos de quitina en la cutícula las oscurecen a su color final. Transcurridos unos pocos días son capaces de alimentarse, y con esa ingesta desencadenan los procesos que los llevarán a realizar la ecdisis y muda al siguiente estadio. El ciclo completo en promedio lleva alrededor de 3 meses en algunas especies (como *R. prolixus*) aunque en otras puede tomar hasta 2 años. Estos insectos son hematófagos obligados durante todo su ciclo de vida y son capaces de ingerir hasta 10 veces su peso en sangre (Wigglesworth, 1934).

Vincent Wigglesworth realizó numerosos descubrimientos desde la década de 1930 en conducta, fisiología, desarrollo, muda y reproducción en insectos, utilizando como modelo experimental a *R. prolixus* (Wigglesworth, 1934, Wigglesworth, 1939, Wigglesworth, 1953, Wigglesworth, 1954, Wigglesworth, 1959, Wigglesworth, 1964). Esta especie posee características distintivas que la hacen un excelente modelo de estudio en diferentes procesos biológicos (Ons, 2017). El ciclo completo desde la eclosión del huevo hasta el desarrollo reproductivo adulto, en condiciones controladas en el laboratorio ocurre en un lapso de 3 a 4 meses. Además, las ninfas se encuentran en un estado de desarrollo arrestado hasta que ingieren una cantidad de sangre a repleción, lo cual estimula procesos fisiológicos que dan como resultado la muda y ecdisis un número fijo de días después. Esta capacidad de sincronizar el ciclo es una ventaja para realizar estudios de desarrollo post-embrionario (Edwards, 1998). La alimentación con sangre además dispara una rápida diuresis posprandial, lo cual ha sido aprovechado para estudios de osmorregulación y excreción (Capriotti *et al.*, 2019, Quinlan, 1997). Su tamaño, facilidad de manipulación y los colores característicos de algunos de sus órganos hacen que las disecciones y técnicas quirúrgicas sean relativamente sencillas. Por otro lado, desde 2015 su genoma se encuentra completamente secuenciado y ha sido cuidadosamente anotado, lo que resulta una ventaja para estudios genéticos y moleculares (Mesquita *et al.*, 2015).

Ciertas especies de insectos afectan el desarrollo humano a partir de la reducción de la disponibilidad de alimentos. En el mundo se estima que la pérdida en rendimientos de cultivos a causa de plagas de insectos es de entre 20 y 40% (Douglas *et al.*, 2018, Oercke *et al.*, 2006). Este problema se incrementa de cara al

futuro, ya que se considera que para el 2050 el aumento en la producción de alimentos debe aumentar del 70 al 100%, a fin de satisfacer las necesidades de una población creciente (Raguso *et al.*, 2015, Tilman *et al.*, 2011).

Dos tercios de las especies conocidas de la clase Insecta se alimentan de plantas (fitófagos), principalmente de dos maneras: masticadores o succionadores. Los insectos masticadores pueden causar un daño mecánico, ya que afectan funciones vitales como la adquisición de minerales, o disminuyen la superficie de exposición a la luz. Tienen piezas bucales que les permiten romper y desprender porciones de tejido vegetal entero (ya sean raíces, tejido foliar o hasta flores y frutos). En los insectos perforadores y succionadores, las piezas bucales suelen ser afiladas y alargadas, permitiendo penetrar en el tejido vascular y hasta en células individuales aprovechando los vasos del floema o xilema. El daño directo causado puede ser sustancial, pero además suelen ser vectores de bacterias y virus que causan enfermedades en los cultivos (Wari *et al.*, 2021).

Las especies fitófagas de lepidópteros, coleópteros, ortópteros e himenópteros son masticadoras. Entre los dípteros, existen especies con ambos tipos de alimentación. Por su parte, todos los hemípteros fitófagos son perforadores/succionadores. Entre ellos, las plagas más importantes respecto a la agricultura son los áfidos, cicádidos y pentatómidos (chinchas) (Panizzi, 1997)

Si bien la mayoría de los insectos tienen un rango de alimentación reducido a una o pocas especies de plantas, una minoría son polífagas. Las chinchas fitófagas (Hemiptera: Pentatomidae) se encuentran entre los principales insectos plaga de nuestro territorio, sobre todo de soja, aunque también en hortalizas, frutas y granos (Athey 2019). Generalmente estos insectos se estudian como parte de un complejo y no como especies individuales, aunque poseen diferentes hábitos alimenticios, generan diferentes daños a las plantas, poseen distintas respuestas a insecticidas comunes y a especies que se utilizan para controlarlas (Athey 2019). Históricamente, la chinche verde *Nezara viridula* ha sido una de las 2 plagas más importantes en el cultivo de soja en América (Panizzi 1985). Este insecto posee 5 estadios ninfales en los cuáles los dos primeros tienen hábitos gregarios, mientras que los siguientes, junto con los adultos, son los que generan la mayor parte de los daños al cultivo (Corpuz, 1969). En el quinto estadio las ninfas ya tienen un color predominantemente verde con motivos de otros colores y comienzan a dispersarse. Cuando finalizan la última muda eclosionan como adultos, con desarrollo

reproductivo que les permite, luego de la cópula, realizar varias oviposiciones de entre 30 y 120 huevos en forma de panal de abejas en el envés de la hoja, adheridos al tejido vegetal. Los huevos son de color blanquecino y van tornándose al color rojizo hasta su eclosión, con la que se renueva el ciclo. Además los adultos pueden entrar en un estado de quiescencia con las bajas temperaturas (Musolin 2012), para retomar su metabolismo activo cuando comienza la primavera.

1.2 Control de insectos perjudiciales

Desde las primeras civilizaciones humanas se han utilizado sustancias para controlar insectos (Smith y Secoy 1975), pero no fue sino hasta el siglo XVI cuando se concentraron esfuerzos de modo científico con los primeros estudios de derivados vegetales orgánicos. Entre las principales esencias vegetales que se utilizaron podemos nombrar las piretrinas provenientes de crisantemos, la nicotina del tabaco y la rotenona de las leguminosas (Thompson 2001). Simultáneamente fueron utilizadas algunas sustancias inorgánicas, aunque fue ya entrado el siglo XIX y XX cuando se comenzaron a sintetizar los compuestos químicos de acción neurotóxica que reconocemos en la actualidad, tales como los carbamatos, organofosforados, organoclorados, neonicotinoides y piretroides.

Hacia 1937 en Alemania el Dr. Gerhard Schrader demostró las propiedades insecticidas de los compuestos derivados del fósforo, y fue durante la segunda guerra mundial que aumentó su producción para ser utilizados como gases nerviosos (Sarin y Tabun). Hacia el final de la guerra, algunos de estos compuestos comenzaron a ser utilizados para controlar plagas de insectos, como fue el caso de Tetraetilpirofosfato (Tepp) y luego de Sulfatepp, con la adición de una molécula de azufre que generaba una disminución en la toxicidad a mamíferos y era más estable en agua.

Cuatro clases de insecticidas han sido utilizados tradicionalmente en las campañas de control vectorial: organofosforados, carbamatos, organoclorados y piretroides (OMS 2022). Con el correr de los años se fueron sintetizando nuevos y mejores insecticidas organofosforados, que tienen como sitio blanco la enzima acetilcolinesterasa. Paratión, Malatión, Fentión y Fenitrotión, fueron y siguen siendo muy utilizados en todo el mundo. Por su parte, los carbamatos al igual que los

organofosforados se unen a las acetilcolinesterasas e interfieren en el funcionamiento del sistema nervioso, la diferencia radica en que se unen de manera reversible a la enzima y son biotransformados *in vivo*. Por esta razón es que son menos tóxicos para los mamíferos y siguen utilizándose en la actualidad.

El organoclorado DDT y los piretroides tienen como blanco el canal proteico de sodio dependiente de voltaje, presente en la membrana de las células excitables. Los insecticidas organoclorados químicamente se dividen en 3 clases (análogos del DDT, del hexacloruro de benceno o compuestos del ciclodieno), pero todos poseen similares características en cuanto a solubilidad y volatilidad (Daley *et al.*, 2014, Karasali y Maragou, 2016). Fueron muy utilizados desde 1939 por algunas décadas hasta que demostraron su alta persistencia y toxicidad, por lo que se prohibieron en muchos países a partir de 1970 y son poco utilizados en la actualidad (Delaplane 2000, Richardson *et al.*, 2019). Los insecticidas piretroides sintéticos surgieron en la década del 80, emulando la acción de las piretrinas que se utilizaban desde 1850 (Hitmi *et al.* 2000). Desde su origen han ocurrido variaciones que mejoraron la estabilidad y la residualidad de compuestos altamente eficaces para el control de insectos. A partir de mejoras químicas se han logrado sintetizar moléculas más estables como el caso de Permetrina, Cipermetrina y Deltametrina (Davies *et al.*, 2007). En las últimas 3 décadas estos insecticidas han sido muy utilizados tanto en la protección de cultivos como en la aplicación domiciliar y peridomiliar, en la búsqueda de reducir las poblaciones de insectos vectores. Sin embargo, debido a la emergencia de poblaciones resistentes, su uso se ha reducido como herramienta en el control de vectores en la mayoría de países del mundo (Global vector control response 2017–2030. Geneva: World Health Organization; 2017. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO). Por consideraciones ambientales y de salud pública, los piretroides son los únicos insecticidas permitidos a la fecha para un uso domisanitario en nuestro país; la resistencia a estos compuestos reportada por parte de vinchucas (Capriotti *et al.*, 2014; Fabro *et al.*, 2012; Fronza *et al.*, 2020, Germano *et al.*, 2010, Picollo *et al.*, 2005, Sierra *et al.*, 2016) y mosquitos (Barrera Illanes *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2006, Ranson *et al.*, 2011, Zheng Hua *et al.*, 2018) presenta un desafío a la sostenibilidad de los programas de control en amplias regiones y en el corto plazo. (WHO - Global insecticide use for vector-borne disease control - Sixth edition 2010-2019).

Otras clases de insecticidas han obtenido más recientemente la pre-aprobación de OMS, por lo que resultan prometedoras como nuevas herramientas químicas para el control de vectores: neonicotinoides, pirroles, butenolides, miméticos de hormona juvenil y espinosinas (Ahmad *et al.*, 2018, Alomar *et al.*, 2021, Klingelhöfer *et al.*, 2022, Sparks *et al.*, 2021, Tosi *et al.*, 2021). Sin embargo, resulta importante focalizar el esfuerzo científico hacia la búsqueda de alternativas con una mejor sostenibilidad ambiental, que puedan implementarse para complementar o reemplazar a los insecticidas sintéticos.

El concepto de Manejo Integrado de Plagas (MIP), introducido desde la década de 1950 para el control de plagas agrícolas (Higley y Peterson 1996), es sugerido por la OMS para el control de vectores (Global vector control response 2017–2030. Geneva: World Health Organization; 2017. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO). A lo largo de los años se fue ahondando en la búsqueda de un control de insectos especie-específico con menor impacto ambiental (Dias y Moraes, 2014). Cada estrategia puede aportar diferentes niveles de control, pero un efecto conjunto con rotación de cultivos e insecticidas, control biológico, desarrollo biotecnológico y disminución del uso continuado e innecesario de insecticidas puede generar una mejora sustancial en retrasar la aparición del fenómeno de resistencia, optimizar los recursos y herramientas, mejorar la rentabilidad, eficacia y al mismo tiempo generar un menor impacto ambiental. La OMS ha propuesto el plan 2017-2030 para la respuesta global al control de vectores (GVCR). Las estrategias indicadas incluyen mejor vigilancia y coordinación, mayor capacidad y acciones integradas con planes operativos de actividades prioritarias. Para ello es necesario brindar apoyo para la evaluación y consecuente adaptación de los diferentes países hacia nuevas o mejores estrategias de control (<https://www.who.int/publications/i/item/9789241512978>)

1.3 Mecanismos biológicos de resistencia a insecticidas

La detoxificación de xenobióticos es un proceso complejo que comprende múltiples etapas y mecanismos biológicos. Existen superfamilias enzimáticas clásicamente estudiadas en el contexto de la detoxificación en insectos; ellas son las Citocromo P450 (CYP), Carboxil-colinesterasas (CCE) y Glutación transferasas (GST) (Volonté *et al.*, 2022). Más recientemente, se ha implicado en la detoxificación en insectos a otras superfamilias, tales como proteínas de choque térmico (HSP),

proteínas cuticulares, UDP glicosiltransferasas, factores de transcripción, transportadores ABC, proteínas quimiosensoriales (CSP) y proteínas de unión a odorantes (OBP por sus siglas en inglés), entre otras (ver Ingham *et al.*, 2023).

El proceso de detoxificación fue tradicionalmente dividido en fases 1 y 2, aunque más recientemente se habla de fases 0 y 3, que corresponden a la entrada y salida de los compuestos (Baldwin 2019). Durante la fase 0, proteínas, enzimas y transportadores moderadamente selectivos modulan el ingreso de los compuestos a los compartimentos celulares donde ejercen su función (Szakács *et al.*, 2008). En la fase 1 las reacciones se basan en la acción de CCE y CYP, que reducen la actividad biológica de xenobióticos mediante reacciones de reducción, oxidación y/o hidrólisis. La fase 2 comprende la acción principalmente de enzimas de las familias GST y UGT, las cuales catalizan reacciones de conjugación con los tóxicos derivados de la fase 1, generando productos solubles para metabolizar. La tercera fase corresponde al transporte al medio extracelular de los metabolitos o compuestos no modificados por parte de transportadores ABC y otros (Ferreira *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2019, Lin *et al.*, 2022).

La resistencia a insecticidas es el desarrollo, por parte de una población de insectos, de la capacidad de tolerar dosis que han probado ser letales para la mayoría de los individuos de la misma especie (OMS, 1957). Es una forma preadaptativa que poseen los insectos para sobrevivir en condiciones adversas; muchas veces una población contiene algunos individuos con determinadas modificaciones genéticas, que generan una mejor respuesta al tóxico. En la descendencia prevalecerán por sobre los insectos susceptibles y por ende el rasgo de resistencia será seleccionado a través de las generaciones, siempre que continúe la presión de selección (Kennedy y Tierney 2013). La resistencia a un insecticida fue reportada por primera vez en 1914 (Melander 1914) como la falta de eficacia del agente inorgánico polisulfuro de calcio en el control de insectos (*Aspidiotus perniciosus*, *Bryobia rubrioculus* y áfidos de orquídeas).

Se han descrito mecanismos de resistencia a insecticidas que pueden agruparse en cuatro clases: insensibilidad en el sitio de acción, resistencia metabólica, resistencia por disminución en la penetración y resistencia por comportamiento.

-Resistencia por insensibilidad en el sitio de acción: Los insecticidas neurotóxicos poseen un blanco molecular en el sistema nervioso. La interacción de

la molécula insecticida con dicho blanco genera desequilibrios que llevan a la intoxicación y, eventualmente, a la muerte. Mutaciones génicas que alteran la estructura de las proteínas blanco suelen generar deficiencias en la interacción con el insecticida. Entre los mecanismos conocidos de resistencia, las mutaciones en el sitio blanco son las que generan tasas más elevadas (Enayati *et al.*, 2020). En el caso de los piretroides y DDT se conoce como *knock-down resistance (kdr)* a este tipo de mutaciones, que se ubican en regiones determinadas del canal de sodio dependiente de voltaje (Narahashi 2010). Las mutaciones *kdr* fueron identificadas por primera vez en *Musca domestica* (Busvine 1951), y posteriormente fueron descritas como causa principal de resistencia en poblaciones de prácticamente todas las especies de insectos plaga (Auteri *et al.*, 2018, Jamroz *et al.*, 1998, Reimer *et al.*, 2014, Uemura *et al.*, 2024). En Argentina, nuestro grupo de trabajo demostró la presencia de mutaciones *kdr* tanto en vinchucas (Capriotti *et al.*, 2014, Fabro *et al.*, 2012, Sierra *et al.*, 2016) como en mosquitos *Ae. aegypti* (Barrera Illanes *et al.*, 2023 y resultados no publicados).

La resistencia por insensibilidad en el sitio de acción ha sido reportada para otros insecticidas neurotóxicos tales como carbamatos y organofosforados (con blanco en acetilcolinesterasa) (Araújo *et al.*, 2023), fenilpirazoles y organoclorados (que actúan sobre receptores GABA ionotrópicos) (Buckingham *et al.*, 2017) neonicotinoides y spinosad (cuyo sitio blanco son los receptores nicotínicos de acetilcolina) (Bass *et al.*, 2015).

-Resistencia metabólica: La biotransformación incluye la metabolización de moléculas tóxicas para su posterior eliminación, mediante acción enzimática. Los insectos resistentes suelen presentar un aumento en la actividad de enzimas detoxificantes de fases 1 y 2, como consecuencia de amplificación génica, mutaciones de las secuencias codificantes y/o aumentos en la actividad (Enayati *et al.*, 2005, Feyereisen *et al.*, 1999, Li *et al.*, 2007). En insectos resistentes a insecticidas se destaca la sobreexpresión de genes de detoxificación, particularmente las Citocromo P450 (CYP450). Estas enzimas metabolizan los insecticidas, haciéndolos menos dañinos y más solubles, lo cual facilita su eliminación. Diversos estudios han mostrado la capacidad de diferentes enzimas de esta familia de unir y modificar insecticidas. En los últimos años se ha utilizado butóxido de piperonilo (PBO), CYP450 en distintas formulaciones, y se ha demostrado mayor eficacia en poblaciones resistentes (Ingham *et al.*, 2023).

Además, esterasas, glutatión transferasas, transportadores ABC, y otras familias detoxificantes también están vinculadas a la resistencia a insecticidas. Comprender sus mecanismos ofrece perspectivas para estrategias más eficaces en el manejo de la resistencia.

-Resistencia por disminución de la penetración: Es un mecanismo principalmente físico que ha sido detectado en muchas especies de insectos y depende de las propiedades del tegumento. La disminución de la penetrancia del tóxico, por aumento del grosor de la cutícula o por modificaciones estructurales que generan menor permeabilidad, puede contribuir a la resistencia. Se han encontrado insectos resistentes con proteínas de la cutícula sobreexpresadas, lo cual sugiere el aporte de cambios cuticulares estructurales que aportan a la resistencia (Calderón-Fernández *et al.*, 2017, Koganemaru *et al.*, 2013). La ralentización en el proceso de penetración del tóxico puede permitir a los insectos tener más tiempo para metabolizarlo (Brattsten *et al.*, 1986, Scott *et al.*, 1991). La cutícula es la primera barrera que deben superar los insecticidas. Está compuesta por la epicutícula (rica en hidrocarburos) y la procutícula (rica en quitina y proteínas). Algunos cambios en estas capas se observan en insectos y están vinculados a resistencia al reducir la penetración del insecticida. En *An. gambiae* por ejemplo, una epicutícula con 30% más hidrocarburos redujo en 50% la penetración de deltametrina (Balabanidou *et al.*, 2016). La sobreexpresión de proteínas cuticulares con unión a quitina se ha asociado con resistencia, al modificar la procutícula. Estos cambios afectan la fisiología del insecto, ya que los hidrocarburos cuticulares están relacionados con la protección contra desecación y patógenos. Aunque se conoce la vía de biosíntesis de hidrocarburos cuticulares en *An. gambiae* y se han propuesto genes candidatos, los mecanismos precisos y la relación causal con la resistencia cuticular aún son desconocidos. La falta de marcadores genéticos y la complejidad de los métodos de identificación dificultan la comprensión completa de este mecanismo de resistencia (Ingham *et al.*, 2023, Pedrini *et al.*, 2009).

-Resistencia por comportamiento: Se ha comprobado que insectos de diferentes ordenes presentan modificaciones en su comportamiento que les permiten evitar las áreas donde se ha aplicado insecticida, o alimentarse de recursos que contienen el tóxico (Sanou *et al.*, 2021).

Estudios recientes que han hecho uso de análisis de grandes bases de datos, así como ensayos fisiológicos, han evidenciado que la resistencia a insecticidas es

un fenómeno más complejo que lo previamente asumido, que implica una multiplicidad de mecanismos y familias génicas prácticamente no estudiadas. Esto incluye mecanismos tales como el secuestro y transporte de moléculas, implicación de la microbiota, etc. Las nuevas familias de genes bajo estudio de implicación en resistencia a insecticidas abarcan a las proteínas quimiosensoriales, proteínas transportadoras de olor, factores de transcripción, etc. (para un review reciente ver Ingham *et al.*, 2023).

Proteínas quimiosensoriales, transportadoras de olor, hexamerinas y α -cristalinas abundantes en larvas, están vinculadas a resistencia a piretroides (Ingham *et al.*, 2018). Otro aspecto a considerar es el papel del microbioma, dónde diferencias en la composición microbiana se asocian con el fenómeno. También se ha identificado la influencia del estrés oxidativo, afectando la longevidad y la respuesta metabólica a insecticidas (Oliver y Brooke 2014, Champion y Xu 2018). El estudio de estos mecanismos amplía la comprensión de la resistencia y ofrecen posibles puntos de intervención en el control de insectos.

A nivel mundial, el control de insectos se realiza con un grupo reducido de insecticidas sintéticos, tal vez la escasa innovación en los últimos 30 años tenga que ver con los costosos y lentos procesos asociados a la prueba y registro (Blackie *et al.*, 2014, Gamundi *et al.*, 2007, Rowen *et al.*, 2022). A partir de la utilización sistemática de unos pocos neurotóxicos se ha reportado la deficiencia en el control que muchas veces viene acompañada de un incremento de la dosis aplicada. La solución en estos casos produce el problema en el mediano plazo, aumentando los costos de producción y elevando la aparición de resistencia. Las mezclas de neonicotinoides y piretroides son los insecticidas con mejor efectividad utilizados en nuestro país contra hemípteros fitófagos. Hoy en día estas aplicaciones han demostrado eficacia, pero la experiencia advierte que estos productos generarán resistencia en poco tiempo, además del impacto ambiental. Por ello, resulta importante alternar con métodos de control biológico, rotación de cultivos, rotar insecticidas con diferente modo de acción, barreras físicas, cultivos trampa, utilización de semioquímicos, entre otros.

Desde 1940, los insectos triatominos se intentan controlar con insecticidas químicos. Los primeros reportes de poblaciones resistentes a estos neurotóxicos fueron hacia 1970 en Venezuela (Gonzalez-Valdivieso *et al.*, 1971). Con el correr de los años fue variando el uso de diferentes tipos de químicos debido a la baja

residualidad, a los efectos tóxicos en animales domésticos y personas, o por las altas dosis o costos necesarios para su efectividad, además de la aparición de resistencia. Desde la década de 1980 los piretroides probaron ser altamente eficientes a bajas dosis, con alto efecto residual, por lo que comenzaron a ser elegidos en las campañas de control. Sin embargo, con el comienzo del nuevo milenio aparecieron los primeros reportes de resistencia moderada por parte de *R. prolixus* en Venezuela y *T. infestans* en Brasil (Vassena *et al.*, 2000). En *T. infestans*, la resistencia a insecticidas piretroides es un problema extendido y un desafío para el control de la transmisión vectorial de *T. cruzi* (Gurtler 2021, Mougabure Cueto y Picollo 2021, Picollo *et al.*, 2005, Santo Orihuela *et al.*, 2008) con focos de resistencia muy altos en Bolivia, y las provincias argentinas de Chaco y Salta (Gurtler 2021, Mogabure-Cueto y Piccolo 2015, Sierra *et al.*, 2016). Si bien se han buscado alternativas como el tratamiento de animales domésticos con insecticidas o el uso de trampas, no se ha tenido el éxito suficiente, por lo que el rociado en las viviendas con insecticidas residuales sigue siendo hoy en día el método de control por excelencia. Sin embargo, es necesario el compromiso con las comunidades ya que las mejoras de vivienda junto con el manejo del ambiente son primordiales para mejorar los resultados del programa de control y disminuir el impacto de la acción de los químicos sobre el ambiente.

Ante el panorama de resistencia a insecticidas e impacto ambiental de los compuestos sintéticos, se plantea el desafío científico de encontrar métodos innovadores y sustentables. Por el momento el control de insectos se basa en 4 métodos principales que son químicos, biológicos, genéticos y ambientales (Deguine *et al.*, 2021, Marcos-Marcos *et al.*, 2018). Se han comentado los desafíos que presenta el uso de insecticidas neurotóxicos, tales como el alto impacto ambiental, acumulación en la cadena alimentaria y existencia extendida de poblaciones resistentes a uno o varios de ellos simultáneamente (Pathak *et al.*, 2022).

El control biológico hace referencia al uso de microorganismos y/u otros agentes biológicos. Se ha implementado con éxito, por ejemplo en el uso de las toxinas de *Bacillus thuringiensis israelensis* como larvicida, (Hare *et al.*, 1986) o con la bacteria *Wolbachia* que suprime la replicación de arbovirus en mosquitos, con bajo impacto para la especie y el humano (Conway *et al.*, 2023, Geoghegan *et al.*, 2017, Shaw *et al.*, 2016). Existen además estudios sobre la utilización de virus de

insectos y microorganismos que compiten con el patógeno (Dennison *et al.*, 2015, Jupantakul *et al.*, 2014, Saldaña *et al.*, 2017, Scolari *et al.*, 2019), aunque resulta difícil su implementación debido a restricciones regulatorias y logísticas.

La introducción de machos estériles es un método de control genético. Estos machos copulan con las hembras fértiles sin producir descendencia, lo cual genera una disminución poblacional (Bourtzis y Vreysen 2021, Gato *et al.*, 2021). Sin embargo, es difícil generar los machos estériles tanto como su introducción en el campo. Además, existen pocos estudios que permitan evaluar el impacto a largo plazo en los ecosistemas.

El manejo ambiental (eliminación de criaderos, orden y limpieza de los espacios para evitar la formación de colonias de insectos, etc.) es una actividad clave de cualquier estrategia de manejo integrado de plagas que debe incorporarse a los programas de control. Si bien es necesario, el manejo ambiental muchas veces no es suficiente para controlar poblaciones de vectores en momentos de brote o elevada transmisión, con lo que debería ser complementado con el uso de insecticidas, idealmente de bajo impacto.

Se han propuesto alternativas menos exploradas, como el uso de toxinas peptídicas presentes en venenos de arañas o escorpiones, que podrán ser vía prometedoras hacia futuro. Dentro de este panorama, resulta relevante la generación de información sobre sistemas poco explorados que propongan nuevos blancos de acción, con una buena eficiencia y menor impacto sobre los ecosistemas.

El desarrollo de insecticidas basados en ARN de interferencia (ARNi) es una de las áreas más activas de la biotecnología aplicada al control de insectos plaga, al punto que se los considera insecticidas de próxima generación (Christiaens *et al.*, 2022, Fletcher *et al.*, 2020). La técnica de RNAi permite reprimir la expresión de un gen específico mediante la administración de un ARN doble cadena (dsRNA) que codifica un fragmento de su secuencia. Fragmentos pequeños de RNA específico se unen al RNA mensajero (mRNA) del gen blanco por complementariedad de bases, lo que promueve el clivaje del mRNA por un complejo enzimático. La técnica de ARN de interferencia (ARNi) se basa en el mecanismo de defensa de algunos virus, aunque se sabe desde hace algún tiempo que forma parte esencial de los organismos eucariotas en su función reguladora de expresión de genes (Bernstein *et al.*, 2003).

Además de su potencial como insecticida, el ARNi es utilizado en ciencia de insectos como técnica para el estudio de la función de genes. El mecanismo que se utiliza a nivel experimental es la síntesis *in vitro* de dsRNA complementario al gen que se quiere silenciar (Fire *et al.*, 1998). Este dsRNA es administrado a los insectos, habitualmente por vía de micro-inyección, aunque ensayos más recientes han demostrado eficiencia por vía oral e incluso por vía tópica (Whitten 2019, Yan *et al.*, 2021). Una vez en el medio interno celular, la ARNasa DICER cliva al dsRNA en fragmentos de 21-25nt monocatenarios. Estos pequeños fragmentos de interferencia (siRNA small interference RNAs) se asocian con un complejo proteico denominado RISC (RNA induced silencing complex) del que forma parte una proteína Argonata que es la encargada de reconocer el ARNm específico y clivarlo, eliminando o disminuyendo su expresión (Fig. 1). De esta manera, al analizar los fenotipos por pérdida de función, puede inferirse el papel de genes en insectos (Christiaens *et al.*, 2020, Zhu y Palli 2020).

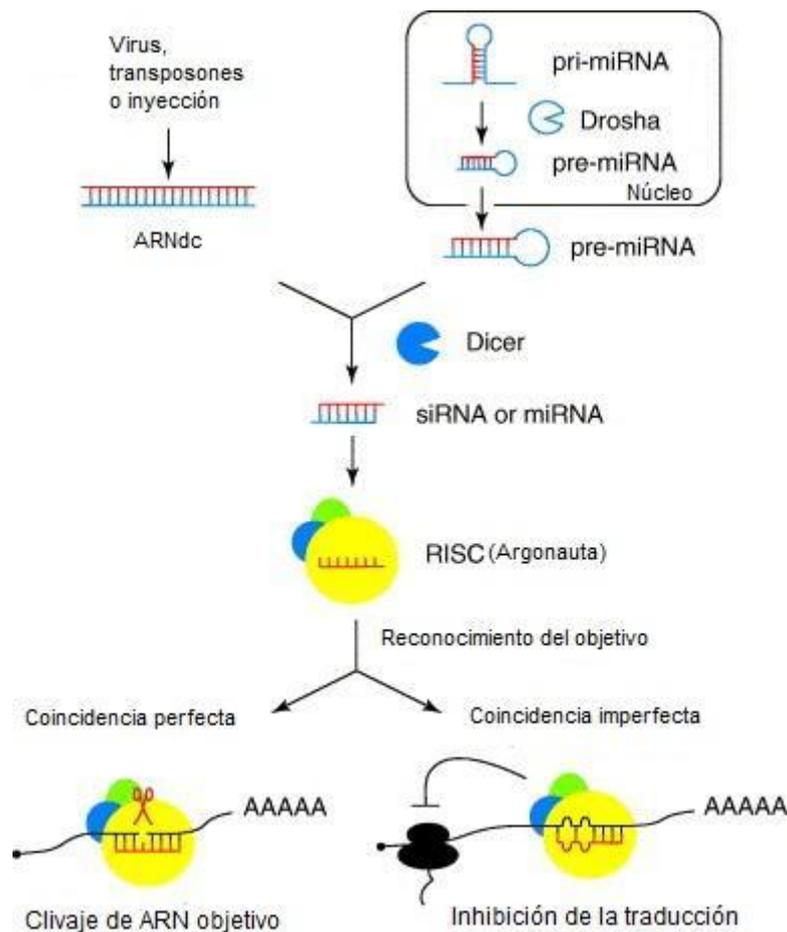


Figura 1. ARN de interferencia. Mecanismo de procesamiento del ARNdc. Pri-miRNA: micro ARN primario. Pre-miRNA: precursor del micro ARN. siRNA. pequeño ARN de interferencia. miRNA: micro ARN. (Figura adaptada de Van Rij y Andino, 2006).

La técnica de ARNi es particularmente eficiente en hemípteros (Blariza *et al.*, 2017, Christiaens y Smaghe 2014, Dulbecco *et al.*, 2018). En *R. prolixus* se ha demostrado la transferencia vertical del silenciamiento; es decir, se logra una represión de la expresión de genes en las ninfas mediante inyección a madres adultas (Paim *et al.*, 2013).

En *D. melanogaster* el proceso de interferencia de genes por ARNi también es muy efectivo. El sistema UAS/Gal4 permite estudiar el efecto del silenciamiento génico en diferentes tejidos, contextos y condiciones de manera finamente dirigida (Hales *et al.*, 2015). El sistema en su versión más simple implica la utilización de 2 líneas de moscas parentales, una que lleva el gen de interés (en este caso el ARNi y la proteína Dicer-2 para reforzar el silenciamiento), cuya expresión es controlada por la secuencia UAS (*upstream activating sequence*). La otra línea parental codifica el factor de transcripción Gal4 (que activa UAS) y un promotor seleccionado para expresar GAL4 en condiciones determinadas. En la progenie (F1) de la cruce de 2 moscas parentales, Gal4 activa la expresión de la construcción de interés, dado que está fusionada corriente abajo de la secuencia UAS. La manipulación de distintos promotores de GAL4 permite una expresión tejido-específica, dirigida a una etapa del desarrollo determinada, o de acuerdo con los objetivos experimentales (Fig. 2). Entre otras, esta herramienta genética permite estudios detallados de función génica en *D. melanogaster*.

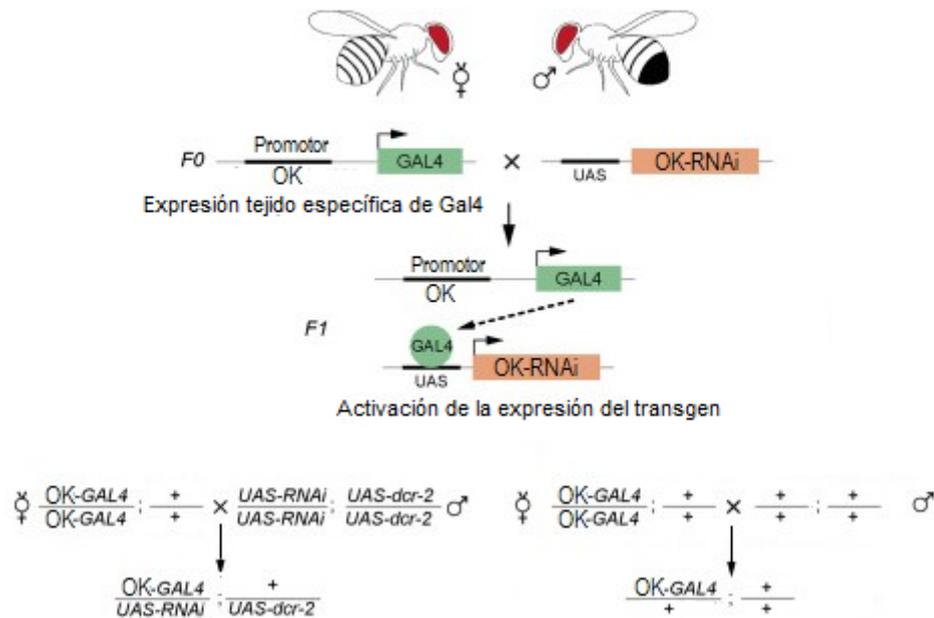


Figura 2. Mecanismo de silenciamiento mediante el sistema UAS/Gal4 en *D. melanogaster*. Se detallan las construcciones genéticas empleadas en el presente trabajo (Capítulo 1) para el silenciamiento efectivo por ARNi en la prole F1 mediante la cruce de F0.

En cuanto al uso de ARNi como mecanismo de control de insectos, la primera vía de introducción al mercado insecticida ha sido mediante plantas transgénicas que expresan el ARNdc. Cuando la planta es ingerida por el insecto se silencia la expresión de un gen clave en la supervivencia y/o reproducción, lo que genera un efecto letal o de baja reproductiva. La utilización de ARNi es una de las áreas más prometedoras para el control de plagas en la actualidad (Baum *et al.*, 2007, Dalakouras *et al.*, 2020, Ghosh *et al.*, 2017, Krempl *et al.*, 2016, Luo *et al.*, 2017, Mao *et al.*, 2007), aunque su eficiencia es diferente en distintos ordenes de insectos (Bellés *et al.*, 2010, Xu *et al.*, 2016). La deficiencia de absorción, y por ende su falta de eficacia como método de control, puede deberse a nucleasas extracelulares que están presentes en el tracto digestivo de los insectos, y que pueden estar activas también en hemolinfa (Christiaens *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2012, Luo *et al.*, 2013, Wynant *et al.*, 2012). Además, las diferentes sensibilidades a la técnica se han reportado entre diferentes especies, así como en diferentes tejidos del propio insecto (Vogel *et al.*, 2019).

Un sistema de administración alternativo de dsRNA es a través de microorganismos simbioses modificados genéticamente. Este método ha demostrado una alta efectividad en especies de diferentes ordenes de insectos

como *R. prolixus* (Whitten *et al.*, 2016), *Drosophila suzukii* (Murphy *et al.*, 2016), *Anopheles stephensi* (Kumar *et al.*, 2013), *Spodoptera exigua* (Vatanparast y Kim 2017) y *Helicoverpa armigera* (Yang y Han 2014). La administración mediante virus parece simple porque en la naturaleza existen millones que afectan un rango amplio de huéspedes, y son extremadamente eficientes para infectar células con ARN, pero hay que tener en cuenta que esta vía de administración es muy propensa a la infección cruzada y otros problemas de bioseguridad asociados a la liberación al ambiente de virus transgénicos (Kolliopoulou *et al.*, 2017, Taning *et al.*, 2018).

A partir del auge de la nanotecnología en la actualidad, muchos estudios con nanopartículas de quitosano o de polímeros sintéticos parecen ser mejores formas de administrar ARN, debido a su gran estabilidad, facilidad de absorción, baja toxicidad y su carácter poli catiónico que permite interacción electrostática estable con el ARN (Arjunan *et al.*, 2024). Numerosos ejemplos dan muestra de este modo de introducción de ARN con alta efectividad, aunque las partículas a veces deben ser modificadas para incrementar sus efectos (Christiaens *et al.*, 2018, He *et al.*, 2013, Mysore *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2015).

La presente Tesis aborda distintos aspectos relacionados con la fisiología reproductiva, el desarrollo y la detoxificación de insectos. Se han utilizado técnicas bioinformáticas, de fisiología, biología molecular y silenciamiento génico mediado por dsRNA, tanto en *R. prolixus* como en *D. melanogaster*. En conjunto, el campo de aplicación del trabajo realizado es el manejo de la resistencia a insecticidas y el control de insectos perjudiciales con aproximaciones de menor impacto ambiental. Los resultados presentados han sido publicados en tres manuscritos (Silva *et al.*, 2021, Sterkel y Volonté *et al.*, 2022; Volonté *et al.*, 2022) y forman parte de dos manuscritos en preparación.

2.1 Insectos

R. prolixus: Los insectos de la especie *R. prolixus* se obtuvieron de la colonia establecida en el Centro Regional de Estudios Genómicos (CREG-CENEXA - Facultad de Ciencias Exactas/Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de La Plata). La colonia es mantenida a temperatura controlada a 28 ± 2 °C y humedad relativa $\approx 60\%$ en un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Una vez al mes, los insectos fueron alimentados con sangre de gallinas, manipuladas siguiendo la Resolución 1047/2005 (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET) relativa al Marco Ético Nacional de Referencia para la Investigación Biomédica con Animales de Laboratorio, Granja y Colectados en la Naturaleza. Este marco está en concordancia con los procedimientos estándar de la Oficina de Bienestar de Animales de Laboratorio, Departamento de Salud y Servicios Humanos, Institutos Nacionales de Salud, y las recomendaciones establecidas en la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo relacionada con la protección de los animales utilizados para fines científicos. Las consideraciones de bioseguridad están de acuerdo con la Resolución 1619/2008 del CONICET, que está en concordancia con el Manual de Bioseguridad de la OMS (ISBN 92 4 354 6503).

D. melanogaster: Los insectos de la especie *D. melanogaster* se mantuvieron a temperatura ambiente (22-25 °C) en medios estándar de agar/harina de maíz/levadura. Los controladores GAL4 para el gen Orcokina se caracterizaron en Chen *et al.*, 2015, y fueron amablemente proporcionadas por Christian Wegener (U. Würzburg, Alemania). Las siguientes líneas UAS-OK RNAi se obtuvieron del Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC; Viena, Austria): VDRC #106882, dirigida a la isoforma OKA; y VDRC #12876, dirigido a todas las isoformas conocidas del gen. Además, la línea #61833, que se dirige sólo a la isoforma OKA se obtuvo del Bloomington Drosophila Stock Center. Los tipos silvestres Canton-S (CS), white1118 (w1118), UAS-mCD8GFP y UAS-dicer2 se obtuvieron del Bloomington Drosophila Stock Center. UAS-dcr2 se coexpresó siempre con los transgenes de ARNi tanto para una como para ambas isoformas del gen. Los experimentos fueron realizados en el Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, en Chile.

2.2 Técnicas de Biología Molecular

2.2.1 Extracción de ARN

Las ninfas de cuarto estadio de *R. prolixus* fueron micro-disectadas bajo lupa binocular estereoscópica Zeiss, utilizando pinzas quirúrgicas de titanio y hojas de afeitar. Se utilizó solución salina para facilitar la visualización y extracción de cada tejido (ver Soluciones en Anexo II: Protocolos detallados). Los tejidos extraídos fueron colocados en tubos tipo eppendorf de 1,5 ml con 200 μ l de reactivo Trizol (TRI reagent - Sigma Aldrich Argentina) para su almacenamiento en ultrafreezer a -80°C hasta el posterior procesamiento.

La extracción de ARN total se realizó según el protocolo correspondiente al fabricante del reactivo Trizol. Las muestras de *R. prolixus* se homogeneizaron en bloque frío (0 a 4°C) utilizando pistilos plásticos con taladro para facilitar la ruptura completa del tejido o del individuo completo en el caso de las ninfas de primer estadio y hembras adultas de *D. melanogaster*. El ARN obtenido se disolvió en agua ultrapura estéril. Se utilizó 1 μ l para estimar la concentración del ARN obtenido y su calidad en un equipo Nanodrop lite plus (Thermo Fisher Scientific). La integridad del ARN y la concentración fueron en cada caso confirmadas mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (ver protocolos en Anexo II: Protocolos detallados). Los tubos cerrados sellados con parafilm se conservaron a -80°C hasta su utilización.

2.2.2 Síntesis de ADNc

Para la síntesis de ADN copia (ADNc) se utilizó 1 μ g de ARN como molde. Se trató con DNAsa I (Thermo Fisher Scientific) eliminando los restos de ADN genómico, según las instrucciones del fabricante. Luego se procedió a sintetizar ADNc con la enzima transcriptasa reversa MMLV (Promega) según el protocolo del fabricante. En todos los casos se realizó un control de la reacción mediante PCR con *primers* de Actina (ver Tabla S1 en Anexo I: Material suplementario) y electroforesis en gel de agarosa 1% (Ver Protocolos detallados en Anexo II: Material suplementario).

2.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR) y cuantitativa (qPCR)

Para la amplificación de los fragmentos a utilizar se realizaron 2 reacciones de punto final consecutivas. Se utilizó en ambas la enzima *Taq pegasus* DNA Polimerasa de PB-L (Protocolo en Anexo II: Protocolos detallados).

Para las qPCR se tomó la precaución, siempre que resultó posible, de diseñar los primers *forward* y *reverse* en exones diferentes del gen, de acuerdo a los modelos génicos de *R. prolixus* (www.vectorbase.org). De esta manera se evitó la amplificación de ADN genómico que pudiera estar presente en la muestra a pesar del tratamiento con DNasa I. En el caso del gen *rhopreh* esto no fue posible dado que es un gen compuesto por un único exón. Otra precaución en el diseño de primers fue que abarcaran una región diferente a la amplificada por los primers utilizados para la síntesis de dsRNA, en los casos de experimentos de ARNi. Si bien es poco probable, el dsRNA inyectado podría retro-transcribirse en ADNc e introducir errores en la cuantificación del ARNm endógeno (observaciones no publicadas). La única excepción fue el gen *rhopreh*, ya que no fue posible diseñar primers eficientes fuera de la región amplificada para la síntesis de ARNdc.

Todos los pares de primers utilizados para las qPCR se sometieron a pruebas de dimerización, eficiencia y amplificación de un único producto. Sólo se utilizaron pares de primers con una eficiencia de entre el 80% y el 120% (ver Tabla S1 en Anexo I: Material suplementario). Los niveles de amplificación se cuantificaron en tiempo real utilizando FastStart SYBR Green Master Mix (Roche) en un equipo de PCR en tiempo real Agilent AriaMx (Applied Biosystems) (ver Anexo II: Protocolos detallados). En todos los lotes se incluyeron controles negativos con agua estéril en lugar de molde de ADNc. Los genes codificantes para el factor de elongación 1 (*rhopref1*) y tubulina (*hoprtub*) se utilizaron como genes constitutivos ya que fueron validados previamente como genes estables en *R. prolixus* (Majerowicz *et al.*, 2011; Omondi *et al.*, 2015; Paim *et al.*, 2012). Los valores de $2e^{-\Delta CT}$ obtenidos para los grupos tratados y de control se utilizaron para evaluar los niveles de expresión de cada gen de interés (Livak y Schmittgen, 2001).

2.2.4 Síntesis de ARN de doble cadena

Se diseñaron *primers* específicos para cada gen *target* (ver Tabla S1 en Anexo I: Material suplementario). Los *primers* para los experimentos de ARNi se diseñaron para silenciar la expresión de cada gen en todas sus isoformas conocidas, buscando una secuencia común a todas las isoformas, en cada caso. Un fragmento del gen de la β -lactamasa (β -lac), ausente en el genoma de *R. prolixus*, se amplificó por PCR a partir del plásmido pBluescript y se utilizó como control negativo del experimento.

Los *primers* diseñados contienen la secuencia de unión a la polimerasa T7 en el extremo 5', que es necesaria para la síntesis de dsRNA. Todos los productos de PCR fueron secuenciados (Macrogen, Seúl, Corea) para confirmar su identidad. La PCR secundaria (ver Anexo II: Protocolos detallados) se llevó a cabo utilizando 1 μ l del producto de la PCR primaria y un *primer* del promotor completo T7 (ver Tabla S1 en Anexo I: Material suplementario). Los dsRNA se transcribieron *in vitro* utilizando el *kit* MEGAscript T7 (Thermo) o la enzima Polimerasa T7 según las instrucciones del fabricante. Después de una extracción fenol:cloroformo: isoamilalcohol y precipitación con isopropanol los dsRNA fueron resuspendidos en agua ultrapura estéril (Milli-Q) (ver Anexo II: Protocolos detallados). Los dsRNA se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5% p/v) para verificar su tamaño e integridad. Se tomaron fotos de los geles teñidos con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta. La cantidad de dsRNA se cuantificó mediante análisis de imágenes de los geles por comparación con un patrón de concentración conocida (Productos Bio-logicos) con el programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.). Los ARNdc se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

2.2.5 Silenciamiento génico por ARN de interferencia (ARNi)

Las ninfas de cuarto estadio y las hembras adultas de *R. prolixus* fueron inyectadas en el tórax con 2 μ g de dsRNA disuelto en 2 μ l de agua ultrapura mediante una microjeringa Hamilton de 10 μ l. A los insectos del grupo control se les inyectaron 2 μ g de dsRNA β -lac (inespecífico). En el experimento de silenciamiento de neuropéptidos sólo se utilizaron hembras apareadas que habían sido alimentadas una vez durante la etapa adulta. Las hembras fueron inyectadas con dsRNA 21 días después de la primera alimentación.

Tanto en el experimento de ecdisis con silenciamiento de neuropéptidos como en el de reproducción de hembras silenciadas para CSP, las ninfas de cuarto estadio y las hembras adultas respectivamente, se alimentaron 7 días después de la inyección de dsRNA. El día de alimentación se consideró el día 0 después de la alimentación con sangre (*post blood meal*: PBM). Las ninfas del cuarto estadio se colectaron en reactivo TRIzol (Sigma-Aldrich) para la extracción de ARN. Estos individuos se utilizaron para comprobar los niveles de disminución de la expresión mediante qPCR en el día 11 PBM, el día anterior a la ecdisis esperada (Wulff *et al.*, 2018). Una fracción de las ninfas de primer estadio nacidas de los huevos puestos por las hembras inyectadas con ARN_{dc} se alimentó 7 días después de la eclosión. Ese día, las ninfas de primer estadio de diferentes grupos se recogieron en reactivo TRIzol (Sigma-Aldrich) para la extracción de ARN y comprobar los niveles de disminución de la expresión génica mediante qPCR.

En *D. melanogaster* el silenciamiento génico por ARNi se realizó utilizando el mecanismo de modificación de la expresión génica denominado UAS/Gal4, en este caso para interferir el gen de Orcokina. Las líneas utilizadas fueron descritas en el punto 2.1 y el mecanismo durante el punto 1.4.

2.3 Ensayos fisiológicos y conductuales en *D. melanogaster*

2.3.1 Ecdisis

Los insectos de 6 a 10 h después de la formación de la pupa fueron examinados y aquellos que contenían una burbuja en la región media del pupario (etapa tardía p4(i); Bainbridge y Bownes, 1981), fueron colocados con el lado dorsal hacia arriba sobre un portaobjetos a temperatura ambiente (aprox. 22 °C) bajo luz tenue. Las pupas fueron colocadas en una lupa binocular Leica y videogradas hasta que todas ellas realizaron la ecdisis (Fig. 3). Los insectos de los grupos control e interferidos para el gen *dromeok* se registran simultáneamente sobre el mismo portaobjetos. Los videos fueron analizados para observar el comportamiento y registrar los tiempos de inicio y finalización de la pre-ecdisis y de la ecdisis en cada individuo, de acuerdo a comportamientos estereotipados característicos (Lahr *et al.*, 2012).



Figura 3. Disposición de pupas de *D. melanogaster*. Las pupas de diferentes genotipos se ubicaron en portaobjetos por filas. Los videos fueron analizados sin conocer el genotipo colocado en cada fila.

2.3.2 Cortejo, cópula y oviposición

Los ensayos de cortejo se realizaron como se describe en McBride *et al.*, 1999 utilizando cámaras de cortejo estándar en una habitación humidificada mantenida a 22 °C e iluminada con luz tenue. Un macho virgen experimental de 5 días de edad fue aspirado y colocado cuidadosamente dentro de la arena experimental, sin disturbar durante 5 min. para permitir su habituación. Para los ensayos que probaron el cortejo hacia una hembra, se introdujo en la arena una hembra virgen de tipo salvaje (Canton-S: CS) de 5 días de edad. Se grabaron al mismo tiempo dos parejas (en cámaras de cortejo separadas), una experimental y otra control.

Los videos fueron observados, se cuantificaron y evaluaron los diferentes elementos del cortejo: orientación del macho hacia la hembra, seguimiento, golpeteo, extensión de alas, lamido, intento de cópula (flexión del abdomen) y cópula (Ver fig. 4) (Koemans *et al.*, 2017).

Para los ensayos que prueban el cortejo hacia otro macho, se introdujo en la arena un macho virgen decapitado de 5 días de edad junto con el macho evaluado (en estos ensayos se utilizan moscas decapitadas para evitar interferencias del comportamiento de la mosca objetivo, de acuerdo con Iftikhar *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2008). El macho objetivo era una mosca CS de tipo salvaje o era del mismo genotipo que el del macho evaluado. Para los experimentos de preferencia, se introdujo simultáneamente en la arena una pareja decapitada compuesta por un macho y una hembra vírgenes de 5 días de edad con el macho evaluado.

Para todas las pruebas, se calculó un índice de cortejo (IC), que es el porcentaje de tiempo dedicado a cortejar a un sujeto durante una sesión de 10 minutos, o hasta la cópula, lo que ocurra primero. La cópula exitosa se registró como 1 si la cópula ocurrió durante la sesión de 10 minutos y 0 si no fue así.

En el análisis del proceso de oviposición se colocaron 3 hembras vírgenes del genotipo de interés y 4 machos de tipo salvaje (Canton-S) en un vial con alimento estándar. Veinticuatro horas más tarde fueron transferidos a un nuevo vial y desechado el anterior. Las moscas fueron nuevamente transferidas diariamente a un vial con alimento fresco y se contaron los huevos puestos durante cada período de 24 hs durante 4 días consecutivos. Ese vial se mantuvo hasta el día 13, cuando las moscas se transfirieron diariamente a un nuevo vial hasta el día 15 para contar los huevos puestos en este día como punto final del experimento. Se analizaron de 9 a 11 viales independientes por genotipo.

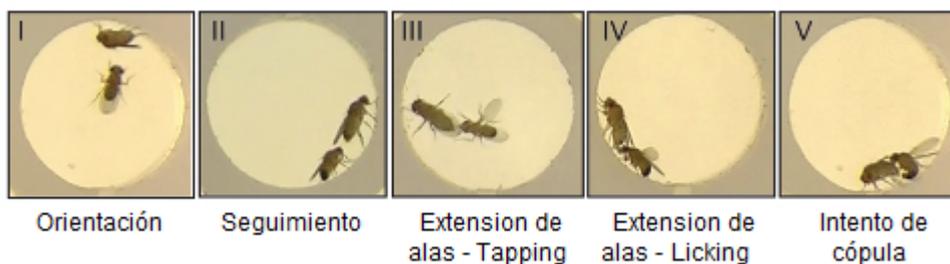


Figura 4. Características del cortejo de *D. melanogaster*. Se evidencian en la cámara de cópula los diferentes puntos (I a V) de la situación de cortejo en *D. melanogaster*. I) El macho se orienta hacia la hembra. II) La persigue en sus movimientos. III) Realiza la extensión de un ala que produce

una vibración, al tiempo que se acerca y toca a la hembra. IV) Con las alas extendidas el macho comienza a “lamer” a la hembra. V) Comienza a intentar copular, puede ser aceptado o rechazado por la hembra. (Figura adaptada de Koemans *et al.*, 2017).

2.4 Ensayos fisiológicos y conductuales en *R. prolixus*

2.4.1 Control de silenciamiento, ecdisis y supervivencia

Ninfas de cuarto estadio de *R. prolixus* tanto control como las interferidas para los genes EH, ETH y CZ fueron separadas y disectadas en diferentes momentos luego de la alimentación (días 4, 6, 8, 10 y 12) con el fin de medir los niveles de ARNm de cada uno en comparación con los insectos interferidos para β -lac.

Hembras adultas de 3 a 5 días fueron inyectadas con dsRNA de cada gen (CZ, EH, ETH, OK, y β -lac), luego alimentadas y copuladas por machos *wild type*. Las ninfas de primer estadio descendientes de cada hembra fueron separadas en 2 grupos, uno sin alimentar para analizar la supervivencia y otro alimentado con sangre de gallina a los 15 días post-eclosión para evaluar la ecdisis y la transferencia vertical del silenciamiento génico.

2.4.2 Cortejo, cópula y oviposición

Hembras vírgenes se separaron el día de su muda, para asegurar que no hayan copulado. Entre 3 y 5 días después se inyectaron con el dsRNA. Las hembras fueron marcadas con diferentes colores para reconocerlas individualmente y colocadas juntas en frascos sin división por tratamiento, a fin de evitar sesgos. Una semana después de las inyecciones los insectos se alimentaron a repleción sobre gallinas. Inmediatamente antes y después de la alimentación los insectos se pesaron en una balanza analítica para calcular el índice de fertilidad de acuerdo con Chiang y Chiang 2016 ($(N^{\circ} \text{ huevos} / (PI * PS)) * 1000$) siendo PI= Peso inicial (mg) PS= Peso en sangre ingerida (mg).

Cada hembra fue colocada con 2 machos vírgenes en frascos de vidrio y se grabó en video durante una hora con luz infrarroja en la oscuridad. Se videograbaron al mismo tiempo una hembra tratada y una hembra control en frascos separados (Fig. 5). Se tuvieron en cuenta los principales comportamientos de

cortejo y cópula (ver detalle en Capítulo 1). Después de los ensayos, las parejas se mantuvieron juntas durante 3 días. Para los ensayos del capítulo 4, de supervivencia y reproducción mediante silenciamiento de CSP, en los que no se realizaron ensayos de cópula, las hembras se mantuvieron directamente 5 días con machos *wild type*. En ambos experimentos, cada hembra fue separada en viales individuales y se contó diariamente el número de huevos puestos por cada una. Los huevos de cada hembra fueron separados en viales y se contó el número de ninfas nacidas (eclosión de los huevos). Al final del experimento se desecharon las hembras que no pusieron huevos, o que pusieron huevos inviables, posiblemente por falta de cópula. El número de estos individuos fue homogéneo entre los grupos experimentales.



Figura 5. Ensayo de cópula en *R. prolixus*. Se dispusieron 2 machos y una hembra en cada frasco. Se grabó en paralelo una hembra tratada y una control. Se realizó el ensayo de forma que haya lugar para realizar todos los movimientos de cortejo y cópula. Se analizaron los videos para encontrar los puntos de cortejo y analizar las cópulas exitosas.

2.5 Histoquímica

El sistema nervioso central (SNC) y el intestino de adultos *ok-GAL4>UAS-mcd8GFP* de *D. melanogaster* se disectaron en PBS frío (solución salina tamponada con fosfato) y se fijaron durante 1 h en paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente. Los tejidos fijados se enjuagaron 3 x 10 min en PBS RT y se montaron en medio Fluoromount-G (SouthernBiotech) sobre cubreobjetos recubiertos de polilisina. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de disco giratorio (Olympus DSU) y se analizaron utilizando ImageJ (Schneider *et al.*, 2012).

2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico y los diseños de gráficos se realizaron utilizando el software Prism 8.0 (GraphPad Software). Se realizaron al menos dos réplicas independientes para cada experimento; los datos de diferentes réplicas se combinaron en un único gráfico para el diseño de las figuras y análisis estadístico. Si los datos se distribuían normalmente y tenían la misma varianza, se analizaron mediante ANOVA de un factor seguido de análisis de comparación múltiple *post-hoc* de Tukey (para comparaciones entre todos los genotipos) o Dunnett (para comparaciones con el control). De lo contrario, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba de Dunn para análisis de comparación múltiple. Las tablas de contingencia se analizaron mediante pruebas de Chi-cuadrado.

Se utilizó la prueba de rangos logarítmicos (Kaplan-Meier) para evaluar las diferencias en la tasa de supervivencia. Se utilizó un ANOVA de dos factores para evaluar las diferencias en las tasas diarias de oviposición, eclosión de huevos y ecdisis. Se realizó una prueba t no pareada para evaluar las diferencias entre los grupos experimental y de control en los niveles relativos de ARNm. Se consideró estadísticamente significativo $p < 0,05$.

2.7 Técnicas bioinformáticas

2.7.1 Identificación de genes y análisis de secuencias

Se realizaron búsquedas BLASTp (con un umbral de valor esperado $< 0,0001$) utilizando los dominios PFAM PF02798 y PF00043 (GST), PF00135 (CCE),

y PF00067 (CYP) como consultas en las bases de datos de proteínas predichas de *C. lectularius* (NCBI número de acceso GCF_000648675.2), *H. halys* (i5k número OGS1.2), *R. prolixus* (NCBI número de acceso GCA_000181055.3), y *N. lugens* (NCBI número de acceso GCA_014356525.1). Los dominios PFAM mencionados se utilizaron como consultas para realizar búsquedas tBLASTn (Altschul *et al.*, 1990) en un transcriptoma no redundante de *N. viridula* (Lavore *et al.*, 2018). Todas las coincidencias positivas con el transcriptoma se curaron manualmente y se analizaron utilizando secuencias homólogas como referencia para reconstruir los transcritos, siempre que se detectaran errores evidentes en la secuenciación, tales como desplazamientos de marco de lectura o ensamblajes erróneos. Se descartaron los transcritos que codificaban proteínas de menos de 100 aminoácidos. La isoforma más larga de cada uno de los genes resultantes de las búsquedas BLASTp y las secuencias obtenidas de las búsquedas tBLASTn se utilizaron como *queries* para realizar nuevas búsquedas en las bases de datos mencionadas. Las búsquedas BLASTp y tBLASTn se realizaron en las proteínas predichas del genoma y en el transcriptoma de *N. viridula*, respectivamente, con un *e-value* < 0,0001. Se descartaron las secuencias de proteínas menores a 100 aminoácidos. Las proteínas predichas obtenidas de los genomas en estudio se analizaron para conservar sólo la isoforma más larga de cada gen para los análisis posteriores. Las coincidencias positivas resultantes de todas las búsquedas se volvieron a analizar en dos pasos secuenciales: una búsqueda InterProScan (Jones *et al.*, 2014) utilizando las aplicaciones Gene3d, PfamA y SuperFamily, y búsquedas BLASTp contra la base de datos no redundante del NCBI. Se descartaron las coincidencias que no pertenecían a las superfamilias de interés (falsos positivos). Las secuencias que codifican CYP, CCE y GST del transcriptoma de *N. viridula* se presentan como Información suplementaria electrónica SE2.1 en Anexo I. Los números de acceso de todas las secuencias utilizadas para el análisis de *N. lugens*, *C. lectularius*, *R. prolixus* y *H. halys* se presentan como Información suplementaria electrónica SE2.2 en el Anexo I.

2.7.2 Búsqueda e identificación de proteínas quimiosensoriales en bases de datos genómicas y transcriptómicas

Se realizaron las búsquedas BLAST (con valor de umbral esperado $p < 0,0001$) correspondientes con el dominio PFAM característico de la familia de

CSP (OS-D:PF03392) como *query* y las proteínas predichas de cada genoma de las especies del análisis: *C. lectularius* (GCA_000648675.3, Clec2v1.0), *H. halys* (i5k versión OGSv1.2), *N. lugens* (NCBI número de acceso GCA_014356525.1), *N. viridula* (NCBI número de acceso GCA_928085145.1), *Orius laevigatus* (NCBI número de acceso GCA_018703685.1, anotación de proteínas en InsectBase) y *R. prolixus* (NCBI número de acceso GCA_000181055.3). Con los resultados obtenidos se realizaron búsquedas iterativas para reconocer secuencias que no respondieron a la búsqueda por dominio. Todos los resultados positivos fueron analizados mediante BLASTp versus la base de datos de insectos para descartar falsos positivos.

Las CSP de *An. gambiae* estaban reportadas previamente (Bieismann *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2006). Para *D. melanogaster* se utilizaron las secuencias reportadas en la literatura (Número de acceso Flybase: CG6642; CG11390; CG9358; CG30172). Además, en la literatura hay reportes de CSP en bases transcriptómicas de algunas de las especies incluidas en nuestros análisis. Dicha información previa fue útil para comparar con nuestras búsquedas y así confirmar, modificar o agregar secuencias a la base de datos (Benoit *et al.*, 2016, Latorre Estivalis *et al.*, 2022, Sun *et al.*, 2020, Wu *et al.*, 2019, Xue *et al.*, 2014).

En el caso de *T. infestans*, su genoma disponible (GCA_011037195.1) no se encuentra anotado, es decir no se han reportado las regiones codificantes para cada gen. Por ello se utilizó una metodología diferente al resto de las especies analizadas, cuyos genomas sí están anotados. Con todas las secuencias de CSP identificadas en las distintas especies bajo análisis, generamos una base de datos en forma de archivo multi-FASTA. Dicha base de datos fue utilizada como *query* para hacer una búsqueda tBLASTn en el genoma de *T. infestans*. La salida del Blast brindó el número de *scaffold* y la coordenada de cada uno de los *hits* dónde potencialmente existe una CSP. Con esta información utilizamos la herramienta Fgenesh+ del software Softberry en línea (www.softberry.com) que permite la predicción de genes utilizando como soporte una proteína similar (Solovyev *et al.*, 2007). Distintas bases de datos transcriptómicas existentes fueron utilizadas para comparar con los modelos hallados con la herramienta (Latorre Estivalis *et al.*, 2022, Martinez-Barnetche *et al.*, 2018, Traverso *et al.*, 2022). Cada una de las secuencias de CSP de *T. infestans* fue analizada y curada manualmente, en base a la

información disponible descripta. Por último, con el *software* Artemis se anotaron todas las CSP encontradas en el genoma de *T. infestans*.

Para cada una de las secuencias resultantes de la búsqueda, curación y reportadas en la literatura se utilizó TOPCONS2 para la predicción de estructuras transmembrana (Tsirigos *et al.*, 2015), Interproscan v85.0 (Blum *et al.*, 2021) para el análisis de los dominios, SignalP 5.0 (Almagro Armenteros *et al.*, 2019) en la identificación del péptido señal. Se realizaron alineamientos de secuencias mediante Clustal Ω (Sievers y Higgins 2014). Se utilizaron las secuencias caracterizadas de *D. melanogaster* y *An. gambiae* para identificar las 4 cisteínas conservadas en la estructura de CSP. Finalmente, se analizó la estructura secundaria y la posible formación de las alfa-hélices características de la familia por PSIPRED (Buchan y Jones 2019).

