



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Rol de la cutícula en la resistencia a insecticidas y en la comunicación química de insectos vectores de la Enfermedad de Chagas.

Tesista: DULBECCO, Andrea Belén

Directora: Juárez, M. Patricia

Codirector: Girotti, Juan R.

Año: 2019

El presente trabajo de tesis, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP) "Prof. Dr. Rodolfo R. Brenner", de la Facultad de Ciencias Médicas, de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Juárez, M. Patricia y la co-dirección del Dr. Girotti, Juan R.

Trabajos publicados durante la realización de este trabajo de tesis:

Dulbecco, A. B., Mijailovsky S. J., Girotti J. R., and Juárez M. P. 2015. Deltamethrin binding to *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) lipoproteins. Analysis by solvent bar microextraction coupled to gas chromatography. *J. Med. Entomol.* 52: 1254–1259.

Calderón-Fernández, G. M., Moriconi, D. E., **Dulbecco, A. B.** and Juárez, M. P. 2017. Transcriptome analysis of the *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) integument. *J. Med. Entomol.* **54**, 1531–1542.

Dulbecco, A. B., Moriconi D.E., Calderón-Fernández G.M., Lynn S., McCarthy A., Juárez M.P., Pedrini N. 2018. Integument CYP genes belonging to the largest genome-wide cytochrome P450 expansions in triatomines contribute to deltamethrin resistance in *Triatoma infestans*. *Sci Rep.* DOI: 10.1038/s41598-018-28475-x

Mi reconocimiento

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata y sus autoridades, el Dr. Horacio Garda y la Dra. Margarita García, por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por las becas que me otorgaron oportunamente.

A la Universidad Nacional de La Plata, CONICET y FONCyT, por los subsidios que permitieron financiar este trabajo.

A la Sociedad Brasileña de Bioquímica y Biología Molecular por otorgarme la beca con las que pude realizar mi estancia de investigación en la Universidad Federal de Río de Janeiro (UFRJ).

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas, que me aceptaron en la Carrera de Doctorado en la misma Facultad que me formó como Licenciada en Biotecnología y Biología Molecular.

Mi agradecimiento

A mis directores Patricia Juárez y Juan Girotti, por el apoyo y la dedicación a lo largo de todos estos años, y por incertivar me a crecer en el ámbito científico participando de congresos y estadias en otros laboratorios.

A Nicolás Pedrini, no solo por ser parte importante de mi formación científica sino también por la calidad humana y gran entusiasmo que le aporta día a día al laboratorio.

A Gustavo Calderón-Fernández por contribuir en mi formación en biología molecular. A Cecilia Fusé y Facundo Bozzolo por el mantenimiento del insectario. A Sergio Mijailovsky por sus aportes en química analítica.

A la Dra. Katia Gondim y al Dr. David Majerowicz y todo su grupo de trabajo, por tan cordialmente recibirme en su laboratorio en el Instituto de Bioquímica Médica- UFRJ y hacerme sentir una más de su grupo.

A las chicas del Laboratorio 12 y de Biología Molecular por todos los momentos compartidos, no solo en las tareas diarias sino también en el acompañamiento constante dentro y fuera del laboratorio, que hoy se reflejan en esta hermosa amistad que tenemos. En especial a Debo, mi co-equiper, porque con ella avanzamos juntas, porque compartimos muchas alegrías y algunos enojos, pero sobre todas las cosas porque ella siempre me aporta su actitud positiva.

A mi familia, mis papás y mis hermanos, que ya son gran parte de todos mis logros. Cada día valoro más mi suerte de tenerlos. A mi sobrino Manu, que sin saberlo nuestras tardes de plaza fueron mi gran distracción este último tiempo, y al pequeño Tomi, por transmitirme su paz y tranquilidad.

A mis amigas de siempre, las del colegio, las de "vóley", las de la facu... que ya son parte de mi vida desde hace tantos años y me acompañan siempre.

Y a mi boni, mi gran compañero de vida, con el que disfruto plenamente hasta de las cosas más simples y sencillas. Gracias por acompañarme, por hacerme feliz, por musicalizar cada uno de mis días.

A todos ustedes, gracias.

INDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	10
1.1	ENFERMEDAD DE CHAGAS	11
1.2	TRIATOMINOS	14
1.3	INTEGUMENTO DE LOS INSECTOS	15
1.3.1	<i>Lípidos cuticulares</i>	18
1.3.1.1	Comunicación química.....	21
1.3.1.2	Lípidos cuticulares en triatominos.....	23
1.3.2	<i>Metabolismo</i>	27
1.3.2.1	CYP4G.....	29
1.4	RESISTENCIA A INSECTICIDAS.....	30
1.4.1	<i>Mecanismos de resistencia</i>	33
1.4.1.1	Resistencia por modificación del sitio de acción.....	33
1.4.1.2	Resistencia metabólica	33
1.4.1.3	Factor cuticular.....	35
1.4.2	<i>Transporte de insecticidas</i>	37
2	OBJETIVOS.....	39
2.1	OBJETIVOS GENERALES.....	39
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.1	INSECTOS	41
3.2	PREPARACIÓN DE MUESTRAS	42
3.2.1	<i>Obtención de los lípidos</i>	42
3.2.1.1	Separación en columna.....	42
3.2.1.2	Cromatografía en capa fina	43
3.2.2	<i>Derivatización de alcoholes grasos</i>	44
3.2.2.1	Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME).....	45
3.2.3	<i>Obtención de hemolinfa</i>	47
3.2.3.1	Incubación con deltametrina	47
3.2.3.2	Fraccionamiento de lipoproteínas.....	47
3.2.3.3	Extracción de deltametrina.....	48
3.3	ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA GASEOSA CAPILAR (CGC)	49

3.3.1	<i>Identificación de compuestos por CGC-MS</i>	51
3.3.2	<i>Cuantificación de componentes lipídicos por CGC-FID</i>	55
3.3.3	<i>Cuantificación de deltametrina mediante CGC- μECD</i>	57
3.4	ANOTACIÓN DE GENES Y RELACIONES FILOGENÉTICAS	58
3.5	ANÁLISIS GÉNICOS	59
3.5.1	<i>Obtención de los tejidos</i>	59
3.5.2	<i>Extracción de ARN</i>	60
3.5.3	<i>Síntesis de ADN complementario</i>	62
3.5.4	<i>PCR cuantitativa</i>	62
3.5.4.1	Diseño, determinación de eficiencia de amplificación y curvas de calibración de los cebadores.....	64
3.5.4.2	Expresión diferencial de genes.....	68
3.5.5	<i>Silenciamiento de los genes de interés mediante la técnica de ARN de interferencia (ARNi)</i>	69
3.5.5.1	Síntesis de ARNs de doble cadena e inyección en los insectos.....	71
3.5.5.2	Eficiencia del silenciamiento.....	73
3.6	CARACTERIZACIÓN DE FENOTIPOS RESULTANTES DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO	73
3.6.1	<i>Composición y cuantificación de hidrocarburos</i>	73
3.6.2	<i>Bioensayos de tolerancia frente a condiciones de baja humedad relativa</i>	74
3.6.3	<i>Bioensayos de mortalidad por aplicación tópica con deltametrina</i>	74
3.7	ESTUDIOS HISTOMORFOLÓGICOS Y DE INMUNOFLUORESCENCIA.....	74
3.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	75
	RESULTADOS	76
	4 SECCIÓN I: LÍPIDOS CUTICULARES Y TRANSPORTE DE DELTAMETRINA	77
4.1	COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA CUTÍCULA DE <i>T.INFESTANS</i> RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES A DELTAMETRINA	78
4.2	DIMORFISMO SEXUAL EN LOS LÍPIDOS DE LA CUTÍCULA DE <i>T. INFESTANS</i>	85
4.2.1	<i>Derivatización y cuantificación del C₂₂-ol y C₂₀-ol</i>	90
4.2.2	<i>Análisis de acil-CoA reductasas en integumento</i>	93
4.3	TRANSPORTE DE DELTAMETRINA EN LA HEMOLINFA DE <i>T. INFESTANS</i> RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES A DELTAMETRINA	96
4.4	DISCUSIÓN	99

5	SECCIÓN II: ESTUDIO DE LOS GENES CITOCROMO P450 (CYP) DEL CLAN 4 EN INTEGUMENTO DE TRIATOMINOS	115
5.1	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CYP4Gs.	116
5.1.1	<i>Expresión diferencial de CYP4Gs en distintos tejidos</i>	<i>119</i>
5.1.2	<i>Expresión diferencial de CYP4Gs en el integumento a lo largo del cuarto estadio ninfal.....</i>	<i>120</i>
5.2	CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS CYP4Gs.....	123
5.2.1	<i>Diseño y eficiencia del silenciamiento génico.....</i>	<i>123</i>
5.2.2	<i>Efecto del silenciamiento en el fenotipo de HC.....</i>	<i>125</i>
5.2.2.1	Silenciamiento dsCYP4G107.....	127
5.2.2.2	Silenciamiento dsCYP4G106.....	130
5.2.3	<i>Efecto del silenciamiento en insectos expuestos a condiciones de baja humedad relativa.....</i>	<i>135</i>
5.3	ANÁLISIS DE GENES CYP CLAN 4 CON ACTIVIDAD DETOXIFICANTE EN EL INTEGUMENTO DE <i>TRITOMA INFESTANS</i>	137
5.3.1	<i>Expresión diferencial en el integumento de T. infestans resistentes y susceptibles a deltametrina</i>	<i>137</i>
5.3.2	<i>Expresión diferencial en tejidos</i>	<i>138</i>
5.3.3	<i>Silenciamiento génico de CYP3093A11 y CYP4EM10</i>	<i>139</i>
5.3.3.1	Bioensayo de mortalidad por exposición a deltametrina	140
5.4	DISCUSIÓN	142
6	CONCLUSIONES.....	156
7	BIBLIOGRAFÍA.....	159
8	MATERIAL SUPLEMENTARIO	171

Glosario de abreviaturas

ALD: aldehído

Lp: Lipoforina

AG: ácido graso

MS: espectrometría de masas

AGL: ácido graso libre

NRQ: cantidad relativa normalizada

ARNi: ARN de interferencia

qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

CGC: cromatografía gaseosa capilar

R: población resistente a piretroides

CYP: citocromo P450

ROH: alcohol graso

DG: diglicérido

S: población susceptible a piretroides

DLM: deltametrina

STD: estándar

ELOVL: acil-CoA elongasas de muy largas cadenas

TLC: cromatografía en capa fina

FAR: acil-CoA reductasas

TG: triglicérido

FAS: ácido graso sintasa

VHDLp: Lipoproteína de muy alta densidad

FID: detector de ionización con llama

GR: gen de referencia

HC: hidrocarburo

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana o Mal de Chagas-Mazza, es una enfermedad parasitaria sistémica, generalmente crónica, causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* y que afecta a humanos y otros mamíferos.

La enfermedad en humanos se caracteriza por dos fases. La fase aguda dura entre 4 y 8 semanas luego de contraerse la infección, con riesgo potencial de miocarditis, encefalitis y otras formas graves diseminadas, aunque en la mayoría de los casos no hay síntomas, o estos son leves y no específicos. Durante esta fase, una gran cantidad de parásitos circulan por el torrente sanguíneo (Rassi et al. 2010). Hay reportados algunos casos agudos fatales, debidos principalmente a una ingesta de comida o líquido contaminado con *T. cruzi* (Pereira et al. 2009). En la fase crónica, los parásitos permanecen ocultos principalmente en el músculo cardíaco y digestivo; los síntomas pueden aparecer tras décadas de evolución y puede originar complicaciones en hasta 30% de los infectados. Entre las complicaciones más importantes se encuentran las alteraciones cardíacas con trastornos del ritmo y la conducción del impulso, y las miocardiopatías dilatadas difíciles de controlar, en ocasiones acompañadas de afectaciones secundarias, como trombo embolismos. Puede provocar también mega formaciones digestivas, como megaesófago o megacolon. Con el paso de los años, la infección puede causar muerte súbita por arritmias cardíacas o insuficiencia cardíaca progresiva por destrucción del músculo cardíaco y sus inervaciones (Prata 2001, Rassi et al. 2010, [WHO] World Health Organization 2017).

Existen distintas vías de transmisión:

- Vectorial, provocada por la picadura de insectos triatomíneos infectados con el parásito *T. cruzi*.
- Congénita, por transmisión de madre a hijo en el embarazo.
- Transfusional, a través de la transfusión de sangre donada por una persona con Chagas, o a través de un trasplante de órgano.
- Vía oral, por consumo de alimentos contaminados.
- Accidentes de laboratorio.

La transmisión vectorial representa la forma de contagio más frecuente de Chagas. El ciclo se inicia cuando estos insectos incorporan el parásito en su tracto digestivo al tomar sangre de un organismo infectado; luego al tomar sangre de un segundo huésped, eventualmente defecan sobre la piel y/o membranas mucosas del mismo, desde donde el parásito penetra al torrente sanguíneo iniciando la infección. Hasta el momento no hay vacuna contra la enfermedad de Chagas. El nifurtimox (un compuesto nitrofurano) y el benznidazol (derivado del nitroimidazol) son los únicos fármacos disponibles de eficacia comprobada contra el *T. cruzi*. Ambos medicamentos son eficaces casi al 100% para curar la enfermedad si se administran al comienzo de la infección en la etapa aguda, incluso en los casos de transmisión congénita. Sin embargo, su eficacia disminuye a medida que transcurre el tiempo desde el inicio de la infección.

Esta enfermedad se considera una de las endemias más expandidas en América Latina. Las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud señalan que en todo el mundo, pero principalmente en América Latina, más de 8 millones de personas se encuentran infectadas ([WHO] World Health Organization 2017). Inicialmente la enfermedad de Chagas estaba confinada al continente americano, pero en los últimos cien años se ha expandido a otros continentes debido a grandes movimientos globales de la población desde y hacia América Latina. La enfermedad se ha vuelto una cuestión importante de salud no sólo en países endémicos, sino también en Estados Unidos y Canadá, y en varias zonas de Europa, con un número creciente de individuos infectados, tal como se muestra en la Figura 1-1.

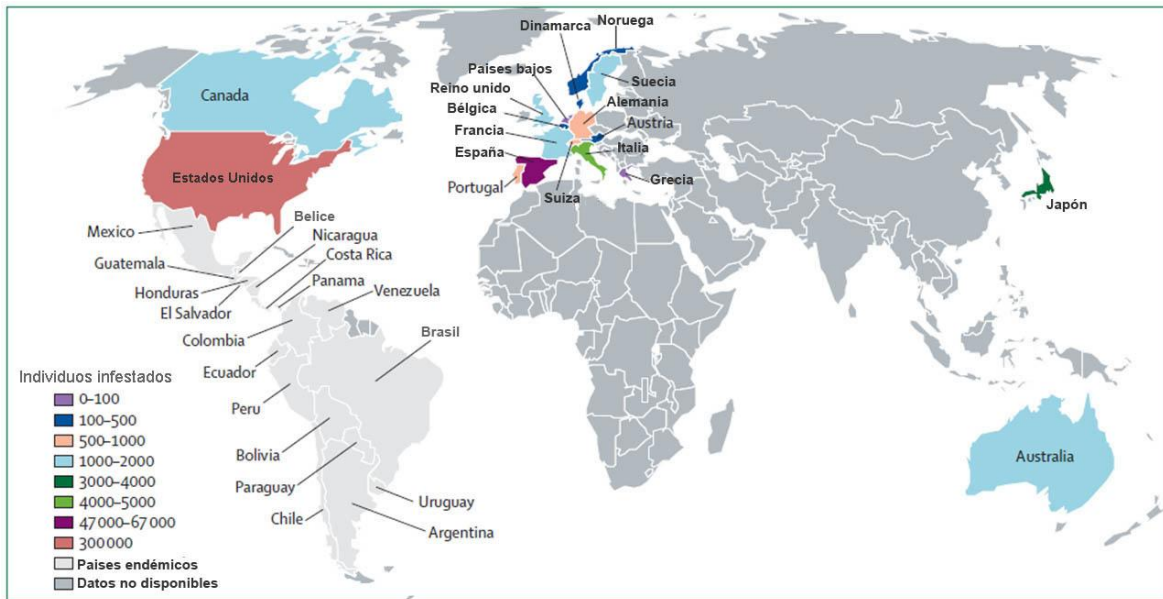


Figura 1-1: Número estimado de inmigrantes infectados con *Tripanosoma cruzi* viviendo en países no endémicos (modificado de Rassi et al. 2010)

En Argentina se calcula que un millón y medio de personas tienen Chagas. Dentro de nuestro territorio, las provincias de Chaco, Catamarca, Formosa, Santiago del Estero, San Juan y Mendoza presentan los mayores porcentajes de transmisión vectorial, las provincias de Córdoba, Corrientes, La Rioja, Salta, y Tucumán muestran una situación de riesgo intermedio; a su vez, si bien algunas provincias lograron certificar la interrupción de la transmisión vectorial, las 24 jurisdicciones poseen riesgo de transmisión congénita derivado de las migraciones internas e internacionales de países vecinos con elevada endemicidad.

La enfermedad de Chagas está asociada a múltiples factores sociales y ambientales carenciales que exponen a millones de personas a la infección. Entre los principales factores determinantes presentes en vastas áreas de América Latina, se destacan: habitar en viviendas mal estructuradas, principalmente en zonas rurales y suburbanas, escasez de recursos, residir en áreas de pobreza con inestabilidad social y económica, y muchas veces con altas tasas de migración. En cuanto a que afecta al medio rural más pobre de Latinoamérica, un sector de la población indudablemente marginado, esta enfermedad parasitaria desatendida implica no sólo una pérdida en la calidad de vida del enfermo sino que contribuye a perpetuar el ciclo de pobreza, al reducir la capacidad de aprendizaje, la productividad y la posibilidad de generar ingresos.

El modo más eficaz para prevenir la enfermedad de Chagas en América Latina es el control de su vector, así como el mejoramiento de las viviendas en zonas de bajos recursos.

1.2 TRIATOMINOS

Los triatominos son insectos del orden Hemiptera, familia Reduviidae y subfamilia Triatominae; son insectos hematófagos obligados que se alimentan normalmente de la sangre de diversos mamíferos y aves. La mayor parte de las especies se distribuyen en casi todos los países de América Latina, desde el norte de México hasta el norte de la Patagonia Argentina. También se localizan numerosas especies de triatominos en la parte sur de Estados Unidos, y aunque la mayor prevalencia de enfermos de Chagas proviene de la inmigración de habitantes latinoamericanos, ya hay reportados casos autóctonos de la enfermedad (Bern et al. 2011). Existen también algunas especies en Europa (*Triatoma rubrofasciata* De Geer 1773) y Asia (*T. cavernicola* Else y Cheong 1977 y otras, género *Linshcosteus* sp. Distant 1904) (Schofield and Galvão 2009).

Pese a que todas las especies de triatominos son potencialmente vectores del parásito *T. cruzi*, su importancia vectorial se relaciona con su habilidad de adaptarse a hábitos humanos. Los géneros más abundantes y relevantes son *Triatoma* y *Rhodnius*, y los tres vectores más reconocidos son *Triatoma infestans*, principalmente confinados en los países del extremo sur de Sudamérica, *Rhodnius prolixus*, con una amplia distribución desde México y América Central hasta países localizados en el norte del Amazonas y Brasil; y *T. dimidiata*, principalmente desde México hasta el norte de Perú.

Los triatominos viven principalmente en áreas rurales de regiones de clima cálido y seco. Buscan habitar junto al hombre y los animales domésticos para tener cerca su fuente de alimento. El éxito de la especie es función de su habilidad para explotar eficientemente los recursos disponibles en ambientes humanos. Para eso, anidan en las casas con paredes sin revoque, techos de paja y en lugares próximos al domicilio, como gallineros, corrales y depósitos. También pueden diseminarse por transporte de personas o elementos como maderas en contacto con vinchucas hacia otras regiones. El hábitat característico de la vinchuca, como se la denomina vernáculamente, abre camino a la alta probabilidad de exposición y prevalencia de la infección a millones de personas de pocos recursos ya que más allá de los determinantes biológicos y ambientales de la enfermedad, existen diversos

factores socio-económicos que juegan un rol potenciador. A su vez, la presencia de gran cantidad de poblaciones silvestres da lugar a la posibilidad de reinfestación de estructuras peridomésticas (Porcasi et al. 2006, Gorla et al. 2009). También existe potencial riesgo de expansión de la especie debido al cambio climático, al generarse nuevas zonas con las condiciones ambientales que resultan adecuadas para la existencia de la misma (Gorla 2002).

Respecto a su ciclo de vida, los triatominos son insectos hemimetábolos, o sea, que desarrollan una metamorfosis incompleta. A partir del huevo, se suceden 5 estadios ninfales y el estado adulto (Figura 1-2), siendo todos hematófagos y vectores de *T. cruzi*. La duración del ciclo vital es muy variable en cuanto a la especie considerada pudiendo encontrarse una o dos generaciones anuales.



Figura 1-2: Ciclo de vida de triatominos.

1.3 INTEGUMENTO DE LOS INSECTOS

El integumento es un tejido clave en contribuir al éxito evolutivo de los insectos y en su adaptación a ambientes muy diversos, siendo esencial en la supervivencia de los mismos. Está formado por la cutícula y la epidermis subyacente. La cutícula o exosqueleto está compuesta por filamentos de quitina embebidos en una matriz de proteínas, conteniendo además lípidos. Es una estructura extracelular que recubre la superficie exterior del insecto y también internamente las tráqueas. Dependiendo de la especie, edad, ciclo de vida, condiciones fisiológicas, etc., la cutícula presenta variedad de propiedades físicas (flexible,

elástica o rígida). Consta de 2 capas principales, la de mayor espesor es la procutícula formada por una matriz proteica, con fibras de quitina entrecruzadas, conteniendo lípidos y pigmentos, y que a su vez se subdivide en una endocutícula flexible y una exocutícula esclerotizada. La más externa es la epicutícula, cubierta por una mezcla compleja de lípidos de cadena larga y muy larga donde predominan hidrocarburos, alcoholes grasos, ceras, glicéridos y ácidos grasos (Blomquist et al. 1987). En la Figura 1-3 se muestra un corte transversal del integumento de insectos en la que se observa la disposición de sus componentes principales (la cutícula con sus partes y la epidermis con sus diferentes tipos celulares).

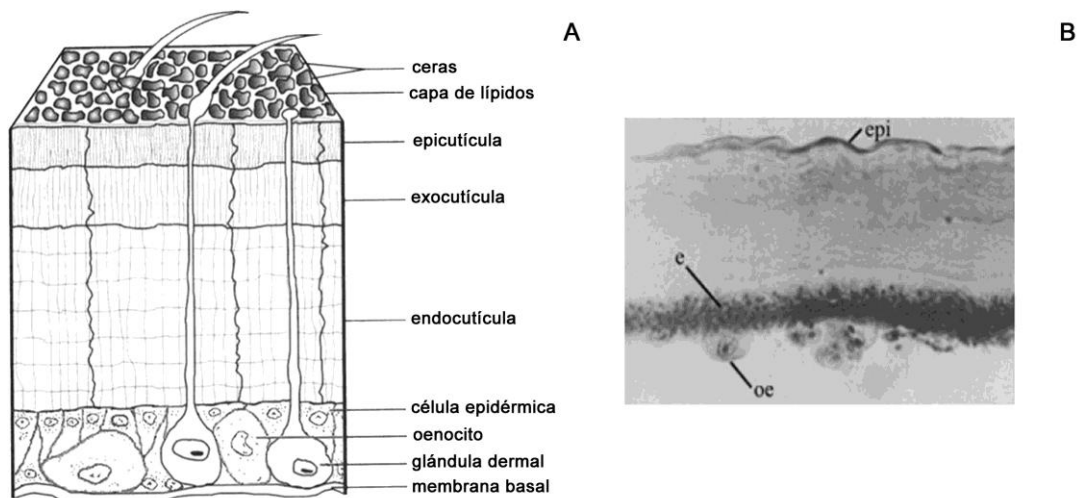


Figura 1-3: A) Esquema de la cutícula de insectos. B) Corte transversal de la cutícula de *Triatoma infestans*, donde se observa la epicutícula (epi), y la epidermis, con células epidérmicas (e) y oenocitos (oe) (Juárez and Calderón-Fernández 2007).

El tejido epidérmico consta de una monocapa de células que se encuentra por debajo de la cutícula, y es responsable de la síntesis de la mayoría de los componentes cuticulares y de las modificaciones cuticulares asociadas al crecimiento de los insectos y la metamorfosis; comprende las células epidérmicas y otras células modificadas (oenocitos, células formadoras de glándulas dermales, de pelos, etc.) (Wigglesworth 1933, Juárez and Brenner 1985). Las células epidérmicas están involucradas en la producción de los componentes cuticulares; secretan quitina y las proteínas cuticulares junto con las enzimas implicadas en la formación y digestión de la cutícula al momento de muda (Locke 1984). Los oenocitos

son células ectodérmicas modificadas, con gran cantidad de retículo endoplasmático y gotas lipídicas dispersas en todo el citoplasma. Dependiendo del orden, pueden encontrarse asociados a la epidermis o embebidos en el cuerpo graso del insecto (Wigglesworth 1933, Martins, Guedes, et al. 2011, Makki et al. 2014). En los estudios pioneros en *R. prolixus*, los oenocitos se propusieron como responsables de la síntesis de los lípidos cuticulares y su transporte a la superficie (Wigglesworth 1933, 1975, 1985). En *T. infestans*, los oenocitos se localizan en la epidermis (Juárez and Brenner 1985), y son el lugar mayoritario de síntesis de los lípidos cuticulares (Juárez and Brenner 1989).

Estudios genómicos en *Drosophila melanogaster* revelaron que los oenocitos tienen funciones críticas en la regulación del crecimiento, el desarrollo y el comportamiento alimentario, y expresan varios genes relacionados al metabolismo de lípidos. Además, se ha demostrado que existe un acoplamiento metabólico entre el cuerpo graso y los oenocitos, siendo éstos los encargadas de metabolizar las grandes reservas de lípidos liberadas por el cuerpo graso en condiciones de ayuno, proporcionando evidencias de que algunas funciones de procesamiento de lípidos por parte del hígado en mamíferos son similares a las realizadas por los oenocitos en insectos (Gutierrez et al. 2007). El análisis del transcriptoma de oenocitos en *Aedes aegypti* sugiere que también cumplen diversos roles en detoxificación así como también en homeostasis e inmunidad (Martins et al. 2011).

Con respecto a los genes de triatominos, se cuenta con la información derivada de la secuenciación completa del genoma de *R. prolixus* (Mesquita et al. 2015), y a partir de dicha información, un análisis de los genes involucrados en metabolismo lipídico y genes de detoxificación (Schama et al. 2016, Majerowicz et al. 2017). Además, se dispone de la información del transcriptoma de tracto digestivo de *R. prolixus* y de glándulas salivales de *T. rubida* (Ribeiro et al. 2012, 2014). Con respecto a *T. infestans*, aún no se dispone de la información de su genoma completo. Al momento de comenzar con el presente trabajo de tesis, se contaba con la información del transcriptoma de integumento de *T. infestans* obtenido en nuestro laboratorio, y estaba en curso el análisis y ensamblado de las secuencias obtenidas. En la Figura 1-4 se muestra el análisis preliminar de la abundancia relativa de los transcritos identificados y caracterizados en 20 grupos funcionales.

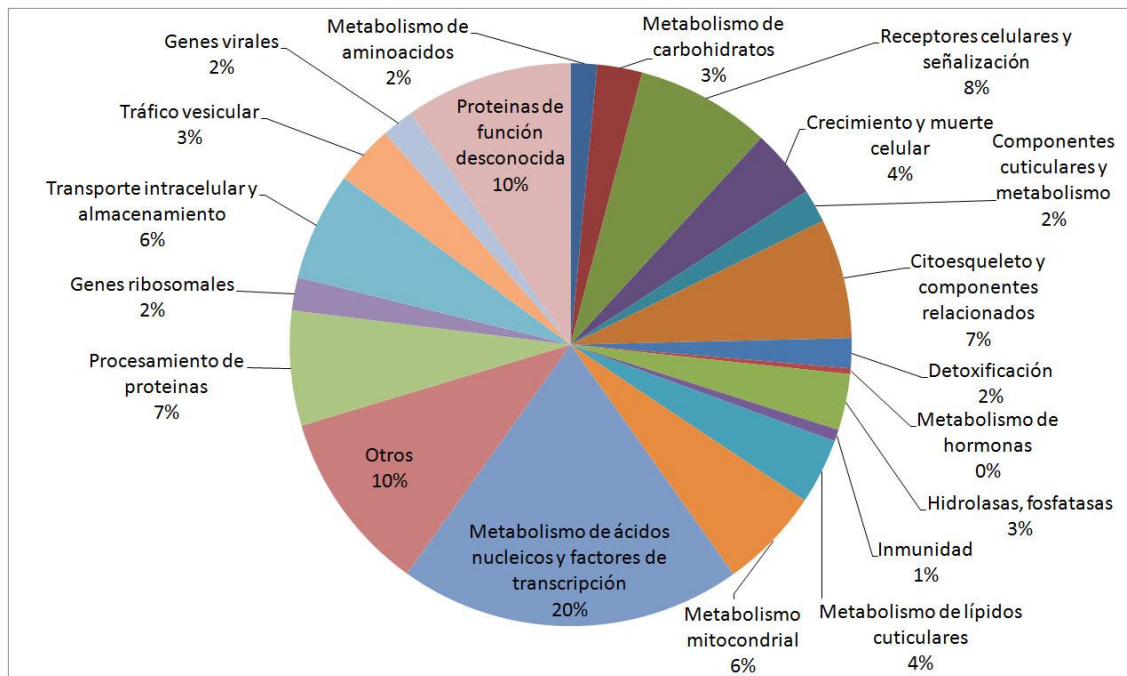


Figura 1-4: Clasificación preliminar y abundancia relativa de los transcritos caracterizados en el transcriptoma de integumento de *Triatoma infestans*.

1.3.1 LÍPIDOS CUTICULARES

Los lípidos de la superficie cuticular comprenden una mezcla compleja de cadenas carbonadas largas y muy largas, lineales y metil ramificadas, donde predominan ceras, hidrocarburos, alcoholes grasos, ácidos grasos y otros compuestos oxigenados de elevado peso molecular (Blomquist et al. 1987, Juárez and Calderón-Fernández 2007). Se ha demostrado que estos lípidos son esenciales en la fisiología de los insectos ya que evitan la pérdida de agua por evaporación, actúan en comunicación química y regulan la penetración de insecticidas y microorganismos entre otras muchas funciones (Motoyama et al. 1992, Juárez 1994a, Gibbs 2002, Kaib et al. 2004, Lorenzo Figueiras et al. 2009, Pedrini et al. 2009, Ginzel 2010, Cocchiararo-Bastias et al. 2011). La cantidad y composición de los lípidos cuticulares varía ampliamente entre insectos, y también entre los estados de desarrollo de una misma especie y las condiciones ambientales, siendo una de las muchas formas en que los insectos están adaptados para el entorno en el que viven (Blomquist and Jackson 1979, Blomquist 2010, Chung and Carroll 2015).

Los hidrocarburos (HC), principalmente n-alcanos y/o alquenos, lineales o metil-ramificados, están presentes en el extracto cuticular de virtualmente todos los insectos

estudiados y son los componentes más estudiados. Las longitudes de cadena usuales varían de 20 a > de 50 átomos de carbono. El límite en la longitud de cadena de los HC de insecto ha ido variando con el tiempo, resultado de los avances en las técnicas analíticas utilizadas (cromatografía gaseosa-espectrometría de masas) más que en la naturaleza química de los mismos. Por este motivo se han logrado reportar HC de cadenas de hasta 70 carbonos con diversos grados de insaturación en adultos de termitas y hormigas, empleando espectrometría de masa de ionización/desorción por laser con matriz asistida (MaldiTOF) (Cvačka et al. 2006).