2.7.3 Análisis filogenético

Los alineamientos de secuencias de proteínas para las familias de proteínas objetivo se generaron con MAFFT (Kato K. *et al.*, 2005) utilizando la opción G-INS-i con la siguiente configuración: "*leave gappy regions*" activo; *Unaligned level* = 0.1; *Offset value* = 0.12; *Maxiterate* = 1000. Los alineamientos se recortaron utilizando trimAl v1.2 (Capella-Gutierrez S. *et al.*, 2009) con los parámetros por defecto excepto el umbral de separación (-gt) que se fijó en 0,3. G-INS-i, más lento pero más preciso que otros métodos. Los alineamientos recortados se utilizaron para construir un árbol filogenético para cada familia basado en el enfoque aproximado de máxima verosimilitud con IQ-tree v 1.6.12 (Nguyen LT. *et al.*, 2015) utilizando los parámetros -B 1000 y -alrt 1000 para combinar la opción *ModelFinder*, la búsqueda de árboles basada en 1000 réplicas, y la estimación del soporte de ramas utilizando el test aproximado de razón de verosimilitud basado en el procedimiento Shimodaira-Hasegawa (aLRT-SH) (Hordijk y Gascuel 2005). Los valores de soporte de rama entre 80 y 100 se marcaron con un círculo a escala. El modelo de sustitución de aminoácidos mejor ajustado estimado por IQ-tree para cada familia de proteínas y elegido según el Criterio Bayesiano de Información (BIC) fue: LG + F + R4 en el clan CYP mitocondrial (Fig. 2.2A), LG + I + G4 para CYP2 (Fig. 2.2B), Q.yeast+R7 para CYP3 (Fig. 2.2C), Q.pfam+F + R6 para CYP4 (Fig. 2.2D), WAG+F + R8 para CCE (Fig. 2.3), LG + R4 para GST (Fig.2.4) y LG+R7 para CSP (Fig. 3.1).

El modelo de sustitución de aminoácidos mejor ajustado para cada familia fue estimado por ModelFinder, integrado en el software IQ-tree. Éste selecciona el mejor modelo entre cientos de opciones utilizando el Criterio de Información Bayesiano (Kalyaanamoorthy S, *et al.*, 2017). Los árboles filogenéticos se enraizaron en grupos externos y se editaron con la herramienta en línea iTol ([https:// itol.embl.de](https://itol.embl.de)). Las secuencias se nombraron de acuerdo con anotaciones previas disponibles para *R. prolixus* (Schama *et al.*, 2016, Traverso *et al.*, 2017), *H. halys* (Sparks *et al.*, 2020), *C. lectularius* (Benoit *et al.*, 2016) y *N. lugens* (Lao *et al.*, 2015). Estas anotaciones, junto con las relaciones filogenéticas observadas en los árboles, también se utilizaron para nombrar las nuevas secuencias encontradas. Para la clasificación de las secuencias en clanes, familias y subfamilias, incluimos *D. melanogaster* como referencia en análisis filogenéticos adicionales, ya que representa un organismo modelo con un genoma bien estudiado. Los árboles se construyeron siguiendo la misma metodología descrita anteriormente, utilizando los siguientes modelos de sustitución: LG + F + R5 (clan CYP mitocondrial, Fig. S2.5A en Anexo I: Material suplementario), LG + I + G4 (clan CYP2, Fig. S2.5B en Anexo I: Material suplementario), Q.yeast+R7 (clan CYP3, Fig. S2.5C en Anexo I: Material suplementario), Q.pfam + F + R8 (clan CYP4, Fig. S2.5D en Anexo I: Material suplementario), WAG+F + R9 (CCE, Fig. S2.6 en Anexo I: Material suplementario) y Q.pfam+R6 (GST, Fig. S2.7 en Anexo I: Material suplementario). Una vez generados los árboles filogenéticos, se realizaron análisis de identidad de secuencias mediante CD-HIT con un umbral de identidad del 30% para confirmar la anotación propuesta. Las secuencias CCE se alinearon con una referencia de *D. melanogaster* (CG17907) utilizando Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2018), y se verificó la presencia de regiones conservadas y residuos específicos a lo largo de las secuencias para confirmar su clasificación (Información suplementaria electrónica SE2.3 en Anexo I: Material suplementario).

2.7.4 Análisis de duplicación y enriquecimiento

Se construyeron tablas de contingencia de 2 por 2 entre dos especies y:

- El número de secuencias que codifican CYP, CCE o GST frente al resto de genes de un genoma determinado.

- El número de secuencias que codifican una determinada superfamilia génica (CYP, CCE o GST) frente a la suma de genes pertenecientes a las otras dos superfamilias en estudio.

- El número de secuencias que codifican enzimas de un determinado clado perteneciente a CYP, CCE o GST frente al resto de secuencias de la misma superfamilia.

Para estimar el número de duplicaciones y pérdidas de genes utilizamos el método de reconciliación del árbol de genes frente al árbol de especies (Swenson *et al.*, 2012). Este método compara los árboles de genes con el árbol de especies e identifica las ganancias y pérdidas génicas que podrían explicar las diferencias entre ambos. De este modo, inspeccionamos manualmente los árboles filogenéticos obtenidos para cada familia de acuerdo con Almeida *et al.*, 2014. Este método puede subestimar el número de eventos, ya que no tiene en cuenta los genes que pueden haber sido ganados y luego se perdieron (no analizamos pseudogenes). Sin embargo, como cada ortogrupo se analiza por separado, los resultados son más precisos que cuando se aplican métodos automatizados. Es importante tener en cuenta que las estimaciones de las ganancias y pérdidas de genes dependen de las anotaciones: anotaciones defectuosas conducirán a una sobreestimación de las pérdidas y a una subestimación de las duplicaciones.

2.7.5 Análisis de clusters

Para el análisis de enzimas detoxificantes del Capítulo 2 se descargaron archivos de formato de características generales (GFF) para *R. prolixus* (GCA_000181055.3_Rhodnius_prolixus-3.0.3.gff) del NCBI; *H. halys* (halhal_OGSv1.2.gff) del i5K; *C. lectularius* (GCF_000648675.2_Clec_2.1_genomic.gff) del NCBI; y *N. lugens* (GCF_014356525.1.gff) del NCBI. Las localizaciones de los genes diana (coordenadas y *scaffolds*) para las cuatro especies se obtuvieron de cada archivo GFF utilizando una lista de ID y la herramienta Seqtk. Dos genes se consideraron en un clúster genómico cuando pertenecían a la misma familia génica y estaban separados por menos de 35.000 pb. Los genomas de *R. prolixus*, *C. lectularius* y *H. halys* están ensamblados a nivel de *scaffolds* (www.vectorbase.org; <http://i5k.github.io/genomes>).

En cuanto al análisis de clusters de las CSP (Capítulo 3), se generó un código a partir del cuál se calcula el promedio de la distancia entre genes en los genomas correspondientes (ver en 3.5.3 e Información suplementaria electrónica SE3.1 en Anexo I: Material suplementario). Se descargaron archivos GFF. Además de los nombrados más arriba se incluyeron *O. laevigatus* (GCA_018703685.1) de InsectBase; *D. melanogaster* (GCA_000001215.4) del NCBI y *A. gambiae* (GCA_943734735.2) del NCBI. Las localizaciones de los genes diana (coordenadas y *scaffolds*) se obtuvieron de cada archivo GFF utilizando una lista de ID y la herramienta Seqtk. Dos genes se consideraron en un clúster genómico cuando pertenecían a la misma familia génica y estaban a menos de la distancia promedio entre genes calculada con el código desarrollado a tal efecto para cada especie (ver Capítulo 3).

Regulación neuroendocrina en procesos clave del ciclo de vida de insectos

1.1 Introducción

1.1.1 Estructura y función de los neuropéptidos

Los neuropéptidos son las moléculas de señalización nerviosa más diversas, funcional y estructuralmente (Scherkenbeck y Zdobinsky 2009). Actúan como mensajeros químicos que regulan procesos fisiológicos tales como el desarrollo, comportamiento, reproducción, respuesta a estímulos, respuesta de estrés, etc. Son producidos en células neurosecretoras del sistema nervioso central, neuronas sensoriales, motoneuronas y/o células secretoras del tracto digestivo (Nassel y Larhammar 2013).

Los neuropéptidos son sintetizados como prepropéptidos en neuronas o células endocrinas y sufren diferentes modificaciones postraduccionales para ejercer su función. El primer paso en la maduración es la liberación del péptido señal por enzimas proteolíticas especializadas (Vaughn *et al.*, 2011). El péptido señal completo suele ser de 20 a 30 aminoácidos; su anclaje en la membrana del retículo endoplasmático determina la localización de los neuropéptidos en vesículas. Dentro de las vesículas ocurre el clivaje proteolítico del propéptido en péptidos cortos de 10 a 40 aminoácidos. A partir del clivaje del propéptido se producen dos tipos de péptidos: por un lado los péptidos biológicamente activos que están conservados estructural y funcionalmente a lo largo de la evolución, y por otro lado péptidos llamados “espaciadores” que no están conservados y cuya función es desconocida y poco estudiada (Wegener y Gorbashov 2008). Finalmente, dentro de las vesículas, los neuropéptidos continúan procesándose mediante modificaciones post-traduccionales que contribuyen a su estabilidad y actividad biológica. Entre ellas, la más común es la amidación del extremo C-terminal, aunque también pueden recibir oxidaciones, acetilaciones y/o formación del piroglutamato en el extremo N terminal (Nassel y Zandawala 2019).

Los neuropéptidos maduros son almacenados en vesículas, desde donde son liberados al espacio extracelular para ejercer su acción biológica sobre receptores específicos presentes en la membrana de la célula blanco (Nassel y Zandawala 2022). Los receptores de neuropéptidos son en su mayoría receptores acoplados a proteína G (GPCR), pero también existen receptores de tipo tirosina kinasa y guanilato ciclasa (Ons *et al.*, 2016). Los GPCR constituyen una de las familias más importantes en cuanto a proteínas de la superficie celular; regulan muchos procesos

fisiológicos y comportamentales de insectos mediante la señalización a través de la membrana (Vogel *et al.*, 2013). La interrelación con los neuropéptidos constituye una red muy compleja, dónde pueden unirse a uno o varios receptores que se asocian a diferentes proteínas G dependiendo el tipo de célula (Altstein y Nassel 2010, Cars *et al.*, 2012).

La proliferación de información genómica ha permitido la identificación de genes precursores de neuropéptidos en grandes bases de datos, antes incluso de que se les haya asignado funciones específicas. A pesar de los avances en genómica que han identificado neuropéptidos y precursores, la función específica de estas moléculas en diversos sistemas neuroendocrinos aún está en gran parte sin caracterizar (Nassel y Zandawala, 2019).

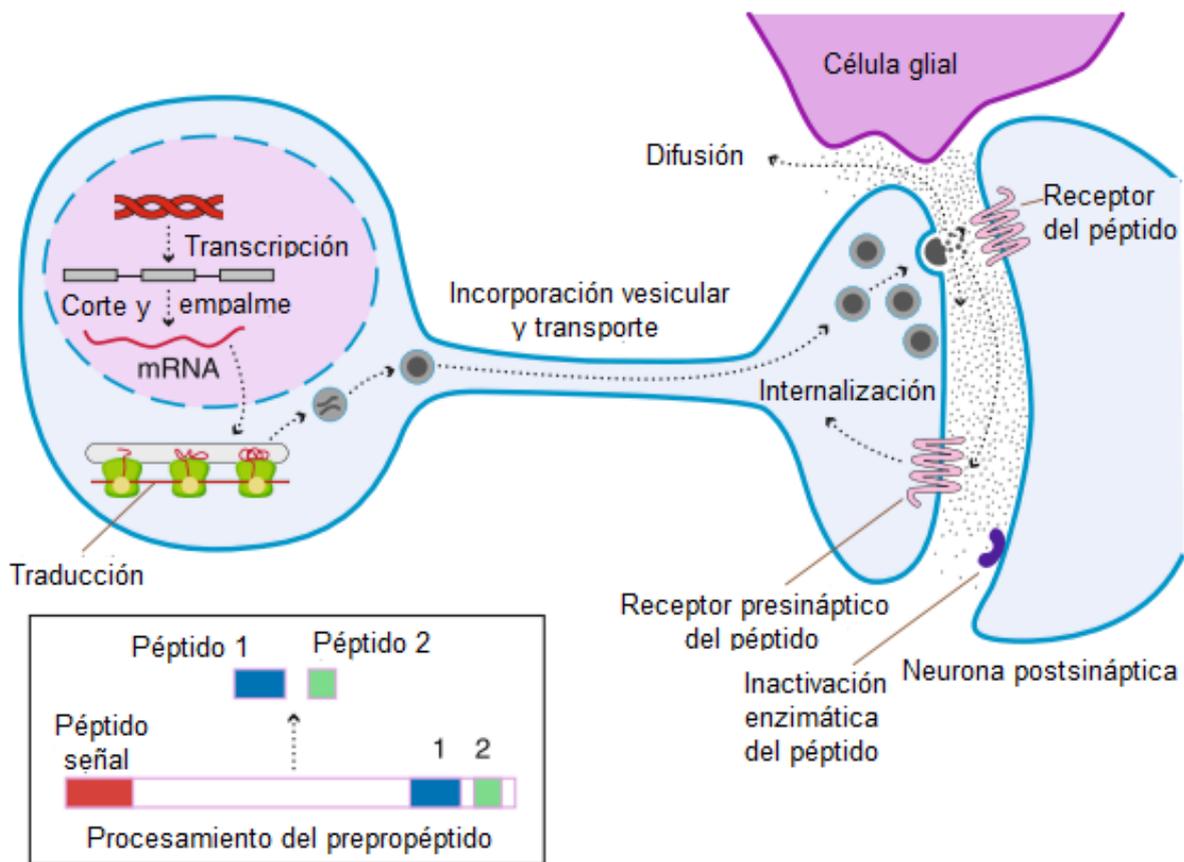


Figura 1.1 Síntesis y maduración de neuropéptidos en neuronas peptidérgicas. Se transcriben los genes, realizando el corte y empalme para dar los ARNm maduros. Luego se realiza la traducción del mensajero con la respectiva traslación del núcleo a los ribosomas. Se produce el prepro péptido precursor, se cliva el péptido señal incorporando el propéptido a las vesículas y se escinden los péptidos bioactivos y espaciadores. Se transportan por la neurona hacia la terminal del axón los péptidos maduros en vesículas para ser liberados en respuesta al estímulo, generando la recepción postsináptica. La terminación de la señal es dada por receptores presinápticos en primer lugar, o por

inactivación enzimática o difusión lejos de los receptores postsinápticos (figura adaptada de Nassel y Larhammar 2013).

1.1.2 Regulación neuroendocrina de la ecdisis y su relación con la reproducción

Los insectos han desplegado una adaptabilidad asombrosa a diversos nichos ecológicos, lo que los ha convertido en una de las formas de vida predominantes en la tierra (Chown y Nicolson, 2004). Esta flexibilidad proviene de sus distintivas estrategias de desarrollo post-embrionario, fisiología y reproducción. Aunque el exoesqueleto es muy eficaz para contrarrestar la desecación y daños físicos, impone restricciones al desarrollo post-embrionario, donde la ecdisis juega un papel central (Zitnan y Adams, 2012).

Durante su evolución los insectos han desplegado distintas formas de metamorfosis, que se clasificaron en ametábolos (las más ancestrales), hemimetábolos y holometábolos (las más derivadas) (ver Introducción General). A pesar de la enorme relevancia de los hemimetábolos, entre los que se encuentran plagas agrícolas y sus enemigos naturales así como vectores de agentes patógenos, el proceso de ecdisis está muy poco estudiado en estas especies. Dada la diferencia en el desarrollo post-embrionario entre hemi y holometábolos, la regulación endocrina de este proceso podría tener componentes similares, pero también podría diferir significativamente. Hasta la fecha, existen pocos trabajos que se ocupen del estudio de la regulación neuroendocrina en Hemimetabola (Sterkel y Volonté *et al.*, 2022, Lenaerts *et al.*, 2017, Wulff *et al.*, 2017, 2018, Verbakel *et al.*, 2021, Zhao *et al.*, 2021).

En holometábolos, los principales neuropéptidos que componen la red reguladora de la ecdisis son corazonina (CZ: *Corazonin*), hormona de la eclosión (EH: *Eclosion hormone*), hormona desencadenante de la ecdisis (ETH: *Ecdysis triggering hormone*) y péptidos cardioactivos de crustáceos (CCAP: *Crustacean cardioactive peptide*) (Zitnan y Adams, 2012). El modelo aceptado sugiere que un pico de ecdisona estimula las células Inka para transcribir y traducir los neuropéptidos ETH, que serán secretados hacia la hemolinfa cuando disminuyen los niveles de ecdisona. Como respuesta, se activan las neuronas que liberan neuropéptidos para desencadenar la secuencia comportamental de la pre-ecdisis. Hacia el final de este proceso, ETH actúa sobre las neuronas liberadoras de EH

promoviendo la cascada de liberación peptídica que da como resultado la ecdisis y post-ecdisis (Kim *et al.*, 2004; Truman *et al.*, 2005, White y Ewer, 2014, Zitnan *et al.*, 1999).

Nuestro grupo de trabajo ha presentado resultados relativos a la regulación de la ecdisis en Hemimetabola, utilizando como modelo a *R. prolixus*. Identificamos por primera vez a un nuevo componente de la red reguladora de la ecdisis; el neuropéptido Orcokinina (OK: *Orcokinin*) (Wulff *et al.*, 2017, 2018). Encontramos que OK es clave en la regulación de la ecdisis en *R. prolixus*; los insectos que expresan niveles bajos de este neuropéptido no son capaces de realizar los comportamientos estereotipados que llevan a la ecdisis exitosa, y mueren en el día en que esta debería ocurrir. Sin embargo, pudimos comprobar que los procesos de formación de nueva cutícula ocurren normalmente, con lo que se encuentra afectado el comportamiento innato de ecdisis, que es la etapa final de la muda (Wulff *et al.*, 2018).

En la mayoría de los insectos, OK se presenta en 3 isoformas llamadas OKA, OKB y OKC, aunque los últimos dos son casi idénticos a nivel de secuencia (Wulff *et al.*, 2017). En todas las especies donde se ha estudiado, OKA se expresa exclusivamente en el sistema nervioso central (SNC), mientras que OKB está presente tanto en el SNC como en el intestino, lo que lo convierte en un “*brain-gut peptide*”, sugiriendo probables funciones en la alimentación y/o diuresis. En *R. prolixus*, los péptidos derivados de OKA son esenciales para una ecdisis exitosa mientras que los de OKB parecen ser menos críticos (Wulff *et al.*, 2017). A su vez, RhoprOKA parece reprimir la expresión de RhoprCZ y RhoprEH de forma directa o indirecta, y estimular la expresión de RhoprETH y RhoprCCAP durante el pico de ecdisona, lo cual indica un papel regulador de la expresión de otros componentes de la red regulatoria (Wulff *et al.*, 2018).

En distintas especies de insectos se ha observado que la expresión de genes reguladores de la ecdisis persiste a niveles altos en la etapa adulta, en la cual los individuos ya no mudan ni sufren ecdisis (Meiselman *et al.*, 2017, Park *et al.*, 2002, Yamanaka *et al.*, 2008). Se ha sugerido que, durante la etapa adulta, los neuropéptidos reguladores de la ecdisis están involucrados en la regulación de procesos reproductivos. De hecho, se ha observado en *D. melanogaster* que ETH es un regulador del desarrollo ovárico, ya que no sólo disminuye la oviposición de hembras que expresan bajos niveles del transcripto, sino que también se reduce el

tamaño de ovarios en hembras en las que se suprime su expresión en la *corpora allata*, o se eliminan las células Inka encargadas de su producción (Meiselman *et al.*, 2017). Todos los fenotipos fueron recuperados cuando se topicó con Metopreno, un análogo de la hormona juvenil (JH: *Juvenile hormone*). Por otro lado el comportamiento de cortejo en machos de *D. melanogaster* también se ve afectado cuando se disminuye la expresión de ETH, ya que su señalización es esencial para obtener niveles normales de JH, responsable de muchos de los procesos reproductivos (Deshpande *et al.*, 2023, Meiselman *et al.*, 2022, Zhang *et al.*, 2022). El primer cambio en cuanto al cortejo se relaciona con la memoria a largo plazo y a corto plazo (LTM: *Long term memory* y STM: *Short term memory*), esto es la supresión de nuevos intentos de cortejo al poco tiempo de haber obtenido un rechazo y en tiempos más largos (Ejima *et al.*, 2007, Lee y Adams 2021). También se reportó recientemente la importancia de ETH en la regulación mediante JH de los comportamientos inhibitorios de cortejo luego de la cópula (PCCI: *Post-copulation courtship inhibition*), así como en la regulación del cortejo entre machos (Meiselman *et al.*, 2022). La regulación de la ecdisis por neuropéptidos en hemimetábolos, y su papel en procesos reproductivos en la etapa adulta son temas poco o nada abordados por la neuroendocrinología de insectos, a pesar de su relevancia para el conocimiento en ciencia de insectos y la posible aplicabilidad en el control de plagas.

Los comportamientos de ecdisis y cortejo en insectos tienen en común ser comportamientos innatos, altamente estereotipados. En *D. melanogaster*, el cortejo se realiza en diferentes pasos sincronizados (ver Introducción General).

En *R. prolixus* el comportamiento de cortejo comienza con la posición de vigilancia, dónde el macho permanece inmóvil con las antenas dispuestas hacia la hembra, siguiendo sus movimientos. Luego realiza un acercamiento a la hembra y puede saltar encima o montar con sus patas en la región dorsal. El macho realiza algunas veces rotación sobre la hembra, o bien se coloca hacia la región dorsolateral de esta, con su cabeza apuntando en el mismo sentido y disponiendo su abdomen lateralmente, sosteniéndose con todas sus patas a la hembra para comenzar la cópula. Si la hembra no realiza comportamiento de rechazo, en ese momento el macho dispone el *aedeagus* (o edeago) dentro de la hembra contactando su genitalia, y comienza movimientos de martilleo (pequeños golpes con su primer par de patas en la región dorsal de la hembra) y abdominales

laterales. Luego de la cópula se genera la sujeción, es decir que permanece sobre ella durante unos minutos (De Simone *et al.*, 2022, Manrique y Lazzari 1994, Pontes *et al.*, 2008, Tellez-Garcia *et al.*, 2019, Vitta y Lorenzo 2009).

1.1.3 Orcokininas en insectos

Con anterioridad al uso de espectrometría de masas, la identificación y caracterización funcional de neuropéptidos en artrópodos se realizó mediante purificación por HPLC, a partir de extractos obtenidos de sistemas nerviosos diseccionados a partir de miles de individuos (Janssen *et al.*, 1996). Las fracciones de HPLC eran acopladas a bioensayos de contracción de tejidos; las fracciones positivas eran subsiguientemente analizadas para estudiar su contenido de péptidos bioactivos (Orchard y Lee *et al.*, 2011, Veenstra, 1989). En las últimas dos décadas, con el desarrollo de técnicas de secuenciación masiva y espectrometría de masas de macromoléculas, la neuroendocrinología de insectos experimentó una aceleración en las capacidades de identificación de neuropéptidos, tanto en especies modelo como no-modelo (Ons 2017). De esta manera, han podido identificarse numerosos neuropéptidos para los cuales su función permanece totalmente desconocida. Entre aquellos muy poco estudiados se encuentran las OK, que deben su nombre al crustáceo *Orconectes limosus* en el que fueron descritas por primera vez (Stangier *et al.*, 1992), mostrando una actividad miotrópica en ensayos iniciales (Bungart *et al.*, 1994 y 1995, Dircksen *et al.*, 2000). En insectos, las OK fueron identificadas por primera vez en 2004 (Pascual *et al.*, 2004) en la cucaracha *Blattella germanica*; al igual que en crustáceos, inicialmente solo fue identificada la isoforma A (OKA). En el año 2012 nuestro grupo identificó por primera vez la isoforma B que se origina por *splicing* alternativo del gen (Sterkel *et al.*, 2012) y codifica para una familia nueva de neuropéptidos en insectos, teniendo en cuenta la diferencia de secuencia respecto a los péptidos codificados en OKA. La presencia de ambas isoformas fue confirmada en todos los genomas de insectos estudiados hasta la fecha. Como se comenta más arriba, la expresión de OKA y OKB es tejido-específica, sugiriendo funciones diferentes (Chen *et al.*, 2015, Hofer *et al.*, 2005, Jiang *et al.*, 2015, Ons *et al.*, 2011, 2015, Veenstra y Ida 2014, Yamanaka *et al.*, 2011). Por otro lado, nuestro grupo ha demostrado la expresión de ambas isoformas en ovarios (Ons *et al.*, 2015, Wulff *et al.*, 2017) y el efecto miotrópico en

R. prolixus como estimulador de la aorta (Wulff *et al.*, 2018). En cuanto a insectos holometábolos, no sólo se demostró la expresión de OKA a nivel de SNC sino también de OKB en intestino de *Tribolium castaneum*, *Bombyx mori* y *D. melanogaster* (Chen *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2015, Veenstra y Ida 2014, Yamanaka *et al.*, 2011).

A pesar de ser una familia de neuropéptidos conservada en artrópodos y particularmente en insectos, una búsqueda exhaustiva en la literatura (febrero de 2024) sólo reporta un número reducido de trabajos relativos a la función del sistema OK. Hofer y Bomberg (2006) indicaron un posible rol de OKA en la regulación de ritmos circadianos en la cucaracha *Leucophaea maderae*. Una inyección local de un péptido derivado de OKA en *O. limosus* evidenció una desregulación del ritmo circadiano con respecto a la actividad locomotora. Por otro lado, *T. castaneum* realiza un comportamiento innato de escape que se conoce como muerte fingida, el cual se vió alterado en insectos que expresaban niveles bajos de OKA o de OKB (Jiang *et al.*, 2015). A partir de estudios *in vitro* en el gusano de seda (*B. mori*) se encontró que un péptido de la familia OKA generó un aumento en la síntesis y liberación de ecdisteroides (Yamanaka *et al.*, 2011). Más recientemente, se demostró que en *B. mori* OK es el principal regulador de la inhibición de la pigmentación cuticular mediante un péptido maduro codificado en el precursor OKA (Wang *et al.*, 2019). Además OKB juega un papel fundamental en la vitelogénesis y el control del crecimiento de los ovocitos de la cucaracha *B. germánica* (Ons *et al.*, 2015). Por fuera de los artrópodos, se demostró en *Caenorhabditis elegans* que los péptidos OK son necesarios y suficientes para el comportamiento inactivo durante el sueño programado para el desarrollo (DTS) y el sueño inducido por estrés (SIS) (Honer *et al.*, 2020). Finalmente, el neuropéptido inicialmente llamado FLG-amida en el molusco *Sepia officinalis* se renombró So-OKB por sus similitudes tanto en secuencia como en localización, así como por su función en la reproducción, ya que está implicado en la regulación de la vitelogénesis y procesos relacionados con la oviposición (Endress *et al.*, 2022).

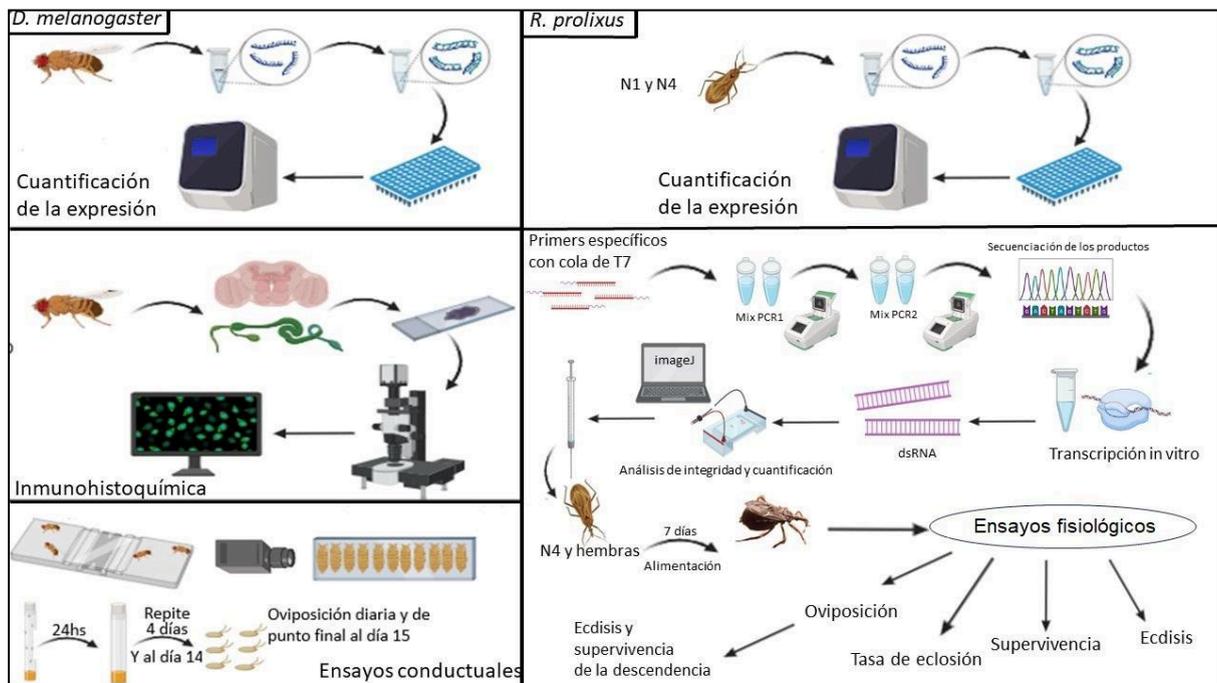
1.2 Hipótesis

- El papel de los neuropéptidos que regulan la ecdisis en Holometabola está conservado en Hemimetabola.
- Los neuropéptidos que regulan la ecdisis se mantienen durante la etapa adulta implicados en la regulación de la reproducción en *R. prolixus*.
- Los neuropéptidos Orcokina regulan comportamientos innatos estereotipados en pupas y/o adultos de *D. melanogaster*.

1.3 Objetivos

- Comprobar si la función de los neuropéptidos que regulan la ecdisis en insectos holometábolos (CZ, CCAP, EH y ETH) se encuentra conservada en *R. prolixus*.
- Evaluar si los neuropéptidos CZ, CCAP, EH, OK y ETH tienen un papel en la aptitud reproductiva de *R. prolixus*.
- Estudiar el papel del neuropéptido Orcokina en los comportamientos de ecdisis y cortejo de *D. melanogaster*.

1.4 Resumen de la metodología utilizada



1.5 Resultados

1.5.1 Neuropéptidos en la ecdisis de *R. prolixus*

En ninfas de cuarto estadio de *R. prolixus*, la ecdisis ocurre regularmente el día 12 post ingesta (Wulff *et al.*, 2017); hacia la mitad de este período, entre los días 4 y 6 post ingesta, tiene lugar el pico de ecdisona en hemolinfa (Wulff *et al.*, 2017). Para correlacionar estos momentos del ciclo con la expresión de genes precursores de neuropéptidos que conforman la red reguladora de la ecdisis en holometábolos, estudiamos los niveles de expresión de *RhoprCZ*, *RhoprETH* y *RhoprEH* a los 4, 6, 8, 10 y 12 días post ingesta en cuerpo completo de ninfas de cuarto estadio. Mientras que la expresión de todos los genes fue detectable en cada uno de los tiempos, hubo un aumento significativo de la expresión de todos ellos el día 12 post ingesta, justo antes de la ecdisis esperada (n = 7) (Fig. 1.2). Además, los niveles de ARNm de ETH y EH también aumentaron el día 10 pbm (n=5) y ligeramente el día 6 pbm (n=5), coincidiendo con el pico de ecdisona en la hemolinfa (Wulff *et al.*, 2017). El aumento en los niveles de ARNm el día 6 fue más evidente para el precursor de ETH. Este neuropéptido presentó niveles de ARNm más altos que CZ y EH en todos los momentos evaluados.

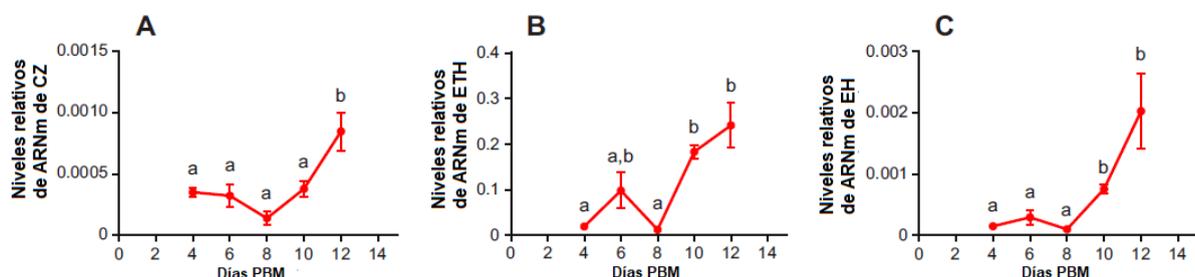


Figura 1.2. Niveles de ARNm de corazonina (CZ), hormona desencadenante de ecdisis (ETH) y hormona de eclosión (EH) en ninfas de *R. prolixus* de cuarto estadio durante el ciclo de muda. (A) niveles de ARNm evaluados por qPCR de CZ, (B) ETH y (C) EH; El factor de elongación 1 (EF-1) y tubulina (Tub) se utilizaron como genes *housekeeping*. Los datos de dos experimentos independientes se combinaron en un solo gráfico y se representaron como la media \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA unidireccional: $p < 0,05$; $n=5$ el día 4, 6, 8 y 10 pbm y $n=7$ el día 12 pbm).

Se exploró el papel de estos neuropéptidos en la ecdisis mediante el silenciamiento de genes mediado por ARNi. En comparación con los controles, los tratamientos con dsRNA redujeron significativamente los niveles de transcripción de

ETH (96,44%, $p < 0,01$, $n = 10$), CZ (86,44%, $p < 0,0001$, $n = 6$) y EH (69,12%, $p < 0,05$, $n = 6$) en ninfas del cuarto estadio (Fig. 1.3). Ninguno de los grupos experimentales mostró diferencias fenotípicas con los controles hasta el período de ecdisis esperado (Fig. 1.4). En ese momento (día 14 ± 4 pbm), la mayoría de los insectos pertenecientes al grupo control ($n = 45$) mudaron al quinto estadio, al igual que los insectos inyectados con dsCZ ($n = 14$) y dsEH ($n = 25$) (Fig. 1.4A). Sin embargo, los insectos tratados con dsETH no mudaron ($P < 0,0001$, $n = 61$). En cambio, en el momento esperado de la ecdisis, detuvieron cualquier movimiento y murieron entre 1 y 2 días después (Fig. 1.4A, B). Aunque los individuos silenciados para ETH no se despojaron de la cutícula del cuarto estadio, presentaron la cutícula del quinto estadio endurecida y oscurecida, como se revela al retirar suavemente la cutícula superior con pinzas entomológicas (Fig. 1.5).

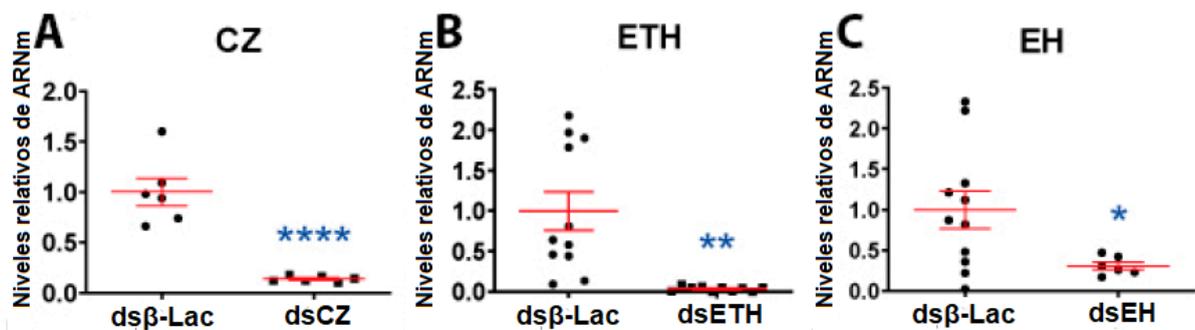


Figura 1.3. Eficiencia del silenciamiento génico en ninfas de cuarto estadio 11 días después de la alimentación. A) CZ. B) ETH. C) EH. Los datos de múltiples experimentos independientes fueron combinados en un solo gráfico. Se utilizó factor de elongación 1 (EF-1) y tubulina (Tub) como genes *housekeeping*. Todos los valores $2e^{-\Delta CT}$ se dividieron por el promedio del $2e^{-\Delta CT}$ del grupo control. Prueba de t no pareada= * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. **** $p < 0,0001$.

Dado que el fenotipo observado durante el tratamiento con dsETH fue similar al observado con el silenciamiento de OKA en un trabajo previo de nuestro grupo (Wulff *et al.*, 2017), medimos los niveles de ARNm de OKA en insectos control y tratados con dsETH el día 11 pbm. Observamos una reducción significativa en el nivel de ARNm de OKA en insectos que expresaban bajos niveles de ETH (Fig. 1.4C; $p = 0,001$, $n = 11$). El experimento fue replicado con un fragmento de ARNdc que abarcó una región distinta del transcripto de *RhoprETH*, a fin de descartar efectos “*off target*”, es decir, inespecíficos por la acción sobre otro gen. Los

resultados obtenidos fueron similares tanto en letalidad como en fenotipo durante la ecdisis y en la regulación negativa del transcrito OKA.

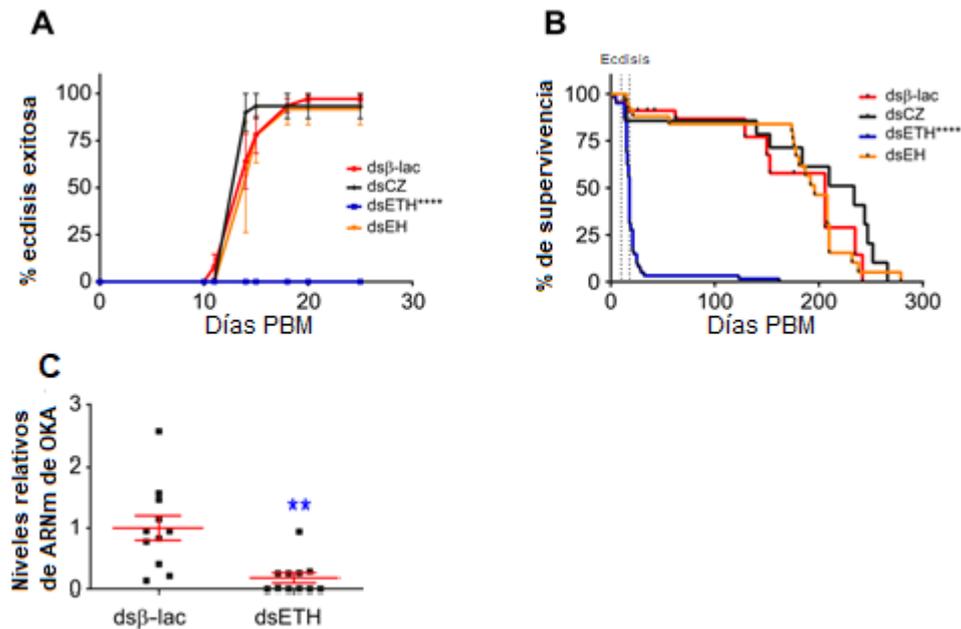


Figura 1.4. Efectos en ninfas de *R. prolixus* de cuarto estadio después del tratamiento con dsβ-lac (n = 45), dsCZ (n = 14), dsETH (n = 61) y dsEH (n = 25). (A) Porcentaje de ecdisis exitosa en diferentes días PBM. ANOVA de dos factores. **(B)** Supervivencia de ninfas de cuarto/quinto estadio. Los datos se muestran como curvas de Kaplan-Meier (prueba de rango logarítmico). Las líneas verticales punteadas indican el período en el que se produjo la ecdisis en los controles. **(C)** Niveles de ARNm de Orcokina A (OKA) en ninfas de cuarto estadio control y tratadas con dsETH 11 días pbm evaluados mediante qPCR; El factor de elongación 1 (EF-1) y la tubulina (Tub) se utilizaron como genes *housekeeping* (n = 11). Todos los valores de $2e^{-\Delta CT}$ se dividieron por el promedio de los valores de $2e^{-\Delta CT}$ en el grupo control. Los datos de 3, 4 o 5 experimentos independientes se combinaron en un solo gráfico para dsCZ, dsEH y dsETH, respectivamente, y se representaron como la media \pm SEM. Se realizó una prueba-t no pareada para evaluar las diferencias entre los grupos experimental y de control en los niveles relativos de ARNm. **p=0,001, ****p<0,0001.

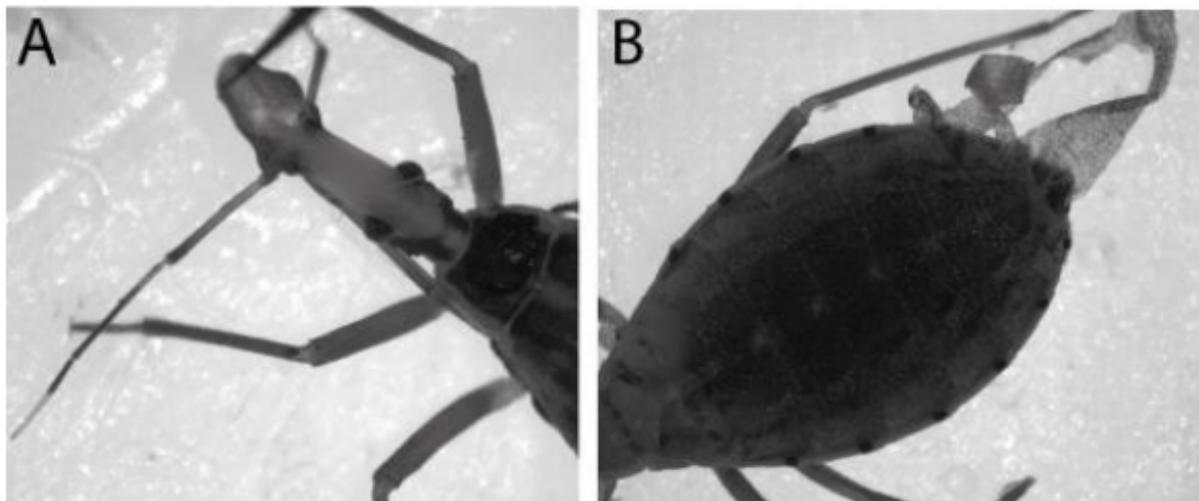


Figura 1.5. Fenotipo observado en ninfas del cuarto estadio silenciadas para ETH. Los individuos no se desprendieron de la cutícula del cuarto estadio pero presentaron la cutícula del quinto estadio endurecida y pigmentada, como se revela al retirar suavemente la cutícula superior con pinzas entomológicas.

1.5.2 *Neuropéptidos en la reproducción de R. prolixus*

Evaluamos el papel de los neuropéptidos ETH, CZ, EH, CCAP, OKA en la aptitud reproductiva de *R. prolixus* mediante el silenciamiento de genes mediado por ARNi. La supervivencia de las hembras no se vio afectada en los grupos dsETH (n=25), dsCZ (n=13), dsCCAP (n=17) o dsOKA (n=7); Se observó un aumento pequeño pero significativo en la supervivencia (resistencia a la inanición, $P = 0,044$, $n = 15$) en las hembras inyectadas con dsEH en comparación con el grupo control ($n = 26$) (Fig. 1.6A, B). La producción de huevos no se vió afectada en ningún grupo experimental (Fig. 1.6C, D); sin embargo, la eclosión de huevos se redujo drásticamente en los animales tratados con dsETH ($P < 0,0001$, $n = 25$; Fig. 1.6E, F). Abrimos cuidadosamente varios de los huevos no eclosionados puestos por hembras inyectadas con dsETH para evaluar si estaban embrionados o mostraban posibles defectos en el desarrollo de los embriones. Los huevos se abrieron el día 12 después de su puesta (el día en que eclosionaron las ninfas del control). Observamos proninfas completamente formadas sin ningún defecto evidente en el desarrollo (Fig. 1.7), lo que indica que la falla en la eclosión de los huevos no se debió a problemas en la fertilización o el desarrollo embrionario. Se descartaron

efectos *off target* inyectando ARNdc que cubría diferentes regiones del ARNm de ETH, logrando fenotipos idénticos.

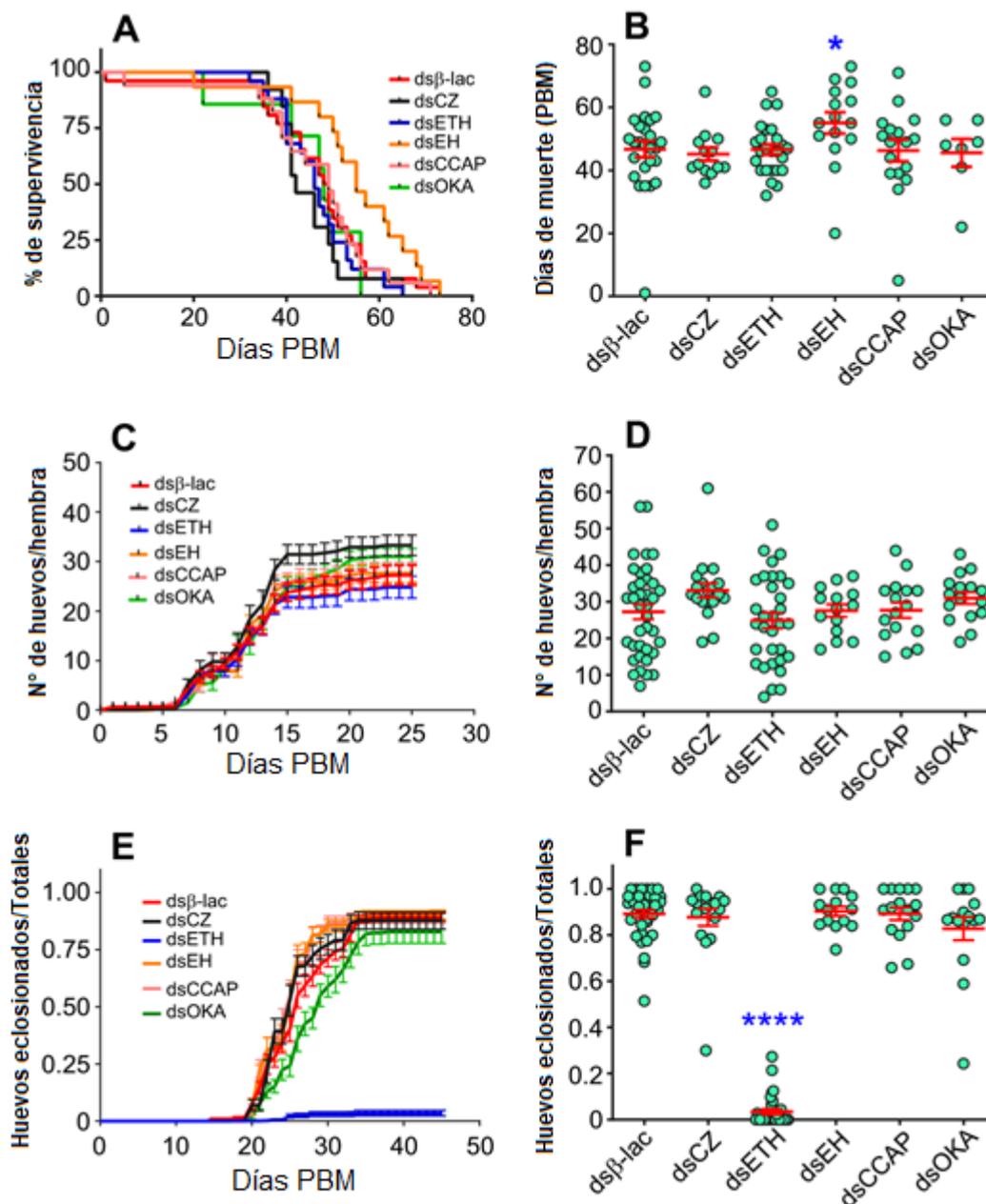


Figura 1.6. Efectos de la caída en la expresión de CZ, ETH, EH, CCAP y OKA en hembras adultas de *R. prolixus*. (A) Curvas de Kaplan-Meier (prueba de rango logarítmico) de supervivencia después del tratamiento con dsβ-lac, dsCZ, dsETH, dsEH, dsCCAP y dsOKA. (B) Día de la muerte (pbm) para hembras inyectadas con diferentes ARNdc. (C) Número acumulado de huevos puestos diariamente por hembras de *R. prolixus*. Se utilizó un ANOVA de dos factores para evaluar las diferencias. (D) Número total de huevos puestos por hembras de *R. prolixus* a los 25 días pbm. (E) Proporción de huevos eclosionados. Se utilizó un ANOVA de dos factores para evaluar las

diferencias. (F) Proporción de huevos eclosionados a los 45 días pbm. Los datos se representan como la media \pm SEM. *P=0,044, ****P<0,0001.

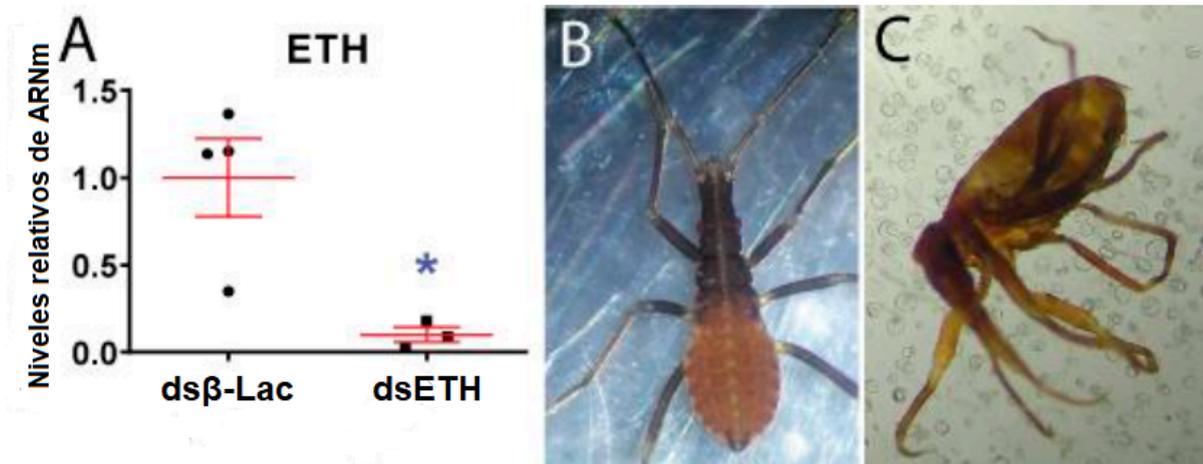


Figura 1.7. Efectos del silenciamiento de ETH sobre la oviposición. (A) Eficiencia del silenciamiento génico en hembras inyectadas con dsETH. Tubulina (Tub) se utilizó como *housekeeping*. Todos los valores $2e^{-\Delta CT}$ se dividieron por el promedio del $2e^{-\Delta CT}$ del grupo de control. Se realizó una prueba-t no pareada para evaluar las diferencias entre el grupo control y tratado. *p<0,05. Los datos se muestran como media \pm SEM. (B) Fenotipo de una ninfa eclosionada de un huevo puesto por una hembra inyectada con dsβ-lac. (C) Fenotipo de un ninfa que no logró salir del huevo puesto por una hembra inyectada con dsETH.

1.5.3 Neuropéptidos en la descendencia de *R. prolixus*

Las determinaciones de qPCR revelaron niveles reducidos de ARNm objetivo en las ninfas del primer estadio nacidas de hembras tratadas con dsCZ (87,9%), dsEH (46,5%), dsCCAP (97,6%) y dsOKA (80%) (Fig. 1.8), lo que demostró un efecto materno de las inyecciones de dsRNA para todos los genes estudiados.

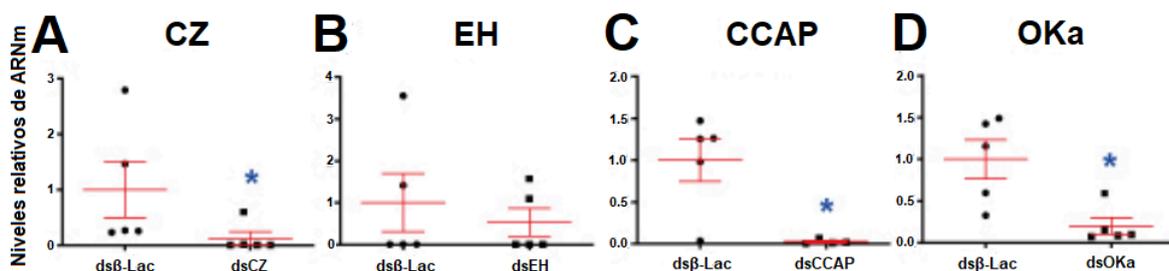


Figura 1.8. Eficiencia del silenciamiento génico en ninfas de primer estadio nacidas de huevos puestos por hembras inyectadas con ARNdc. (A) CZ (B) EH (C) CCAP (D) OKa. Los datos de múltiples experimentos independientes se combinaron en un solo gráfico. La tubulina (Tub) se utilizó como gen *housekeeping*. Todos los valores de $2e^{-\Delta CT}$ fueron divididos por el promedio de los valores de $2e^{-\Delta CT}$ del grupo de control. Se realizó una prueba-t no pareada para evaluar las

diferencias entre el grupo control y los experimentales. * $p < 0,05$. Los datos se muestran como media \pm SEM.

Las ninfas de primer estadio fueron alimentadas, y se evaluaron los efectos sobre la supervivencia y la ecdisis. A diferencia de las ninfas del cuarto estadio, el 83% de las ninfas del primer estadio silenciadas para la expresión de EH murió durante el período de ecdisis esperado, sin realizar la muda ($n=58$, $p < 0,0001$). Se observaron resultados similares para ninfas silenciadas con dsOKA (88,9% de mortalidad, $n=18$; $p < 0,0001$) y ninfas silenciadas con dsCCAP (86,8% de mortalidad, $n=38$, $p < 0,0001$; Fig. 1.9A, B). Como se observó en las ninfas del cuarto estadio, la mayoría de las ninfas del primer estadio silenciadas para el control ($n=55$) y CZ mudaron normalmente al segundo estadio (94,9% y 89,4% respectivamente), aunque la supervivencia del último grupo se redujo ($n=38$, $p=0,0077$; Fig. 1.9A,B). Las ninfas no alimentadas (que no inician el proceso de muda) no mostraron diferencias en las tasas de supervivencia entre los diferentes grupos experimentales (Fig. 1.9C), con la única excepción de las ninfas silenciadas para EH ($n=145$), que presentaron una supervivencia reducida en comparación con los controles ($n=252$, $p=0,0003$). Los resultados en conjunto indican que la reducción en la supervivencia se debió a fallas durante la ecdisis en las ninfas alimentadas con sangre, ya que cuando no fueron alimentadas no hubo defectos aparentes en el desarrollo. No fue posible registrar la tasa de muda para el grupo dsETH dada la tasa casi nula de eclosión de huevos.

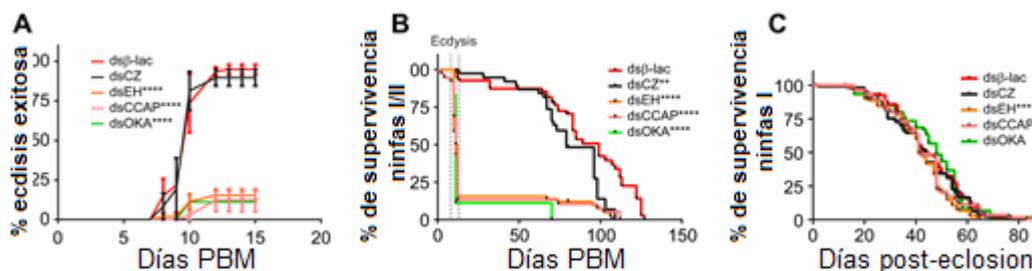


Figura 1.9. Efectos de la baja en la expresión de CZ, EH, CCAP y OKA en hembras sobre la descendencia. (A) Porcentaje de ecdisis exitosa en ninfas de primer estadio alimentadas en diferentes días pbm (media \pm SEM) ANOVA de dos factores. **(B)** Supervivencia de ninfas de primer/segundo estadio alimentadas. Los datos se muestran como curvas de Kaplan-Meier (prueba de rango logarítmico; $n=55$ para dsβ-lac, $n=38$ para dsCZ, $n=38$ para dsCCAP, $n=18$ para dsOKA y $n=25$ para dsEH). Las líneas verticales punteadas indican el período en el que se produjo la ecdisis

en los controles. **(C)** Supervivencia de ninfas de primer estadio no alimentadas. Los datos se muestran como curvas de Kaplan-Meier (prueba de rango logarítmico; n=252 para ds β -lac, n=203 para dsCZ, n=163 para dsCCAP, n=53 para dsOKA y n=145 para dsEH). **p=0,0077, ***p=0,0003, ****p<0,0001.

1.5.4 Estudios funcionales sobre el papel de orcoquinina en ecdisis y reproducción en *D. melanogaster*

Orcokinina es uno de los neuropéptidos menos estudiados en insectos. Hasta nuestro trabajo, no había sido estudiada su función en el insecto modelo *D. melanogaster*. Debido a la falta de información en cuanto al grado de silenciamiento efectuada por las diferentes líneas ok-RNAi utilizadas aquí, se midieron los niveles de transcripción de OK causados por la expresión de los transgenes UAS-OK RNAi utilizados, denominados aquí RNAi-A1 y RNAi-A2 (ambos dirigidos a la isoforma OKA) y RNAi-A+B (que apunta a todas las isoformas conocidas del gen). Para ello, utilizamos dos controladores ok-Gal4 diferentes, denominados aquí ok1-GAL4 y ok2-GAL4. Tanto UAS-RNAi-A1 como UAS-RNAi-A2 causaron una reducción cercana al 95% en los niveles de la transcripción OKA (Fig. 1.10A) cuando se utilizaron cualquiera de los controladores GAL4. Estos transgenes provocaron una reducción de alrededor del 40% en los niveles de la transcripción de OKB utilizando el controlador ok1-GAL4; sin embargo, no se observó una caída estadísticamente significativa usando ok2-GAL4 (Fig. 1.10B). Sorprendentemente, UAS-RNAi-A+B no provocó cambios apreciables en los niveles del transcripto OKA (ya que la diferencia en cuanto al control es de una expresión superior cuando usamos ok2-GAL4 como controlador, y ninguna cuando usamos ok1-GAL4; Fig. 1.10A) pero sí provocó una reducción estadísticamente significativa en los niveles de los transcritos OKB utilizando el controlador ok1-GAL4 (Fig. 1.10B). Incluimos aquí los resultados obtenidos utilizando el transgén UAS-RNAi-A+B porque en el caso del cortejo y oviposición provocó los mismos cambios que los observados utilizando las construcciones UAS-RNAi-A1 y UAS-RNAi-A2 (ver más abajo).

Examinamos el patrón de expresión regulado por los controladores ok1-GAL4 y ok2-GAL4 en el SNC adulto utilizando un indicador de proteína fluorescente verde (GFP) (Fig. 1.11). Detectamos expresión OK en grandes neuronas bilaterales que se proyectan ampliamente por todo el protocerebro (llamadas neuronas orcoA-PLP por Chen *et al.*, 2015), así como en cuatro neuronas accesorias de la médula (llamadas

orcoA-AME neuronas por Chen *et al.*, 2015). En el sistema nervioso ventral (SNV) de un adulto, tanto ok1-GAL4 como ok2-GAL4 dirigieron la expresión de GFP en cinco cuerpos celulares (mientras que Chen *et al.*, 2015 informaron dos pares de neuronas que expresaban OKA, pero en una ubicación similar). Finalmente, los controladores ok1-GAL4 y ok2-GAL4 dirigieron la expresión de GFP en las células del intestino medio anterior, como se informó anteriormente. Esto indica que, al igual que en otras especies, *DromeOKB* es un neuropéptido *brain-gut*.

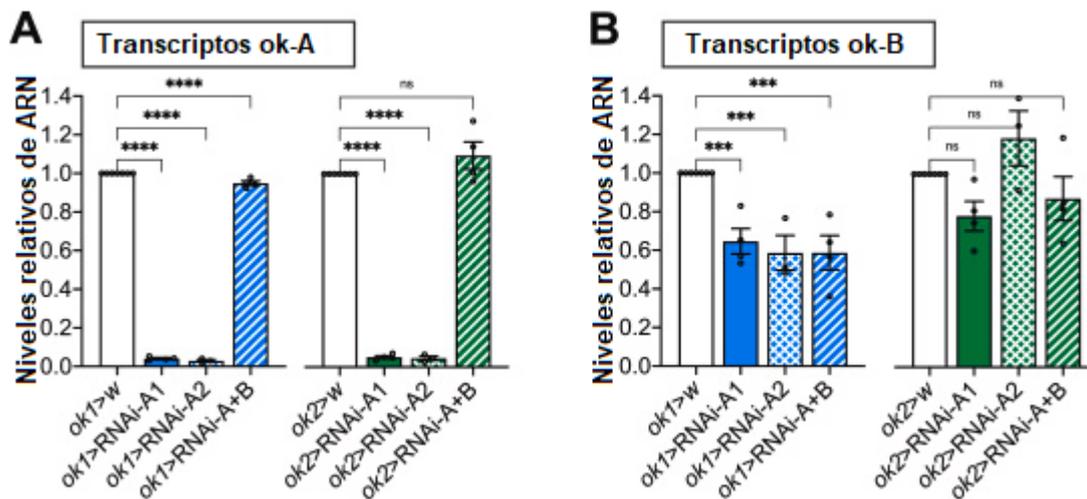


Figura 1.10. Eficiencia de silenciamiento de transgenes de ARNi. Niveles de transcritos de (A) OKA y (B) OKB en moscas adultas (5 días) en relación con las medidas de los controles (barras blancas); Los genotipos se indican a lo largo del eje X. n = 3–4 réplicas biológicas independientes se cuantificaron para cada grupo. El número de moscas utilizadas por réplica osciló entre 18 y 24 por genotipo. ns = no significativo, * = $p < 0,0332$; ** = $p < 0,0021$; *** = $p < 0,0002$; **** = $p < 0,0001$; Se siguió ANOVA de un factor seguido por análisis post hoc de Dunnett.

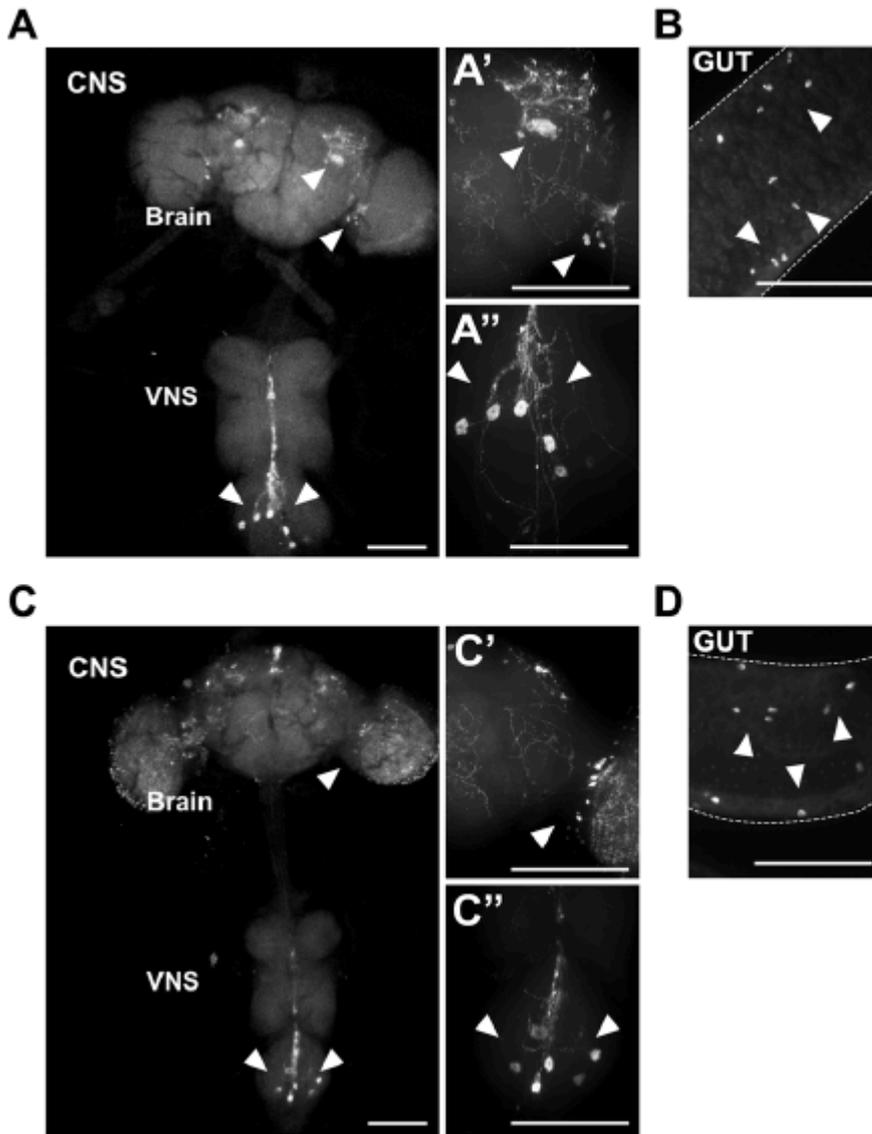


Figura 1.11. Expresión del reportero de GFP impulsada por ok1-GAL4 (A-B) y ok2-GAL4 (C-D). (A, C) Expresión en el SNC de adultos; Las flechas apuntan a neuronas con marcación positiva; (A', A'') Imágen ampliada de las neuronas que expresan el reportero en el cerebro (A') y SNV (A'') indicados por puntas de flecha. (C', C'') Imágen ampliada de neuronas que expresan reportero en el cerebro (C') y SNV (C'') indicadas por puntas de flecha. (B, D) Expresión en el intestino medio de adulto; las puntas de flecha apuntan a células marcadas. La línea de puntos describe la forma del intestino. Barras de escala: 100µm.

1.5.5 Orcokininina en la ecdisis de *D. melanogaster*

La disminución de la expresión de OK utilizando los diferentes transgenes UAS-OK-RNAi y los dos controladores GAL4 no provocó cambios consistentes en la duración de la fase previa a la ecdisis. Mientras que se observó un acortamiento significativo en la duración de la pre ecdisis cuando el transgén UAS-OK-RNAi-A2

se expresó usando el controlador GAL4 OK (Fig. 1.12A-B), no se observó tal acortamiento usando el transgén UAS-OK-RNAi-A1 o los transgenes UAS-OK-RNAi-A+B (Fig. 1.12A-B). No se observaron efectos de la caída de OK en la duración de la fase de ecdisis de la secuencia ecdisial con ninguna de las líneas UAS-ok-RNAi probadas (Fig. 1.12C-D). Tanto los comportamientos previos a la ecdisis como los de ecdisis parecían normales; hembras y machos emergieron como adultos sin diferencias perceptibles respecto del grupo control.

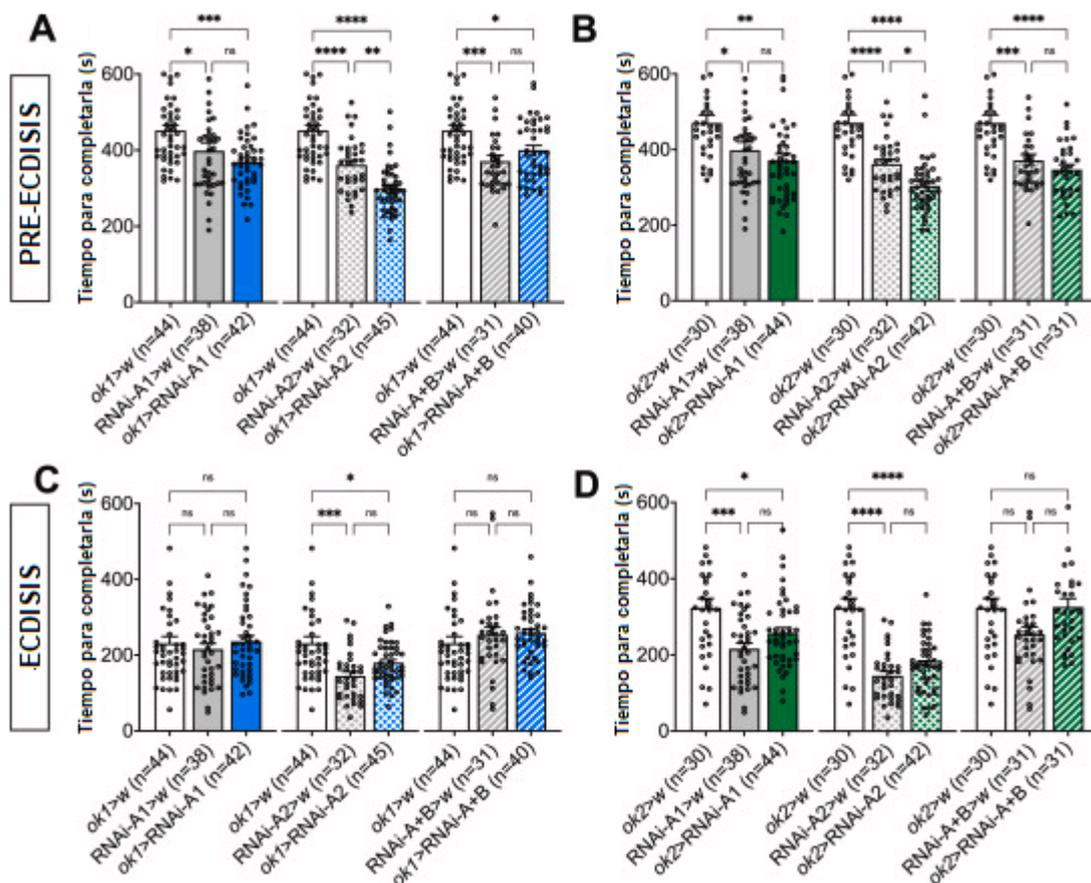


Figura 1.12. Efecto del silenciamiento de OK sobre la duración de las conductas de ecdisis. Duración de la pre ecdisis (A y B) y de la ecdisis (C y D) cuando OK fue silenciado utilizando los drivers ok1-GAL4 (A y C) y ok2-GAL4 (B y D). Los tiempos son media \pm SEM. Ns = no significativo, * = $p < 0,0332$; ** = $p < 0,0021$; *** = $p < 0,0002$; **** = $p < 0,0001$; ANOVA de un factor seguido de análisis post hoc de Tukey. El número de moscas analizadas se indica entre paréntesis.

1.5.6 Orcokininina en el comportamiento de cortejo y cópula de *D. melanogaster*

Probamos la participación de OK en el control del comportamiento innato de cortejo y cópula. No se observaron efectos consistentes de la caída de OK en la latencia de cortejo, el índice de cortejo o en el porcentaje de machos que realizaron

diferentes acciones de cortejo cuando se probó un macho de tipo salvaje con una hembra experimental (Fig. 1.13A-C para ok1-GAL4 y Fig. 1.14A-C para ok2-GAL4). Por el contrario, cuando se probó un macho experimental con una hembra de tipo salvaje se observó una latencia de cortejo más corta, es decir que los machos silenciados comenzaban a cortejar antes (Fig. 1.13D para ok1-GAL4 y Fig. 1.14D para ok2-GAL4). Esta tendencia se acentuó cuando ambos animales, machos y hembras, fueron experimentales (Fig. 1.13G para ok1-GAL4 y Fig. 1.14G para ok2-GAL4). Sin embargo no hubo diferencias entre los grupos experimentales en el índice de cortejo (Fig. 1.13E para ok1-GAL4 y Fig. 1.14E para ok2-GAL4) ni en el porcentaje de machos que realizaron los diferentes elementos de la secuencia de cortejo (Fig. 1.13F para ok1-GAL4 y 1.14F para ok2-GAL4).

Dado que los resultados sugirieron un posible papel de OK en la inhibición del cortejo, analizamos el cortejo entre machos, un comportamiento que ocurre en muy baja frecuencia entre moscas de tipo salvaje. Encontramos un aumento significativo ($p < 0,001$) en los niveles de cortejo hacia machos de tipo salvaje por parte de machos silenciados para el gen OK con cualquiera de los controladores (ok1-GAL4 y ok2-GAL4) y para todas las formas de silenciamiento (UAS-ok-RNAi-A1, UAS-ok-RNAi-A2 y UAS-ok-RNAi-A+B) (Fig. 1.15A y D). Este aumento del cortejo entre machos también se observó cuando ambos machos tenían los mismos genotipos (Fig. 1.15B y E). A pesar de que se produjo un cortejo de macho a macho, las pruebas de preferencia mostraron que los machos silenciados para el gen OK preferían cortejar a una hembra frente a un macho, independientemente del genotipo de las moscas probadas (Fig. 1.15C y F).

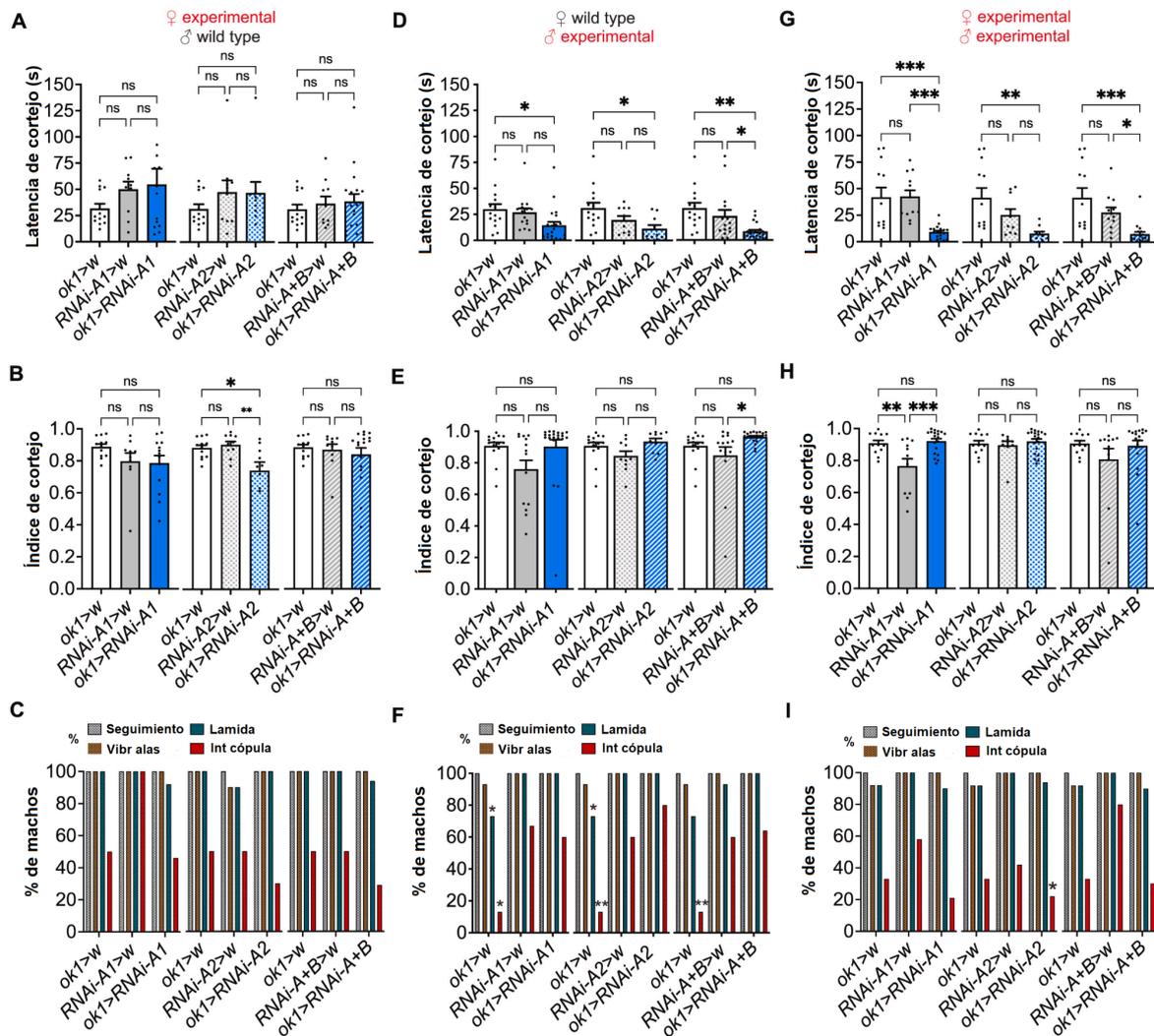


Figura 1.13. Comportamiento de cortejo de los machos hacia las hembras después del silenciamiento utilizando el controlador ok1-GAL4. Latencia de cortejo (A, D y G), índice de cortejo (B, E y H) y porcentaje de machos que realizan diferentes pasos de la secuencia de cortejo (C, F e I) cuando se emparejan con hembras. Las parejas estaban formadas por un macho de tipo salvaje con una hembra experimental (A a C); un macho experimental con una hembra de tipo salvaje (D a F); y un macho experimental con una hembra experimental (G a I). El número de parejas de moscas utilizadas osciló entre 8 y 22 por genotipo. Los valores indicados en A, B, D, E, G y H son medias \pm SEM. ns = no significativo, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$; **** = $p < 0,0001$; ANOVA de un factor seguido de análisis post hoc de Tukey. Para las figuras C, F e I, la barra de colores representa el porcentaje de machos que ejecutan el comportamiento de seguimiento y golpeteo (gris), vibración de las alas (marrón), lamer (azul) e intentar copular (rojo).

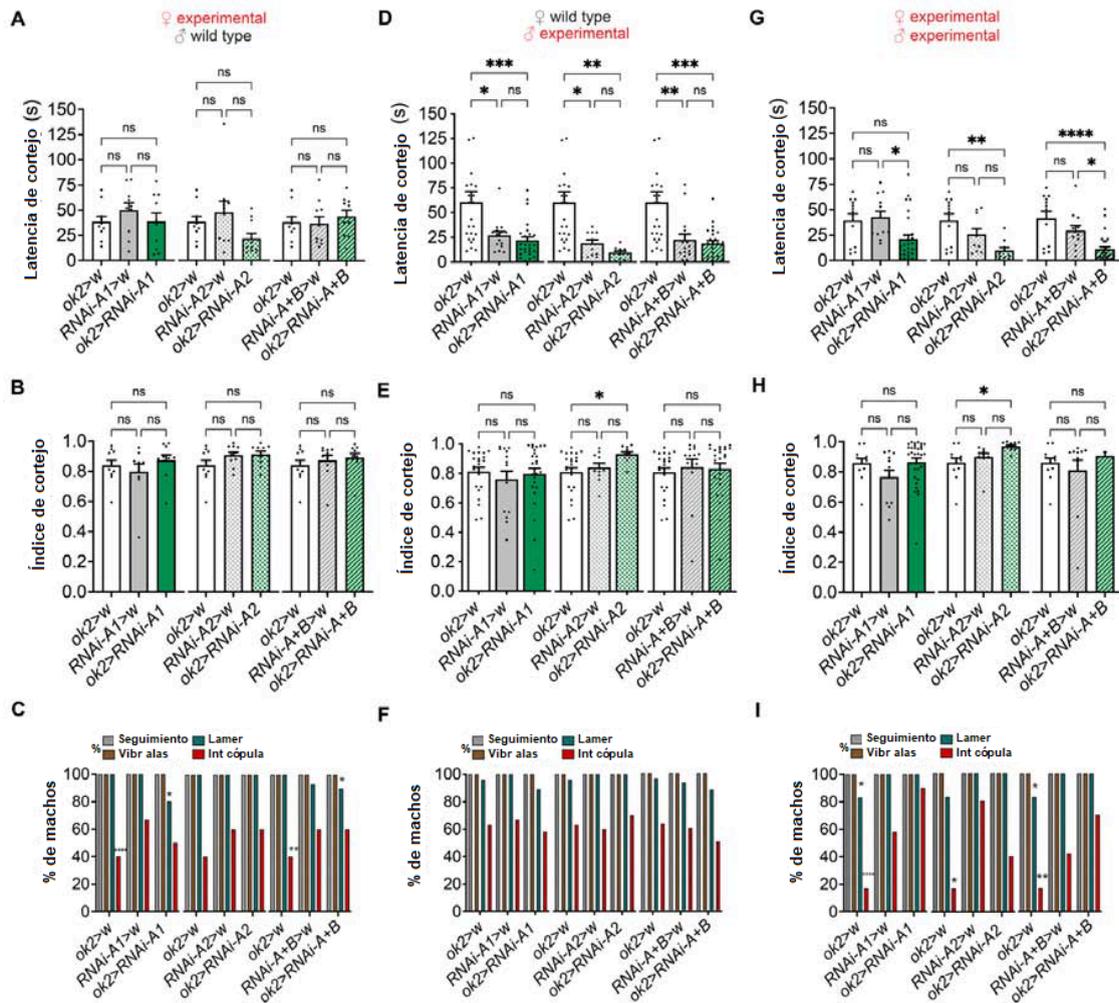


Figura 1.14. Comportamiento de cortejo de los machos hacia las hembras después del silenciamiento utilizando el controlador ok2-GAL4. Latencia de cortejo (A, D y G), índice de cortejo (B, E y H) y porcentaje de machos que realizan diferentes pasos de la secuencia de cortejo (C, F e I) cuando se emparejan con hembras. Las parejas estaban formadas por un macho de tipo salvaje con una hembra experimental (A a C); un macho experimental con una hembra de tipo salvaje (D a F); y un macho experimental con una hembra experimental (G a I). El número de parejas osciló entre 8 y 22 por genotipo. Los valores indicados en A, B, D, E, G y H son medias \pm SEM. ns = no significativo, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$; **** = $p < 0,0001$; ANOVA de un factor seguido de análisis post hoc de Tukey. Para las figuras C, F e I, la barra de colores representa el porcentaje de machos que ejecutan el comportamiento de seguimiento y golpeteo (gris), vibración de las alas (marrón), lamer (azul) e intentar copular (rojo).

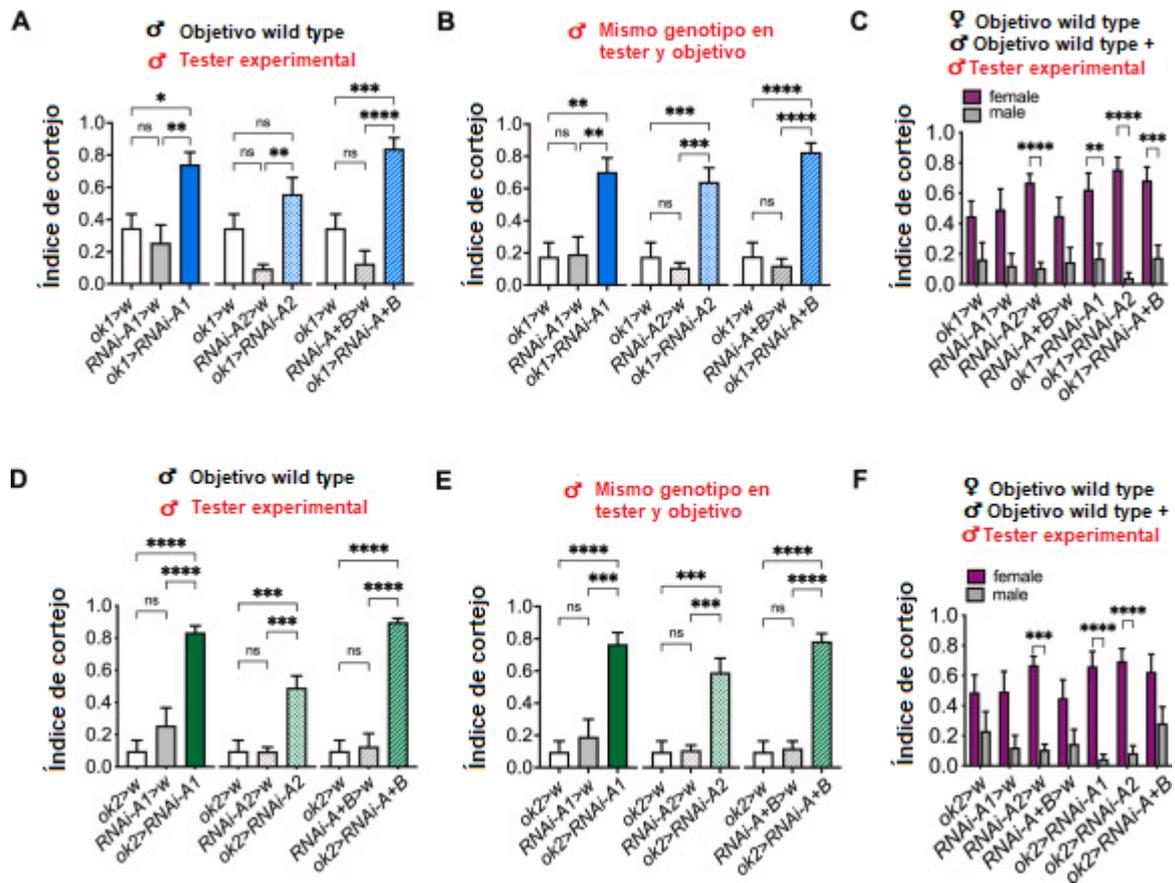


Figura 1.15. El comportamiento de cortejo de un macho hacia otro macho fue desinhibido mediante el silenciamiento de OK, sin afectar la preferencia sexual por hembras. Índice de cortejo para machos hacia: un macho CS (A y D) y hacia un macho del mismo genotipo (B y E). (C y F) Preferencia del macho hacia una pareja compuesta por una hembra de tipo salvaje (CS) (indicada en morado) y un macho de tipo salvaje (CS) (indicado en gris). El número de parejas osciló entre 8 y 18 por genotipo. ns = no significativo, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$; **** = $p < 0,0001$; ANOVA de un factor seguido de análisis post hoc de Tukey (A, B, D y E) y prueba de comparaciones múltiples de Sidak (C y F).

1.5.7 Papel de Orcokina en la oviposición de *D. melanogaster*

Evaluamos la puesta diaria de huevos por parte de hembras silenciadas para OK, apareadas con machos de tipo salvaje (CS) durante los días 1 a 4 y luego el día 15. Observamos una reducción constante en la producción de huevos durante el período inicial para todos los genotipos de ARNi (Fig. 1.16A, C). Sin embargo, el número promedio de huevos puestos durante los primeros 4 días fue significativamente diferente de los controles solo en las hembras para las cuales UAS-ok-RNAi-A1 fue dirigido por el controlador ok2-GAL4 y cuando

UAS-ok-RNAi-A+B fue dirigido mediante controladores ok1-GAL4 u ok2-GAL4 (Fig. 1.16B, D). La tendencia de las hembras tratadas a poner menos huevos no se observó a los 15 días (Fig. 1.16A, C), lo que sugiere una maduración más lenta. No se observaron diferencias en el porcentaje de eclosión de huevos entre los diferentes genotipos (no mostrado).

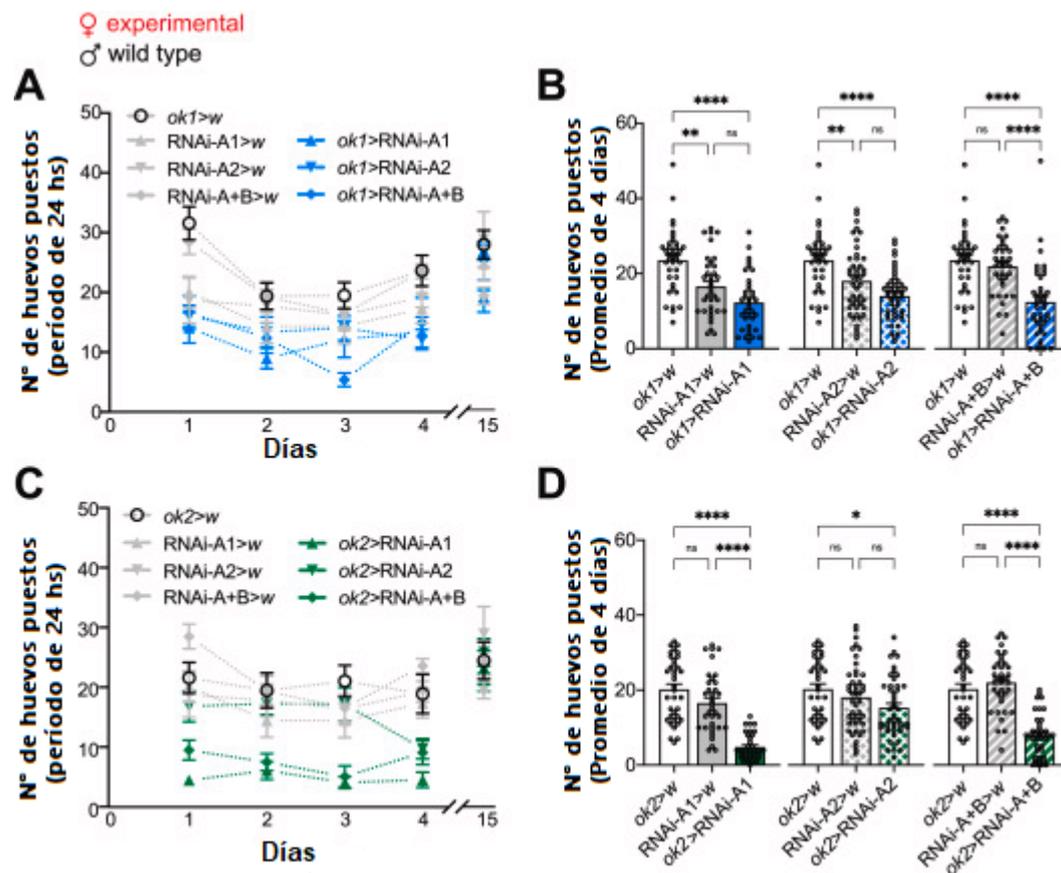


Figura 1.16. Efecto del silenciamiento de OK sobre el número de huevos puestos por las hembras apareadas. Número de huevos puestos diariamente por las hembras durante los días 1 a 4 y el día 15 después del apareamiento (A, C) cuando OK fue silenciado usando ok1-GAL4 (panel superior) o ok2-GAL4 (panel inferior). Media (\pm SEM) de huevos puestos durante 24 h durante los días 1 a 4 (B, D). Se evaluaron entre veintisiete y 33 hembras por condición. ns = no significativo, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$; **** = $p < 0,0001$; ANOVA de un factor seguido de análisis post hoc de Tukey.

1.6 Discusión

La ecdisis es crítica en el desarrollo post-embionario de los insectos como etapa final de la muda. Si bien es un proceso complejo que comprende diferentes

factores, en insectos holometábolos la red endocrina central conservada que la regula se compone de CZ, CCAP, ETH, EH y BUR, más allá de diferencias entre especies. Esta red de regulación hormonal está bien estudiada en modelos holometábolos como *Manduca sexta*, *T. castaneum*, *Ae. aegypti*, *D. melanogaster* o *B. mori* (Arakane *et al.*, 2008, Ewer *et al.*, 2005, Fuse y Truman 2002, Kim *et al.*, 2006, Malhotra y Basu *et al.*, 2023), pero no en ametábolos o hemimetábolos, lo que deja lagunas en la comprensión de la evolución de los insectos. Pocos estudios mostraron la relevancia de algunos neuropéptidos de la red en la ecdisis en hemimetábolos mediante la técnicas de RNAi: un trabajo estudiando ETH en la langosta *Schistocerca gregaria*, CCAP y OK en *R. prolixus* (Lee *et al.*, 2013, Lenaerts *et al.*, 2017, Wulff *et al.*, 2017). Aquí evaluamos en *R. prolixus* los neuropéptidos implicados en la regulación de la ecdisis en holometábolos, para probar la hipótesis de un papel conservado en holo y hemimetábolos. Por otra parte, estudiamos si OK tiene un papel conservado en la regulación de la ecdisis en holometábolos, aprovechando las herramientas genéticas disponibles en *D. melanogaster*.

Encontramos que los niveles de expresión de CZ, ETH y EH están elevados uno o dos días antes de la muda, y ETH además el día 6 después de la ingesta de sangre, coincidiendo con el pico de ecdisona en hemolinfa (Wulff *et al.*, 2017). El papel de ETH en la ecdisis es crucial, se ha demostrado en diversas especies holometábolos y en el hemimetábolo *S. gregaria* que el efecto de su disminución es letal. Nuestros resultados en *R. prolixus* refuerzan la evidencia indicando la conservación de la función en la clase Insecta (Arakane *et al.*, 2008, Diao *et al.*, 2016, Lenaerts *et al.*, 2017, Shi *et al.*, 2017). Los fenotipos de doble cutícula son coincidentes con lo demostrado en la misma especie con el neuropéptido OK (Wulff *et al.*, 2017). De hecho, en los insectos silenciados para ETH vimos una disminución significativa en los niveles de OKA el día 11 post-alimentación; previamente habíamos demostrado que los niveles de ETH disminuían en insectos silenciados para OKA (Wulff *et al.*, 2018). Los resultados en conjunto sugieren una retroalimentación entre estos neuropéptidos en la regulación del proceso de ecdisis en *R. prolixus*.

Si bien los resultados con el silenciamiento de ETH sugieren una conservación de función entre holo y hemimetábolos, el silenciamiento de OK no

afectó la ecdisis de pupa a adulto en *D. melanogaster*, lo cual indica que no hay una conservación de función de OK a lo largo de la evolución de los insectos.

Los neuropéptidos encargados de regular los procesos que desencadenan en la muda mantienen sus niveles de expresión en la etapa adulta dónde el insecto ya no sufre ecdisis. En los últimos años se ha demostrado el papel de algunos de estos neuropéptidos en la regulación de procesos relacionados con la reproducción. En dípteros se ha demostrado el papel gonadotrófico de ETH mediado por la acción de JH, así como su papel en la regulación del cortejo (Areiza *et al.*, 2014, Meiselman *et al.*, 2017, 2018a; 2018b), mientras que OK en *B. germánica* tiene un rol en la vitelogénesis y la maduración ovárica (Ons *et al.*, 2015). Aquí demostramos que OK tiene un papel en la producción de huevos en *D. melanogaster*, y que la disminución en su expresión desinhibe el comportamiento innato de cortejo. Así, el papel de los neuropéptidos OK y ETH parece estar relacionado tanto en los modelos holo como hemimetabolos. Sin embargo en *R. prolixus* no vimos diferencia en la puesta de huevos con ninguno de los genes reguladores de la ecdisis testeados. Dado que las pro-ninfas realizan dentro del huevo una ecdisis antes de la eclosión (Truman y Riddiford, 2019), consideramos que esta ecdisis podría estar inhibida con el silenciamiento de ETH, lo que llevó a la dramática reducción en la tasa de eclosión de los huevos tratados, por más que no se detectaron otros defectos en el desarrollo embrionario.

Los resultados demuestran que, con foco en el sistema neuroendócrino, podrían utilizarse agentes de control de insectos tales como los peptidomiméticos, plantas transgénicas, nanopartículas para el *delivery* de dsRNA, etc (Verlinden *et al.*, 2014). En esa búsqueda los neuropéptidos y sus receptores resultan particularmente interesantes porque actúan como neurotransmisores u hormonas activando cascadas de señalización que regulan finamente procesos vitales, a la vez que difieren genética y estructuralmente entre especies y con los vertebrados.

Capítulo 2:

Análisis comparativo de superfamilias génicas relacionadas con la detoxificación en cinco especies de hemípteros perjudiciales

2.1 Introducción

2.1.1 Familias génicas involucradas en detoxificación y resistencia a insecticidas

Existen superfamilias de genes que están relacionadas con el metabolismo de xenobióticos, entre ellas las más estudiadas en insectos son las CYP450, CCE y GST, aunque en los últimos años se demostró la relevancia en detoxificación de otras familias de genes (Ingham *et al.*, 2023).

Las CYP se encuentran entre las superfamilias génicas más grandes en los organismos vivos. Entre otras funciones, cumplen un papel en la detoxificación de compuestos tanto endógenos como exógenos. La superfamilia CYP se divide en 4 Clanes: Mitocondrial, CYP2, CYP3 y CYP4. Entre las enzimas del Clan Mitocondrial se encuentran aquellas con función en la síntesis de ecdisteroides, muy conservadas entre especies de insectos. La familia CYP12 del Clan mitocondrial se ha reportado como relacionada a la detoxificación de xenobióticos y a la resistencia a los insecticidas (Feyereisen *et al.*, 2006)

El Clan CYP2 comprende genes conservados, involucrados en la síntesis de ecdisteroides (Traverso *et al.*, 2017). El CYP3 es habitualmente el Clan más numeroso en los genomas de insectos, cuyos miembros han sido involucrados en diversas funciones. Su proliferación se debe a la dinámica de evolución con altas tasas de duplicación génica que ha permitido la diversificación y neofuncionalización (Feyereisen *et al.*, 2011, Volonté *et al.*, 2022). Las familias CYP6 y CYP9 comprendidas en este Clan han sido relacionadas a la detoxificación y la resistencia a insecticidas (Edi *et al.*, 2014, Liu, 2015, Moyes *et al.*, 2017, Nardini *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2018, Zou *et al.*, 2019). A modo de ejemplo, en *Culex pipiens* se demostró la implicación de enzimas de la familia CYP6 en detoxificación y resistencia a deltametrina (Zou *et al.*, 2022). En *An. gambiae* se ha descrito que algunas enzimas de la familia CYP6 están implicadas no sólo en la resistencia a piretroides sino también a compuestos como Bendiocarb (de la familia de los carbamatos) y DDT (Edi *et al.*, 2014). Por otro lado, en un análisis transcriptómico en poblaciones resistentes y susceptibles de campo y laboratorio, se encontraron diferencias en la expresión de algunas enzimas de la familia CYP6 en las poblaciones resistentes comparadas con las susceptibles en la mosca del olivo *Bactrocera oleae* (Pavlidí *et al.*, 2018). También en *Ae. aegypti*, a partir de análisis transcriptómicos por *microarrays*, se vio aumentada la expresión de enzimas de las

familias CYP6 y CYP9 en las poblaciones resistentes. En el mismo sentido, la exposición a deltametrina de *Ae. aegypti* provocó un aumento en la expresión de enzimas de las familias CYP6 y CYP9 (Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2019). Se ha visto la expresión de CYP6 y CYP9 aumentada en poblaciones del género *Anopheles* resistentes a insecticidas, como por ejemplo CYP6Z1, CYP9K1, CYP6AA1 y CYP6P9a en *An. funestus* (Hearn *et al.*, 2022, Ibrahim *et al.*, 2016, Irving *et al.*, 2012); CYP9K1, CYP6AA1, CYP6P3 y CYP6M2 en *An. gambiae* y *An. coluzzii* (Njoroge *et al.*, 2022, Yunta *et al.*, 2022); y CYP6P4 en *An. arabiensis* (Ibrahim *et al.*, 2015). La familia CYP6 es la más representada de la superfamilia CYP y a su vez es la responsable de la mayor parte del metabolismo de xenobióticos, siendo CYP6P, CYP6M2 y CYP6K1 las asociadas más fuertemente a este fenómeno (Ingham *et al.*, 2024).

Algunas familias del Clan CYP4 han sido involucradas en resistencia a insecticidas, tanto por la metabolización del tóxico como por la biosíntesis de hidrocarburos de la cutícula, lo que contribuiría a una reducción en la absorción del insecticida. Miembros de esta familia fueron analizados funcionalmente mediante ARNi. Los ensayos sugirieron un papel importante en la detoxificación de piretroides por parte de CYP4EM1 en *R. prolixus* (Paim *et al.*, 2022). También se reportó la sobreexpresión de miembros del Clan CYP4 por exposición a deltametrina en *An. gambiae* (Ingham *et al.*, 2014), *R. prolixus* (Dulbecco *et al.*, 2020 y 2022) y finalmente, se detectó una expresión aumentada de genes miembros del Clan CYP4 en poblaciones de *T. infestans* resistentes a piretroides (Grosso *et al.*, 2016, Traverso *et al.*, 2017)

Las CCE están implicadas en la hidrólisis de ésteres carboxílicos a ácidos y alcoholes. Son posiblemente la más diversa y multifuncional de las superfamilias detoxificantes, lo cual dificulta su clasificación. La división de los clados hasta el momento se ha realizado a partir de las primeras divergencias encontradas en dípteros, que no son siempre extrapolables al resto de ordenes de insectos. En la actualidad se dividen en 3 clases funcionales: las enzimas de Neurodesarrollo (ND) que carecen de actividad catalítica con excepción de las acetilcolinesterasas; la clase Dietaria (DD) que comprende las principales enzimas caracterizadas como encargadas en la detoxificación de compuestos de la dieta e insecticidas, y la clase de Procesamiento de Hormonas y Feromonas (HPP) (Montella *et al.*, 2012). Enzimas de la clase HPP presentan neofuncionalización con evolución dinámica a

partir de duplicaciones génicas, lo que podría estar relacionado con la resistencia a insecticidas por metabolización. Muchas de estas enzimas fueron reportadas como importantes en el proceso de desintoxicación de organofosforados, carbamatos y piretroides en diferentes ordenes de insectos (Bass y Field *et al.*, 2011, Li *et al.*, 2007, Montella *et al.*, 2012, Raymond *et al.*, 1998).

Las GST son proteínas diméricas con un amplio rango de sustratos en funciones metabólicas, de desintoxicación y excreción. Catalizan reacciones de conjugación y deshidrocloración. Se clasifican en microsomales y citosólicas según su localización celular. Entre las citosólicas se encuentran las clases Zeta, Theta, Sigma, Omega, Delta y Epsilon; las 2 últimas han sido reportadas sólo en insectos. Las clases Delta, Epsilon y Omega han sido relacionadas con la resistencia a insecticidas, tanto con validación de métodos genéticos *in vivo* (BdGSTe2, BdGSTe4, AfGSTe2) como en el metabolismo de insecticidas *in vitro* (BmGSTu2, TuGSTd05, AfGSTe2) (Pavliidi *et al.*, 2018). También se ha encontrado en *N. lugens* la implicación en estos fenómenos de una GST sobreexpresada en insectos resistentes (nlgst1-1) mediante la detoxificación de productos de peroxidación lipídica inducida por piretroides (Vontas *et al.*, 2002). Además, la implicación de diferentes GST en este proceso puede ser debida a la protección frente al estrés oxidativo inducido por una intoxicación, y/o por el secuestro de la molécula, aunque no ha sido totalmente dilucidado hasta el momento.

2.1.2 Detoxificación en hemípteros

Hemiptera es uno de los ordenes de insectos más diversos, con más de 50,000 especies, siendo el más diverso considerando Hemimetabola. El suborden Heteroptera incluye especies adaptadas a una diversidad de nichos ecológicos y estilos de vida. Análisis filogenéticos y registros fósiles sugieren que el origen del suborden Heteroptera coincide con un cambio de herbivoría a depredación, aunque en Pentatomorpha y Cimicomorpha, dos linajes dentro de Heteroptera, se observa un retorno a la herbivoría (Johnson *et al.*, 2018). Dentro de Cimicomorpha, la hematofagia surgió de manera independiente en la subfamilia Triatominae y la familia Cimicidae (chinchas de cama). Las diferentes dietas presentan desafíos distintos para estos heterópteros filogenéticamente relacionados. A lo largo de su historia evolutiva, los hemípteros con diferentes hábitos alimenticios han adaptado

su fisiología de detoxificación para lidiar con distintas sustancias químicas (Weirauch *et al.*, 2019).

Se ha demostrado ampliamente que la capacidad de los insectos herbívoros para detoxificar aleloquímicos de plantas afecta su capacidad para utilizar diferentes hospederos potenciales. Por otro lado, la reducción de complemento enzimático de detoxificación en especies tales como la abeja *Apis mellifera* o el piojo *Pediculus humanus* se ha relacionado con una dieta muy especializada. Por el contrario, los himenópteros generalistas presentan un mayor número de GST, CCE y CYP en sus genomas, en comparación con especies especialistas del mismo orden. Es ampliamente aceptado que las expansiones o contracciones de familias de genes relacionadas con la detoxificación a lo largo de la evolución están asociadas con adaptaciones funcionales al rango de dieta y otras características del entorno (Cheng *et al.*, 2017, Martínez-Barnette *et al.*, 2018, Nyanjom *et al.*, 2018 Pelletier y Leal 2011, Rane *et al.*, 2016). Sin embargo, un análisis comparativo reciente sobre la subfamilia Aphidiinae indica que no hay una correlación entre el rango de hospederos de una especie y el número de genes relacionados con la detoxificación, sugiriendo que esta correlación no puede generalizarse para las especies de hemípteros (Lin *et al.*, 2022). La evolución de las familias de genes está determinada por un proceso dinámico de duplicación y pérdida, mediado por deriva genética, selección natural y reordenamientos cromosómicos (Nei y Rooney 2005). Las proliferaciones de genes parálogos en los genomas, o *gene blooms*, originan expansiones significativas en subfamilias particulares. Los genes recientemente duplicados pueden fijarse si otorgan ventajas adaptativas, o perderse a través de deleciones o mutaciones deletéreas que los convierten en pseudogenes. Por lo tanto, el análisis comparativo del complemento de detoxificación de insectos podría indicar aquellos grupos de genes involucrados en la adaptación de las especies a nichos ecológicos particulares.

En trabajos anteriores, encontramos que los triatomíneos que son hematófagos obligados en su ciclo de vida completo, presentan reducciones (o incluso ausencia) de algunas familias de GST, CCE y CYP, mientras que otras están expandidas. Hasta nuestro trabajo no se había informado un análisis exhaustivo que compare genes relacionados con la detoxificación entre distintas familias del orden Hemiptera; por lo tanto, algunas de las particularidades encontradas en los triatomíneos podrían ser comunes a todo el orden, o al suborden Heteroptera.

Aunque un trabajo anterior comparó las superfamilias de CYP, CCE y GST en 160 especies de insectos (Rane *et al.*, 2019), no incluyó ninguna especie del orden Hemiptera. Por lo tanto, la información sobre este grupo, relevante tanto en términos de número de especies como de su impacto económico/sanitario, sigue siendo escasa. Además, un análisis evolutivo que identifique diferencias en los complejos de CYP, GST y CCE entre heterópteros succionadores fitófagos y hematófagos podría revelar adaptaciones moleculares a la dieta. Un análisis comparativo de expansiones/reducciones génicas y presión de selección evolutiva entre especies con distintos hábitos alimentarios podría revelar características comunes dentro de los heterópteros, así como diferencias que sugerirían fuerzas evolutivas ejercidas sobre diferentes genes y familias de genes.

La chinche verde *N. viridula* es una plaga de cultivos que genera un grave impacto económico, especialmente en la soja (Lavore *et al.*, 2018). A pesar de su relevancia económica de América del Norte a América del Sur, el genoma de *N. viridula* fue publicado de manera muy reciente (King *et al.*, 2023), con posterioridad a los presentes análisis. *H. halys*, también pentatómido, tiene niveles excepcionalmente altos de polifagia, lo que lo convierte en una plaga invasora eficiente que se expandió desde Asia hasta América del Norte y del Sur, Europa y Australia. *N. lugens* es un saltamontes que sólo se alimenta de arroz, representando una seria amenaza para la producción. La chinche de cama *C. lectularius* y la vinchuca *R. prolixus* son hematófagos obligados durante todo su ciclo de vida, y son especies de relevancia sanitaria como ectoparásitos humanos o vectores. En el presente Capítulo, realizamos un análisis comparativo del complemento de superfamilias de genes GST, CCE y CYP en cuatro heterópteros (*N. viridula*, *H. halys*, *C. lectularius* y *R. prolixus*), y una Auchenorrhyncha (*N. lugens*).

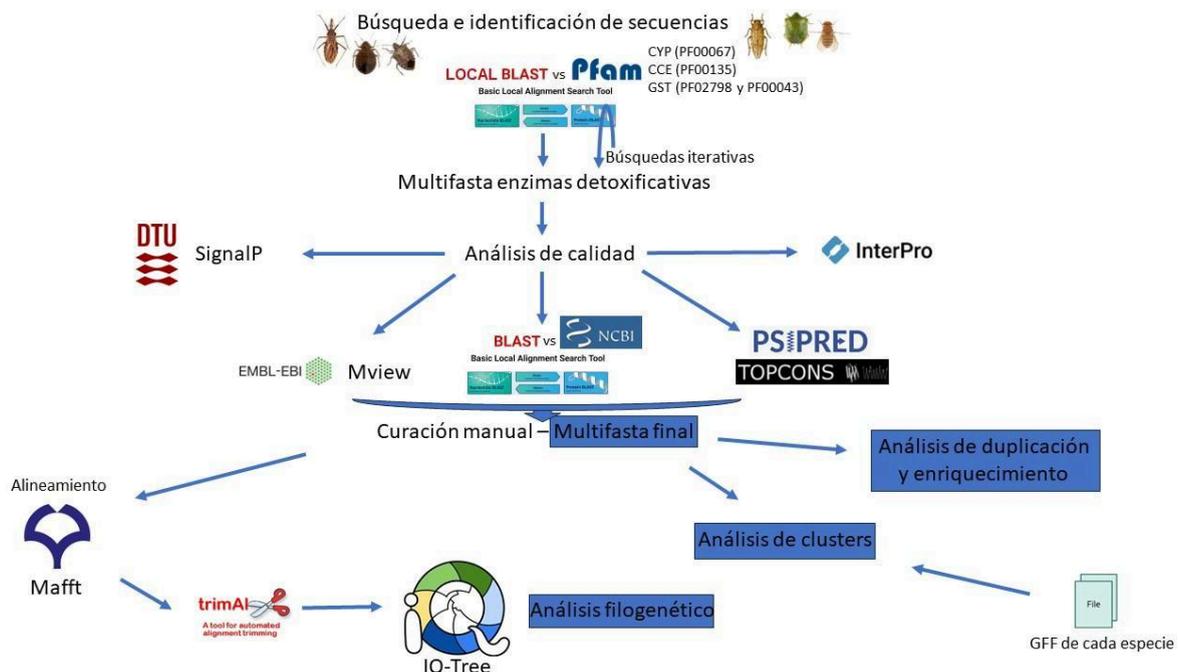
2.2 Hipótesis

- El análisis comparativo de familias génicas entre especies de insectos hemípteros con distintas dietas (fitófagos o hematófagos) podría revelar adaptaciones específicas a cada tipo de alimentación, en particular en la detoxificación de los productos tóxicos derivados de la sangre o las plantas.

2.3 Objetivo

- Analizar comparativa y evolutivamente el repertorio de familias génicas detoxificantes en especies de insectos hemípteros perjudiciales especializados en distintas dietas, a fin de identificar genes y/o clados potencialmente involucrados en la adaptación a la hematofagia o fitofagia.

2.4 Resumen de la metodología utilizada



2.5 Resultados

Se compararon los repertorios de CYP, CCE y GST de cuatro heterópteros (*N. viridula*, *H. halys*, *R. prolixus* y *C. lectularius*) y un Auchenorrhyncha (*N. lugens*). Este último se incluyó en el análisis evolutivo como *outgroup*, por ser un hemíptero no heteróptero. Considerando la suma de los miembros de todas las superfamilias

génicas analizadas, se identificaron 151 genes relacionados con la detoxificación en *N. viridula*, 116 en *C. lectularius*, 190 en *R. prolixus*, 233 en *H. halys* y 135 en *N. lugens* (Tabla 2.1).

La superfamilia CYP fue la más numerosa en cuanto a cantidad de genes en todas las especies, seguida de las CCE, mientras que la GST fue la menos representada (Tabla 2.1). Esta tendencia también se observó en otros genomas, como los de especies de Aphodiinae (Lin *et al.*, 2022) y *An.gambiae* (Ranson *et al.*, 2002); en cambio, en otras especies como por ejemplo, *D. melanogaster*, la familia GST es más numerosa que la de CCE (Traverso *et al.*, 2017). *H. halys* presentó mayor repertorio en todas las superfamilias: 132 genes en CYP, 72 en CCE y 29 en GST. En comparación, el repertorio de *C. lectularius* fue el más pequeño con 55 CYP, 46 CCE y 15 GST (Tabla 2.1). Las superfamilias CYP y CCE de *R. prolixus* presentaron 113 y 63 miembros respectivamente, mientras que las de *N. viridula* presentaron 83 y 52, respectivamente (Tabla 2.1). El tamaño de la superfamilia GST fue más homogéneo entre especies, con 16 genes en *N. viridula*, 15 en *C. lectularius* y *N. lugens*, 14 en *R. prolixus*. *H. halys* divergió de la tendencia, con 29 genes (Tabla 2.1). Cuando la suma de CYP, CCE y GST se comparó con los conjuntos completos de genes en los genomas, se detectaron expansiones significativas en *H. halys* y *R. prolixus*, pero no en *N. lugens* y *C. lectularius* (Tabla S2.1 en Anexo I: Material suplementario). Esto se vio apoyado por diferentes números de duplicaciones y pérdidas de genes (Fig. 2.1), siendo *H. halys* y *R. prolixus* las especies con el mayor número de eventos de duplicación detectados en las familias de genes estudiadas.

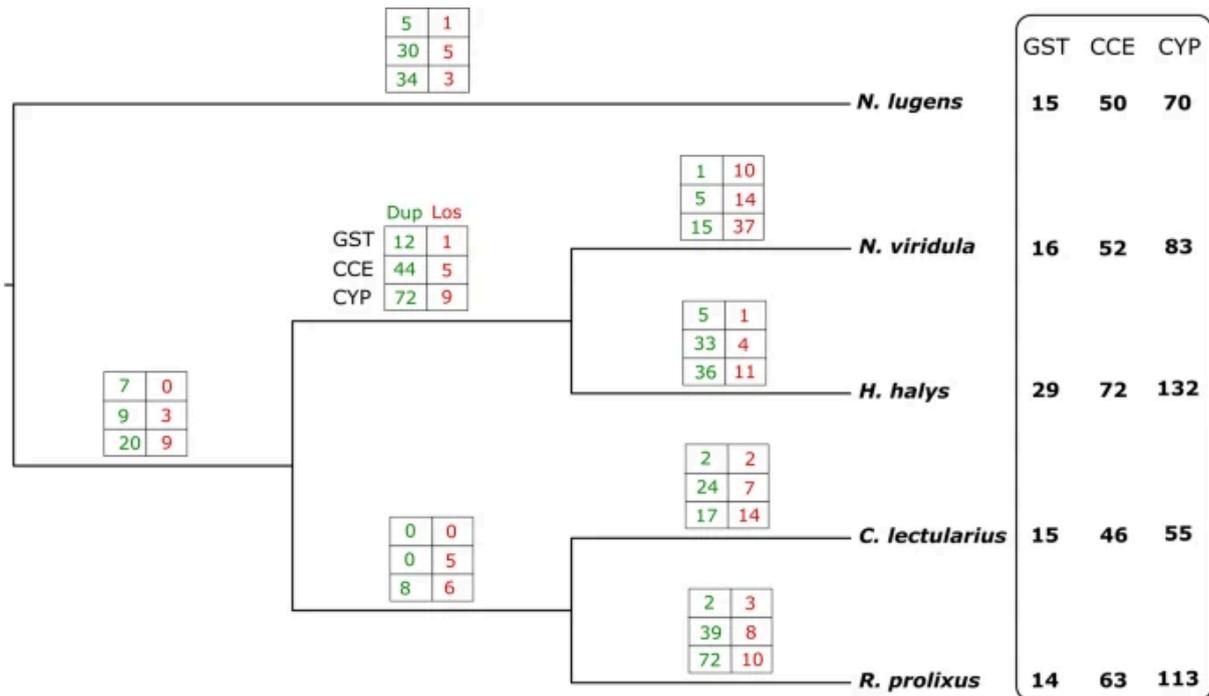


Figura 2.1. Árbol de especies que muestra el número de ganancias (verde) y pérdidas (rojo) de genes en cada rama para las superfamilias GST, CCE y CYP.

Superfamilia	Familia/Clan/Clase	<i>R. prolixus</i>	<i>C. lectularius</i>	<i>H. halys</i>	<i>N. viridula</i>	<i>N. lugens</i>	
CYP	Clan Mitocondrial	Número	7	7	8	6	11
		Familias	CYP301, 302, 314, 315, 394, 404	CYP301, 302, 314, 315, 394, 404	CYP301, 302, 314, 315, 3221	CYP301, 302, 314, 315, 3221	CYP301, 302, 314, 315, 353, 404, 419
	Clan CYP2	Número	6	6	6	4	9
		Familias	CYP15, 18, 303, 306, 307	CYP15, 18, 303, 305, 306, 307	CYP15, 18, 303, 305, 306, 307	CYP15, 305, 306, 307	CYP15, 18, 303, 304, 305, 306, 307
	Clan CYP3	Número	53	30	75	41	16
		Familias	CYP6, 395, 3084-3092, 3096	CYP6, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 3087,	CYP6, 395, 3090, 3092,	CYP6, 395, 3090, 3092, 3225,	CYP6, 408, 427, 3115

				3089, 3090, 3091	3226, 3227, 3228, 3229, 3230, 3231	3226, 3227, 3228, 3229, 3230, 3231	
Clan CYP4	Número	47	12	43	32	34	
	Familias	CYP4, 3093	CYP4	CYP4, 3222, 3223, 3224	CYP4, 3223, 3224	CYP4, 380, 417, 425, 426, 439	
	Número total de la superfamilia CYP	113	55	132	83	70	
CCE	Clase de procesamiento de hormonas y feromonas	Número	43	30	57	45	25
		Familias	B-Esterasas	B-Esterasas, No caracterizada	B-Esterasas	B-Esterasas	B-Esterasas, No caracterizada
	Clase dietaria	Número	0	0	0	0	5
		Familias					A-Esterasas
	Clase de neurodesarrollo	Número	20	16	15	7	20
Familias		Neurologina, Clase I, Neurotactina, Gliotactina, Glutactina, Acetilcolinesterasa	Neurologina, Clase I, Neurotactina, Gliotactina, Glutactina, Acetilcolinesterasa	Neurologina, Clase I, Neurotactina, Gliotactina, Glutactina, Acetilcolinesterasa	Neurologina, Gliotactina, Glutactina, Acetilcolinesterasa	Neurologina, Clase I, Neurotactina, Gliotactina, Glutactina, Acetilcolinesterasa	
	Número total de la superfamilia CCE	63	46	72	52	50	
GST	Clase delta	Número	1	2	2	0	2

	Clase epsilon	0	0	0	0	4
	Clase omega	1	1	3	2	1
	Clase sigma	7	6	17	9	4
	Clase theta	3	2	3	3	1
	Clase zeta	1	1	1	1	1
	Clase microsomal	1	3	3	1	2
	Número total de la superfamilia GST	14	15	29	16	15
Número total de enzimas detoxificantes (CYP+CCE+GST)	190	116	233	151	135	

Tabla 2.1. Números de los genomas de *C. lectularius*, *H. halys*, *R. prolixus* y *N. lugens* y el transcriptoma de *N. viridula*.

2.5.1 Citocromos P450

Los complementos CYP de los genomas de *N. lugens* y *C. lectularius* resultaron significativamente más pequeños en comparación con los complementos CYP de los otros genomas de heterópteros analizados aquí. Además, al comparar la cantidad de genes CYP dentro del repertorio completo de detoxificación, el número encontrado en *R. prolixus* fue significativamente mayor que en *C. lectularius* (ver Tabla S2.1 con los valores p en Anexo I: Material suplementario). Nuestro análisis filogenético permitió clasificar a los miembros de la superfamilia CYP en clanes y familias (Fig. 2.2), que presentaron diferentes dinámicas evolutivas (Tabla 2.2).

Familia	CYPMIT	CYP2	CYP3	CYP4	GST	CCE	Total
Duplicaciones							
Clec	0	0	17	0	2	24	43

Rpro	0	0	34	38	2	39	113
(Clec + Rpro)	0	0	5	3	0	0	8
Hhal	0	0	25	11	5	33	74
Nvir	0	0	6	9	1	5	21
(Hhal + Nvir)	2	0	43	27	12	44	128
(Clec + Rpro) + (Hhal + Nvir)	0	0	15	5	7	9	36
Nlug	3	1	9	21	5	30	33
Pérdidas							
Clec	1	1	10	2	2	7	23
Rpro	0	1	4	5	3	8	21
(Clec + Rpro)	0	0	3	3	0	5	11
Hhal	0	0	6	5	1	4	16
Nvir	2	2	22	11	10	14	61
(Hhal + Nvir)	1	1	7	0	1	5	15
(Clec + Rpro) + (Hhal + Nvir)	1	2	1	5	0	3	12
Nlug	0	1	1	1	1	5	9
Total	10	9	208	146	52	235	624

Tabla 2.2. Números detectados en los genomas de *Nilaparvata lugens* (Nlug), *Cimex lectularius* (Clec), *Halyomorpha halys* (Hhal), *Rhodnius prolixus* (Rpro) y el transcriptoma de *Nezara viridula* (Nvir) de acuerdo con el análisis filogenético.

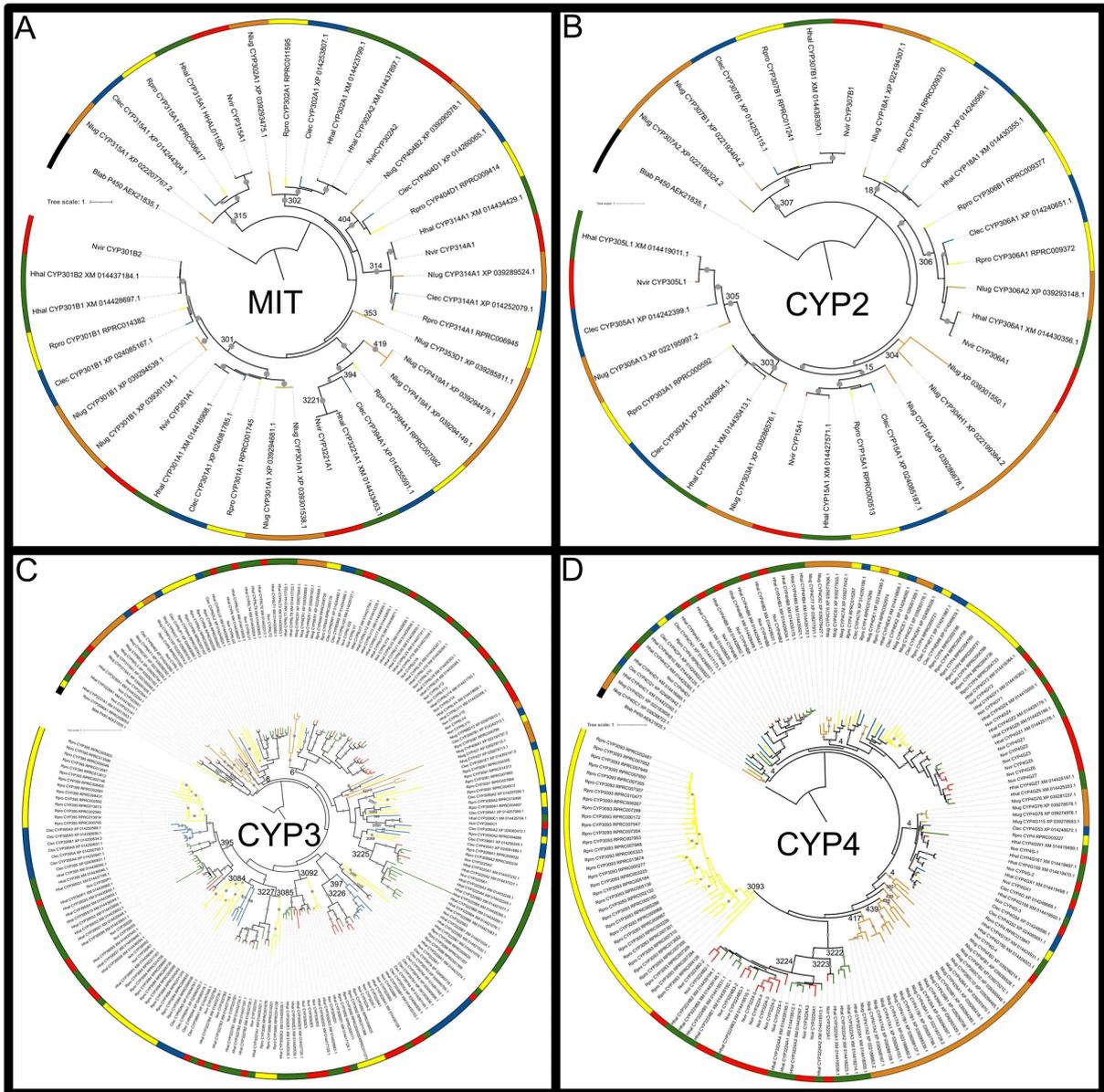


Figura 2.2. Filogenia de la superfamilia CYP: de *N. viridula* (rojo: Nvir), *R. prolixus* (amarillo: Rpro), *H. halys* (verde: Hhal), *C. lectularius* (azul: Clec) y *N. lugens* (naranja: Nlug). **A)** clan mitocondrial. **B)** Clan CYP2. **C)** Clan CYP3. **D)** Clan CYP4. Se utilizó un gen CYP de *Bemisia tabaci* como grupo externo (AEK21835.1 - NCBI) y el árbol se enraizó en esta secuencia. Los valores de soporte de rama > 80 están marcados a escala con un círculo gris. Para una mejor visualización: Figuras S2.1 a S2.4 del Anexo I: Material suplementario.

2.5.1.1 Clan mitocondrial

El número de genes del Clan mitocondrial fue similar entre las especies analizadas (8 en *H. halys*, 7 en *C. lectularius* y *R. prolixus*, 6 en *N. viridula* y 11 en *N. lugens*, Tabla 2.1). Estos números podrían reflejar estabilidad en la evolución del

Clan, con pocos eventos de duplicaciones y pérdidas de genes (Tabla 2.2). Muchos genes de este Clan tienen papeles esenciales en el ciclo vital de los insectos, como los genes *Halloween* que están implicados en la síntesis de ecdisteroides (Feyereisen *et al.*, 2006). Los genes *Halloween* pertenecen a las familias 315 (*sad*), 302 (*disembodied; dib*) y 314 (*shadow; shd*). Todos ellos estuvieron representados por 1 gen por especie en las bases de datos de hemípteros, con la excepción de 2 genes CYP302 en *H. halys* (Fig. 2.2A). La familia CYP394 del Clan mitocondrial tuvo 1 representante en *R. prolixus* y *C. lectularius*, mientras que CYP3221 tuvo 1 representante en cada uno de los pentatómidos. *N. lugens* no tuvo representantes de estas dos últimas familias, pero sí 2 genes clasificados como CYP419, que está filogenéticamente relacionado. Además, el genoma de *N. lugens* codifica un gen perteneciente a la familia CYP353, que está ausente en las especies de heterópteros analizadas en este estudio (Fig. 2.2A). Curiosamente, CYP404 estuvo representado por 1 gen en *N. lugens*, *C. lectularius* y *R. prolixus*, pero ausente en los pentatómidos. La familia mitocondrial CYP más grande en las bases de datos analizadas aquí fue CYP301, con 4 genes detectados en *N. lugens*, 3 en *H. halys*, y 2 en *C. lectularius*, *R. prolixus*, y *N. viridula* (Fig. 2.2A). Coincidiendo con observaciones previas en triatóminos (Traverso *et al.*, 2017), ninguna de las secuencias identificadas en los hemípteros aquí analizados estuvo filogenéticamente relacionada con la familia CYP12 que ha sido asociada con la resistencia a insecticidas en otras especies (Fig. S2.1 del Anexo I: Material suplementario) (Feyereisen *et al.*, 2006).

2.5.1.2 Clan CYP2

Al igual que el clan mitocondrial, CYP2 contiene genes *Halloween* (por ejemplo, las familias CYP306 y CYP307, denominadas *phantom* y *spook*, respectivamente) (Feyereisen *et al.*, 2006) (Fig. 2.2B). Se detectaron 9 genes CYP2 en *N. lugens*, 6 en *R. prolixus*, *C. lectularius* y *H. halys* y 4 en *N. viridula* (Tabla 2.1, Fig. 2.2B). La dinámica evolutiva de este clan fue similar a la del clan mitocondrial, pero con más eventos de pérdida génica y una duplicación en *N. lugens* (Tabla 2.2). Se detectó un único miembro de las familias CYP305 y CYP307 en cada base de datos de especies, con la excepción de 2 genes CYP307 en *N. lugens*, y 0 CYP305

en *R. prolixus*. Para la familia CYP15, se detectó un miembro en cada base de datos. Dos genes fueron clasificados como de la familia CYP306 en *R. prolixus*, mientras que se encontró un miembro en cada una de las otras especies. La familia CYP304, previamente descrita en *D. melanogaster* y otros insectos, estuvo representada por un gen en *N. lugens*, pero no en las otras especies analizadas, lo que sugiere una pérdida de esta familia en Heteroptera. Además, un gen CYP2 de *N. lugens* (XP_039301550.1) no pudo clasificarse confiablemente en ninguna familia (Fig. 2.2B y Fig. 2 del Anexo). Por último, sólo se identificó una secuencia perteneciente a cada una de las familias CYP18 y CYP303 en los 4 genomas analizados, pero no en el transcriptoma de *N. viridula* (Fig. 2.2B). Las subfamilias CYP303 y CYP18 no fueron detectadas en los transcriptomas de *T. dimidiata* y *T. infestans* (Traverso *et al.*, 2017), lo que podría sugerir una expresión baja o condicional en los heterópteros, dificultando la identificación de estas subfamilias incluso en bases de datos transcriptómicas bien representadas.