Los HC se destacan como principales responsables del rol de barrera para impedir la pérdida de agua, ya que la gran relación superficie/volumen de los insectos resulta en un alto potencial para la desecación, es decir que las características hidrofóbicas de los HC contribuyen significativamente al balance hídrico del insecto (Gibbs and Rajpurohit 2010). Por ejemplo, los HC cuticulares del lepidóptero *Diatraea saccharalis*, principal plaga del cultivo del maíz, sufren cambios importantes durante el desarrollo desde larva hasta la etapa adulta; la fracción de cadena lineal, principalmente C₂₅, C₂₇, C₂₉ y C₃₁, aumenta de 6.7 % en las larvas a 70.7 % en pupas, disminuyendo a 26.7 % en adultos. Los hidrocarburos ramificados son casi indetectables en las larvas y pupas (0.3 %) mientras que componentes ramificados comprenden el 71 % de la fracción total de hidrocarburos en la etapa adulta. La fracción de alquenos representa el 93 % del total de hidrocarburos cuticulares en larvas, donde predominan hidrocarburos insaturados de hasta 53 átomos de carbono, con 1 a 4 dobles enlaces. Estas estructuras posiblemente confieran una protección adecuada a la pérdida de agua de la frágil superficie de las larvas (Girotti et al. 2012).

Los HC también tienen un rol relevante en la absorción de agentes químicos y la actividad de microorganismos (Juárez 1994a, Napolitano and Juárez 1997, Pedrini et al. 2007). Por su alta especificidad, el patrón de HC se ha utilizado con excelentes resultados en triatomíneos, para establecer si dos insectos pertenecen a un mismo taxón (quimiotaxonomía), así como para establecer cómo se relacionan insectos de un determinado grupo con otro, contribuyendo en la diferenciación de géneros, complejos, especies, subespecies y aún de diferentes poblaciones (Juárez et al. 2002, Calderón-Fernández et al. 2012, Calderón-Fernández and Juárez 2013).

Además de los HC, muchas especies de insectos contienen grandes cantidades de lípidos cuticulares más polares con uno o más grupos funcionales oxigenados en sus largas cadenas carbonadas alifáticas (Blomquist and Jackson 1979). Por ejemplo, las ceras (ésteres de ácidos grasos de largas cadenas con alcoholes grasos de elevado peso molecular) son constituyentes cuticulares de varios insectos, representando desde sólo un 3 % de los lípidos cuticulares en el gorgojo *Ceutorrhynchus assimilis*, hasta un 74 % en la cucaracha *Arenivaga investigata*. En el escarabajo *Epilachna varivestis*, el porcentaje de ceras varía durante las distintas etapas de desarrollo, representando un 24 %, 29 % y 4 % en larva, pupa y adulto respectivamente. Las abejas contienen un 34 % de ceras como constituyente de su cutícula, y además secretan grandes cantidades en la cera de abejas (Nation 2008). En algunos insectos la fracción de ceras contiene relativamente pocos componentes, mientras que en otros son mezclas muy complejas.

Los alcoholes grasos son generalmente lípidos de número par de átomos de carbonos, con un rango que va desde 22 a 34 carbonos, y su abundancia relativa también varía mucho entre especies (Soliday et al. 1974, Blomquist and Jackson 1979). En las larvas del gusano de seda *Samia cynthia ricini*, los alcoholes son compuestos mayoritarios representando un 70 % de los lípidos cuticulares, en donde el triacontanol (C₃₀-ol) representa el 99 % (Buckner 1993). En el gusano polífago plaga del algodón y/o maíz *Helicoverpa zea*, los alcoholes grasos representan un 15-20 % de los lípidos cuticulares, con el C₃₀-ol y el C₂₈-ol como alcoholes mayoritarios. En las larvas del gusano del tabaco *Heliothis virescens*, los alcoholes grasos también representan un constituyente mayoritario (28%), con el C₂₆-ol como alcohol mayoritario, seguido de C₂₄-ol, C₂₈-ol y C₂₂-ol (Buckner 1993). La cantidad de alcoholes grasos dentro de una misma especie también puede variar con respecto al sexo, estadio de desarrollo y condiciones ambientales. Por ejemplo, la cantidad de alcoholes grasos en larvas, pupas y adultos del escarabajo *Epilachna varivestis* varía entre un 21, 25 y 5 % respectivamente (Buckner 1993).

Por su parte, aldehídos de largas cadenas no son constituyentes comunes de la cutícula de los insectos. Usualmente se encuentran en mezclas lipídicas que también contienen alcoholes grasos de cadenas largas, donde ambos compuestos tienen cadenas de número par de átomos de carbono, que van desde 22 a 34 carbonos (Buckner 1993). En algunos insectos, como en el áfido *Acyrtosiphon pisum*, los aldehídos comprenden un 9 % de

lípidos cuticulares, siendo los mayoritarios el C₃₀-al y el C₂₈-al. Los aldehídos representan un 55 % de los lípidos cuticulares en la pupa del gusano del tabaco *H. virescens*, siendo el C₂₆-al el mayoritario; mientras que sólo un 5 % de los lípidos cuticulares son aldehídos en el gusano del maíz *Helicoverpa zea*, con el C₃₀-al representando más de un 90 % (Buckner 1993).

1.3.1.1 COMUNICACIÓN QUÍMICA

Los insectos se basan en señales quimiosensoriales para impulsar una multitud de comportamientos. Los compuestos químicos utilizados para mediar la comunicación se denominan semioquímicos, y en insectos sirven para encontrar pareja, permanecer juntos, enviar señales a miembros de su misma especie indicando la locación de alimento y para protegerse de predadores, entre otras funciones (Klowden 2010). Las feromonas son aquellos semioquímicos que median interacciones entre miembros de la misma especie.

Dentro de las feromonas producidas por insectos, la mayoría son de naturaleza lipídica y son producidas a partir de intermediarios del metabolismo de ácidos grasos, posibilitando la generación de gran diversidad de estructuras químicas a partir de pequeñas modificaciones en el esqueleto carbonado de la molécula. Algunas de estas sencillas modificaciones incluyen la adición de grupos funcionales para formar alcoholes, aldehídos, acetatos, epóxidos o cetonas, incorporación de ácidos grasos ramificados o aminoácidos, o un cambio en la estereoquímica (Jurenka 2004, Blomquist et al. 2012). Así como los productos químicos pueden variar en sus propiedades intrínsecas, como la volatilidad, también lo hacen las feromonas, pudiendo ser moléculas volátiles (de bajo peso molecular) o no volátiles (de alto peso molecular). En consecuencia, para que la comunicación química sea efectiva los insectos han desarrollado sofisticados órganos para que la señal sea detectada específicamente entre otras varias señales en el ambiente. Generalmente las feromonas de largo alcance son producidas por glándulas exócrinas y son altamente volátiles. Son percibidas principalmente en las antenas, que contienen una serie de sensilas anatómicas y funcionalmente diversas que albergan neuronas de receptores olfativos (ORN, por sus siglas en inglés) para la detección de diversos productos químicos. Por su parte, las feromonas de contacto poseen una baja volatilidad debido a sus largas cadenas carbonadas

y requieren contacto directo para ser reconocidas. Se ha sugerido que son percibidas como estímulos de contacto o gustativos. Al igual que en el sistema olfativo, las neuronas quimiosensoriales detectan las feromonas de contacto en la sensila gustativa ubicada en varias partes del cuerpo, principalmente en las patas. Mientras que las feromonas volátiles son detectadas por los ORN que expresan receptores odorantes particulares, las feromonas de contacto son detectadas por las neuronas del receptor gustativo (GRN) que expresan una variedad de receptores quimiosensoriales de contacto (Blomquist and Vogt 2003, Nojima et al. 2007, McKinney et al. 2015).

Las feromonas sexuales son los semioquímicos más estudiados. Se pueden dividir en feromona sexuales volátiles, liberada por un individuo para atraer al sexo opuesto a distancia, o en feromonas sexuales de contacto, incitando una conducta de cortejo y/o copulación en el sexo opuesto. La especificidad de los sistemas de comunicación por feromonas sexuales viene dada por la singularidad de la estructura química (posición y/o geometría del doble enlace, quiralidad, etc.) y por una mezcla determinada de componentes de la feromona (multicomponentes). Por ejemplo, en varias especies de Lepidópteros, la mayoría de las feromonas sexuales son compuestos de cadena lineal con 12, 14 y 16 carbonos y un grupo funcional que consiste en un alcohol, aldehído y/o éster de acetato. Las hembras de *Heliothis virescens* y *Helicoverpa zea* emiten una feromona sexual cuyo principal componente es el aldehído insaturado de 16 carbonos (*Z*)-hexadec-11-enal; otro grupo importante de feromonas sexuales son los hidrocarburos y sus epóxidos (Jurenka 2004).

La mayoría de las feromonas sexuales estudiadas corresponden a compuestos volátiles, especialmente de insectos plaga; sin embargo, tanto las feromonas volátiles como las de contacto son importantes para el apareamiento, y en algunas especies de insectos, ambos tipos son usadas secuencialmente (Nojima 2005). En *Blatella germanica* una feromona sexual volátil es utilizada para la atracción de largo alcance, mientras que la feromona sexual de contacto produce la respuesta de apareamiento típica del macho. La feromona de contacto consiste en una cetona de 29 carbonos, (3,11)-dimetil-nonacosanona, y sus dos derivados, un alcohol y un aldehído (3,11)-dimetil-nonacosanol y (3,11)-dimetil-nonacosanal. Estudios biosintéticos muestran que la cetona es producida a partir del 3,11-

dimetilnonacosano presente en la superficie cuticular de hembras y machos (Chase et al. 1992, Schal et al. 2003).

Otros tipos de feromonas de insectos incluyen las de agregación, que son señales que inducen la formación de grupos de conoespecíficos, conduciendo a sitios de alimentación y/o de reproducción. Las feromonas de alarma muestran menor quimioespecificidad que la feromonas sexuales y su selectividad se basa principalmente en su volatilidad, más que en sus características estructurales (Cardé 2014, McKinney et al. 2015).

El conocimiento del rol de los lípidos cuticulares en la comunicación química de insectos se ha profundizado notablemente con la identificación de feromonas de contacto de naturaleza lipídica diversa tales como ácidos grasos, hidrocarburos, aldehídos, alcoholes, cetonas, etc. (Blomquist et al. 2012). Por ejemplo, el (Z)-9-tricoseno (C_{23}) es la feromona sexual de *Musca domestica*. El contacto del macho con la feromona presente en la hembra es necesario para estimular el apareamiento. Incluso hidrocarburos cuticulares de mayores longitudes de cadena (13,23-dimetilpentatriacontano, rC_{35}) sobre la superficie de hembras de moscas teste *Glossina pallidipes* sirven como feromonas de contacto y sólo el contacto del macho con estos componentes de la cutícula le permite el reconocimiento del sexo (Carlson et al. 1984). En *D. melanogaster*, los alquenos son las principales feromonas sexuales de contacto (Jallon and Wicker-Thomas 2003). La cucaracha *Periplaneta americana*, que tiene un comportamiento nocturno de agregación, utiliza HC cuticulares para generar este comportamiento (Sreng et al. 1998).

1.3.1.2 LÍPIDOS CUTICULARES EN TRIATOMINOS

En triatominos, los lípidos cuticulares comprenden una mezcla compleja de cadenas carbonadas largas y muy largas, lineales y metil ramificadas, donde predominan los hidrocarburos, alcoholes grasos, ácidos grasos y otros compuestos oxigenados de elevado peso molecular (Juárez and Calderón-Fernández 2007). Esta composición lipídica con predominio de cadenas hidrocarbonadas largas e inertes, contribuye a las características de impermeabilidad de la cutícula de estos insectos, los cuáles muestran una notable adaptación a ambientes secos.

La composición de los lípidos epicuticulares de *T. infestans* ha sido caracterizada, representando un 0.02- 0,12 % p/p del total del peso del insecto, en ninfas (41 µg/insecto) y adultos (141 µg/ insecto). Esta proporción varía en función de la edad y del sexo (Juárez et al. 1984). Los HC son los mayores componentes de la epicutícula, seguidos de los alcoholes grasos (ROH) y ácidos grasos (AG), tanto libres como esterificados. La composición relativa de los lípidos tanto cuticulares como de tejido epidérmico depende en gran medida del estado de alimentación, origen, edad, sexo y estadio de desarrollo, pero no hay disponibles estudios muy exhaustivos. Los alcoholes grasos representan un 15 % de los lípidos cuticulares en ninfas, y la proporción aumenta en adultos (Juárez et al. 1984). Se identificaron algunos componentes aldehídos en la epicutícula de adultos *T. infestans* pero su cuantificación o abundancia relativa no se conoce (Cocchiararo-Bastias et al. 2011). Durante los estadios ninfales, los ácidos grasos son almacenados preferencialmente como ácidos grasos libres (AGL) o triglicéridos (TAG), mientras que en el adulto, como diacilgliceroles (DAG). En cuanto a los lípidos presentes en la epidermis, el contenido es mayor con respecto a los de la epicutícula, con función y composición diferentes (Juárez et al. 1984). Los HC no sólo están presentes en el integumento, sino que grandes cantidades son detectadas en la hemolinfa (12-28 % del total de lípidos) (Fichera and Brenner 1982, Juárez and Brenner 1985, Rimoldi et al. 1990) y huevos (6 %) (Juárez and Brenner 1985).

Con respecto a los hidrocarburos cuticulares, en las especies del género *Triatoma* sp. estudiadas hasta el momento, así como en las del género *Rhodnius* sp., consisten en mezclas complejas de cadenas lineales y metil ramificadas, saturadas, de 18 a más de 40 carbonos y con 1 a 4 ramificaciones metilo (Juárez and Brenner 1987, Juárez et al. 2001, 2002, Juárez and Calderón-Fernández 2007). Los HC lineales corresponden principalmente a compuestos impares de 25 a 33 carbonos. En adultos, se observa un patrón característico donde el C₂₉ es el componente mayoritario, mientras en los estadios ninfales el mayoritario es el C₃₁. En cuanto a los HC ramificados, *T. infestans* contiene mezclas complejas de compuestos mono, di y tri-metil ramificados, de cadenas de 27 a más de 39 carbonos. Por su parte, *R. prolixus* muestra una estructura diferente e incluso más compleja de ramificaciones, con mezclas de isómeros posicionales y compuestos ramificados de más de 40C. Una diferencia entre *R. prolixus* y el género *Triatoma* es la presencia de tetrametilramificados en *Rhodnius* (Figura 1-5).

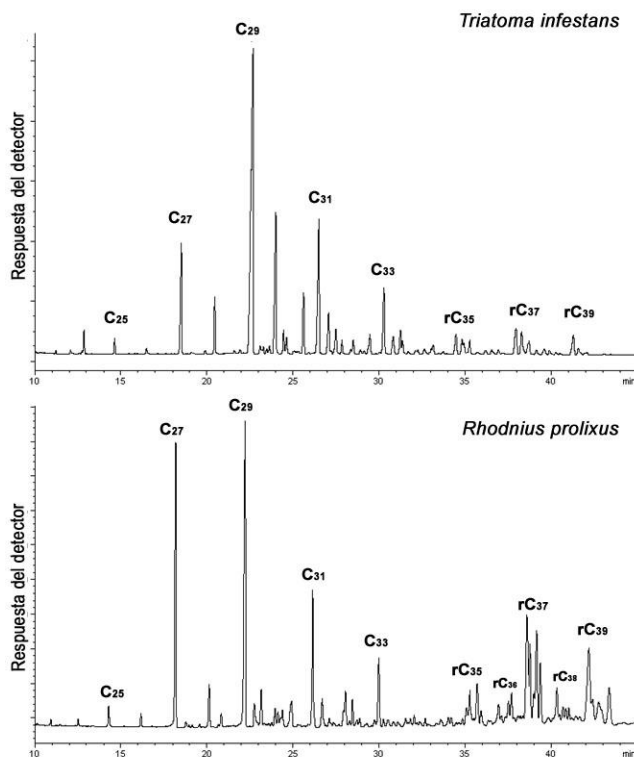


Figura 1-5: Perfiles cromatográficos (CGC) de hidrocarburos cuticulares de *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*. Los grupos metilramificados son diferentes en ambas especies. Modificado de Juárez and Calderón-Fernández 2007.

Además de variaciones en el patrón de HC cuticulares entre géneros, también se ha demostrado que hay altos niveles de variación interpoblacionalmente en *T. infestans*. Un análisis de las cantidades relativas de los principales HC en distintas poblaciones distribuidas a lo largo de todo el rango geográfico de la especie mostró que las poblaciones se segregan en distintos grupos; el grupo Andino, que comprende especímenes de Perú y la mayor parte de Bolivia, el grupo no-Andino, que incluye todos los especímenes de Argentina y Paraguay, y parte minoritaria de Bolivia, y también existe un tercer grupo Intermedio entre ambas (Calderón-Fernández et al. 2012). Esta segregación de grupos se correlaciona con importantes diferencias cromosómicas y en el contenido de ADN entre ellos (Panzera et al. 2010, 2014). Los insectos del grupo Intermedio presentan una alta resistencia a piretroides, conduciendo a importantes fallas en el control vectorial (Picollo et al. 2005), tema discutido más adelante.

Comunicación química de contacto

Se ha demostrado que los lípidos cuticulares de *T. infestans* son las principales señales químicas de agregación por contacto. Mediante experimentos de comportamiento con distintas fracciones epicuticulares, en este laboratorio se demostró que la fracción de ácidos grasos es responsable de la agregación de los insectos, específicamente AGL de 18 y 26 carbonos (Lorenzo Figueiras et al. 2009). Las señales de agregación pueden ser importantes para ser utilizadas como atractantes en dispositivos para monitorear insectos plaga o de interés sanitario. Además, en combinación con compuestos volátiles relacionados con el hospedador, los componentes lipídicos de la cutícula también pueden ser candidatos prometedores para ser utilizados en combinación con componentes insecticidas en dispositivos de captura y matanza. En este laboratorio, se ha desarrollado una trampa para *T. infestans* que combina el uso de un extracto epicuticular que funciona de atractante, junto con un formulado de hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* como agente bioinsecticida (Juárez et al. 2008, Pedrini et al. 2009, Forlani et al. 2015).

En base a ensayos de comportamiento en nuestro laboratorio, también se demostró que en *T. infestans* es necesario un reconocimiento por contacto de las antenas del macho con la cutícula de la hembra para producir los intentos de cópula por parte de los machos (Figura 1-6). Para dilucidar qué componente epicuticular era necesario para mediar el reconocimiento, Cocchiararo-Bastias et al. (2011) analizaron la composición de los lípidos epicuticulares extraídos con hexano mediante la técnica de análisis del espacio de cabeza y microextracción en fase sólida (HS-SPME) acoplada a cromatografía gaseosa-espectrometría masas (CGC-MS). Mediante esta técnica, evidenciaron un dimorfismo sexual en cuanto a la presencia de alcoholes de 20 y 22 carbonos en las hembras. En base a ensayos de comportamiento, se demostró el rol de feromona sexual por contacto de estos alcoholes, principalmente del C₂₂-ol (Cocchiararo-Bastias et al. 2011).

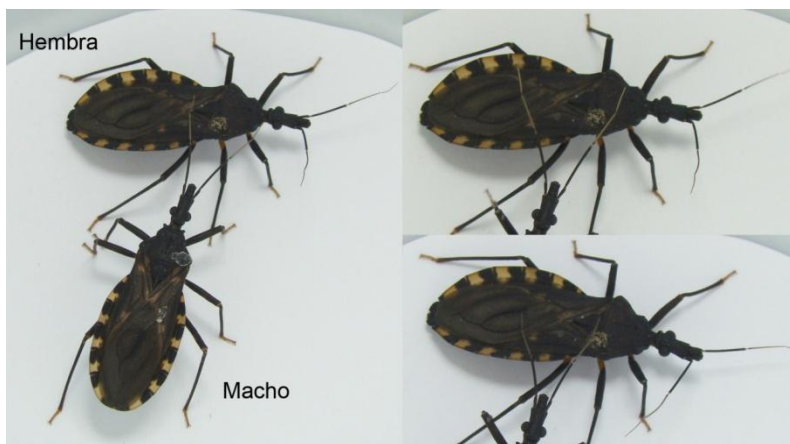


Figura 1-6: Reconocimiento sexual por contacto del macho a través de sus antenas con la cutícula de la hembra necesarios para intentos de cópula posteriores en *Triatoma infestans*.

Las feromonas sexuales son esenciales en la eficiencia reproductiva de muchas especies. Es por eso que gran parte del estímulo para la identificación de feromonas surge de la expectativa del uso de las mismas para el manejo y control de insectos plaga, como por ejemplo a través de la aplicación de métodos de interrupción del apareamiento o de técnicas de confusión sexual como se emplean en otras especies de insectos (Savoldelli and Trematerra 2011).

Al momento, sólo el C₂₀-ol y C₂₂-ol han sido identificados como feromonas sexuales de contacto en hembras *T. infestans*; se desconoce si existen otros componentes que contribuyan al dimorfismo sexual.

1.3.2 METABOLISMO

El integumento es el sitio de síntesis de la mayor parte de los lípidos cuticulares, los que comparten una ruta metabólica común (Figura 1-7). En este proceso intervienen al menos dos ácido graso sintasas, una citosólica (FAS) y otra de localización microsomal (mFAS) que participan en la producción de ácidos grasos de cadenas lineales y ramificadas (Juárez and Brenner 1989, Juárez et al. 1992, Chung et al. 2014). Los productos de las FASs del integumento son los sustratos para las correspondientes acil-CoA elongasas (ELOVLS) que los convierten en ácidos grasos de muy largas cadenas (Juárez et al. 1984, Vaz et al. 1988, Juárez and Brenner 1989, Juárez 2004). Los productos de las ELOVL son finalmente reducidos a aldehídos o alcoholes grasos por acil-CoA reductasas (FAR) y posteriormente a

hidrocarburos vía decarbonilación oxidativa mediada por una citocromo P450 (CYP) de la familia 4G (Qiu et al. 2012, Balabanidou et al. 2016), o son parcialmente liberados del sistema elongante, con longitudes de cadena de hasta 34-36 carbonos. La acción previa de una desaturasa sobre el ácido graso sustrato de las elongasas producirá los correspondientes HC insaturados.

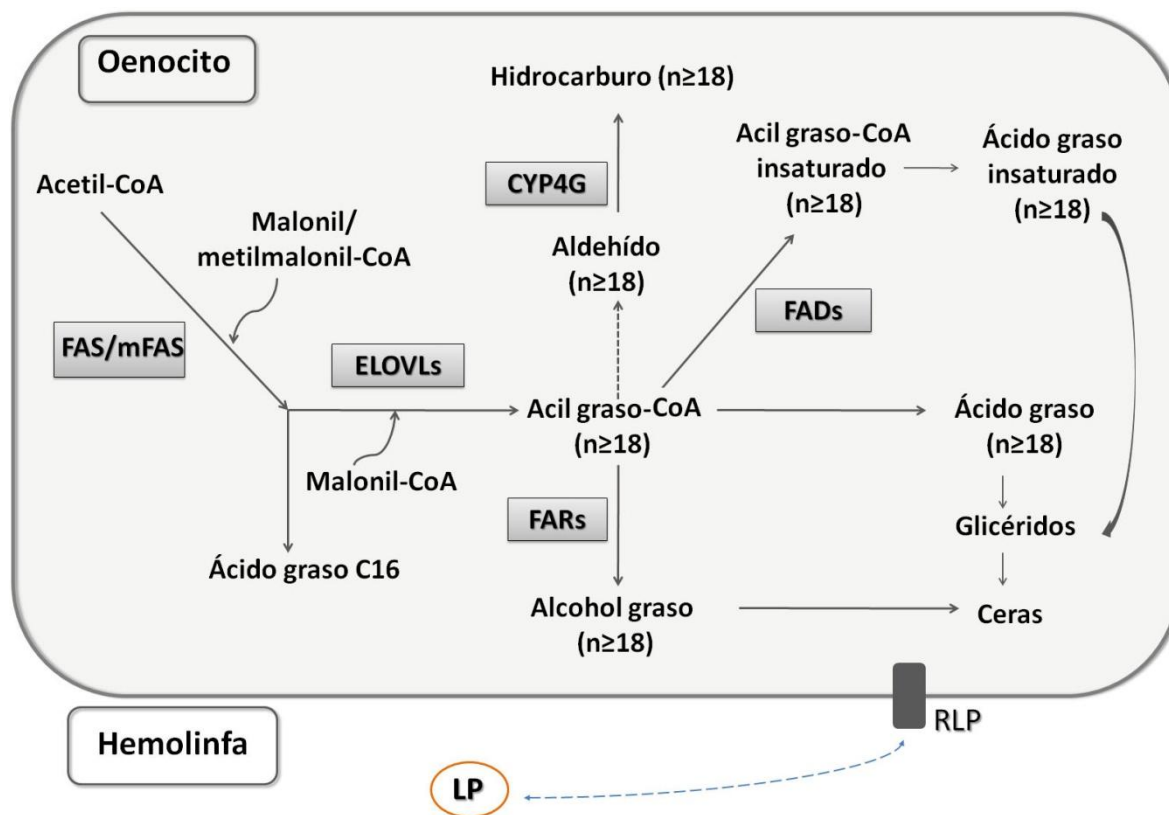


Figura 1-7: Esquema simplificado de la ruta de biosíntesis de lípidos cuticulares en el oenocito. Las enzimas se muestran en recuadros, las flechas en negrita son procesos enzimáticos ya conocidos y las flechas punteadas corresponden a un paso enzimático que no se ha dilucidado por completo.

LP: lipoforina, RPL: receptor de lipoforina.

Con la reciente secuenciación del genoma completo de *R. prolixus* (Mesquita et al. 2015), se han identificado varios de los genes putativamente involucrados en la biosíntesis de lípidos cuticulares, entre ellos, tres genes FAS (que corresponderían a las específicas de integumento y a la FAS de cuerpo graso), diez genes ELOVL y 9 genes FAD, que estarían involucrados en la elongación y saturación respectivamente de las cadenas hidrocarbonadas

y 13 genes FAR, involucrados putativamente en la reducción de precursores acilo graso para generar un aldehído o alcohol (Majerowicz et al. 2017).

1.3.2.1 CYP4G

Las citocromo P450 monoxigenasas (citocromoP450s) constituyen una de las mayores superfamilia de enzimas encontradas en la naturaleza, catalizando la conversión de compuestos lipofílicos (tanto endógenos como xenobióticos) en derivados mas hidrofílicos. Debido a su gran abundancia, los genes P450 (*CYP*) se asignan en familias y subfamilias siguiendo una nomenclatura especial basada en sus secuencia aminoacídicas. Las secuencias se clasifican en familias (40% de identidad aminoacídica) y subfamilias (55% identidad aminoacídica). Brevemente, luego de la abreviatura “CYP”, se describe la familia con un numeral arábigo seguido de la designación de la subfamilia indicado por una letra mayúscula, y finalmente el número de gen (Feyereisen 2012). También se utiliza una agrupación de mayor orden denominada clan, que comprende los clanes 2, 3, 4 y mitocondrial. Dentro del clan 4, los genes *CYP4G* son específicos de insecto y pueden ser considerados como clave en la evolución y supervivencia de la clase Insecta (Qiu et al. 2012). Se destacan por ser genes P450 exclusivos de insectos, con ortólogos distribuidos en toda la clase Insecta y unos de los menos estudiados. Funcionalmente, sólo unas pocas enzimas CYP4G han sido caracterizadas, pero estarían implicadas en dos funciones fisiológicas principales: síntesis de HC cuticulares y procesamiento de odorantes volátiles. En *D. melanogaster*, de 20 genes pertenecientes al clan 4, el gen CYP4G1 es altamente expresado en oenocitos, mientras que CYP4G15 se expresa en la corteza cerebral y tejidos neuronales (Maibèche-Coisne et al. 2000, Chung et al. 2009).

El mecanismo de la etapa final de formación de los HC cuticulares de insecto fue tema de controversia por más de dos décadas, recién en 2012 se demostró que una CYP4G2 de otro díptero (mosca doméstica), con más de 70 % de identidad de secuencia con CYP4G1 de *D. melanogaster*, convertía las acil-CoAs de muy largas cadenas en hidrocarburo, mediante una reacción de decarbonilación oxidativa (Figura 1-8) (Qiu et al. 2012).

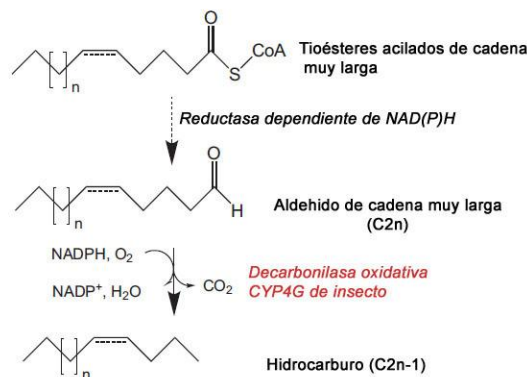


Figura 1-8: Etapa final de la biosíntesis de hidrocarburos. Modificado de Qiu et al. 2012.

En el genoma de *R. prolixus* se encuentran dos genes pertenecientes a la subfamilia CYP4G, que podrían estar implicadas en la síntesis de HC (Mesquita et al. 2015).

1.4 RESISTENCIA A INSECTICIDAS

Como se ha mencionado anteriormente, no existe una vacuna eficaz contra la enfermedad de Chagas, por lo que el control químico vectorial ha sido y es en la actualidad uno de los métodos más utilizados para controlar la expansión de la enfermedad. El control químico vectorial para el Chagas comenzó a mediados del siglo XX, con el uso de compuestos organoclorados, organofosforados y carbamatos. Dada su alta estabilidad química y potencial riesgo toxicológico y eco toxicológico, el uso de varios de ellos está prohibido en la actualidad. El escenario en el control de insectos cambió drásticamente al desarrollarse los insecticidas piretroides sintéticos, principalmente por su alta capacidad insecticida, su baja dosis de aplicación, mayor seguridad toxicológica, y su rápida eliminación ambiental. El uso de piretroides es la primera opción en todos los programas de Chagas en países endémicos, y probablemente lo seguiría siendo de no presentarse poblaciones resistentes.

Siguiendo planes de acción a gran escala de control químico vectorial, se lograron grandes progresos en la reducción de la enfermedad de Chagas. Para 1960, la máxima distribución de *T. infestans* ocupaba un área estimada de 6,3 millones km², incluyendo partes de Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay, Perú y Uruguay, siendo esta especie responsable de la mitad de los 18 millones de personas infectadas con *T. cruzi*, según datos de WHO para la década de 1980. Desde entonces, las intervenciones de control de *T. infestans* han reducido sustancialmente la distribución de a menos de 1 millón de km² y 9,8 millones de personas

infectadas, logrando la interrupción de la transmisión vectorial en Uruguay (1997), Chile (1999) y Brasil (2006), según certificaciones de la Sociedad Panamericana de Salud (Coura and Dias 2009). En Argentina, la transmisión de *T. cruzi* por *T. infestans* fue interrumpida en 7 provincias donde la enfermedad históricamente había sido endémica.

A pesar de los constantes esfuerzos del control vectorial, el éxito no fue completo: las poblaciones domésticas de *T. infestans* persisten actualmente en varias áreas de la región del Gran Chaco desde Argentina, Bolivia y Paraguay y partes de la zona inter-andeana de Bolivia y sur de Perú (Figura 1-9). Las poblaciones de insectos persistentes que sobrevivieron a la aplicación del insecticida se relacionan con fuentes de poblaciones peridomésticas, fallas operativas, efecto residual reducido del insecticida o el desarrollo de resistencia a los insecticidas piretroides, lo que dificulta aún más el panorama de control vectorial (Mougabure-Cueto and Picollo 2015, Bustamante Gomez et al. 2016).

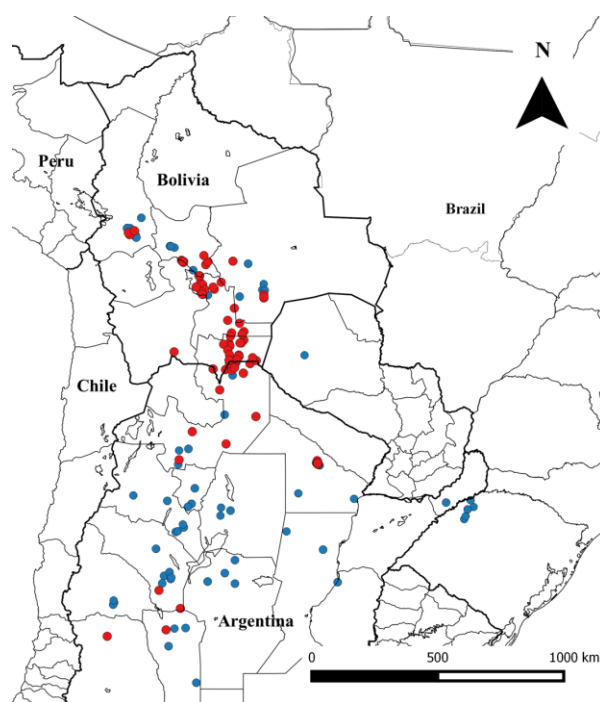


Figura 1-9: Distribución geográfica de *Triatoma infestans*. Poblaciones resistentes (rojo) y susceptibles (azules) (Bustamante Gómez y col, 2016).