2.5.1.3 Clan CYP3

De acuerdo con la literatura, los clanes CYP3 y CYP4 siempre son más grandes que los clanes mitocondrial y CYP2 en los genomas de insectos (Feyereisen *et al.*, 2006). Los primeros han proliferado como resultado de eventos de duplicación génica, lo que permitió su diversificación y neofuncionalización (Feyereisen *et al.*, 2011). Resultados similares se observaron en las especies de hemípteros aquí analizadas. El clan CYP3 presenta una evolución muy dinámica y una tendencia a la expansión significativa con 2,8 veces más duplicaciones génicas que pérdidas (Tabla 2.2). El número de secuencias que codifican enzimas CYP3 fue de 53 en *R. prolixus*, 30 en *C. lectularius*, 75 en *H. halys*, y 41 en *N. viridula* (Tabla 2.1; Fig. 2.2C). El complemento CYP3 de *N. lugens* fue significativamente reducido (16 genes) comparado con su contraparte en los heterópteros (Tabla 2.1, Fig. 2.2C). En consecuencia, se observaron muchas duplicaciones génicas en todas las ramas filogenéticas que conducen a Heteroptera (15). Además, *R. prolixus* presentó 34 duplicaciones y *C. lectularius* 17, lo que explica la mayor parte de la diferencia entre estas dos especies hematófagas. Se observó un gran número de duplicaciones en el ancestro de *N. viridula* y *H. halys* (43), y de nuevo en el linaje de *H. halys* (Fig. 2.2C, Tabla 2.2). La discrepancia entre los dos pentatómidos podría estar

relacionada con diferencias en la amplitud de sus dietas, dado que *H. halys* es más polífaga, aunque el número mucho menor de genes y duplicaciones, y el mayor número de pérdidas génicas detectadas en *N. viridula* podrían reflejar el carácter incompleto de su transcriptoma en relación a los genomas. Los análisis se realizaron a partir de la información transcriptómica disponible al momento del trabajo, pero actualmente se presentó el genoma secuenciado y ensamblado a nivel cromosómico de *N. viridula* (King *et al.*, 2023), por lo que se podrán validar estos resultados a nivel genómico.

CYP6 es la familia del Clan CYP3 más abundante en las especies herbívoras analizadas (37,3% de CYP3 son CYP6 en *H. halys*, 36,5% en *N. viridula*, 68,75% en *N. lugens*) y en *C. lectularius* (26,7%), y la segunda en importancia en *R. prolixus* (15,1%). Sin embargo, nuestro análisis filogenético indica que varias de las secuencias previamente anotadas en la literatura como CYP6 pertenecen en realidad a familias diferentes (Fig. 2.2C), teniendo en cuenta que las primeras anotaciones fueron realizadas con estudios sólo de Dípteros. Dentro de la familia CYP6, la subfamilia LV parece ser exclusiva de los pentatómidos (18 en *H. halys* y 11 en *N. viridula*). La segunda familia más numerosa en pentatómidos y *C. lectularius*, y la más abundante en *R. prolixus*, es CYP395 (20% de las secuencias en *H. halys*, 12,2% en *N. viridula*, 23,3% en *C. lectularius* y 26,4% en *R. prolixus*). Sin embargo, ninguna de las secuencias CYP de *N. lugens* se clasificó en esta familia. Las subfamilias CYP395-S, CYP395-R, CYP395-P y CYP395-Q sólo estuvieron representadas en pentatómidos, las subfamilias CYP395-C a CYP395-F sólo contienen secuencias de *R. prolixus*, y las subfamilias CYP395-A y CYP395-B sólo estuvieron representadas por secuencias de *C. lectularius*. Las familias CYP3225 a CYP3231 son exclusivas de los pentatómidos. La familia CYP3225 resultó mayor en *H. halys* (12 secuencias) que en *N. viridula* (3 secuencias). Por el contrario, la subfamilia CYP3226 presentó 2 genes en *H. halys* y 5 en *N. viridula*. La familia CYP3227 contuvo 6 secuencias de *H. halys* y 4 de *N. viridula*, mientras que las familias CYP3228 a CYP3231 estuvieron representadas por un gen tanto en *H. halys* como en *N. viridula*.

Las familias CYP3084 a CYP3089 y CYP3091 estuvieron ausentes en los pentatómidos. Esta última estuvo representada por 5 secuencias en *R. prolixus* y 1 en *C. lectularius*. Las familias exclusivas de *R. prolixus* fueron CYP3084, CYP3085, CYP3086, CYP3088 y CYP3096. La familia CYP3090, descrita anteriormente sólo

en triatominos (Traverso *et al.*, 2017), parece ser ubicua en Heteroptera con 1 secuencia en *H. halys*, *N. viridula*, *R. prolixus* y *C. lectularius*. Por último, la familia CYP3092, descrita para triatominos por primera vez en trabajos anteriores (Schama *et al.*, 2016, Traverso *et al.*, 2017), también se detectó en pentatómidos (4 secuencias en *R. prolixus* y *N. viridula* y 7 en *H. halys*). Dentro de esta familia, la subfamilia CYP3092A es exclusiva de *R. prolixus*, mientras que las subfamilias CYP3092D y CYP3092E sólo se detectaron en los pentatómidos.

Observamos que la familia CYP9 (perteneciente al Clan CYP3) estuvo ausente en todas las bases de datos de hemípteros aquí analizadas (Fig. S2.3 del Anexo I: Material suplementario). En trabajos anteriores informamos de la ausencia de la familia CYP9 en especies de triatominos (Traverso *et al.*, 2017). Además, un trabajo reciente analizando el genoma del hemíptero depredador *O. laevigatus* (Anthocoridae) también informó de la ausencia de la familia CYP9 (Bailey *et al.*, 2022). Globalmente, los resultados apuntan a la falta de la familia CYP9 como una observación común en los genomas de hemípteros. Dado que CYP9 es una familia grande en los genomas de insectos pertenecientes a diferentes ordenes, y que se asoció con la resistencia a los insecticidas y la desintoxicación de xenobióticos (Feyereisen *et al.*, 2011), la falta de esta familia en Hemiptera podría ser un hallazgo relevante para la entomología evolutiva y aplicada. Por el contrario, la familia CYP395 es uno de los grupos más numerosos en las bases de datos de heterópteros; en ausencia de la familia CYP9, CYP395 podría tener un papel en la detoxificación.

2.5.1.4 Clan CYP4

CYP4 es el segundo Clan CYP más numeroso en los genomas de insectos de diferentes ordenes (Feyereisen *et al.*, 2006). Muchos genes pertenecientes a este Clan están implicados en la detoxificación (Dulbecco *et al.*, 2022). El análisis reveló 47, 43, 32, 12 y 34 genes CYP4 en *R. prolixus*, *H. halys*, *N. viridula*, *C. lectularius* y *N. lugens*, respectivamente. El porcentaje de la familia CYP4 respecto a la totalidad del complemento CYP fue significativamente mayor en *N. lugens* en comparación con *H. halys* y *C. lectularius* (Tabla S2.1 en el Anexo I: Material suplementario). Esto se debió al pequeño número de genes CYP3 detectados en *N. lugens*. También se observó una reducción significativa de CYP4 en *C. lectularius* en

comparación con *N. viridula* y *R. prolixus* (Tabla 2.1, Fig. 2.2D, Tabla S2.1 en el Anexo I: material suplementario). Este resultado refleja una expansión del Clan en *R. prolixus* debido a 38 eventos de duplicación génica (Tabla 2.2). Nuestra metodología no puede descartar que la expansión se produjera en el ancestro de las especies hematófagas con una posterior pérdida masiva de genes en *C. lectularius*. También se informó de una expansión específica del género CYP4 para *Acyrtosiphon spp.* en comparación con otros Aphididae (Lin *et al.*, 2022); en ese caso, los autores propusieron la pérdida de genes en otros miembros de la subfamilia, y una conservación de los números ancestrales en *Acyrtosiphon*. Se detectó un gran número de duplicaciones (27) en el ancestro de los pentatómidos (Tabla 2.2). De nuevo, las pérdidas detectadas en *N. viridula* deben confirmarse con información genómica.

Los genes CYP4 se clasificaron en las familias CYP4, CYP3222, CYP3223, CYP3224, CYP380, CYP417, CYP425, CYP426, CYP439, y CYP3093, siendo 3222 a 3224 exclusivos de los pentatómidos, y 380, 417, 425, 426, y 439 exclusivos de *N. lugens* (Fig. 2.2D). Además, la familia CYP3093 fue exclusiva y se expandió en *R. prolixus* (71,4% del clan CYP4) debido a una expansión génica o *gene bloom* (Fig. 2.2D). Se propuso que las expansiones de los genes CYP se producen en respuesta a estímulos ambientales, lo que conduce a un potencial desarrollo de resistencia a los insecticidas (Feyereisen *et al.*, 2011). Hasta la fecha, no hay información funcional sobre CYP3093 para *R. prolixus*, con la excepción de modelos bioinformáticos de *docking* molecular (Dulbecco *et al.*, 2018). Para varios miembros de CYP3093, estos modelos propusieron una interacción favorable entre el piretroide deltametrina y el sitio activo, sugiriendo un posible papel en el metabolismo de insecticidas (Dulbecco *et al.*, 2018). En *T. infestans* CYP3093 está altamente expresado en el tegumento, que es la primera barrera a los tóxicos, y está sobreexpresado en poblaciones resistentes de *T. infestans* (Dulbecco *et al.*, 2018). En conjunto, la evidencia nos permite hipotetizar que la expansión de CYP3093 confiere a *R. prolixus* el potencial de adquirir resistencia a los insecticidas químicos. Esta gran expansión no es compartida por otras especies de triatomíneos (Traverso *et al.*, 2017), ni por otros heterópteros (presentes resultados), lo que sugiere que puede ser un evento reciente en la evolución de esta especie.

El 100% de las secuencias CYP4 de *C. lectularius* (12) pertenecen a la familia CYP4, que también está representada en *R. prolixus* (14 genes, 29,8% del

clan), *H. halys* (30 genes, 69,8%), *N. viridula* (20 genes, 62,5%) y *N. lugens* (17 genes, 50%). Sin embargo, nuestro análisis filogenético sugiere que puede haber una mayor diversidad dentro de esta familia, ya que las secuencias se agrupan en varios clados diferentes. Se ha sugerido que la familia CYP4 juega un papel en la tolerancia y resistencia a insecticidas en especies de triatomíneos, dada su mayor expresión en *T. infestans* resistente a piretroides (Grosso *et al.*, 2016, Traverso *et al.*, 2017). Además, el silenciamiento génico mediado por ARNi de algunos miembros de la familia CYP4 condujo a una mayor susceptibilidad a la deltametrina en *T. infestans* (Dulbecco *et al.*, 2020) y *R. prolixus* (Paim *et al.*, 2022).

2.5.2 Carboxilcolinesterasas

Las búsquedas en bases de datos y la curación manual de genes (Información suplementaria electrónica SE2.2 en Anexo I: Material suplementario) revelaron 50 genes que codifican CCE en *N. lugens*, 72 en *H. halys*, 46 en *C. lectularius* y 52 en *N. viridula*, mientras que el genoma de *R. prolixus* incluye 63 genes codificantes para CCE (Tabla 2.1). Se trata de una familia dinámica con 184 duplicaciones y 51 pérdidas génicas detectadas (Tabla 2.2, Fig. 2.1). Estas cifras sugieren una expansión de la superfamilia en Hemiptera (Tabla S2.1 del Anexo I: Material suplementario), que fue más pronunciada en algunas ramas de la filogenia. Se produjeron expansiones muy grandes en los ancestros de los pentatómidos (44 duplicaciones) e individualmente en *R. prolixus* (39), *C. lectularius* (24) y *H. halys* (33). En general, esta dinámica fue en su mayor parte específica de cada rama, lo que sugiere que podría ser el resultado de una adaptación relativamente reciente a diferentes nichos ambientales. El número de pérdidas génicas (14) está sin duda sobreestimado debido a la falta de datos genómicos en *N. viridula*.

Clasificamos las secuencias CCE de *N. lugens*, *N. viridula* y *C. lectularius* basándonos en sus relaciones filogenéticas con las CCE de *H. halys* y *R. prolixus* previamente descritas (Sparks *et al.*, 2020, Traverso *et al.*, 2017) y en el análisis de los residuos conservados característicos de sus secuencias (Información suplementaria electrónica SE2.3 del anexo I: Material suplementario, Fig. 2.3). Curiosamente, la clase DD sólo estuvo representada en *N. lugens* (5 genes). La falta de CCE clase DD en hemípteros hematófagos y predadores se ha propuesto como consecuencia de su dieta; dado que estas especies no están expuestas a

metabolitos secundarios de plantas, no necesitarían esta clase de CCE (Bailey *et al.*, 2022, Traverso *et al.*, 2017). Sin embargo, nuestros resultados revelan que las CCE-DD también están ausentes en los pentatómidos, sugiriendo su pérdida durante la evolución de los insectos del suborden Heteroptera. Esto se ve reforzado por la evidencia de DD-CCE en especies de hemípteros no Heteroptera, como Aphidinae (Lin *et al.*, 2022).

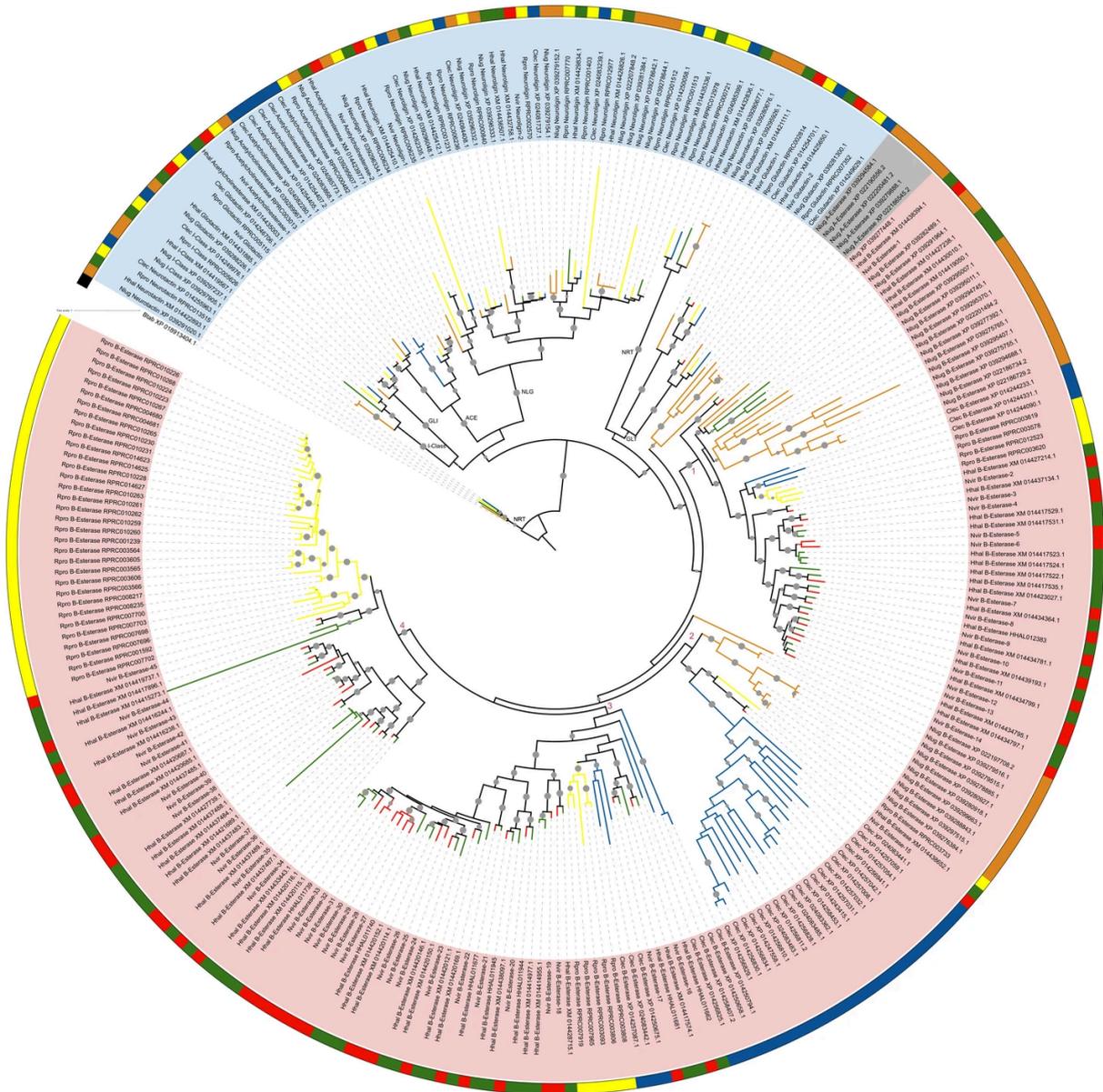


Figura 2.3. Filogenia de la superfamilia CCE: de *N. viridula* (rojo: Nvir), *R. prolixus* (amarillo: Rpro), *H. halys* (verde: Hhal), *N. lugens* (naranja: Nlug) y *C. lectularius* (azul: Clec). Las clases están resaltadas en azul claro (Neurodesarrollo), gris (Dietaria) y rosa (Procesamiento de hormonas y feromonas). Se utilizó la colinesterasa 1 de *B. tabaci* como grupo externo (XP_018913404.1 - NCBI),

y el árbol se enraizó en esta secuencia. Los valores de soporte de rama > 80 están marcados a escala con un círculo gris.

Las secuencias consideradas como HPP se definieron aquí teniendo en cuenta las relaciones filogenéticas y la presencia de β -esterasas previamente anotadas (Sparks *et al.*, 2020). Observamos una importante diversificación en las HPP, lo cual es coincidente con informes anteriores sobre Heteroptera (Bailey *et al.*, 2022, Traverso *et al.*, 2017). Se detectaron 43 genes CCE HPP en *R. prolixus*, 30 en *C. lectularius*, 57 en *H. halys*, 45 en *N. viridula* y 25 en *N. lugens*. Estos números de Heteroptera son considerablemente más altos que los números reportados para especies de otros ordenes de insectos, e incluso para otros hemípteros (Lin *et al.*, 2022). Una secuencia CCE de *N. lugens* y 20 de *C. lectularius* no pudieron clasificarse como β -esterasas mediante el análisis de identidad de secuencia, pero son parte de la clase de procesamiento de hormonas y feromonas según la filogenia (Fig. 2.3). Se observaron grandes expansiones en HPP de heterópteros, especialmente pentatómidos. Para facilitar las comparaciones, los grupos HPP se numeran del 1 al 4 (Fig. 2.3). Las secuencias de *D. melanogaster* y *N. lugens* estuvieron presentes en los grupos 1 y 2 (Fig. S2.5 del Anexo de material suplementario). *N. lugens* mostró una expansión de las secuencias HPP en ambos grupos, mientras que también se observaron expansiones de pentatómidos y *C. lectularius* en los grupos 1 y 2, respectivamente. En el grupo 3, donde solo se encuentran secuencias de heterópteros, las especies de pentatómidos también presentaron una expansión, que está filogenéticamente relacionada con un clado que contiene entre 2 y 5 secuencias en cada especie de heterópteros aquí analizada. En el grupo 4, *R. prolixus*, así como las especies pentatómidas, presentaron una gran expansión aunque parecen ser independientes. No se encontraron secuencias de *C. lectularius* en este grupo (Fig. 2.3).

La clase ND codifica proteínas como neurologina, gliotactina, glutactina y neurotactina, que no son catalíticas. También codifica AChE, que participa en la neurotransmisión, y es el sitio objetivo de los insecticidas organofosforados y carbamatos (Casida *et al.*, 2013). La clase ND presentó expansiones específicas de especie, que resultaron menores que aquellas pertenecientes a la clase HPP descritas más arriba. En la clase ND, el complemento genético se expandió significativamente en *R. prolixus* y *C. lectularius* con respecto a *N. viridula*, y en *N.*

lugens con respecto a *N. viridula* y *H. halys* (Tabla S2.1 del Anexo I: Material suplementario). *D. melanogaster* y otros dípteros poseen un único gen que codifica AChE en sus genomas. También se encontró un solo gen que codifica AChE en el transcriptoma de *N. viridula*, mientras que *R. prolixus*, *H. halys* y *N. lugens* tuvieron 2 cada uno. Sorprendentemente, el genoma de *C. lectularius* codifica 5 genes del parálogo AChE (Fig. 2.3), lo cual podría favorecer la tolerancia a insecticidas que tienen ese blanco de acción.

Todas las especies analizadas tuvieron un gen clasificado como “neuroreceptor putativo” (gliotactina o clado K) dentro de la clase del neurodesarrollo. *H. halys*, *R. prolixus* y *C. lectularius* contaron con 2 genes en el grupo de neurotactina y 1 en el grupo “no caracterizado” o I, *N. lugens* tuvo 2 genes en el grupo I y 3 en neurotactina, mientras que no se detectaron representantes de estos grupos en el transcriptoma de *N. viridula*. Todas las especies analizadas aquí tuvieron 2 genes en el grupo de la glutactina. El grupo más numeroso en la clase del neurodesarrollo fue el formado por neuroliginas: 2 en *N. viridula*, 5 en *C. lectularius*, 7 en *H. halys*, 10 en *N. lugens* y una importante expansión con 12 representantes en *R. prolixus*. (Fig. 2.3, Tabla S2.1 en Anexo I: material suplementario).

Nuestros resultados, junto con reportes previos (Bailey *et al.*, 2022, Lin *et al.*, 2022, Schama *et al.*, 2016, Traverso *et al.*, 2018), sugieren una configuración particular del complemento CCE en Heteroptera, con falta de DD y expansiones en la clase HPP. En ausencia de la clase DD, las β -esterasas catalíticas podrían desempeñar un papel en la desintoxicación de Heteroptera. En este sentido, las expansiones observadas en la clase HPP pueden contrarrestar funcionalmente la ausencia de DD en la capacidad de estas especies para hacer frente a xenobióticos tóxicos.

2.5.3 Glutación transferasas

Las GST citosólicas en insectos se han clasificado en los grupos delta, epsilon, omega, sigma, theta y zeta. Entre ellas, las clases delta y épsilon son exclusivas de insectos y han sido asociadas con la resistencia a los insecticidas en Diptera (Enayati *et al.*, 2005).

Se encontraron 14 GST en *R. prolixus*, 16 en *N. viridula*, 15 en *C. lectularius* y *N. lugens* y 29 en *H. halys* (Tabla 2.1). Aunque esta superfamilia fue menos

dinámica en términos de nacimiento y muerte de genes en comparación con otras superfamilias relacionadas con la desintoxicación, también presentó una tendencia de expansión (Fig. 2.4). El mayor número de duplicaciones se observó en el antepasado de los pentatómidos, lo que sugiere un papel adaptativo de GST en los heterópteros fitófagos. La ausencia de datos genómicos para *N. viridula* puede estar ocultando duplicaciones en esta especie y dando lugar a una sobreestimación del número de pérdidas de genes (14). La expansión de la superfamilia GST observada en el genoma de *H. halys* fue significativa en comparación con *N. lugens* y *R. prolixus* (Tabla S2.1 del Anexo I: material suplementario).

No se ha informado que las GST microsomales desempeñen un papel en la desintoxicación de xenobióticos; aunque difieren estructuralmente de las GST citosólicas, catalizan reacciones similares (Enayati *et al.*, 2005). Encontramos 3 secuencias en *H. halys* y *C. lectularius*, 2 en *N. lugens*, mientras que las bases de datos de *R. prolixus* y *N. viridula* se identificó solo 1 GST microsomal.

Las especies de hemípteros aquí analizadas presentaron un bajo número de la clase delta (2 en *H. halys*, *N. lugens* y *C. lectularius*, 1 en *R. prolixus* y ninguno en *N. viridula*) y épsilon (4 en *N. lugens* y ninguno en los heterópteros, Tabla 1) (Fig. 2.4 y Fig. S2.7 en Anexo I: Material suplementario). Con excepción de *N. lugens* y *Trialeurodes vaporariorum* (Bailey *et al.*, 2022), la ausencia de GST épsilon es un hallazgo común en los genomas de hemípteros (Lin *et al.*, 2022). Por el contrario otras clases de GST se encuentran expandidas en estas especies y en particular la clase sigma, especialmente en los pentatómidos (Tabla 2.1). Cincuenta por ciento del total de GST de *R. prolixus* (7 de 14), 56,25% de *N. viridula* (9 de 16), 40% de *C. lectularius* (6 de 15), 58,6% de *H. halys* (17 de 29), y el 26,7% en *N. lugens* (4 de 15) se clasificaron en dicha clase (Tabla 2.1). Estos resultados sugieren que la clase sigma podría ser relevante para la desintoxicación en hemípteros, compensando la ausencia o reducción en otras clases de GST. Sin embargo, esta tendencia de una clase sigma expandida no se confirmó en Aphidinae; en cambio, la clase delta presentó una expansión género-específica en *Acyrtosiphon* (Lin *et al.*, 2022).

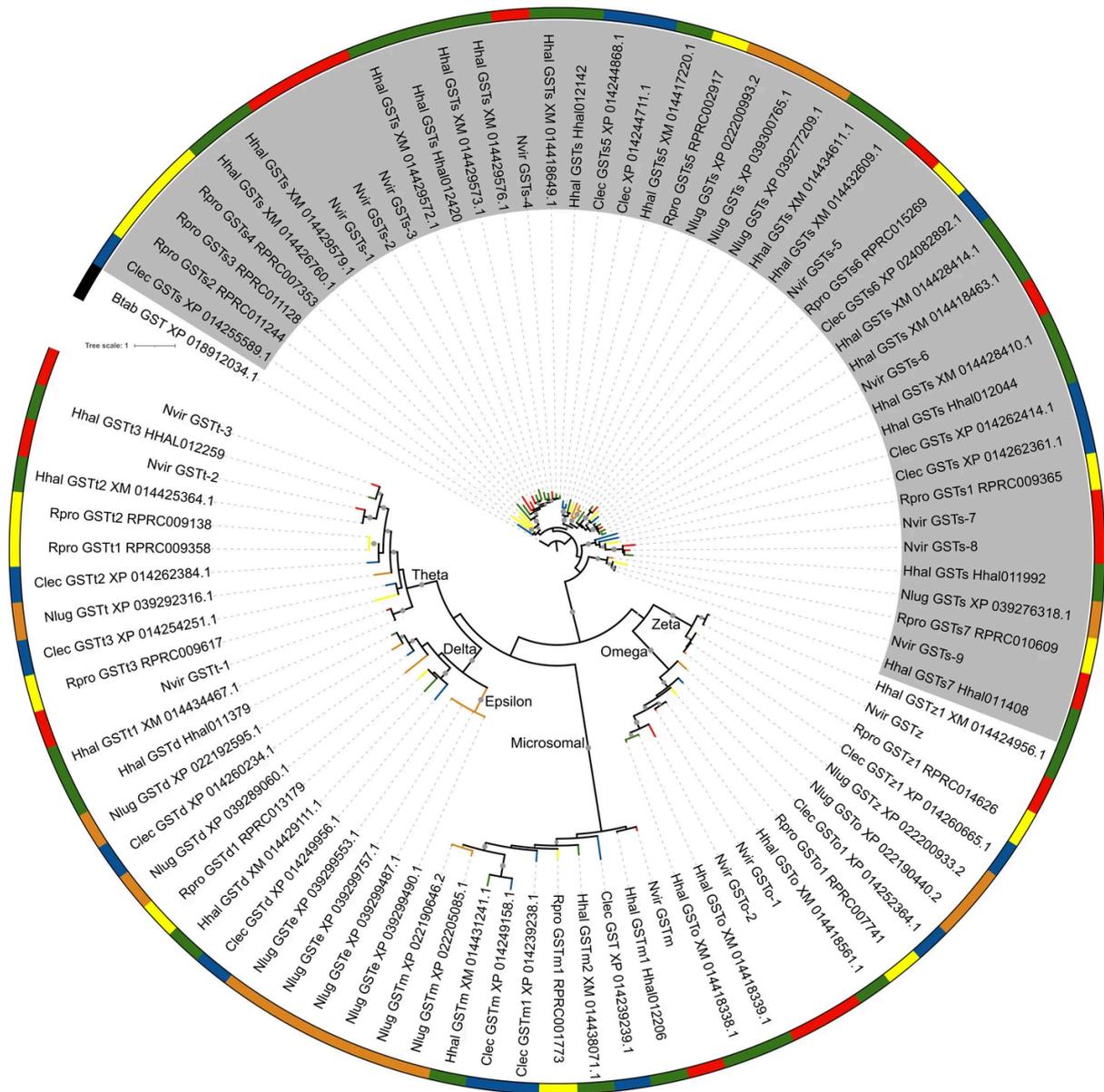


Figura 2.4. Filogenia de la superfamilia GST: de *N. viridula* (rojo: Nvir), *R. prolixus* (amarillo: Rpro), *H. halys* (verde: Hhal), *N. lugens* (naranja: Nlug) y *C. lectularius* (azul: Clec). La clase sigma está resaltada en gris, el resto tiene nombres en el árbol. Se utilizó un GST de *B. tabaci* como grupo externo (XP_018912034.1 - NCBI) y el árbol se enraizó en esta secuencia. Los valores de soporte de rama > 80 están marcados a escala con un círculo gris.

La clase omega tiene un residuo de cisteína en su sitio activo, lo que permite la catálisis de la tiol transferasa y reacciones de reducción que no son catalizadas por las otras clases de GST (Board *et al.*, 2000). En el genoma de *H. halys* detectamos 3 genes de esta clase, 2 en el transcriptoma de *N. viridula* y 1 en los genomas de *N. lugens*, *R. prolixus* y *C. lectularius* (Fig. 2.4, Tabla 2.1).

Se ha propuesto que la clase theta contribuye a la desintoxicación de xenobióticos debido a su acción protectora contra oxidantes y actividad de deshalogenación (Claudianos *et al.*, 2006). *R. prolixus*, *H. halys* y *N. viridula* tuvieron 3 genes de esta clase, mientras que *C. lectularius* 2 y *N. lugens* 1. Finalmente, se detectó 1 gen perteneciente a la clase zeta en cada una de las bases de datos de los hemípteros aquí analizados.

2.5.4 Clusters genómicos y evolución de superfamilias de genes de detoxificación

Los genes parálogos que se originaron a partir de duplicaciones relativamente recientes suelen estar agrupados, o “*clusterizados*” en los genomas. Los genes duplicados que se encuentran en regiones genómicas adyacentes podrían regularse de forma coordinada, lo cual plantea una presión evolutiva para mantener a estos genes organizados en *clusters* (Vieira *et al.*, 2011). Nuestro análisis reveló una correlación lineal positiva entre el número total de genes de detoxificación (familias CYP, CCE y GST) y los genes organizados en *clusters* en el genoma ($R=0,85$, $r\text{-pearson}=0,92$) aunque no fue significativa ($p=0,079$) (Fig. 2.5A). Esta tendencia se mantiene cuando cada superfamilia se considera por separado ($R=0,77$, $r\text{-pearson}=0,88$, $p=0,12$ para GST; $R=0,92$, $r\text{-pearson}=0,96$, $*p=0,04$ para CYP; $R=0,61$, $r\text{-pearson}=0,78$, $p=0,22$ para CCE) siendo significativa en el caso de la superfamilia CYP. Los genes de desintoxicación que formaron *clusters* representaron el 28,9% en *N. lugens*, el 49,13% en *C. lectularius*, el 63,7% en *R. prolixus* y el 56,22% en *H. halys* (Fig. 2.5B).

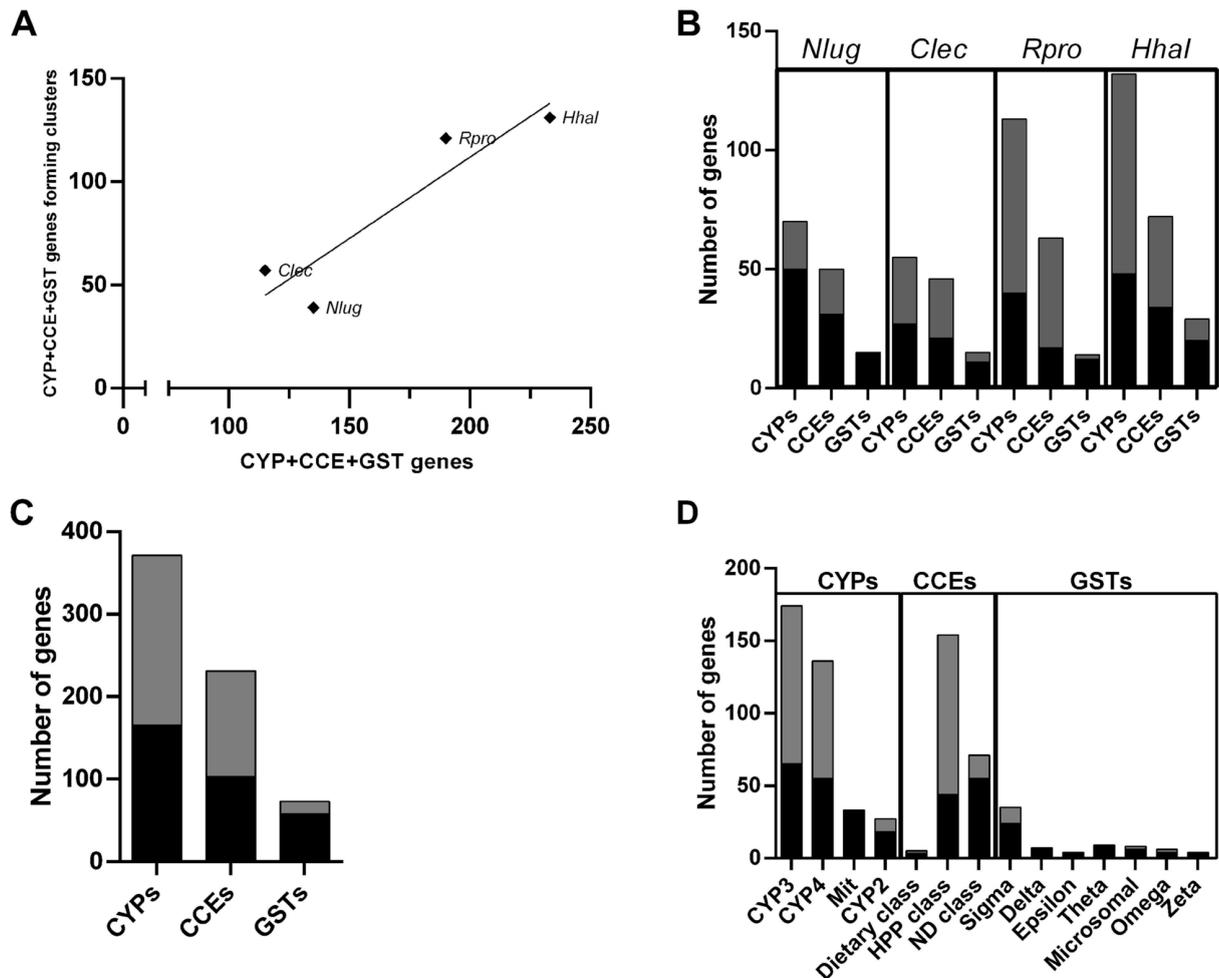


Figura 2.5. Análisis de clusters entre especies y superfamilias. **A)** Genes de detoxificación totales versus genes de detoxificación en grupos para cada especie con genoma disponible ($R=0,85$, $r\text{-pearson}=0,92$, $p=0,079$). **B)** Genes de detoxificación totales versus genes en grupos en *N. lugens* (*Nlug*), *C. lectularius* (*Clec*), *R. prolixus* (*Rpro*) y *H. halys* (*Hhal*) para cada superfamilia bajo el análisis. **C)** Suma de genes totales versus suma de genes en grupos para cada superfamilia bajo el análisis. **D)** Genes totales versus genes en grupos para cada clan/clase bajo el análisis. Barra negra: número de genes no agrupados; Barra gris: número de genes agrupados.

Considerando el total de miembros del CYP identificados en las cuatro especies con secuencia genómica disponible bajo análisis, el 54% forman *clusters*; mientras que para CCE son el 55,6% y para GST 20,5% (Fig. 2.5C). Todas las familias dentro de la superfamilia CYP mostraron una tendencia a agruparse, excepto el clan mitocondrial. CYP2 contiene el 33,3% de los genes en *clusters*, CYP3 el 62,6% y CYP4 el 59,6% (Fig. 2.5D). El gran porcentaje de genes *clusterizados* coincide con una gran cantidad de duplicaciones especie-específicas

observadas en las familias de genes CYP3 y CYP4, lo que sugiere eventos de duplicación recientes.

La mayoría de los genes CYP3 y CYP4 estuvieron agrupados en los heterópteros (Fig. 2.6A); mientras que la mayoría de los genes pertenecientes a CYP2 estuvieron agrupados en las especies hematófagas analizadas. La clase HPP de CCE tuvo el 71,4% de los genes organizados en *clusters* (Fig. 2.6B). Esta tendencia resultó fuerte en Heteroptera y evidente en *R. prolixus* (95% de los genes agrupados) (Fig. 2.6B). En el caso de los GST, la mayor proporción de genes *clusterizados* (cerca del 30%) estuvo dada por las clases sigma, microsomal y omega (Figs. 2.6C).

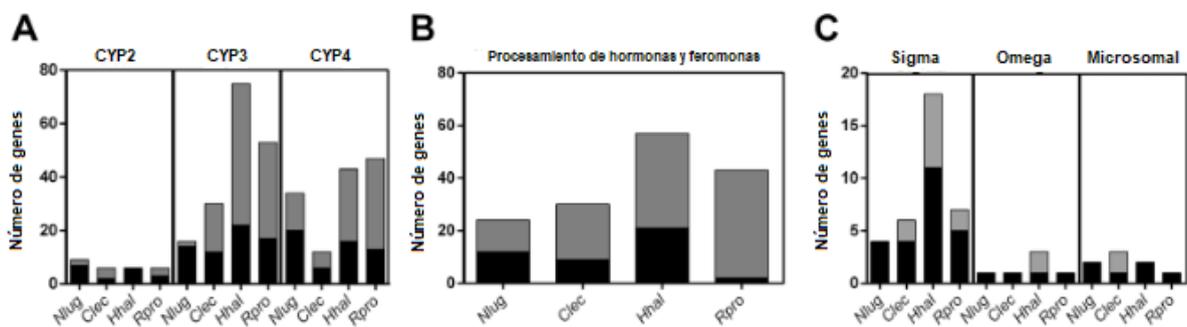


Figura 2.6. Las familias con la mayoría de sus genes codificados en clusters génicos se analizaron especie por especie. A) CYP. B) CCE. C) GST. Barra negra: número de genes no agrupados; Barra gris: número de genes agrupados.

Nuestro análisis de ganancia y pérdida de genes reveló algunos patrones interesantes. El gran número de duplicaciones y pérdidas de genes sugiere que las superfamilias de genes de detoxificación tienen una evolución muy dinámica, con altas tasas de recambio, que dan como resultado genes específicos de linaje. Este patrón evolutivo se asemeja al de las familias de genes quimiosensoriales que, al igual que las familias de genes de detoxificación, tienen un papel en la adaptación al ambiente (Vieira *et al.*, 2011). Entre las superfamilias de detoxificación, la superfamilia CYP fue la más dinámica con un total de 354 eventos (duplicaciones y pérdidas), la mayoría de los cuales fueron duplicaciones, lo que indica que esta familia se encuentra en expansión. Los clanes CYP3 y CYP4 fueron los más dinámicos dentro de la superfamilia (Fig. 2.1, Tabla 2.2). La segunda superfamilia más dinámica fue la CCE, con 235 eventos. La superfamilia GST tuvo menos eventos en comparación, lo que concuerda con tener menos genes que las otras

superfamilias. En general, todas las familias tuvieron más duplicaciones que pérdidas, lo que sugiere una tendencia general de expansión.

Las comparaciones entre especies mostraron una expansión de genes relacionados con la detoxificación en la rama que condujo a los heterópteros fitófagos (Fig. 2.1). Esto es especialmente cierto para las superfamilias CCE y CYP. La superfamilia GST tuvo menos eventos en general, pero también parece ser más dinámica en las especies fitófagas en comparación con las hematófagas. Además, se observó una gran expansión en CYP en *H. halys*, que también tuvo muchas duplicaciones en las otras superfamilias. El elevado número de duplicaciones en linajes fitófagos sugiere que la herbivoría es una dieta adquirida más recientemente, con un ancestro común depredador de todos los heterópteros (Johnson *et al.*, 2018). Una dieta fitófaga representa un importante desafío adaptativo, como resultado de la coevolución entre las plantas que intentan evitar la herbivoría y los insectos que intentan superar la toxicidad de los compuestos químicos producidos por ellas. El amplio complemento de enzimas de desintoxicación, resultantes de la duplicación, podría ser importante en *H. halys* para permitirle alimentarse sobre un amplio rango de especies de plantas. Se ha sugerido que esto es una clave de su éxito como especie invasora a nivel global. *N. viridula* tuvo un patrón muy diferente en nuestro análisis. Esto puede ser debido a que el análisis fue realizado con datos transcriptómicos, no genómicos, dado que se utilizó la información disponible en el momento de los análisis. Debido a que los transcriptomas suelen no representar a todo el complemento génico, es probable que se subestime tanto el número como las duplicaciones de genes, mientras que las pérdidas de genes pueden haberse sobreestimado. A pesar de esto, *H. halys* es un pentatómido polífago con un rango de alimentación mucho más amplio que *N. viridula*, lo que sugiere que la observación de un mayor repertorio de enzimas desintoxicantes que podría estar relacionada con la adaptación de *H. halys* a un rango más amplio de fuentes alimenticias.

A diferencia de las especies fitófagas, no se observaron expansiones significativas en los ancestros hematófagos, que a su vez tuvieron muchas expansiones especie-específicas. La superfamilia GST, sin embargo, parece estar reduciéndose entre los heterópteros que se alimentan de sangre. La hematofagia evolucionó de forma independiente en *C. lectularius* y *R. prolixus* ya que su ancestro común más reciente probablemente fue un depredador (Johnson *et al.*, 2018). Por lo

tanto, tiene sentido que estas dos especies tuvieran una evolución independiente de sus complementos genéticos de detoxificación en respuesta al cambio de dieta, con muchas duplicaciones y pérdidas específicas de cada especie. *R. prolixus*, sin embargo, tuvo muchas más duplicaciones que *C. lectularius*, lo que explica la mayor parte de la gran diferencia en el número total de genes de desintoxicación entre estas dos especies. En particular, hubo una diferencia notable entre las dos especies hematófagas en la dinámica evolutiva de la familia CYP4, en la que *R. prolixus* tuvo 38 duplicaciones, mientras que *C. lectularius* no tuvo ninguna.

2.6 Discusión

Aquí presentamos un análisis comparativo de superfamilias de genes de detoxificación entre especies de heterópteros con diferentes especializaciones alimentarias. La disponibilidad de datos transcriptómicos nos permitió incluir *N. viridula*, una importante plaga de cultivos poco estudiada. Sin embargo, una secuencia genómica completa de la especie es esencial para cerrar brechas en la comprensión de su complemento de genes de detoxificación y en la evolución de estos genes en Heteroptera. Nuestros resultados indican una reducción en varias familias de enzimas asociadas con la detoxificación de xenobióticos en las cuatro especies de heterópteros analizadas aquí, en comparación con especies de insectos de otros grupos: ausencia de la clase épsilon y una clase delta reducida en la superfamilia GST; ausencia de la familia mitocondrial CYP12; ausencia de la familia CYP9 en el Clan CYP3; y ausencia de la clase DD de CCE. Por el contrario, otras familias relacionadas con la desintoxicación se encuentran expandidas en los heterópteros y han tenido una evolución dinámica: el Clan CYP3, HPP en la superfamilia CCE y la clase sigma en la superfamilia GST. Estas características fueron propuestas previamente como particularidades de la subfamilia Triatominae, o incluso para heterópteros no herbívoros (Bailey *et al.*, 2022, Traverso *et al.*, 2017). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que estas particularidades podrían extenderse a todo el suborden Heteroptera.

Nuestro análisis comparativo sugiere que la dieta puede ser un importante impulsor de la evolución de la familia de genes de desintoxicación en Heteroptera. Sin embargo, sería necesario un muestreo de más especies para comprobar esta hipótesis. Por ejemplo, sería interesante incluir más especies pertenecientes a

Cimicomorpha, tanto fitófagas como carnívoras, para separar la dieta de las limitaciones filogenéticas en la evolución de las superfamilias de genes de detoxificación en este grupo. Además, la inclusión de especies fitófagas no pentatómidas permitiría comprobar si el cambio a una dieta herbívora se asocia con un aumento en el repertorio de genes de desintoxicación. Por otro lado, sería interesante estudiar los genes particulares implicados en la evolución paralela de la desintoxicación de compuestos de la sangre en *C. lectularius* y *R. prolixus*. Si bien no se encontraron diferencias contundentes entre los hábitos hemato y fitofágicos, si vimos una expansión del complemento enzimático de *H. halys*, que es la especie con mayor rango de alimentación entre las analizadas. Finalmente, dado que la detoxificación en los insectos se revela como un rasgo extremadamente complejo, que involucra múltiples familias de genes, incluidos transportadores ABC, UDP-glicosiltransferasas, factores de transcripción, proteínas de choque térmico, proteínas quimiosensoriales, proteínas cuticulares e incluso cambios en el microbioma (ver, por ejemplo, Ingham *et al.*, 2018, 2020 y 2021, Sierra *et al.*, 2021, Traverso *et al.*, 2022), un análisis comparativo de familias de genes adicionales dará un panorama más completo del potencial de desintoxicación en diferentes especies.

Capítulo 3:

Identificación y análisis genómico y filogenético de proteínas quimiosensoriales en *Triatoma infestans*

3.1 Introducción

3.1.1 *Sistema quimiosensorial*

Todos los organismos interactúan con el ambiente mediante señales físicas y químicas. Estas últimas son recibidas y traducidas para generar una respuesta fisiológica y/o comportamental, por lo que resultan esenciales en muchos de los procesos de la vida como la búsqueda de pareja, de alimento o supervivencia. Este sistema además es fundamental en la evolución y adaptabilidad de los insectos a diferentes ambientes o los cambios que ocurren en él. La diversidad de sustancias químicas a las que se enfrentan los insectos hace que la sensibilidad y respuesta a estos estímulos ambientales sea fundamental en la supervivencia y desarrollo. Se ha reportado que los insectos que se alimentan de diferentes fuentes o colonizan más nichos poseen un repertorio expandido de familias de proteínas relacionadas con los sistemas sensoriales (Rane *et al.*, 2016).

Se han descrito familias proteicas relacionadas con la quimiorrecepción en insectos: *Chemosensory Proteins* (CSP), *Odorant binding proteins* (OBP), *Odorant receptors* (OR), *Gustatory receptors* (GR) e *Ionotropic receptors* (IR). Estas proteínas están relacionadas con la detección y/o recepción de moléculas solubles y volátiles que pueden ser nutrientes, feromonas sexuales, sustancias aversivas y señales de escape ante depredadores. CSP y OBP son proteínas globulares pequeñas y solubles, mientras que los receptores se encuentran en la membrana de las neuronas quimiosensoriales. Las proyecciones de estas neuronas se ubican dentro de las sensilias, que son estructuras huecas similares a un pelo, llenas de un líquido conocido como linfa sensiliar. Las señales ingresan a las sensilias por los poros en la pared de quitina y se asocian a los receptores difundiendo por la linfa (Sanchez-Gracia *et al.*, 2009). Las primeras proteínas en entrar en contacto con moléculas de olor para su transporte hacia los receptores son las OBP y CSP, secretadas por células de soporte hacia el líquido sensiliar (Leal, 2012). Si bien existen diferencias estructurales entre CSP y OBP, las evidencias indican que ambas pueden unirse a diferentes sustratos de manera similar (Vieira y Rozas *et al.*, 2011). Aunque las CSP son una familia bien conservada y las OBP muy divergentes entre especies (están ausentes en algunas), se cree que pueden tener un ancestro común (Pelosi *et al.*, 2005).

A pesar de sus funciones en la olfacción, se ha descrito la expresión tanto de CSP como de OBP por fuera de tejidos sensoriales. De hecho, existe cada vez mayor evidencia acerca del papel de estas proteínas en diferentes funciones fisiológicas, tales como el desarrollo larval, detección de dióxido de carbono, regeneración de patas, detoxificación de xenobióticos, resistencia a insecticidas, etc. (Ingham *et al.*, 2020, Pelosi *et al.*, 2018).

3.1.2 CSP

Las CSP son pequeñas proteínas solubles de entre 10 y 30 kDa, entre 110 y 150 aminoácidos. Poseen una estructura conservada con 6 alfa hélices y 4 cisteínas que forman una cavidad de unión hidrofóbica, con un péptido señal que es escindido para dar lugar a la proteína soluble. El repertorio de CSP difiere mucho entre especies de insectos. Se les han atribuido funciones relacionadas con la quimiorrecepción, mediante un papel en la solubilización y transporte de moléculas odorantes que suelen ser hidrofóbicas (Leal *et al.*, 2005, Xu *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha revelado que su expresión no se restringe a los tejidos olfativos y, sumado a la diversidad de su dinámica evolutiva, la evidencia indica que actúa en otros procesos y funciones fisiológicas como la detoxificación y la resistencia a los insecticidas (Ingham *et al.*, 2020). La expresión de CSP en diversos tejidos, la variedad de sus ligandos junto con su identificación en organismos que no responden a moléculas transportadas por el aire pueden dar una idea de su nivel multifuncional y sin duda, que juegan un rol crucial en procesos subyacentes a la adaptación a nuevos entornos (Liu *et al.*, 2020). Por ejemplo, en el micro-crustáceo *Artemia franciscana* se ha detectado la expresión en procesos de desarrollo embrionario (Chen *et al.*, 2003). Entre otras funciones por fuera de la olfacción, se ha descrito un papel de CSP en el desarrollo embrionario de la abeja *A. mellifera*, en la regeneración de extremidades en *Periplaneta americana*, como surfactante en la succión de *Helicoverpa armigera* y *Helicoverpa assulta*, etc (Kitabayashi *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 2014, Maleszka *et al.*, 2007, Nomura *et al.*, 1992). Más recientemente, se ha acumulado evidencia de un papel relevante de CSP en la detoxificación de xenobióticos tóxicos provenientes del ambiente o la dieta (Ingham *et al.*, 2023 y 2024, Li *et al.*, 2021) En este contexto, tendrían un papel de transportar y neutralizar moléculas tóxicas, facilitando su excreción. Se ha

documentado la expresión diferencial de CSP en insectos expuestos a insecticidas (Sierra *et al.*, 2021; Traverso *et al.*, 2022), así como en poblaciones resistentes de especies como *B. mori*, *Plutella xylostella*, *B. tabaci*, *Ae. aegypti* y *An. gambiae* (Bautista *et al.*, 2015; David *et al.*, 2014; Ingham *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2014; Xuan *et al.*, 2015). Resultados previos de nuestro grupo de trabajo mostraron una expresión diferencial de 3 CSP de *T. infestans* una hora después de exposición a deltametrina respecto del grupo no intoxicado (Traverso *et al.*, 2022), mientras que también se reportaron cambios en la expresión en antenas luego de la alimentación en *R. prolixus* (Latorre-Estivalis *et al.*, 2022). En el áfido *Aphis gossypii* se reportaron diferencias en la expresión de 8 CSP después del tratamiento con insecticidas de diferente modo de acción; una de ellas aumentó significativamente su expresión independientemente de la dosis utilizada. En *D. melanogaster* se demostró, mediante manipulaciones genéticas de CSP, una disminución de la susceptibilidad frente a neurotóxicos (Li *et al.*, 2021, Xu *et al.*, 2022). Se vió un aumento en la mortalidad de los pulgones *Rhopalosiphum padi* ante la aplicación de dosis subletales de imidacloprid y beta-cipermetrina cuando la expresión de distintas CSP fue disminuída mediante RNAi (Peng *et al.*, 2020). Además, 2 genes CSP (SAP2 y CSP6) se encontraron sobreexpresados en una población de *An. gambiae* resistente a piretroides, en comparación con poblaciones susceptibles. En la misma especie, la expresión de distintos genes CSP se vio modulada por la topicación con deltametrina. El silenciamiento de CSP en *An. gambiae* restableció la susceptibilidad a piretroides en insectos resistentes (Ingham *et al.*, 2020). Por otro lado, se propuso que las CSP expresadas en el intestino del lepidóptero *Spodoptera litura* actúan en la detoxificación de compuestos de las plantas de las cuales se alimenta (Singh *et al.*, 2020). Los trabajos citados, muchos de ellos muy recientes, apuntan hacia una implicación de CSP como moléculas relevantes para la detoxificación en insectos. Esto podría estar relacionado con una estructura compacta y estable que les atribuye un alto nivel de variación dentro del bolsillo de unión, lo cual les permite acomodar diferentes moléculas (Pelosi *et al.*, 2018). En ese sentido podrían secuestrar y enmascarar las moléculas de xenobióticos tóxicos que son de naturaleza hidrofóbica. Las CSP unidas a moléculas de insecticida podrían prevenir la interacción de las mismas con su sitio de acción y así facilitar la detoxificación (Ingham *et al.*, 2020). Por otro lado, en el intestino podrían enmascarar moléculas tóxicas de la dieta, generando complejos solubles y estables para ser excretados

con las heces (Pelosi *et al.*, 2018). El papel de esta familia génica en la detoxificación de xenobióticos no ha sido estudiado hasta la fecha en triatominos. Además, existe poca información en la literatura acerca de las funciones no olfativas de CSP, en particular sobre cómo estarían involucradas el secuestro, transporte y resistencia a insecticidas. En ese sentido, el presente capítulo está orientado a incrementar el conocimiento de la estructura de CSP de *T. infestans*, principal vector de Chagas en el Cono Sur, y sus relaciones filogenéticas con otras especies, que podrían sugerir funciones conservadas.

3.1.3 Genómica de *T. infestans*

T. infestans es un insecto hemíptero perteneciente a la familia Reduviidae y subfamilia Triatominae, de hábito hematofágico obligatorio, a partir de su evolución de insectos predadores (Justi *et al.*, 2017). Con algunas excepciones, ésta familia de insectos se ubica en América ocupando diferentes nichos ecológicos. Históricamente las especies de género *Rhodnius* se ubican en las copas de las palmeras y las *Triatoma* en la tierra, donde se alimentan de aves y mamíferos (Gaunt *et al.*, 2000). Se han adaptado a vivir en hábitats domésticos y peridomésticos de zonas rurales, aunque son cada vez más frecuentes los reportes de aparición en zonas urbanas (Provecho *et al.*, 2021). Estos insectos además poseen la capacidad de transmitir el protozoo *T. cruzi*, que causa la enfermedad de Chagas, con millones de personas afectadas en el mundo. *T. infestans* es uno de los 4 principales vectores y el más importante del Cono Sur. Habita tanto domicilios como peri domicilios, y las poblaciones silvestres suelen invadir zonas habitadas (Gurtler *et al.*, 2023).

A pesar de que *T. infestans* es la especie con mayor relevancia vectorial en nuestra región, muchos de los estudios en triatominos son realizados en *R. prolixus*, un vector relevante en Centro América. Esto se debe a que *R. prolixus* resulta un mejor modelo experimental con mayor facilidad de cría en laboratorio y un ciclo de vida más corto. A esto se suma el hecho de contar con un genoma secuenciado y anotado desde hace casi 10 años (Mesquita *et al.*, 2015), lo cual facilita análisis genéticos, bioinformáticos y moleculares.

Actualmente, una version del genoma de *T. infestans* se encuentra disponible en NCBI (GCA_011037195.1), aunque se trata de un ensamblado altamente

fragmentado (observaciones no mostradas) donde no hay predicción de genes publicada. En el presente Capítulo, analizamos la secuencia genómica de *T. infestans* para caracterizar la familia CSP en la especie, y establecer relaciones filogenéticas que puedan permitir inferencias funcionales. Los resultados son una base para futuros análisis moleculares y fisiológicos de esta familia génica relevante en procesos biológicos clave de adaptación a cambios ambientales.

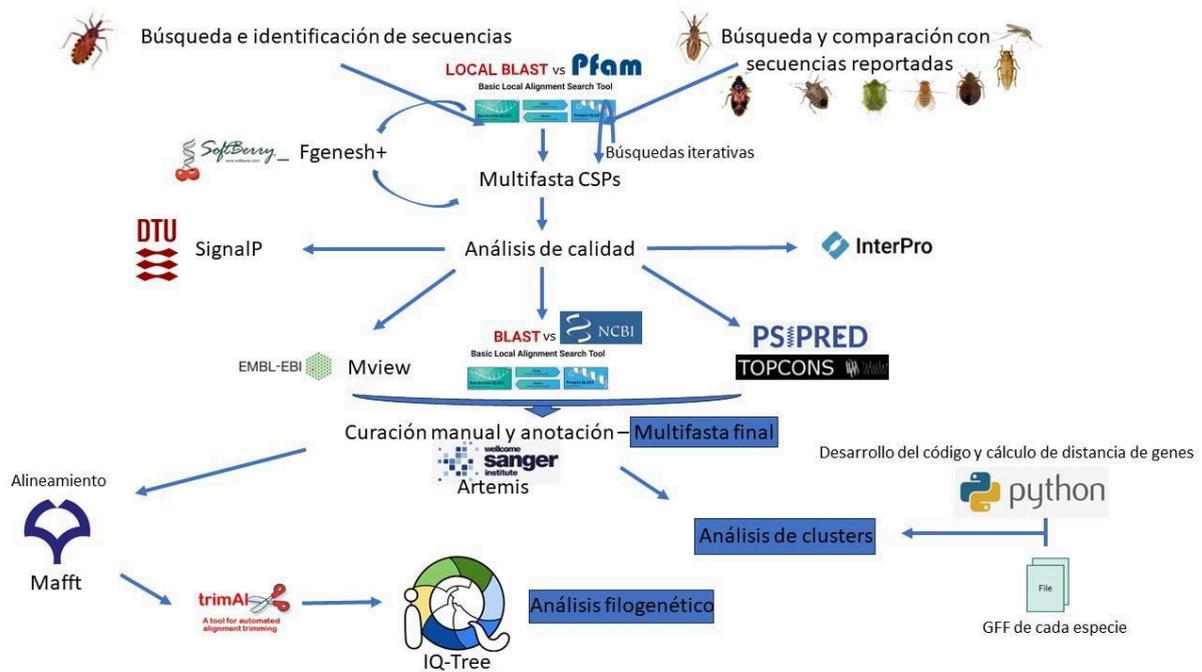
3.2 Hipótesis

- Las CSP mantienen estructura conservada entre especies de insectos, lo cual permite identificarlas en nuevos genomas y realizar análisis filogenéticos.

3.3 Objetivos

- Caracterizar y anotar los genes codificantes para CSP en el genoma de *T. infestans*.
- Realizar análisis filogenéticos para inferir posibles relaciones funcionales.

3.4 Resumen de la metodología utilizada



3.5 Resultados

3.5.1 Identificación y curación de secuencias

Se realizó una búsqueda por homología de secuencias en los genomas de dos especies de dípteros: *An. gambiae* y *D. melanogaster* y siete especies de hemípteros: *C. lectularius*, *H. halys*, *N. lugens*, *N. viridula*, *O. laevigatus*, *R. prolixus*

y *T. infestans* (Tabla 3.1). Los hemípteros analizados tuvieron un número de CSP en sus genomas que fue desde 16 en *O. laevigatus* hasta 26 en *T. infestans*. Si bien los dípteros analizados aquí presentaron un complemento menor (4 para *D. melanogaster* y 8 para *An. gambiae*) se han reportado especies de dípteros con un mayor número de CSP; *Ae. aegypti*, por ejemplo, tiene 42 CSP codificadas en su genoma (Sierra *et al.*, 2021). No parece existir una correlación entre la cercanía evolutiva y el número de CSP en los genomas; *T. infestans* tiene un número más cercano de CSP (26) a los pentatómidos *N. viridula* (25) o *H. halys* (23) que al otro triatómido analizado, *R. prolixus*, con 17 (Tabla 3.1). Esto podría sugerir una expansión reciente en el género *Triatoma*. Las otras especies de hemípteros analizadas, por más que se encuentran más alejadas evolutivamente, presentaron números similares de CSP en sus genomas: 17 en *C. lectularius* y *N. lugens*; 16 en *O. laevigatus* (Tabla 3.1).

Familia/ Especie	<i>An. gam biae</i>	<i>D. melano gaster</i>	<i>C. lectularius</i>	<i>H. halys</i>	<i>N. lugens</i>	<i>N. viridula</i>	<i>O. laevigatus</i>	<i>R. prolixus</i>	<i>T. infestans</i>
CSP	8 (7)	4 (4)	17 (14)	23 (20)	17 (17)	25 (18)	16 (13)	17 (14)	26 (24)

Tabla 3.1. Número de genes CSP en los insectos analizados. Entre paréntesis se marcan cuantas secuencias están completas según el análisis de las características de la familia CSP, en Anexo I: Material suplementario se encuentra la descripción (Tabla S3.1).

Excepto *T. infestans*, las especies analizadas aquí poseen un genoma con sus modelos génicos predichos. Las búsquedas BLASTp realizadas en la base de datos de proteínas predichas de cada genoma arrojaron resultados que fueron comparados con bases de datos transcriptómicas disponibles (Beismann *et al.*, 2002, Benoit *et al.*, 2016, Latorre Estivalis *et al.*, 2022, McKenna *et al.*, 1994, Sun *et al.*, 2020, Wu *et al.*, 2019, Xue *et al.*, 2014, Zhou *et al.*, 2006). Las CSP de cada insecto fueron analizadas en cuanto a longitud, péptido señal, 4 cisteínas conservadas y cantidad de alfa hélices, a fin de confirmar la presencia de los elementos característicos de la familia proteica. Como es esperable los genomas con mayor grado de fragmentación son los que presentan un mayor número de secuencias incompletas, evidenciadas por una o más deficiencias en las

características esenciales de este tipo de proteínas. Sin embargo, se obtuvieron CSP que parecen estar completas en todas las especies. El análisis de calidad de todas las CSP se puede ver en la tabla S3.1 del Anexo I: Material suplementario, en la que vemos que *D. melanogaster* y *N. lugens* son las únicas especies en las que todas las secuencias halladas poseen todas las características conservadas. En *C. lectularius* las proteínas parciales son más evidentes, ya sea por la longitud o la falta de una zona importante como el péptido señal; en el presente trabajo analizamos las predicciones automáticas de los genomas y las mejoramos a fin de obtener datos de mejor calidad. En 2 de las 3 secuencias parciales de *R. prolixus* (Rpro_CSP14 y Rpro_CSP15-NTE) detectamos la falta del péptido señal, cisteínas conservadas y estructura secundaria; la restante careció únicamente de una región hacia el extremo 3'. Faltas sutiles también se dan en 2 de las 3 proteínas parciales de *O. laevigatus* (Olae013075.1 y Olae002861.1) mientras que la tercera es evidente con faltas más importantes (Olae003234.1) (Tabla S3.1 en Anexo). En el caso de *An. gambiae* se encuentra una de las proteínas con la falta de la sexta alfa hélice característica (Agam_CSP7), al igual que 2 de las 3 proteínas parciales halladas en *H. halys* (Hhal_XM_014432270.1 y Hhal_XM_014421395.1-CSP10); la restante además carece de 2 de las 4 cisteínas conservadas, 2 alfa hélices y codón de *stop* (Hhal_XM_014430491.1) (Tabla S3.1 en Anexo). La especie con más proteínas parciales (7 de 25) fue *N. viridula*; algunas de las proteínas parciales de reportes anteriores (Wu *et al.*, 2019) fueron corregidas y se encontró una secuencia previamente no reportada (Nvir_CSP25). Nvir_CSP9, Nvir_CSP12 y Nvir_CSP19 no poseen alguna/s de su/s alfa hélice/s característica/s. Nvir_CSP15, Nvir_CSP17 y Nvir_CSP22 además no presentan péptido señal, mientras que Nvir_CSP23 no tiene codón de *stop* y le faltan 2 alfa hélices.

En el caso de *T. infestans*, se realizó una predicción bioinformática para dilucidar la estructura de cada una de las CSP identificadas en el genoma (Genbank: GCA_011037195.1), dado que esta información no estaba disponible. Una búsqueda inicial reveló la presencia de 21 secuencias de posibles CSP en 14 *scaffolds* diferentes, mediante el modelo de las proteínas que dieron el mejor *hit* de Blast y predicciones automáticas. Se compararon las secuencias detectadas y reconstruidas en el genoma con secuencias transcriptómicas reportadas previamente (Latorre Estivalis *et al.*, 2022, Martínez Barnetche *et al.*, 2018, Traverso *et al.*, 2022), a fin de identificar aquellas que puedan estar ausentes por fallas en la

Nombre	Fuente (Genoma y transcriptomas)	Longitud (aa)	Estado	Péptido o señal	Codón de inicio	Codón de stop	Número de Cys conservadas	Número de Alfa helices *
Tinf_CSP1	+ (1) (2) (3)	128	Completa	Si	Si	Si	4	6
Tinf_CSP2	Sólo en transcriptomas (1) (2) (3)	127	Completa	Si	Si	Si	4	6
Tinf_CSP3	+ (1) (2) (3)	127	Completa	Si	Si	Si	4	6
Tinf_CSP4	+ (2-parcial)	127	Completa	Si	Si	Si	4	6
Tinf_CSP5	+ (1) (2) (3)	126	Completa	Si	Si	Si	4	6
Tinf_CSP6	+ (2) (3)	127	Completa	Si	Si	Si	4	6
Tinf_CSP7	+ (1) (2) (3)	113	Completa	Si	Si	Si	4	6
Tinf_CSP8	+ (1) (2) (3)	133	Completa	Si	Si	Si	4	6
Tinf_CSP9	+ (2-parcial)	109	Completa	Si	Si	Si	4	6
Tinf_CSP10	Sólo en transcriptomas (2) (3)	134	Completa	Si	Si	Si	4	6
Tinf_CSP11	Sólo en transcriptomas (1) (2) (3)	128	Completa	Si	Si	Si	4	7
Tinf_CSP12	+ (1) (2) (3)	130	Completa	Si (0.993)	Si	Si	4	6
Tinf_CSP13	Sólo en transcriptomas (2) (3)	129	Completa	Si (0.924)	Si	Si	4	6
Tinf_CSP14	+ (1) (2) (3)	132	Completa	Si (0.996)	Si	Si	4	6
Tinf_CSP15	+ (1) (2) (3)	131	Completa	Si (0.998)	Si	Si	4	6
Tinf_CSP16	+ (1) (2) (3)	127	Completa	Si (0.998)	Si	Si	4	6

Tinf_CSP17	+ (1) (2) (3)	136	Completa	Si (0.997)	Si	Si	4	6
Tinf_CSP18	Sólo en transcripto mas (1) (2)	133	Completa	Si (0.979)	Si	Si	4	6
Tinf_CSP19	+ (1) (2) (3)	119	Completa	Si (0.985)	Si	Si	4	6
Tinf_CSP20	Sólo en transcripto mas (2) (3)	127	Completa	Si (0.996)	Si	Si	4	6
Tinf_CSP21	+ (2) (3)	127	Completa	Si (0.996)	Si	Si	4	6
Tinf_CSP22	+ (1-parcial)	83	Parcial	Si (0.958)	Si	no	3	4
Tinf_CSP23	+	131	Completa	Si (0.997)	Si	Si	4	7
Tinf_CSP24	+ (2) (3)	126	Completa	Si (0.996)	Si	Si	4	7
Tinf_CSP25	+	127	Completa	Si (0.994)	Si	Si	4	6
Tinf_CSP26	+	107	Parcial	No (0.204)	No	Si	3	6

Tabla 3.2. Análisis de secuencias CSP en *Triatoma infestans*. * Número de alfa helices presentes en la secuencia después del péptido señal. ** Para algunas secuencias, los aminoácidos extra fueron eliminados y la secuencia manualmente corregida basada en homología con los modelos de CSP de otras especies. (+) Identificación y curación de las secuencias en el genoma de *T. infestans*. Una o más secuencias con alto porcentaje de identidad con la hallada en este trabajo fueron reportadas en transcriptomas: (1) Martínez-Barnetche *et al.*, 2018; (2) Traverso *et al.*, 2022; (3) Latorre Estivalis *et al.*, 2022.

Las secuencias de CSP identificadas en el genoma fueron anotadas utilizando el programa Artemis. Esta curación manual de secuencias nos permitió generar un archivo .gff en el que constan las coordenadas exactas de cada secuencia nucleotídica, con los exones e intrones que forman cada gen (ver Información suplementaria S3.2 en Anexo I: Material suplementario). Esta información resulta de utilidad para diseños experimentales y análisis filogenéticos con las CSP de *T. infestans*.

3.5.2 Análisis filogenético

Al igual que en el Capítulo 2, incluimos heterópteros con distintos hábitos de alimentación (hematófagos: *R. prolixus*, *T. infestans*, *C. lectularius*; fitófagos: *N. viridula*, *H. halys*; predador: *O. laevigatus*) un hemíptero no heteróptero de alimentación fitófaga (*N. lugens*). Se incluyeron además dos dípteros, el mosquito *An. gambiae* y la mosca de la fruta *D. melanogaster*, dado que son especies bien caracterizadas, particularmente en cuanto a la familia CSP. Al igual que en el Capítulo 2, consideramos que las proteínas conservadas a nivel de secuencia entre especies lejanas evolutivamente podrían dar indicio de una función conservada en el transporte de moléculas tóxicas asociadas a los distintos tipos de dieta.

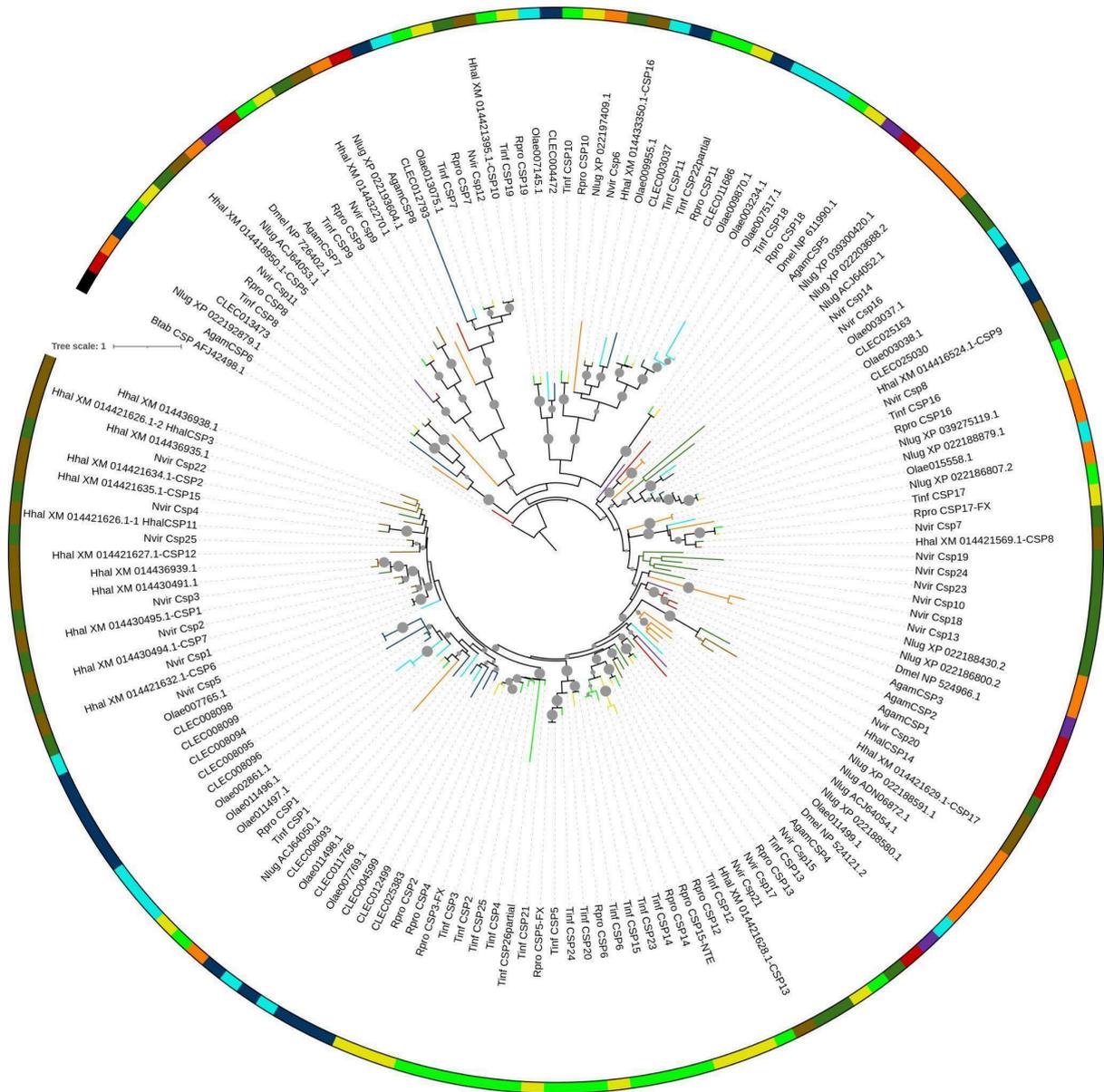


Figura 3.2. Filogenia de la familia CSP: de *N. viridula* (verde oscuro: Nvir), *R. prolixus* (amarillo: Rpro), *H. halys* (marrón: Hhal), *N. lugens* (naranja: Nlug), *C. lectularius* (azul: Clec), *O. laevigatus* (celeste: Olae), *D. melanogaster* (violeta: Dmel), *A. gambiae* (rojo:Agam) y *T. infestans* (verde claro:Tinf). Los nombres de cada CSP están en cada secuencia, los que poseen número de genbank no han sido renombrados aquí. Se utilizó una CSP de *B. tabaci* como grupo externo (AFJ342498.1 - NCBI) y el árbol se enraizó en esa secuencia. Los valores de soporte de rama > 80 están marcados a escala con un círculo gris.

El análisis filogenético (Figura 3.2) evidenció un clado compuesto únicamente por una secuencia de *An. gambiae* y 2 de *N. lugens* (Agam_CSP5, Nlug_XP_039300420.1 y Nlug_XP_022203688.2) que se encuentran alejados del resto de secuencias. El clado donde se encuentra Tinf_CSP8 y su ortólogo Rpro_CSP8 posee una secuencia por cada especie hemíptera analizada

(Nlug_XP_022192879.1, CLEC013473, Hhal_XM_014418950.1-CSP5, Nvir_CSP11), pero está ausente en los dípteros. Los genes Tinf_CSP18 y Rpro_CSP18 conforman un pequeño grupo de ortología cercana exclusivo de triatominos, por lo que podría tratarse de un gen con función específica de su adaptación al medio. Las secuencias de hemípteros Tinf_CSP9, Rpro_CSP9, Nvir_CSP9 y Hhal_XM_014432270.1 se asocian con un soporte mayor a 0.8 con la Agam_CSP7 y Dmel_NP_726402.1, que parecen ser ortólogos en estos dípteros. Nlug_ACJ64053.1, relaciona ese clado con otro conservado para todas las especies analizadas que contiene los ortólogos de triatominos Tinf_CSP7 y Rpro_CSP7, los de pentatómidos Nvir_CSP12 y Hhal_XM_014421395.1-CSP10, asociados con 1 secuencia de *C. lectularius* (CLEC012793) y 1 de *O. laevigatus* (Olae013075.1). Cierran este grupo una secuencia de *An. gambiae* y una de *N. lugens* (Agam_CSP8 y Nlug_XP_022193604.1) aunque en menor relación filogenética que el resto de las secuencias detalladas.

El clado correspondiente a Tinf_CSP19 y Rpro_CSP19 se relaciona con ortología 1:1 con los genes CLEC004471 y Olae07145.1 en lo que podría enmarcarse como un tipo de CSP característico de los heterópteros no pentatomidos. Tinf_CSP10 y Rpro_CSP10 son ortólogos, formando parte de un clado que incluye exclusivamente secuencias de las especies hemípteras. Asociadas a Tinf_CSP11 y Tinf_CSP22parcial se encuentra Rpro_CSP11, 1 secuencia de *N. lugens* (Nlug_XP_022197409.1), 1 de *N. viridula* (Nvir_CSP6) y 1 de *H. halys* (Hhal_XM_014433350.1-CSP16). Este clado presenta 2 secuencias de *C. lectularius* (CLEC003037 y CLEC011686) y una expansión de 4 secuencias en *O. laevigatus*; (Olae009955.1, Olae009870.1, Olae003234.1 y Olae007517.1). Es interesante mencionar la expresión de Tinf_CSP11 se vió disminuída en antena luego de la ingesta de sangre (Latorre Estivalis *et al.*, 2022), por lo que podría ser importante en el proceso detoxificante post prandial o búsqueda de alimento.

Dmel_NP_611990.1 se ubica sólo sin ningún ortólogo cercano; en el clado aledaño se encuentra Agam_CSP5 asociado a 2 secuencias de *N. lugens* (Nlug_XP_039300420.1 y Nlug_XP_022203688.2). Una secuencia de cada uno de los triatominos (Tinf_CSP16 y Rpro_CSP16), 3 secuencias de *N. viridula* (CSP8, CSP14 y CSP16), 2 de *C. lectularius* (CLEC025030 y CLEC025163) 2 de *O. laevigatus* (Olae003037.1 y Olae003038.1) y 1 de *H. halys* (Hhal_XM_014416524.1-CSP9) forman un clado asociado a una secuencia de *N.*

lugens (Nlug_ACJ64052.1). Esta última especie contiene varias secuencias que se separan del resto asociándose entre sí como el caso por un lado de Nlug_XP_039275119.1 y Nlug_XP_022188879.1 y por otro de 4 secuencias (Nlug_XP_022188591.1, Nlug_ADN06872.1, Nlug_ACJ64054.1 y Nlug_XP_022188580.1). Dos secuencias de *N. lugens* (Nlug_XP_022188430.2 y Nlug_XP_022186800.2) se agrupan con la CSP13 de *N. viridula*. En el árbol aparece un clado particular de la chinche verde que agrupa 5 secuencias (Nvir_CSP10, Nvir_CSP18, Nvir_CSP19, Nvir_CSP23 y Nvir_CSP24) con ninguna ortología cercana, lo que podría reflejar un evento de duplicación génica reciente.

Los ortólogos cercanos Tinf_CSP17 y Rpro_CSP17 se relacionan con 1 gen de cada uno de los pentatómidos (Nvir_CSP7 y Hhal_XM_014421569.1), 1 de *N. lugens* y 1 de *O. laevigatus* pero ninguna de *C. lectularius*, en lo que parece un clado específico de hemípteros con una posible pérdida por parte de la chinche de cama (Figura 3.1). De manera similar, hay un clado donde se agruparon únicamente secuencias de dípteros (Dmel_NP_524121.2 y Agam_CSP4), aunque 1 secuencia de *O. laevigatus* parece cercana (Olae011499.1).

Existe una expansión de *An. gambiae* con 3 secuencias emparentadas con un gen de *D. melanogaster* (Dmel_NP_524966.1). Dentro de esta expansión se encuentra la secuencia Agam_CSP2, que fue reportada en la literatura con elevada expresión en poblaciones de mosquitos resistentes a insecticidas, cuya expresión es además inducida por el contacto con piretroides. Estudios funcionales de silenciamiento génico demostraron su implicación en la tolerancia a insecticidas piretroides (Ingham *et al.*, 2020). Esta expansión en un repertorio tan reducido de CSP como es el caso de los 2 dípteros da cuenta de la importancia de estas secuencias en mecanismos de detoxificación de xenobióticos y seguramente de la dinámica evolutiva que permite a esta especie adaptarse a las aplicaciones de neurotóxicos como intentos de control poblacional.

Se agrupan a lo largo del árbol clados específicos de la familia Pentatomidae. Grupos de relación 1:1 como en Nvir_CSP21 y Hhal_XM_014421628.1-CSP13; Nvir_CSP5 y Hhal_XM_014421632.1-CSP6; Nvir_CSP1 con Hhal_XM_014430494.1-CSP7; Nvir_CSP2 con Hhal_XM_014430495.1-CSP1 y Nvir_CSP4 con Hhal_XM_014421635.1-CSP15. Además, en los clados específicos de pentatómidos se encuentran expansiones de *H. halys*. Nvir_CSP20 y Nvir_CSP25 se asocian con la CSP14 y CSP17 y con CSP11 y CSP12 de *H. halys*

respectivamente. La máxima expansión se ve en el clado de Nvir_CSP22, agrupada con 4 secuencias (Hhal_XM_014421626.1-2_HhalCSP3, Hhal_XM_014436935.1, Hhal_XM_014421634.1-CSP2 y Hhal_XM_014436938.1) lo cual puede sugerir una evolución reciente mediante duplicación génica en *H.halys*.

La CSP13 de triatominos se encuentra asociada a la CSP15 de *N. viridula*. Por otro lado la Tinf_CSP12, nombrada por su asociación filogenética con Rpro_CSP12, mantiene una expansión de *T. infestans* presentando tres secuencias extra (Tinf_CSP14, Tinf_CSP15 y Tinf_CSP23) comparado con las 2 extra de *R. prolixus* (CSP14 y CSP15-NTE). Luego parece suceder lo mismo con 2 expansiones de *T. infestans* con respecto a *R. prolixus* en la CSP6 (en la que *T. infestans* presenta CSP6 y CSP20) y en la CSP5 (que presenta Tinf_CSP5 y Tinf_CSP24). La mayor expansión de triatominos se da en el clado en el que se agrupan la CSP2, CSP3-FX y CSP4 de *R. prolixus* con CSP2, CSP3 y CSP4 de *T. infestans*, con el agregado de otras 3 secuencias en esta última (Tinf_CSP21, Tinf_CSP25 y Tinf_CSP26partial). Esto es particularmente interesante dado que Tinf_CSP21 se vió diferencialmente expresada 4 horas después de la topicación con el piretroide deltametrina (Traverso *et al.*, 2022). Por otro lado, una secuencia de cada uno de los triatominos (Tinf_CSP1 y Rpro_CSP1) se asoció directamente con 1 secuencia de *N. lugens* y en cercanía de un mayor número de secuencias de *O. laevigatus* y *C. lectularius* divididas en 2 ramas principales. Allí se encontraron 5 secuencias del depredador y 10 de la chinche de cama, lo que presenta particular interés en cuanto a los hábitos de hematofagia derivados de la especie omnívora y una posible evolución más reciente con ganancia de genes de la especie hematófaga. Las especies de la subfamilia Triatominae que presentaron sólo 1 gen en este clado, pueden haber perdido genes luego de la diferenciación con la especies predadoras y el Cimicidae, respaldando la hipótesis más aceptada que ubica la evolución de la hematofagia en estas dos familias de manera independiente (Li *et al.*, 2017; Weirauch *et al.*, 2019).

3.5.3 Análisis de clusters

Como se ha dicho, aquellos genes físicamente próximos en el genoma tienden a ser regulados de manera conjunta, con patrones de expresión similares en respuesta a un mismo estímulo (Ingham y Nagi 2024). Por ello, resulta relevante

estudiar la disposición genética y la formación de clusters génicos por parte de las familias génicas de interés. A la hora de definir un *cluster* génico, es necesario determinar la distancia promedio entre genes de un genoma, que es particular para cada especie. Si dos genes de una misma familia se encuentran a una distancia menor a dicho promedio, podemos considerarlos como parte de un cluster génico. Dada la extensión variable de regiones no codificantes, no se trata simplemente de dividir el número de genes por el tamaño del genoma. Por ello, en el presente trabajo hemos desarrollado un código computacional que permite calcular la distancia promedio entre genes de un genoma a partir de un archivo .gff. Además, se tuvieron en cuenta variaciones dependiendo del tipo de información y como se encuentra ubicada en el archivo, tales como por ejemplo la columna dónde se encuentra el inicio y final de cada gen, la tecnología con la que se ensambló el genoma y la disposición de la columna dónde se extrae la información de genes y las que no son necesarias (mRNA, *Polypeptide*, etc). El código se encuentra disponible en <https://github.com/gonzalohdominguez/clusters/tree/main>; es de libre acceso y puede ser utilizado para cualquier genoma de interés que se encuentre secuenciado y posea un archivo .gff asociado. En cada genoma analizado, el programa calculó la distancia entre 2 genes adyacentes para todos los genes del genoma. La suma de todos los valores de distancia fueron divididos por el número total de genes generando el promedio (Tabla 3.3).

Especie	Tamaño del genoma (Mb)	Nivel de ensamblado	Número de genes	Distancia promedio entre dos genes adyacentes (pb)
<i>An. gambiae</i>	264.5	Cromosomas	15165	31521
<i>C. lectularius</i>	510.8	<i>Scaffolds</i>	14647	40823
<i>D. melanogaster</i>	143.7	Cromosomas	17872	11490
<i>H. halys</i>	998.2	<i>Scaffolds</i>	16831	21509
<i>N. lugens</i>	1100	Cromosomas	20891	6039
<i>N. viridula</i>	1200	Cromosomas	15972	59602
<i>O. laevigatus</i>	151	<i>Scaffolds</i>	18107	5827
<i>R. prolixus</i>	706.8	<i>Scaffolds</i>	15738	34212

Tabla 3.3. Distancia promedio entre genes calculada a partir del código detallado anteriormente.

Como se ve en la Tabla 3.3, la distancia promedio entre dos genes es muy variable con dependencia de cada especie y genoma, incluso entre especies con genomas ensamblados a nivel de cromosoma tales como *An. gambiae*, *N. lugens* o *D. melanogaster* (31521, 11490 y 6039 pb de distancia en promedio entre genes adyacentes, respectivamente). Con la información obtenida, pudimos definir los *clusters* génicos con un criterio no arbitrario, que permitió un análisis más preciso.

En cada uno de los genomas, se cuantificó la distancia medida en pb entre el final de un gen codificante para una CSP y el inmediato siguiente en el mismo *scaffold* (para *C. lectularius*, *H. halys*, *O. laevigatus* y *R. prolixus*) o cromosoma (para *An. gambiae*, *D. melanogaster*, *N. lugens* y *N. viridula*). Aquellos genes ubicados a una distancia igual o menor al promedio de pb de distancia entre dos genes adyacentes en cada genoma fueron considerados como parte de un mismo *cluster* génico. Dado que el genoma de *T. infestans* no se encuentra anotado, no pudimos cuantificar la distancia promedio entre genes, por lo que se tomó un estimado de 35kb al ser cercano al promedio de la especie evolutivamente más cercana y con valores similares de sus características genómicas (Fig. 3.2).

La presencia de genes en *clusters* se asocia con una regulación conjunta, que hace que, luego de eventos de duplicación génica, exista una presión evolutiva para que los genes se mantengan agrupados (Leask *et al.*, 2021, Mulhair *et al.*, 2023). Observamos que los genes de la familia CSP de las especies analizadas en conjunto tienen una tendencia a conformar *clusters* génicos, con más del 50% de los genes ubicados entre sí a una distancia promedio menor que el promedio general de cada genoma. Existe una correlación lineal positiva y significativa entre el número de genes CSP en cada genoma y el número de los mismos agrupados en *clusters* génicos (Figura 3.2A: $R=0,5834$, $r\text{-pearson}= 0,7638$, $*p=0,0166$). Esto sugiere la existencia de eventos de duplicación génica y una presión evolutiva por mantener los genes agrupados y regulados de manera conjunta. Esta tendencia es sobre todo evidente para *An. gambiae* con 7 genes CSP en *cluster* sobre 8 totales, y en *N. viridula* con 16 de 21 genes agrupados (Figura 3.2B). Por su parte las especies *H. halys*, *C. lectularius* y *D. melanogaster* tienen el 50% o más de sus genes CSP agrupados en el genoma (13/20, 10/17 y 2/4 respectivamente). Por debajo del 50% se encuentran *N. lugens* (8 de 17), *Orius laevigatus* (6/16), *R. prolixus* (9/19) y *T. infestans* (7/19). En el caso de *T. infestans*, dado que algunos

transcriptos fueron identificados únicamente en transcriptomas y que se trata de un genoma con un alto grado de fragmentación, este valor puede estar subestimado. En los otros genomas fragmentados (*C. lectularius*, *H. halys*, *O. laevigatus* y *R. prolixus*) estos valores también podrían estar subestimados si genes adyacentes hubieran quedado ubicados en diferentes *scaffolds*.

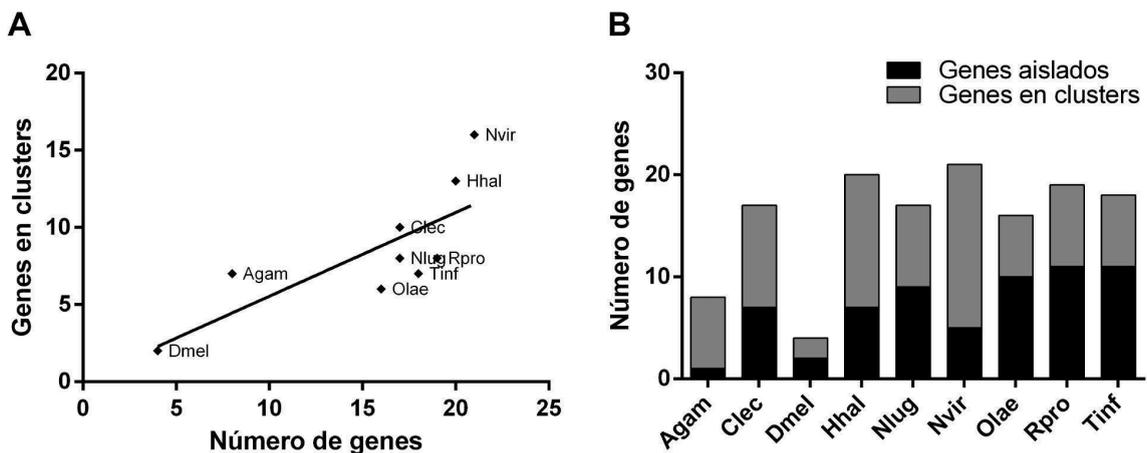


Figura 3.2. Análisis de clusters. A) Regresión lineal del total de genes versus la cantidad de genes que forman clusters en cada especie, analizando la relación entre cantidad y formación de *clusters* ($R=0,5834$, $r\text{-pearson}=0,7638$, $*p=0,0166$). B) Número total de genes y los que se ubican en *clusters* de cada especie por separado analizando la tendencia individual y de hábitos alimenticios.

3.6 Discusión

En el presente capítulo se abordó la anotación y caracterización en *T. infestans* de una familia génica cuya relevancia en detoxificación y resistencia a insecticidas es cada vez más evidente. Hasta nuestro conocimiento, es la primera familia génica en ser profundamente caracterizada en la especie mediante la utilización de datos tanto transcriptómicos como genómicos, dado que resultados previos utilizaron únicamente bases de datos transcriptómicas (por ejemplo Traverso *et al.*, 2016, 2017 y 2022). Identificamos 26 CSP de las cuales 20 están presentes en el genoma y otras 6 solamente en transcriptomas. Dado que se trata de una base de datos con una calidad menor a la media de los genomas de insectos, sin anotaciones génicas ni caracterizaciones profundas, consideramos que los 6 transcriptos faltantes serán identificados una vez que el genoma de la especie sea re-secuenciado y analizado. Los 26 transcriptos identificados fueron nombrados de

acuerdo a su relación con las CSP de *R. prolixus*, donde fueron previamente reportadas (Mesquita *et al.*, 2015). Las relaciones de ortología podrían indicar funciones similares en las especies, hipótesis que podrá ser ensayada en análisis genéticos y fisiológicos hacia futuro.

Datos no publicados de nuestro grupo indican que CSP8, CSP11, CSP17 Y CSP19 podrían tener una interacción molecular fuerte con el piretroide deltametrina, de acuerdo a modelados de *docking* molecular; por otra parte CSP11 y CSP17 de *T. infestans* presentaron una expresión alterada después de la ingesta de sangre (Latorre Estivalis *et al.*, 2022), lo que podría sugerir la implicación de estas proteínas en triatominos en distintos procesos de detoxificación. El análisis filogenético junto con la dinámica de agrupamiento de genes permite proponer genes candidatos para el estudio de su función en un entorno de detoxificación y resistencia a insecticidas. En el presente trabajo encontramos genes candidatos para el estudio de detoxificación tanto en *T. infestans* y *C. lectularius* como en los fitófagos *N. viridula* y *H. halys*, a partir de sus relaciones filogenéticas con genes con evidencia funcional en *An. gambiae* y *T. infestans* (Ingham *et al.*, 2023, Latorre Estivalis *et al.*, 2022, Traverso *et al.*, 2022). La ubicación de genes clusterizados en los genomas, además de sugerir una regulación conjunta, puede indicar funciones similares. Finalmente, en el presente capítulo presentamos el desarrollo de un código que nos ha permitido refinar los estudios de clusterización de familias génicas en los genomas, y que se encuentra disponible para su uso.

Análisis funcional de CSP en *Rhodnius prolixus*

4.1 Introducción

4.1.1 Fisiología y CSP en *R. prolixus*

Como se mencionó anteriormente, las CSP en insectos han sido estudiadas principalmente en el contexto de la percepción sensorial. La evidencia acumulada, sin embargo, propone estudiar su rol en otros contextos y en la regulación fisiológica en general. En insectos triatominos, resultados transcriptómicos han demostrado la regulación de la expresión de CSP en respuesta a un insecticida (Traverso *et al.*, 2022), por la alimentación (Latorre estivalis *et al.*, 2022), con dependencia del sexo o el hábitat (Marchant *et al.*, 2016), pero hasta la fecha no existen resultados experimentales que indiquen el papel fisiológico de proteínas de esta familia. Los patrones de expresión revelados por estudios transcriptómicos en triatominos indican que las CSP, de manera similar a lo que ocurre en otras especies, podrían participar en procesos detoxificantes, comunicación intraespecífica, adaptación al entorno, etc.

Como se manifiesta en el Capítulo 1 de la presente Tesis, la técnica de ARN de interferencia es especialmente eficiente en *R. prolixus* para el estudio de la función de genes; hasta el momento no había sido utilizada para analizar el papel de CSP en esta especie, pero sí en otras. Así, se ha demostrado un papel CSP en la resistencia a diferentes insecticidas por parte de *A. gossypii* (Xu *et al.*, 2022), y en la resistencia a piretroides por parte de *An. gambiae* (Ingham *et al.*, 2020). En el áfido *R. padi*, a partir del silenciamiento de 3 genes CSP se demostró la implicación en el comportamiento de localización de hospederos (Peng *et al.*, 2021). En *N. lugens*, se investigó la CSP8 (Nlug_ACJ64054.1 de nuestro trabajo) mediante RNAi en experimentos conductuales, que demostraron una menor respuesta a los atrayentes en insectos silenciados para la expresión del gen (Waris *et al.*, 2018). En un ensayo similar en el lepidóptero *Mythimna separata*, la disminución de la expresión de la CSP8 afectó la respuesta del insecto a semioquímicos, demostrando la contribución de esta proteína en los procesos de respuesta a compuestos volátiles de plantas (Younas *et al.*, 2018). Por otro lado, se demostró por RNAi en el coleóptero *Galeruca daurica* que una CSP juega un rol fundamental en la detección de al menos 8 compuestos volátiles de hospederos por parte de hembras, pero no de machos, lo que resulta interesante para investigar las diferencias funcionales entre sexos, posiblemente relacionadas con oviposición. Recientemente mediante RNAi en

machos del lepidóptero *Athetis lepigone* se vió que una CSP está directamente relacionada a la detección de al menos 2 feromonas sexuales y 3 volátiles de maíz, de acuerdo con resultados de electroantenografía. Además, la tasa de reproducción disminuye en un 37,5% con machos tratados respecto al control (Li *et al.*, 2023). En el hemíptero *B. tabaci* se reportó una reducción en la oviposición de los días 1, 3, 7 y 10 luego de la alimentación en hembras silenciadas para *BtabCSP11* con respecto al control (Zeng *et al.*, 2020). En el coleóptero *Ophraella communa* se encontró una reducción significativa en la oviposición cuando CSP12 fue silenciada (Ma *et al.*, 2019). Estos ejemplos entre otros, dan cuenta de la factibilidad de la técnica de RNAi en los análisis funcionales para el estudio de CSP, al tiempo que se verifica la importancia de esta familia proteica en funciones diversas, tales como la búsqueda de hospedero, pareja, detección de peligro, detoxificación de compuestos volátiles y procesos reproductivos. A pesar del progreso significativo del estudio de CSP en los últimos años, el conocimiento sigue siendo reducido sobre todo en cuestiones fisiológicas y comportamentales, y prácticamente nulo en triatominos.

Si bien hemos mencionado las ventajas de utilizar *R. prolixus* como modelo, la reciente publicación del genoma de *T. infestans* es un incentivo para realizar estudios en el principal vector de la enfermedad de Chagas en nuestra región. A pesar de esto, la anotación del genoma está en proceso y su disponibilidad es primordial para la realización de determinados estudios en esta especie, sobre todo en aquellos que implican análisis funcionales de genes. Además, desde hace aproximadamente un siglo se utiliza *R. prolixus* para investigaciones relacionadas a comportamiento y fisiología de triatominos a partir del investigador pionero en fisiología de insectos, V.B. Wigglesworth (Wigglesworth, 1934, Wigglesworth, 1939, Wigglesworth, 1953, Wigglesworth, 1954, Wigglesworth, 1959, Wigglesworth, 1964). Por otra parte, la cría de *R. prolixus* en insectarios resulta más eficiente que la de *T. infestans*, dado su ciclo vital y tasa reproductiva. En ese camino, en nuestro laboratorio se han realizado numerosos estudios fisiológicos y comportamentales utilizando este modelo, para el cual mantenemos una colonia desde hace más de 15 años, que se renueva regularmente con individuos cedidos gentilmente por UnOVe-ANLIS-Malbrán (antes CEREVERE). Si bien tenemos experiencia en trabajos con *T. infestans*, la técnica de RNAi la hemos aplicado en el silenciamiento de distintos genes en *R. prolixus* con un alto porcentaje de eficiencia, por lo que la elección para realizar el silenciamiento para el estudio de la función de CSP no sólo

se basa en la factibilidad sino también en que el genoma se encuentra anotado con los genes CSP identificados (Latorre Estivalis *et al.*, 2022).

Como estrategia de RNAi, en el presente trabajo utilizamos el silenciamiento conjunto de varias CSP con un mismo dsARN. Dado que existe una alta similitud de secuencias entre CSP de la misma especie, su función podría ser redundante y enmascarar los efectos de silenciar solo una. Además, de acuerdo al fenómeno de compensación génica, existen mecanismos de dosificación génica para contrarrestar los efectos a la baja de la expresión de genes parálogos (Diss *et al.*, 2014; Zuo *et al.*, 2022). Por lo anterior, utilizamos un dsRNA que abarca una región común entre 5 CSP, con el objetivo de silenciar todas en el mismo experimento (Figura 4.1). Se eligieron esas 5 porque tienen una alta similitud de secuencia entre sí; además, contamos con información preliminar que indica la regulación de alguno de estos transcritos después de la ingesta de sangre (resultados no publicados).

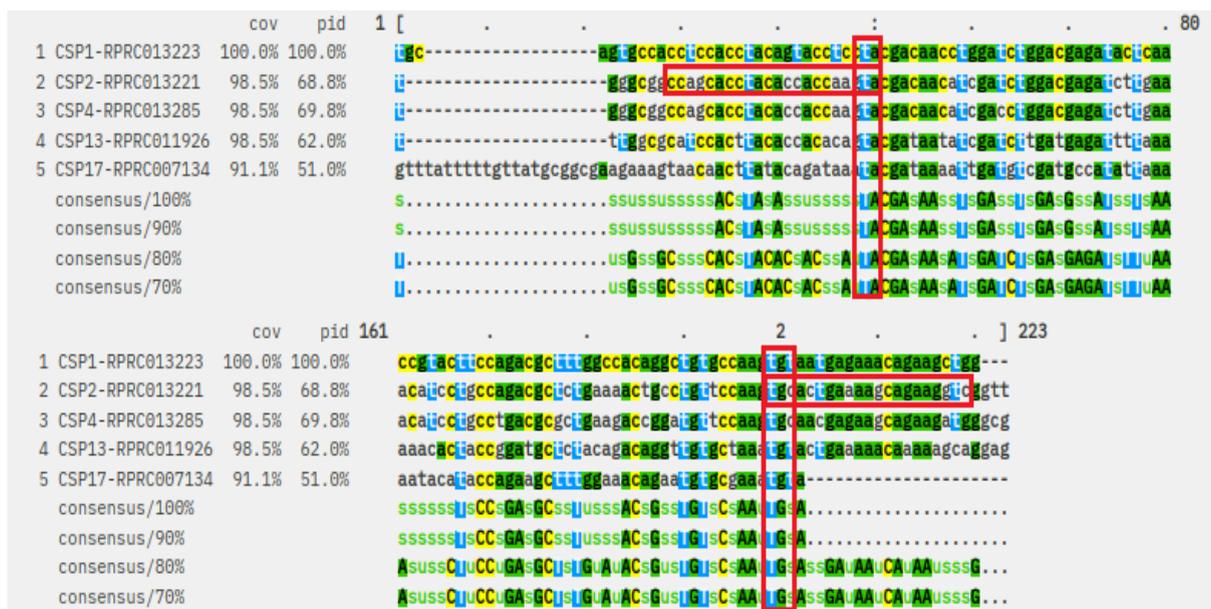


Figura 4.1. Alineamiento de secuencias nucleotídicas abarcadas por los primers diseñados para interferencia. Alineamiento realizado en MAFFT y visualizado en MView (ver materiales y métodos) para reconocer las secuencias de CSP1, CSP4, CSP13 y CSP17 de *R. prolixus* que mantienen un alto porcentaje de ID (>50%) con el amplicón de CSP2 y sobre todo en los últimos 2-3 nucleótidos del 3' del *primer forward* y *reverse* (100%ID). Con rojo se recuadran los primers específicos diseñados y los últimos nucleótidos del extremo 3'.

Si bien los *primers* de interferencia se diseñaron sobre la secuencia RPRC013221, las otras 4 (RPRC013223, RPRC013285, RPRC011926 y

RPRC007134) poseen un porcentaje de identidad superior al 50% en todo el amplicón y mayor similitud en las zonas del extremo 3', donde la diferencia nucleotídica para la selección individual se hace más importante. En ese sentido y teniendo en cuenta el corte por parte del complejo Dicer-2 en secuencias de 21-24 nt entendemos que el silenciamiento será eficiente en al menos 5 de esas secuencias.

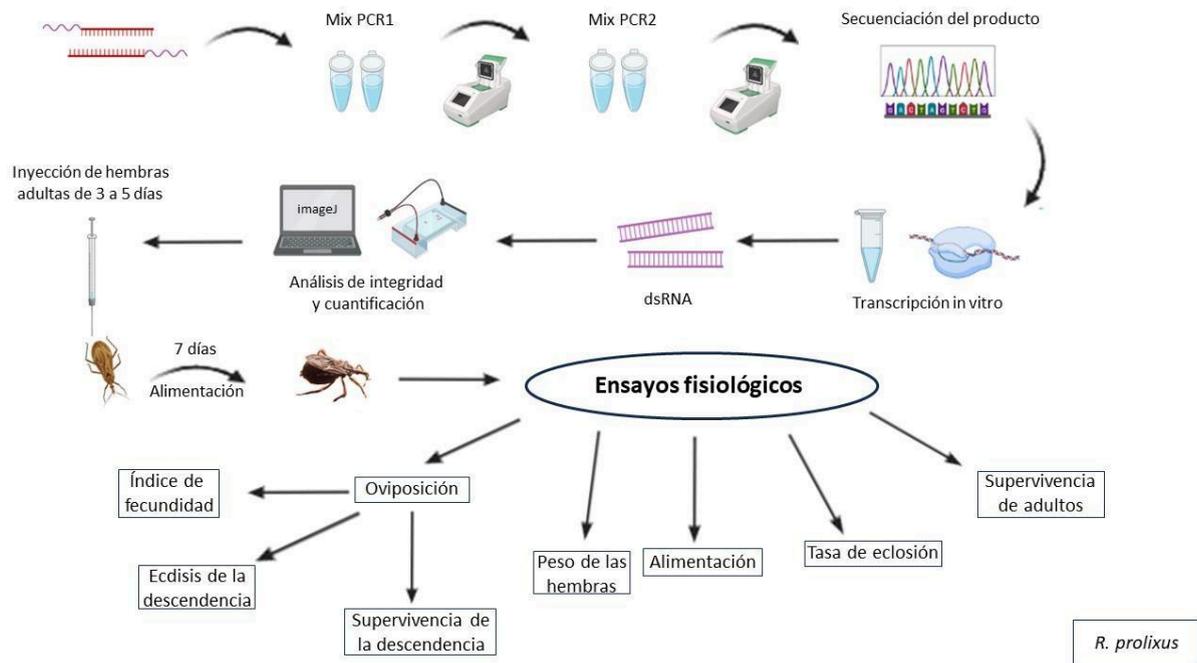
4.2 Hipótesis

- El silenciamiento génico en conjunto de CSP en *R. prolixus* permitirá inferir funciones de esta familia génica en la especie.
- Las proteínas CSP tienen un papel en la supervivencia y/o reproducción en hembras adultas de *R. prolixus*

4.3 Objetivo

- Demostrar la eficiencia de silenciamiento en CSP de *R. prolixus*.
- Estudiar los efectos del silenciamiento génico en la alimentación, reproducción y supervivencia en hembras adultas y ninfas de primer estadio en *R. prolixus*.

4.4 Resumen de la metodología utilizada



4.5 Resultados

4.5.1 CSP en reproducción y supervivencia de *R. prolixus*

El día 7 después de la inyección, 6 hembras de cada grupo (tratado: silenciamiento conjunto de CSP; control: dsRNA inespecífico) se utilizaron para confirmar la baja en la expresión según lo detallado en Materiales y Métodos. Se identificó una disminución en los niveles de expresión de la CSP2 del 66,7% (+/- 6,27) para el grupo dsCSP comparado con el control (Figura 4.2). Si bien aún no fue evaluado, consideramos que el tratamiento generará niveles similares de silenciamiento de genes parálogos, dada la similitud de secuencia.

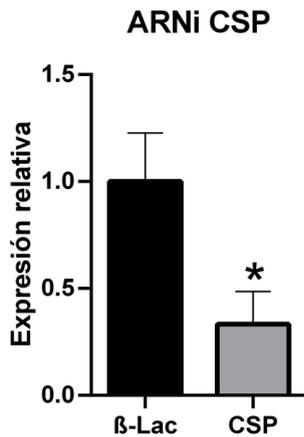


Figura 4.2. Niveles de expresión de dsCSP2 (RPRC013221) en hembras de grupo control inyectado con dsB-Lac y hembras tratadas inyectadas con dsCSP. Se utilizaron 6 hembras por grupo para medir los niveles de ARNm de cada gen. Se observó una disminución del 66,7 +/- 6,27% de la expresión. Se representan las medias +/- SEM. Los niveles de cada individuo fueron relativizados al promedio del grupo control (t student *= p<0,05, n=6).

Cuando analizamos tanto el peso de las hembras como el peso de la sangre ingerida no hubo diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 4.3A y B). Tampoco encontramos diferencias entre los grupos en cuanto al índice de fecundidad en hembras tratadas y control (Fig. 4.3C): 2,67 (+/- 0.18) en dsCSP y 2,74 (+/- 0.19) en dsB-Lac. Es decir que al final del experimento ambos grupos pusieron un número similar de huevos. Se analizaron potenciales diferencias en el día de eclosión de los huevos (resultados no mostrados), como así también en el porcentaje de eclosión, sin observarse diferencias significativas con un 87,23% (± 2.96) en dsB-Lac y 88,38% (± 2.136) en dsCSP (fig. 4.3D).

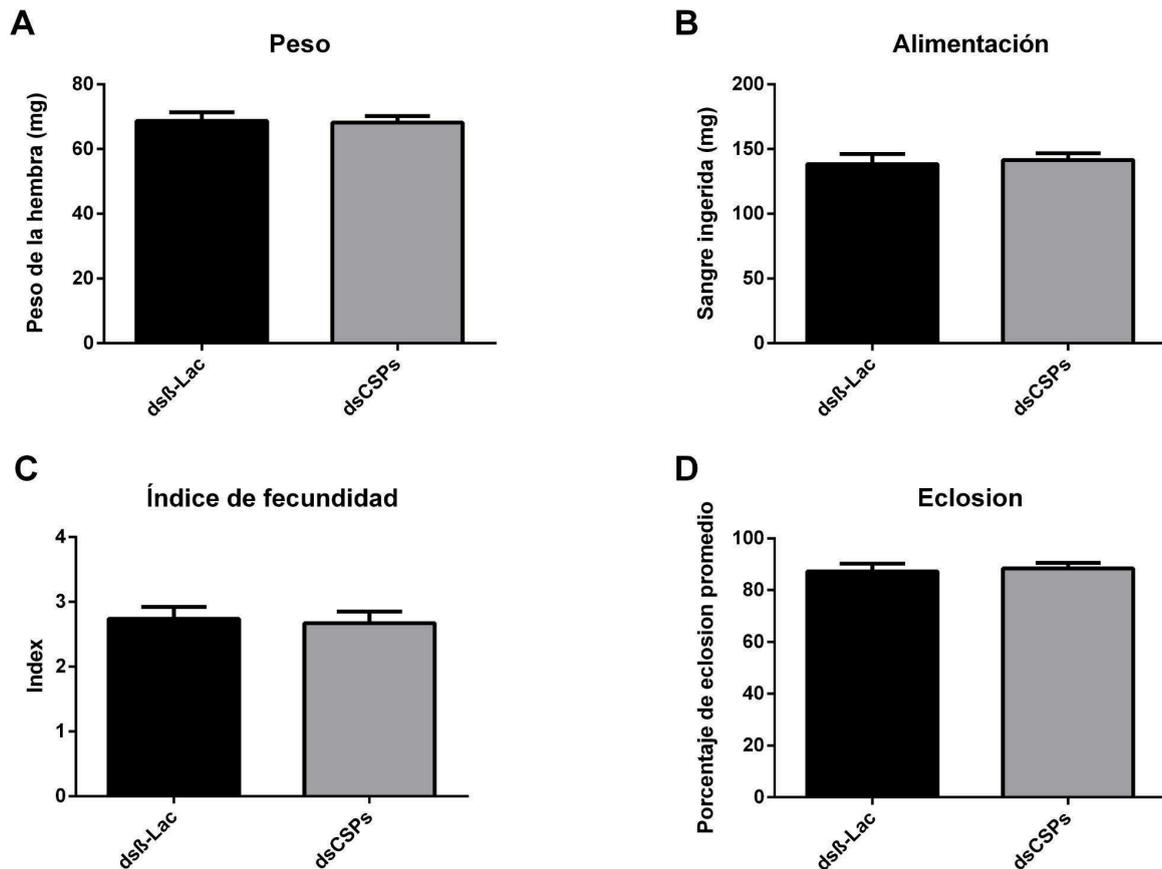


Figura 4.3. Efecto del silenciamiento conjunto de CSP en hembras de *R. prolixus* **A) Peso de las las hembras.** (n=35 dsB-Lac y n=37 dsCSP). **B) Miligramos de sangre ingerida.** (n=32 dsB-Lac y n=37 dsCSP). **C) Índice de fecundidad** (n=26 dsB-Lac y n=29 dsCSP). **D) Porcentaje de huevos eclosionados por hembra** (n=25 dsB-Lac y n=28 dsCSP). Se muestran en conjunto los resultados de 3 experimentos independientes. CSP: grupo tratado; B-lac: grupo control.

Si bien el índice de fecundidad al igual que el número acumulado de huevos puestos por hembra fue similar entre ambos grupos (Fig. 4.3C y 4.4B), la curva de oviposición diaria sí mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales en dos días diferentes (Anova de 2 factores; N=29 para B-Lac y N=32 para CSP; **p<0,01). En hembras silenciadas para CSP fue más alta en los primeros días evaluados respecto de las control, mientras que la tendencia se revirtió a partir del día 7. Así entonces, el número de huevos puestos el día 5 es significativamente más alto en las hembras tratadas con dsCSP respecto al control (**p<0.01; N=29 para B-Lac y N=32 para CSP), mientras que en el día 10 el número de huevos puestos por las hembras control fue significativamente más alto (**p<0.01; N=29 para B-Lac y N=32 para CSP).

Las hembras silenciadas para CSP aceleran el proceso de oviposición, sobre todo una tendencia desde el día 1, que se hace significativa el día 5. Este resultado apunta a un desarrollo ovárico acelerado, que podría responder a una situación de estrés que, bajo amenaza de una menor supervivencia, tiende a dejar descendencia anticipadamente (Fig. 4.4B).

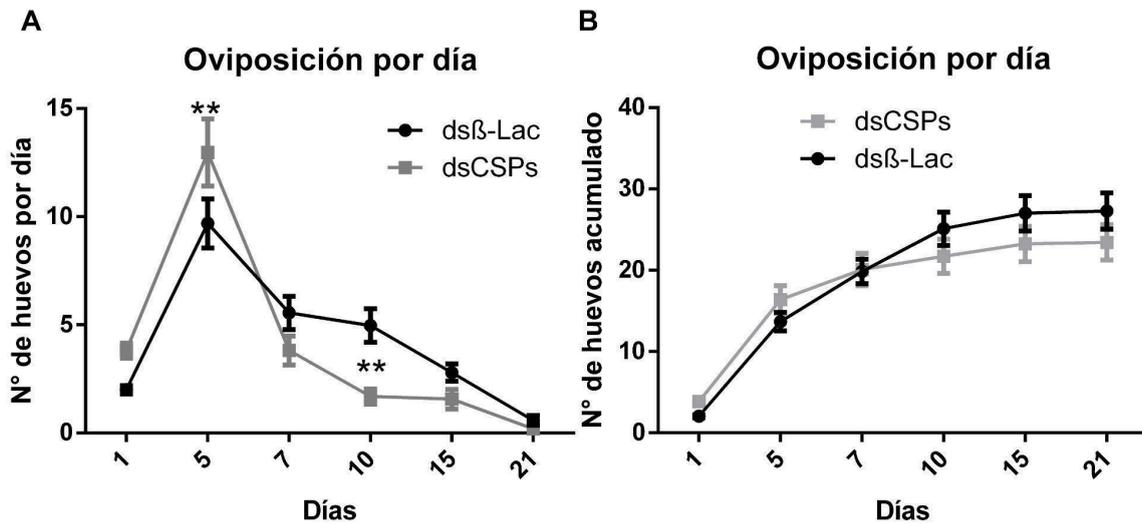


Figura 4.4. Oviposición diaria A) Número de huevos puesto cada día de conteo. B) Número de huevos acumulado. ANOVA de dos factores con comparación múltiple de Sidak (n=29-32, **=p<0.01).

Siguiendo en esta línea, las curvas de supervivencia mostraron que las hembras silenciadas para CSP murieron antes (p<0.005) (Fig. 4.6). Mientras que hasta el día 50 aproximadamente las hembras se comportaron de forma similar en ambos grupos, se observó que en los siguientes 20 días el resto de las hembras silenciadas para CSP mueren anticipadamente (p<0.005) (Fig. 4.6) .

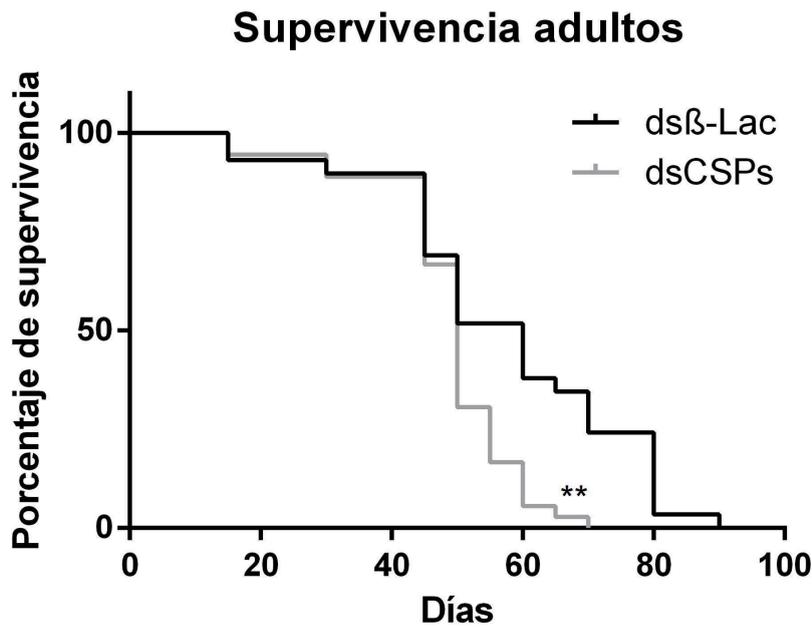


Figura 4.6. Curva de supervivencia de hembras adultas tratadas con dsCSP y dsB-Lac. (kaplan meier, n=29 B-Lac y 36 CSP, ** p=0,0022).

Finalmente, se analizaron las curvas de supervivencia de las ninfas eclosionadas, no alimentadas, a partir de los huevos depositados por las hembras de ambos grupos experimentales. Si bien las diferencias en la supervivencia de ambos grupos no resultaron significativas, la tendencia observada es similar a lo que obtuvimos con las hembras adultas, con una tendencia a una mortalidad anticipada para el grupo tratado con dsCSP (Fig. 4.7). Un grupo de ninfas de cada grupo experimental fue alimentado, y se evaluó el tiempo hasta completar la ecdisis, que fue similar en ambos grupos experimentales (resultados no mostrados).

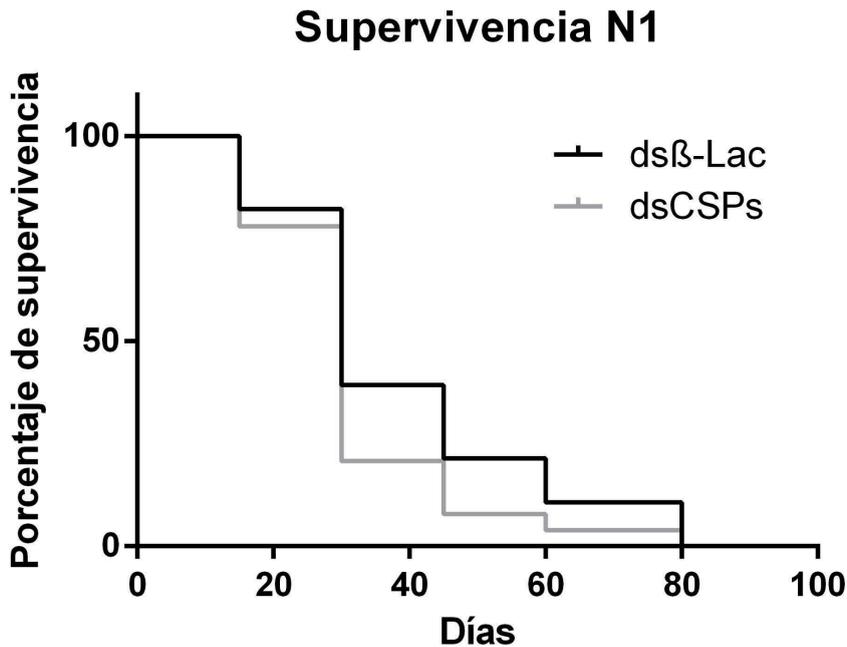


Figura 4.7. Curva de supervivencia de ninfas 1 eclosionadas a partir de huevos puestos por hembras silenciadas con CSPdc y B-Lacdc. (kaplan meier, n=150, p>0,05).

4.6 Discusión

En este Capítulo presentamos por primera vez un análisis funcional de CSP en triatominos, con herramientas de silenciamiento génico. Se utilizó para ello una secuencia de dsRNA que abarcaría al menos 4 transcritos a la vez, a fin de evitar efectos de compensación entre genes parálogos con secuencia conservada. La estrategia utilizada fue exitosa al menos para el silenciamiento de una de ellas y para obtener resultados funcionales, y podrá ser utilizada para profundizar la función de este grupo de CSP en *R. prolixus*.

Los resultados evidenciaron que los insectos que expresan bajos niveles de CSP no presentan alteraciones en la alimentación evidentes respecto a los controles. Sin embargo, al analizar las curvas de oviposición, observamos que los insectos silenciados comienzan a poner un número mayor de huevos de manera más temprana que los controles, y la curva de oviposición cae de manera más abrupta, lo cual hizo que el número total de huevos puestos grupos fuera similar entre ambos. Esto podría indicar una aceleración en el desarrollo ovárico, que será evaluada de manera directa en experimentos futuros. En ensayos preliminares (no mostrados) realizamos el silenciamiento génico inyectando hembras de segunda

alimentación; es decir, hembras que ya habían ovipuesto una primer tanda de huevos, con ovarios completamente maduros. En esos resultados no observamos diferencias en la oviposición, lo que podría apoyar la hipótesis de un efecto del silenciamiento de CSP en la aceleración del desarrollo de los ovarios.

Otro efecto significativo del silenciamiento de CSP fue observado en una aceleración de la mortalidad; las hembras silenciadas tienen una mortalidad significativamente aumentada respecto a las hembras control. En insectos, se ha demostrado que un aumento en la respuesta de estrés oxidativo, inducida por diversos factores, afecta negativamente tanto a la supervivencia como a la oviposición (Kramer *et al.*, 2021, Michalkova *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2001). El aumento en la respuesta de estrés oxidativo puede deberse, entre otras cosas, a fallas en la detoxificación (Rix y Cutler 2022). Los resultados presentados, en el contexto de la literatura citada, nos permiten plantear la hipótesis de que las CSP silenciadas en *R. prolixus* contribuyen a detoxificar metabolitos de la dieta de sangre. Al disminuir la expresión de CSP, el insecto sufre los síntomas de una intoxicación subletal, que lleva a aumentar el estrés oxidativo, lo cual afecta la reproducción y la supervivencia a mediano plazo. La puesta acelerada de huevos podría ser un mecanismo adaptativo ante una intoxicación que reduciría el tiempo de vida, y por tanto el tiempo disponible para la oviposición. Existen experimentos en marcha en el laboratorio para validar o descartar la hipótesis propuesta. En conjunto, nuestros resultados aportan y suman evidencia que asocia a las CSP con funciones relevantes en insectos, no restringidas a la olfacción (Li *et al.*, 2023, Ma *et al.*, 2019, Zeng *et al.*, 2020).

Discusión general y conclusiones

En el presente trabajo hemos estudiado estructural y funcionalmente distintas familias génicas relevantes para la supervivencia y reproducción de insectos, particularmente, pero no solo, relacionadas a procesos detoxificantes. Así, realizamos un análisis de neuropéptidos reguladores de la ecdisis, familias de genes estudiados tradicionalmente en el contexto de la detoxificación (CYP, CCE y GST), y CSP, las cuales sólo recientemente han cobrado relevancia como reguladoras de un amplio rango de procesos vitales. Los resultados aportados son novedosos dado que han permitido asignar nuevas funciones a neuropéptidos en *D. melanogaster* y *R. prolixus*, comparando la función de neuropéptidos reguladores de la ecdisis y otros comportamientos innatos entre especies de holo y hemimetábolos. Además, hemos caracterizado el complemento detoxificante en hemípteros con distinto modo de alimentación, a fin de dilucidar la probable relación con la detoxificación de xenobióticos presentes en distintos tipos de dieta. A continuación, estudiamos estructuralmente la familia CSP en *T. infestans*, y realizamos un análisis evolutivo en comparación con otras especies de hemípteros, en lo que constituye el primer análisis completo de una familia génica en la especie utilizando tanto datos genómicos como transcriptómicos. A fin de obtener la primer evidencia funcional de CSP en triatominos, silenciamos conjuntamente genes de esta familia en *R. prolixus*, lo cual reveló un papel en la puesta de huevos, probablemente reflejando un desarrollo acelerado de los ovarios, y una reducción en el tiempo de sobrevivencia. En cuanto a la regulación de la ecdisis en hemimetábolos, los resultados aquí obtenidos apuntan a una conservación del papel de ETH, con un rol clave en el éxito del proceso. El papel de EH y CCAP resultó menos evidente en nuestros resultados, aunque se vieron efectos en las ninfas de primer estadio. También es de destacar la evidencia de una regulación e interrelación funcional entre OK y ETH en *R. prolixus*. En ese sentido, si bien no observamos un papel clave de OK en regular la ecdisis en *D. melanogaster*, se observó un papel clave de este neuropéptido en la inhibición del comportamiento de cortejo, dado que los animales expresando bajos niveles de OK tuvieron un comportamiento de cortejo completamente desinhibido. Es interesante mencionar que resultados similares se obtuvieron mediante el silenciamiento del receptor de ETH (Meiselman *et al.*, 2022), lo que podría indicar una relación funcional entre ETH y OK, en la mosca de la fruta, que también fue observada en *R. prolixus* de acuerdo con nuestros resultados. Por otra parte, se ha demostrado que el neuropéptido ETH tiene un efecto gonadotrófico en especies de

dípteros, mientras que OK está implicado en la vitelogénesis y la maduración ovárica en ciertos insectos (Areiza *et al.*, 2014; Ons *et al.*, 2015; Meiselman *et al.*, 2017, 2018). Nuestros estudios en *D. melanogaster* sugieren un papel de OK en los primeros días de oviposición. La evidencia de una relación funcional conservada entre ETH y OKA es una sugerencia interesante de nuestros resultados de manera global, y será oportuno abordarla en futuros trabajos de neurobiología de insectos.

Es relevante mencionar que buena parte del trabajo de la presente Tesis fue realizado durante el período de Aislamiento Social Preventivo Obligatorio debido a la pandemia de COVID-19 (2020-2021). A pesar de esta limitación, durante ese período se ha podido avanzar fuertemente en la incorporación de herramientas bioinformáticas y de análisis evolutivos para el estudio de detoxificación en hemípteros, que han permitido obtener los resultados expuestos en el Capítulo 2, y publicados en Volonté *et al.*, 2022. Nuestros resultados indican una reducción en familias de enzimas asociadas con la detoxificación de xenobióticos en todas las especies analizadas, lo que sugiere una convergencia en la pérdida de genes relacionados con la detoxificación en estos insectos (Bailey *et al.*, 2022, Traverso *et al.*, 2017). Sin embargo, observamos una expansión de ciertas familias relacionadas con la desintoxicación que sugiere una adaptación a diferentes dietas, sobre todo para la especie mayormente polífaga *H. halys*. Es interesante destacar que muchas de las particularidades que identificamos en heterópteros habían sido previamente reportadas en triatominos (Traverso *et al.*, 2017). Los resultados aquí presentados permiten generalizar los hallazgos y proponer que el complemento detoxificante del grupo heteróptera posee características que lo diferencian de otros grupos, y ponen de manifiesto la necesidad de profundizar este tipo de estudios en especies de hemípteros.

En cuanto a la familia CSP, caracterizamos su presencia y estructura en el genoma publicado de *T. infestans*, lo que constituye la primera familia génica anotada y analizada en la especie con datos genómicos. Nuestros resultados, junto con trabajos anteriores, sugieren que las CSP podrían desempeñar un papel importante en la adaptación de los triatominos a su dieta sanguínea. La baja en las concentraciones de CSP podrían afectar negativamente la supervivencia, y acelerar la reproducción. En plagas de cultivo se ha descrito un proceso llamado “hormesis”, según el cual cantidades sub-letales de un agente estresante pueden estimular la adaptación o capacidad reproductiva de un organismo (Guedes y Cutler,

2014). En ese sentido, la disminución de CSP en *R. prolixus* tiene las características similares a una respuesta de estrés, que podría producirse por deficiencias en el metabolismo detoxificante. Aun en ausencia de un agente tóxico externo, tal como un insecticida, el insecto necesita lidiar con tóxicos provenientes de la dieta o el ambiente que, en caso de acumularse podrían provocar efectos de intoxicación.

El estudio de los insectos trasciende su papel como modelos en investigación científica. Si bien son fundamentales para comprender principios biológicos universales, también son una preocupación sanitaria y económica debido a su capacidad para transmitir enfermedades y causar daños a los cultivos. Durante décadas, los insecticidas químicos han sido la principal herramienta para controlar estas poblaciones, pero su uso indiscriminado ha generado resistencia y ha causado un impacto ambiental significativo (Mogabure Cueto y Picollo, 2021). El manejo integrado de plagas (MIV) es la dirección recomendada con el objetivo de eliminar o reducir las poblaciones de insectos perjudiciales, tanto vectores de enfermedades como plagas de los cultivos o del alimento almacenado (WHO 2021). Ante este escenario, se hace necesario explorar alternativas de control que sean efectivas y ambientalmente sustentables. Para ello, es necesario comprender en profundidad los procesos biológicos clave en el ciclo de vida de los insectos, lo que permitiría identificar puntos vulnerables para intervenir de manera específica. Dentro de estos procesos, en la presente Tesis hemos abordado distintos aspectos de la regulación de la ecdisis, la reproducción y la detoxificación, mediante herramientas moleculares, genéticas, fisiológicas y bioinformáticas. Nuestros hallazgos contribuyen a una mejor comprensión de la biología de los insectos y ofrecen nuevas perspectivas para el desarrollo de estrategias de control de poblaciones de insectos perjudiciales. Las investigaciones continúan en esta línea de trabajo para explorar nuevas hipótesis y acercar los resultados hacia su campo de aplicación, el control de insectos perjudiciales con herramientas de bajo impacto ambiental.