La estructuración espacial de las poblaciones de *T. infestans* está asociada con la existencia de tres grupos alopátricos (Andinos, no-Andinos e Intermedio) que muestran importantes

diferencias cromosómicas, en el contenido de ADN y en análisis cuantitativos de fenotipos antenales e hidrocarburos cuticulares (Catalá et al. 2007, Panzera et al. 2010, Calderón-Fernández et al. 2012). La existencia de poblaciones genética y fenéticamente diferentes podría indicar distintas capacidades en cuanto a su comportamiento, dispersión y aún en la capacidad vectorial; la mayor tendencia a la aparición de poblaciones resistentes se observa en áreas andinas y especialmente intermedias (Cardozo et al. 2010, Bustamante Gomez et al. 2016).

Con respecto a *R. prolixus*, solo hay documentado niveles bajos de resistencia a insecticida (Vassena et al. 2000). Sin embargo, es de suma importancia el monitoreo constante y el conocimiento de los mecanismos involucrados en la resistencia en esta y otras especies de triatomíneos de relevancia vectorial. El uso de insecticidas alternativos o con formulaciones diferentes, o el desarrollo de estrategias que no incluyan el control químico (por ejemplo, uso de hongos entomopatógenos como control biológico de plagas) son estrategias que se están investigando hace tiempo (Juárez 1996, Juárez et al. 2008, Pedrini et al. 2009, Forlani et al. 2015), aunque su uso aún no está aprobado a nivel nacional. Además del control vectorial, es esencial el mejoramiento de las viviendas y su entorno, para evitar las condiciones que favorecen la instalación de colonias domésticas de triatomíneos (Gorla 1992, Gürtler et al. 2007).

El control de insectos mediante el uso de insecticidas químicos enfrenta un serio problema no sólo en el caso de triatomíneos sino también de otros insectos vectores a nivel mundial, a partir del desarrollo de elevados grados de resistencia a estos compuestos. En particular, los más ampliamente estudiados son los mosquitos vectores de malaria, al generar los mayores índices de mortalidad de humanos a nivel mundial (OMS 2012, Mnzava et al. 2015). Otras enfermedades transmitidas por mosquitos (dengue, zika y chikungunya) han resurgido y avanzado en forma epidémica recientemente, poniendo en peligro a millones de personas (PAHO/WHO 2016). A pesar de la abundante bibliografía sobre los mecanismos de resistencia, no existe aún una comprensión integral de los mecanismos de resistencia y su regulación (Liu 2015). A la fecha no existen nuevas moléculas de eficacia comprobada; ante la emergencia, las autoridades sanitarias de los países afectados recurren a la aplicación de dosis mayores o a una combinación con insecticidas de mayor toxicidad para

los seres humanos. Amén de su peligrosidad, su aplicación indiscriminada contribuye a incrementar el grado de resistencia de las poblaciones insectiles.

1.4.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA

La resistencia a insecticidas es un fenómeno multifactorial, que involucra varios mecanismos, entre ellos: resistencia metabólica, resistencia por modificación del sitio de acción y el tercer factor, menos estudiado pero con gran cantidad de evidencias en el último tiempo que resaltan su importancia, es el factor cuticular. La era de la genómica y transcriptómica han establecido un nuevo punto de partida para los estudios de resistencia a insecticidas; no se intenta encontrar un único gen responsable de la resistencia en una determinada población sino que el enfoque ómico permite entender la intrincada respuesta generada como un todo, que involucra varios mecanismos compensatorios (Ffrench-Constant 2013).

1.4.1.1 RESISTENCIA POR MODIFICACIÓN DEL SITIO DE ACCIÓN

Es un mecanismo ampliamente estudiado que involucra la insensibilidad en el sitio de acción de distintos insecticidas (Ranson et al. 2002, Ffrench-Constant et al. 2004, Hemingway et al. 2004). Los piretroides afectan el sistema nervioso del insecto mediante la modificación del normal funcionamiento de los canales de sodio regulados por voltaje en las membranas de células excitables. La resistencia kdr (“knockdown resistance”), es la reducción de la sensibilidad a piretroides causada por mutaciones puntuales en el gen del canal de sodio (Soderlund 2008). Este mecanismo ha sido reportado en varias especies de insecto de importancia económica y sanitaria (Soderlund and Knipple 2003).

1.4.1.2 RESISTENCIA METABÓLICA

Este factor implica una mayor capacidad de metabolizar el insecticida debido a un aumento en la expresión de genes relacionados con detoxificación (Hemingway 2000, Liu 2015). En insectos, los mecanismos de detoxificación transforman tóxicos en moléculas no tóxicas a través de reacciones de fase I y fase II. Las reacciones de fase I involucran oxidaciones, reducciones e hidrólisis, mientras que las de fase II ocurren a través de reacciones de conjugación que convierten los productos primarios de fase I en derivados solubles en agua que pueden ser excretados. Han sido implicadas 4 familias de enzimas en la resistencia

insecticidas: esterasas, glutatión s-transferasas (GST), citocromo P450s (CYP), participando en reacciones de fase I y II, y más recientemente, los transportadores ABC, implicados en su eliminación (Dermauw and Leeuwen 2014).

Las CYP, como se describió en el apartado 1.3.2.1, se agrupan en 4 clanes en la mayoría de los organismos: 2, 3, 4 y mitocondrial. El clan 2 y el clan mitocondrial están involucrados en metabolismo hormonal y desarrollo, y tienden a estar altamente conservados y reducidos en número entre los distintos órdenes. En cambio, varias subfamilias del clan 3 y clan 4 han sufrido expansiones génicas, resultando en la aparición de P450 linaje específicos (Feyereisen 2012). Las P450 juegan un rol fundamental en la detoxificación de insecticidas químicos; varios genes *CYP* del clan CYP3 y CYP4 han sido asociados con resistencia a insecticidas en Díptera, Hemíptera y Coleóptera (Zhu et al. 2010, Feyereisen 2011, David et al. 2013, Grosso et al. 2016). Se cree que las expansiones de genes en los genomas de insectos son resultado de estímulos ambientales, lo que provoca la generación de grupos (clusters) de genes en tándem. Originalmente, esas duplicaciones en tándem son idénticas tanto en estructura como en funcionalidad, pero pueden divergir por mutaciones y/o translocaciones. Estas copias adicionales modificadas pueden ser no funcionales o, lo que es más interesante, pueden adquirir una nueva función, relacionada a una mayor demanda metabólica, como una mayor capacidad de desintoxicación que lleva a la resistencia a los insecticidas en el caso de los genes CYP.

A partir de la publicación del genoma completo de *R. prolixus*, se han identificado los genes potencialmente involucrados en los procesos de detoxificación, y se ha reportado la presencia de expansiones CYP así como de otros genes con actividad detoxificante (Mesquita et al. 2015). Con respecto a genes CYP, se han reportado 88 genes pertenecientes a los 4 clanes de insecto clasificados en 24 familias y 48 subfamilias (Schama et al. 2016). Se han encontrado 11 nuevas familias, donde 10 de ellas pertenecen al clan CYP3, y una al clan CYP4 (CYP3093). El clan 4 contiene 27 genes pertenecientes a la familia CYP4 subfamilias C, G, EK, EL, EM y a la nueva familia CYP3093. Esta nueva familia muestra una gran expansión génica, con genes potencialmente funcionales CYP3093A1 al A10, agrupados en un clúster distintivo. La subfamilia CYP4EM también presenta una de las mayores expansiones génicas, tal como se muestra en la Figura 1-10 (Schama et al. 2016)

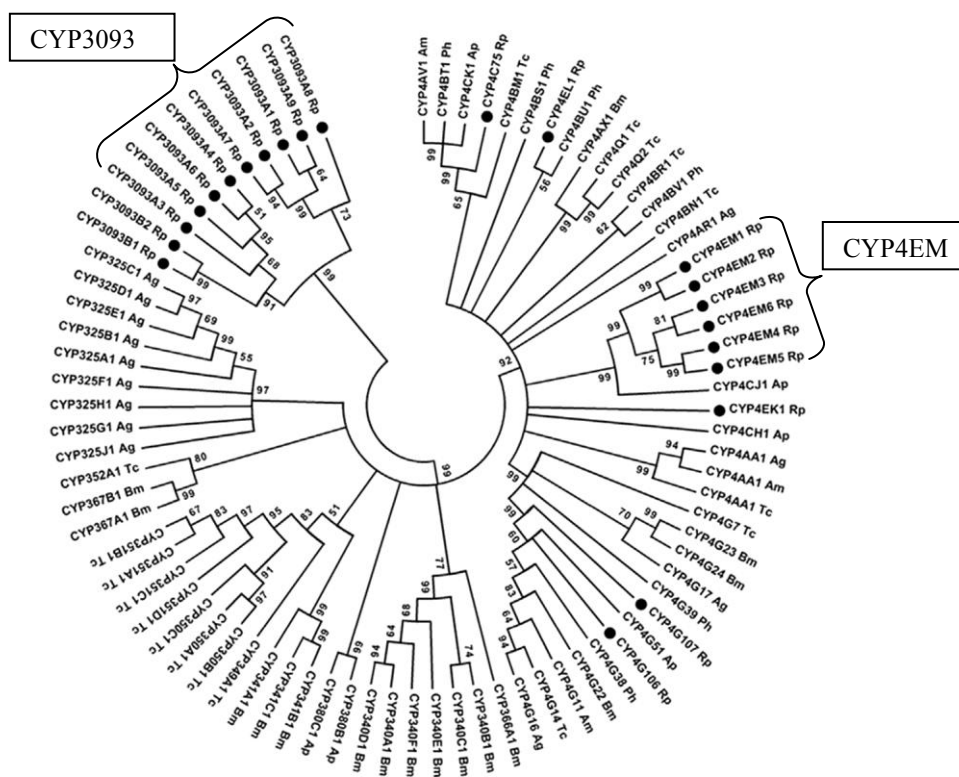


Figura 1-10: Árbol filogenético de P450 clan 4, utilizando las secuencias de *Anopheles gambiae* (Ag), *Bombix mori* (Bm), *Tribolium castaneum* (Tc), *Apis mellifera* (Am), *Pediculus humanus* (Ph), and *Acyrtosiphon pisum* (Ap). Los genes de *Rhodnius prolixus* (Rp) están marcados con un círculo negro, se remarcan las expansiones específicas correspondientes a subfamilia CYP3093A y subfamilia CYP4EM. Schama et al. 2016.

1.4.1.3 FACTOR CUTICULAR

El factor cuticular como mecanismo de resistencia implica una disminución en la penetración del insecticida a través de la cutícula del insecto (Juárez et al. 2010, Zhu et al. 2013, Bass et al. 2014, Balabanidou et al. 2016). Se han publicado evidencias dispersas sobre el rol de los lípidos y proteínas cuticulares en este fenómeno, pero no se han llevado a cabo estudios exhaustivos enfocados especialmente en este aspecto. Estudios de hace ya 20 años demostraron que la remoción de los lípidos cuticulares aceleraba la penetración de insecticidas en ejemplares resistentes de la polilla del repollo, en los que se había observado una penetración retardada de los mismos (Motoyama et al. 1992).

En nuestro laboratorio se ha demostrado por primera vez en insecto mediante evidencias bioquímicas y por análisis de microscopía de barrido, que existe un aumento de aproximadamente un 56% en la cantidad de HC cuticulares en especímenes *T. infestans*

resistentes a piretroides junto con un grosor aumentado de la cutícula, con valores de 32.1 ± 5.9 mm en los insectos resistentes respecto de 17.8 ± 5.4 mm en los susceptibles (Pedrini et al. 2009). Estas características se correlacionan con una penetración reducida del insecticida (Juárez 1994a, Juárez et al. 2010) (Figura 1-11). Recientemente, se ha demostrado también en este laboratorio, resultados similares en poblaciones resistentes del mosquito transmisor de malaria *Anopheles gambiae*, registrando un aumento en la cantidad de HC cuticulares (~29%) junto con un grosor cuticular aumentado. Estos datos también se correlacionaron con una disminución en la penetración de deltametrina (Balabanidou et al. 2016). En *A. gambiae*, hay dos genes codificantes de CYP4G: CYP4G16 y CYP4G17. Mediante ensayos de expresión heteróloga, Balabanidou et al. (2016) demostraron el rol de decarbonilasa oxidativa de CYP4G16, confirmando su participación en la síntesis de HC.

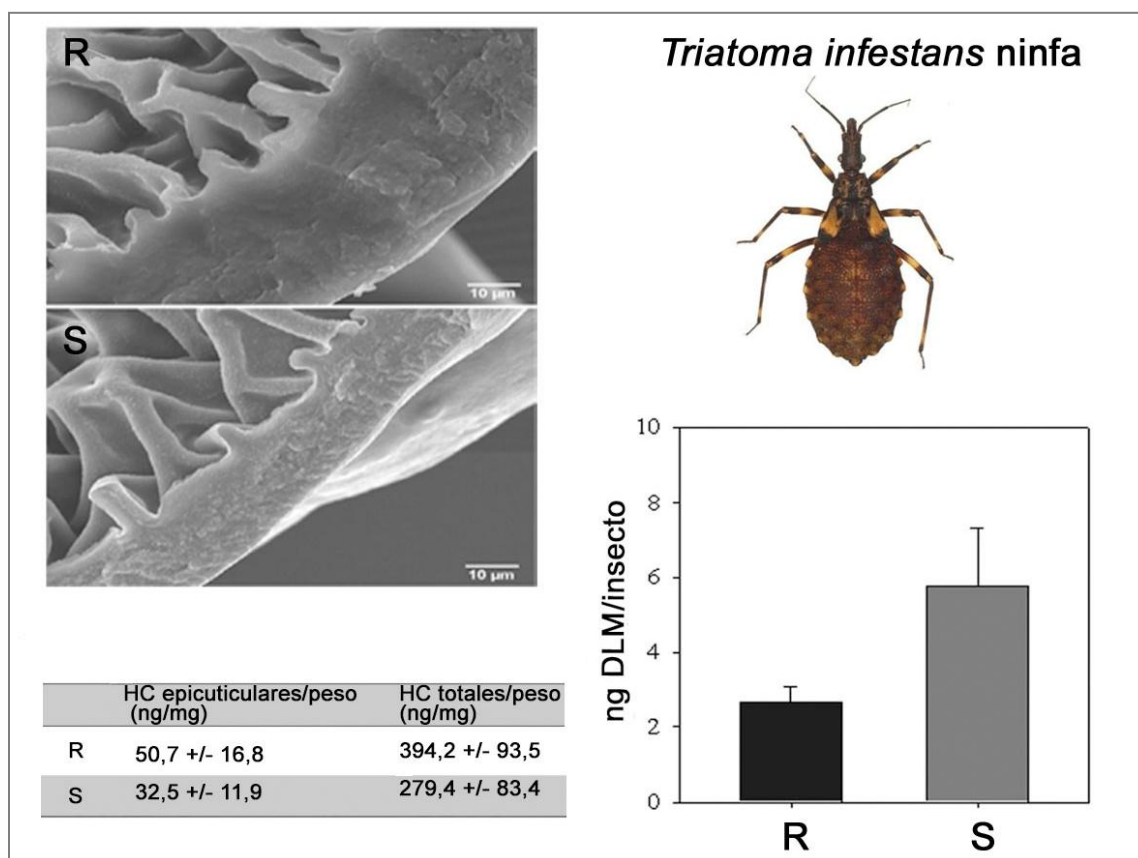


Figura 1-11: Espesor de la cutícula, cantidad de hidrocarburos y penetración de deltametrina en ejemplares ninfas *Triatoma infestans* resistentes (R) y susceptibles (S) a insecticidas piretroides. Modificado de Pedrini et al. 2009 y Juárez et al. 2010.

A su vez, se evidenció en transcriptomas y proteomas de varias especies resistentes la sobreexpresión de genes codificantes de distintos tipos de proteínas cuticulares, o relacionados a la esclerotización cuticular, entre ellos, *Aedes Aegyptis* (díptera), *Myzus persicae* (hemíptera), *Cimex lectularius* (hemíptera), *Culex pipiens* (díptera) *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae*, *Myzus persicae* (Vontas et al. 2007, Awolola et al. 2009, Pan et al. 2009, David et al. 2010, Puinean et al. 2010, Mamidala et al. 2012, Silva et al. 2012, Wang et al. 2015). En 2010, se detectó una correlación entre el grosor cuticular y el grado de resistencia en ejemplares *Anopheles funestus* (Wood et al. 2010). Asimismo, se describió en poblaciones de *Anopheles coluzzi* la sobreexpresión de genes detoxificantes (CYP450) y genes del integumento que participarían en la biosíntesis de hidrocarburos (CYP4G16, ELOVL) y proteínas cuticulares estructurales; la participación del mecanismo de resistencia kdr no sería tan relevante. Sin embargo falta aún su validación funcional (Toé et al. 2015).

El factor cuticular en la resistencia a insecticidas es evidentemente un mecanismo muy complejo, e incluiría alteraciones en la regulación/expresión de genes que codifican la biosíntesis de proteínas cuticulares, de HC y enzimas involucradas en la formación de otros componentes de la cutícula.

1.4.2 TRANSPORTE DE INSECTICIDAS

Las estrategias actuales de control de plagas dependen en gran medida de insecticidas de contacto, como los piretroides, que son compuestos lipofílicos que ingresan a los diversos tejidos blancos luego de penetrar a través de la cutícula. Se ha adquirido un gran conocimiento sobre el mecanismo de acción y toxicocinética de estas moléculas (Soderlund 1995, Davies et al. 2007) pero las etapas iniciales del contacto insecticida-insecto no se han examinado por completo. Una vez que la molécula ingresó a través de la cutícula, la hemolinfa y sus lipoproteínas cumplen el rol de transportadores.

En *T. infestans*, así como en otros insectos, se ha demostrado la presencia de 3 fracciones lipoproteicas de alta y muy alta densidad en la hemolinfa: lipoforina (Lp), y lipoproteína de muy alta densidad I y II (VHDL1 y VHDL2 respectivamente) siendo Lp la principal responsable del transporte de lípidos (Fichera and Brenner 1982, Rimoldi et al. 1999). La

Lp está compuesta por dos apolipoproteínas estructurales, apolipoproteína I y II, y un núcleo central de lípidos neutros. Funciona como un transportador reusable, transfiriendo su carga lipídica desde el sitio de absorción o almacenamiento a su sitio de acción, sin ser degradada o internalizada (Arrese et al. 2001, Canavoso and Wells 2001, Canavoso et al. 2001).

Entre los escasos estudios que intentaron dilucidar la penetración de insecticidas a través de la cutícula se demostró que el insecticida organoclorado dicloro difenil tricloroetano (DDT) se une mayoritariamente a las proteínas de hemolinfa de la cucaracha (Winter et al. 1975). En *Manduca sexta*, se demostró que la unión de insecticidas a las lipoproteínas estaba relacionada con la polaridad de la molécula (Helling et al. 1986). Si este mecanismo de transporte disminuye o aumenta la toxicidad del insecticida en el insecto aún no ha sido abordado. Entender el modo de absorción y distribución del insecticida puede ayudar a dilucidar mecanismos que contribuyan a la resistencia, ya sea por diferencias en el mecanismo de captación, unión a lipoproteínas, biodisponibilidad del insecticida y/o distribución en los tejidos internos entre ejemplares resistentes y susceptibles. La intoxicación y muerte del insecto dependerá no sólo de la dosis aplicada y la formulación, sino también de la estabilidad del insecticida y de la fisiología del insecto, y entre otras, de la penetración a través de la cutícula (Juárez 1994a).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GENERALES

El integumento de los insectos es indispensable para la supervivencia de los mismos. Dada su importancia y enorme complejidad, se propone avanzar en el conocimiento de aspectos bioquímicos y moleculares del integumento y los lípidos cuticulares involucrados en la resistencia a insecticidas y en la comunicación química en triatominos. Este conocimiento contribuirá no sólo a dilucidar los mecanismos y regulación de su formación, sino también en el mediano plazo, al diseño de estrategias que permitan tanto interferir en la formación de esta cubierta protectora o utilizarlo para el control de insectos plaga o de interés sanitario.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avanzar en el estudio de la composición y metabolismo de lípidos cuticulares en *Triatoma infestans*:

- Analizar la composición de componentes epicuticulares específicos en función de la susceptibilidad a insecticidas piretroides y en función del sexo.
- Cuantificar la producción de feromonas sexuales de contacto en hembras vírgenes.
- Análizar las acil-CoA reductasas (FARs) que intervienen en la biosíntesis de alcoholes grasos en integumento.

b) Evaluar la vía de transporte de deltametrina en la hemolinfa de insectos resistentes y susceptibles.

c) Estudiar el rol de los genes citocromo P450 (CYP) del clan 4 en el integumento de triatominos:

- Caracterizar molecular y funcionalmente los genes codificantes de las enzimas que intervienen en las etapas finales de la biosíntesis de hidrocarburos (citocromo P450: CYP4Gs).
- Estudiar genes potencialmente involucrados en la detoxificación de insecticidas en el integumento de triatominos resistentes.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 INSECTOS

Se utilizaron ejemplares *Triatoma infestans* obtenidos a partir de colonias de laboratorio de insectos susceptibles (S) y resistentes (R) a deltametrina, y ejemplares *Rhodnius prolixus*. La colonia *T. infestans* resistente se originó a partir de insectos colectados en la ciudad de Salvador Mazza (Salta) y aportados por el Biól. Rubén Cardozo (Univ. Nacional de Salta). El índice de resistencia frente a deltametrina (RR:100) fue determinado por el Biól. según metodologías establecidas por el CIPEIN ([WHO] World Health Organization 1994, Picollo et al. 2005, Pedrini et al. 2009). La colonia *T. infestans* susceptible se originó a partir de insectos colectados de zonas de la provincia de Santiago del Estero no tratadas con deltametrina y que no registraban casos de resistencia, y aportados por el Servicio Nacional de Chagas, Santa María de Punilla, Córdoba, a cargo del Biól. Raúl Stariolo. Los insectos *Rhodnius prolixus*, procedentes de Colombia, también fueron aportados por el Biól. Stariolo. Todas las colonias utilizadas a lo largo de la tesis estaban libres de infección con *T. cruzi* y se mantuvieron en el insectario del INIBIOLP, a 28 °C y 50 % de H.R., alimentadas con sangre de rata. Cada una de las colonias fue renovada anualmente con insectos procedentes de las regiones anteriormente descriptas.

Para los ensayos relacionados a la resistencia a insecticidas se utilizaron adultos *T. infestans* R y S. Para los ensayos de dimorfismo sexual se utilizaron adultos *T. infestans* vírgenes, y en el caso particular de las hembras, las mismas se separaron individualmente al alcanzar el estadio adulto. Para los ensayos de caracterización molecular y funcional de CYP4Gs se utilizaron ninfas *R. prolixus*. El motivo del uso de *R. prolixus* en esa sección se debe a que su ciclo de vida es muy sincronizado en el laboratorio, lo que permite un fácil control sobre las condiciones y tiempos de muda durante un ensayo, a diferencia de *T. infestans*.

El manejo de animales de laboratorio y los protocolos de experimentación fueron aprobados por el comité de bioética del INIBIOLP (Certificación de bienestar animal N° A5647-01 otorgado al INIBIOLP), y llevados a cabo de acuerdo a las Políticas de Bienestar Animal AVMA y la Guía para la Eutanasia de Animales AVMA:

- <https://www.avma.org/kb/policias/pages/default.aspx>

- <https://www.avma.org/KB/Policias/Documents/euthanasia.pdf>

3.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

3.2.1 OBTENCIÓN DE LOS LÍPIDOS

Para estudiar la composición lipídica de la epicutícula de insectos *T. infestans*, se realizó una extracción de los mismos con hexano. En primer lugar, los insectos se colocaron unos minutos a bajas temperaturas para anestésarlos, luego se lavaron con agua bidestilada para la remoción de contaminantes hidrosolubles y posteriormente se sumergieron en *n*-hexano destilado (Carlo Erba, Italia) en una relación aproximada de 6 ml/gr de insecto, se realizaron tres extracciones de cinco minutos cada una, colectando en un vial los lípidos epicuticulares de cada insecto (Juárez et al. 2001). Luego se concentraron las muestras mediante evaporación del hexano utilizando una corriente N₂ hasta evaporación total, finalmente las muestras fueron resuspendidas en hexano para su posterior procesamiento.

3.2.1.1 SEPARACIÓN EN COLUMNA

Las distintas fracciones lipídicas presentes en las muestras se separaron mediante cromatografía de adsorción en columna utilizando una mini columna de vidrio vertical (10 mm x 5 mm I.D., malla de 100-200 µm) como se muestra a continuación, con ácido silícico como soporte sólido previamente activado a 150 °C durante 1 hora. La muestra a separar se deposita en la parte superior de este soporte, y el resto de la columna se va eluyendo con una mezcla de solventes. Se establece un equilibrio entre el soluto adsorbido en la fase estacionaria y el solvente que fluye por la columna. Cada componente de la mezcla establece interacciones diferentes con la fase estacionaria y la móvil de acuerdo a su polaridad, y serán transportados a distintas velocidades, consiguiendo su separación. La mezcla de solventes utilizada fue la siguiente:



Fracción 1 (conteniendo HC): 2ml hexano

Volumen muerto1: 1ml 95:5 (hexano: éter etílico)

Fracción 2 (conteniendo ceras (W), ésteres de colesterol (EC) y aldehídos (ALD)): 2ml 95:5 (hexano: éter etílico)

Volumen muerto 2: 2ml 85:15 (hexano: éter etílico)

Fracción 3 (conteniendo alcoholes grasos (ROH)): 4ml 85:15 (hexano: éter etílico)

Cada fracción fue recolectada en un vial de vidrio de 4ml, y posteriormente la muestra fue analizada mediante cromatografía en capa fina (TLC) o concentrada en un tubo cónico de 0,5 ml para su análisis mediante cromatografía gaseosa capilar (CGC).

3.2.1.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

La cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica de separación de lípidos sobre una placa que contiene la fase estacionaria de sílica gel. La muestra se siembra en la parte inferior de la placa, y es introducida en una cubeta cromatográfica que contiene la fase móvil, que asciende por la placa de TLC por capilaridad. A medida que el eluyente pasa por el lugar donde está la mancha de la mezcla problema se establece un equilibrio entre las moléculas de cada uno de los componentes en la mezcla que son adsorbidas y las que se encuentran en disolución. De acuerdo a su polaridad, unos componentes se desplazarán más que otros. Cuando el eluyente llega a la parte superior de la placa, ésta se saca de la cubeta, se seca, y los componentes separados de la mezcla se revelan empleando reactivos de visualización. Mediante esta técnica, se analizaron los extractos lipídicos y las fracciones obtenidas por columna, utilizando placas de sílica gel Polygram Sil G de 4 × 8 cm y 20 x 20 cm (Macherey-Nagel, Alemania). Para la fase móvil orgánica se utilizaron dos sistemas de desarrollo: primero *n*-hexano (100 %) y luego *n*-hexano: éter etílico: ácido acético (80:20:1 v/v). Los lípidos se identificaron por comparación con estándares sembrados en

forma simultánea en la misma placa. Todos los solventes orgánicos utilizados fueron de grado pro-análisis (Carlo Erba, Italia).

La visualización de las muestras se realizó mediante alguno de los siguientes métodos:

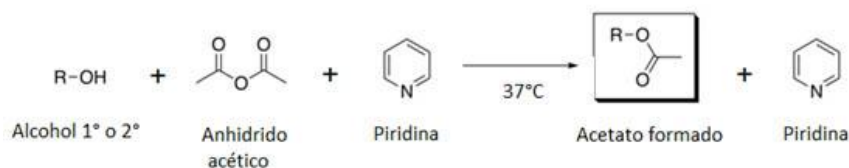
1) Con vapores de yodo (I_2). Se colocó la placa desarrollada y seca en una cuba conteniendo yodo bisublimado (Carlo Erba) durante 10 minutos. Es un método cualitativo que permite visualizar las zonas con lípidos ya que el yodo (colorante inespecífico) los tiñe de un color parduzco

2) Por calcinación. Se realizó la inmersión de la placa cromatográfica en una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) en etanol (5 %) y posteriormente se colocó en estufa a 180 °C durante 15 min. Es un método destructivo, inespecífico, con una alta sensibilidad, que produce la carbonización de los compuestos que se observan como manchas negras.

3.2.2 DERIVATIZACIÓN DE ALCOHOLES GRASOS.

Los compuestos químicos a menudo se derivatizan previamente a su análisis ya que la introducción de ciertos elementos o grupos a través de la derivatización química puede mejorar la respuesta del detector o generar espectros de masas útiles para el esclarecimiento de las características estructurales de los analitos. Para el análisis de los alcoholes grasos de menor longitud de cadena que se encuentran presentes en muy bajas proporciones en la epicutícula de los insectos, se recurrió a su derivatización química, transformando el alcohol original en un derivado acetilado. En el caso particular de los ROH, la introducción de una carga mejora la sensibilidad en la detección mediante espectrometría de masas, ya que posee un patrón de fragmentación fácilmente identificable.

La acetilación de los alcoholes presentes en el extracto epicuticular total se realizó con anhídrido acético en presencia de piridina como catalizador, como se muestra en la siguiente reacción:



El extracto de lípidos cuticulares correspondientes a un macho o una hembra *T. infestans* fue colocado en un vial de vidrio de 2 ml. Se agregaron 100 µl de anhídrido acético y 200 µl de piridina. Se incubó la reacción a 37 °C por 30 minutos y a continuación se agregaron 500 µl de agua miliQ. Se procedió a una extracción de los lípidos con 3 lavados sucesivos de 500 µl de hexano cada uno, mezclando y centrifugando después de cada agregado de hexano (Farquhar 1962) (con modificaciones). Se recolectaron las 3 fracciones de hexano en un nuevo vial de 2 ml. Para el análisis de la muestra mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CGC-MS), se evaporó la totalidad del hexano, y se resuspendió en el volumen adecuado para ser inyectado en el cromatógrafo.

Para la cuantificación, se evaporó la totalidad del hexano y se extrajo la muestra mediante microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME), como se indica en el ítem siguiente.

3.2.2.1 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DEL ESPACIO DE CABEZA (HS-SPME)

La microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (o HS-SPME por sus siglas en inglés headspace-solid phase microextraction) es una técnica no destructiva que permite extraer compuestos químicos para su posterior análisis e identificación. Se emplea una fibra de sílice fundida recubierta con una fase adsorbente que sirve para la extracción, la fase puede estar constituida de un polímero líquido o un sorbente sólido. La polaridad de las fibras depende del material de recubrimiento empleado, y pueden extraer diferentes tipos de moléculas, volátiles o no volátiles, a partir de diferentes medios, en fase líquida o gaseosa. El principio en el que se basa la HS-SPME es la partición de los analitos entre la fase gaseosa del espacio de cabeza o “headspace” (HS) de una muestra sólida o líquida y el recubrimiento de fibra. Así, el transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra comienza cuando la fibra entra en contacto con la muestra y la extracción se considera completa cuando la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la muestra y la fibra (Figura 3-1). Los analitos extraídos pueden analizarse posteriormente por cromatografía gaseosa capilar (CGC).

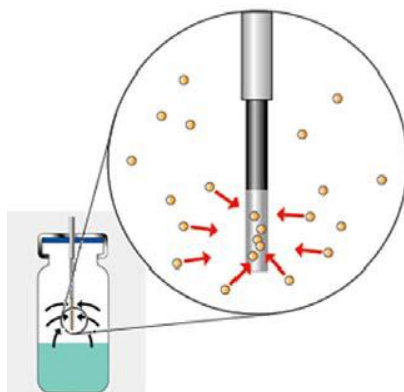


Figura 3-1: Moléculas extraídas del espacio de cabeza (HS) por la fibra de SPME.

La muestra se coloca en un vial con tapa de teflón y septum de goma. Con la aguja de metal se perfora el septum de la tapa del vial y se expone el material adsorbente a la muestra durante un período de tiempo que oscila entre 15 y 30 minutos (Figura 3-2B). Se retrae la fibra del vial y se inyecta en el cromatógrafo gaseoso. En el inyector del CGC se expone el material adsorbente a altas temperaturas y los analitos se desorben en el interior del mismo (Figura 3-2C). Los diversos materiales adsorbentes que recubren la fibra de sílice se clasifican según su polaridad en: polares (poliacrilato, carbowax-divinilbenceno, carbowax-resina templada), no polares (polidimetilsiloxano), y bipolares (combinación de las anteriores). Esta técnica no requiere de solventes para la extracción y tiene un límite de detección muy bajo, del orden de las partes por trillón (ppt).

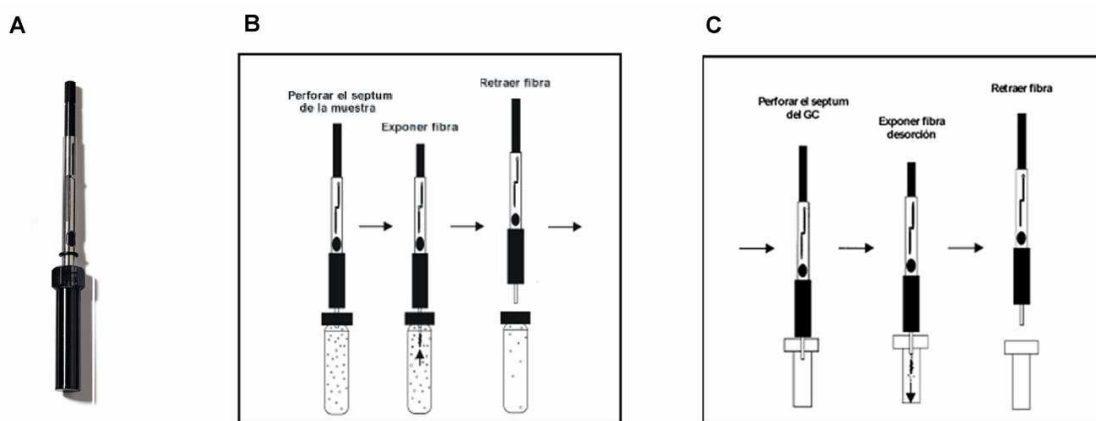


Figura 3-2: A) Fotografía del dispositivo para análisis de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME): la fibra se encuentra protegida por una aguja de metal, que se retrae dentro del holder. B) Procedimiento para la extracción de compuestos volátiles por HS-SPME. C) Desorción de los analitos en el inyector del cromatógrafo gaseoso.

Para el análisis de los alcoholes derivatizados, se utilizó una fibra bipolar de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB, 65 μm , Supelco, EE.UU) y la toma de muestra se efectuó durante 20 minutos a 150 °C. Para llevar a cabo la cuantificación, se utilizó una curva de calibración con estándares externos. Para ello, diluciones seriadas de C₂₀-ol y C₂₂-ol comerciales fueron derivatizadas y analizadas como se describió anteriormente. Con los datos obtenidos, se trazó una curva de calibración relacionando el área del pico cromatográfico y su concentración. Dado que la respuesta del detector es específica para cada compuesto, se trazaron curvas correspondientes a cada alcohol.

3.2.3 OBTENCIÓN DE HEMOLINFA

A fin de investigar la vía del transporte del insecticida piretroide deltametrina (DLM) en la hemolinfa de insectos *T. infestans*, se extrajo la misma de especímenes macho R y S. Para ello, los insectos se colocaron boca abajo sobre un eppendorf 1,5 ml cuya punta había sido removida, previa escisión de la cabeza y patas delanteras. Cada eppendorf con los insectos se colocó en un tubo de vidrio de 12 por 100 mm² y se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 300 rpm temperatura ambiente, de manera de recolectar la hemolinfa (25 ml/insecto) en dicho tubo. Luego, la hemolinfa de 20 insectos se colocó en un tubo refrigerado conteniendo fluoruro de fenilmetilsulfonilo en una concentración final de 2 mM para inhibir las proteasas de la hemolinfa.

3.2.3.1 INCUBACIÓN CON DELTAMETRINA

A continuación, se agregó una solución de deltametrina en acetona (560 ng/ml) a 600 ml de hemolinfa, y se mezcló vigorosamente cada 10 minutos durante 1 hora a 30 °C. Pasada la hora de incubación, se centrifugó el tubo por 10 minutos a 6500 rpm para descartar los hemocitos de la muestra.

3.2.3.2 FRACCIONAMIENTO DE LIPOPROTEÍNAS

El fraccionamiento de las lipoproteínas de hemolinfa se llevó a cabo por ultracentrifugación en gradiente de densidad con solución de NaBr (Rimoldi et al. 1999). La hemolinfa libre de hemocitos se sembró sobre 3 ml de una solución de NaBr (densidad 1.28 g/ml, 0.196 M NaCl, 0.01 % EDTA), y se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman L8 70M con rotor SW60Ti (BeckmanCoulter, Inc., Fullerton, CA) a 45000 rpm durante 22 hs

a 4 °C. El contenido del tubo se colectó en fracciones de 100 μ l desde la parte superior. 10 μ l de cada una de esas fracciones se utilizaron para monitorear la presencia de proteínas mediante absorción a 280 nm en un espectrofotómetro Ultrospec2100 (Amersham Biosciences UK Ltd, Buckinghamshire, United .Kingdom); los 90 μ l restantes se utilizaron para la cuantificación de deltametrina.

3.2.3.3 EXTRACCIÓN DE DELTAMETRINA

La microextracción en fase líquida es un proceso químico de separación de compuestos en una mezcla aprovechando la diferencia de solubilidad entre dos líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles. Para la extracción de deltametrina en cada una de las fracciones obtenidas se recurrió a la microextracción con barras de solvente utilizando fibras huecas (por sus siglas en inglés HF-SBME), que es una modificación de la microextracción en fase líquida y puesto a punto previamente en nuestro laboratorio. Los analitos son extraídos de una disolución acuosa hacia la fase aceptora, que es un disolvente orgánico que se encuentra en el volumen interior de la fibra hueca y que ha sido previamente inmovilizado en los poros del capilar de la fibra, tal como se muestra en la Figura 3-3.

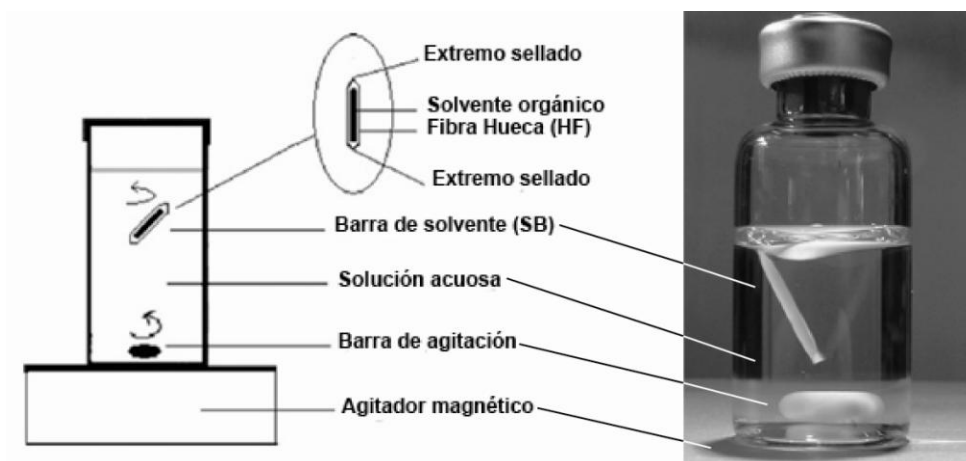


Figura 3-3: HF-SBME. Esquema de la extracción de los analitos a partir de la solución acuosa hacia la fase orgánica contenida dentro de la fibra, mediante la técnica de SBME con fibras huecas.

En este caso, la fibra hueca se lavó en acetona, se secó y se impregnó en 1-octanol por inmersión. La barra de solvente se obtuvo sellando y cortando la fibra hueca con una maquina selladora FS.200 (DaSA, Argentina) (Wang et al. 2012). La elección de 1-octanol

como solvente fue por su compatibilidad con la fibra, baja solubilidad en agua, baja presión de vapor y por su comportamiento cromatográfico (Shen and Lee 2002). Se colocaron 90 μl de cada fracción obtenida por ultra centrifugación en un vial (6ml) y se mezclaron con 150 μl de acetona y 2760 μl de agua miliQ, para obtener un volumen final de 3 ml. La temperatura de extracción fue de 65 °C. Cada barra de solvente fue colocada en un vial y agitada a 800 rpm durante 20 minutos, luego fue removida de la solución, y una alícuota de 2 μl del solvente enriquecido con DLM fue recolectado con una jeringa (10 μl , Hamilton, NV) para su posterior inyección y análisis mediante cromatografía gaseosa capilar acoplada a un detector de captura electrónica, como se describe más adelante. La selección de las condiciones óptimas para la extracción de DLM (temperatura, velocidad y tiempo de agitación) fueron optimizadas previamente, y utilizadas para obtener la curva estándar de DLM para las cuantificaciones.

3.3 ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRFÍA GASEOSA CAPILAR (CGC)

La cromatografía gaseosa capilar (CGC) es una técnica analítica de separación de sustancias en mezclas complejas. La muestra se inyecta en el cromatógrafo gaseoso, donde es volatilizada y luego introducida en la columna capilar dentro del horno. La columna contiene un líquido inmovilizado en el material inerte que recubre la pared del capilar que cumple la función de fase estacionaria. La muestra volatilizada es arrastrada por un gas (fase móvil). La separación se logra por la interacción diferenciada de los componentes de la mezcla con la fase estacionaria y la fase móvil, lo que define el tiempo de retención de cada compuesto (tiempo que es retenido en la columna). Para identificar la presencia de los compuestos eluidos de la columna, se debe acoplar un detector a la salida del cromatógrafo. La elección del detector a utilizar depende de la naturaleza química de las muestras así como del objetivo del ensayo. Las sustancias detectadas se observan como picos en un gráfico donde se representa la respuesta del detector en función del tiempo de elución (cromatograma).

CGC acoplada a espectrometría de masas: La CGC acoplada a espectrometría de masas (MS) tiene gran aplicación para la identificación y caracterización de compuestos ya que

combina el alto poder de resolución que da la cromatografía de gases con la alta sensibilidad suministrada por el espectrómetro de masas. La más empleada es la de impacto electrónico, en donde los compuestos son fragmentados e ionizados por una corriente de electrones generando un patrón de fragmentos que es específico de cada molécula. El registro obtenido se denomina espectro de masas y representa las abundancias iónicas obtenidas en función de la relación masa/carga de los iones detectados. El espectro de masas más común es un TIC (total ion chromatogram), que corresponde a todas las masas que se adquieren. En un típico espectro de masas se identifica el ion molecular (M)⁺, que resulta de la pérdida de un electrón de la molécula, y el pico base que es el ión más abundante del espectro. Por su parte, en un cromatograma ion-extraído (EIC) se grafica la intensidad de la señal a uno o más valores m/z correspondientes al analito de interés, que es así “extraído” a partir de una serie de espectros de masa obtenidos de la corrida cromatográfica dentro de una tolerancia de masa fijada. Este tipo de análisis es útil para reexaminar datos y detectar analitos previamente insospechados, para resaltar isómeros potenciales, resolver sustancias co-eluyentes u obtener un cromatograma limpio de los componentes de interés sin necesidad de purificar la muestra, de gran utilidad para identificar componentes minoritarios.

CGC acoplado a un detector de ionización de llama: En el detector de ionización de llama (FID) los analitos que llegan al detector son ionizados por una llama y convertidos en una señal eléctrica que luego de ser amplificada, genera el cromatograma.

CGC acoplado a un detector de captura electrónica: El detector de captura electrónica (μ ECD) es muy selectivo y sensible a la presencia de compuestos con grupos funcionales electronegativos como halógenos, peróxidos, nitro y quinonas. Se basa en la emisión de una partícula β (electrón) por parte de átomos como el ^{63}Ni o tritio adsorbido sobre una placa de platino o titanio. Dicho electrón ioniza el gas portador y se produce una ráfaga de electrones. Si se aplica un campo eléctrico constante, se tendrá una corriente constante entre ambos; sin embargo, si se tienen especies orgánicas en el gas, éstas capturarán parte de los electrones, disminuyendo por tanto la intensidad de la corriente.

3.3.1 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POR CGC-MS

La determinación de la identidad química de los compuestos contenidos en las muestras de interés se realizó mediante CGC-MS. Se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard 6890 equipado con una columna capilar Zebron-5HT *inferno* (30 m x 0.25 mm I.D., F.T. 0.25 µm, Phenomenex, EEUU). Como gas transportador se utilizó He a 11.36 psi con una velocidad lineal de 39 cm/s. El inyector se operó en modo splitless a 300 °C, y el horno se programó con una temperatura inicial de 50 °C por 1 min, y luego con rampas de temperatura de 50 °C/min hasta 200 °C y 3 °C/min hasta 330°C permaneciendo finalmente a esa temperatura por 10 min. El detector MS (Agilent 5975C VL) fue operado en el modo SCAN con un rango de masas de 35 a 650 u.m.a.; en modo impacto electrónico a 70 eV; línea de transferencia a 320 °C; temperatura de cámara de ionización a 230 °C y cuadrupolo a 150 °C.

Los compuestos de interés HC, ALD y ROH se identificaron tentativamente por interpretación de sus espectros de fragmentación de masas (Christie 1989, Juárez et al. 2001); los espectros también se compararon con los datos de las bibliotecas de espectros de MS (Adams 2007), y los índices de retención de Kovals (KI) con valores publicados anteriormente (Blomquist et al. 1987, Juárez et al. 2001). Para que la identificación sea confiable, se requiere no solo del análisis de los patrones de fragmentación, sino también la correspondencia con los valores de KI y la factibilidad biosintética. El KI es un método de cuantificación de los tiempos de elución de diferentes compuestos en cromatografía de gases, utilizado para contribuir a identificar los componentes de una mezcla. Los mismos se calculan tomando de referencia los tiempos de retención de n-alcános de 10 a 44 átomos de carbono analizados en idénticas condiciones, utilizando la siguiente fórmula:

$$IK = 100 \left[n + (N - n) \frac{\log t'_r(\text{desconocido}) - \log t'_r(n)}{\log t'_r(N) - \log t'_r(n)} \right]$$

Donde n es el número de carbonos del alcáno más corto; N es el número de átomos de carbono del alcáno más largo; $t'_r(n)$ es el tiempo de retención ajustado del alcáno más corto; y $t'_r(N)$ el tiempo de retención ajustado del alcáno más largo.

En la Figura 3-4 se muestra a modo de ejemplo el espectro de fragmentación correspondiente a moléculas lineales de 30 carbonos: C_{30} , C_{30} -ol y C_{30} -al. En el caso de los hidrocarburos, en la fragmentación se forman grupos metileno debidos a la ruptura de las uniones carbono-carbono de la cadena principal. En los HC de cadena lineal, la intensidad de los fragmentos disminuye en forma continua. El peso molecular del compuesto se puede determinar en base al ion molecular $(M)^+$, que resulta tras la pérdida de un electrón; en el ejemplo del C_{30} le corresponde un pico a $m/z = 422$. Hay una pérdida de unidades metileno ($-CH_2-$) en series correspondientes a $M-14$, $M-28$, $M-42$, etc. En alcanos de longitudes de cadena cortas, el pico del ion molecular es fuerte pero su intensidad decrece al aumentar el tamaño y presencia de ramificaciones.

En cuanto a los aldehídos, la característica del espectro de masa de aldehídos de cadenas cortas es la presencia de un pico base dominante $m/z 57$, seguido de un pico $m/z 43$, y un tercero $m/z 82$, y uno de menor intensidad $m/z 96$. El ion $M-18$, formado por la pérdida de H_2O y el ión $M-46$ son fragmentos característicos de aldehídos de cadenas hidrocarbonadas largas y de número par de átomos de carbono. En el ejemplo para el C_{30} -al, $M=436$ y los picos característicos que se observan corresponden a $m/z = 418$ y 390 .

En los alcoholes grasos, el ion molecular raramente se encuentra en grandes cantidades, y el primer ion significativo corresponde a la pérdida de agua, $([M-18]^+)$. En el ejemplo que se muestra en la Figura 3-4 para el C_{30} -ol, $m/z = 420$. Los demás iones corresponden a fragmentos de hidrocarburos. Los iones $m/z=392$ y 364 también son característicos y representan la pérdida de sucesivos grupos etilenos.

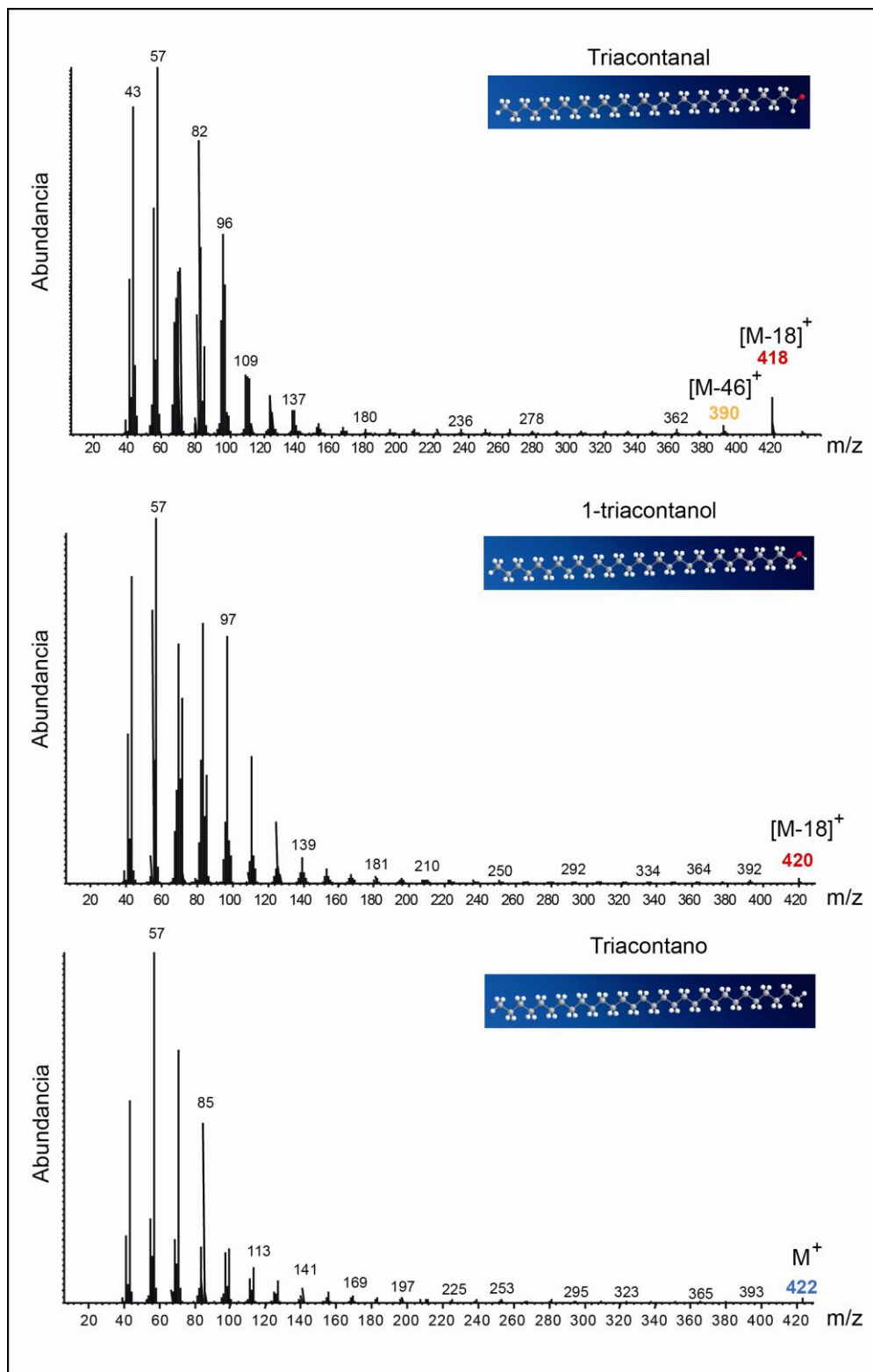


Figura 3-4: Espectros de masa correspondientes al C₃₀-al, C₃₀-ol y C₃₀, y los picos utilizados para su identificación.

En el caso del espectro de masa de un alcohol graso acetilado, el ion molecular se encuentra ausente, y el primer ion molecular significativo es aquel correspondiente a la pérdida de ácido acético ($[M-60]^+$). En el espectro del 1-triacontanil acetato (C_{30} -ol acetilado), ilustrado a continuación, este pico se da a $m/z=420$. El ion base en el espectro de acetatos es generalmente $m/z=43$, representando el fragmento $[CH_3CO]^+$. Un ion distintivo a $m/z=61$ es típico en el espectro de los acetatos, y corresponde al fragmento $-[CH_3COOH_2]^+$.

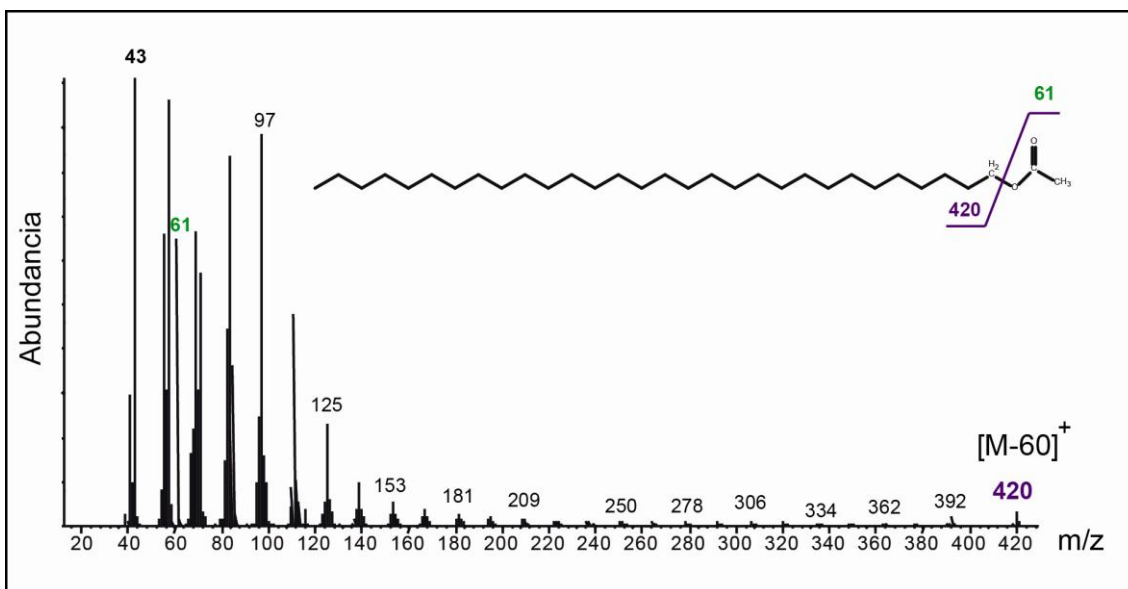


Figura 3-5: Espectro de masa del alcohol C_{30} -ol acetilado.

Para el análisis de alcoholes grasos acetilados, se utilizó un cromatograma EIC a $m/z=61$, correspondiente al ión típico de los acetatos, como se muestra en la Figura 3-6.

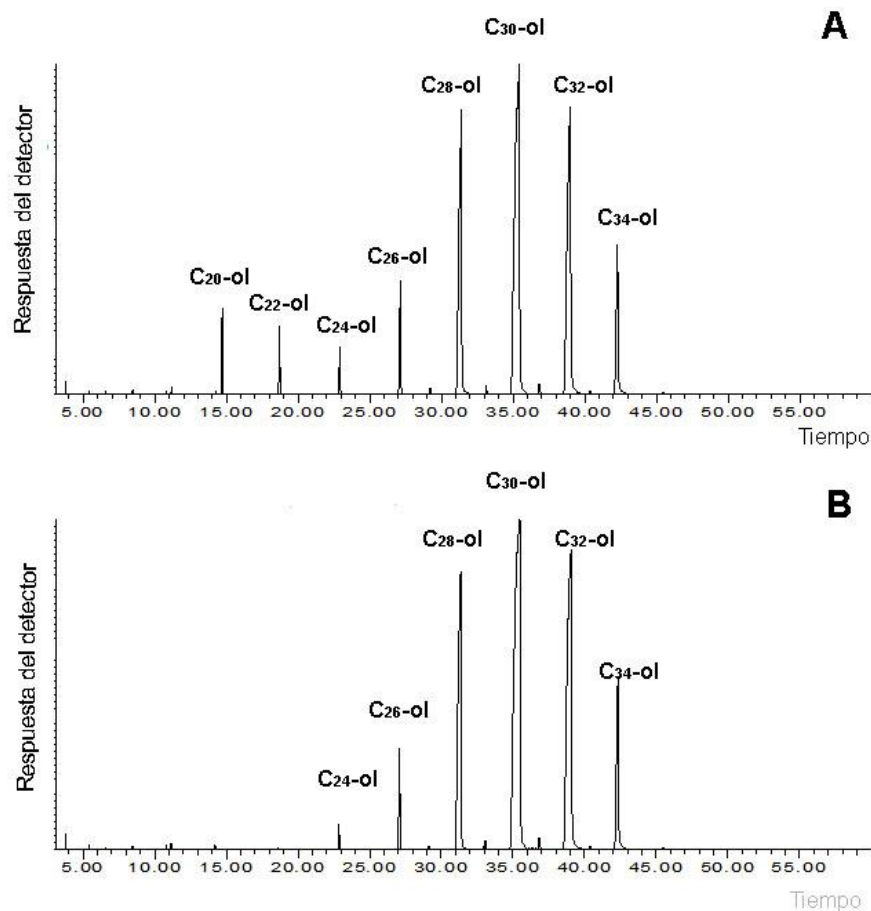


Figura 3-6: Cromatograma ión-extraído (EIC) a $m/z=61$ de una muestra de lípidos epicuticulares donde se observan los alcoholes grasos acetilados de hembras (B) y machos (C).

3.3.2 CUANTIFICACIÓN DE COMPONENTES LIPÍDICOS POR CGC-FID

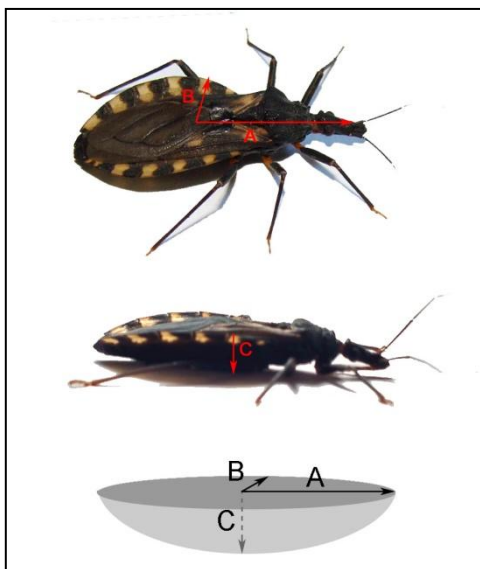
La cuantificación de cualquier compuesto mediante CGC se basa en que el área de los picos registrados en el cromatograma es proporcional a la masa del compuesto inyectado; de esta manera, el procedimiento general de un análisis cuantitativo por CGC involucra la obtención del cromatograma de la muestra, la medida del área de los picos de interés y el cálculo de la masa correspondiente a cada uno de los picos. Este cálculo se hace empleando una curva de calibración basada en la inyección de un estándar de concentración conocida. El cálculo posterior del área obtenida a partir del estándar permite correlacionar valores de área con valores de masa. Una forma de cuantificación relativa es referir el porcentaje del área de un pico en función del área total de todos los picos contenidos en el cromatograma;

la comparación de los porcentajes entre distintas muestras permite establecer diferencias entre ellas.

Una vez identificados por CGC-MS cada uno de los picos obtenidos en el perfil de HC, ALD y ROH, la cuantificación se realizó mediante CGC-FID, ya que implica menores costos de operación y se reserva el uso del MS para ensayos de identificación. Se utilizaron los siguientes estándares internos: docosano (C₂₂); hexadecanal (C₁₆-al) y nonadecanol (C₁₉-ol). Para ello, se agregó al extracto crudo 100 µl con jeringa Hamilton de un mix de estándar conteniendo C₂₂-ol (560 ng), C₁₆-al (620 ng), C₁₉-ol (521 ng). Estas concentraciones fueron definidas con el fin de obtener picos bien definidos y de tamaño acorde a los compuestos en la muestra y a la respuesta del detector del equipo. Las condiciones cromatográficas fueron similares a las descritas en 3.3.1, y el FID se mantuvo a una temperatura de 320 °C. El área de cada uno de los picos fue calculada, y referida a su correspondiente estándar interno. Los resultados se expresaron en ng de lípido/insecto. La abundancia relativa de cada uno de los compuestos se calculó como la relación entre el área del pico de interés y la suma del total de los picos correspondiente a HC, ALD o ROH, según corresponda.

Dada la evidente diferencia de tamaño en función del sexo, para el análisis de dimorfismo sexual se obtuvieron medidas del largo, ancho abdominal y espesor de hembras y machos. Para las medidas se utilizaron insectos adultos machos (n=13) y hembras (n=15) vírgenes y en auynas, de 18-20 días de edad. Los insectos recibieron una comida a replesión durante el estadio anterior.

Con estos valores se calculó la superficie aproximada de hembras y machos mediante la ecuación de una semi-elipsoide:



$$S = A1/2 + A2$$

$$A1 = 2 \cdot \pi \cdot [b^2 + (a \cdot b / e) \cdot \arcsen(e)]$$

$$A2 = \pi \cdot a \cdot b$$

$$\text{Donde } e = c/a = (1/a) \cdot \text{Raiz} [(a^2 + b^2)]$$

a: radio mayor del elipsoide

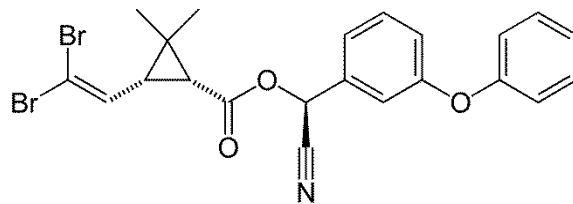
b: radio menor del elipsoide

c: altura del elipsoide

Los resultados fueron expresados como ng de lípido/mm².

3.3.3 CUANTIFICACIÓN DE DELTAMETRINA MEDIANTE CGC- μ ECD

La detección y cuantificación de la deltametrina, presente en las fracciones lipoproteicas de la hemolinfa, se realizó mediante CGC acoplada a μ ECD, operado en modo splitless a 280 °C y con una columna capilar DB-5 (J&W Scientific, EEUU), utilizando helio como gas portador. La temperatura del horno se programó desde 150 °C a 300 °C a 15 °C/min. El μ ECD se mantuvo en 320 °C. El área del pico de DLM fue calculada para cada cromatograma (HP ChemStation, Hewlett-Packard) y expresada en ng de acuerdo a la curva estándar de DLM obtenida previamente. La identidad del pico se confirmó por comparación con el del estándar de DLM, cuya fórmula molecular es la siguiente:



La presencia de Br y N en la molécula hacen que su detección por μ ECD sea más conveniente que por FID.