Abad-Franch, F., *et al.*, “Observations on the Domestic Ecology of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae).” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 97, scielo , 2002.

Aguilar, Hugo Marcelo, *et al.*, “Chagas Disease in the Amazon Region.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 102, scielo , 2007.

Ahmad, Shujaiddin, *et al.*, “Pyrrole: An Insight into Recent Pharmacological Advances with Structure Activity Relationship.” *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 157, 2018, pp. 527–61, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.002>.

Almagro Armenteros, José Juan, *et al.*, “SignalP 5.0 Improves Signal Peptide Predictions Using Deep Neural Networks.” *Nature Biotechnology*, vol. 37, no. 4, 2019, pp. 420–23, doi:[10.1038/s41587-019-0036-z](https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z).

Alomar, Abdullah A., *et al.*, “Juvenile Hormone Analog Enhances Zika Virus Infection in *Aedes aegypti*.” *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, 2021, p. 21062, doi:[10.1038/s41598-021-00432-1](https://doi.org/10.1038/s41598-021-00432-1).

Altschul, Stephen F., *et al.*, “Basic Local Alignment Search Tool.” *Journal of Molecular Biology*, vol. 215, no. 3, 1990, pp. 403–10, doi:[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).

Altstein, Miriam, and Dick Nässel. “Neuropeptide Signaling in Insects.” *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 692, Jan. 2010, pp. 155–65, doi:[10.1007/978-1-4419-6902-6_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6902-6_8).

Amelia-Yap, Zheng Hua, *et al.*, “Pyrethroid Resistance in the Dengue Vector *Aedes aegypti* in Southeast Asia: Present Situation and Prospects for Management.” *Parasites & Vectors*, vol. 11, no. 1, 2018, p. 332, doi:[10.1186/s13071-018-2899-0](https://doi.org/10.1186/s13071-018-2899-0).

Arakane, Yasuyuki, *et al.*, “Functional Analysis of Four Neuropeptides, EH, ETH, CCAP and Bursicon, and Their Receptors in Adult Ecdysis Behavior of the Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum*.” *Mechanisms of Development*, vol. 125, no. 11, 2008, pp. 984–95, doi:<https://doi.org/10.1016/j.mod.2008.09.002>.

Araújo, Maria F., *et al.*, “The Buzz on Insecticides: A Review of Uses, Molecular Structures, Targets, Adverse Effects, and Alternatives.” *Molecules*, vol. 28, no. 8, 2023, doi:[10.3390/molecules28083641](https://doi.org/10.3390/molecules28083641).

Areiza, Maria, *et al.*, “Ecdysis Triggering Hormone Ensures Proper Timing of Juvenile Hormone Biosynthesis in Pharate Adult Mosquitoes.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 54, 2014, pp. 98–105, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.09.006>.

Arjunan, Nareshkumar, *et al.*, “Nanoparticle-Mediated DsRNA Delivery for Precision Insect Pest Control: A Comprehensive Review.” *Molecular Biology Reports*, vol. 51, no. 1, 2024, p. 355, doi:[10.1007/s11033-023-09187-6](https://doi.org/10.1007/s11033-023-09187-6).

Athey, Kacie J., *et al.*, “Predation on Stink Bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in Cotton and Soybean Agroecosystems.” *PLOS ONE*, vol. 14, no. 3, Public Library of Science, Mar. 2019, p. e0214325, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214325>.

Audsley, Neil, and Rachel E. Down. "G Protein Coupled Receptors as Targets for next Generation Pesticides." *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 67, 2015, pp. 27–37, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.07.014>.

Auteri, Michelangelo, *et al.*, "Insecticide Resistance Associated with Kdr Mutations in *Aedes albopictus*: An Update on Worldwide Evidences." *BioMed Research International*, vol. 2018, Aug. 2018, pp. 1–10, doi:10.1155/2018/3098575.

Bailey, Emma, *et al.*, "A Scaffold-Level Genome Assembly of a Minute Pirate Bug, *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae), and a Comparative Analysis of Insecticide Resistance-Related Gene Families with Hemipteran Crop Pests." *BMC Genomics*, vol. 23, no. 1, 2022, p. 45, doi:10.1186/s12864-021-08249-y.

Balabanidou, V., Kampouraki, A., MacLean, M., Blomquist, G. J., Tittiger, C., Juárez, M. P., ... Vontas, J. (2016). "Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*". Proceedings of the National Academy of Sciences, 113(33), 9268–9273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608295113>

Baldwin, William. "Phase 0 of the Xenobiotic Response: Nuclear Receptors and Other Transcription Factors As a First Step in Protection from Xenobiotics." *Nuclear Receptor Research*, vol. 6, Nov. 2019, doi:10.32527/2019/101447.

Barnetche, Jesús, *et al.*, "Adaptations in Energy Metabolism and Gene Family Expansions Revealed by Comparative Transcriptomics of Three Chagas Disease Triatomine Vectors." *BMC Genomics*, vol. 19, Apr. 2018, p. 296, doi:10.1186/s12864-018-4696-8.

Barrera-Illanes, Alberto N., *et al.*, "First Report on Knockdown Resistance Mutations in Wild Populations of *Aedes aegypti* from Argentina Determined by a Novel Multiplex High-Resolution Melting Polymerase Chain Reaction Method." *Parasites & Vectors*, vol. 16, no. 1, 2023, p. 222, doi:10.1186/s13071-023-05840-y.

Bass, Chris, *et al.*, "The Global Status of Insect Resistance to Neonicotinoid Insecticides." *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 121, 2015, pp. 78–87, doi:<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004>.

Bass, Chris, and Linda Field. "Gene Amplification and Insecticide Resistance." *Pest Management Science*, vol. 67, Aug. 2011, pp. 886–90, doi:10.1002/ps.2189.

Baum, James A., *et al.*, "Control of Coleopteran Insect Pests through RNA Interference." *Nature Biotechnology*, vol. 25, no. 11, 2007, pp. 1322–26, doi:10.1038/nbt1359.

Bautista, Ma, *et al.*, "Evidence for Tradeoffs in Detoxification and Chemosensation Gene Signatures in *Plutella xylostella*." *Pest Management Science*, vol. 71, Mar. 2015, doi:10.1002/ps.3822.

Belles, Xavier. "Beyond Drosophila: RNAi In Vivo and Functional Genomics in Insects." *Annual Review of Entomology*, vol. 55, Jan. 2010, pp. 111–28, doi:10.1146/annurev-ento-112408-085301.

Benoit, Joshua B., *et al.*, “Unique Features of a Global Human Ectoparasite Identified through Sequencing of the Bed Bug Genome.” *Nature Communications*, vol. 7, no. 1, 2016, p. 10165, doi:10.1038/ncomms10165.

Bernstein, Emily, *et al.*, “Dicer Is Essential for Mouse Development.” *Nature Genetics*, vol. 35, no. 3, 2003, pp. 215–17, doi:10.1038/ng1253.

Biessmann, Harald, *et al.*, “Isolation of cDNA Clones Encoding Putative Odourant Binding Proteins from the Antennae of the Malaria-Transmitting Mosquito, *Anopheles gambiae*.” *Insect Molecular Biology*, vol. 11, no. 2, John Wiley & Sons, Ltd, Apr. 2002, pp. 123–32, doi:https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2002.00316.x.

Blariza, María, *et al.*, “Silencing of Two Vitellogenin Genes Inhibits Oviposition in the Chagas Disease Vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae).” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 97, May 2017, doi:10.4269/ajtmh.16-1029.

Blum, Matthias, *et al.*, “The InterPro Protein Families and Domains Database: 20 Years On.” *Nucleic Acids Research*, vol. 49, no. D1, Jan. 2021, pp. D344–54, doi:10.1093/nar/gkaa977.

Board, Philip, *et al.*, “Identification, Characterization, and Crystal Structure of the Omega Class Glutathione Transferases.” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, Sept. 2000, pp. 24798–806, doi:10.1074/jbc.M001706200.

Bourtzis, Kostas, and Marc Vreysen. “Sterile Insect Technique (SIT) and Its Applications.” *Insects*, vol. 12, July 2021, p. 638, doi:10.3390/insects12070638.

Brattsten, L. B., *et al.*, “Insecticide Resistance: Challenge to Pest Management and Basic Research.” *Science*, vol. 231, no. 4743, American Association for the Advancement of Science, Mar. 1986, pp. 1255–60, doi:10.1126/science.231.4743.1255.

Buchan, Daniel W. A., and David T. Jones. “The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 Years On.” *Nucleic Acids Research*, vol. 47, no. W1, July 2019, pp. W402–07, doi:10.1093/nar/gkz297.

Buckingham, Steven, *et al.*, “Mechanisms of Action, Resistance and Toxicity of Insecticides Targeting GABA Receptors.” *Current Medicinal Chemistry*, vol. 24, June 2017, doi:10.2174/0929867324666170613075736.

Bungart, Dieter, Caroline Hilbich, *et al.*, “Occurrence of Analogues of the Myotropic Neuropeptide Orcokinin in the Shore Crab, *Carcinus maenas*: Evidence for a Novel Neuropeptide Family.” *Peptides*, vol. 16, Feb. 1995, pp. 67–72, doi:10.1016/0196-9781(94)00145-V.

Bungart, Dieter, Heinrich Dirksen, *et al.*, “Quantitative Determination and Distribution of the Myotropic Neuropeptide Orcokinin in the Nervous System of *Astacidean crustacean*.” *Peptides*, vol. 15, Feb. 1994, pp. 393–400, doi:10.1016/0196-9781(94)90194-5.

Busvine, J. R. “Mechanism of Resistance to Insecticide in Houseflies.” *Nature*, vol. 168, no. 4266, 1951, pp. 193–95, doi:10.1038/168193a0.

Caers, Jelle, *et al.*, “More than Two Decades of Research on Insect Neuropeptide GPCRs: An Overview.” *Frontiers in Endocrinology*, vol. 3, Nov. 2012, p. 151, doi:10.3389/fendo.2012.00151.

Calderón-Fernández, Gustavo M., *et al.*, “Transcriptome Analysis of the *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Integument.” *Journal of Medical Entomology*, vol. 54, no. 6, Nov. 2017, pp. 1531–42, doi:10.1093/jme/tjx151.

Capella-Gutiérrez, Salvador, *et al.*, “TrimAl: A Tool for Automated Alignment Trimming in Large-Scale Phylogenetic Analyses.” *Bioinformatics*, vol. 25, no. 15, Aug. 2009, pp. 1972–73, doi:10.1093/bioinformatics/btp348.

Capriotti, Natalia, Gastón Mougabure-Cueto, *et al.*, “L925I Mutation in the Para-Type Sodium Channel Is Associated with Pyrethroid Resistance in *Triatoma infestans* from the Gran Chaco Region.” *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 8, no. 1, Public Library of Science, Jan. 2014, p. e2659, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002659>.

Capriotti, Natalia, Juan P. Ianowski, *et al.*, “The Neuropeptide CCHamide2 Regulates Diuresis in the Chagas Disease Vector *Rhodnius prolixus*.” *Journal of Experimental Biology*, vol. 222, no. 10, May 2019, p. jeb203000, doi:10.1242/jeb.203000.

Casida, John, and Kathleen Durkin. “Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects.” *Annual Review of Entomology*, vol. 58, Jan. 2013, pp. 99–117, doi:10.1146/annurev-ento-120811-153645.

Champion, Cody J., and Jiannong Xu. “Redox State Affects Fecundity and Insecticide Susceptibility in *Anopheles gambiae*.” *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, 2018, p. 13054, doi:10.1038/s41598-018-31360-2.

Chen, Ji, *et al.*, “Isoform-Specific Expression of the Neuropeptide Orcokinin in *Drosophila melanogaster*.” *Peptides*, vol. 68, 2015, pp. 50–57, doi:<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.01.002>.

Chen, Tao, *et al.*, “Molecular Characterization of Artemin and Ferritin from *Artemia franciscana*.” *European Journal of Biochemistry / FEBS*, vol. 270, Feb. 2003, pp. 137–45, doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03373.x.

Cheng, Tingcai, *et al.*, “Genomic Adaptation to Polyphagy and Insecticides in a Major East Asian Noctuid Pest.” *Nature Ecology & Evolution*, vol. 1, no. 11, 2017, pp. 1747–56, doi:10.1038/s41559-017-0314-4.

Chiang, R. Gary, and Jennifer A. Chiang. “Reproductive Physiology in the Blood Feeding Insect, *Rhodnius prolixus*, from Copulation to the Control of Egg Production.” *Journal of Insect Physiology*, vol. 97, 2017, pp. 27–37, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.06.001>.

Chown, Steven L., and Sue Nicolson. “Insect Physiological Ecology: Mechanisms and Patterns.” Oxford University Press, 15 July 2004, doi:10.1093/acprof:oso/9780198515494.001.0001.

Christiaens, Olivier, Luc Swevers, *et al.*, “DsRNA Degradation in the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*) Associated with Lack of Response in RNAi Feeding and Injection Assay.” *Peptides*, vol. 53, 2014, pp. 307–14, doi:<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.12.014>.

Christiaens, Olivier, Jeremy Sweet, *et al.*, “Implementation of RNAi-Based Arthropod Pest Control: Environmental Risks, Potential for Resistance and Regulatory Considerations.” *Journal of Pest Science*, vol. 95, Jan. 2022, doi:[10.1007/s10340-021-01439-3](https://doi.org/10.1007/s10340-021-01439-3).

Christiaens, Olivier, Myriam Tardajos, *et al.*, “Increased RNAi Efficacy in *Spodoptera exigua* via the Formulation of DsRNA With Guanlylated Polymers.” *Frontiers in Physiology*, vol. 9, Apr. 2018, p. 316, doi:[10.3389/fphys.2018.00316](https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00316).

Christiaens, Olivier, and Guy Smagghe. “The Challenge of RNAi-Mediated Control of Hemipterans.” *Current Opinion in Insect Science*, vol. 6, 2014, pp. 15–21, doi:<https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.09.012>.

Claudianos, C., *et al.*, “A Deficit of Detoxification Enzymes: Pesticide Sensitivity and Environmental Response in the Honeybee.” *Insect Molecular Biology*, vol. 15, no. 5, John Wiley & Sons, Ltd, Oct. 2006, pp. 615–36, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00672.x>.

Conway, Michael J., *et al.*, “Targeting *Aedes aegypti* Metabolism with Next-Generation Insecticides.” *Viruses*, vol. 15, no. 2, 2023, doi:[10.3390/v15020469](https://doi.org/10.3390/v15020469).

Coura, José Rodrigues, and Angela C. V Junqueira. “Risks of Endemicity, Morbidity and Perspectives Regarding the Control of Chagas Disease in the Amazon Region.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 107, scielo , 2012.

Cruz-Reyes, Alejandro, and José Miguel Pickering-López. “Chagas Disease in Mexico: An Analysis of Geographical Distribution during the Past 76 Years - A Review.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 101, scielo , 2006.

Cuba Cuba, César A., *et al.*, “The Triatomines of Northern Peru, with Emphasis on the Ecology and Infection by Trypanosomes of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae).” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 97, scielo , 2002.

Dalakouras, Athanasios, *et al.*, “Genetically Modified Organism-Free RNA Interference: Exogenous Application of RNA Molecules in Plants1 [OPEN].” *Plant Physiology*, vol. 182, no. 1, Jan. 2020, pp. 38–50, doi:[10.1104/pp.19.00570](https://doi.org/10.1104/pp.19.00570).

Daley, Jennifer, *et al.*, “Bioamplification as a Bioaccumulation Mechanism for Persistent Organic Pollutants (POPs) in Wildlife.” *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 227, Jan. 2014, pp. 107–55, doi:[10.1007/978-3-319-01327-5_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-01327-5_4).

Davies, T. G. E., *et al.*, “DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium Channels.” *IUBMB Life*, vol. 59, no. 3, John Wiley & Sons, Ltd, Jan. 2007, pp. 151–62, doi:<https://doi.org/10.1080/15216540701352042>.

De Simone, Gabriel A., *et al.*, “The Effects of a Male Audience on Male and Female Mating Behaviour in the Blood-Sucking Bug *Rhodnius prolixus*.” *Neotropical Entomology*, vol. 51, no. 2, 2022, pp. 212–20, doi:10.1007/s13744-021-00935-6.

Deguine, Jean-Philippe, *et al.*, “Integrated Pest Management: Good Intentions, Hard Realities. A Review.” *Agronomy for Sustainable Development*, vol. 41, no. 3, 2021, p. 38, doi:10.1007/s13593-021-00689-w.

Denholm, I., *et al.*, “An Overview of the Evolution of Overproduced Esterases in the Mosquito *Culex pipiens*.” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, vol. 353, no. 1376, Royal Society, Oct. 1998, pp. 1707–11, doi:10.1098/rstb.1998.0322.

Dennison, Nathan, *et al.*, “The Mosquito Microbiota Influences Vector Competence for Human Pathogens.” *Current Opinion in Insect Science*, vol. 3, Aug. 2014, doi:10.1016/j.cois.2014.07.004.

Deshpande, Sonali A., *et al.*, “Ecdysis Triggering Hormone Receptors Regulate Male Courtship Behavior via Antennal Lobe Interneurons in *Drosophila*.” *General and Comparative Endocrinology*, vol. 278, 2019, pp. 79–88, doi:https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.12.003.

Diao, Feici, *et al.*, “The Splice Isoforms of the *Drosophila* Ecdysis Triggering Hormone Receptor Have Developmentally Distinct Roles.” *Genetics*, vol. 202, Nov. 2015, doi:10.1534/genetics.115.182121.

Dias, Clarice Noleto, and Denise Fernandes Coutinho Moraes. “Essential Oils and Their Compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) Larvicides: Review.” *Parasitology Research*, vol. 113, no. 2, 2014, pp. 565–92, doi:10.1007/s00436-013-3687-6.

Dias, João Carlos Pinto. “Southern Cone Initiative for the Elimination of Domestic Populations of *Triatoma infestans* and the Interruption of Transfusion Chagas Disease: Historical Aspects, Present Situation, and Perspectives.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 102, scielo , 2007.

Dirksen, Heinrich, *et al.*, “Two Orcokinin and the Novel Octapeptide Orcomyotropin in the Hindgut of the Crayfish *Orconectes limosus*: Identified Myostimulatory Neuropeptides Originating Together in Neurons of the Terminal Abdominal Ganglion.” *The Journal of Experimental Biology*, vol. 203, Oct. 2000, pp. 2807–18, doi:10.1242/jeb.203.18.2807.

Diss, Guillaume, *et al.*, “Molecular Mechanisms of Paralogous Compensation and the Robustness of Cellular Networks.” *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, vol. 322, no. 7, John Wiley & Sons, Ltd, Nov. 2014, pp. 488–99, doi:https://doi.org/10.1002/jez.b.22555.

Douglas, Angela. “Strategies for Enhanced Crop Resistance to Insect Pests.” *Annual Review of Plant Biology*, vol. 69, Apr. 2018, doi:10.1146/annurev-arplant-042817-040248.

Dulbecco, A B, *et al.*, “Deciphering the Role of *Rhodnius prolixus* CYP4G Genes in Straight and Methyl-Branched Hydrocarbon Formation and in Desiccation Tolerance.” *Insect*

Molecular Biology, vol. 29, no. 5, John Wiley & Sons, Ltd, Oct. 2020, pp. 431–43, doi:<https://doi.org/10.1111/imb.12653>.

Dulbecco, Andrea B, Gustavo M. Calderón-Fernández, *et al.*, “Cytochrome P450 Genes of the CYP4 Clan and Pyrethroid Resistance in Chagas Disease Vectors .” *Frontiers in Tropical Diseases* , vol. 3, 2022, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fitd.2022.823093>.

Dulbecco, Andrea B, Débora E. Moriconi, *et al.*, “Integument CYP Genes of the Largest Genome-Wide Cytochrome P450 Expansions in Triatomines Participate in Detoxification in Deltamethrin-Resistant *Triatoma infestans*.” *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, 2018, p. 10177, doi:10.1038/s41598-018-28475-x.

Edi, Constant V, *et al.*, “CYP6 P450 Enzymes and ACE-1 Duplication Produce Extreme and Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*.” *PLOS Genetics*, vol. 10, no. 3, Public Library of Science, Mar. 2014, p. e1004236, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004236>.

Edwards, J. S. “Sir Vincent Wigglesworth and the Coming of Age of Insect Development.” *The International Journal of Developmental Biology*, vol. 42, no. 3, Apr. 1998, pp. 471–73, <https://ijdb.ehu.eus/article/9654033>.

Eggleton, Paul. “The State of the World’s Insects.” *Annual Review of Environment and Resources*, vol. 45, Oct. 2020, doi:10.1146/annurev-environ-012420-050035.

Ejima, Aki, *et al.*, “Generalization of Courtship Learning in *Drosophila* is Mediated by Cis-Vaccenyl Acetate.” *Current Biology: CB*, vol. 17, May 2007, pp. 599–605, doi:10.1016/j.cub.2007.01.053.

Elizalde, Luciana, *et al.*, “The Ecosystem Services Provided by Social Insects: Traits, Management Tools and Knowledge Gaps.” *Biological Reviews*, vol. 95, no. 5, John Wiley & Sons, Ltd, Oct. 2020, pp. 1418–41, doi:<https://doi.org/10.1111/brv.12616>.

Enayati, A. A., *et al.*, “Insect Glutathione Transferases and Insecticide Resistance.” *Insect Molecular Biology*, vol. 14, no. 1, John Wiley & Sons, Ltd, Jan. 2005, pp. 3–8, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x>.

Enayati, Ahmadali, *et al.*, “Evolution of Insecticide Resistance and Its Mechanisms in *Anopheles stephensi* in the WHO Eastern Mediterranean Region.” *Malaria Journal*, vol. 19, no. 1, 2020, p. 258, doi:10.1186/s12936-020-03335-0.

Endress, Maxime, *et al.*, “Structural and Functional Characterization of Orcokinin B-like Neuropeptides in the Cuttlefish (*Sepia officinalis*).” *Marine Drugs*, vol. 20, no. 8, 2022, doi:10.3390/md20080505.

Ewer, John. “Behavioral Actions of Neuropeptides in Invertebrates: Insights from *Drosophila*.” *Hormones and Behavior*, vol. 48, no. 4, 2005, pp. 418–29, doi:<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.05.018>.

Fabro, Jérica, *et al.*, “Identification of a Point Mutation Associated with Pyrethroid Resistance in the Para-Type Sodium Channel of *Triatoma infestans*, a Vector of Chagas’

Disease.” *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 12, no. 2, 2012, pp. 487–91, doi:<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.006>.

Farji-Brener, Alejandro G., and Victoria Werenkraut. “The Effects of Ant Nests on Soil Fertility and Plant Performance: A Meta-Analysis.” *Journal of Animal Ecology*, vol. 86, no. 4, John Wiley & Sons, Ltd, July 2017, pp. 866–77, doi:<https://doi.org/10.1111/1365-2656.12672>.

Ferreira, Marta, *et al.*, “The First Demonstration of CYP1A and the ABC Protein(s) Gene Expression and Activity in European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) Primary Hepatocytes.” *Chemosphere*, vol. 100, 2014, pp. 152–59, doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.051>.

Feyereisen, R. “Arthropod CYPomes Illustrate the Tempo and Mode in P450 Evolution.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, vol. 1814, no. 1, 2011, pp. 19–28, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.06.012>.

Feyereisen, R. “Evolution of Insect P450.” *Biochemical Society Transactions*, vol. 34, no. 6, Oct. 2006, pp. 1252–55, doi:[10.1042/BST0341252](https://doi.org/10.1042/BST0341252).

Fire, Andrew, *et al.*, “Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.” *Nature*, vol. 391, no. 6669, 1998, pp. 806–11, doi:[10.1038/35888](https://doi.org/10.1038/35888).

Fletcher, Stephen, *et al.*, “A Perspective on RNAi-Based Biopesticides.” *Frontiers in Plant Science*, vol. 11, Feb. 2020, doi:[10.3389/fpls.2020.00051](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00051).

Fronza, Georgina, *et al.*, “Insecticide Resistance Mechanisms in *Triatoma infestans* (Reduviidae: Triatominae): The Putative Role of Enhanced Detoxification and Knockdown Resistance (Kdr) Allele in a Resistant Hotspot From the Argentine Chaco.” *Journal of Medical Entomology*, vol. 57, no. 3, May 2020, pp. 837–44, doi:[10.1093/jme/tjz249](https://doi.org/10.1093/jme/tjz249).

Fuse, Megumi, and James W. Truman. “Modulation of Ecdysis in the Moth *Manduca sexta*: The Roles of the Suboesophageal and Thoracic Ganglia.” *Journal of Experimental Biology*, vol. 205, no. 8, Apr. 2002, pp. 1047–58, doi:[10.1242/jeb.205.8.1047](https://doi.org/10.1242/jeb.205.8.1047).

Gato Armas, Rene, *et al.*, “Sterile Insect Technique: Successful Suppression of *Aedes aegypti* Field Population in Cuba”. *Insects*, 2021, doi:[10.20944/preprints202104.0182.v1](https://doi.org/10.20944/preprints202104.0182.v1).

Gaunt, Michael, and Michael Miles. “The Ecotopes and Evolution of Triatomine Bugs (Triatominae) and Their Associated Trypanosomes.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 95, scielo, 2000.

Geoghegan, Vincent, *et al.*, “Perturbed Cholesterol and Vesicular Trafficking Associated with Dengue Blocking in Wolbachia-Infected *Aedes aegypti* Cells.” *Nature Communications*, vol. 8, no. 1, 2017, p. 526, doi:[10.1038/s41467-017-00610-8](https://doi.org/10.1038/s41467-017-00610-8).

Germano, M. D., *et al.*, “New Findings of Insecticide Resistance in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) From the Gran Chaco.” *Journal of Medical Entomology*, vol. 47, no. 6, Nov. 2010, pp. 1077–81, doi:[10.1603/ME10069](https://doi.org/10.1603/ME10069).

Ghosh, Subhanita, *et al.*, “An RNAi-Based High-Throughput Screening Assay to Identify Small Molecule Inhibitors of Hepatitis B Virus Replication.” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 292, no. 30, Elsevier, July 2017, pp. 12577–88, doi:10.1074/jbc.M117.775155.

Gonzalez-Valdivieso, Freddy E., *et al.*, “Susceptibility of *R. Prolixus* to Chlorinated Hydrocarbon Insecticides in Venezuela”. World Health Organization, <https://iris.who.int/handle/10665/188269>.

Grosso, Carla G., *et al.*, “Identification of Three Cytochrome P450 Genes in the Chagas’ Disease Vector *Triatoma infestans*: Expression Analysis in Deltamethrin Susceptible and Resistant Populations.” *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 44, 2016, pp. 459–70, doi:<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.027>.

Guedes, R. N. C., y Cutler, G. C. (2014). Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. *Pest Management Science*, 70(5), 690–697. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ps.3669>

Guhl, F. 5 - *Geographical Distribution of Chagas Disease*. Edited by Jenny Telleria and Michel B T - American Trypanosomiasis Chagas Disease (Second Edition) Tibayrenc, Elsevier, 2017, pp. 89–112, doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00005-8>.

Gullan, P., and Peter Cranston. *The Insects: An Outline of Entomology, Gullan and Cranston 5th Edition, 2014 File Name - G-C The Insectproof*. 2021.

Gürtler, Ricardo E. “How Is Global Change Affecting Chagas Disease Landscapes?” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 117, scielo , 2022.

Gürtler, Ricardo Esteban, *et al.*, “The Pampa Del Indio Project: District-Wide Quasi-Elimination of *Triatoma infestans* after a 9-Year Intervention Program in the Argentine Chaco.” *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 17, no. 4, Public Library of Science, Apr. 2023, p. e0011252, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011252>.

Hales, Karen, *et al.*, “Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System.” *Genetics*, vol. 201, Nov. 2015, pp. 815–42, doi:10.1534/genetics.115.183392.

He, Bicheng, *et al.*, “Fluorescent Nanoparticle Delivered DsRNA Toward Genetic Control of Insect Pests.” *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, vol. 25, Sept. 2013, pp. 4580–84, doi:10.1002/adma.201301201.

Hearn, Jack, *et al.*, “Multi-Omics Analysis Identifies a CYP9K1 Haplotype Conferring Pyrethroid Resistance in the Malaria Vector *Anopheles funestus* in East Africa.” *Molecular Ecology*, vol. 31, no. 13, John Wiley & Sons, Ltd, July 2022, pp. 3642–57, doi:<https://doi.org/10.1111/mec.16497>.

Hitmi, Adnane, *et al.*, “The Production of Pyrethrins by Plant Cell and Tissue Cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium* and *Tagetes* Species.” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 35, no. 5, Taylor & Francis, Jan. 2000, pp. 317–37, doi:10.1080/10409230091169230.

Hofer, Sabine, *et al.*, “Novel Insect Orcokinin: Characterization and Neuronal Distribution in the Brains of Selected *Dicondylian* Insects.” *Journal of Comparative Neurology*, vol. 490, no. 1, John Wiley & Sons, Ltd, Sept. 2005, pp. 57–71, doi:<https://doi.org/10.1002/cne.20650>.

Honer, Madison, *et al.*, “Orcokinin Neuropeptides Regulate Sleep in *Caenorhabditis elegans*.” *Journal of Neurogenetics*, vol. 34, Oct. 2020, pp. 1–13, doi:[10.1080/01677063.2020.1830084](https://doi.org/10.1080/01677063.2020.1830084).

Hordijk, Wim, and Olivier Gascuel. “Improving the Efficiency of SPR Moves in Phylogenetic Tree Search Methods Based on Maximum Likelihood.” *Bioinformatics*, vol. 21, no. 24, Dec. 2005, pp. 4338–47, doi:[10.1093/bioinformatics/bti713](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti713).

Ibrahim, Sulaiman, *et al.*, “The Cytochrome P450 CYP6P4 Is Responsible for the High Pyrethroid Resistance in Knockdown Resistance-Free *Anopheles arabiensis*.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 68, Nov. 2015, doi:[10.1016/j.ibmb.2015.10.015](https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.10.015).

Iftikhar, Hina, *et al.*, “The Role of MiRNAs in *Drosophila melanogaster* Male Courtship Behavior.” *Genetics*, vol. 211, no. 3, Mar. 2019, pp. 925–42, doi:[10.1534/genetics.118.301901](https://doi.org/10.1534/genetics.118.301901).

Ingham, V A, *et al.*, “Transcriptomic Meta-Signatures Identified in *Anopheles gambiae* Populations Reveal Previously Undetected Insecticide Resistance Mechanisms.” *Nature Communications*, vol. 9, no. 1, 2018, p. 5282, doi:[10.1038/s41467-018-07615-x](https://doi.org/10.1038/s41467-018-07615-x).

Ingham, Vicky, *et al.*, “Pyrethroid Resistance Mechanisms in the Major Malaria Vector Species Complex.” *Entomologia Generalis*, vol. 43, June 2023, doi:[10.1127/entomologia/2023/1880](https://doi.org/10.1127/entomologia/2023/1880).

Ingham, Vicky, and Sanjay Nagi. “Genomic Profiling of Insecticide Resistance in Malaria Vectors: Insights into Molecular Mechanisms.” *Research Square*, 2024, doi:[10.21203/rs.3.rs-3910702/v1](https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3910702/v1).

Ingham, Victoria A, Amalia Anthousi, *et al.*, “A Sensory Appendage Protein Protects Malaria Vectors from Pyrethroids.” *Nature*, vol. 577, no. 7790, 2020, pp. 376–80, doi:[10.1038/s41586-019-1864-1](https://doi.org/10.1038/s41586-019-1864-1).

Ingham, Victoria A, Christopher M. Jones, *et al.*, “Dissecting the Organ Specificity of Insecticide Resistance Candidate Genes in *Anopheles gambiae*: Known and Novel Candidate Genes.” *BMC Genomics*, vol. 15, no. 1, 2014, p. 1018, doi:[10.1186/1471-2164-15-1018](https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1018).

Ingham, Victoria A, Jacob A. Tennessen, *et al.*, “Integration of Whole Genome Sequencing and Transcriptomics Reveals a Complex Picture of the Reestablishment of Insecticide Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles coluzzii*.” *PLOS Genetics*, vol. 17, no. 12, Public Library of Science, Dec. 2021, p. e1009970, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009970>.

Irving, Helen, *et al.*, “Positional Cloning of Rp2 QTL Associates the P450 Genes CYP6Z1, CYP6Z3 and CYP6M7 with Pyrethroid Resistance in the Malaria Vector *Anopheles funestus*.” *Heredity*, vol. 109, Sept. 2012, doi:[10.1038/hdy.2012.53](https://doi.org/10.1038/hdy.2012.53).

Jamroz, Robert C., *et al.*, “Role of the Kdr and Super-Kdr Sodium Channel Mutations in Pyrethroid Resistance: Correlation of Allelic Frequency to Resistance Level in Wild and Laboratory Populations of Horn Flies (*Haematobia Irritans*).” *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 28, no. 12, 1998, pp. 1031–37, doi:[https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(98\)00094-0](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(98)00094-0).

Janssen, I., Schoofs, L., Spittaels, K., Neven, H., Vanden Broeck, J., Devreese, B., ... De Loof, A. (1996). Isolation of NEB-LFamide, a novel myotropic neuropeptide from the grey fleshfly. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 117(2), 157–165. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0303-7207\(95\)03746-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0303-7207(95)03746-2)

Jiang, Hongbo, *et al.*, “Alternatively Spliced Orcokinin Isoforms and Their Functions in *Tribolium castaneum*.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 65, July 2015, doi:10.1016/j.ibmb.2015.07.009.

Johnson, Kevin P., *et al.*, “Phylogenomics and the Evolution of Hemipteroid Insects.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 115, no. 50, Proceedings of the National Academy of Sciences, Dec. 2018, pp. 12775–80, doi:10.1073/pnas.1815820115.

Jones, Philip, *et al.*, “InterProScan 5: Genome-Scale Protein Function Classification.” *Bioinformatics*, vol. 30, no. 9, May 2014, pp. 1236–40, doi:10.1093/bioinformatics/btu031.

Jupatanakul, Natapong, *et al.*, “The Insect Microbiome Modulates Vector Competence for Arboviruses.” *Viruses*, vol. 6, no. 11, 2014, pp. 4294–313, doi:10.3390/v6114294.

Justi, Silvia A., and Cleber Galvão. “The Evolutionary Origin of Diversity in Chagas Disease Vectors.” *Trends in Parasitology*, vol. 33, no. 1, 2017, pp. 42–52, doi:<https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.002>.

Kalyaanamoorthy, Subha, *et al.*, “ModelFinder: Fast Model Selection for Accurate Phylogenetic Estimates.” *Nature Methods*, vol. 14, no. 6, 2017, pp. 587–89, doi:10.1038/nmeth.4285.

Karasali, H., and Niki Maragou. *Pesticides and Herbicides: Types of Pesticide*. 2016, pp. 319–25, doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00535-3.

Katoh, Kazutaka, *et al.*, “MAFFT Version 5: Improvement in Accuracy of Multiple Sequence Alignment.” *Nucleic Acids Research*, vol. 33, no. 2, Jan. 2005, pp. 511–18, doi:10.1093/nar/gki198.

Kennedy, Christopher, and Keith Tierney. “Xenobiotic Protection/Resistance Mechanisms in Organisms.” *Environ. Toxicol.*, 2013, pp. 689–721, doi:10.1007/978-1-4614-5764-0_23.

Kim, Young-Joon, Dušan Žitňan, *et al.*, “Central Peptidergic Ensembles Associated with Organization of an Innate Behavior.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 38, Proceedings of the National Academy of Sciences, Sept. 2006, pp. 14211–16, doi:10.1073/pnas.0603459103.

Kim, Young-Joon, Ivana Valachova, *et al.*, “Corazonin Receptor Signaling in Ecdysis Initiation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, May 2004, pp. 6704–09, doi:10.1073/pnas.0305291101.

King, Rob, *et al.*, “The Complete Genome Assemblies of 19 Insect Pests of Worldwide Importance to Agriculture.” *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 191, 2023, p. 105339, doi:https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105339.

Klingelhöfer, Doris, *et al.*, “Neonicotinoids: A Critical Assessment of the Global Research Landscape of the Most Extensively Used Insecticide.” *Environmental Research*, vol. 213, 2022, p. 113727, doi:https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113727.

Koch, Frank. “Delaplane, K. S. y Mayer, D. F. (2000). Crop Pollination by Bees. – New York, Oxon (CABI Publishing). – 352 S., Zahlr. s/w Fotos. ISBN 0-85199-448-2 (Hardcover). US\$ 100,-.” *Zoosystematics and Evolution*, vol. 78, no. 1, John Wiley & Sons, Ltd, Jan. 2002, p. 192, doi:https://doi.org/10.1002/mmnz.20020780120.

Koemans, Tom, *et al.*, “*Drosophila* Courtship Conditioning As a Measure of Learning and Memory.” *Journal of Visualized Experiments*, vol. 2017, June 2017, doi:10.3791/55808.

Koganemaru, Reina, and Dini M. Miller. “The Bed Bug Problem: Past, Present, and Future Control Methods.” *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 106, no. 3, 2013, pp. 177–89, doi:https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.05.005.

Kolliopoulou, Anna, *et al.*, “Viral Delivery of DsRNA for Control of Insect Agricultural Pests and Vectors of Human Disease: Prospects and Challenges.” *Frontiers in Physiology*, vol. 8, June 2017, p. 399, doi:10.3389/fphys.2017.00399.

Kramer, Boris H., *et al.*, “Oxidative Stress and Senescence in Social Insects: A Significant but Inconsistent Link?” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 376, no. 1823, Royal Society, Mar. 2021, p. 20190732, doi:10.1098/rstb.2019.0732.

Kremen, Claire, and Rebecca Chaplin-Kramer. “Insects as Providers of Ecosystem Services: Crop Pollination and Pest Control.” *Insect Conservation Biology: Proceedings of the Royal Entomological Society’s 23rd Symposium*, June 2007, pp. 349–82, doi:10.1079/9781845932541.0349.

Kreml, Corinna, *et al.*, “Gossypol Toxicity and Detoxification in *Helicoverpa armigera* and *Heliothis virescens*.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 78, 2016, pp. 69–77, doi:https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.09.003.

Kumar, Ashwani, *et al.*, “Malaria in South Asia: Prevalence and Control.” *Acta Tropica*, vol. 121, no. 3, 2012, pp. 246–55, doi:https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.01.004.

Lahr, Eleanor C., *et al.*, “Genetic Analysis of Ecdysis Behavior in *Drosophila* Reveals Partially Overlapping Functions of Two Unrelated Neuropeptides.” *The Journal of Neuroscience*, vol. 32, no. 20, May 2012, pp. 6819 LP – 6829, doi:10.1523/JNEUROSCI.5301-11.2012.

Lao, Shu-Hua, *et al.*, “Genomic and Transcriptomic Insights into the Cytochrome P450 Monooxygenase Gene Repertoire in the Rice Pest Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens*.” *Genomics*, vol. 106, July 2015, doi:10.1016/j.ygeno.2015.07.010.

Latorre Estivalis, Jose Manuel, *et al.*, “The Antennal Transcriptome of *Triatoma infestans* Reveals Substantial Expression Changes Triggered by a Blood Meal.” *BMC Genomics*, vol. 23, no. 1, 2022, p. 861, doi:10.1186/s12864-022-09059-6.

Lavore, Andrés, *et al.*, “*Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) Transcriptomic Analysis and Neuropeptidomics.” *Scientific Reports*, vol. 8, Nov. 2018, doi:10.1038/s41598-018-35386-4.

Leal, Walter. “Odorant Reception in Insects: Roles of Receptors, Binding Proteins, and Degrading Enzymes.” *Annual Review of Entomology*, vol. 58, Sept. 2012, doi:10.1146/annurev-ento-120811-153635.

Leal, Walter S., *et al.*, “Kinetics and Molecular Properties of Pheromone Binding and Release.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 102, no. 15, Proceedings of the National Academy of Sciences, Apr. 2005, pp. 5386–91, doi:10.1073/pnas.0501447102.

Lee, Dohee, *et al.*, “Evidence for a Conserved CCAP-Signaling Pathway Controlling Ecdysis in a Hemimetabolous Insect, *Rhodnius prolixus*.” *Frontiers in Neuroscience*, vol. 7, Nov. 2013, p. 207, doi:10.3389/fnins.2013.00207.

Lee, Sang Soo, and Michael Adams. “Regulation of *Drosophila* Long-Term Courtship Memory by Ecdysis Triggering Hormone.” *Frontiers in Neuroscience*, vol. 15, Apr. 2021, p. 670322, doi:10.3389/fnins.2021.670322.

Lenaerts, Cynthia, *et al.*, “The Ecdysis Triggering Hormone System Is Essential for Successful Moulting of a Major Hemimetabolous Pest Insect, *Schistocerca gregaria*.” *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, 2017, p. 46502, doi:10.1038/srep46502.

Li, Dawei, Yongshuo Ma, *et al.*, “A Structural and Data-Driven Approach to Engineering a Plant Cytochrome P450 Enzyme.” *Science China Life Sciences*, vol. 62, no. 7, 2019, pp. 873–82, doi:10.1007/s11427-019-9538-3.

Li, Fen, Herbert Venthur, *et al.*, “Evidence for the Involvement of the Chemosensory Protein AgosCSP5 in Resistance to Insecticides in the Cotton Aphid, *Aphis gossypii*.” *Insects*, vol. 12, Apr. 2021, p. 335, doi:10.3390/insects12040335.

Li, Heng, *et al.*, “Chemosensory Protein Regulates the Behavioural Response of *Frankliniella intonsa* and *Frankliniella occidentalis* to Tomato Zonate Spot Virus–Infected Pepper (*Capsicum annuum*).” *PLOS Pathogens*, vol. 19, no. 5, Public Library of Science, May 2023, p. e1011380, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011380>.

Li, Hu, *et al.*, “Mitochondrial Phylogenomics of Hemiptera Reveals Adaptive Innovations Driving the Diversification of True Bugs.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 284, no. 1862, Royal Society, Sept. 2017, p. 20171223, doi:10.1098/rspb.2017.1223.

- Li, Xianchun, Mary A. Schuler, *et al.*, “Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics.” *Annual Review of Entomology*, vol. 52, 2007, pp. 231–53, doi:10.1146/annurev.ento.51.110104.151104.
- Lin, Rongmei, *et al.*, “The Phylogenetic and Evolutionary Analyses of Detoxification Gene Families in *Aphidinae* Species.” *PLOS ONE*, vol. 17, no. 2, Public Library of Science, Feb. 2022, p. e0263462, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263462>.
- Liu, Guoxia, *et al.*, “Comprehensive History of CSP Genes: Evolution, Phylogenetic Distribution and Functions.” *Genes*, vol. 11, no. 4, 2020, doi:10.3390/genes11040413.
- Liu, Nannan. “Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions.” *Annual Review of Entomology*, vol. 60, Jan. 2015, pp. 537–59, doi:10.1146/annurev-ento-010814-020828.
- LIU, NANNAN, *et al.*, “Pyrethroid Resistance in Mosquitoes.” *Insect Science*, vol. 13, no. 3, John Wiley & Sons, Ltd, June 2006, pp. 159–66, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2006.00078.x>.
- Liu, Tong, *et al.*, “Increased Dopamine Level Enhances Male–Male Courtship in *Drosophila*” *The Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 21, May 2008, pp. 5539 LP – 5546, doi:10.1523/JNEUROSCI.5290-07.2008.
- Liu, Yu-Ling, *et al.*, “Unique Function of a Chemosensory Protein in the Proboscis of Two *Helicoverpa* Species.” *Journal of Experimental Biology*, vol. 217, no. 10, May 2014, pp. 1821–26, doi:10.1242/jeb.102020.
- Liu, Zheng, *et al.*, “Reducing Progoitrin and Enriching Glucoraphanin in *Brassica napus* Seeds through Silencing of the GSL-ALK Gene Family.” *Plant Molecular Biology*, vol. 79, no. 1, 2012, pp. 179–89, doi:10.1007/s11103-012-9905-2.
- Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method.” *Methods*, vol. 25, no. 4, 2001, pp. 402–08, doi:<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Losey, John E., and Mace Vaughan. “The Economic Value of Ecological Services Provided by Insects.” *BioScience*, vol. 56, no. 4, Apr. 2006, pp. 311–23, doi:10.1641/0006-3568(2006)56[311:TEVOES]2.0.CO;2.
- Luo, Y, *et al.*, “Differential Responses of *Migratory locust* to Systemic RNA Interference via Double-Stranded RNA Injection and Feeding.” *Insect Molecular Biology*, vol. 22, no. 5, John Wiley & Sons, Ltd, Oct. 2013, pp. 574–83, doi:<https://doi.org/10.1111/imb.12046>.
- Luo, Yuan, *et al.*, “Towards an Understanding of the Molecular Basis of Effective RNAi against a Global Insect Pest, the Whitefly *Bemisia tabaci*.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 88, 2017, pp. 21–29, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.07.005>.
- Ma, Chao, *et al.*, “OcomCSP12, a Chemosensory Protein Expressed Specifically by Ovary, Mediates Reproduction in *Ophraella communa* (Coleoptera: Chrysomelidae).” *Frontiers in Physiology*, vol. 10, Oct. 2019, doi:10.3389/fphys.2019.01290.

Majerowicz, D., *et al.*, “Looking for Reference Genes for Real-Time Quantitative PCR Experiments in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae).” *Insect Molecular Biology*, vol. 20, no. 6, John Wiley & Sons, Ltd, Dec. 2011, pp. 713–22, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2011.01101.x>.

Maleszka, J., *et al.*, “RNAi-Induced Phenotypes Suggest a Novel Role for a Chemosensory Protein CSP5 in the Development of Embryonic Integument in the Honeybee (*Apis mellifera*).” *Development Genes and Evolution*, vol. 217, no. 3, 2007, pp. 189–96, doi:[10.1007/s00427-006-0127-y](https://doi.org/10.1007/s00427-006-0127-y).

Malhotra, Pooja, and Saumik Basu. “The Intricate Role of Ecdysis Triggering Hormone Signaling in Insect Development and Reproductive Regulation.” *Insects*, vol. 14, no. 8, 2023, doi:[10.3390/insects14080711](https://doi.org/10.3390/insects14080711).

Manrique, Gabriel, and Claudio R. Lazzari. “Sexual Behaviour and Stridulation during Mating in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae).” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 89, scielo, 1994.

Mao, Ying-Bo, *et al.*, “Silencing a Cotton Bollworm P450 Monooxygenase Gene by Plant-Mediated RNAi Impairs Larval Tolerance of Gossypol.” *Nature Biotechnology*, vol. 25, no. 11, 2007, pp. 1307–13, doi:[10.1038/nbt1352](https://doi.org/10.1038/nbt1352).

Marchant, Axelle, *et al.*, “Under-Expression of Chemosensory Genes in Domiciliary Bugs of the Chagas Disease Vector *Triatoma brasiliensis*.” *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 10, no. 10, Public Library of Science, Oct. 2016, p. e0005067, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005067>.

Marcos-Marcos, Jorge, *et al.*, “Impact, Economic Evaluation, and Sustainability of Integrated Vector Management in Urban Settings to Prevent Vector-Borne Diseases: A Scoping Review.” *Infectious Diseases of Poverty*, vol. 7, no. 1, 2018, p. 83, doi:[10.1186/s40249-018-0464-x](https://doi.org/10.1186/s40249-018-0464-x).

McBride, Sean M. J., *et al.*, “Mushroom Body Ablation Impairs Short-Term Memory and Long-Term Memory of Courtship Conditioning in *Drosophila melanogaster*.” *Neuron*, vol. 24, no. 4, Elsevier, Dec. 1999, pp. 967–77, doi:[10.1016/S0896-6273\(00\)81043-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81043-0).

McKenna, M. P., *et al.*, “Putative *Drosophila* Pheromone-Binding Proteins Expressed in a Subregion of the Olfactory System.” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 23, 1994, pp. 16340–47, doi:[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)34013-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)34013-9).

Meiselman, Matthew, *et al.*, “Endocrine Network Essential for Reproductive Success in *Drosophila melanogaster*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 114, no. 19, Proceedings of the National Academy of Sciences, May 2017, pp. E3849–58, doi:[10.1073/pnas.1620760114](https://doi.org/10.1073/pnas.1620760114).

Meiselman, Matthew R., Anindya Ganguly, *et al.*, “Endocrine Modulation of Primary Chemosensory Neurons Regulates *Drosophila* Courtship Behavior.” *PLOS Genetics*, vol. 18, no. 8, Public Library of Science, Aug. 2022, p. e1010357, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010357>.

Meiselman, Matthew R., Timothy G. Kingan, *et al.*, “Stress-Induced Reproductive Arrest in *Drosophila* Occurs through ETH Deficiency-Mediated Suppression of Oogenesis and Ovulation.” *BMC Biology*, vol. 16, no. 1, 2018, p. 18, doi:10.1186/s12915-018-0484-9.

Melander, A. L. “Can Insects Become Resistant to Sprays?1.” *Journal of Economic Entomology*, vol. 7, no. 2, Apr. 1914, pp. 167–73, doi:10.1093/jee/7.2.167.

Mesquita, Rafael D., *et al.*, “Genome of *Rhodnius prolixus*, an Insect Vector of Chagas Disease, Reveals Unique Adaptations to Hematophagy and Parasite Infection.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, no. 48, Proceedings of the National Academy of Sciences, Dec. 2015, pp. 14936–41, doi:10.1073/pnas.1506226112.

Michalkova, Veronika, *et al.*, “Amelioration of Reproduction-Associated Oxidative Stress in a Viviparous Insect Is Critical to Prevent Reproductive Senescence.” *PLOS ONE*, vol. 9, no. 4, Public Library of Science, Apr. 2014, p. e87554, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087554>.

Montella, Isabela Reis, *et al.*, “The Classification of Esterases: An Important Gene Family Involved in Insecticide Resistance - A Review.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 107, scielo, 2012.

Morales-Ramos, Juan A., *et al.*, “Self-Selection of Agricultural By-Products and Food Ingredients by *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) and Impact on Food Utilization and Nutrient Intake.” *Insects*, vol. 11, no. 12, 2020, doi:10.3390/insects11120827.

Mougabure-Cueto, Gastón, and María Inés Picollo. “Insecticide Resistance in Triatomines BT - Triatominae - The Biology of Chagas Disease Vectors.” Edited by Alessandra Guarneri and Marcelo Lorenzo, Springer International Publishing, 2021, pp. 537–55, doi:10.1007/978-3-030-64548-9_19.

Mougabure-Cueto, Gastón, and María Inés Picollo. “Insecticide Resistance in Vector Chagas Disease: Evolution, Mechanisms and Management.” *Acta Tropica*, vol. 149, 2015, pp. 70–85, doi:<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.014>.

Moyes, Catherine, *et al.*, “Contemporary Status of Insecticide Resistance in the Major *Aedes* Vectors of Arboviruses Infecting Humans.” *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 11, July 2017, p. e0005625, doi:10.1371/journal.pntd.0005625.

Mulhair, Peter, *et al.*, “Diversity, Duplication, and Genomic Organization of Homeobox Genes in Lepidoptera.” *Genome Research*, vol. 33, Dec. 2022, p. gr.277118.122, doi:10.1101/gr.277118.122.

Murphy, Katherine A., *et al.*, “Accelerating Research on Spotted Wing *Drosophila* Management Using Genomic Technologies.” *Journal of Pest Science*, vol. 89, no. 3, 2016, pp. 631–41, doi:10.1007/s10340-016-0741-z.

Musolin, Dmitry L. “Surviving Winter: Diapause Syndrome in the Southern Green Stink Bug *Nezara viridula* in the Laboratory, in the Field, and under Climate Change Conditions.” *Physiological Entomology*, vol. 37, no. 4, John Wiley & Sons, Ltd, Dec. 2012, pp. 309–22, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2012.00846.x>.

Mysore, Keshava, *et al.*, “Disruption of *Aedes aegypti* Olfactory System Development through Chitosan/SiRNA Nanoparticle Targeting of Semaphorin-1a.” *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 7, May 2013, p. e2215, doi:10.1371/journal.pntd.0002215.

Narahashi, Toshio. “Neurophysiological Effects of Insecticides.” *Hayes’ Handbook of Pesticide Toxicology*, vol. 1, Dec. 2010, pp. 799–817, doi:10.1016/B978-0-12-374367-1.00031-8.

Nardini, Luisa, *et al.*, “Detoxification Enzymes Associated with Insecticide Resistance in Laboratory Strains of *Anopheles arabiensis* of Different Geographic Origin.” *Parasites & Vectors*, vol. 5, no. 1, 2012, p. 113, doi:10.1186/1756-3305-5-113.

Nässel, Dick, and Dan Larhammar. *Neuropeptides and Peptide Hormones*. 2013, pp. 213–37, doi:10.1007/978-3-642-10769-6_11.

Nässel, Dick R., and Meet Zandawala. “Endocrine Cybernetics: Neuropeptides as Molecular Switches in Behavioural Decisions.” *Open Biology*, vol. 12, no. 7, Royal Society, July 2022, p. 220174, doi:10.1098/rsob.220174.

Nässel, Dick R., and Meet Zandawala. “Recent Advances in Neuropeptide Signaling in *Drosophila*, from Genes to Physiology and Behavior.” *Progress in Neurobiology*, vol. 179, 2019, p. 101607, doi:https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.02.003.

Nei, Masatoshi, and Alejandro Rooney. “Nei M, Rooney AP. Concerted and Birth-and-Death Evolution of Multigene Families. *Annu Rev Genet* 39: 121-152.” *Annual Review of Genetics*, vol. 39, Feb. 2005, pp. 121–52, doi:10.1146/annurev.genet.39.073003.112240.

Nguyen, Lam-Tung, *et al.*, “IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies.” *Molecular Biology and Evolution*, vol. 32, no. 1, Jan. 2015, pp. 268–74, doi:10.1093/molbev/msu300.

Njoroge, Harun, *et al.*, “Identification of a Rapidly-Spreading Triple Mutant for High-Level Metabolic Insecticide Resistance in *Anopheles gambiae* Provides a Real-Time Molecular Diagnostic for Anti-Malarial Intervention Deployment.” *Molecular Ecology*, 2022, doi:10.22541/au.164492990.07150000/v1.

Nomura-Kitabayashi, Aya, *et al.*, “Purification and Localization of P10, a Novel Protein That Increases in Nymphal Regenerating Legs of *Periplaneta americana* (American Cockroach).” *The International Journal of Developmental Biology*, vol. 36, Oct. 1992, pp. 391–98.

Nomura Kitabayashi, Aya, *et al.*, “Molecular Cloning of cDNA for P10, a Novel Protein That Increases in the Regenerating Legs of *Periplaneta americana* (American Cockroach).” *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 28, no. 10, 1998, pp. 785–90, doi:https://doi.org/10.1016/S0965-1748(98)00058-7.

Nyanjom, Steven Ger, *et al.*, “Expression Levels of Odorant Receptor Genes in the Savanna Tsetse Fly, *Glossina morsitans morsitans*.” *Journal of Medical Entomology*, vol. 55, no. 4, June 2018, pp. 855–61, doi:10.1093/jme/tjy018.

OERKE, E. C. "Crop Losses to Pests." *The Journal of Agricultural Science*, 2005/12/09, vol. 144, no. 1, Cambridge University Press, 2006, pp. 31–43, doi:DOI: 10.1017/S0021859605005708.

Oliver, Shüné V, and Basil D. Brooke. "The Effect of Multiple Blood-Feeding on the Longevity and Insecticide Resistant Phenotype in the Major Malaria Vector *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae)." *Parasites & Vectors*, vol. 7, no. 1, 2014, p. 390, doi:10.1186/1756-3305-7-390.

Omondi, Bonaventure, *et al.*, "Evaluation of Reference Genes for Insect Olfaction Studies." *Parasites & Vectors*, vol. 8, Apr. 2015, doi:10.1186/s13071-015-0862-x.

Ons, S, *et al.*, "Neuropeptide Precursor Gene Discovery in the Chagas Disease Vector *Rhodnius prolixus*." *Insect Molecular Biology*, vol. 20, no. 1, John Wiley & Sons, Ltd, Feb. 2011, pp. 29–44, doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01050.x.

Ons, Sheila, Andrés Lavore, *et al.*, "Identification of G Protein Coupled Receptors for Opsines and Neurohormones in *Rhodnius prolixus*. Genomic and Transcriptomic Analysis." *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 69, 2016, pp. 34–50, doi:https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.05.003.

Ons, Sheila. "Neuropeptides in the Regulation of *Rhodnius prolixus* Physiology." *Journal of Insect Physiology*, vol. 97, 2017, pp. 77–92, doi:https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.05.003.

Ons, Sheila, Xavier Bellés, *et al.*, "Orcokinin Contribute to the Regulation of Vitellogenin Transcription in the Cockroach *Blattella germanica*." *Journal of Insect Physiology*, vol. 82, 2015, pp. 129–33, doi:https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.10.002.

Orchard, Ian, *et al.*, "The Proctolin Gene and Biological Effects of Proctolin in the Blood-Feeding Bug, *Rhodnius prolixus*." *Frontiers in Endocrinology*, vol. 2, Oct. 2011, p. 59, doi:10.3389/fendo.2011.00059.

Paim, R M M, *et al.*, "Effect of Salivary CYP4EM1 and CYP4EM2 Gene Silencing on the Life Span of Chagas Disease Vector *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) Exposed to Sublethal Dose of Deltamethrin." *Insect Molecular Biology*, vol. 31, no. 1, John Wiley & Sons, Ltd, Feb. 2022, pp. 49–59, doi:https://doi.org/10.1111/imb.12737.

Paim, Rafaela, *et al.*, "Validation of Reference Genes for Expression Analysis in the Salivary Gland and the Intestine of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) under Different Experimental Conditions by Quantitative Real-Time PCR." *BMC Research Notes*, vol. 5, Mar. 2012, p. 128, doi:10.1186/1756-0500-5-128.

Paim, Rafaela M M, *et al.*, "Long-Term Effects and Parental RNAi in the Blood Feeder *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae)." *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 43, no. 11, 2013, pp. 1015–20, doi:https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.08.008.

Panizzi, A. R., and F. Slansky. "Review of Phytophagous Pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) Associated with Soybean in the Americas." *The Florida Entomologist*, vol. 68, no. 1, Florida Entomological Society, Apr. 1985, pp. 184–214, doi:10.2307/3494344.

Panizzi, Antônio. "Wild Hosts of Pentatomids: Ecological Significance and Role in Their Pest Status on Crops." *Annual Review of Entomology*, vol. 42, Feb. 1997, pp. 99–122, doi:10.1146/annurev.ento.42.1.99.

Park, Yoonseong, *et al.*, "Deletion of the Ecdysis-Triggering Hormone Gene Leads to Lethal Ecdysis Deficiency." *Development (Cambridge, England)*, vol. 129, Feb. 2002, pp. 493–503, doi:10.1242/dev.129.2.493.

Pascual, Nuria, *et al.*, "Orcokinin in Insects and Other Invertebrates." *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 34, Dec. 2004, pp. 1141–46, doi:10.1016/j.ibmb.2004.07.005.

Pathak, Vinay Mohan, *et al.*, "Current Status of Pesticide Effects on Environment, Human Health and It's Eco-Friendly Management as Bioremediation: A Comprehensive Review." *Frontiers in Microbiology*, vol. 13, Aug. 2022, doi:10.3389/fmicb.2022.962619.

Pavliidi, Nena, *et al.*, "Molecular Characterization of Pyrethroid Resistance in the Olive Fruit Fly *Bactrocera oleae*." *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 148, 2018, pp. 1–7, doi:https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.03.011.

Pedrini, Nicolás, *et al.*, "Control of Pyrethroid-Resistant Chagas Disease Vectors with Entomopathogenic Fungi." *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 3, no. 5, Public Library of Science, May 2009, p. e434, https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000434.

Pelletier, Julien, and Walter S. Leal. "Characterization of Olfactory Genes in the Antennae of the Southern House Mosquito, *Culex quinquefasciatus*." *Journal of Insect Physiology*, vol. 57, no. 7, 2011, pp. 915–29, doi:https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.04.003.

Pelosi, Paolo, Immacolata Iovinella, *et al.*, "Beyond Chemoreception: Diverse Tasks of Soluble Olfactory Proteins in Insects." *Biological Reviews*, vol. 93, no. 1, John Wiley & Sons, Ltd, Feb. 2018, pp. 184–200, doi:https://doi.org/10.1111/brv.12339.

Pelosi, Paolo, Mariantonietta Calvello, *et al.*, "Diversity of Odorant-Binding Proteins and Chemosensory Proteins in Insects." *Chemical Senses*, vol. 30, no. suppl_1, Jan. 2005, pp. i291–92, doi:10.1093/chemse/bjh229.

Peng, X., *et al.*, "Chemosensory Proteins Participate in Insecticide Susceptibility in *Rhopalosiphum padi*, a Serious Pest on Wheat Crops." *Insect Molecular Biology*, vol. 30, no. 2, John Wiley & Sons, Ltd, Apr. 2021, pp. 138–51, doi:https://doi.org/10.1111/imb.12683.

Peng, Yingchuan, *et al.*, "Identification of a Double-Stranded RNA-Degrading Nuclease Influencing Both Ingestion and Injection RNA Interference Efficiency in the Red Flour Beetle *Tribolium castaneum*." *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 125, 2020, p. 103440, doi:https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103440.

Picollo, María Inés, *et al.*, "High Resistance to Pyrethroid Insecticides Associated with Ineffective Field Treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina ." *Journal of Medical Entomology*, vol. 42, no. 4, July 2005, pp. 637–42, doi:10.1093/jmedent/42.4.637.

Ponce, Carlos. "Current Situation of Chagas Disease in Central America." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 102, scielo , 2007.

Pontes, Gina B., *et al.*, "Metasternal Gland Volatiles and Sexual Communication in the Triatomine Bug, *Rhodnius prolixus*." *Journal of Chemical Ecology*, vol. 34, no. 4, 2008, pp. 450–57, doi:10.1007/s10886-008-9431-5.

Prokop, Jakub, *et al.*, "Diversity, Form, and Postembryonic Development of Paleozoic Insects." *Annual Review of Entomology*, vol. 68, Jan. 2023, pp. 401–29, doi:10.1146/annurev-ento-120220-022637.

Provecho, Yael Mariana, *et al.*, "Urban Infestation by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), an Overlooked Phenomena for Chagas Disease in Argentina." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 116, scielo , 2021.

Quinlan, Michael C., *et al.*, "Anti-Diuresis in the Blood-Feeding Insect *Rhodnius prolixus* Stål: The Peptide CAP2b and Cyclic GMP Inhibit Malpighian Tubule Fluid Secretion." *Journal of Experimental Biology*, vol. 200, no. 17, Sept. 1997, pp. 2363–67, doi:10.1242/jeb.200.17.2363.

Raguso, Robert A., *et al.*, "The Raison d'être of Chemical Ecology." *Ecology*, vol. 96, no. 3, John Wiley & Sons, Ltd, Mar. 2015, pp. 617–30, doi:<https://doi.org/10.1890/14-1474.1>.

Ramos, D. L., *et al.* "Ecosystem Services Provided by Insects in Brazil: What Do We Really Know?" *Neotropical Entomology*, vol. 49, no. 6, Springer, 1 Dec. 2020, pp. 783–94, doi:10.1007/s13744-020-00781-y.

Ramos-Elorduy, Julieta. "Los Insectos Comestibles de Brasil: Etnicidad, Diversidad e Importancia En La Alimentación." *Bol Soc Entomol Aragon*, vol. 38, Jan. 2006.

Ramos-Elorduy, Julieta. "Anthropo-entomophagy: Cultures, Evolution and Sustainability." *Entomological Research*, vol. 39, Sept. 2009, pp. 271–88, doi:10.1111/j.1748-5967.2009.00238.x.

Rane, Rahul V, Tom K. Walsh, *et al.*, "Are Feeding Preferences and Insecticide Resistance Associated with the Size of Detoxifying Enzyme Families in Insect Herbivores?" *Current Opinion in Insect Science*, vol. 13, 2016, pp. 70–76, doi:<https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.12.001>.