3.4 ANOTACIÓN DE GENES Y RELACIONES FILOGENÉTICAS

Mi trabajo de tesis se basó en un transcriptoma de tejido epidérmico de *T. infestans* obtenido previamente en este laboratorio. Para el mismo se partió de ARN total mediante secuenciación de alto rendimiento en plataforma 454 GS FLX. La identidad de las secuencias correspondientes a los genes potencialmente codificantes de FARs y de citocromo P450s del clan 4 fue asignada mediante análisis de similitud de secuencias con genes anotados previamente utilizando el programa Blast2Go (<https://www.blast2go.com/>) empleando el algoritmo BlastX. Actualmente, la información correspondiente a todas las secuencias identificadas se encuentra disponible en GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/> (BioProjects PRJNA238208 and PRJNA314811).

A partir de esta información se construyeron árboles filogenéticos de las secuencias proteicas correspondientes a los genes CYP4G y FAR de *T. infestans* y *R. prolixus*. Un árbol filogenético es un diagrama que representa las posibles relaciones evolutivas entre organismos y que permite hacer inferencias sobre ciertos aspectos de las secuencias. La construcción de los mismos se realizó mediante el programa Mega 6 (Tamura et al. 2013). Para ello se obtuvieron secuencias de aminoácidos homólogas de otros insectos mediante búsqueda en las bases de datos GenBank y VectorBase. Se incluyeron las secuencias parciales de *T. infestans* obtenidas a partir del transcriptoma de integumento. Las secuencias correspondientes al genoma de *R. prolixus* están disponibles en VectorBase (<https://www.vectorbase.org/organisms/rhodnius-prolixus>).

Las secuencias fueron alineadas mediante el algoritmo ClustalW incluido en el programa y las secuencias fueron analizadas mediante el método de máxima verosimilitud (ML), con

1000 repeticiones “Bootstrap” como forma de inferir la consistencia de las relaciones en el árbol filogenético. Se emplearon como grupos externos de las CYP4G las secuencias de *R. prolixus* (CYP4a) y de humano (CYP4v2), y para todo el clan 4 la secuencia de una CYP del clan 3 de *Rhodnius* (CYP6AI). Para el caso de las acil-CoA reductasas (FAR), se utilizaron las secuencias de proteínas FAR humanas y del crustáceo *Daphnia pulex* como grupos externos.

3.5 ANÁLISIS GÉNICOS

3.5.1 OBTENCIÓN DE LOS TEJIDOS

Los insectos se colocaron unos minutos en el freezer para adormecerlos, y luego se procedió a su disección en una caja de petri con solución salina fría (0,9 % NaCl). Se realizó un corte transversal en el tercer segmento del tórax para separar la cabeza, y en el último segmento del abdomen. Luego, se realizó un corte a lo largo de los conexivos para tener acceso al interior del insecto. Cuidadosamente se extrajo con pinza el sistema digestivo y el sistema respiratorio. Bajo lupa, se extrajo el cuerpo grasoso lentamente, con cuidado de no levantar la epidermis subyacente (Figura 3-7). Una vez que no se observaron restos de cuerpo grasoso o tráqueas, se colocó la cutícula en una caja de petri limpia.



Figura 3-7: Disección de ninfas *Rhodnius prolixus* NIV para la obtención del integumento y demás tejidos de interés. La epidermis es una monocapa de células adherida a la cutícula, el cuerpo grasoso es un tejido blancuzco que se encuentra como un entramado rodeando órganos internos, las tráqueas son formaciones de pequeño grosor que inervan todo el cuerpo del insecto.

Se agregaron 500 μ l de Trizol (Applied Biosystems, EEUU) sobre la epidermis, y muy suavemente se raspó la epidermis con una espátula. Finalmente, se recolectó la epidermis en Trizol, y se colocó en un eppendorf. Se utilizaron 500 μ l de Trizol para terminar de lavar

la cutícula y el recipiente. Se colocó el mililitro de Trizol con la epidermis recolectada en el eppendorf, y se procedió a realizar la extracción de RNA o se conservó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

También se extrajeron cuidadosamente las glándulas salivales y el cerebro junto con los ganglios ventrales (tejido nervioso) de la cabeza de los insectos. Estos órganos, así como el cuerpo graso, túbulos de Malpighi e intestinos también fueron conservados en Trizol a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ o hasta su utilización.

3.5.2 EXTRACCIÓN DE ARN

Para la extracción de ARN total, las muestras en Trizol se homogeneizaron utilizando homogenizadores mecánicos. El homogenato se centrifugó 15 minutos a 13000 rpm en centrifuga refrigerada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, para descartar restos de cutícula. Se colocó el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf, se agregaron 200 μl de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 segundos. Se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó la muestra nuevamente 15 minutos a 13000 rpm para lograr la separación de fases. Se tomaron 350 μl de la fase acuosa superior y se transfirieron a un nuevo tubo eppendorf. Se agregó 1 volumen de isopropanol, se mezcló suavemente por pipeteo y se colocó 45 minutos - 1 hora en freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación, se centrifugó la muestra 13000 rpm 15 min, y se descartó el sobrenadante. Al pellet resultante se le realizó 2 lavados con 1 ml de etanol 75 % seguidos de una centrifugación. Finalmente, se dejó evaporar el etanol y se resuspendió el RNA en 20-50 μl de agua libre de RNAsas.

El ARN obtenido se cuantificó utilizando un espectrofotómetro *Nanodrop 2000c* (Thermo, EEUU). Se registraron además los valores de los cocientes 260/280 y 260/230 para evaluar la presencia de contaminantes (proteínas y solventes, respectivamente). Se consideraron como adecuados los cocientes: $260/280 > 1,8$ y $260/230 > 1,0$.

Para determinar la integridad del ARN obtenido y la pureza del mismo, se corrió 1 μg de cada muestra en un gel 1 % de agarosa por 20 minutos a 100 V en una cuba electroforética horizontal especialmente reservada para trabajo con ARN. Tanto el buffer para preparar el gel como el utilizado durante la corrida fueron preparados con agua MiliQ estéril. Para la visualización de las bandas, el gel fue luego teñido con bromuro de etidio y observado en

un transiluminador Hoefer Macrovue UV- 20. Se tomaron fotos con una cámara Kodak DC 210 y el software Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics, EEUU). Se evaluó la presencia de las típicas bandas 28S y 18S, y sólo se trabajó con las muestras cuya corrida electroforética haya sido satisfactoria.

A modo de ejemplo, se muestra en la Figura 3-8 una corrida electroforética correspondiente a muestras de ARN de integumento y de cuerpo gordo. Este procedimiento se realizó de manera rutinaria para cada una de las muestras de ARN para evaluar la integridad del material genético obtenido y que no haya contaminación con ADN genómico. Se observan nítidamente las bandas típicas de 28S y 18S, y no se observa la presencia de contaminación con ADN genómico en el punto de siembra.

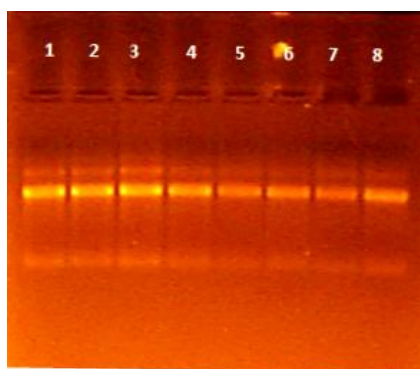


Figura 3-8: ARN extraído de integumento (calles 1, 2, 3,4) y cuerpo gordo (calles 5, 6, 7,8) a partir de insectos *Rhodnius prolixus* NV.

A continuación, se realizó un tratamiento con DNAsa (TURBO™ DNase, Ambion, EEUU) para eliminar posibles restos de ADN genómico.

ARN	1 µg
Buffer	1 µl
Enzima	0,2 µl
H2O	a completar
Volumen final	10 µl

La reacción se llevó a cabo a 37 °C por 30 minutos. A continuación, se adicionó EDTA en una concentración final de 15 mM y se continuó la reacción a 65 °C por 10 minutos, de manera de inactivar la enzima.

3.5.3 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO

Para la obtención de ADN complementario (ADNc) se utilizó el kit comercial High iScript cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante, usando 1 µg de ARN. La reacción típica de 20 se detalla a continuación:

ARN	1µg
Buffer de reacción 5X	4 µl
Enzima	1 µl
H2O	a completar
Volumen final	20 µl

La (Thermo) y el ciclado consiste típicamente en tres etapas: 5 minutos a 25 °C (unión de random primers al ARN), 20 minutos a 46 °C (síntesis de ADNc) y 1 minuto a 95 °C (inactivación de la retrotranscriptasa).

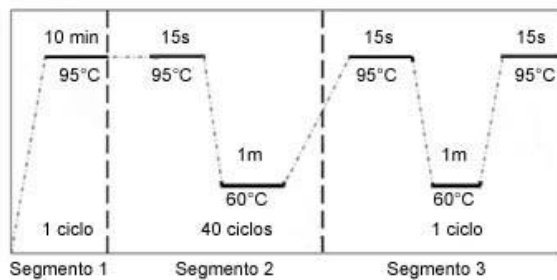
3.5.4 PCR CUANTITATIVA

Para la determinación de la cantidad relativa de transcritos (ARNm) a tiempo real a partir de ADNc (RT-qPCR). Esta técnica se basa en la detección específica del número de copias de un transcritto determinado haciendo uso de sondas específicas específicos. En este caso, se utilizó la mezcla comercial Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) que contiene todos los reactivos necesarios (dNTPs, una ADN polimerasa hot start, buffer de reacción inespecífico SYBR Green como agente intercalante). El molde para esta reacción es el ADNc, diluido 5 o 10 veces. El protocolo para una reacción típica de qPCR fue el siguiente:

Supermix 2X	7,5 µl
-------------	--------

Primer forward + Primer reverse	0,4 μ l
cDNA dilución 1/5 o 1/10	5 μ l
Volumen final	15 μ l

P (Thermo). En general, el protocolo de ciclado y de lectura de fluorescencia fue el siguiente:



En el segmento 1 se produce la activación de la ADN polimerasa y la desnaturalización del molde, el segmento 2 constituye la reacción de PCR propiamente dicha y el segmento 3 corresponde a la curva de disociación de los productos formados.

El resultado de una PCR en tiempo real se visualiza en un gráfico de amplificación, en el cual se expresa la fluorescencia detectada por el equipo en el eje de las ordenadas (ΔR_n o R_n) y el número de ciclos de la PCR en el eje de las abscisas. De esta forma, la curva de amplificación consta de una fase inicial donde la producción de fluorescencia está por debajo del nivel de detección del equipo, una segunda fase en la que se da un incremento de la fluorescencia en forma exponencial (en cada ciclo se duplica el número de copias del fragmento amplificado), y una tercera fase (meseta) donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia. En este gráfico es posible establecer un valor de fluorescencia umbral que señala la zona de aumento exponencial. Este valor se representa en el gráfico con una recta horizontal y se denomina línea Threshold o Umbral. Un parámetro fundamental en una qPCR, y en función del cual se van a realizar los ensayos de cuantificación, es el denominado Ciclo Umbral o Threshold Cycle (Ct). Este se define como el ciclo en el cual la fluorescencia supera el valor umbral. El valor del Ct se relaciona inversamente con la cantidad inicial de templado, es decir, cuanto más templado inicial tenga la muestra el valor de Ct será menor, pues será menor el número de ciclos necesarios para cruzar el umbral de fluorescencia.

La temperatura de disociación de un dímero de ácido nucleico depende de su secuencia, por lo que el análisis de las curvas de disociación obtenidas permite determinar la cantidad de productos de PCR formados durante el ciclado, como también la presencia de sub-productos indeseados o dímeros de primers. Luego de cada corrida se corrobora la calidad de las curvas de disociación obtenidas y en caso de no haber sido satisfactorias (presencia de más de un pico de disociación, dímeros de cebadores, etc.) esos resultados no se consideran.

3.5.4.1 DISEÑO, DETERMINACIÓN DE EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN Y CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS CEBADORES

A partir de las secuencias obtenidas del genoma de *R. prolixus* y del transcriptoma de *T. infestans*, se diseñaron cebadores específicos de qPCR para cada gen de interés, utilizando el programa Gene Runner. El mayor limitante en la búsqueda de cebadores es la propia secuencia, y la generación de cebadores capaces de amplificar una región específica sin generar secuencias que formen dímeros ni estructuras secundarias indeseadas, que pueden bajar la eficiencia de amplificación. Los cebadores utilizados se encuentran listados en la Tabla 1.

Tabla 1: Lista de cebadores utilizados para qPCR.

Especie	Nombre	Cebador sentido	Cebador antisentido
Genes de referencia			
<i>R. prolixus</i>	EF-1	GAT TCC ACT GAA CCG CCT TA	GCC GGG TTA TAT CCG ATT TT
<i>R. prolixus</i>	β -actina	CCA TGT ACC CAG GTA TTG CT	ATC TGT TGG AAG GTG GAC AG
<i>T. infestans</i>	β -actina	CACCCCAGCAATGTATGTAG	ACCATCAGGAAGTTCGTAAG
<i>T. infestans</i>	18S	GGCGGGGGCATTCGTATTG	ATCGCTGGCTGGCATCGTTTAT
Genes CYP4g			
<i>R. prolixus</i>	CYP4G107	CCAGGCAAGAGATCCAGGAGC	ACTGGCACCGGAGGGAAGAG
<i>R. prolixus</i>	CYP4G106	GCAAGGCCGGACATTCAAG	GCTATGATGGGCACAGGTGG
Genes CYP450 clan 4			
<i>T. infestans</i>	JAC17131	TATCTTCTTCCCAGCGCCTTCCA	AGTGAAACTGCCATGGGAAGTGA
<i>T. infestans</i>	JAS02904	ATGCGACTTTATAGCCACCTGC	TTTGGCACACTCTTCTGGCAGA

<i>T. infestans</i>	JAR98714	TGCCACTGAGTTCTAAATCCTG	GAAGCAATCCAGACATTCAGG
<i>T. infestans</i>	JAS02894	CCGGAAGTAATGCTGTTTGATCC	AAAGTTTCCGCCTATGATGCCA
<i>T. infestans</i>	JAS02902	GCCACAAGAGACAAACTTTCCG	TTGGTGCCACTTCAGGATCTTC
<i>T. infestans</i>	JAS02889	AAATGGCGATGGACTGACCG	ATCTCTTCCAGACATCGCTCCTG
<i>T. infestans</i>	JAS02888	ATACGTCCAATCGCCATGCTTC	TTTCGTGCGCGGGTTGGATAC
<i>T. infestans</i>	JAR98719	AAGGGAAGCGACCGGAAGATTG	GATAGCTGTTCCCAAGTTGGTGC
<i>T. infestans</i>	JAS02890	TCAGTGCTGGTCCCAGGAGTTG	AGGACGGCGTGGTTCAATTTG
<i>T. infestans</i>	JAR98713	CTTGATATCAGGGAAGAAGTGGGA	TTCAAGTTAGGTGGGCGATCA
<i>T. infestans</i>	JAR98715	CACGATGTAGGTAAAGGTTCTGCA	ACATGAACATGCAACACTTTACGC
<i>T. infestans</i>	JAC16640	TAAAGACGGCAGTCTCTGCAGC	GAATACGCTTCGGCAGGCTC
<i>T. infestans</i>	JAC16639	AGCCCACCATCTATCTACGCAG	CTGGACGTGACCATAAGGTTGG
<i>T. infestans</i>	JAC16638	ATCCGTGCGGCTAATATGACTG	TAATGTGTGTCGGGTTGCCAAG
<i>T. infestans</i>	JAC17089	AATGGCATCATAGGCGGAAAC	CATTGTTGCCATCACTGTCCTG
Genes FAR			
<i>T. infestans</i>	JAS01706	GATGAATGGAGCACCTTACCC	TGCCTTGAATCAAACCTAATGAG
<i>T. infestans</i>	JAS01707	AGTCTTGCTGACACTTGTGCC	TGATGGACGGACAAGATTATCC
<i>T. infestans</i>	JAR97764	TTGCAATGTCCACGGGTATGATC	TTGCCAACGAACCTACCAGTCTGC
<i>T. infestans</i>	JAR97768	CAGCTGAAGAACGACTGGAATTG	TAGAGCTGCTGCCGCATGTAC
<i>T. infestans</i>	JAR97763	CTAGAGTGAAATCAGCCTTTGCG	CCTGTACGCGGGTGGATAGAC
<i>T. infestans</i>	JAR97761	GTTACGATCATGTCCGGCTGTC	CAGCCTGACTGATACCAAGCTCC
<i>T. infestans</i>	JAS01708	TTCAGAATGGCAGGTCACCTGG	TGTTGCCAGAAAGGAAGATGATG
<i>T. infestans</i>	JAS01704	CCGGGTACTGGTTCATTCAATG	TGCTAAAGTTTGGCAGTCTGTG
<i>T. infestans</i>	JAS01703	TGATTGTGGCAGCTTGAAAG	AGGCTTAGAAATTGCTGCATTCC

La especificidad y concentración de cada par de cebadores fue evaluada por qPCR mediante curvas de calibración. Para esto, se tomaron alícuotas de cada muestra a estudiar para formar un conjunto representativo de todas las condiciones. Se obtuvieron distintas concentraciones de la muestra inicial mediante diluciones seriadas 1/5 y se utilizaron como molde las diluciones 1/5, 1/25, 1/125, 1/625 y 1/3125. Se utilizó como control negativo agua libre de nucleasas para evaluar la potencial formación de dímeros de primers. Se evaluaron los parámetros de linealidad de las rectas obtenidas para cada gen para determinar el rango dinámico de la reacción, y se obtuvo la eficiencia de PCR para cada par de cebadores.

En la figura 3-9 se muestra a modo ilustrativo las curvas de fluorescencia, curva de disociación y curva de calibración para el par de cebadores del transcripto CYP4G107. En la curva de amplificación se muestra la línea umbral establecida para el par de cebadores CYP4G107 (Figura 3-9A), en la curva de desnaturalización se observa un único fragmento de amplificación, descartando la generación de fragmentos inespecíficos o de dímeros de cebadores (Figura 3-9B). La curva de calibración indica para este par de cebadores una eficiencia del 100%, con un coeficiente de determinación R^2 de 0,99 (Figura 3-9C). Sólo se aceptaron como válidas eficiencias de entre 85 y 115, y curvas de calibración cuyo coeficiente de determinación (R^2) fuera superior a 0,99.

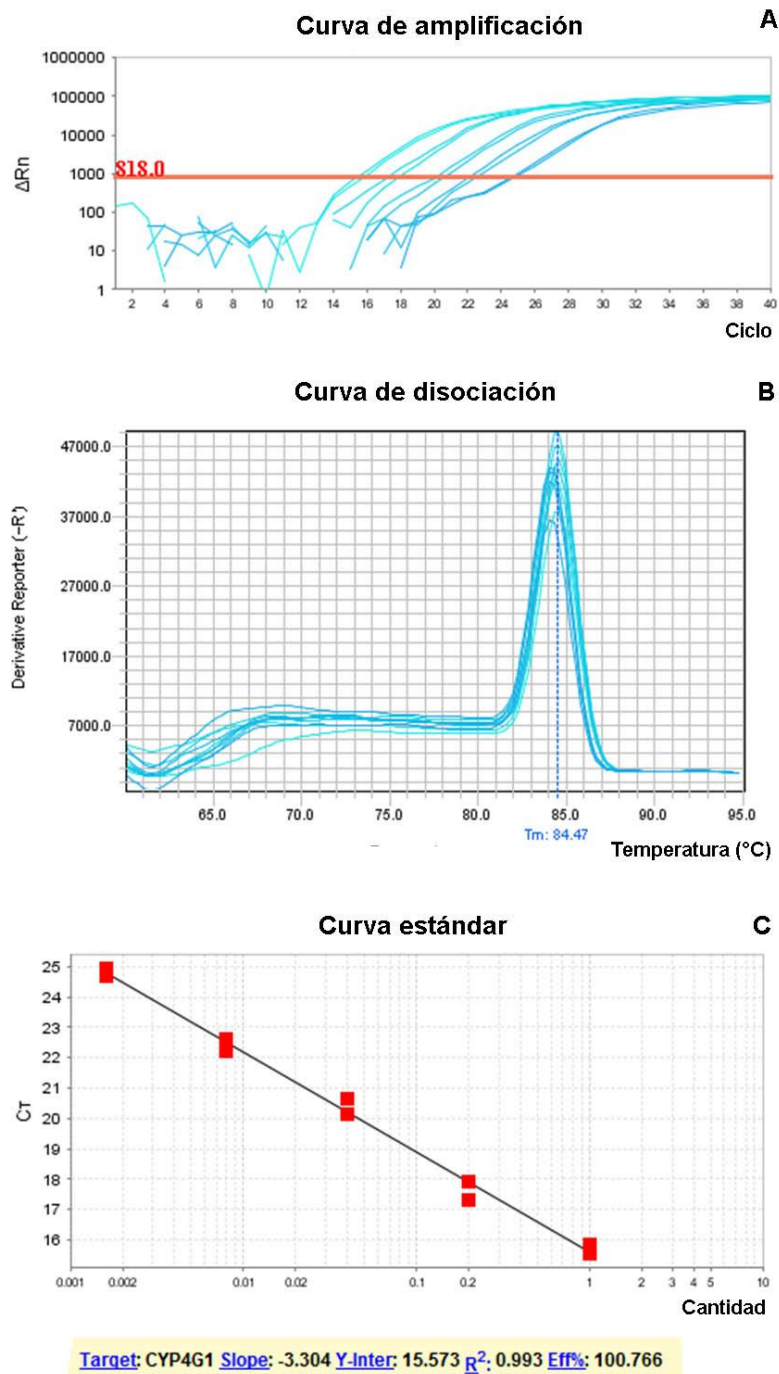


Figura 3-9: Curvas de amplificación para RT-qPCR del cebador para CYP4G107. Se muestran las curvas de fluorescencia en el tiempo (curva de amplificación), la curva de desnaturalización y la curva de calibración con los valores obtenidos.

3.5.4.2 EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES

Mediante RT-qPCR se estudió la expresión diferencial de genes de interés en distintas condiciones.

En el caso de las acil-CoA reductasas (FARs), se analizó su expresión diferencial en hembras respecto de machos, utilizando ejemplares *T. infestans* vírgenes, en las mismas condiciones que los insectos utilizados para estudiar los lípidos de la epicutícula. Para los genes correspondientes al clan 4 de las CYP450, se analizó su expresión en insectos *T. infestans* NV resistentes respecto de susceptibles. Los datos de expresión relativa se obtuvieron a partir de los valores de Ct utilizando el programa REST (versión 2009, Qiagen), que usa el método de cuantificación relativa utilizando genes de referencia (GR) (Pfaffl et al. 2002). Para realizar los cálculos se utiliza el método de $\Delta\Delta Ct$, que compara las diferencias de expresión del gen de interés en muestra control y tratado, respecto a la diferencia de expresión de los genes de referencia en muestra control y tratado. Los genes de referencia son genes que presentan un nivel de expresión constante en todas las muestras utilizadas, y por eso pueden ser utilizados como normalizadores en las muestras.

Utiliza la siguiente ecuación:

donde ER es la expresión relativa, E es la eficiencia de amplificación de los cebadores de la qPCR, ΔCt es la diferencia de Ct entre el control (en estos casos, insectos machos, o susceptibles) y el tratamiento (insectos hembras, o resistentes respectivamente), T es el gen de interés, GR es el gen de referencia. Como genes de referencia se utilizaron el 18S y la β -actina de *T. infestans*.

En el caso de las CYP4G, se estudió su perfil de expresión en cuerpo graso, integumento, túbulos de Malpighi, glándulas salivales, tejido nervioso e intestinos de *R. prolixus*. A su vez, se midió su patrón de expresión en el integumento de ninfas NV en distintas condiciones de ayuno y alimentación. Para analizar los perfiles de expresión de los genes

CYP4G, se aplicó el modelo de cantidades relativas normalizadas (NRQ), que consiste en la conversión de los valores del ciclo de cuantificación (Ct) en NRQ. Para el cálculo del NRQ, se utiliza como primer normalizador un valor promedio obtenido de todo el conjunto de muestras para obtener cantidades relativas, luego se ajustan las diferencias en la eficiencia de la PCR entre los cebadores y finalmente para la normalización de los datos se utilizan los genes de referencia (Pfaffl et al. 2002, Hellemans et al. 2007). Los valores de NRQ se obtuvieron siguiendo las fórmulas detalladas en Hellemans et al. 2007, y se graficaron en el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., EEUU). El factor de elongación 1-alfa (EF1) y la β actina de *R. prolixus* fueron usados como GR internos (Majerowicz et al. 2011, Villalobos-Sambucaro et al. 2015).

En cada caso, se emplearon tres réplicas biológicas para cada condición, y cada una de ellas se midió por duplicado.

3.5.5 SILENCIAMIENTO DE LOS GENES DE INTERÉS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ARN DE INTERFERENCIA (ARNi)

Con el fin de comenzar con el estudio de los genes CYP potencialmente involucrados en detoxificación de insecticidas (CYP4EM10 y CYP3093A11), y en la síntesis de HC (CYP4Gs), se realizó un silenciamiento génico postranscripcional mediante la técnica de RNA de interferencia (ARNi).

El ARNi es un mecanismo biológico que está ampliamente distribuido en eucariotas, mediante el cual se consigue silenciar genes mediante moléculas de ARN de doble cadena (dsARN). El silenciamiento de genes se da por la interacción de complejos enzimáticos en el citoplasma con pequeñas moléculas de ARN (siRNA), las cuales actúan sobre el ARN mensajero (ARNm) endógeno, impidiendo que sea traducido a proteína. Mediante este mecanismo, el silenciamiento del gen de interés ocurre en respuesta a la introducción de un ARN de doble cadena (dsARN) exógeno en la célula, donde ese dsRNA es clivado en pequeños fragmentos de 21-25 nt (small interfering ARNs, siARNs) por una nucleasa (Dicer). Los siARN generados se asocian con proteínas celulares formando un complejo multimérico denominado RISC (por sus siglas en inglés, RNA-induced silencing complex), a través del complejo de carga RLC (RISC loading complex). RISC contiene varias

proteínas, incluyendo una helicasa que abre la doble hebra del siARN. Luego, una de las hebras es descartada y la otra hebra se asocia al mRNA blanco y media su silenciamiento. Una endoribonucleasa también presente en el complejo, cliva el mRNA blanco. Otras de las proteínas que forman el complejo son de la familia Argonauta (AGO), que sirven para guiar el complejo al mRNA blanco, tal como se muestra en la Figura 3-10 (Barnard et al. 2012)

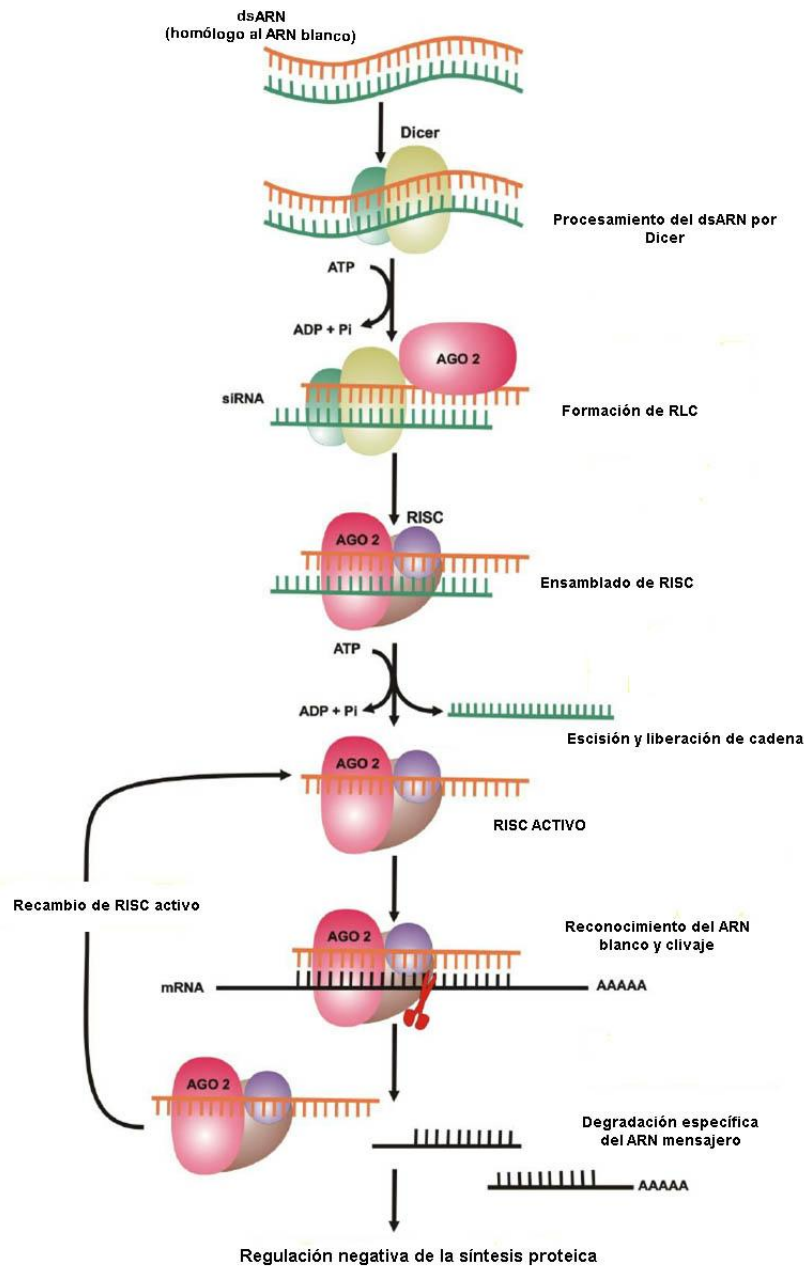


Figura 3-10: Esquema del mecanismo de acción de la degradación génica mediante RNA de interferencia. Modificado de Barnard et al. 2012.

3.5.5.1 SÍNTESIS DE ARNs DE DOBLE CADENA E INYECCIÓN EN LOS INSECTOS

Para la obtención del ARN de interferencia, se utilizó el kit comercial Megascript RNAi kit (Ambion, EEUU). Según las recomendaciones del fabricante, los fragmentos de dsARN que se utilizan en experimentos de RNAi son típicamente de 400 pares de bases (pb) o incluso mayores, siendo 200 pb el tamaño mínimo de dsRNA recomendado.

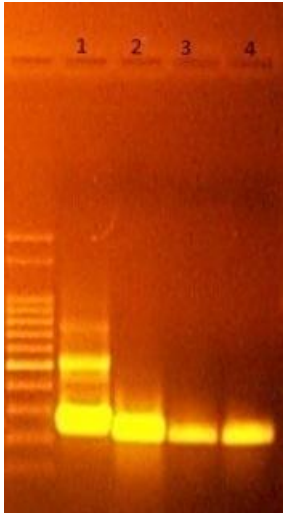
En primer lugar se diseñaron primers específicos para las secuencias de interés (CYP4G106 y CYP4G107 de *R. prolixus* y CYP4EM10 y CYP3093A11 de *T. infestans*) utilizando el programa Gene Runner de una longitud entre 200 y 400pb, con la secuencia correspondiente al sitio promotor de la T7 flanqueando dicha secuencia. Además de las consideraciones básicas que se tienen en cuenta para el diseño de cualquier par de cebadores, en el caso de silenciamientos mediante ARNi el fragmento dsARN debe ser específico del gen blanco, es decir, debe ser capaz de lograr un silenciamiento únicamente del transcripto de interés y no de otros transcriptos. Es por eso que una vez elegido el par de cebadores que cumplan los criterios establecidos en el programa Gene Runner, se debe llevar a cabo la síntesis de dsARN y a continuación una prueba de silenciamiento para confirmar que la introducción de dicho fragmento de dsARN fue capaz de silenciar el gen de interés.

Los cebadores utilizados se listan en la Tabla 2.

Tabla 2: Lista de cebadores utilizados para silenciamiento génico mediante ARNi.

Especie	Nombre	Cebador sentido	Cebador antisentido
<i>R. prolixus</i>	dsCYP4G107	AATACGACTCACTATAGGGAGACATG GAAACTCTGCGGCTCTTC	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGCCAA ACTGCTGACGACCAC
<i>R. prolixus</i>	dsCYP4G106	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGG ATGACAACGATGTCGGTG	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGATGGG CACAGGTGGGTATAGC
<i>R. prolixus</i>	dsCYP4G106*	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACT GGCATGTTGATGACGCTG	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGTACTC GGGTGCCTTGTCG
<i>T. infestans</i>	dsCYP3093A11	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGA ACAATTAGATATTTTAGGA	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGATAG AATTCATGTGGATGTGTCCA
<i>T. infestans</i>	dsCYP4EM10	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGAT TGCTCCAAGTTGGTACAG	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGGACA GGAATTCATAAATGC

Mediante varias reacciones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo final, se obtuvo el molde de ADN para la síntesis de la doble hebra de ARN. Para la síntesis de cada dsRNA, se llevaron a cabo todos los pasos especificados en el kit. Una manera de ir analizando el resultado de cada uno de los pasos de reacción, es su análisis mediante una corrida en un gel de agarosa al 10 %, como se ejemplifica en la siguiente figura para un fragmento dsARN de 250 pb.



Paso 1: Reacción de transcripción

Paso 2: Generación de la doble hebra de ARN.

Paso 3: Digestión con nucleasas para remover restos de ADN y ARN simple cadena.

Paso 4: Purificación del dsARN y resuspensión en buffer adecuado.

Se cuantificó la cantidad de dsRNA obtenida para cada gen de interés, y se corroboró la integridad del fragmento sintetizado mediante corrida electroforética en gel de agarosa (paso 4) utilizando marcadores moleculares para confirmar el tamaño del mismo.

El método utilizado de introducción de dsARN en el insecto fue mediante inyección de 1 μ l de solución (concentración de doble hebra entre 0.8-1,2 μ g/ μ l, dependiendo el gen a silenciar) con jeringa Hamilton de 10 μ l en el abdomen de los insectos.

Para el silenciamiento de genes CYP de detoxificación, se utilizaron insectos *T. infestans* NIV R y S; en el caso del silenciamiento de genes CYP4Gs, se utilizaron *R. prolixus* NIV. Los insectos fueron inyectados a los 7 días luego de la muda y en condiciones de ayuno. Como control negativo, el kit comercial dispone de una solución dsControl (dsCTR) para ser inyectada en los insectos controles. Dicha secuencia codifica para un gen bacteriano, que está ausente en eucariotas.

3.5.5.2 EFICIENCIA DEL SILENCIAMIENTO

Los insectos inyectados fueron alimentados y disectados cuatro días después. El grado de silenciamiento fue analizado en el integumento de insectos inyectados con el dsARN específico y el dsControl, mediante PCR cuantitativa (RT-qPCR). A su vez, en cada caso se estudió la expresión génica de genes con alta homología de secuencia con el gen de interés de manera de descartar un silenciamiento indeseado, y en el caso de los genes CYP3093A11 y CYP4EM10, evaluar la respuesta frente al silenciamiento de los otros miembros de las subfamilias estudiadas. Cada muestra consistió en el extracto de ARN de integumento de 4 insectos. Se analizaron 3 réplicas biológicas independientes, y cada medición por duplicado. En análisis estadístico del silenciamiento se realizó con el software REST (versión 2009, Qiagen) (Pfaffl et al. 2002)

3.6 CARACTERIZACIÓN DE FENOTIPOS RESULTANTES DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO

3.6.1 COMPOSICIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HIDROCARBUROS

A fin de determinar los efectos del silenciamiento génico de los transcritos CYP4G en la biosíntesis de los HC cuticulares, se estudiaron los fenotipos de insectos *R. prolixus* NV que habían sido previamente silenciados en el estadio anterior mediante inyección con dsCYP4G107 y dsCYP4G106. Se extrajeron con hexano los lípidos epicuticulares e internos de los insectos silenciados y controles con 24 hs de muda. Para los lípidos epicuticulares, se realizaron dos extracciones de 3 minutos cada una, y una extracción final de 1 minuto. A continuación, esos insectos fueron sumergidos en hexano durante 24 hs para la remoción de los lípidos internos, principalmente provenientes del integumento y la hemolinfa. La separación de los HC de cada uno de los extractos obtenidos se realizó mediante cromatografía en columna y TLC, tal como se describió en la sección 3.2.1.1 y 3.2.1.2.

Para el análisis y cuantificación de HC, se utilizó docosano (C₂₂) como estándar interno. Las muestras fueron analizadas utilizando el equipo de CGC-MS anteriormente descrito. Se analizaron los extractos obtenidos para analizar la identidad de los compuestos. Las

cuantificaciones se realizaron con 5 réplicas biológicas independientes de 4 insectos cada una, mediante CGC-FID.

3.6.2 BIOENSAYOS DE TOLERANCIA FRENTE A CONDICIONES DE BAJA HUMEDAD RELATIVA

Dado el rol de los HC cuticulares como barrera a la pérdida de agua, se estudió el efecto del silenciamiento de los genes CYP4Gs sobre la supervivencia de los insectos en condiciones de baja humedad. Se colocaron grupos de 10 ejemplares *R. prolixus* NV silenciados con dsCYP4G107 o dsCYP4G106, en una estufa con condiciones de humedad relativa entre 4-10 %, y 34°C de temperatura. Se registró la mortalidad de los distintos grupos cada 24 horas durante un período de 30 días. Como controles, se utilizaron insectos inyectados con dsCTR así como también insectos sin inyectar. El ensayo se realizó por triplicado en cada uno de los casos.

3.6.3 BIOENSAYOS DE MORTALIDAD POR APLICACIÓN TÓPICA CON DELTAMETRINA

Se estudió el efecto del silenciamiento de los genes de detoxificación CYP4EM10 y CYP3093A11 que se encuentran sobreexpresados en los insectos resistentes de nuestra colonia frente a aplicación tópica con deltametrina. Los insectos *T. infestans* NV tratados (dsCYP3093A11 o dsCYP4EM10) y control (dsCTR) fueron topicados en los abdómenes ventrales con una dosis de deltametrina en acetona de 100ug/insecto. Esta dosis fue estimada para insectos NV según datos reportados en bibliografía y análisis previos del laboratorio (Germano 2012). Se registraron las mortalidades a las 24, 48 y 72 hs luego de la aplicación tópica. Se realizaron tres réplicas independientes de 10 insectos cada una.

3.7 ESTUDIOS HISTOMORFOLÓGICOS Y DE INMUNOFLUORESCENCIA

Para llevar a cabo los ensayos histológicos, se obtuvieron criosecciones a partir de disecciones del integumento de insectos *T. infestans* NV. Para ello, se fijaron los integumentos con paraformaldehído 4 % en buffer fosfato salino (PBS) y se realizaron pasajes seriados en soluciones de concentración creciente de sacarosa en PBS para

crioconservar el tejido. A continuación se embebieron en el medio de inclusión apropiado y se congelaron con nitrógeno líquido. Se realizaron secciones de 8 μm con un criostato Leica CM1510 (Leica Microsystems), y las mismas se colocaron en portaobjetos tratados con poli-lisina 0,01 %. Para los estudios histo-morfológicos, las secciones de integumento se colorearon con hematoxilina o con Oil Red O y posteriormente se analizaron mediante microscopía óptica (Nikon TE 2000U).

La localización de lipoforina en el integumento se realizó por inmunofluorescencia directa. Para ello, las criosecciones de integumento se incubaron con un anticuerpo anti lipoforina conjugado con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC). Los núcleos se colorearon con el marcador fluorescente DAPI y las secciones se analizaron en un microscopio láser confocal (Olympus FV300). Las imágenes se adquirieron y procesaron con los software FluoView FV1000.

Estos ensayos fueron realizados bajo la dirección de la Dra. Lilian Canavoso durante una estadía en la Universidad Nacional de Córdoba (Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología).

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias entre medias de las cantidades cuantificadas de ROH, ALD e HC en la epicutícula de los insectos, así como los valores NRQ correspondientes a la expresión de los genes de interés, fueron determinadas empleando el software GraphPad Prism versión 5.01, mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido por el post-test de Tukey, o análisis del test de t de Student, según el grupo de datos analizado.

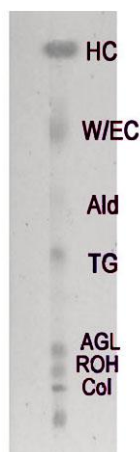
Para el análisis estadístico de los datos de qPCR entre tratamientos y controles se utilizó el software REST 2009 (Qiagen, Alemania), que evalúa las diferencias entre los valores de expresión relativa.

RESULTADOS

4 SECCIÓN I: LÍPIDOS CUTICULARES Y TRANSPORTE DE DELTAMETRINA

4.1 COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA CUTÍCULA DE *T.INFESTANS* RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES A DELTAMETRINA

En la Figura 4-1 se muestra un análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de lípidos de la epicutícula de hembras *T. infestans* extraídos con hexano. Se observa tanto la presencia de hidrocarburos (HC) como de ceras (W), ésteres de colesterol (EC), aldehídos (ALD), triglicéridos (TG), ácidos grasos libres (AGL), alcoholes grasos (ROH) y esterol/colesterol (COL). En el punto de siembra quedan retenidos mono y diglicéridos.



4-1: Perfil de TLC de lípidos epicuticulares de adultos *Triatoma infestans*.

Se observa que los HC son el componente mayoritario; la identidad y proporciones relativas de los HC de esta fracción ya han sido reportadas (Juárez and Calderón-Fernández 2007). Se seleccionaron ALD y ROH para su posterior análisis por compartir una ruta biosintética común con los HC, tal como se muestra en la Figura 1-7. Además, el estudio de la fracción ROH es importante por el rol previamente reportado de ciertos componentes como feromonas sexuales de contacto, así como también por su abundancia relativa en adultos (Juárez and Calderón-Fernández 2007, Cocchiararo-Bastias et al. 2011). Análisis previos en este laboratorio no evidenciaron diferencias en W, TG y AGL en insectos resistentes (datos no publicados).

Se realizó una primera aproximación para el estudio de estos componentes al analizar mediante cromatografía gaseosa un extracto total de epicutícula de hembra extraído con

hexano (Figura 4-2). Se trata de una muestra compleja de componentes carbonados, donde varios componentes de interés co-eluyen en un mismo tiempo de retención.

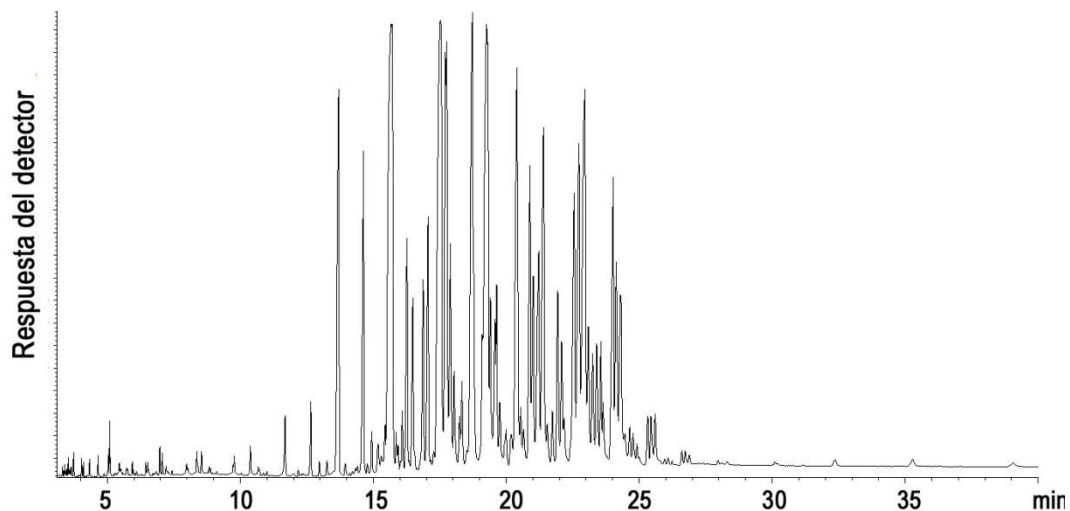


Figura 4-2: Perfil cromatográfico de un extracto epicuticular de lípidos totales de hembra *Triatoma infestans*.

La separación por columna con los solventes utilizados permitió la separación de los compuestos de interés, como se muestra en la TLC de la Figura 4-3. En la fracción 1 se observa la presencia de HC como único componente, la fracción 2 contiene W y ALD, y la fracción 3 ROH.

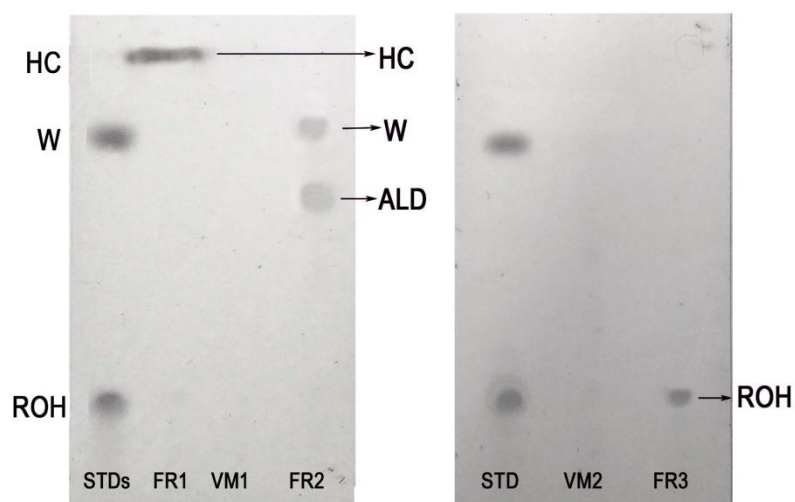


Figura 4-3: Perfil de TLC de lípidos epicuticulares de adultos *Triatoma infestans* luego de su fraccionamiento por columna con el protocolo descrito en la sección 3.2.1.1. FR: fracción, VM: volumen muerto, STD: estándar.

En la Figura 4-4 puede verse el perfil cromatográfico correspondiente a la FR2. El análisis por CGC-MS mostró una serie continua de aldehídos de cadenas de número par de carbonos, de 24C a 34C. El C₃₀-al es el aldehído mayoritario, representando aproximadamente un 40% de los aldehídos totales, seguido del C₃₂-al (30%) y el C₂₈-al (20%). El C₂₆-al y el C₃₄-al son los aldehídos minoritarios, representando entre un 5 y 7% de la muestra. No se identificaron cadenas ramificadas. Este perfil se observó tanto en insectos resistentes como susceptibles. En la Figura 4-4 se muestra el C₁₆-al en rojo, utilizado como estándar interno para las cuantificaciones. En ésta fracción también eluyen las ceras, a mayores tiempos de retención. Dicha fracción no fue analizada en el marco de este trabajo de tesis.

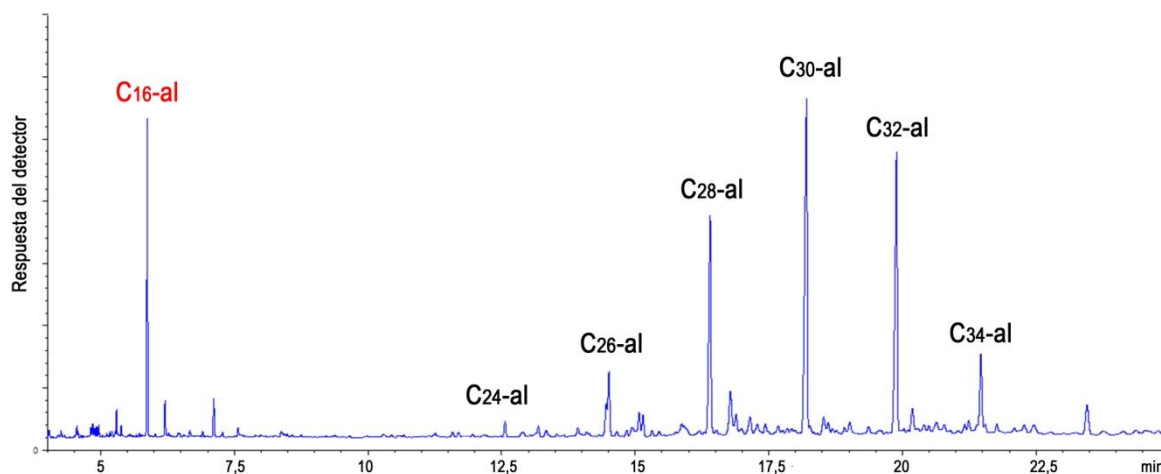


Figura 4-4: Perfil de aldehídos de *Triatoma infestans* hembras obtenidos a partir de un extracto de epicutícula fraccionado por columna, y analizado por CGC-MS. En rojo se muestra el C₁₆-al, utilizado como estándar interno.

La abundancia relativa y el análisis cuantitativo por CGC-FID de cada uno de los compuestos se muestran en la Tabla 1 y en la Figura 4-5. La cantidad total de ALD fue de 1104 ± 257 ng/insecto y 1263 ± 373 ng/insecto en hembras R y S respectivamente, no registrándose diferencias significativas entre ellos ($P > 0,05$). El análisis de cada uno de los aldehídos tampoco registró diferencias significativas R/S.

Tabla 1: Abundancia relativa y cuantificación absoluta de los aldehídos presentes en hembras resistentes (R) y susceptibles (S) a deltametrina mediante CGC-FID. Se indica el KI para cada componente así como los iones diagnóstico que permitieron su identificación por CGC-MS.

ALD	KI	Iones diagnóstico (m/z)	Abundancia relativa (%)		Cuantificación (ng/insecto ± SD)	
			R	S	R	S
C ₂₄ -al	2636	43, 57, 71, 82, 96, 111, 334, 352	1	1	10,2 ± 2,7	11,4 ± 3,5
C ₂₆ -al	2831	43, 57, 71, 82, 96, 111, 362, 380	5	7	49,9 ± 18,4	82,5 ± 12,9
C ₂₈ -al	3036	43, 57, 71, 82, 96, 111, 390, 408	18	21	195,0 ± 91,1	266,3 ± 81,8
C ₃₀ -al	3247	43, 57, 71, 82, 96, 111, 418, 436	42	35	475,8 ± 86,6	451,5 ± 142,6
C ₃₂ -al	3461	43, 57, 71, 82, 96, 111, 446, 464	29	29	314,1 ± 72,8	364,9 ± 121,2
C ₃₄ -al	3669	43, 57, 71, 82, 96, 111, 474, 492	6	8	68,4 ± 19,8	98,6 ± 39,7

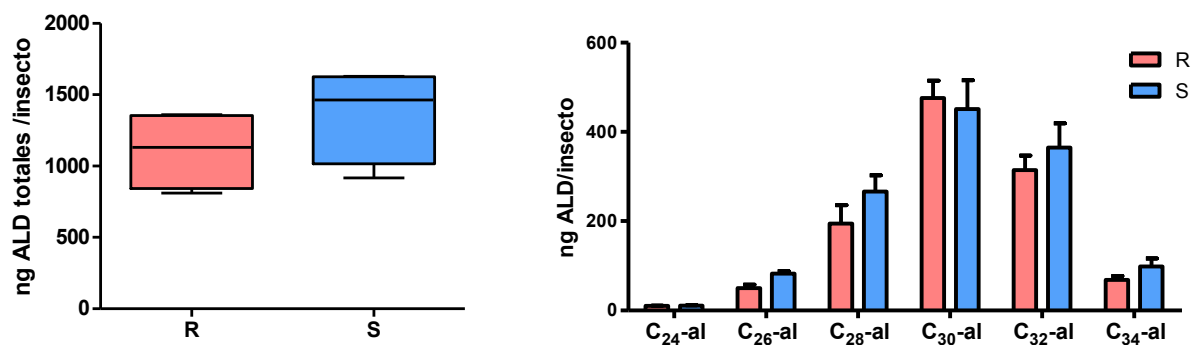


Figura 4-5: Cuantificación de aldehídos totales e individuales en la epicutícula de hembras R y S. La cantidad de aldehído se expresa en nanogramos (ng) por insecto. Los datos se muestran como media ± SD. No se observan diferencias significativas (Test de Student).

En la Figura 4-6 se muestra el perfil cromatográfico de ROH, con la identificación de cada uno de los compuestos según sus patrones de fragmentación en el CGC-MS. Predominan los alcoholes de longitudes de cadena par, de 20 a 34 carbonos. No se detectaron ROH ramificados. El perfil cromatográfico es similar en hembras R y S, donde el alcohol mayoritario es el C₃₀-ol, seguido de C₃₂-ol y C₂₈-ol. En rojo se encuentra el C₁₉-ol, utilizado como estándar interno para llevar a cabo las cuantificaciones posteriores.

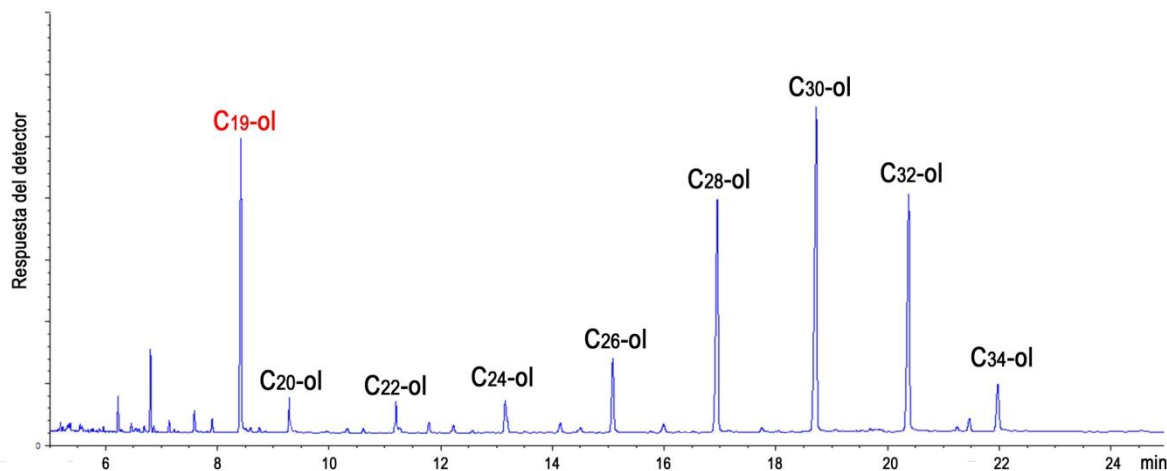


Figura 4-6: Perfil de alcoholes grasos de *Triatoma infestans* hembras obtenidos a partir de un extracto de epicutícula fraccionado por columna, y analizado por CGC-MS. En rojo se muestra el C₁₉-ol utilizado como estándar interno.

La abundancia relativa y la cantidad de cada uno de los alcoholes grasos presentes en las muestras R y S se determinaron por CGC-FID y se indica en la Tabla 2 y en la Figura 4-7. Las hembras R contienen una cantidad total de alcoholes de $1413,5 \pm 402,38$ ng/insecto, y las hembras S $1432,6 \pm 233,9$ ng/insecto. Estas diferencias no son significativas ($P > 0,05$). El análisis de cada uno de los alcoholes tampoco evidenció diferencias en hembras R respecto de S.

Los alcoholes C₂₀-ol y C₂₂-ol en las muestras analizadas se registraron en muy variables cantidades, incluso en algunas muestras con valores muy bajos. Estos compuestos son los alcoholes de menor longitud de cadena detectados, y corresponden a $<5\%$ del total de los alcoholes de la muestra. Los distintos pasos de fraccionamiento pueden ocasionar pérdidas de material, que en el caso de compuestos presentes en muy bajas cantidades relativas dentro de la muestra, dificultan su cuantificación precisa. Dado el interés específico en la cuantificación de dichos compuestos por su rol demostrado como feromona sexual de

contacto, el análisis de los mismos se realizó mediante previa derivatización y análisis por HS-SPME, como se describe más adelante.

Tabla 2: Abundancia relativa y cuantificación absoluta de los alcoholes grasos presentes en hembras resistentes (R) y susceptibles (S) a deltametrina mediante CGC-FID. SE indica el KI para cada componente así como los iones diagnóstico que permitieron su identificación por CGC-MS.

ROH	KI	Iones diagnóstico (m/z)	Abundancia relativa (%)		Cuantificación (ng/insecto \pm SD)	
			R	S	R	S
C ₂₄ -ol	2700	43, 55, 69, 83, 97, 111, 308, 336	3	2	38,8 \pm 10,3	27,9 \pm 1,9
C ₂₆ -ol	2904	43, 55, 69, 83, 97, 111, 336,364	6	6	86,16 \pm 38,4	80,1 \pm 24,6
C ₂₈ -ol	3104	43, 55, 69, 83, 97, 111, 364, 392	22	20	314,6 \pm 112,6	280,2 \pm 54,1
C ₃₀ -ol	3313	43, 55, 69, 83, 97, 111, 392, 420	40	36	586,3 \pm 161,8	515,6 \pm 78,1
C ₃₂ -ol	3518	43, 55, 69, 83, 97, 111, 420,448	23	30	328,2 \pm 107,2	436,3 \pm 135,7
C ₃₄ -ol	3724	43, 55, 69, 83, 97, 111, 448,476	4	6	59,6 \pm 25,4	92,5 \pm 28,1

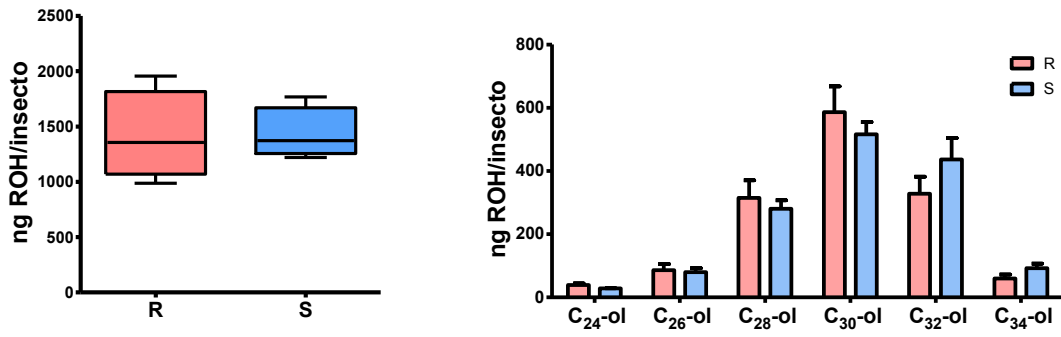
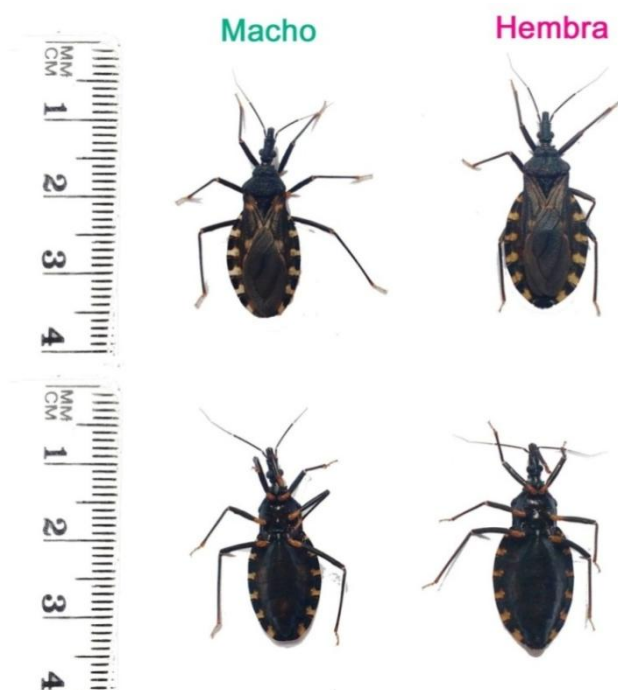


Figura 4-7: Cuantificación de alcoholes grasos presentes en la epicutícula de hembras R y S. La cantidad de alcoholes se expresa en nanogramos (ng) por insecto. Los datos se muestran como media \pm SD. No se registran diferencias significativas entre hembras y machos (Test de Student).

4.2 DIMORFISMO SEXUAL EN LOS LÍPIDOS DE LA CUTÍCULA DE *T. INFESTANS*

Se realizó el análisis comparativo de HC, ALD y ROH presente en la epicutícula de hembras y machos resistentes.



Dado que existe un marcado dimorfismo sexual en cuanto al tamaño de los insectos, se estimó un valor aproximado de la superficie correspondiente a hembras y machos. A ese fin, se utilizó la ecuación de un semi-elipsoide, como se describe en Materiales y Métodos. Se registró una superficie de $579 \text{ mm}^2 \pm 40,5$ en las hembras y $468 \text{ mm}^2 \pm 35,7$ en los machos, evidenciando diferencias significativas ($P < 0,01$) entre ellos (Test de Student).

El análisis de los compuestos lipídicos se refirió tanto por

En la Figura 4-8 se muestra el perfil cromatográfico de los HC. Como ya se describió en introducción, se observa una serie de HC lineales e impares de 25 a 33C, junto con una gran cantidad de HC mono, di y tri- metil ramificados.

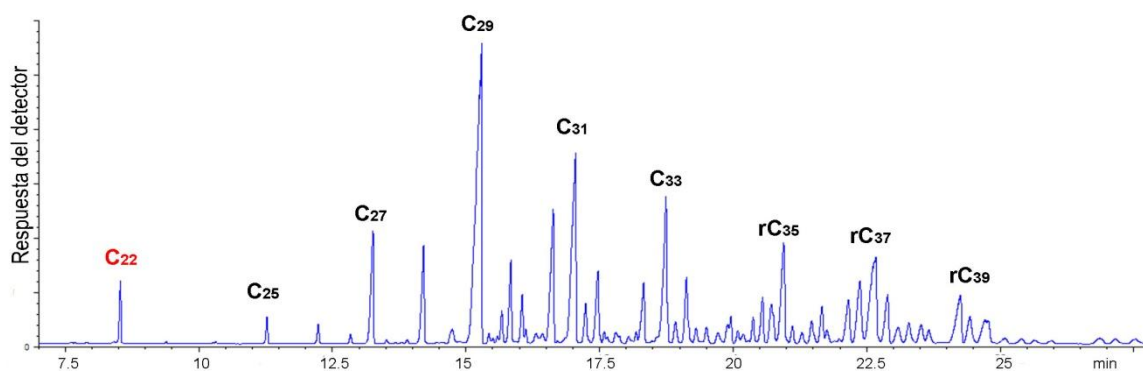


Figura 4-8: Perfil cromatográfico de HC epicuticulares extraídos con hexano de hembras *Triatoma infestans*. En rojo se indica el C22, utilizado como estándar interno para las cuantificaciones.

En la tabla 3 y la figura 4-9 se muestra la abundancia relativa de cada componente HC así como su cuantificación. El análisis en la cantidad de HC totales por insecto no mostró diferencias significativas entre machos y hembras. El análisis de los HC mayoritarios tampoco detectó diferencias significativas.

Tabla 3: Abundancia relativa y cuantificación absoluta de los HC presentes en machos y hembras resistentes mediante CGC-FID. Se indica el KI para cada componente lineal o el rango de KI para componentes ramificados.