Rane, Rahul V, Amol B. Ghodke, *et al.*, "Detoxifying Enzyme Complements and Host Use Phenotypes in 160 Insect Species." *Current Opinion in Insect Science*, vol. 31, 2019, pp. 131–38, doi:<https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.12.008>.

Ranson, Hilary, Charles Claudianos, *et al.*, "Evolution of Supergene Families Associated with Insecticide Resistance." *Science*, vol. 298, no. 5591, American Association for the Advancement of Science, Oct. 2002, pp. 179–81, doi:10.1126/science.1076781.

Ranson, Hilary, Raphael N'Guessan, *et al.*, "Pyrethroid Resistance in African Anopheline Mosquitoes: What Are the Implications for Malaria Control?" *Trends in Parasitology*, vol. 27, no. 2, 2011, pp. 91–98, doi:<https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.08.004>.

Rassi, Anis, and Joffre Rezende. "American Trypanosomiasis (Chagas Disease)." *Infectious Disease Clinics of North America*, vol. 26, June 2012, pp. 275–91, doi:10.1016/j.idc.2012.03.002.

Reimer, Lisa, *et al.*, "Relationship Between Kdr Mutation and Resistance to Pyrethroid and DDT Insecticides in Natural Populations of *Anopheles gambiae*." *Journal of Medical Entomology*, vol. 45, no. 2, Mar. 2008, pp. 260–66, doi:10.1093/jmedent/45.2.260.

Richardson, Jason R., *et al.* "Neurotoxicity of Pesticides." *Acta Neuropathologica*, vol. 138, no. 3, 2019, pp. 343–62, doi:10.1007/s00401-019-02033-9.

Rix, Rachel R., and G. Christopher Cutler. "Review of Molecular and Biochemical Responses during Stress Induced Stimulation and Hormesis in Insects." *Science of The Total Environment*, vol. 827, 2022, p. 154085, doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154085.

Rowen, Elizabeth K., *et al.*, "Early-Season Plant Cover Supports More Effective Pest Control than Insecticide Applications." *Ecological Applications*, vol. 32, no. 5, John Wiley & Sons, Ltd, July 2022, p. e2598, doi:https://doi.org/10.1002/eap.2598.

Saavedra-Rodriguez, K., *et al.*, "Exome-Wide Association of Deltamethrin Resistance in *Aedes aegypti* from Mexico." *Insect Molecular Biology*, vol. 28, no. 5, John Wiley & Sons, Ltd, Oct. 2019, pp. 591–604, doi:https://doi.org/10.1111/imb.12575.

Saldaña, Miguel, *et al.*, "Microbial Control of Arthropod-Borne Disease." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 112, Feb. 2017, pp. 1–13, doi:10.1590/0074-02760160373.

Sánchez-Gracia, A., *et al.*, "Molecular Evolution of the Major Chemosensory Gene Families in Insects." *Heredity*, vol. 103, no. 3, 2009, pp. 208–16, doi:10.1038/hdy.2009.55.

Sanou, Antoine, *et al.*, "Insecticide Resistance and Behavioural Adaptation as a Response to Long-Lasting Insecticidal Net Deployment in Malaria Vectors in the Cascades Region of Burkina Faso." *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, 2021, p. 17569, doi:10.1038/s41598-021-96759-w.

Santo Orihuela, Pablo, *et al.*, "Relative Contribution of Monooxygenase and Esterase to Pyrethroid Resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia." *Journal of Medical Entomology*, vol. 45, Apr. 2008, pp. 298–306, doi:10.1603/0022-2585(2008)45[298:RCOMAE]2.0.CO;2.

Schama, Renata, *et al.*, "*Rhodnius prolixus* Supergene Families of Enzymes Potentially Associated with Insecticide Resistance." *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 69, 2016, pp. 91–104, doi:https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.06.005.

Scherkenbeck, Jürgen, and Tino Zdobinsky. "Insect Neuropeptides: Structures, Chemical Modifications and Potential for Insect Control." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 17, no. 12, 2009, pp. 4071–84, doi:https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.12.061.

Schneider, Caroline A., *et al.*, "NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis." *Nature Methods*, vol. 9, no. 7, 2012, pp. 671–75, doi:10.1038/nmeth.2089.

Scolari, Francesca, *et al.*, “*Aedes Spp.* and Their Microbiota: A Review.” *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, Sept. 2019, doi:10.3389/fmicb.2019.02036.

Scott, Jeffrey G. “Cytochrome P450 Monooxygenases and Insecticide Resistance: Lessons from CYP6D1 BT - Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance.” Edited by Isaac Ishaaya, *Springer Berlin Heidelberg*, 2001, pp. 255–67, doi:10.1007/978-3-642-59549-3_12.

Scott, Jeffrey G. Investigating Mechanisms of Insecticide Resistance: Methods, Strategies, and Pitfalls BT - Pesticide Resistance in Arthropods. Edited by Richard T Roush and Bruce E Tabashnik, Springer US, 1990, pp. 39–57, doi:10.1007/978-1-4684-6429-0_3.

Shaw, W. Robert, *et al.*, “*Wolbachia* Infections in Natural *Anopheles* Populations Affect Egg Laying and Negatively Correlate with *Plasmodium* Development.” *Nature Communications*, vol. 7, no. 1, 2016, p. 11772, doi:10.1038/ncomms11772.

Shi, Zuokun, *et al.*, “Effects of Starvation on the Carbohydrate Metabolism in *Harmonia axyridis* (Pallas).” *Biology Open*, vol. 6, June 2017, p. bio.025189, doi:10.1242/bio.025189.

Sierra, Ivana, Natalia Capriotti, *et al.*, “Kdr Mutations in *Triatoma infestans* from the Gran Chaco Are Distributed in Two Differentiated Foci: Implications for Pyrethroid Resistance Management.” *Acta Tropica*, vol. 158, Mar. 2016, doi:10.1016/j.actatropica.2016.03.014.

Sierra, Ivana, Jose Manuel Latorre-Estivalis, *et al.*, “Transcriptomic Analysis and Molecular Docking Reveal Genes Involved in the Response of *Aedes aegypti* Larvae to an Essential Oil Extracted from Eucalyptus.” *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 15, no. 7, Public Library of Science, July 2021, p. e0009587, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009587>.

Sievers, Fabian, and Desmond G. Higgins. “Clustal Omega.” *Current Protocols in Bioinformatics*, vol. 48, no. 1, John Wiley & Sons, Ltd, Dec. 2014, pp. 3.13.1-3.13.16, doi:<https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0313s48>.

Sievers, Fabian, and Desmond G. Higgins. “Clustal Omega for Making Accurate Alignments of Many Protein Sequences.” *Protein Science*, vol. 27, no. 1, John Wiley & Sons, Ltd, Jan. 2018, pp. 135–45, doi:<https://doi.org/10.1002/pro.3290>.

Singh, Sujata, *et al.*, “Molecular Modeling of Chemosensory Protein 3 from *Spodoptera litura* and Its Binding Property with Plant Defensive Metabolites.” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, June 2020, p. 4073, doi:10.3390/ijms21114073.

Smith, Allan E., and Diane M. Secoy. “Forerunners of Pesticides in Classical Greece and Rome.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 23, no. 6, American Chemical Society, Nov. 1975, pp. 1050–55, doi:10.1021/jf60202a004.

Sparks, Michael E., *et al.*, “Brown Marmorated Stink Bug, *Halyomorpha halys* (Stål), Genome: Putative Underpinnings of Polyphagy, Insecticide Resistance Potential and Biology of a Top Worldwide Pest.” *BMC Genomics*, vol. 21, no. 1, 2020, p. 227, doi:10.1186/s12864-020-6510-7.

Sparks, Thomas C., *et al.*, “The Spinosyns, Spinosad, Spinetoram, and Synthetic Spinosyn Mimics - Discovery, Exploration, and Evolution of a Natural Product Chemistry and the

Impact of Computational Tools.” *Pest Management Science*, vol. 77, no. 8, John Wiley & Sons, Ltd, Aug. 2021, pp. 3637–49, doi:<https://doi.org/10.1002/ps.6073>.

Stangier, Joachim, *et al.*, “Orcokinin: A Novel Myotropic Peptide from the Nervous System of the Crayfish, *Orconectes limosus*.” *Peptides*, vol. 13, no. 5, 1992, pp. 859–64, doi:[https://doi.org/10.1016/0196-9781\(92\)90041-Z](https://doi.org/10.1016/0196-9781(92)90041-Z).

Sterkel, Marcos, Pedro Oliveira, *et al.*, “OKB, a Novel Family of Brain-Gut Neuropeptides from Insects.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 42, Mar. 2012, pp. 466–73, doi:[10.1016/j.ibmb.2012.03.003](https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.03.003).

Sterkel, Marcos, Mariano Volonté, *et al.*, “The Role of Neuropeptides in Regulating Ecdysis and Reproduction in the Hemimetabolous Insect *Rhodnius prolixus*.” *Journal of Experimental Biology*, vol. 225, no. 17, Sept. 2022, p. jeb244696, doi:[10.1242/jeb.244696](https://doi.org/10.1242/jeb.244696).

Sun, Dongdong, *et al.*, “Identification of Candidate Olfactory Genes in the Antennal Transcriptome of the Stink Bug *Halyomorpha halys*.” *Frontiers in Physiology*, vol. 11, July 2020, doi:[10.3389/fphys.2020.00876](https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00876).

Swenson, Krister, *et al.*, “Gene Tree Correction for Reconciliation and Species Tree Inference.” *Algorithms for Molecular Biology: AMB*, vol. 7, Nov. 2012, p. 31, doi:[10.1186/1748-7188-7-31](https://doi.org/10.1186/1748-7188-7-31).

Szakács, Gergely, *et al.*, “The Role of ABC Transporters in Drug Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity (ADME–Tox).” *Drug Discovery Today*, vol. 13, no. 9, 2008, pp. 379–93, doi:<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.12.010>.

Taning, Clauvis, *et al.*, “Engineered Flock House Virus for Targeted Gene Suppression Through RNAi in Fruit Flies (*Drosophila melanogaster*) in Vitro and in Vivo.” *Frontiers in Physiology*, vol. 9, July 2018, doi:[10.3389/fphys.2018.00805](https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00805).

Tellez–Garcia, A. A., *et al.*, “Genital Morphology and Copulatory Behavior in Triatomine Bugs (Reduviidae: Triatominae).” *Arthropod Structure & Development*, vol. 49, 2019, pp. 103–18, doi:<https://doi.org/10.1016/j.asd.2018.11.012>.

Thompson, Helen. “Assessing the Exposure and Toxicity of Pesticides to Bumblebees (*Bombus Spp.*)” *Apidologie*, vol. 32, Jan. 2001, pp. 305–21.

Tilman, David, *et al.*, “Global Food Demand and the Sustainable Intensification of Agriculture.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 50, Proceedings of the National Academy of Sciences, Dec. 2011, pp. 20260–64, doi:[10.1073/pnas.1116437108](https://doi.org/10.1073/pnas.1116437108).

Tosi, Simone, *et al.*, “Long-Term Field-Realistic Exposure to a next-Generation Pesticide, Flupyradifurone, Impairs Honey Bee Behaviour and Survival.” *Communications Biology*, vol. 4, no. 1, 2021, p. 805, doi:[10.1038/s42003-021-02336-2](https://doi.org/10.1038/s42003-021-02336-2).

Traverso, Lucila, Andrés Lavore, *et al.*, “Comparative and Functional Triatomine Genomics Reveals Reductions and Expansions in Insecticide Resistance-Related Gene Families.”

PLOS Neglected Tropical Diseases, vol. 11, no. 2, Public Library of Science, Feb. 2017, p. e0005313, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005313>.

Traverso, Lucila, Ivana Sierra, *et al.*, “Neuropeptidomics in *Triatoma infestans*. Comparative Transcriptomic Analysis among Triatomines.” *Journal of Physiology-Paris*, vol. 110, no. 3, Part A, 2016, pp. 83–98, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2016.12.005>.

Traverso, Lucila, Jose Manuel Latorre Estivalis, *et al.*, “Transcriptomic Modulation in Response to an Intoxication with Deltamethrin in a Population of *Triatoma infestans* with Low Resistance to Pyrethroids.” *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 16, no. 6, Public Library of Science, June 2022, p. e0010060, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010060>.

Truman, James W. B. T. Vitamins & Hormones. “Hormonal Control of Insect Ecdysis: Endocrine Cascades for Coordinating Behavior with Physiology.” *Insect Hormones*, vol. 73, Academic Press, 2005, pp. 1–30, doi:[https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)73001-6](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)73001-6).

Truman, J. W., y Riddiford, L. M. (2019). The evolution of insect metamorphosis: a developmental and endocrine view. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1783), 20190070. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0070>

Tsirigos, Konstantinos, *et al.*, “The TOPCONS Web Server for Consensus Prediction of Membrane Protein Topology and Signal Peptides.” *Nucleic Acids Research*, vol. 43, May 2015, doi:10.1093/nar/gkv485.

Uemura, Nozomi, *et al.*, “Recent Advances in the Study of Knockdown Resistance Mutations in *Aedes* Mosquitoes with a Focus on Several Remarkable Mutations.” *Current Opinion in Insect Science*, vol. 63, 2024, p. 101178, doi:<https://doi.org/10.1016/j.cois.2024.101178>.

van Rij, Ronald P., and Raul Andino. “The Silent Treatment: RNAi as a Defense against Virus Infection in Mammals.” *Trends in Biotechnology*, vol. 24, no. 4, Elsevier, Apr. 2006, pp. 186–93, doi:10.1016/j.tibtech.2006.02.006.

Vassena, C. V, *et al.*, “Insecticide Resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*.” *Medical and Veterinary Entomology*, vol. 14, no. 1, John Wiley & Sons, Ltd, Mar. 2000, pp. 51–55, doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2000.00203.x>.

Vatanparast, Mohammad, and Yonggyun Kim. “Optimization of Recombinant Bacteria Expressing DsRNA to Enhance Insecticidal Activity against a Lepidopteran Insect, *Spodoptera exigua*.” *PLOS ONE*, vol. 12, no. 8, Public Library of Science, Aug. 2017, p. e0183054, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183054>.

Veenstra, Jan A. “Isolation and Structure of Corazonin, a Cardioactive Peptide from the American Cockroach.” *FEBS Letters*, vol. 250, no. 2, John Wiley & Sons, Ltd, July 1989, pp. 231–34, doi:[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80727-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80727-6).

Veenstra, Jan A., and Takanori Ida. “More *Drosophila* Enteroendocrine Peptides: Orcokinin B and the CCHamides 1 and 2.” *Cell and Tissue Research*, vol. 357, no. 3, 2014, pp. 607–21, doi:10.1007/s00441-014-1880-2.

Verbakel, Lina, *et al.*, “Prothoracicostatic Activity of the Ecdysis-Regulating Neuropeptide Crustacean Cardioactive Peptide (CCAP) in the Desert Locust.” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, Dec. 2021, p. 13465, doi:10.3390/ijms222413465.

Verlinden, Heleen, *et al.*, “Chapter Three - Receptors for Neuronal or Endocrine Signalling Molecules as Potential Targets for the Control of Insect Pests.” *Target Receptors in the Control of Insect Pests: Part II*, edited by Ephraim B T - Advances in Insect Physiology Cohen, vol. 46, Academic Press, 2014, pp. 167–303, doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417010-0.00003-3.

Vieira, Filipe, and Julio Rozas. “Comparative Genomics of the Odorant-Binding and Chemosensory Protein Gene Families across the Arthropoda: Origin and Evolutionary History of the Chemosensory System.” *Genome Biology and Evolution*, vol. 3, Apr. 2011, pp. 476–90, doi:10.1093/gbe/evr033.

Vitta, Ana C. R., and Marcelo G. Lorenzo. “Copulation and Mate Guarding Behavior in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) .” *Journal of Medical Entomology*, vol. 46, no. 4, July 2009, pp. 789–95, doi:10.1603/033.046.0409.

Vogel, Elise, *et al.*, “RNA Interference in Insects: Protecting Beneficials and Controlling Pests.” *Frontiers in Physiology*, vol. 9, Jan. 2019, doi:10.3389/fphys.2018.01912.

Vogel, Kevin, *et al.*, “Phylogenetic Investigation of Peptide Hormone and Growth Factor Receptors in Five Dipteran Genomes.” *Frontiers in Endocrinology*, vol. 4, Dec. 2013, p. 193, doi:10.3389/fendo.2013.00193.

Volonté, Mariano, *et al.*, “Comparative Analysis of Detoxification-Related Gene Superfamilies across Five Hemipteran Species.” *BMC Genomics*, vol. 23, no. 1, 2022, p. 757, doi:10.1186/s12864-022-08974-y.

Vontas, J. G., *et al.*, “Resistance-Associated Point Mutations of Organophosphate Insensitive Acetylcholinesterase, in the Olive Fruit Fly *Bactrocera oleae*.” *Insect Molecular Biology*, vol. 11, no. 4, John Wiley & Sons, Ltd, Aug. 2002, pp. 329–36, doi:https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2002.00343.x.

Wang, Pingyang, *et al.*, “The Silkworm (*Bombyx mori*) Neuropeptide Orcokinin Is Involved in the Regulation of Pigmentation.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 114, 2019, p. 103229, doi:https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.103229.

Wang, Rui-Long, *et al.*, “Identification and Functional Analysis of a Novel Cytochrome P450 Gene CYP9A105 Associated with Pyrethroid Detoxification in *Spodoptera exigua* Hübner.” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 3, 2018, doi:10.3390/ijms19030737.

Wang, Yue, *et al.*, “A Cost of Reproduction: Oxidative Stress Susceptibility Is Associated with Increased Egg Production in *Drosophila melanogaster*.” *Experimental Gerontology*, vol. 36, no. 8, 2001, pp. 1349–59, doi:[https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(01\)00095-X](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(01)00095-X).

Wari, David *et al.* “Sap-Sucking Pests; They Do Matter.” *Insects* vol. 12, 4 363. 19 Apr. 2021, doi:10.3390/insects12040363

Waris, Muhammad, *et al.*, “The Role of Chemosensory Protein 10 in the Detection of Behaviorally Active Compounds in Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens*.” *Insect Science*, vol. 27, Dec. 2018, doi:10.1111/1744-7917.12659.

Waugh, David S. “An Overview of Enzymatic Reagents for the Removal of Affinity Tags.” *Protein Expression and Purification*, vol. 80, no. 2, 2011, pp. 283–93, doi:https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.005.

Wegener, Christian, and Anton Gorbashov. “Molecular Evolution of Neuropeptides in the Genus *Drosophila*.” *Genome Biology*, vol. 9, no. 8, 2008, p. R131, doi:10.1186/gb-2008-9-8-r131.

Weirauch, Christiane, *et al.*, “Revisiting Habitat and Lifestyle Transitions in Heteroptera (Insecta: Hemiptera): Insights from a Combined Morphological and Molecular Phylogeny.” *Cladistics*, vol. 35, no. 1, John Wiley & Sons, Ltd, Feb. 2019, pp. 67–105, doi:https://doi.org/10.1111/cla.12233.

White, Benjamin, and John Ewer. “Neural and Hormonal Control of Postecdysial Behaviors in Insects.” *Annual Review of Entomology*, vol. 59, Oct. 2013, doi:10.1146/annurev-ento-011613-162028.

Whitten, Miranda M. A. “Novel RNAi Delivery Systems in the Control of Medical and Veterinary Pests.” *Current Opinion in Insect Science*, vol. 34, 2019, pp. 1–6, doi:https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.02.001.

Whitten, Miranda M. A. “Symbiont-Mediated RNA Interference in Insects.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 283, no. 1825, Royal Society, Feb. 2016, p. 20160042, doi:10.1098/rspb.2016.0042.

Wigglesworth 1899-1994., Vincent B. “The Principles of Insect Physiology, by V.B. Wigglesworth. With 316 Illustrations.” *TA - TT -*, E.P. Dutton and Co, doi:LK - https://worldcat.org/title/839070.

Wigglesworth, J. S. “Experimental Growth Retardation in the Foetal Rat.” *The Journal of Pathology and Bacteriology*, vol. 88, no. 1, John Wiley & Sons, Ltd, July 1964, pp. 1–13, doi:https://doi.org/10.1002/path.1700880102.

WIGGLESWORTH, V. B. “Factors Controlling Moulting and ‘Metamorphosis’ in an Insect.” *Nature*, vol. 133, no. 3367, 1934, pp. 725–26, doi:10.1038/133725b0.

WIGGLESWORTH, V. B. “Motility of Insect Tracheoles.” *Nature*, vol. 172, no. 4371, 1953, p. 247, doi:10.1038/172247a0.

WIGGLESWORTH, V. B. “Physiology of Insects.” *Nature*, vol. 173, no. 4412, 1954, p. 965, doi:10.1038/173965a0.

Wu, Zhong-Zhen, *et al.*, “Candidate Genes Coding for Odorant Binding Proteins and Chemosensory Proteins Identified from Dissected Antennae and Mouthparts of the Southern Green Stink Bug *Nezara viridula*.” *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, vol. 31, May 2019, p. 100594, doi:10.1016/j.cbd.2019.100594.

Wulff, Juan Pedro, Ivana Sierra, *et al.*, “Orcokinin Neuropeptides Regulate Ecdysis in the Hemimetabolous Insect *Rhodnius prolixus*.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 81, 2017, pp. 91–102, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.01.003>.

Wulff, Juan Pedro, Natalia Capriotti, *et al.*, “Orcokinins Regulate the Expression of Neuropeptide Precursor Genes Related to Ecdysis in the Hemimetabolous Insect *Rhodnius prolixus*.” *Journal of Insect Physiology*, vol. 108, 2018, pp. 31–39, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.05.006>.

Wynant, Niels, *et al.*, “Tissue-Dependence and Sensitivity of the Systemic RNA Interference Response in the Desert Locust, *Schistocerca gregaria*.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 42, no. 12, 2012, pp. 911–17, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.09.004>.

Xu, Hongfei, *et al.*, “Chemosensory Proteins Are Associated with Thiamethoxam and Spirotetramat Tolerance in *Aphis Gossypii* Glover.” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 4, 2022, doi:10.3390/ijms23042356.

Xu, Jin, *et al.*, “RNA Interference in Moths: Mechanisms, Applications, and Progress.” *Genes*, vol. 7, no. 10, 2016, doi:10.3390/genes7100088.

Xu, PingXi, *et al.*, “*Drosophila* OBP LUSH Is Required for Activity of Pheromone-Sensitive Neurons.” *Neuron*, vol. 45, no. 2, 2005, pp. 193–200, doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.031>.

Xuan, Ning, *et al.*, “Increased Expression of CSP and CYP Genes in Adult Silkworm Females Exposed to Avermectins.” *Insect Science*, vol. 22, no. 2, John Wiley & Sons, Ltd, Apr. 2015, pp. 203–19, doi:<https://doi.org/10.1111/1744-7917.12116>.

Xue, Jian, *et al.*, “Genomes of the Rice Pest Brown Planthopper and Its Endosymbionts Reveal Complex Complementary Contributions for Host Adaptation.” *Genome Biology*, vol. 15, Dec. 2014, p. 21, doi:10.1186/s13059-014-0521-0.

Yamanaka, Naoki, Ladislav Roller, *et al.*, “*Bombyx* Orcokinins Are Brain-Gut Peptides Involved in the Neuronal Regulation of Ecdysteroidogenesis.” *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 519, Feb. 2011, pp. 238–46, doi:10.1002/cne.22517.

Yamanaka, Naoki, Sachie Yamamoto, *et al.*, “Neuropeptide Receptor Transcriptome Reveals Unidentified Neuroendocrine Pathways.” *PLOS ONE*, vol. 3, no. 8, Public Library of Science, Aug. 2008, p. e3048, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003048>.

Yan, Shuo, *et al.*, “Nanoparticle-Mediated Double-Stranded RNA Delivery System: A Promising Approach for Sustainable Pest Management.” *Insect Science*, vol. 28, no. 1, John Wiley & Sons, Ltd, Feb. 2021, pp. 21–34, doi:<https://doi.org/10.1111/1744-7917.12822>.

Yang, Jing, and Zhao-jun Han. “Optimisation of RNA Interference-Mediated Gene Silencing in *Helicoverpa armigera*.” *Austral Entomology*, vol. 53, no. 1, John Wiley & Sons, Ltd, Feb. 2014, pp. 83–88, doi:<https://doi.org/10.1111/aen.12052>.

Younas, Aneela, *et al.*, “Functional Analysis of the Chemosensory Protein MsepCSP8 From the Oriental Armyworm *Mythimna separata*.” *Frontiers in Physiology*, vol. 9, July 2018, doi:10.3389/fphys.2018.00872.

Yunta, Cristina, *et al.*, “Chlorfenapyr Metabolism by Mosquito P450s Associated with Pyrethroid Resistance Identifies Potential Activation Markers.” *Scientific Reports*, vol. 13, Aug. 2023, doi:10.1038/s41598-023-41364-2.

Zeledón, Rodrigo, *et al.*, “Distribution and Ecological Aspects of *Rhodnius pallescens* in Costa Rica and Nicaragua and Their Epidemiological Implications.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 101, scielo, 2006.

Zeng, Yang, *et al.*, “A Chemosensory Protein BtabCSP11 Mediates Reproduction in *Bemisia tabaci*.” *Frontiers in Physiology*, vol. 11, June 2020, p. 709, doi:10.3389/fphys.2020.00709.

Zhang, Xiaoman, *et al.*, “Gut Transcriptome Analysis of P450 Genes and Cytochrome P450 Reductase in Three Moth Species Feeding on Gymnosperms or Angiosperms.” *Frontiers in Ecology and Evolution*, vol. 10, 2022, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2022.948043>.

Zhang, Xiaoshuai, *et al.*, “Juvenile Hormone Studies in *Drosophila melanogaster*.” *Frontiers in Physiology*, vol. 12, Feb. 2022, doi:10.3389/fphys.2021.785320.

Zhang, Xin, *et al.*, “Chitosan/Interfering RNA Nanoparticle Mediated Gene Silencing in Disease Vector Mosquito Larvae.” *Journal of Visualized Experiments*, vol. 97, Mar. 2015, doi:10.3791/52523.

Zhao, Zheng, *et al.*, “Grainy Head Signaling Regulates Epithelium Development and Ecdysis in *Blattella germanica*.” *Insect Science*, vol. 28, no. 2, John Wiley & Sons, Ltd, Apr. 2021, pp. 485–94, doi:<https://doi.org/10.1111/1744-7917.12780>.

Zhou, Jing-Jiang, *et al.*, “Genome and EST Analyses and Expression of a Gene Family with Putative Functions in Insect Chemoreception.” *Chemical Senses*, vol. 31, no. 5, June 2006, pp. 453–65, doi:10.1093/chemse/bjj050.

Zhu, Kun, and Subba Palli. “Mechanisms, Applications, and Challenges of Insect RNA Interference.” *Annual Review of Entomology*, vol. 65, Jan. 2020, doi:10.1146/annurev-ento-011019-025224.

Zitnan, D., and Michael Adams. “Neuroendocrine Regulation of Ecdysis.” *Insect Endocrinology*, vol. 3, Dec. 2012, pp. 253–309, doi:10.1016/B978-0-12-384749-2.10007-X.

Žitňan, Dušan, *et al.*, “Steroid Induction of a Peptide Hormone Gene Leads to Orchestration of a Defined Behavioral Sequence.” *Neuron*, vol. 23, no. 3, 1999, pp. 523–35, doi:[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80805-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80805-3).

Zou, F, *et al.*, “A Cluster of CYP6 Gene Family Associated with the Major Quantitative Trait Locus Is Responsible for the Pyrethroid Resistance in *Culex pipiens* Pallen.” *Insect Molecular Biology*, vol. 28, no. 4, John Wiley & Sons, Ltd, Aug. 2019, pp. 528–36, doi:<https://doi.org/10.1111/imb.12571>.

Zou, Feifei, *et al.*, "Inductions of a CYP6 Cluster Conferring Deltamethrin Resistance in Colonized and Field-Collected *Culex pipiens pallens*." *Parasitology Research*, vol. 121, Jan. 2022, doi:10.1007/s00436-021-07351-0.

Anexo I: Material suplementario

Material suplementario general

Tablas

Información suplementaria S1. Tabla de primers utilizados para el trabajo.

Nombre	Organismo	Secuencia
RhoprActin_Fw1	<i>R. prolixus</i>	ACACCCAGTTTTGCTTACGG
RhoprActin_Rv1	<i>R. prolixus</i>	GTTCCGGCTGTGGTGATGA
Drome_Actin_Fw	<i>D. melanogaster</i>	GCGTCGGTCAATTCATCTT
Drome_Actin_Rv	<i>D. melanogaster</i>	AAGCTGCAACCTCTTCGTCA
Drome_Tubulin_Fw	<i>D. melanogaster</i>	TGTCGCGTGTGAAACACTTC
Drome_Tubulin_Rv	<i>D. melanogaster</i>	AGCAGGCGTTTCCAATCTG
Rhopr_Actina_qPCR_Fw	<i>R. prolixus</i>	CCATGTACCCAGGTATTGCT
Rhopr_Actina_qPCR_Rv	<i>R. prolixus</i>	ATCTGTTGGAAGGTGGACAG
Q-PCR TUB-F	<i>R. prolixus</i>	TGTGCCCAAGGATGTGAACG
Q-PCR TUB-R	<i>R. prolixus</i>	CACAGTGGGTGGTTGGTAGTTGAT
Q-PCR CCAP Fw	<i>R. prolixus</i>	CTGCAAAAAGGCTTTATTTTCC
Q-PCR CCAP Rv	<i>R. prolixus</i>	TCCCATAACTTCGCTTCAGAC
Q-PCR CZ Fw	<i>R. prolixus</i>	TGCCCTTACTAGACAGGGG
Q-PCR CZ Rv	<i>R. prolixus</i>	CTGAAATGTTTGGCCAAAGACA
Q-PCR EH Fw	<i>R. prolixus</i>	TGTGCCCAGTGTAAAGAAAATGT
Q-PCR EH Rv	<i>R. prolixus</i>	TGTCCTCACAGTCTGGAATCA
Q-PCR ETH Fw	<i>R. prolixus</i>	GCAGAGATGAGTTCCACGAG
Q-PCR ETH Rv	<i>R. prolixus</i>	GTGATCCGCTGAACTGTCAC
ARNiAMPPrFw	<i>R. prolixus</i>	TAATACGACTCACTATAGGGCCAGTGCT GCAATGATAC
ARNiAMPPrRv	<i>R. prolixus</i>	TAATACGACTCACTATAGGGGAGCTGAA TGAAGCCATAC
OKART FW	<i>R. prolixus</i>	TGCCGCAGACAAACGTAATT
OKART RV	<i>R. prolixus</i>	ACAAAACCATCAAACCGCTTC
OKBRT FW	<i>R. prolixus</i>	GAGCGAAATTATGGACCAGCA
OKBRT RV	<i>R. prolixus</i>	ATGACCTCCACCCAAACCAT
OKAi Fw	<i>R. prolixus</i>	TAATACGACTCACTATAGGGGAAGCGGT TTTGATGGTTTTGT
OKAi Rv	<i>R. prolixus</i>	TAATACGACTCACTATAGGGGGGATTCTT TGCATAAATGGTCA
OKSRNAi Fwd	<i>R. prolixus</i>	TAATACGACTCACTATAGGGTCACTATCG CTGCGTTCTCTGT
OKSRNAi Rev	<i>R. prolixus</i>	TAATACGACTCACTATAGGGCTAAAGTAT CCAAATTTTCGGCCCTC
T7 full		ATAGAATTCTCTCTAGAAGCTTAATACGA CTCACTATAGGG
OK Fwd	<i>R. prolixus</i>	GGTCATTGTATGATCTTA

OK Rv	<i>R. prolixus</i>	AATGATGTGGCTCACTTT
CZi Fw	<i>R. prolixus</i>	TAATACGACTCACTATAGGGTGCCCTTTA CTAGACAGGGG
CZi Rv	<i>R. prolixus</i>	TAATACGACTCACTATAGGGCCTGTGGT ATAGTCTTTCCTTCA
ETHi Fw	<i>R. prolixus</i>	TAATACGACTCACTATAGGGGCTGCTGA TGGTAGAAGTGG
ETHi Rv	<i>R. prolixus</i>	TAATACGACTCACTATAGGGTACAGCAAT GGAACCTTCGCC
CCAPi Fw	<i>R. prolixus</i>	TAATACGACTCACTATAGGGTGCATTGGT CTCTGCTGTTC
CCAPi Rv	<i>R. prolixus</i>	TAATACGACTCACTATAGGGGCCTCTTG AATTGCTTCCCA
RhCSP13221RNAi_Rev:	<i>R. prolixus</i>	TAATACGACTCACTATAGGGGGTAGATG CCGGTTGGGTC
RhCSP13221RNAi_Fwd	<i>R. prolixus</i>	TAATACGACTCACTATAGGGCCAGCACC TACACCACCAAGTA
QPCR_CSPRPRC013223_FW	<i>R. prolixus</i>	TGTTTTCTAAGCATGCTCGCC
QPCR_CSPRPRC013223_RV	<i>R. prolixus</i>	CTGAAAGTACCTCGTGTAGAG
QPCR_CSP_RPRC007134-Fw	<i>R. prolixus</i>	GATTGTCTTATGGATAGAGCA
QPCR_CSP_RPRC007134-Rv	<i>R. prolixus</i>	CCCAGCAAATCTTTTTTGAGC
QPCR_CSPRPRC013221_FW	<i>R. prolixus</i>	TGCACTGAAAAGCAGAAGGTC
QPCR_CSPRPRC013221_RV	<i>R. prolixus</i>	CTTAGCTTCTTGGGCGTACT
QPCR_Rhp_RPS15_FW	<i>R. prolixus</i>	CCCAGAAATGGTAGGAAGTATT
QPCR_Rhp_RPS15_RV	<i>R. prolixus</i>	CAGGTTTGTACGTTACTAAAC

Tabla S1. Tabla con la secuencia de cada uno de los primers de cada insecto utilizado en el presente trabajo.

Material suplementario al Capítulo II

Tablas

Información suplementaria S2.1. Valores p del análisis comparativo de enriquecimiento entre las enzimas detoxificantes y genes totales de las especies analizadas.

Superfamilia	Clase/Clado	Hhal vs Clec	Hhal vs Rpro	Clec vs Rpro	Nlug vs Clec	Nlug vs Rpro	Nlug vs Hhal	Nlug vs Nvir	Nvir vs Clec	Nvir vs Rpro	Nvir vs Hhal
CYP	Mitocondrial					P<0,05	P<0,05				
	CYP2						P<0,05				
	CYP3				P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001			
	CYP4			P<0,02	P<0,0025		P<0,025		P<0,05		
	Subtotal			P<0,05							
CCE	Clase dietaria				P<0,05	P<0,02	P<0,01	P<0,02			
	A-Esterasas				P<0,05	P<0,02	P<0,01	P<0,02			
	Procesamiento de hormonas y feromonas					P<0,05	P<0,001	P<0,001	P<0,02	P<0,025	
	B-Esterasas					P<0,05	P<0,001	P<0,001	P<0,02	P<0,025	
	Clase de neurodesarrollo						P<0,025	P<0,005	P<0,02	P<0,025	
	Neuroligina							P<0,02		P<0,02	
	Clase I										
	Neurotactina										
	Gliotactina										
	Glutactina										
	Acetilcolinas terasas										
Subtotal		P<0,001	P<0,001		P<0,001					P<0,001	

GST	Microsomal										
	Delta										
	Epsilon										
	Omega										
	Sigma										
	Theta										
	Zeta										
	Subtotal										
GST vs Genes totales	Total		P<0,05				P<0,005	-	-	-	-
CCE vs Genes totales	Total					P<0,005	P<0,001	-	-	-	-
CYP vs Genes totales	Total	P<0,001		P<0,001		P<0,001	P<0,001	-	-	-	-
CYP + CCE + GST vs Genes totales	Total	P<0,001		P<0,001		P<0,001	P<0,001	-	-	-	-

Tabla S2.1. Comparación entre superfamilias, familias, y genes detoxificantes totales mediante test de Chi-cuadrado sobre las especies analizadas. *Diferencias significativas entre hipótesis

Figuras

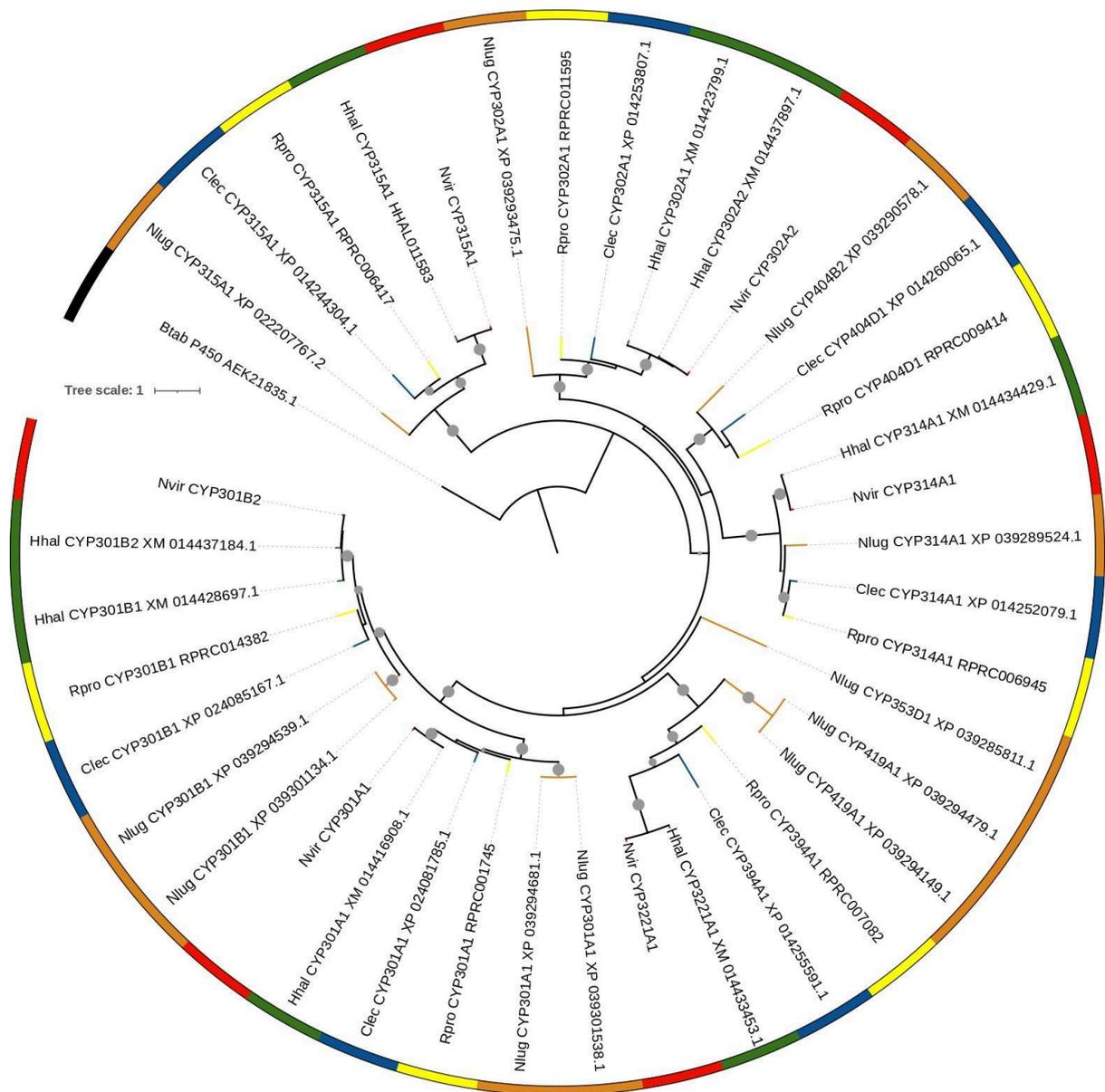


Figura S2.1. Filogenia del Clan mitocondrial de la superfamilia CYP de *N. viridula* (Rojo: Nvir), *R. prolixus* (Amarillo: Rpro), *H. halys* (Verde: Hhal), *C. lectularius* (Azul: Clec), y *N. lugens* (Naranja: Nlug). Un gen CYP de *Bemisia tabaci* fue usado como outgroup (AEK21835.1 - NCBI), y el árbol fue enraizado sobre esta secuencia. Los valores de soporte de rama > 80 fueron marcados con un círculo gris a escala.

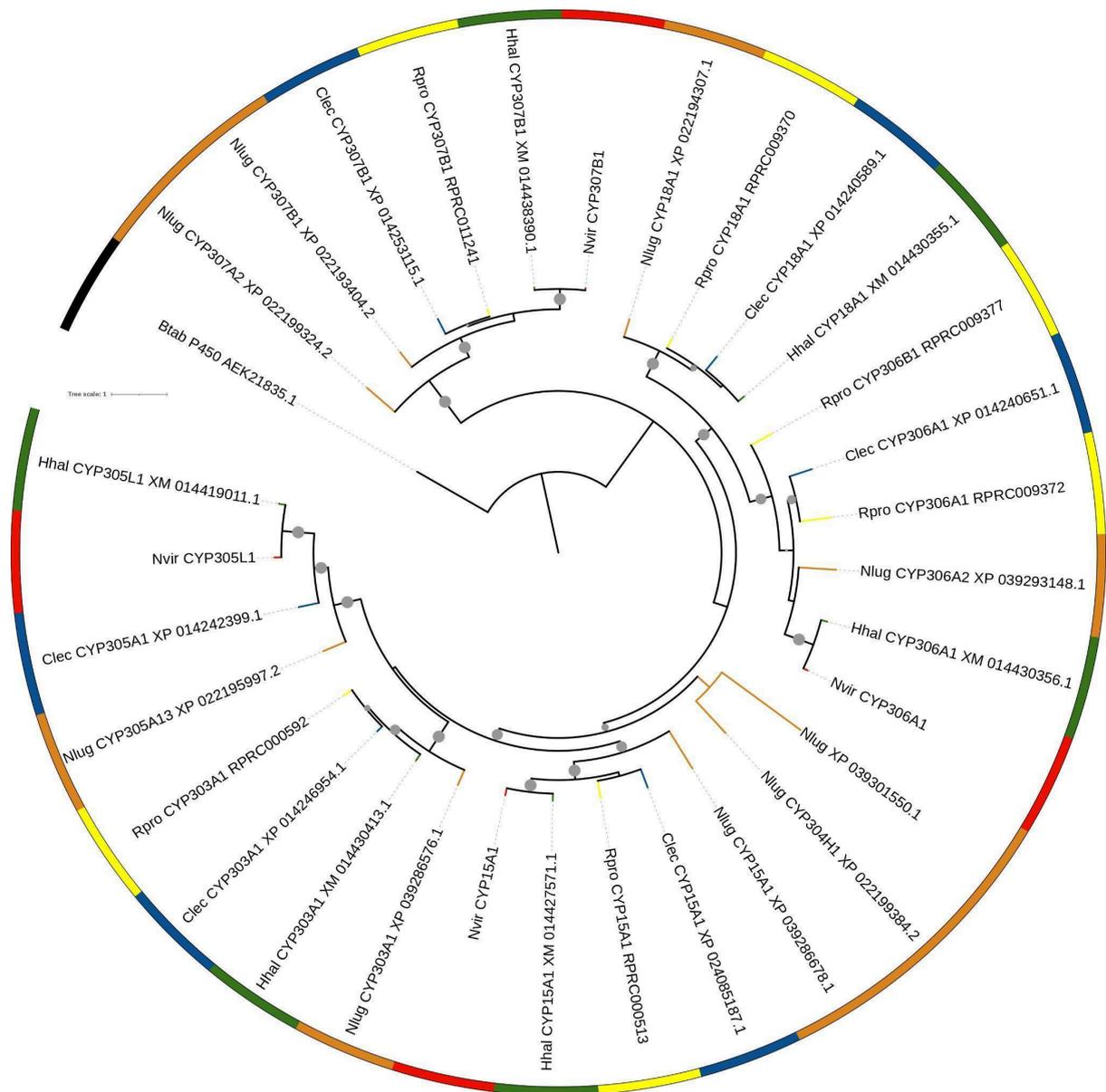


Figura S2.2. Filogenia del Clan CYP2 de la superfamilia CYP de *N. viridula* (Rojo: Nvir), *R. prolixus* (Amarillo: Rpro), *H. halys* (Verde: Hhal), *C. lectularius* (Azul: Clec), y *N. lugens* (Naranja: Nlug). Un gen CYP de *Bemisia tabaci* fue usado como outgroup (AEK21835.1 - NCBI), y el árbol fue enraizado sobre esta secuencia. Los valores de soporte de rama > 80 fueron marcados con un círculo gris a escala.

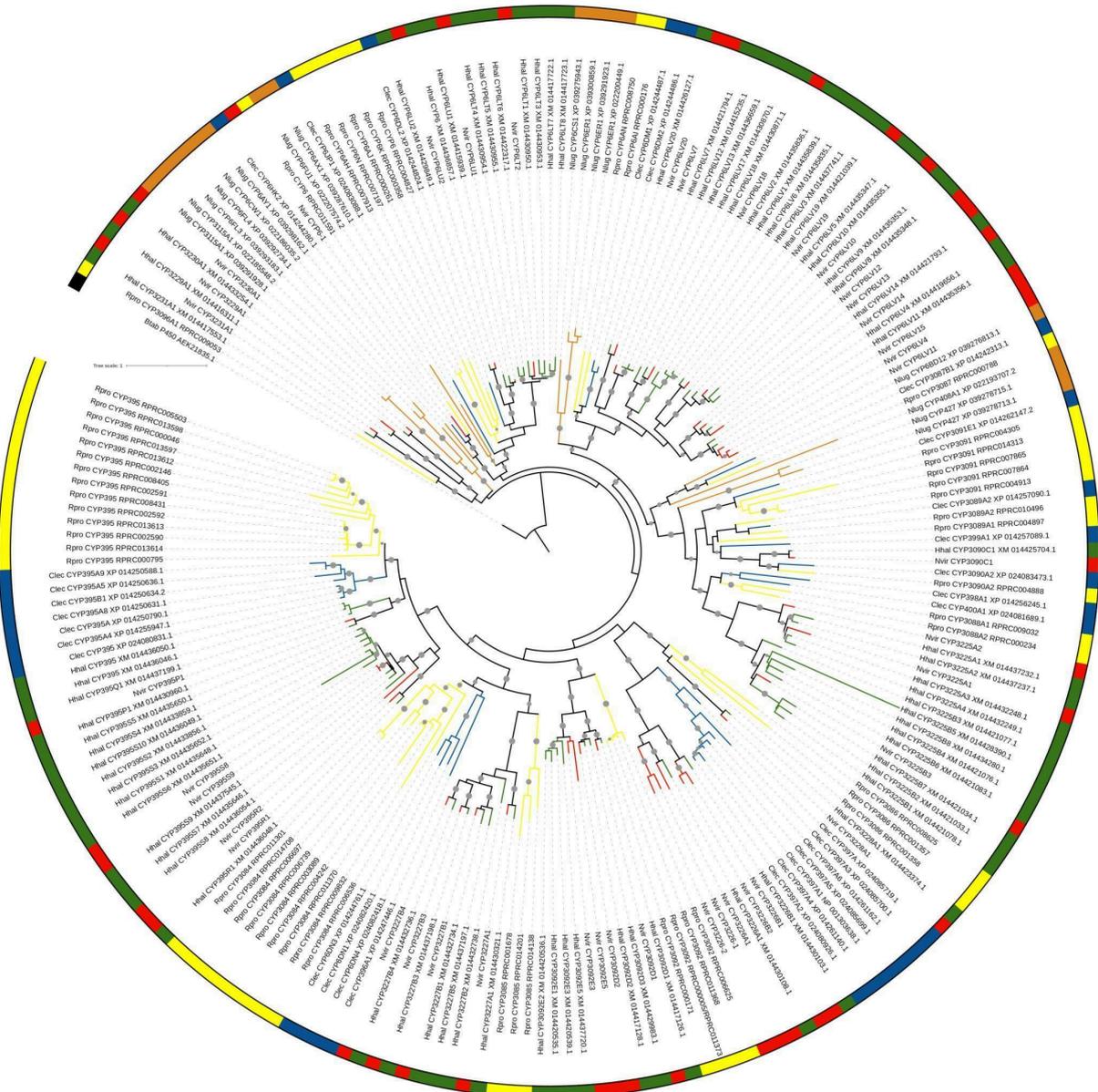


Figura S2.3. Filogenia del Clan CYP3 de la superfamilia CYP de *N. viridula* (Rojo: Nvir), *R. prolixus* (Amarillo: Rpro), *H. halys* (Verde: Hhal), *C. lectularius* (Azul: Clec), y *N. lugens* (Naranja: Nlug). Un gen CYP de *Bemisia tabaci* fue usado como outgroup (AEK21835.1 - NCBI), y el árbol fue enraizado sobre esta secuencia. Los valores de soporte de rama > 80 fueron marcados con un círculo gris a escala.

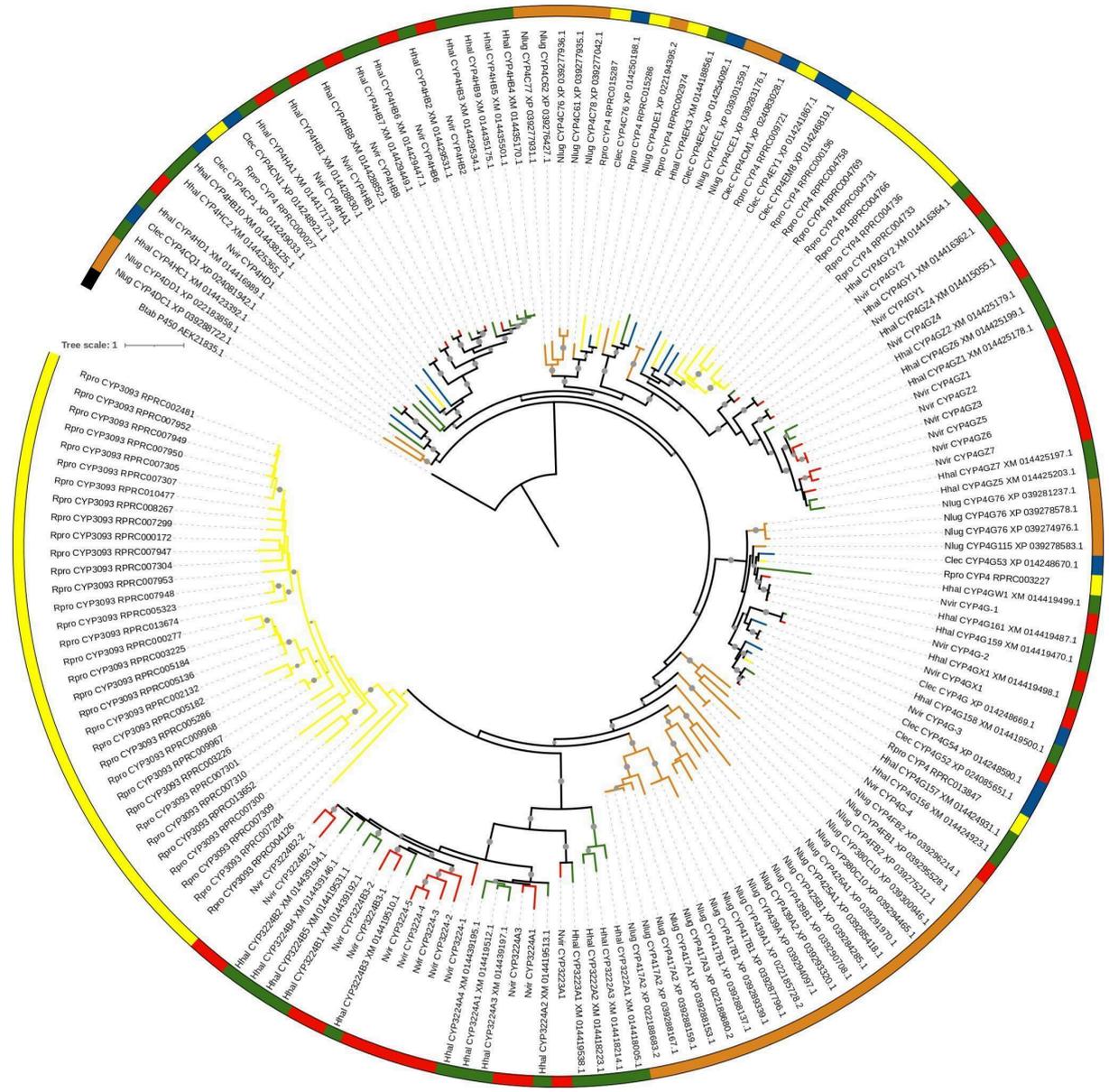


Figura S2.4. Filogenia del Clan CYP4 de la superfamilia CYP de *N. viridula* (Rojo: Nvir), *R. prolixus* (Amarillo: Rpro), *H. halys* (Verde: Hhal), *C. lectularius* (Azul: Clec), y *N. lugens* (Naranja: Nlug). Un gen CYP de *Bemisia tabaci* fue usado como outgroup (AEK21835.1 - NCBI), y el árbol fue enraizado sobre esta secuencia. Los valores de soporte de rama > 80 fueron marcados con un círculo gris a escala.

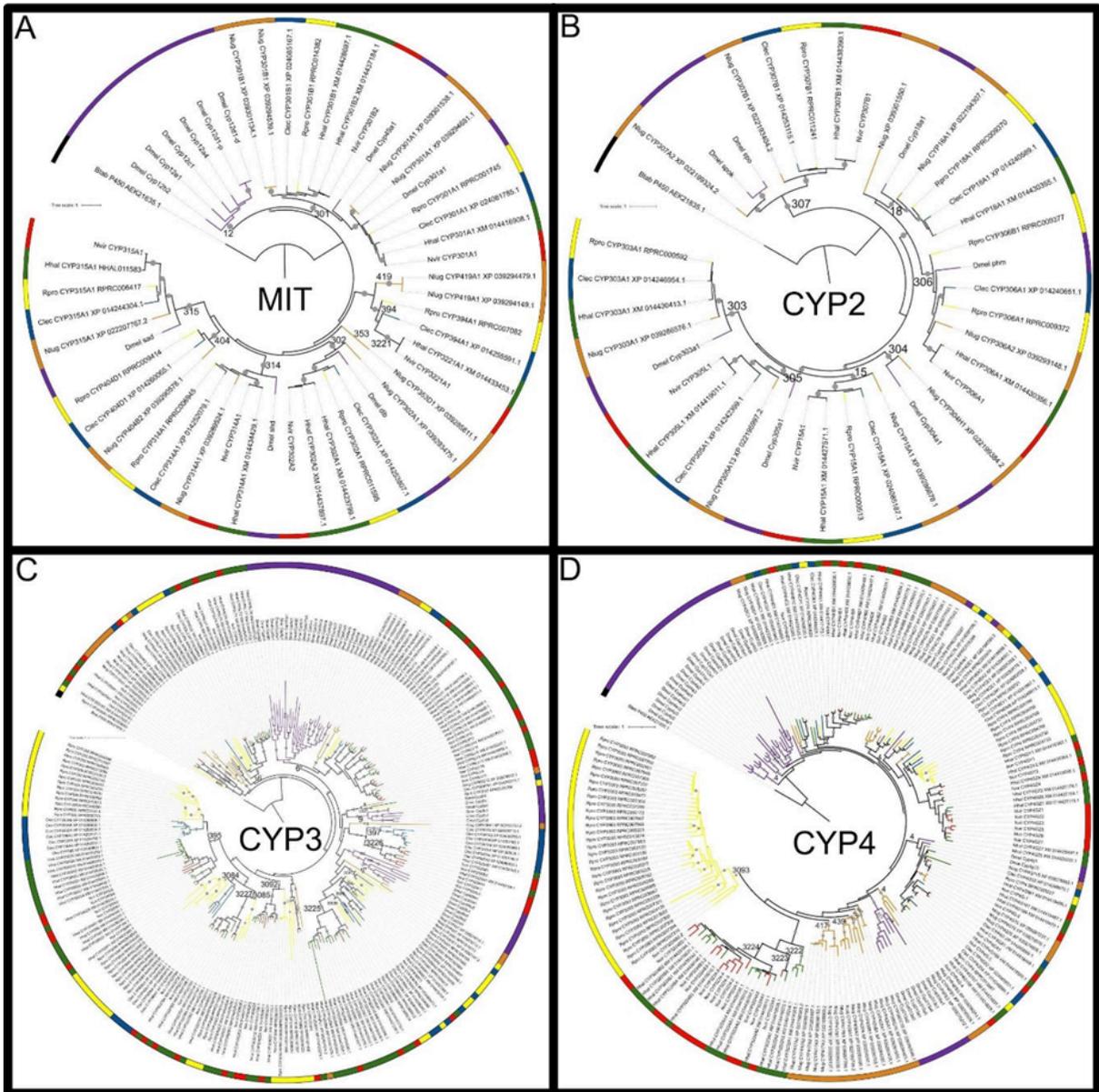


Figura S2.5. Filogenia de la superfamilia CYP de *N. viridula* (Rojo: Nvir), *R. prolixus* (Amarillo: Rpro), *H. halys* (Verde: Hhal), *C. lectularius* (Azul: Clec), *D. melanogaster* (Violeta: Dmel), y *N. lugens* (Naranja: Nlug). **A) Clan mitocondrial. B) Clan CYP2. C) Clan CYP3. D) Clan CYP4.** Un gen CYP de *Bemisia tabaci* fue usado como outgroup (AEK21835.1 - NCBI), y el árbol fue enraizado sobre esta secuencia. Los valores de soporte de rama > 80 fueron marcados con un círculo gris a escala.

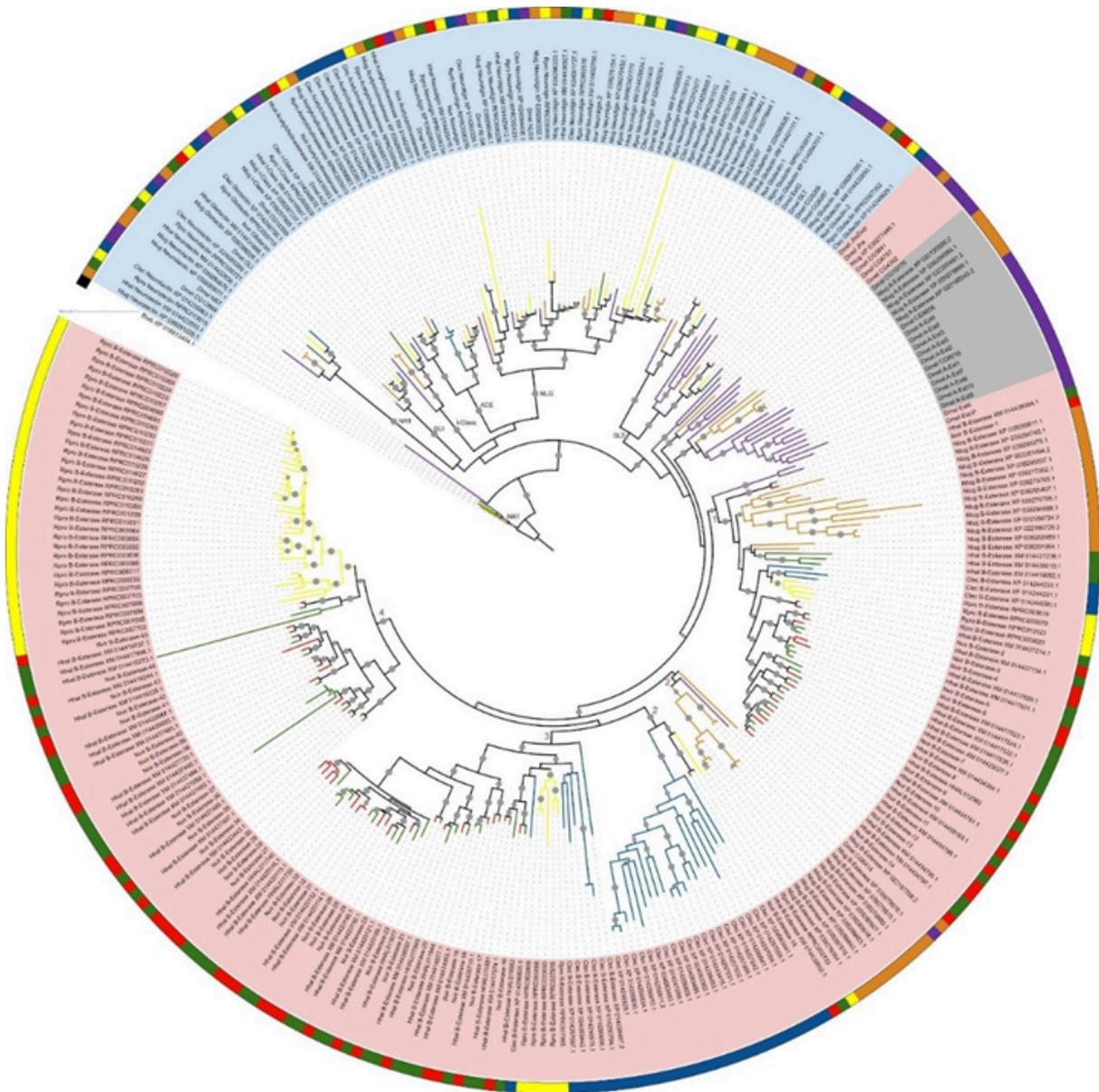


Figura S2.6. Filogenia de la superfamilia CCE de *N. viridula* (Rojo: Nvir), *R. prolixus* (Amarillo: Rpro), *H. halys* (Verde: Hhal), *C. lectularius* (Azul: Clec), *D. melanogaster* (Violeta: Dmel), y *N. lugens* (Naranja: Nlug). Las clases fueron resaltados en celeste (Neurodesarrollo), gris (Dietaria), y rosa (Procesamiento de hormonas y feromonas). Colinesterasa I de *Bemisia tabaci* fue usado como outgroup (XP_018913404.1 - NCBI), y el árbol fue enraizado sobre esta secuencia. Los valores de soporte de rama > 80 fueron marcados con un círculo gris a escala.

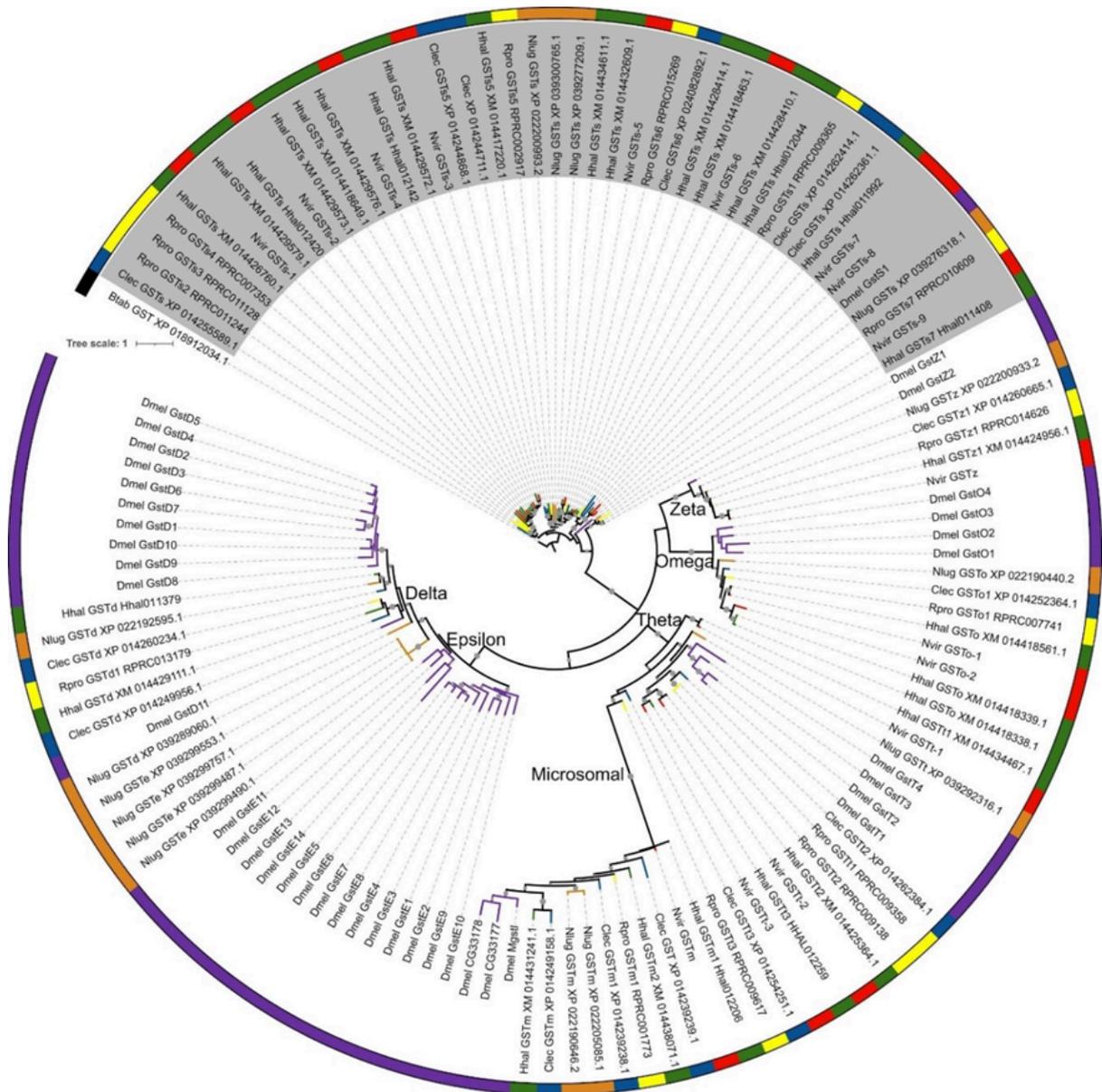


Figura S2.7. Filogenia de la superfamilia GST de *N. viridula* (Rojo: Nvir), *R. prolixus* (Amarillo: Rpro), *H. halys* (Verde: Hhal), *C. lectularius* (Azul: Clec), *D. melanogaster* (Violeta: Dmel), y *N. lugens* (Naranja: Nlug). La clase Sigma fue resaltada en gris, el resto de las clases se nombraron en el árbol. Una GST de *B. tabaci* fue usada como outgroup (XP_018912034.1 - NCBI), y el árbol fue enraizado sobre esta secuencia. Los valores de soporte de rama > 80 fueron marcados con un círculo gris a escala.