HC	KI	Abundancia relativa (%)		Cuantificación (ng/insecto \pm SD)		Cuantificación (ng/mm ² \pm SD)	
		Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho
C ₂₅	2500	1	1	89,3 \pm 25,1	73,4 \pm 22,6	0,26 \pm 0,07	0,24 \pm 0,07
C ₂₇	2700	2	3	317,8 \pm 101,1	324,5 \pm 74,1	0,91 \pm 0,29	1,06 \pm 0,24
C ₂₉	2900	16	17	2035,7 \pm 257,9	1976,9 \pm 285,3	5,82 \pm 0,74	6,44 \pm 0,93
C ₃₁	3100	8	7	1011,3 \pm 142,5	839,9 \pm 208,6	2,89 \pm 0,41	2,74 \pm 0,68
C ₃₃	3300	6	6	787,7 \pm 113,8	758,2 \pm 161,6	2,25 \pm 0,33	2,47 \pm 0,53
rC ₃₅	3530-3605	8	8	998,2 \pm 154,3	957,5 \pm 73,6	2,85 \pm 0,44	3,12 \pm 0,24
rC ₃₇	3733-3808	13	13	1650,8 \pm 311,6	1515,3 \pm 145,5	4,72 \pm 0,89	4,94 \pm 0,47
rC ₃₉	3932-4003	7	7	951 \pm 198	860,9 \pm 142,9	2,72 \pm 0,57	2,8 \pm 0,47

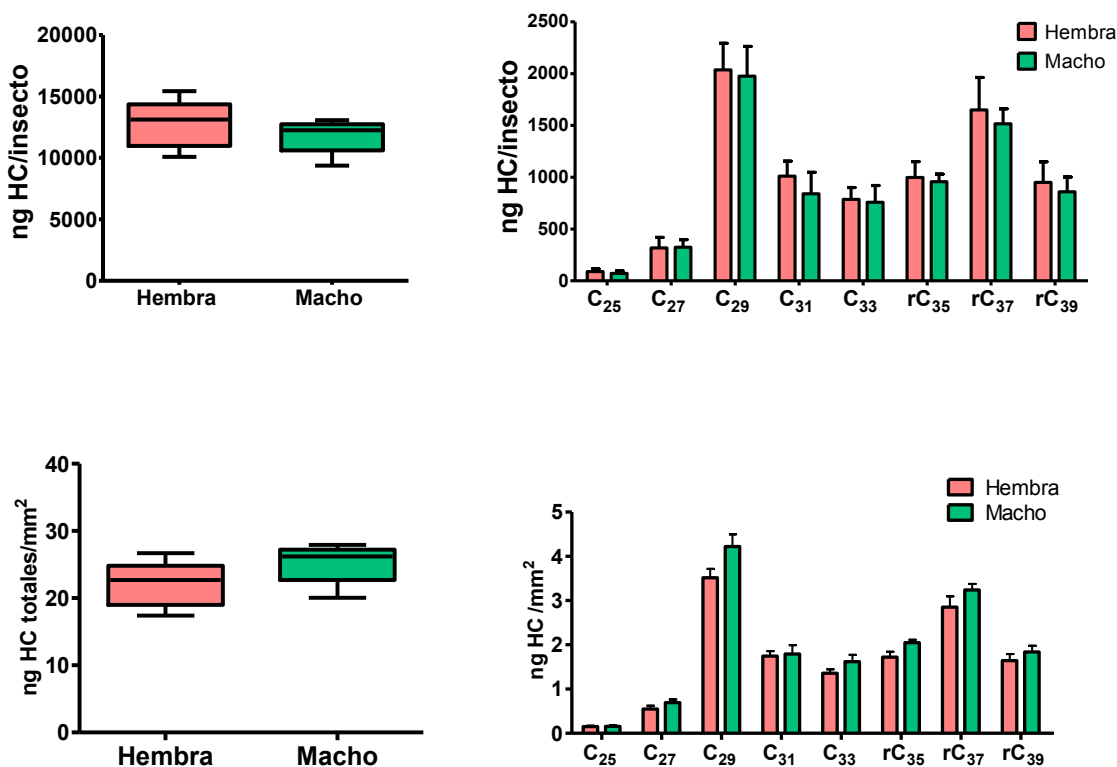


Figura 4-9: Cuantificación de HC epicuticulares totales entre ejemplares hembra y macho *Triatoma infestans*, y cuantificación individual entre los HC mayoritarios. Las concentraciones se expresan en ng/insecto (arriba) o ng/mm² (abajo). Los datos se muestran como media ± SD. No se observan diferencias significativas (Test de Student).

Al analizar los aldehídos presentes en la epicutícula de los insectos (Tabla 4 y Figura 4-10), se registró una cantidad significativamente mayor de aldehídos totales en las hembras con respecto a los machos ($P < 0,05$). Analizando los aldehídos individualmente, se observa una tendencia a un menor contenido de todos los componentes en los machos, pero únicamente el C₃₀-al presenta diferencias significativas con respecto a las hembras ($P < 0,05$). Referidos por superficie, y considerando el mayor tamaño de las hembras, no se registran diferencias significativas en los aldehídos totales, pero sí en el C₃₀-al.

Tabla 4: Abundancia relativa y cuantificación absoluta de los ALD presentes en machos y hembras resistentes mediante CGC-FID. Se indica el KI para cada componente.

ALD	KI	Abundancia relativa (%)	Cuantificación (ng/insecto ± SD)	Cuantificación (ng/mm ² ± SD)
-----	----	-------------------------	----------------------------------	------------------------------------------

		Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho
C ₂₄ -al	2636	1	1	10,2 ± 2,7	9,9 ± 2,9	0,01±0,002	0,01±0,003
C ₂₆ -al	2831	5	7	49,9±18,4	61,8±36,5	0,09±0,03	0,1±0,03
C ₂₈ -al	3036	18	21	195,0±91,0	191,8±117,5	0,34±0,16	0,31±0,13
C ₃₀ -al	3247	43	38	475,8±86,6	355,9±232,7	0,82±0,15	0,56±0,26
C ₃₂ -al	3461	29	28	314,7±72,8	258,8±160,8	0,54±0,13	0,42±0,21
C ₃₄ -al	3669	6	6	68,4±19,8	59,8±39,3	0,12±0,03	0,1±0,05

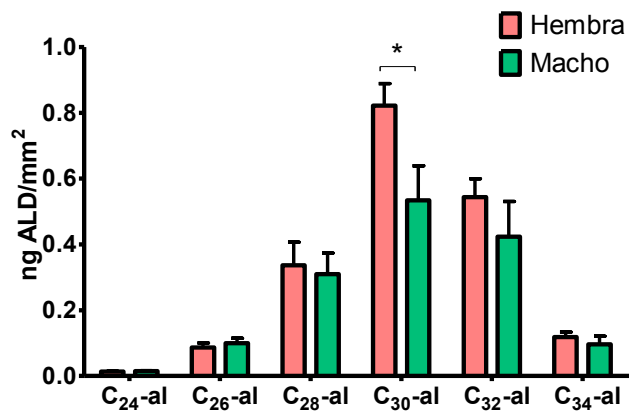
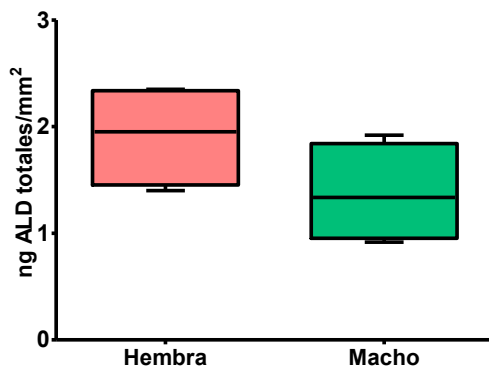
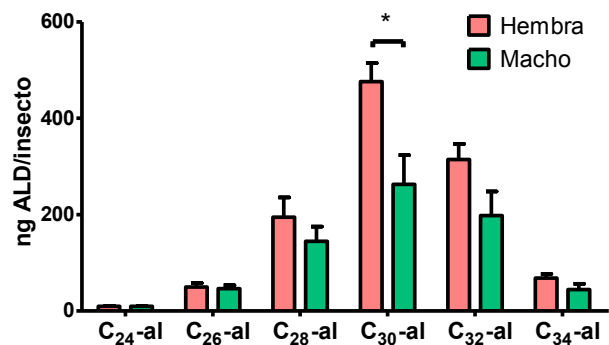
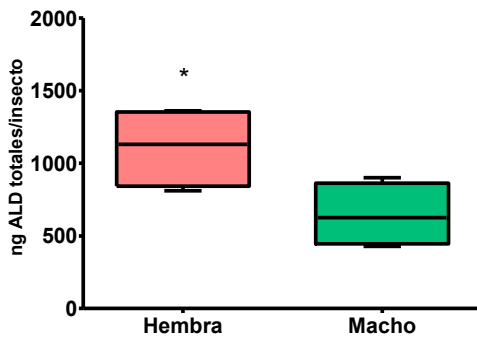


Figura 4-10: Análisis de aldehídos epicuticulares total e individualmente entre ejemplares hembra y macho *Triatoma infestans*. Las concentraciones se expresan en ng/insecto (arriba) o ng/mm² (abajo). Los datos se muestran como media ± SD. El asterisco * por encima de las barras indica diferencias significativas P < 0,05 en el contenido entre hembras y machos (Test de Student).

El análisis de los alcoholes grasos totales (Tabla 5 y Figura 4-11) muestra que los machos contienen $1764,1 \pm 318,4$ ng/insecto mientras que las hembras $1413,5 \pm 402,4$ ng/insecto, evidenciando una diferencia en función del sexo, aunque no significativo. El análisis individual de cada uno de los componentes indica que los compuestos de mayor longitud de cadena, C₃₂-ol y C₃₄-ol, se encuentran significativamente aumentados en los machos ($P < 0,01$). Como se comentó anteriormente, el contenido de C₂₀-ol y el C₂₂-ol en las hembras resultó muy variable, por lo que no se incluyen aquí; su cuantificación se realizó por HS-SPME (sección 4.2.1). Estos compuestos son casi indetectables en los machos mediante esta metodología.

El análisis por superficie muestra que los machos contienen $3,8 \pm 0,6$ ng/mm² mientras que en las hembras se cuantificaron $2,4 \pm 0,7$ ng/mm². Estas diferencias por unidad de superficie son significativas, tanto en el contenido total de alcoholes ($P < 0,05$), como en el contenido de de C₃₂-ol y C₃₄-ol ($P < 0,01$).

Tabla 5: Abundancia relativa y cuantificación absoluta de los ROH presentes en machos y hembras resistentes mediante CGC-FID. Se indica el KI para cada componente.

ROH	KI	Abundancia relativa (%)		Cuantificación (ng/insecto \pm SD)		Cuantificación (ng/mm ² \pm SD)	
		Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho
C ₂₄ -ol	2700	3	2	$38,8 \pm 10,3$	$36,1 \pm 21,2$	$0,07 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,05$
C ₂₆ -ol	2904	6	6	$86,2 \pm 38,4$	$98,9 \pm 46,8$	$0,15 \pm 0,06$	$0,21 \pm 0,10$
C ₂₈ -ol	3104	22	22	$314,6 \pm 112,6$	$379,9 \pm 107,3$	$0,54 \pm 0,16$	$0,82 \pm 0,22$
C ₃₀ -ol	3313	40	37	$586,3 \pm 161,8$	$654,8 \pm 167,5$	$1,01 \pm 0,28$	$1,40 \pm 0,36$
C ₃₂ -ol	3518	23	28	$328,2 \pm 107,2$	$495,1 \pm 22,8$	$0,57 \pm 0,18$	$1,05 \pm 0,05$
C ₃₄ -ol	3724	4	6	$59,6 \pm 25,4$	$99,2 \pm 12,2$	$0,11 \pm 0,04$	$0,21 \pm 0,03$

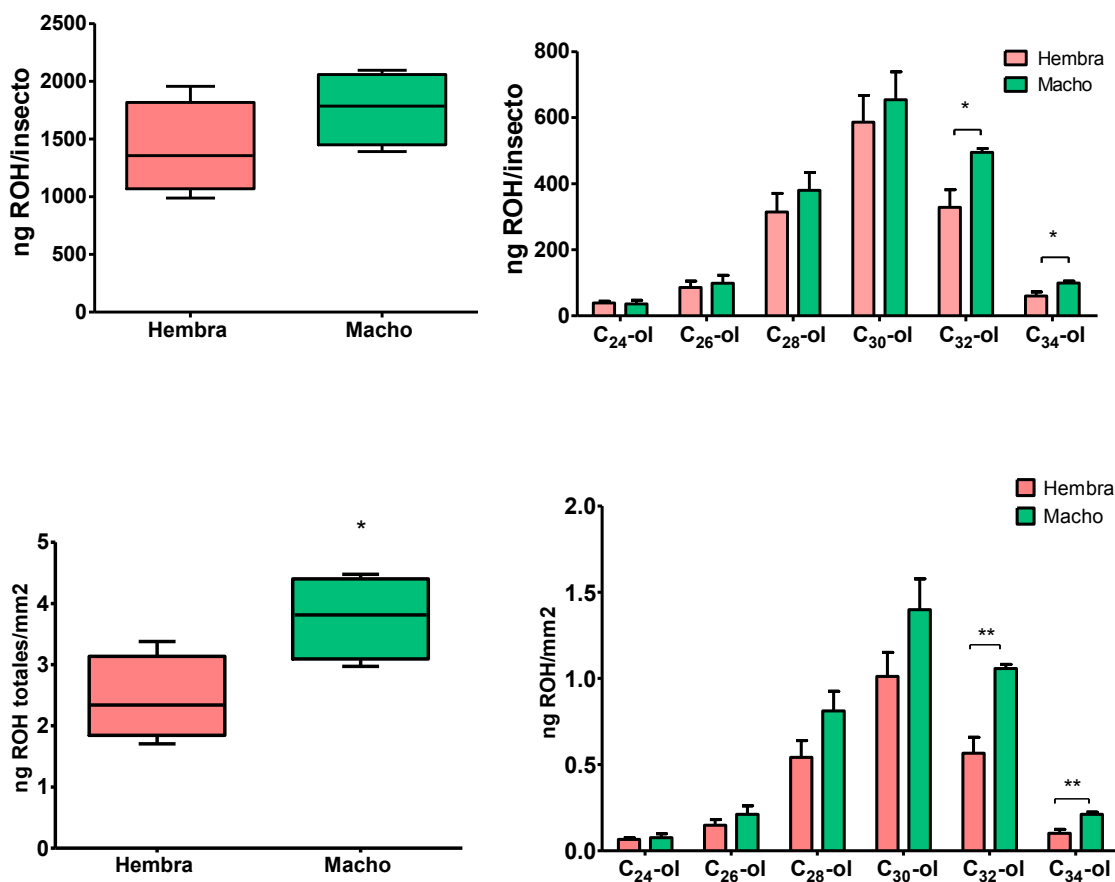


Figura 4-11: Análisis de alcoholes grasos epicuticulares total e individualmente entre ejemplares hembra y macho *Triatoma infestans*. Las concentraciones se expresan en ng/insecto (arriba) o ng/mm² (abajo) Los datos se muestran como media \pm SD. Los asteriscos *, ** por encima de las barras indican diferencias significativas $P < 0,05$ y $0,01$ respectivamente, en el contenido entre hembras y machos (Test de Student).

4.2.1 DERIVATIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL C₂₂-OL Y C₂₀-OL.

Debido a la gran dispersión de datos obtenidos previamente para la cuantificación del C₂₀-ol y C₂₂-ol en hembras mediante separación en columna y análisis por CGC-FID, su cuantificación se realizó por HS-SPME acoplada a CGC-FID. Previamente se derivatizó la muestra entera con el fin de obtener alcoholes grasos acetilados, y posteriormente los mismos se identificaron empleando el análisis del cromatograma de ion-extraído (EIC), tal como se describe en la sección 3.3.1.1. La cuantificación de las muestras acetiladas se

realizó mediante HS-SPME acomplada a CGC-FID. La cuantificación se realizó utilizando las curvas de calibración con estándares externos comerciales de C₂₀-ol y C₂₂-ol.

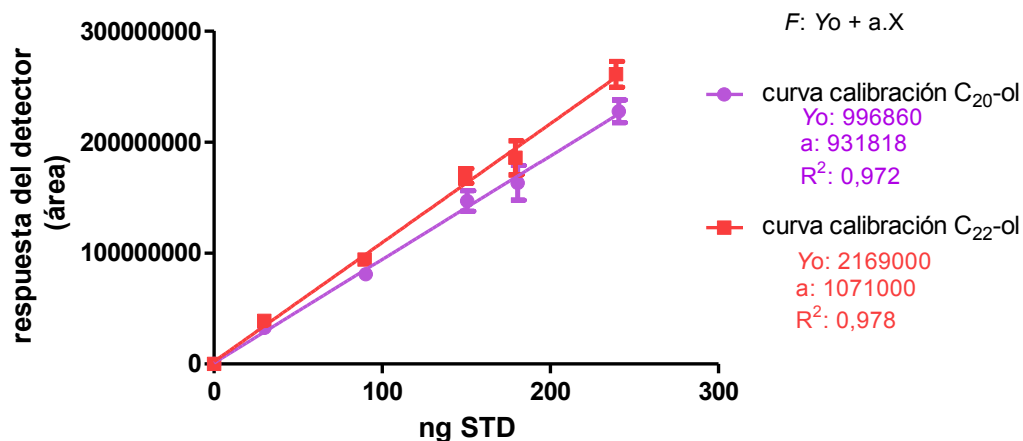


Figura 4-12: Curvas de calibración obtenidas mediante derivatización de C₂₀-ol y C₂₂-ol comerciales y posterior análisis por SPME-CGC-FID.

En la Figura 4-13 se observa un gráfico de caja de los distintos valores obtenidos de la cuantificación del C₂₀-ol y C₂₂-ol presentes en hembras y machos vírgenes. En las hembras, se registraron cantidades de C₂₀-ol con valores mínimos de 30 ng hasta un máximo de 177 ng por hembra, con un promedio de 85,7 ng por hembra. En el caso del C₂₂-ol, se registró un promedio de 65 ng por hembra, también con grandes variaciones en la cantidad, desde 23 hasta 158 ng por hembra.

Este mismo análisis realizado sobre hembras susceptibles arrojó valores un poco mayores con respecto a las hembras resistentes, con valores de C₂₀-ol entre 23 ng y 228 ng por hembra, y valores de C₂₂-ol en un rango de 23 y 191 ng por hembra. Pese a que se observa una tendencia de mayor contenido de estos alcoholes en hembras susceptibles, las diferencias entre medias no son significativas. Tanto en la epicutícula de hembras resistentes como susceptibles, el C₂₀-ol se encuentra en mayores cantidades respecto al C₂₂-ol.

En cuanto a estos compuesto en la epicutícula de insectos machos, sólo se detectaron pequeñas cantidades de cada uno de ellos (En insectos R: C₂₀-ol: 4,5±2,3ng /macho, C₂₂-ol: 0,42±0,2ng/macho; en insectos S: C₂₀-ol: 4,1±1,9, C₂₂-ol: 0,43±0.03)

El análisis de estos compuestos por superficie en hembras R corresponde 0,15 y 0,09 ng/mm² de C₂₀-ol y C₂₂-ol respectivamente, mientras que en machos R sólo un 0,009 y 0,0008 ng/mm². No se registraron diferencias significativas en función de la susceptibilidad a deltametrina.

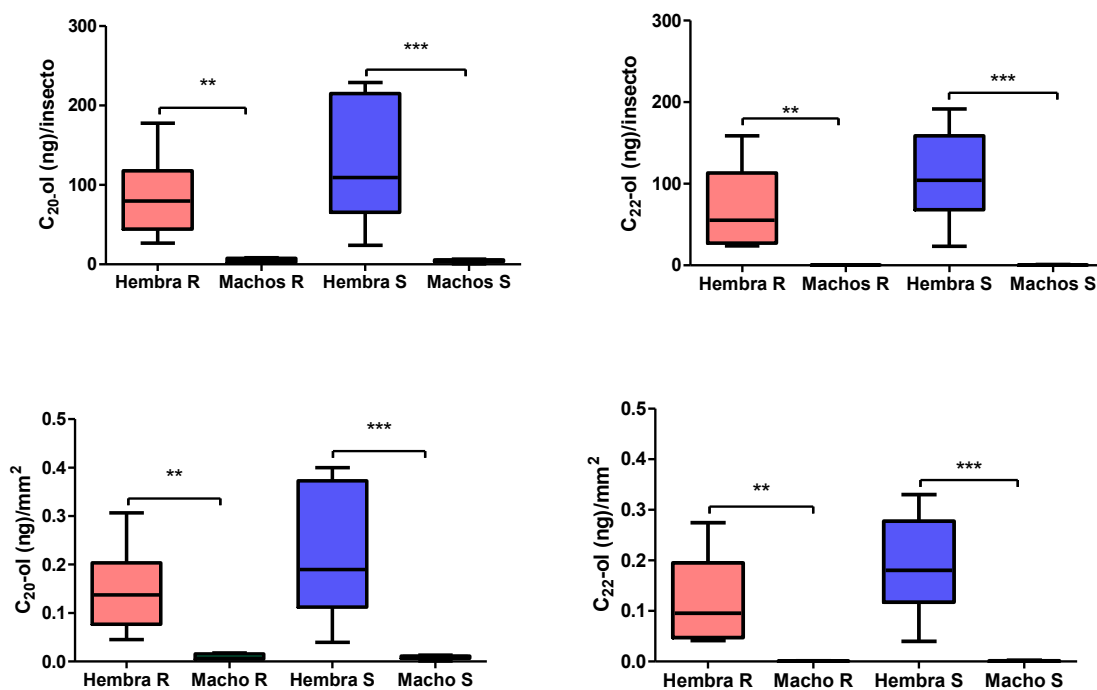


Figura 4-13: Cuantificación de C₂₀-ol y C₂₂-ol en ejemplares *Triatoma infestans* machos y hembras R y S. La concentración se expresa en ng/insecto o ng/mm². Los asteriscos *** por encima de las barras indican diferencias significativas P < 0,001 entre hembras y machos (test de Student).

Tabla 6: Cuantificación de C₂₀-ol y C₂₂-ol acetilados presentes en machos y hembras resistentes y susceptibles mediante HS-SPME acoplada a CGC-FID.

	C ₂₀ -ol		C ₂₂ -ol	
	ng/insecto	ng/mm ²	ng/insecto	ng/mm ²
Hembra R	85,7± 49,9	0,15± 0,09	65,4 ± 41,5	0,09± 0,07
Hembra S	128,1 ± 77,2	0,22± 0,13	108± 56,6	0,19± 0,10
Macho R	4,5± 2,3	0,009± 0,005	0,42± 0,2	0,0008± 0,0004
Macho S	4,1± 1,9	0,010± 0,005	0,43 ± 0,3	0,001± 0,0007

4.2.2 ANÁLISIS DE ACIL-COA REDUCTASAS EN INTEGUMENTO

A partir de la información del transcriptoma de integumento de *T. infestans*, se identificaron 10 secuencias potencialmente codificantes de genes FAR, que estarían involucradas en la síntesis de alcoholes grasos. Los códigos de acceso GenBank son los siguientes: JAS01703, JAR97768, JAR97761, JAR97762, JAR97764, JAS01704, JAR97763, JAS01706, JAS01708, JAS01707.

El análisis filogenético de las secuencias identificadas muestra que las secuencias de *T. infestans* se agrupan con sus correspondientes ortólogas en *Rhodnius* (Figura 4-14). Una de las secuencias (JAR97762) se agrupa junto con los genes que corresponden a una expansión específica de *Rhodnius*. JAS01706 Y JAR97761 son parte del clúster que contiene a los genes humanos FAR1 y FAR2 utilizados como grupo externo, que sintetizan alcoholes de longitudes de cadena de 16-18C. JAS01707 y JAS1704 aparecen en un clúster específico de insectos que incluye a una FAR caracterizada de *D. melanogaster* (*FAR waterproof*), reportada en controlar la formación de alcoholes de muy largas longitudes de cadena (Jaspers et al. 2014), similares a las de *T. infestans*.

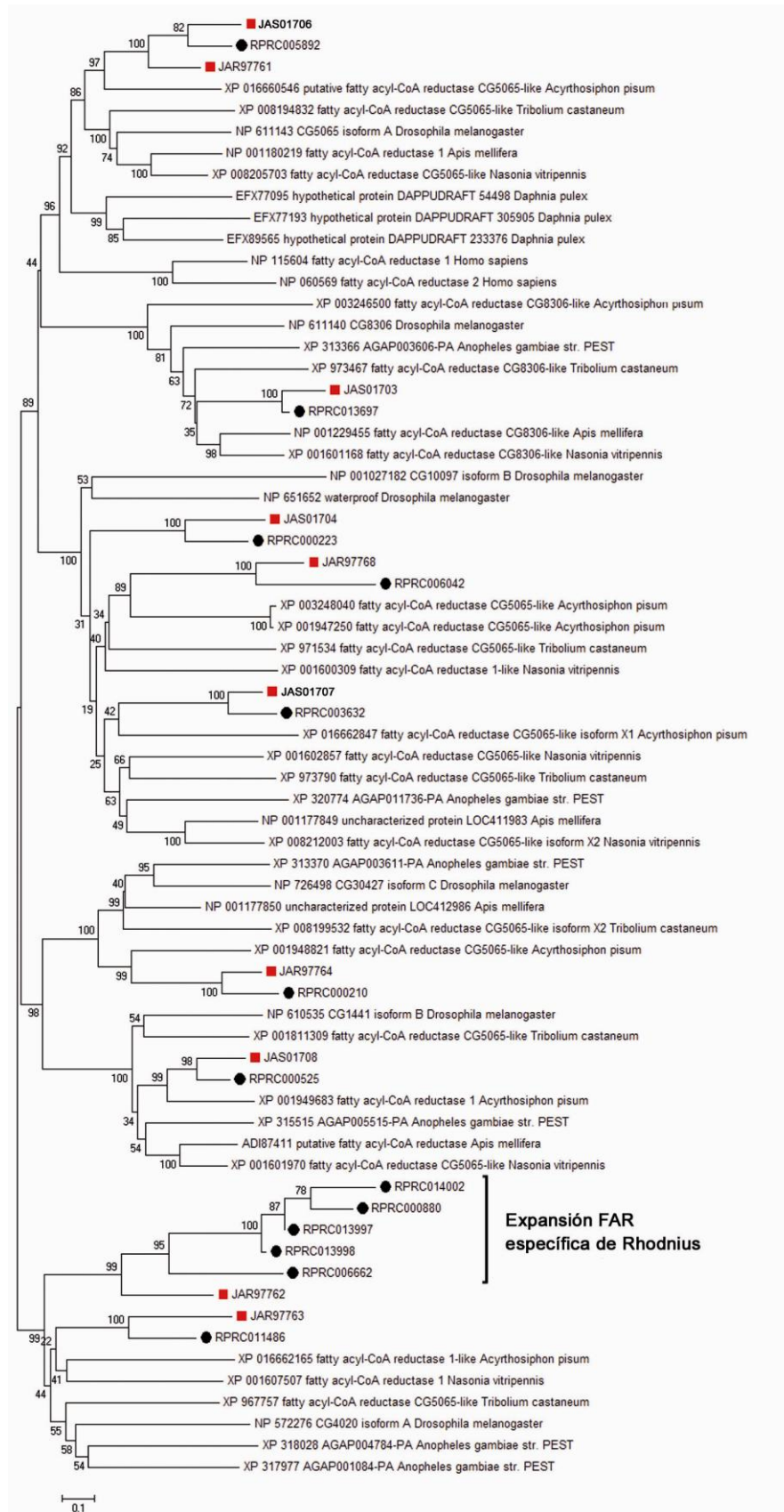


Figura 4-14: Árbol filogenético de máxima probabilidad de los diez genes FAR de *Triatoma infestans* detectados en este estudio. Las secuencias de proteínas FAR humana y del crustáceo *Dafnia pulex* se utilizaron como grupos externos. Las secuencias de proteínas de otras especies se descargaron del NCBI GenBank o Vector base (*Rhodnius prolixus*). Los genes de *Triatoma infestans* (identificados con sus números de acceso a GenBank) están marcados con cuadrados rojos, mientras que los ortólogos correspondientes del triatomino *R. prolixus* están marcados con círculos negros. Se indica la expansión específica de FAR reportada en *Rhodnius* (Mesquita et al. 2015). Los números en las ramas son los soportes de bootstrap de 1000 réplicas.

Se diseñaron cebadores específicos para cada una de las secuencias y se midió su expresión diferencial en el integumento de hembras y machos vírgenes. Dado que no se obtuvieron curvas de calibración aceptables para el par de cebadores correspondiente a JAR97762, la misma no fue analizada. El análisis de expresión diferencial de FAR en función del sexo en el integumento de insectos *T. infestans* se muestra en la Figura 4-15. De las 9 secuencias analizadas, 2 de ellas (JAS01706 y JAS01707) presentaron una expresión significativamente mayor en las hembras respecto a los machos (2,7 veces y 1,6 veces respectivamente).

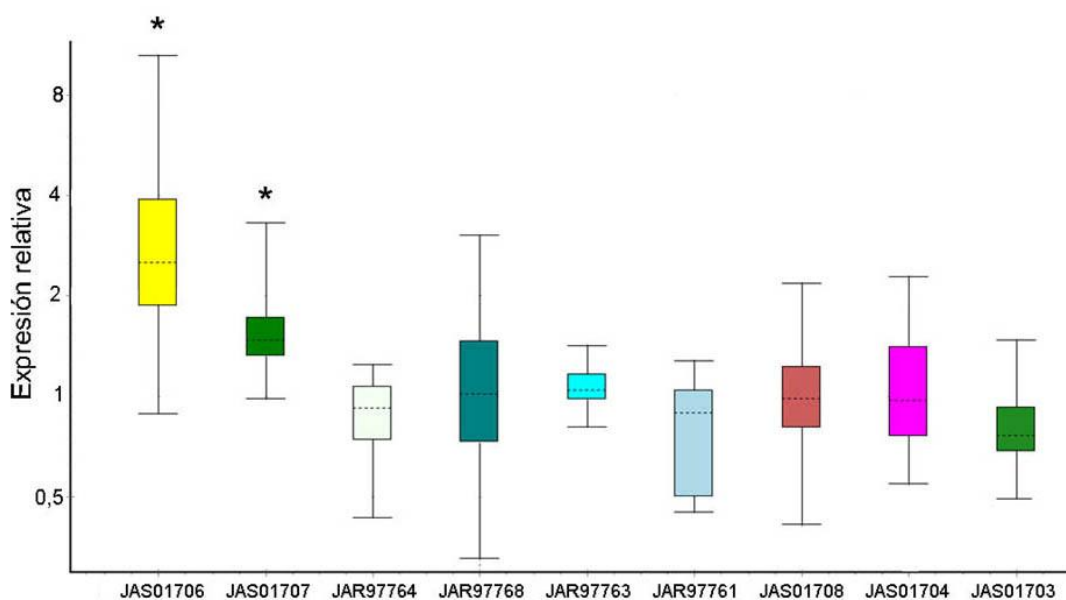


Figura 4-15: Análisis de expresión relativa de genes FAR en el integumento de hembras respecto de machos vírgenes *Triatoma infestans*. El área de la caja abarca el 50% de todas las observaciones, la línea de puntos representa la mediana de la muestra de tres réplicas biológicas y las barras verticales representan el otro 50% de las observaciones restantes. Los valores de expresión relativa indican el nivel de expresión del gen de interés en hembras respecto al nivel de expresión en machos. El asterisco * indica diferencias significativas ($P < 0.05$).

4.3 TRANSPORTE DE DELTAMETRINA EN LA HEMOLINFA DE *T. INFESTANS* RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES A DELTAMETRINA

Con el fin de explorar la vía por la cual se transporta DLM en la hemolinfa de los insectos y realizar comparaciones entre ejemplares resistentes y susceptibles, se aplicó un método previamente desarrollado en el laboratorio para estimar la cantidad de DLM en la hemolinfa. Se recurrió a la técnica de microextracción con barras de solvente con fibras huecas (HF-SBME).

En la Figura 4-16 se pueden observar los perfiles lipoproteicos de la hemolinfa de los machos R y S, y la distribución de la DLM en cada una de dichas fracciones.