Información suplementaria electrónica

Debido a la extensión, los siguientes archivos se encuentran de forma digital:

Información suplementaria SE2.1. Secuencias nucleotídicas de *N. viridula*.

Información suplementaria SE2.2. Nombre de proteína, GenBank y ID en el árbol para cada secuencia usada en este estudio. Tabla A) Superfamilia CYP. Tabla B) Superfamilia CCE. Tabla C) Superfamilia GST.

Información suplementaria SE2.3. Análisis de los residuos conservados característicos de las secuencias CCE comparadas con Ace (CG17907) de *D. melanogaster*.

Información suplementaria SE2.4. Análisis de Chi-cuadrado de las diferentes superfamilias de genes relacionados a detoxificación.

Material suplementario al capítulo III

Tablas

Información suplementaria S3.1. Análisis de calidad de las secuencias CSP utilizadas en los análisis del capítulo 3.

Nombre	Fuente (Genoma y transcritomas)	Longitud (aa)	Estado	Péptido señal (valor p)	Codón de inicio	Codón de stop	Número de Cys conservadas	Número de Alfa helices
Btab_CSP_AFJ42498.1	NCBI	126	Completa	Si (0.989)	Si	Si	4	6
AgamCSP1	(1) (2)	127	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
AgamCSP2	(1) (2)	127	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
AgamCSP3	(1) (2)	126	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
AgamCSP4	(1) (2)	168	Completa	Si (0.996)	Si	Si	4	6
AgamCSP5	(1) (2)	151	Completa	Si (0.997)	Si	Si	4	6
AgamCSP6	(1) (2)	123	Completa	Si (0.997)	Si	Si	4	6

AgamCSP7	(1) (2)	107	Parcial	Si (0.986)	Si	Si	4	5
AgamCSP8	(1) (2)	117	Completa	Si (0.907)	Si	Si	4	7
CLEC00303 7	+ (3)	126	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
CLEC00447 2	+ (3)	125	Completa	Si (0.985)	Si	Si	4	6
CLEC00459 9	+ (3)	134	Completa	Si (0.954)	Si	Si	4	6
CLEC00809 3*	+ (3)	98	Parcial	Si (0.998)	Si	No	2	5
CLEC00809 4	+ (3)	86	Parcial	Si (0.986)	Si	No	2	3
CLEC00809 5	+ (3)	129	Completa	Si (0.998)	Si	Si	4	6
CLEC00809 6	+ (3)	129	Completa	Si (0.997)	Si	Si	4	6
CLEC00809 8	+ (3)	129	Completa	Si (0.991)	Si	Si	4	6
CLEC00809 9	+ (3)	129	Completa	Si (0.990)	Si	Si	4	6
CLEC01176 6	+ (3)	125	Completa	Si (0.939)	Si	Si	4	7
CLEC02503 0	+ (3)	119	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
CLEC02516 3	+ (3)	118	Completa	Si (0.992)	Si	Si	4	6
CLEC01168 6	+ (3)	124	Completa	Si (0.939)	Si	Si	4	7

CLEC01249 9	+ (3)	125	Completa	Si (0.992)	Si	Si	4	6
CLEC02538 3	+ (3)	121	Parcial	Si (0.999)	Si	Si	4	6
CLEC01279 3	+ (3)	137	Parcial	No (0.051)	Si	Si	2	6
CLEC01347 3	+ (3)	135	Completa	Si (0.965)	Si	Si	4	6
Dmel_NP_5 24121.2	(4)	151	Completa	Si (0.920)	Si	Si	4	7
Dmel_NP_5 24966.1	(4)	126	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
Dmel_NP_6 11990.1	(4)	121	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
Dmel_NP_7 26402.1	(4)	112	Completa	Si (0.916)	Si	Si	4	6
Hhal_XM_0 14418950.1- CSP5	+ (5)	128	Completa	Si (0.574)	Si	Si	4	6
Hhal_XM_0 14436938.1	+	127	Completa	Si (0.987)	Si	Si	4	6
Hhal_XM_0 14436935.1	+	126	Completa	Si (0.992)	Si	Si	4	6
Hhal_XM_0 14430494.1- CSP7	+ (5)	126	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
Hhal_XM_0 14421569.1- CSP8	+ (5)	126	Completa	Si (0.996)	Si	Si	4	7

Hhal_XM_0 14433350.1- CSP16	+ (5)	144	Completa	Si (0.918)	Si	Si	4	7
Hhal_XM_0 14430495.1- CSP1	+ (5)	135	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
Hhal_XM_0 14421629.1- CSP17	+ (5)	114	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
Hhal_XM_0 14421634.1- CSP2	+ (5)	131	Completa	Si (0.998)	Si	Si	4	6
Hhal_XM_0 14432270.1*	+	113	Parcial	Si (0.992)	Si	Si	4	5
Hhal_XM_0 14421632.1- CSP6	+ (5)	126	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
Hhal_XM_0 14421627.1- CSP12	+ (5)	120	Completa	Si (0.998)	Si	Si	4	6
Hhal_XM_0 14421628.1- CSP13	+ (5)	117	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
Hhal_XM_0 14416524.1- CSP9	+ (5)	126	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
Hhal_XM_0 14421395.1- CSP10	+ (5)	109	Parcial	Si (0.963)	Si	Si	4	5
Hhal_XM_0 14421635.1- CSP15	+ (5)	121	Completa	Si (0.998)	Si	Si	4	6

Hhal_XM_0 14436939.1	+	126	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
Hhal_XM_0 14421626.1- 2_HhalCSP 3	+ (5)	130	Completa	Si (0.997)	Si	Si	4	6
Hhal_XM_0 14421626.1- 1_HhalCSP 11	+ (5)	121	Completa	Si (0.998)	Si	Si	4	6
HhalCSP14	(5)	117	Completa	Si (0.984)	Si	Si	4	6
Hhal_XM_0 14430491.1	+	110	Parcial	Si (0.999)	Si	No	2	4
Nlug_XP_02 2186800.2	+ (6)	154	Completa	Si (0.986)	Si	Si	4	6
Nlug_XP_02 2186807.2	+ (6)	171	Completa	Si (0.740)	Si	Si	4	6
Nlug_XP_02 2188580.1	+ (6)	131	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
Nlug_XP_02 2188591.1	+ (6)	123	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
Nlug_ACJ64 054.1	+	129	Completa	Si (0.998)	Si	Si	4	6
Nlug_XP_02 2188879.1	+ (6)	129	Completa	Si (0.996)	Si	Si	4	6
Nlug_XP_02 2192879.1	+ (6)	189	Completa	Si (0.994)	Si	Si	4	6
Nlug_XP_02 2193604.1	+ (6)	137	Completa	Si (0.758)	Si	Si	4	8

Nlug_XP_02 2197409.1	+ (6)	138	Completa	Si (0.994)	Si	Si	4	6
Nlug_ACJ64 052.1	+	122	Completa	Si (0.995)	Si	Si	4	7
Nlug_ACJ64 053.1	+	126	Completa	Si (0.996)	Si	Si	4	6
Nlug_XP_02 2203688.2	+ (6)	130	Completa	Si (0.992)	Si	Si	4	6
Nlug_XP_03 9275119.1	+ (6)	128	Completa	Si (0.996)	Si	Si	4	6
Nlug_ADN0 6872.1	+	132	Completa	Si (0.993)	Si	Si	4	6
Nlug_ACJ64 050.1	+	129	Completa	Si (0.976)	Si	Si	4	6
Nlug_XP_03 9300420.1	+ (6)	130	Completa	Si (0.989)	Si	Si	4	6
Nlug_XP_02 2188430.2	+ (6)	165	Completa	Si (0.959)	Si	Si	4	7
Nvir_Csp25	+	119	Completa	Si (0.998)	Si	Si	4	6
Nvir_Csp1	+ (7)	126	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
Nvir_Csp2	+ (7)	135	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
Nvir_Csp3	+ (7)	128	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
Nvir_Csp4	+ (7)	117	Completa	Si (0.997)	Si	Si	4	6
Nvir_Csp5	+ (7)	126	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6

Nvir_Csp6	+ (7)	134	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	7
Nvir_Csp7	+ (7)	124	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
Nvir_Csp8	+ (7)	126	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
Nvir_Csp9	+ (7)	109	Completa	Si (0.997)	Si	Si	4	5
Nvir_Csp10	+ (7)	127	Completa	Si (0.998)	Si	Si	4	6
Nvir_Csp11	+ (7)	127	Completa	Si (0.592)	Si	Si	4	6
Nvir_Csp12	+ (7)	109	Parcial	Si (0.983)	Si	Si	4	5
Nvir_Csp13	+ (7)	127	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
Nvir_Csp14	+ (7)	128	Completa	Si (0.997)	Si	Si	4	6
Nvir_Csp15	+ (7)	109	Parcial	No (0.001)	No	Si	4	5
Nvir_Csp16	+ (7)	129	Completa	Si (0.998)	Si	Si	4	6
Nvir_Csp17	+ (7)	92	Parcial	No (0.001)	No	Si	4	5
Nvir_Csp18	+ (7)	129	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
Nvir_Csp19	+ (7)	101	Parcial	Si (0.982)	Si	Si	4	4
Nvir_Csp20	+ (7)	116	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6

Nvir_Csp21	+ (7)	115	Completa	Si (0.999)	Si	Si	4	6
Nvir_Csp22	+ (7)	79	Parcial	No (0.001)	No	Si	4	5
Nvir_Csp23	+ (7)	91	Parcial	Si (0.991)	Si	No	4	4
Nvir_Csp24	+ (7)	125	Completa	Si (0.990)	Si	Si	4	6
Olae002861 .1	+	105	Parcial**	Si (0.995)	Si	Si**	4	5
Olae003037 .1	+	116	Completa**	Si (0.998)	Si	Si**	4	6
Olae003038 .1	+	125	Completa**	Si (0.999)	Si	Si**	4	6
Olae003234 .1	+	94	Parcial**	Si (0.963)	Si	Si**	2	4
Olae007145 .1	+	122	Completa**	Si (0.995)	Si	Si**	4	6
Olae007517 .1	+	124	Completa**	Si (0.965)	Si	Si**	4	7
Olae007765 .1	+	126	Completa**	Si (0.999)	Si	Si**	4	6
Olae007769 .1	+	125	Completa**	Si (0.999)	Si	Si**	4	6
Olae009870 .1	+	123	Completa**	Si (0.990)	Si	Si**	4	7
Olae009955 .1	+	124	Completa**	Si (0.998)	Si	Si**	4	6
Olae011496. 1	+	130	Completa**	Si (0.995)	Si	Si**	4	6

Olae011497. 1	+	129	Completa**	Si (0.999)	Si	Si**	4	6
Olae011498. 1	+	127	Completa**	Si (0.983)	Si	Si**	4	6
Olae011499. 1	+	122	Completa**	Si (0.999)	Si	Si**	4	6
Olae013075 .1	+	110	Parcial**	Si (0.72)	Si	Si**	4	5
Olae015558 .1	+	141	Completa**	Si (0.999)	Si	Si**	4	6
Rpro_CSP1	+ (8)	128	Completa	Si (0.996)	Si	Si	4	6
Rpro_CSP2	+ (8)	127	Completa	Si (0.997)	Si	Si	4	6
Rpro_CSP3- FX*	+ (8)	127	Completa	Si (0.998)	Si	Si	4	6
Rpro_CSP4	+ (8)	127	Completa	Si (0.998)	Si	Si	4	6
Rpro_CSP5- FX	+ (8)	126	Completa	Si (0.998)	Si	Si	4	6
Rpro_CSP6	+ (8)	126	Completa	Si (0.989)	Si	Si	4	6
Rpro_CSP7	+ (8)	112	Completa	Si (0.983)	Si	Si	4	6
Rpro_CSP8	+ (8)	132	Completa	Si (0.653)	Si	Si	4	6
Rpro_CSP9	+ (8)	109	Parcial	Si (0.993)	Si	Si	4	5
Rpro_CSP1 0	+ (8)	127	Completa	Si (0.986)	Si	Si	4	6

Rpro_CSP1 1	+ (8)	129	Completa	Si (0.996)	Si	Si	4	7
Rpro_CSP1 2	+ (8)	135	Completa	Si (0.997)	Si	Si	4	6
Rpro_CSP1 3	+ (8)	129	Completa	Si (0.997)	Si	Si	4	6
Rpro_CSP1 4	+ (8)	75	Parcial	No (0.0004)	No	Si	2	4
Rpro_CSP1 5-NTE	+ (8)	90	Parcial	No (0.001)	No	Si	2	4
Rpro_CSP1 6	+ (8)	129	Completa	Si (0.996)	Si	Si	4	6
Rpro_CSP1 7-FX	+ (8)	139	Completa	Si (0.793)	Si	Si	4	6
Rpro_CSP1 8	+ (8)	126	Completa	Si (0.954)	Si	Si	4	6
Rpro_CSP1 9	+ (8)	121	Completa	Si (0.957)	Si	Si	4	6

Tabla S3.1. Características conservadas de la familia CSP en las secuencias utilizadas durante los análisis del capítulo. Los prefijos son Btab: *Bemisia tabaci*, Agam: *Anopheles gambiae*, Clec: *Cimex lectularius*, Dmel: *Drosophila melanogaster*, Hhal: *Halyomorpha halys*, Nlug: *Nilaparvata lugens*, Nvir: *Nezara viridula*, Olae: *Orius laevigatus* y Rpro: *Rhodnius prolixus*. Cada uno acompañado del número de secuencia. *Fue curada eliminando una zona sin hit de 30 aa al inicio. **Al ser modelos de softberry siempre presentan codon de stop aunque puede no ser el de la proteína real. ***Luego del péptido señal. (+) Identificada por primera vez en el presente trabajo o curada a partir de la secuencia reportada en la referencia indicada. En los casos que va acompañado del número de referencia es porque fue confirmada o curada la secuencia reportada. (1) Beismann *et al.*, 2002. (2) Zhou *et al.*, 2006. (3) Benoit *et al.*, 2016. (4) McKenna *et al.*, 1994. (5) Sun *et al.*, 2020. (6) Xue *et al.*, 2014. (7) Wu *et al.*, 2019. (8) Latorre Estivalis *et al.*, 2022. Los códigos de cada secuencia remiten a la base de datos de cada genoma o a la referencia utilizada, para ello consultar 2.7 en Materiales y Métodos.

Información suplementaria S3.2. Archivo de formato de características generales (GFF) generado a partir de la curación de las secuencias CSP de *T. infestans* en el software Artemis.

Scaffold	Definición	Inicio	Fin	Hebra codifi cante	ID
JAAEAF01 0000061.1	Gen	267921	295093	+	ID=Tinf_CSP7
JAAEAF01 0000061.1	CDS	267921	267948	+	ID=cds1-Tinf_CSP7;exon:267921..267948; Parent=Tinf_CSP7
JAAEAF01 0000061.1	CDS	293346	293516	+	ID=cds2-Tinf_CSP7;exon:293346..293516; Parent=Tinf_CSP7
JAAEAF01 0000061.1	CDS	294951	295093	+	ID=cds3-Tinf_CSP7;exon:294951..295093; Parent=Tinf_CSP7
JAAEAF01 0000080.1	Gen	645	4914	+	ID=Tinf_CSP22-partial
JAAEAF01 0000080.1	CDS	645	679	+	ID=cds1-Tinf_CSP22-partial;exon:645..679; Parent=Tinf_CSP22-partial
JAAEAF01 0000080.1	CDS	948	1009	+	ID=cds2-Tinf_CSP22-partial;exon:948..100 9;Parent=Tinf_CSP22-partial
JAAEAF01 0000080.1	CDS	4760	4914	+	ID=cds3-Tinf_CSP22-partial;exon:4760..49 14;Parent=Tinf_CSP22-partial
JAAEAF01 0000080.1	Gen	41629	46970	+	ID=Tinf_CSP12
JAAEAF01 0000080.1	CDS	41629	41818	+	ID=cds1-Tinf_CSP12;exon:41629..41818;P arent=Tinf_CSP12
JAAEAF01 0000080.1	CDS	45865	46067	+	ID=cds2-Tinf_CSP12;exon:45865..46067;P arent=Tinf_CSP12
JAAEAF01 0000080.1	Gen	46768	52289	-	ID=Tinf_CSP13

JAAEAF01 0000080.1	CDS	46768	46970	-	ID=cds1-Tinf_CSP13;exon:46768..46970;Parent=Tinf_CSP13
JAAEAF01 0000080.1	CDS	52103	52289	-	ID=cds2-Tinf_CSP13;exon:52103..52289;Parent=Tinf_CSP13
JAAEAF01 0000493.1	Gen	29307	41898	+	ID=Tinf_CSP19
JAAEAF01 0000493.1	CDS	29307	29478	+	ID=cds1-Tinf_CSP19;exon:29307..29478;Parent=Tinf_CSP19
JAAEAF01 0000493.1	CDS	41711	41898	+	ID=cds2-Tinf_CSP19;exon:41711..41898;Parent=Tinf_CSP19
JAAEAF01 0000928.1	Gen	243302	249140	+	ID=Tinf_CSP26-Partial
JAAEAF01 0000928.1	CDS	243302	243329	+	ID=cds1-Tinf_CSP26-Partial;exon:243302..243329;Parent=Tinf_CSP26-Partial
JAAEAF01 0000928.1	CDS	244780	244926	+	ID=cds2-Tinf_CSP26-Partial;exon:244780..244926;Parent=Tinf_CSP26-Partial
JAAEAF01 0000928.1	CDS	248992	249140	+	ID=cds3-Tinf_CSP26-Partial;exon:248992..249140;Parent=Tinf_CSP26-Partial
JAAEAF01 0002312.1	Gen	11161	14143	+	ID=Tinf_CSP4
JAAEAF01 0002312.1	CDS	11161	11347	+	ID=cds1-Tinf_CSP4;exon:11161..11347;Parent=Tinf_CSP4
JAAEAF01 0002312.1	CDS	13947	14143	+	ID=cds2-Tinf_CSP4;exon:13947..14143;Parent=Tinf_CSP4
JAAEAF01 0002312.1	Gen	25933	26886	+	ID=Tinf_CSP25
JAAEAF01 0002312.1	CDS	25933	26119	+	ID=cds1-Tinf_CSP25;exon:25933..26119;Parent=Tinf_CSP25
JAAEAF01 0002312.1	CDS	26690	26886	+	ID=cds2-Tinf_CSP25;exon:26690..26886;Parent=Tinf_CSP25

JAAEAF01 0002312.1	Gen	44550	47203	+	ID=Tinf_CSP24
JAAEAF01 0002312.1	CDS	44550	44733	+	ID=cds1-Tinf_CSP24;exon:44550..44733;Parent=Tinf_CSP24
JAAEAF01 0002312.1	CDS	47007	47203	+	ID=cds2-Tinf_CSP24;exon:47007..47203;Parent=Tinf_CSP24
JAAEAF01 0002312.1	Gen	54007	55592	+	ID=Tinf_CSP6
JAAEAF01 0002312.1	CDS	54007	54190	+	ID=cds1-Tinf_CSP6;exon:54007..54190;Parent=Tinf_CSP6
JAAEAF01 0002312.1	CDS	55393	55592	+	ID=cds2-Tinf_CSP6;exon:55393..55592;Parent=Tinf_CSP6
JAAEAF01 0003391.1	Gen	1	3331	-	ID=Tinf_CSP18-Partial
JAAEAF01 0003391.1	CDS	3136	3331	-	ID=cds1-Tinf_CSP18-Partial;exon:3136..3331;Parent=Tinf_CSP18-Partial
JAAEAF01 0006701.1	Gen	57786	57997	+	ID=Tinf_CSP17-2daParte
JAAEAF01 0006701.1	CDS	57786	57997	+	ID=cds1-Tinf_CSP17-2daParte;exon:57786..57997;Parent=Tinf_CSP17-2daParte
JAAEAF01 0007589.1	Gen	10942	11140	-	ID=Tinf_CSP17-1raParte
JAAEAF01 0007589.1	CDS	10942	11140	-	ID=cds1-Tinf_CSP17-1raParte;exon:10942..11140;Parent=Tinf_CSP17-1raParte
JAAEAF01 0007702.1	Gen	1992	28632	+	ID=Tinf_CSP8
JAAEAF01 0007702.1	CDS	1992	2111	+	ID=cds1-Tinf_CSP8;exon:1992..2111;Parent=Tinf_CSP8
JAAEAF01 0007702.1	CDS	17066	17162	+	ID=cds2-Tinf_CSP8;exon:17066..17162;Parent=Tinf_CSP8

JAAEAF01 0007702.1	CDS	28448	28632	+	ID=cds3-Tinf_CSP8;exon:28448..28632;Parent=Tinf_CSP8
JAAEAF01 0007854.1	Gen	31859	52246	+	ID=Tinf_CSP16
JAAEAF01 0007854.1	CDS	31859	32054	+	ID=cds1-Tinf_CSP16;exon:31859..32054;Parent=Tinf_CSP16
JAAEAF01 0007854.1	CDS	52059	52246	+	ID=cds2-Tinf_CSP16;exon:52059..52246;Parent=Tinf_CSP16
JAAEAF01 0008341.1	Gen	3988	4934	+	ID=Tinf_CSP14
JAAEAF01 0008341.1	CDS	3988	4179	+	ID=cds1-Tinf_CSP14;exon:3988..4179;Parent=Tinf_CSP14
JAAEAF01 0008341.1	CDS	4728	4934	+	ID=cds2-Tinf_CSP14;exon:4728..4934;Parent=Tinf_CSP14
JAAEAF01 0008341.1	Gen	13967	17045	+	ID=Tinf_CSP23
JAAEAF01 0008341.1	CDS	13967	14156	+	ID=cds1-Tinf_CSP23;exon:13967..14156;Parent=Tinf_CSP23
JAAEAF01 0008341.1	CDS	16840	17045	+	ID=cds2-Tinf_CSP23;exon:16840..17045;Parent=Tinf_CSP23
JAAEAF01 0008341.1	Gen	25450	28712	+	ID=Tinf_CSP15
JAAEAF01 0008341.1	CDS	25450	25639	+	ID=cds1-Tinf_CSP15;exon:25450..25639;Parent=Tinf_CSP15
JAAEAF01 0008341.1	CDS	28507	28712	+	ID=cds2-Tinf_CSP15;exon:28507..28712;Parent=Tinf_CSP15
JAAEAF01 0010955.1	Gen	9517	10952	+	ID=Tinf_CSP21
JAAEAF01 0010955.1	CDS	9517	9702	+	ID=cds1-Tinf_CSP21;exon:9517..9702;Parent=Tinf_CSP21

JAAEAF01 0010955.1	CDS	10755	10952	+	ID=cds2-Tinf_CSP21;exon:10755..10952;Parent=Tinf_CSP21
JAAEAF01 0010955.1	Gen	14788	16221	-	ID=Tinf_CSP21Dupl
JAAEAF01 0010955.1	CDS	14788	14982	-	ID=cds1-Tinf_CSP21Dupl;exon:14788..14982;Parent=Tinf_CSP21Dupl
JAAEAF01 0010955.1	CDS	16036	16221	-	ID=cds2-Tinf_CSP21Dupl;exon:16036..16221;Parent=Tinf_CSP21Dupl
JAAEAF01 0010955.1	Gen	22575	23500	-	ID=Tinf_CSP2
JAAEAF01 0010955.1	CDS	22575	22771	-	ID=cds1-Tinf_CSP2;exon:22575..22771;Parent=Tinf_CSP2
JAAEAF01 0010955.1	CDS	23314	23500	-	ID=cds2-Tinf_CSP2;exon:23314..23500;Parent=Tinf_CSP2
JAAEAF01 0010955.1	Gen	2238	3163	-	ID=Tinf_CSP2Dupl
JAAEAF01 0010955.1	CDS	2238	2423	-	ID=cds1-Tinf_CSP2Dupl;exon:2238..2423;Parent=Tinf_CSP2Dupl
JAAEAF01 0010955.1	CDS	2969	3163	-	ID=cds2-Tinf_CSP2Dupl;exon:2969..3163;Parent=Tinf_CSP2Dupl
JAAEAF01 0014074.1	Gen	97267	121380	-	ID=Tinf_CSP9
JAAEAF01 0014074.1	CDS	97267	97409	-	ID=cds1-Tinf_CSP9;exon:97267..97409;Parent=Tinf_CSP9
JAAEAF01 0014074.1	CDS	121194	121380	-	ID=cds2-Tinf_CSP9;exon:121194..121380;Parent=Tinf_CSP9
JAAEAF01 0014468.1	Gen	298451	302842	+	ID=Tinf_CSP1
JAAEAF01 0014468.1	CDS	298451	298640	+	ID=cds1-Tinf_CSP1;exon:298451..298640;Parent=Tinf_CSP1

JAAEF01 0014468.1	CDS	302646	302842	+	ID=cds2-Tinf_CSP1;exon:302646..302842; Parent=Tinf_CSP1
----------------------	-----	--------	--------	---	--

Tabla S3.2. Secuencias curadas de *T. infestans*. Se muestra el Scaffold dónde se halló, su ubicación y la hebra en la que es codificado. Se muestra el gen y los CDS (*Coding Sequence* por sus siglas en inglés) definidos por cada exón de cada gen.

Información suplementaria S3.3. Secuencias curadas de CSP de *T. infestans*.

Nombre	Secuencia aminoacídica predicha **	Secuencia nucleotídica predicha **
Tinf_CSP1	MRSMLTVCLLCM FVAACYTSSKYT TSYDNLDEILN NHRLYTRYFQCL TNKARCTPDGKE LKAVLPDALATGC AKCTEKQKQGSE KVIRFLLKNKPGD YEELEKMYDPNG TYRHRYEEEEAKK LGIKV*	ATGAGATCTATGCTGACCGTGTGTTTGTCTGTGCATGTTT GTGGCAGCATGTTACACCAGCTCCAAATACACTACGTC CTACGACAATCTAGATCTTGATGAAATATTGAACAATCAT AGATTGTACTAGGTATTTCCAGTGCCTGACCAATAAA GCAAGATGTACGCCAGACGGCAAGGAATAAAAGCTGT ATTGCCAGACGCGCTGGCCACAGGCTGTGCCAAGTGC ACTGAGAAGCAGAAACAGGGTCTGAAAAGGTAATCAG ATTTCTGTTGAAGAATAAGCCGGGCGACTATGAAGAACT GGAGAAGATGTACGACCCTAACGGTACTTACCGACACA GGTACGAAGAAGAGGCTAAAAAATTAGGAATCAAAGTG TAA
Tinf_CSP2	MSRTTAAFFCLFV VACAYAASTYTT QYDNIDLDEILNN DRIYKKYFDCLAH NIKCTPDGKQLR DILPDALKTACSK CSEKQKKGSEKV IKFMLEKKRADF VLESQFDPTGIYR KKYAEAKKHGV HI*	ATGTCCAGGACTACTGCTTTCTTTTGTCTGTTTCGTGGTA GCATGTGCTTATGCGGCTAGCACTTACACCACCCAGTAT GACAACATCGATCTGGATGAGATCTTGAATAACGACAG GATATAACAAGAAGTACTTTGACTGTCTGGCCCACAACAT CAAGTGCCTCCGACGGCAAACAGCTCCGAGACATT CTACCGGACGCACTAAAACTGCATGCTCAAAGTGCAG CGAAAAGCAGAAGAAAGGCTCTGAAAAGTAATTAATT TATGTTGAAAAGAAACGAGCTGATTTTGCAGTTTTGGA ATCACAAATTCGATCCGACCGGCATCTACAGGAAGAAGT ACGCAGAAGAAGCAAAGAAACATGGAGTTCATATTTAA
Tinf_CSP3	MSRTIAFFCLFVL ACAYAASTYTTK YDNIDVDEILNND RLYKKYDCLAN KAKCTPDGKELK DILPDALKTQCGK CSEKQKKGAEKV VRFMLENKRADF DVLEKIYDPSGTY RKKYAAEAKRRG INV*	ATGTCCAGGACTATTGCTTTCTTCTGTCTGTTTCGTGTTA GCATGTGCCTATGCGGCTAGCACTTATAACCACCAAGTAC GACAACATCGATGTCGATGAGATCTTGAACAACGACAG GTTATAACAAGAAGTACTACGACTGCCTGGCCAACAAAG CTAAATGTACACCGGACGGTAAAGAGCTGAAAGACATC CTGCCGGACGCTCTGAAGACTCAATGTGGCAAATGCA GCGAAAAGCAGAAGAAAGGCGCGGAGAAGGTGGTCA GGTTCATGTTGGAGAACAAGCGGGCTGACTTTGACGTT CTGGAGAAAATATACGACCCAGCGGCACCTACAGGAA GAAGTACGCTGCAGAGGCCAAGAGACGTGGAATCAAT GTTTAA
Tinf_CSP4	MSRTIAFFGLFVV ACAYAASTYTTQ YDNIDLDEILNND RVYKKYFDCLVN KAKCTPDGKELK DILPDALKTGCAK	ATGTCCAGAACAATCGCCTTCTTCGGTCTGTTTCGTGGT AGCATGTGCCTATGCGGCTAGCACTTACACCACCCAGT ATGACAACATCGATCTGGATGAGATTTTGAACAACGACA GAGTATAACAAGAAGTACTTCGATTGTTTGGTCAACAAG CTAAATGTACACCGGACGGTAAAGAGCTGAAAGACATC CTGCCGGACGCTCTGAAGACTGGTTGTGCCAAGTGTAA

	CNEKQKKGAEKV IRFLLENKRADFD ALEKIYDPSGTYR KKYAAEAQKYGI NV*	ACGAAAAGCAGAAGAAAGGTGCGGAGAAGGTGATCAG ATTCTTGTTGGAGAACAAGCGGGCTGACTTTGACGCTC TGGAGAAAATATACGACCCCGAGCGGCACCTACAGGAAG AAGTACGCTGCAGAGGCCCGAGAAATATGGAATTAATGTT TAA
Tinf_CSP5	MQGLTVVLVCSL ATALAATTYTTY DNIDLDSVLRND RVYKTYYNCLTN KKGCSPEGKELK DKLPDALQTGCS KCSARQKQGLEK IIFLMNSKQADF KEFERIYDPTGEY RKRYAEQAKKKG IKV*	ATGCAAGGACTGACAGTTGTCTTGGTATGCAGCCTGGC TACAGCTCTCGCTGCCACAACCTACACCACCAAATATGA CAACATTGATCTAGATTCGGTGCTCAGAAATGATCGTGT CTATAAACCTACTACAACCTGTTTAACCAATAAAGGCAAA TGTTCTCCAGAGGGCAAGGAATTGAAAGACAACTGCC GGACGCCCTGCAGACAGGTTGCTCCAAATGTTGAGCA AGACAGAAACAAGGACTTGAAAAAATTATCAAATCTTA ATGAATAGCAAGCAAGCTGACTTTAAAGAATTTGAAAGA ATTTACGACCCGACCGGAGAGTACAGGAAGAGGTACG CCGAACAAGCAAAGAAGAAGGGGCATCAAAGTGTGA
Tinf_CSP6	MTCKIVLLCALMA CSLAANTYNTKF DHLDEILDNDR IYKKYLECLIRRG KCTPEARELREA LPDALKNECSRC SRKQKIGSEKVIK FLLKNKPDDFHL EKTYDPAGEYRK KYGELAKSRGIVL S*	ATGACTTGTAAGATAGTACTATTGTGTGCGCTAATGGCC TGCAGTCTGGCGGCCAACACTTACAACACCAAATTTGA TCATTTAGATTTAGATGAGATTCTCGACAATGATAGGATT TATAAAAAATATTTGGAATGTCTGATAAGGAGAGGCAAAT GTACGCCGGAAGCAAGGGAGCTTAGAGAGGCTTTACC TGATGCTCTAAAAAACGAGTGTCTTAGATGTATCGTAA ACAGAAAATCGGATCAGAGAAGGTGATCAAATTTCTGCT GAAGAATAAGCCGGATGATTTCCATCTGCTGGAGAAAA CATATGATCCAGCTGGAGAATACAGGAAGAAATATGGCG AACTGGCCAAGTCCAGAGGAATTGTGCTGTCTTAA
Tinf_CSP7	MKASLLLLQVSIV LVAMVTWSMAAE GRSAVSDEALEA ALKDKRYLARQL KCALGEGACDPV GRRLKTYAPLVL RGACPKCTPSEV KQIQVLAHIQRH YPKEWSKILKQY AGQ*	ATGAAGGCTTCCTTATTATTATTACAGGTGTGCGATTGTAT TGGTGGCGATGGTAACCTGGAGTATGGCCGCGGAGGG AAGATCAGCTGTTTCAGATGAGGCACTAGAAGCGGCTC TTAAAGATAAGCGATACCTGGCAAGACAGTTAAAATGTG CATTGGGTGAAGGAGCATGTGATCCTGTTGGAAGAAGA CTTAAAACATACGCTCCATTGGTGCTCAGAGGAGCATG CCCTAAATGTAATCCAAGTGAAGGTAAGCAGATTCAAC AAGTTTTAGCTCATATACAAAGGCATTATCCAAAGGAATG GAGTAAATACTCAAACAGTATGCTGGCCAATGA
Tinf_CSP8	MLLRHHTLSAIVL FFSLNLASTLTLQ QIHRSWFQRLSVI PVEDVLNNKRILN KYLGCLLRRTVC APEARDFRILLPS ILRAPCNNCTER QRSSLKIFEHVH TLHPDEWQEIMS MYDPKSEHQEKII NFISNS*	ATGTTACTCCGGCACCATACTTTATCAGCAATTGTTCTTT TTTTCTCCCTAAATCTTGCATCCACTCTAACACTGCAAC AGATTCACAGGTCTGTTCCAGAGACTCTCCGTCATA CCGGTAGAGGACGTCTTAAATAACAAAAGAATATTGAAT AAATATCTTGGCTGCCTATTGAGAAGGACGGTTTGTGCA CCGGAAGCGAGAGATTTTGAATATTATTGCCTTCAATA CTGCGAGCGCCATGCAACAATTGCACAGAACGTGAGA GGAGTTCTTTAAAGAAAATATTGAGCATGTGCATACATT GCACCCAGATGAATGGCAAGAAATAATGTCCATGTATGA TCCAAAATCAGAACATCAAGAAAAAATCATCAACTTCAT CTCGAACTCATAA
Tinf_CSP9	MGAPLIISLGVVIV LIGQNFAQQGILN TQNVNGLLADSG FIRKQINCVLNKG PCDITGNQLKLA PEVVGRNCRSCS	ATGGGGGCGCCATTAATTATCTCATTAGGGGTTGTAATT GTACTGATCGGACAAAATTTTGTCAACAGGGTATACTG AATACACAGAACGTAATGGACTCCTTGCAGACAGTGG CTTCATTGTAACAGATAAATTGCGTGCTTAATAAAGGA CCTTGTGATATCACTGGTAATCAACTGAAATTGGCCATT CCAGAAGTAGTGGGAAGAAATTGCAGATCTTGTCCAA

	KQQAANAKKVIS FIRTKYPAEWSQI QAKYGRG*	ACAACAGGCAGCTAATGCTAAAAAAGTAATCAGCTTTAT TCGTACAAAATATCCAGCAGAATGGTCTCAGATACAAGC AAAATACGGGAGAGGTTAA
Tinf_CSP10	MKNMKKLLKLVA LLLSASISTADEP DNEFNRLFDPNV DVDAVLDNDRVL NAYLACFYDEGP CAERPCLVKSKIR EVLETTGCKCND QQRQLKYILNK FIGIRPNDWQRIL EIYDPDGAFRDN VEKLLKQLPA*	ATGAAAAATATGAAGAAATTAATAAAATTGGTGGCACTGT TAATCCTGTCAGCTAGTATTTCTACAGCTGATGAACCTG ACAATGAGTTTAATAGATTATTTGATCCAAATGTGGATGT TGATGCTGTCCTAGATAATGATCGAGTACTGAATGCCTA TCTGGCATGCTTTTATGATGAAGGACCATGCGCAGAAA GACCCAAGCTTGTTAAGAGTAAAATACGGGAAGTGTTG GAAACAACCTTGTTGTAATGTAATGATCAGCAGAGACAA CGTCTGAAATATATACTAAACAAGTTTATCGGTATACGAC CAAACGATTGGCAACGTATATTGGAAATTTATGATCCTGA TGGAGCTTTCAGAGATAATGTAGAAAAATTGAAACAAGG CTTACCGGCTTAA
Tinf_CSP11	MMLLSLCLAWLM FGMAFCRPDSEE EAFYKVFEEIDV DIILDNERLLRSYL TCFFDEAPCSAH AEAVKESIPEVMS SVCGKCNCKQK AIYKHALNKFIP HKEDWDHMLRIY DPNGEYWPNIKK FMES*	ATGATGCTATTATCGCTGTGCCTGGCTTGGTTAATGTTT GGTATGGCTTTCTGTGCGCCAGACAGTGAGGAAGAAG CTTTTTATTATAAAGTATTTGAGGAGATCGATGTGGATAT CATTTTGGATAATGAACGTTTGCTAAGATCATATCTAACT TGTTTCTTTGATGAAGCTCCTTGTAGTGCTCATGCCGAG GCTGTCAAGGAATCAATCCAGAAGTAATGAGTTCAGT GTGTGGTAAATGCAATGATAAACAGAAAGCAATCTACAA GCACGCATTAAACAAATTCATTCCCACACATAAGGAAGA CTGGGATCATATGCTTAGAATTTATGATCCAAATGGTGAA TATTGGCCAAATATAAAAAAATTTATGGAATCGTGA
Tinf_CSP12	MKSAALIVFLLVIC AGPYLASTYTTK YDNIDLDEILSNE RIYVKYYNCLLNK SRCTPDGKELKE NLPDALQTACEK CSEKQKQGSEKV LRFILHRPHDYL ALEEMYDPQKVY RHKYEKDAKERG LKFPD*	ATGAAGAGTGCAGCTTTAATAGTTTTTCTTTTAGTAATTT GCGCTGGACCTTATCTAGCTTCTACGTATACTAACTAAATA TGACAATATAGATCTGGATGAAATTTTAAGCAATGAACGT ATATATGTTAAATACTATAATTGTCTACTGAATAAGAGCAG ATGTACACCCGATGGAAAGGAACTGAAAGAAAACCTAC CGGATGCTTTGCAAACAGCTTGTGAAAAATGTTCTGAA AAACAAAAACAAGGTAGTGAAAAAGTGTTACGATTTATAT TGGAACACAGACCACATGATTACCTTGCTTTGGAAGAA ATGTACGATCCACAAAAAGTGACAGACACAAATATGAA AAGGATGCCAAAGAAAGAGGACTTAAATTCCTGATTAA
Tinf_CSP13	MMSATLLTFSTIIA ASFAASTYTTQY DNIDLDEILNNER VYIKYFNCLIGKD QCTPDGKELKET LPDALKTECAKC TEKQKAGAEKVL RFVIENRPDDYK QVEAIYDPEGIYR QKFGAEAKEKGI ELPK*	ATGATGAGTGCAACACTTTTGACATTTTCAACCATTATTG CTGCAAGCTTTGCCGCATCCACTTATACTACTCAATACG ATAATATCGATCTTGATGAGATTTTAAACAATGAACGCGT CTATATAAAATATTTCAATTGTCTTATAGGTAAGACCAAT GTACACCTGATGGAAAAGAACTGAAAGAAACACTACCG GACGCTCTGAAAACCTGAATGCGCCAAATGTACTGAAAA ACAGAAAGCAGGAGCAGAGAAAAGTTTTGAGATTTGTTA TTGAAAACAGGCCAGACGACTATAACAAGTTGAAGCT ATTTATGATCCTGAAGGAATTTATAGACAGAAATTTGGTG CAGAAGCTAAAGAAAAAGGAATTGAACCTTCTAAATAG
Tinf_CSP14	MKCPVFFFLLAAI FGAVICDEGTYTT KFDNIDLDEILNN DRIYERYLLCLKE EGKCTPDGRDLK DSLSDALQSGCE KCSEKQKAGTQK	ATGAAGTGTCCAGTTGTATTCTTCTTTCTTGCTGCTATAT TCGGTGCAGGTGATTTGTGATGAAGGCACATATACTACCA AATTCGATAATATAGATCTAGATGAAATTTTAAACAATGAT CGCATCTATGAGAGATATTTATTATGTCTTAAAGAAGAAG GAAAATGTACTCCTGATGGTAGAGATTTGAAAGATTAC TGTCAGATGCTTTACAAAGTGGGTGTGAGAAATGTTCA GAAAAGCAAAAAGCCGGAACCTCAAAAAGTTCTACGTTT

	VLRVLEKPKND YLALAKIYDPDRM YRIMYKEDAERL GLKFPTK*	TGTATTGAAAAAGAAACCAAATGATTATCTTGCCTTGGA GAAGATCTACGATCCCGATCGTATGTACAGGATTATGTA CAAAGAGGATGCTGAAAGGTTAGGGCTTAAATTTCCAA CTAAATAA
Tinf_CSP15	MKCAVFFIAAIF GAVFCDEVKYTT KYDNIDLDEILNN DRIYEKYFLCLKG EGKCTPDGRELK VALPDALKTRCV KCSEKQRVGTEK VLRFILDKKPNFY LALEKIYDPDRMY RIMYKEDAERLG LKFPK*	ATGAAGTGTGCAGTTGTATTCTTTATTGCAGCTATATTCG GTGCTGTGTTTTGTGATGAAGTCAAATACACAACCAAAT ACGACAATATAGATTTGGATGAAATTTTAAACAACGATCG TATCTATGAAAAATATTTTTTATGTCTTAAAGGTGAAGGA AAATGTACTCCTGATGGTAGAGAATTGAAAGTTGCACTG CCAGATGCTTTAAAAACAAGATGTGTGAAATGTTGAGAA AAGCAAAGGGTTGGAAGTCAAAGGTTCTCCGTTTCAT ATTGGATAAGAAACCAAATGATTATCTTGCCTTGAGAA GATCTACGATCCCGATCGTATGTACAGGATTATGTACAA AGAGGATGCTGAAAGGTTAGGGCTTAAATTTCCAATAA ATAA
Tinf_CSP16	MNLFILSLFLTAIV FIGSIEAGEVYTS KYDNIDVDKILSN DRILSQYIKCLMD EGNCTNEGKELK KTLPDALATGCN KCSEKQRAQTEK VLRHLIKNRSRD WARLKGKYDPT GEYSKKYETKSP ASK*	ATGAATCTATTTATACTGTCATTATTTTTAACTGCCATTGT ATTTATTGGATCAATTGAAGCTGGCGAGGTATATACCTCA AAATATGATAATATTGATGTGGATAAAATTTTAAAGCAATGA CCGGATACTTAGCCAATATATCAAGTGTGGATGGACGA AGGCAACTGTACTAATGAAGGAAAAGAAGTAAAAAAC ACTACCAGACGCACTAGCAACAGGTTGTAATAAATGTAG CGAAAAACAGAGAGCACAAACTGAAAAAGTATTGAGAC ATTTAATTAATAACAGATCAAGAGATTGGGCAAGACTTA AGGGTAAATACGACCCGACTGGAGAATATTCAAAGAAAT ATGAAACTAAATCACCAGCATCAAAGTAA
Tinf_CSP17	MYAKLWILAITVY ICHAQKQSKVTYT DKYDKIDVDAILH NERVLKRYIDCL MDRARCTPDGA ELKKYIPEALDTE CAKCTEAQKRFA GKVMSFLLQNKR NYWNEELLGKYDP TGKFRKYYEEAA LEDEDYSSFYNE*	ATGTATGCAAATTTGTGGATAATCCTAGCAATAACTGTTT ATATTTGCCATGCGGCCAAGCAAAGCAAAGTGACCTATA CAGATAAATATGATAAAATTGATGTTGATGCTATATTACAT AATGAACGAGTTTTTAAACGTTACATAGATTGTCTTATGG ATAGGGCAAGATGTACGCCAGACGGAGCTGAGTTGAAA AAATACATTCCAGAAGCTTTGGATACTGAATGTGCAAAA TGACAGAAGCACAGAAAAGATTTGCTGGGAAGGTAAT GTCTTTTCTATTACAAAATAAAAGAAATTTATTGGAATGAA CTTTTAGGAAAATATGATCCAATGGAAAATTTAGAAAAG AGTATGAAGAAGCAGCAGCTTGAAGATGAAGATTATTCAT CATTCTACAATGAATAA
Tinf_CSP18	MQRFLVISMLSLT LLLQYSTTHIDG LFEDNIDYDTIFK KDYLLKPYMDCV MDQGRCTKDGK YLKALPFIKTEC QYCDADQKKKLT KIEKFRKYQPSE FQKLLTKYDPNN LHRDALEKLADE HNKQACFV*	ATGCAAAGATTGTTTGTATATCAATGTTATCATTAACTT ATTATTACAATATTCAACAACCACTCATATTGATGGATTAT TTGAGGACAATATTGATTATGATACAATATTTAAAAAAGAT TATTTACTGAAGCCATATATGGATTGTGTGATGGATCAGG GTCGTTGTACAAAGGATGGAAAATATTTAAAAAAGGCAC TGCCCTTTATTATTAATAACTGAATGCCAATACTGTGATGC TGACCAAAAAAAGAAATTGACAAAAATTATTGAAAAATTC AGAAAATATCAACCATCGGAATTTAGAAAATTATTAACAA AATATGATCCAATAATCTTCATCGAGATGCATTGGAAAA ATTGGCTGATGAACATAATAACAAGCTTGTGTTTGTATAA
Tinf_CSP19	MKVITIVLICALS VVTIYAQYEVNVE EILNNKRLLDAYT KCYLDRGPCPGP ARESKKLGVEF TTNCAKCNKKQR	ATGAAAGTAATAACAATAGTTTTAATATGTCTATCTGCCCT TGTGGTCACCATATATGCTCAGTACGAAGTTAATGTTGA AGAAATATTAATAACAAAAGATTACTGGATGCCTATACC AAGTGTATCTAGACAGAGGACCTTGCCCGGGACCGG CAAGAGAAAAGCAAAAAAAACTGGGAGAAGTATTTACA ACAAATTGTGCTAAATGCAATAAGAAACAGAGACAAGAT

	QDTRALRLKRE RKPQLFLEIFEKY DAGSKHLDGFLI WLKKND*	ACAAGAGCTGCGTTGAGAAAATTAAGAGAAAGGAAACC ACAACTTTTCTTAGAGATATTTGAAAAATATGATGCTGGT AGTAAACATCTGGATGGATTTTTGATTTGGTTGAAAAAA AATGATTGA
Tinf_CSP20	MQGLTVVLVCSL ATALAATTYTTY DNIDLDSVLRND RVYKTYYNCLTN KGKCSPEGKELK EALPDALKNECS RCSRKQKIGSEK VIKFLLNKPPDF HLEKTYDPAGE YRKKYGELAKSR GIVLS*	ATGCAAGGACTGACAGTTGTCTTGGTATGCAGCCTGGC TACAGCTCTCGCTGCCACAACCTACACCACCAAATATGA CAACATTGATCTAGATTCCGGTGCTCAGAAATGATCGTGT CTATAAACCTACTACAACCTGTTTAACCAATAAAGGCAAA TGTTCTCCAGAGGGCAAGGAATTGAAAGAGGCTTTACC TGATGCTCTAAAAAACGAGTGCTCTAGATGTAGTCGTAA ACAGAAAATCGGATCAGAGAAGGTGATCAAATTTCTGCT GAAGAATAAGCCGGATGATTTCCATCTGCTGGAGAAAA CATATGATCCAGCTGGAGAATACAGGAAGAAATATGGCG AACTGGCCAAGTCCAGAGGAATTGTGCTGTCTTAA
Tinf_CSP21	MSRTIAFFCLFVL ACAYAASTYTTY YDNIDVDEILNND RLYKKYYDCLAN KAKCTPDGKELK DILPDALKTQCGK CSEKQKKAIEKV VRFMLENKRADF DVLEKIYDPSGT RKKYAAEAKRRG INV*	ATGTCCAGGACTATTGCTTTCTTCTGCCTGTTGTTTTA GCATGTGTCTATGCGGCTAGCACTTACACCACCAAGAAT GGCAACATCGATCTGGATGAGATCTTGAGCAACGACAG GTTATACGAGAAGTACTTCGACTGCCTGGCCAACAAAG CCAAATGTACACCCGGCCGGTAAAGAGTTGAAAGGTGAA AATTC AATTCGGAAAATTCGACACGATCGCAGTACCAA CAACAGCATAACAGAAAGGAAAAAGTAA
Tinf_CSP22	MILLSLCLVWLIS YFTCFDEAPFS AHAAAVNESILEE MCSVCGKCNDK QKAIYKHALNKFI PTHKEDWDHILRI YDPNGEYW*	ATGATACTATTATCGCTATGCTTAGTTTTGGTTAATATCATA TTTTCACTTGTCTTTGATGAAGCTCCTTTTAGTGCTCAT GCAGCTGCTGTCAATGAATCAATTCTAGAAGAAATGTGT TCAGTGTGTGGTAAATGTAATGATAAACAGAAAGCAATC TACAAGCATGCATTGAACAAATTTATCCACACATAAG GAAGACTGGGATCATATTCTTAGGATTTACGATCCAAAT GGTGAATATTGGTGA
Tinf_CSP23	MKCAVVFIAAIS GAVFCDEVKYTT KYDNIDLDEILNN DRIYEKYFLCLKG EGKCTPDGRELK VALPDALKTRCV KCSEKQRAGTEK VLRFLDKKPND YLALAKIYDPDRM YRIMYKEDAELK GLKFPDK*	ATGAAGTGTGCAGTTGTATTCTTTATTGCAGCTATATCCG GTGCTGTGTTTTGTGATGAAGTTAAATATACTACCAAATA CGATAATATAGATTTGGATGAAATTTAAACAATGATCGTA TCTATGAAAAATATTTCTTATGTCTTAAAGGCCGAAGGAAA ATGTACTCCTGATGGTAGAGAATTGAAAGTTGCACTGCC AGATGCTTTAAAAACAAGATGTGTGAAATGTTGAGAAAA GCAAAGGGCTGGAAGTAAAAAGTTCTCCGTTTCGTAT TGGATAAGAAACCAAATGATTATCTTGCTTGGAGAAGA TCTACGATCCCGATCGTATGTACAGGATTATGTACAAAG AGGATGCTGAAAAGTTAGGACTTAAATTTCCAGATAAAT AA
Tinf_CSP24	MQGLTVVLVCSL ATALAATTYTTY DNIDLDSVLRND RVYKTYYNCLTN KGKCSPEGKELK DKLPDALQTGCS KCSARQKQGLEK IIFLMNSKQADF KEFERIYDPTGEY RKRYAEQAKKKG	ATGCAAGGACTGACAGTTGTCTTGGTATGCAGCCTGGC TACAGCTCTCGCTGCCACAACCTACACCACCAAATATGA CAACATTGATCTAGATTCCGGTGCTCAGAAATGATCGTGT CTATAAACCTACTACAACCTGTTTAACCAATAAAGGCAAA TGTTCTCCAGAGGGCAAGGAATTGAAAGACAACTGCC GGACGCCCTGCAGACAGGTTGCTCCAAATGTTGAGCA AGACAGAAACAAGGACTTAAAAAATTATCAAATTTCTTA ATGAATAGCAAGCAAGCTGACTTTAAAGAATTTGAAAGA ATTTACGACCCGACCGGAGAGTACAGGAAGAGGTACG CCGAACAAGCAAAGAAGAAGGGGCATCAAAGTGTGA

	IKV*	
Tinf_CSP25	MSRTILFFGLFVV VCAFAANTYTTK YDNINLDEILNND RVYKKYFDCLAN KAKCTPDGKELK DILPDALKTGCAK CNEKQKKGTEKV IRFLLEKKRADFD ALEKIYDPSGTYR KKYSEEAKKRG KV*	ATGGCTTCCACGATTTTCTTTAACTTGCATGTGTCTATG CGGCTAGCACTTACACCACCAAGAATGGCAACAACGAT CTCGATGAGATTTTGGCAACGACAGGTTATACGAGAA GTACTTCGACTGCCTGGCCAACAAAGCCAAATGTACAC CGGCCGGTAAACAGTTGAAAGTAGTAAGAGGAAGTAAA AAGAAAACAGGACAAACTGCCTGTCAGACAGAAATGGT GTTTCTCGCAATATGTATAACAAGAATAAACAGAATTAC ATGAAAACCATAATAACTCATTTAGGTTTCGACATGCTTG GAAGTACCAACTTGA
Tinf_CSP26	MASTIFFKLACVY AASYTTKNGNN DLDEILSNDRLYE KYFDCLANKAKC TPAGKQLKVVRG SKKKTGQTACQT EMVFLAICINKNK QNYMKTIIHLGS TCLEVPT*	ATGGCTTCCACGATTTTCTTTAACTTGCATGTGTCTATG CGGCTAGCACTTACACCACCAAGAATGGCAACAACGAT CTCGATGAGATTTTGGCAACGACAGGTTATACGAGAA GTACTTCGACTGCCTGGCCAACAAAGCCAAATGTACAC CGGCCGGTAAACAGTTGAAAGTAGTAAGAGGAAGTAAA AAGAAAACAGGACAAACTGCCTGTCAGACAGAAATGGT GTTTCTCGCAATATGTATAACAAGAATAAACAGAATTAC ATGAAAACCATAATAACTCATTTAGGTTTCGACATGCTTG GAAGTACCAACTTGA

Tabla S3.3. Secuencias de CSP en *T. infestans*. Secuencias de aminoácidos y nucleótidos resultantes de los análisis transcriptómicos previos (y Latorre Estivalis *et al.*, 2022, Martínez Barnetche *et al.*, 2018, Traverso *et al.*, 2022) y del presente trabajo. **Para algunas secuencias, aminoácidos extra fueron eliminados y la secuencia manualmente corregida basada en homología con los modelos de CSP de otras especies.

Anexo II: Protocolos utilizados

Protocolos detallados

Extracción de ARN

- La muestra conservada a -80°C en reactivo Trizol se disgrega con ayuda de un pistilo de plástico en una gradilla fría cerca del punto de congelación, utilizando un taladro. La muestra homogeneizada se centrifuga 10 minutos a 12000g. Luego se le adicionan 0,2 volúmenes de cloroformo por volumen de TRizol usado. Se agita 15 segundos vigorosamente de forma manual y se incuba 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga a 4°C y 12000g por 15 minutos y se tomó con cuidado la fase acuosa que queda por arriba de la fase orgánica y debajo de una fina capa lipídica.
- A la fase acuosa se le adicionan 0,5 volúmenes de isopropanol por cada volumen de TRizol utilizado. Incubamos a T° ambiente durante 10 minutos y se coloca 1 hora a -20°C para luego realizar una centrifugación a 12000g por 10 minutos.
- Se elimina el sobrenadante y el pellet se lava con al menos 1 volumen de etanol por cada volumen de TRizol usado. La muestra se pasa por vórtex brevemente y se centrifuga a 7500g por 5 minutos.
- Eliminamos el sobrenadante obteniendo el pellet de ARN, se deja secar a 37°C y luego se resuspende en agua estéril ultrapura tratada con DEPC.
- Evaluamos la calidad del ARN extraído con una electroforesis en gel de agarosa 1%. La cuantificación de la muestra se realiza con el programa ImageJ y el ARN se conserva a -80°C hasta su utilización.

Tratamiento con DNAsa

Para eliminar los restos de ADN genómico se incuba 30 minutos a 37°C . Luego se agrega 1 μL de EDTA 50mM y se incuba 10 minutos a 65°C para inactivar la enzima. Los volúmenes se detallan a continuación:

Reactivo	Cantidad/Concentración final
Buffer DNAsa I 10x	1x
Enzima DNAsa I	0,5 U

ARN total	1 µg
Agua ultrapura estéril	Hasta completar 10 µl

Síntesis de ADNc

Se agrega 1ul de Poli-T y se incuba 5 minutos a 70°C, inmediatamente se lleva a hielo durante 5 minutos. Luego la mezcla de reacción a excepción de la enzima MMLV-RT se incuban a 37°C durante 2 minutos, se adiciona la enzima y se incuba 2 horas a 42°C. Finalmente, se inactiva 5 minutos a 85°C. Los volúmenes se detallan a continuación:

Reactivo	Cantidad/Concentración final
<i>Primer</i> Poli-T	4µM
dATP 10mM	1mM
dCTP 10mM	1mM
dGTP 10mM	1mM
dTTP 10mM	1mM
Inhibidor de RNAsas	20U
Buffer enzima MMLV-RT 5x	1x
Enzima MMLV-RT	200U
Agua ultrapura estéril	Hasta completar 25µl

Para comprobar la eficacia de la reacción, se utiliza como molde en PCR convencional con *primers housekeeping*.

PCR convencional

PCR1:

Reactivo	Cantidad/Concentración final
Buffer 10x	1x
MgCl₂ 50mM	1,5 mM
dNTPs 10mM	0,25 mM

Primer forward 10uM	0,25 µM
Primer reverse 10uM	0,25 µM
Molde	1ul/20µl finales
Enzima Taq-Pegasus/Platinum	1U/20µl finales
Agua ultrapura	Hasta completar volúmen

PCR2:

Reactivo	Cantidad/Concentración final
Buffer 10x	1x
MgCl₂ 50mM	1,5 mM
dNTPs 10mM	0,25 mM
Primer T7 Full 10uM	0,50 µM
Molde de PCR1	1ul/20 µl finales
Enzima Taq-Pegasus/Platinum	1U/20 µl finales
Agua ultrapura estéril	Hasta completar 20 µl

PCR en tiempo real

Reactivo	Cantidad/Concentración final
FastStart SYBR Green Master (Roche)	1x
<i>Primer forward</i>	0,2 µM
<i>Primer reverse</i>	0,2 µM
Molde de ADNc	1,5 µl
Agua ultrapura estéril	Hasta completar volúmen

Ciclado

Número de ciclos	Etapas del ciclado		Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización inicial		5 min	95°C
30/40	Amplificación	Desnaturalización	30 seg	95°C

		<i>Annealing</i>	30 seg	T° Annealing de los <i>primers</i>
		Extensión	30 seg	72°C
1	Extensión final		10 min	72°C

Síntesis de ARNdc

El producto de PCR2 es utilizado como molde para la reacción con los siguientes volúmenes:

Protocolo ARN Polimerasa T7 - Protocolo Megascript kit

Reactivo	Cantidad/Concentración final
ATP 75 mM/ATP Megascript	2 µl/7,5 mM
CTP 75 mM/CTP Megascript	2 µl/7,5 mM
GTP 75 mM/GTP Megascript	2 µl/7,5 mM
UTP 75 mM/UTP Megascript	2 µl/7,5 mM
Buffer 10x ARN Pol T7/Buffer Megascript	2 µl/1x
Enzima ARN Pol T7/Enzima Megascript	2 µl
Producto de PCR	8 µl

La mezcla de reacción se mantiene a 37°C overnight (O.N.). Se hace el tratamiento con DNAsa como se detalló anteriormente. El ARNdc que se obtiene se precipita llevando el volumen a 200 µl con agua ultrapura estéril, y se agrega 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de isopropanol. La mezcla se refrigera a -20°C O.N. Luego se centrifuga a 4°C y máxima velocidad por 20 minutos. Se elimina el sobrenadante y se hace uno o dos lavados dependiendo el pellet con 500 µl de etanol absoluto. Se vortexea y centrifuga nuevamente a 7500 g durante 5 minutos. El sobrenadante se elimina, el pellet se deja secar a 37°C en estufa y se resuspende con 25 µl de solución salina (ver Soluciones en Anexo II: Protocolos detallados). Se hace la cuantificación con una dilución 1:10 de la original en Nanodrop lite plus y/o electroforesis en gel de agarosa.

Electroforesis en gel de agarosa

- Se disuelve 1 g de agarosa en un erlenmeyer con 100 ml de buffer TBE (ver Soluciones) y se calienta en microondas hasta alcanzar hervor. Se colocan 5 μ l de bromuro de etidio para teñir y se vuelca en una cama acrílica con un peine que permite la formación de pocillos de siembra.
- El gel se coloca en una cuba de electroforesis con buffer TBE y las muestras se cargan en los pocillos con 3 μ l de mezcla de formamida y *loading buffer* cada 10 μ l. Se utiliza un marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L). Posteriormente se conecta a 90 V y amperaje constante hasta alcanzar la separación de bandas deseada.
- El gel se visualiza en un transiluminador de luz ultravioleta. Las fotos se toman con una cámara CANON Eos Rebel.

Inmunohistoquímica

- Luego de la disección del tejido de interés, se fija con 2% de PFA O.N. in situ (Ver soluciones). Se retira el PFA y se enjuaga con PBS. Se separa el tejido del insecto.
- Se incuba 1 hora en solución de Triton-X 4%, BSA 2% y suero normal de cabra 10%, en PBS.
- Se lava 3 veces 10 minutos cada una con PBS.
- Incubamos 48 hs a 4°C con el anticuerpo primario diluido 1:3000. El anticuerpo fue preincubado O.N. a 4°C en 0,4% tritón-X, 2% BSA y 2% suero normal de cabra.
- Se lava 3 veces 10 minutos cada una con PBS. Se realiza un lavado final O.N. a 4°C en agitación.
- 12 hs de incubación a 4°C en agitación con el anticuerpo secundario diluido en solución de PBS con 10% de suero normal de cabra.
- Se lava 5 veces 10 minutos cada una con PBS a T° ambiente.
- Se agregan 150 μ l de DAPI diluido 1:1000 en PBS por 15 minutos en agitación a T° ambiente. Se realizan 2 lavados de 10 minutos con PBS.
- Se monta el tejido en portaobjetos con glicerol y se mira en microscopio de fluorescencia.

Soluciones

- Solución salina: NaCl (129 mM); KCl (8,6 mM); CaCl₂ (2,0 mM); MgCl₂ (8,5 mM); NaH₂CO₃ (10,2 mM); NaH₂PO₄ (4,3 mM); Hepes (8,6 mM), PH=7. Posteriormente, es filtrada con filtro de jeringa de 0,2 μ m.
- Buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 3x: Tris (Merck) 0,25M, Ácido bórico (Merck) 0,25M y Na₂EDTA 60 mM. pH=8. En el caso de los geles para ARN, la solución fue autoclavada antes de utilizarse.
- Agarosa en gel (1%): 1g de agarosa en 100 ml de buffer TBE 1X. (1 %) o 2 g de agarosa en 100 ml de buffer TBE 1X. (2 %).
- Bromuro de Etidio (BrEt): se preparó una solución stock de 10 mg/ml, y se almacena en oscuridad. Para su uso, se agregaron 5 μ l de BrEt por cada 1000ml de solución de agarosa.