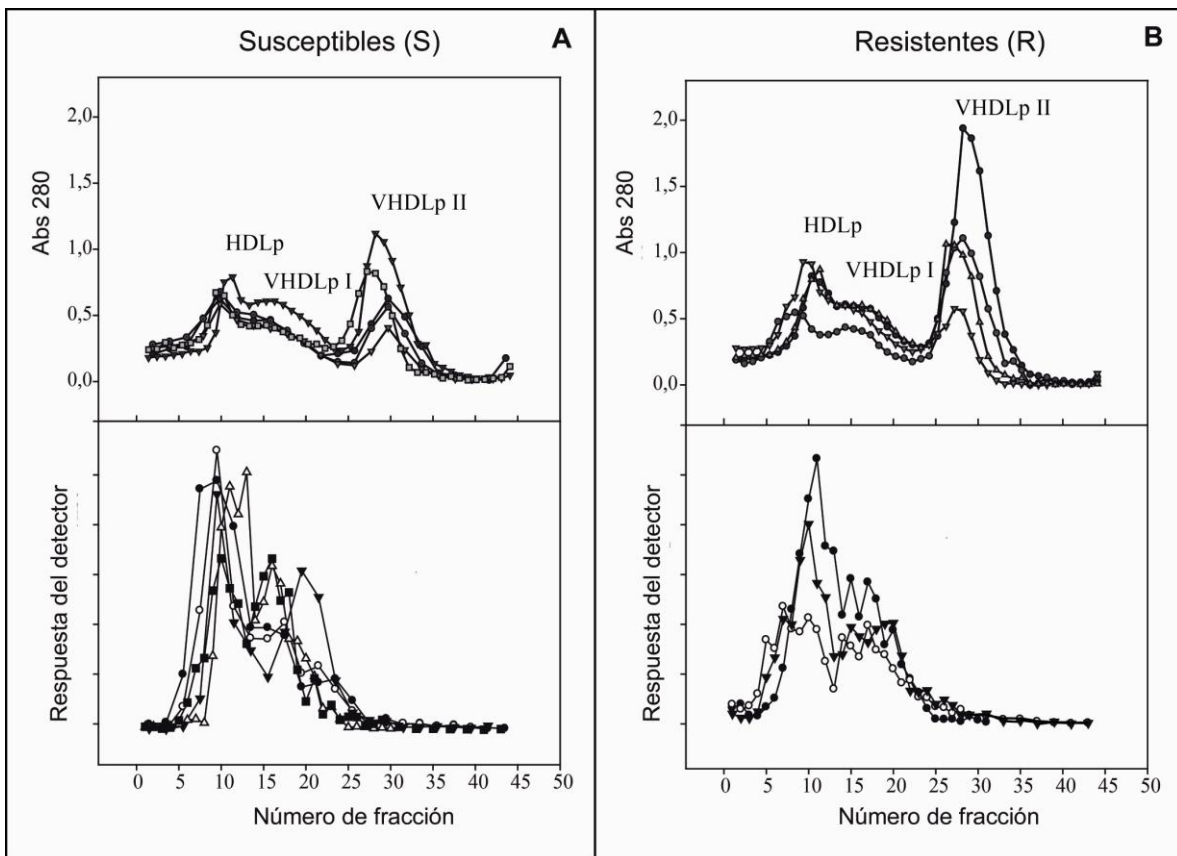


Figura 4-16: Perfiles de lipoproteínas hemolinfáticas de *Triatoma infestans* S (A) y R (B) obtenidos luego de la incubación con deltametrina y fraccionamiento por ultracentrifugación. Determinación de proteínas por medida de Abs280 (parte superior), y determinación de deltametrina por SBME-CGC- μ ECD (parte inferior). Los datos corresponden a n=5 (S) y n=4 (R) muestras de hemolinfa preparadas como se describe en Materiales y Métodos; los símbolos corresponden a las diferentes muestras de hemolinfa.

En la parte superior de la Figura 4-16 se puede observar el perfil lipoproteico característico de *T. infestans*, observándose la lipoforina (Lp) y lipoproteínas de muy alta densidad (VHDLp I y II), con perfiles similares entre R (Figura 4-16A) y S (Figura 4-16B). En la parte inferior, se graficó la presencia de deltametrina en cada una de las fracciones obtenidas. Utilizando la curva de calibración obtenida con DLM comercial, se cuantificó DLM en Lp (S: 313.42684.12 ng; R: 309.52670.14 ng) y VHDLp-I (S: 217.27695.18 ng; R: 227.26620.80 ng), en una relación 60/40, con una distribución similar en R y S; no se detectó DLM en la fracción VHDLp-II (Figura 4-17).

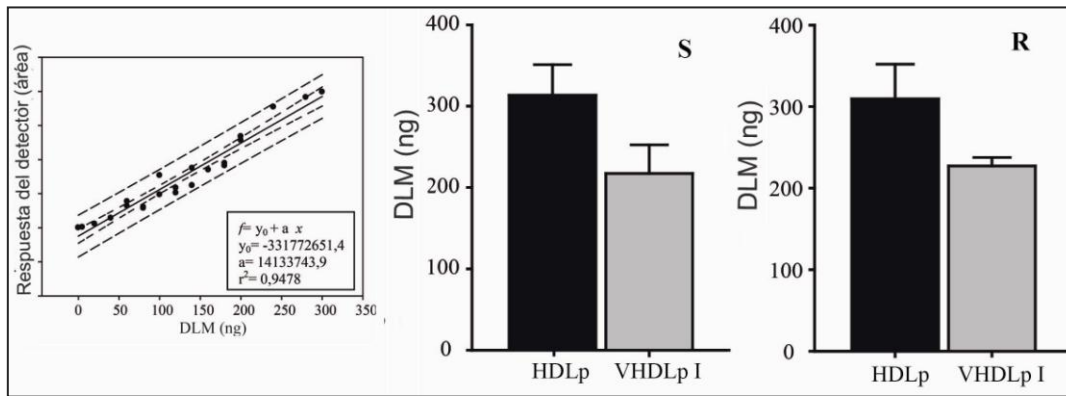


Figura 4-17: Cuantificación de DLM asociada a Lp y a VHDLp I, expresada en ng, obtenida a partir de la curva de calibración.

Con el objetivo de evaluar la localización de la lipoforina en el integumento, se realizaron ensayos preliminares de inmunofluorescencia directa en criosecciones de tejido obtenidos a partir de las placas esternales de los insectos. A su vez, se colorearon los mismos con hematoxilina para obtener una descripción del tejido, y se evaluó la presencia de reservas lipídicas en el tejido epidérmico. En la Figura 4-18 se observa un corte transversal de la cutícula de *T. infestans* teñido con hematoxilina-eosina. Se observa la cutícula y la delgada capa que corresponde a la epicutícula, así como también el tejido epidérmico, compuesto por células epidérmicas y oenocitos. En la Figura 4-18B se observa la presencia de gotas lipídicas en el interior de los oenocitos. Los ensayos de inmunofluorescencia demostraron la presencia de lipoforina en la membrana basal y región sub-epidérmica del integumento (Figura 4-18C).

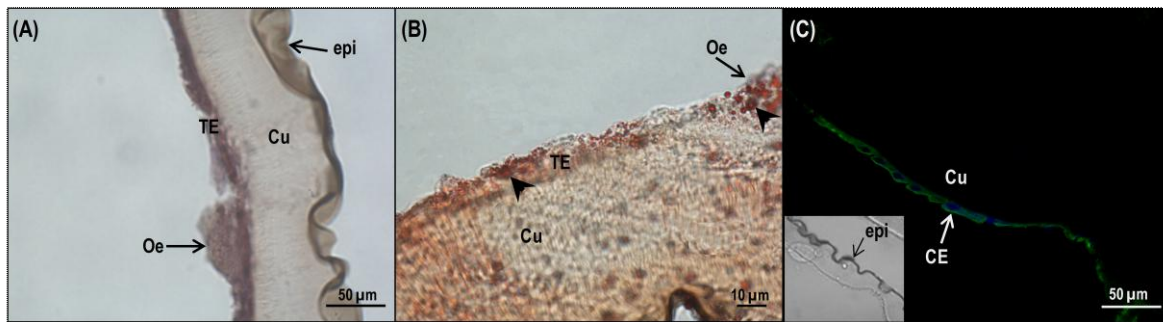


Figura 4-18: Criosecciones de integumento de *Triatoma infestans* coloreados con hematoxilina (a) u oil red o (b). En (b) las cabezas de flecha indican la distribución de los adiposomas en el integumento. (c) Localización de lipoforina (Lp) en secciones de integumento (anti-Lp-FITC: señal verde; DAPI: señal azul). Oe, oenocitos; te, tejido epidérmico; cu, cutícula; epi, epicutícula; ce, célula epidérmica.

4.4 DISCUSIÓN

Composición R-S

La resistencia a insecticidas es un fenómeno multifactorial, donde los mecanismos más estudiados han sido la sobreexpresión de genes codificantes de enzimas detoxificantes (resistencia metabólica) y mutaciones que alteran el sitio de acción de los insecticidas (resistencia por modificación del sitio de acción). El escaso número de investigadores dedicados a estudiar el rol de barrera de la cutícula en la resistencia a insecticidas posiblemente haya influido en la ausencia de estudios sistemáticos sobre este tema. Sin embargo, en los últimos años han surgido evidencias aisladas, aunque numerosas, que avalan la profundización del estudio de su participación en este mecanismo.

Hace ya varios años que se demostró que la remoción de los lípidos cuticulares con solventes orgánicos o la inhibición de las ácido graso sintasas y elongasas, enzimas involucradas en el metabolismo lipídico cuticular, se correlaciona con una penetración de insecticidas aumentada a través de la cutícula (Juárez 1994a, Juárez et al. 1996). Por otra parte, este laboratorio ha demostrado por primera vez en insecto, que tanto en *Triatoma infestans* como en el mosquito *Anopheles gambiae* un mayor contenido de HC epicuticulares y un mayor espesor cuticular se asocian a una penetración reducida de deltametrina (Pedrini et al. 2009, Juárez et al. 2010, Balabanidou et al. 2016), señalando la participación de los HC en el factor cuticular. Recientemente, también se ha reportado un aumento en el espesor cuticular de la chinche de cama *Cimex lectularius* (Lilly et al. 2016).

Con el fin de investigar la posible participación de otros componentes lipídicos no HC en el factor cuticular de resistencia, se analizó la concentración de aldehídos y alcoholes grasos en la cutícula de insectos resistentes y susceptibles a piretroides. La elección de los mismos se debió principalmente a que comparten una ruta de síntesis común con los HC y presentan cadenas carbonadas de similares longitudes de cadena. Además, análisis previos del laboratorio descartaron la participación de otras fracciones (AGL, TG y W) en este mecanismo (datos no publicados).

Este es el primer reporte completo de la identidad y contenido de los aldehídos en *T. infestans*. El análisis mediante CGC-MS evidenció la presencia de compuestos de número par de átomos de carbono, de entre 24C y 34C, siendo el C₃₀-al el mayoritario. No se

detectó la presencia de aldehídos de cadenas ramificadas en la epicutícula. En el caso de los alcoholes grasos, la identificación por CGC-MS, confirmó la presencia de compuestos de número par de átomos de carbono, comprendidos entre 20 y 34C, únicamente de cadenas lineales. El alcohol mayoritario también corresponde al C₃₀-ol. Tampoco se identificaron alcoholes de cadenas ramificadas.

Los alcoholes y aldehídos, además de ser constituyentes de la epicutícula de *T. infestans*, serían precursores de los HC. La síntesis de estos lípidos ocurre en los oenocitos del integumento, y se inicia por la acción de las ácido graso sintasas (FAS), como se describe en la introducción. Estas se acoplan a una serie de elongasas de ácidos grasos (ELOVL) que producen ácidos grasos de muy largas cadenas. Una vez que el ácido graso acilado intermediario llega a una longitud de cadena determinada, lineal o ramificada, saturada o insaturada, el carbono del carbonilo es modificado para formar el grupo funcional. Éste puede ser reducido a un alcohol o a un aldehído mediante un acil-CoA reductasa (FAR) específica. El paso final en la síntesis de HC es llevado a cabo por una CYP4G mediante una decarbonilación oxidativa del aldehído con liberación de CO₂, que genera un HC con una longitud de cadena con un átomo de carbono menos que su intermediario (Reed et al. 1994, Qiu et al. 2012). Se ha postulado y corroborado experimentalmente, que las CYP4Gs utilizan un aldehído como precursor para la síntesis de HC (Qiu et al. 2012, Balabanidou et al. 2016, Chen et al. 2016). Sin embargo, aún no se conoce con exactitud de donde proviene el aldehído, ya que el número limitado de FAR caracterizadas en insectos liberan alcohol como producto de reacción. Recientemente en 2018, se ha reportado por primera vez que la CYP4G1 de *D. melanogaster* y una CYP4G de *Dendroctonus ponderosae* utilizarían un alcohol como intermediario, sugiriendo que las CYP4G oxidarían el alcohol para general el aldehído precursor, y finalmente llevar a cabo la decarbonilación oxidativa (MacLean et al. 2018). Este ha sido el primer reporte de una alcohol oxidasa/decarbonilasa oxidativa en animales.

Las rutas posibles de síntesis de HC se esquematizan a continuación (Figura 4-19)

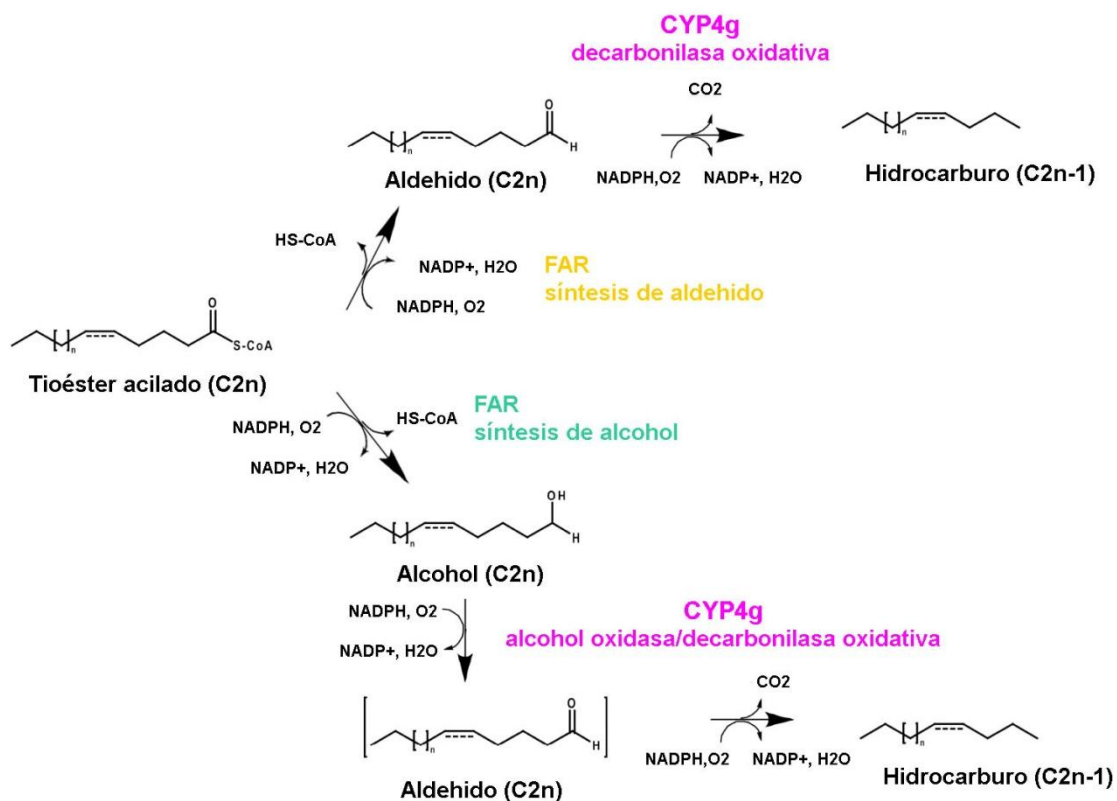
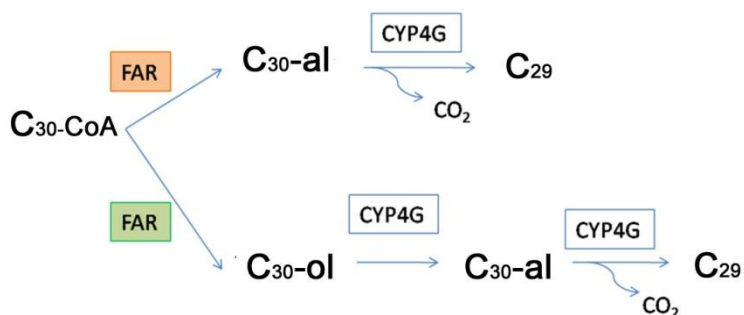


Figura 4-19: Rutas posibles para la síntesis de HC a partir de ácidos grasos precursores.

Nuestros resultados evidencian que en la epicutícula de *T. infestans*, existe una correlación en la abundancia relativa de los componentes HC lineales con respecto a sus correspondientes aldehído y/o alcohol. Dado que estos compuestos comparten precursores acilo grasos de la misma longitud de cadena, y son parte de la misma ruta de síntesis, la composición de los mismos estaría regulada por la acción coordinada de las enzimas involucradas en su biosíntesis. Por ejemplo, el HC lineal mayoritario corresponde al C₂₉, que se originaría por decarbonilación de su precursor aldehído/ alcohol C₃₀-al/C₃₀-ol. La misma situación se da con los demás componentes lineales. Las dos vías posibles se esquematizan a continuación.



Con respecto a los componentes ramificados, no se detectaron alcoholes ni aldehídos de cadenas ramificadas, pese a que la epicutícula de *T. infestans* contiene tanto HC lineales así como mezclas complejas de HC ramificados, con 1, 2 y hasta 3 ramificaciones. Dado que los grupos metilo y las ramificaciones internas de los hidrocarburos se insertan temprano en la síntesis de la cadena hidrocarbonada, los correspondientes aldehídos y/o alcoholes grasos ramificados deberían existir como intermediarios en su ruta de síntesis. Estos compuestos probablemente estén presentes en el integumento (sitio de síntesis). Estudios previos del laboratorio de la fracción de ácidos grasos de *T. infestans* demostró la presencia de componentes lineales de hasta 34C en la epicutícula, pero no AG ramificados (Juárez and Brenner 1989). Sin embargo, se encontraron pequeñas cantidades de estos compuestos en huevos de *T. infestans* (Juárez et al., 1996). En *B. germánica* un examen cuidadoso de los ácidos grasos de integumento demostró que los ácidos grasos ramificados estaban presentes, aunque en cantidades muy inferiores a las de AG lineales (Juárez et al. 1992). Estos ácidos grasos precursores tenían el patrón de ramificaciones consistente con los principales HC ramificados cuticulares de este insecto, lo que contribuyó a establecer el integumento como sitio de síntesis de los HC. En consecuencia, el metabolismo de los hidrocarburos ramificados en el integumento se produciría a través de un acoplamiento estrecho de los sistemas de enzimas de elongación, reducción y decarbonilación: los precursores acil-CoA ramificados serían dirigidos exclusivamente a la vía de decarbonilación oxidativa P450, sin liberación de sus intermediarios.

El estudio comparativo de aldehídos y alcoholes grasos presentes en la epicutícula de ejemplares resistentes (R) y susceptibles (S) a deltametrina no evidenció diferencias

significativas en el contenido total de las fracciones, por lo que estos componentes no tendrían un rol relevante en el factor cuticular de la resistencia. Los HC, principales constituyentes de la epicutícula, serían los únicos componentes lipídicos cuticulares con un rol participativo en el factor cuticular. Balabanidou et al. han demostrado que el aumento en la cantidad de HC cuticulares en *A. gambiae* se correlaciona también con un aumento en la expresión de las dos CYP4Gs, enzimas involucradas en la etapa final de su síntesis. En otra cepa de *A. gambiae* resistente, que no presenta la mutación *kdr*, también se evidenció una sobreexpresión del gen CYP4G16 (Yahouédo et al. 2017), ratificando la participación de los HC en este fenómeno.

Como se demostró por primera vez en *T. infestans* y posteriormente en *A. gambiae*, el factor cuticular involucra no sólo un aumento en HC epicuticulares, sino que la disminución en la penetración de insecticida también se correlaciona con un aumento en el espesor cuticular (Pedrini et al. 2009, Juárez et al. 2010, Balabanidou et al. 2016). La mayor parte de la cutícula de los insectos la constituyen las proteínas cuticulares estructurales y la quitina, un polisacárido de N-acetil- β -D-glucosamina (Willis 2011, Dong et al. 2016). En el transcriptoma de integumento de *T. infestans*, se identificaron 34 genes correspondientes a proteínas cuticulares. El análisis de expresión diferencial entre ninfas resistentes y susceptibles a piretroides de nueve de estos genes, evidenció una sobreexpresión significativa de dos de ellos (5,2 y 27,7 veces) (Calderón-Fernández et al. 2017). Es interesante resaltar el hecho de que ambos genes forman parte de expansiones génicas, previamente detectadas en el análisis del genoma de *Rhodnius prolixus* (Mesquita et al. 2015). El aumento en la expresión de proteínas cuticulares también ha sido reportado en cepas resistentes de *A. gambiae* (Awolola et al. 2009, Yahouédo et al. 2017), y la chinche de cama *Cimex lectularius* (Koganemaru et al. 2013). Aún no hay reportados análisis funcionales que involucren y confirmen el rol de las proteínas cuticulares en el factor cuticular de resistencia, pero es un escenario muy prometedor.

Transporte

Entre otros factores aún no caracterizados que podrían participar en el fenómeno de la resistencia a insecticidas, se encuentra el transporte de los mismos desde el sitio de entrada

hasta el sitio de acción. Los insecticidas de contacto son compuestos lipofílicos que luego de penetrar a través de la cutícula ingresan a los diversos tejidos blancos. En el caso de los piretroides, deben alcanzar los canales de sodio operados por voltaje en el sistema nervioso del insecto. El principal transportador de la mayoría de los insecticidas de contacto a través del cuerpo del insecto sería la hemolinfa, sin embargo, son muy escasos los estudios sobre los mecanismos de transporte involucrados durante las etapas iniciales de intoxicación. Con el fin de comenzar el estudio del transporte de la deltametrina (DLM) en la hemolinfa hacia los sitios blancos, nuestro objetivo fue discriminar el transportador de la DLM y realizar comparaciones preliminares entre insectos resistentes y susceptibles. En base a experiencias previas de nuestro laboratorio, se empleó un novedoso método para la medición de DLM en la hemolinfa de los insectos, mediante microextracción en barras de solventes (SBME) acoplado a CGC- μ ECD. La implementación de esta técnica resultó muy útil para medir cantidades muy pequeñas de insecticida en la hemolinfa de insectos, evitando el consumo de grandes cantidades de solventes orgánicos y pasos posteriores de purificación para la extracción de DLM (Dulbecco et al. 2015).

Las lipoproteínas de la hemolinfa se denominan, dependiendo su densidad, como lipoforina (Lp), una lipoproteína de alta densidad, y lipoproteínas de muy alta densidad (VHDLps). Se demostró que la DLM se une a Lp y VHDLp I, en una relación aproximada 60/40, y no se detectó DLM asociada a VHDL II. Se detectaron cantidades similares de DLM tanto en R como en S. Dado que la DLM es un compuesto lipofílico de alto peso molecular, la unión diferencial a las distintas lipoproteínas puede estar relacionada con la polaridad de la molécula, tal y como ha sido reportado anteriormente (Helling et al. 1986). Además del núcleo interno de fosfolípidos común a las tres lipoproteínas, tanto Lp como VHDL I tienen una composición lipídica similar transportando grandes cantidades de diacilgliceroles e HC; por el contrario, VHDL II transporta principalmente lípidos polares, y un gran contenido de ácidos grasos libres (Rimoldi et al. 1989).

La unión de DLM a lipoproteínas hemolinfáticas no sólo cumpliría el rol de transportador hacia el tejido blanco, sino que también protegería a la molécula de su degradación enzimática por parte de enzimas de detoxificación. Para evaluar la distribución de la Lp en secciones del integumento de insectos R y S, se realizaron estudios histo-morfológicos y de distribución de reservas lipídicas sobre criosecciones de cutícula. Estos análisis

preliminares evidenciaron la presencia de lipoforina en la membrana basal y región sub-epidérmica del integumento, no encontrándose diferencias significativas en la localización de la misma entre insectos R y S.

Aunque la resistencia a DLM en *T. infestans* está asociada con un engrosamiento cuticular y una penetración reducida del insecticida, la unión de DLM a las lipoproteínas no parece contribuir a este mecanismo. Sin embargo, aún estamos lejos de comprender el mecanismo completo de penetración del insecticida y el tráfico a través del cuerpo del insecto. Se necesitan estudios posteriores para seguir el destino de la DLM desde que ingresa al interior del insecto, donde podría ser sustrato en primer lugar de enzimas de detoxificación cuticulares, o transportada a su tejido blanco para cumplir su rol insecticida. Es de destacar, que de las secuencias obtenidas a partir del transcriptoma de integumento, detectamos numerosos genes relacionados con el metabolismo y transporte de lípidos (Calderón-Fernández et al. 2017). Entre estos, dos genes codificantes de receptores de lipoforina. La presencia de receptores para lipoforina y la detección de esta lipoproteína en la membrana basal del tejido epidérmico sugieren la posible interacción integumento-lipoproteínas con un transporte bidireccional de lípidos y sustancias lipofílicas hacia otros tejidos.

Por su parte, en el integumento de *T. infestans* se encontraron 10 genes correspondientes a transportadores ABC (Calderón-Fernández et al. 2017). Estos constituyen una de las mayores clases de transportadores responsables de la translocación impulsada por ATP de muchos sustratos a través de membranas. Estos sustratos incluyen iones, azúcares, aminoácidos, vitaminas, péptidos, polisacáridos, hormonas, lípidos y xenobióticos. Estos transportadores tienen un rol vital en el metabolismo y desarrollo de insectos, y recientemente se ha reportado su posible participación en el mecanismo de resistencia a insecticidas al encontrarse sobreexpresados en varias especies de insectos resistentes, incluyendo mosquitos y chinche de cama (Bariami et al. 2012, Zhu et al. 2013, Pignatelli et al. 2018). La presencia de dichos transcriptos en el integumento de *T. infestans*, teniendo en cuenta su rol en la excreción de xenobióticos y su reciente correlación en la resistencia a insecticida, sugiere que podrían estar participando en el complejo mecanismo de resistencia. El estudio de estos genes en función de la susceptibilidad a deltametrina en *T. infestans* abren el escenario a nuevos estudios.

Dimorfismo sexual:

Además de actuar como barrera a la pérdida de agua y constituir la primera defensa contra agentes externos químicos o microbiológicos, una función importante de los lípidos cuticulares de insectos es servir como señales químicas de reconocimiento entre dos o más individuos. Muchos insectos dependen de las feromonas sexuales para la identificación de parejas reproductivas y el inicio del comportamiento de apareamiento. Trabajos previos de este laboratorio demostraron que el contacto de la antena del macho con la cutícula de la hembra es necesario para llevar a cabo los intentos de cópula en *T. infestans*, identificando al C₂₀-ol y C₂₂-ol como compuestos claves en éste reconocimiento (Cocchiararo-Bastias et al. 2011).

Con el fin de detectar si existen diferencias significativas en el contenido de otros componentes epicuticulares que podrían participar en el reconocimiento sexual por contacto, se procedió al estudio cuantitativo de HC, ALD y ROH en hembras y machos vírgenes. Dado que la técnica de HS-SPME no es efectiva para componentes de muy elevado peso molecular, el análisis de dichas fracciones se realizó mediante fraccionamiento por cromatografía en columna y posterior análisis por inyección en el CGC-FID.

Las hembras y machos utilizados en este trabajo muestran un marcado dimorfismo sexual en cuanto al tamaño. La existencia de estas diferencias en triatominos es un hecho conocido, siendo las hembras, en promedio, más grandes que los machos (Lent & Wygodzinsky, 1979). Es por eso, que al estudiar la concentración de los componentes cuticulares, los mismos se refirieron tanto por insecto como por superficie, de manera de obtener una aproximación más real de la situación que se da en el reconocimiento por contacto. Con respecto a la fracción de HC, no se registraron diferencias ni en la composición ni en la cantidad de HC epicuticulares, como había sido reportado anteriormente (Juárez and Calderón-Fernández 2007). Sin embargo, tanto la fracción de aldehídos como de alcoholes grasos presentaron diferencias significativas en machos y hembras. En los machos, el contenido de alcoholes cuticulares es un 46% mayor por mm² que en las hembras, con el C₃₂-ol y C₃₄-ol significativamente aumentados. Respecto a los aldehídos, el contenido total es mayor en las hembras aunque no presenta diferencias

significativas con respecto a los machos; sólo el C₃₀-al está significativamente aumentado en las hembras.

	ALD (ng/mm ² ± SD)	ROH (ng/mm ² ± SD)	HC (ng/mm ² ± SD)
Hembra	1,9 ± 0,4	2,4 ± 0,7	36,4±5,6
Macho	1,5 ± 0,6	3,8 ± 0,6	38,4±4,6

Estos resultados muestran marcadas diferencias en función del sexo no sólo en el tamaño de los insectos sino también en las cantidades relativas de ALD y ROH presentes en la superficie epicuticular de *T. infestans*. Los HC son el componente mayoritario en ambos casos. En hembras, la cantidad de ROH es similar a la de ALD (2,4 ng/mm² de alcoholes y 1,9 ng/mm² de aldehídos), mientras que en los machos la cantidad de ROH (3,8 ng/mm²) corresponde a más del doble respecto a la de ALD (1,5 ng/mm²). Desconocemos si estas diferencias en las cantidades relativas de los componentes analizados están relacionadas con un comportamiento sexual. Tampoco se conoce si la composición lipídica se mantiene constante a lo largo de toda la superficie del insecto, por lo que faltaría un estudio más exhaustivo de composición relativa de los componentes cuticulares en distintas zonas del cuerpo. En la abeja *Apis mellifera*, la composición y cantidad de ácidos grasos y alcoholes grasos en la cutícula varía en abdomen, tórax y cabeza (Teerawanichpan et al. 2010). Es posible que aquellas sustancias que intervengan en reconocimiento por contacto estén concentradas en zonas específicas para ejercer su rol. Por ejemplo, podrían estar ubicadas en el abdomen dorsal del insecto, zona donde el macho realiza el contacto a través de sus antenas. Si dichos compuestos se localizaran en zonas específicas de la hembra, las diferencias encontradas podrían ser aún mayores.

Pese a las diferencias en las cantidades relativas de ROH y ALD registradas, no se detectaron otros compuestos con un marcado dimorfismo sexual que podría participar junto con el C₂₀-ol y C₂₂-ol en el reconocimiento sexual por contacto.

A partir del conocimiento de compuestos con función de feromona sexual, es importante conocer las cantidades liberadas/producidas que constituyen una señal de atracción hacia el insecto del sexo opuesto; aspecto clave en el desarrollo de nuevas herramientas de control vectorial. El C₂₀-ol y C₂₂-ol se encuentran en muy pequeñas cantidades en comparación con

los demás lípidos de la epicutícula de *T. infestans*, representando aproximadamente un 5% de los alcoholes totales de la epicutícula de las hembras y < 0,5% en machos. El análisis de la fracción de alcoholes mediante fraccionamiento en columna seguido de cuantificación mediante inyección en el CGC-FID arrojó resultados muy variables en cuanto su contenido, ocasionado o bien por pérdidas de material en las distintas etapas de procesamiento de la muestra, o en el análisis cromatográfico en presencia de componentes mayoritarios. Variaciones en la reproducibilidad también han sido reportadas en el análisis de otros componentes con actividad de feromona (Villaverde et al. 2009). Ante esta situación, se decidió optimizar las condiciones para poder efectuar la cuantificación por HS-SPME de estos componentes minoritarios. Este laboratorio fue pionero en la implementación de esta técnica en nuestro país, demostrando su uso por primera vez al analizar las feromonas volátiles de *Tribolium castaneum* así como la presencia del hongo *Fusarium graminearum* en espigas de trigo, mediante la detección de compuestos volátiles fúngicos (Villaverde et al. 2009, Girotti et al. 2010). Asimismo, aplicando esta técnica con modificaciones fue posible detectar componentes de mayor peso molecular (C₂₀-ol y C₂₂-ol) asociados al marcado dimorfismo sexual en la epicutícula de *T. infestans* (Cocchiararo-Bastias et al. 2011). Para poder llevar a cabo su cuantificación, optamos por partir de un extracto lipídico sin fraccionar, derivatizar la muestra con un agente acetilante específico para alcoholes que produce el correspondiente acetato y efectuar su posterior análisis por CGC-MS aplicando la técnica del ion extraído, tal como se describe en Materiales y Métodos. De este modo, fue posible el análisis de estos alcoholes presentes en tan pequeñas cantidades en una muestra compleja sin necesidad de etapas previas de purificación por columna.

En los primeros ensayos realizados, se utilizaron extractos de epicutícula de grupos de 4 hembras vírgenes. Los resultados mostraron que la presencia de C₂₀-ol y C₂₂-ol no se registraba en todas las muestras, y varias muestras sólo contenían pequeñas cantidades de dichos compuestos. A continuación, se utilizaron extractos de hembras individuales, observándose nuevamente la presencia de estos alcoholes sólo en algunas de las muestras. Por el contrario, se determinó que la presencia de estos compuestos se daba en el 100 % de las hembras que habían sido colocadas en recipientes individuales al alcanzar la adultez, por lo que no sólo eran vírgenes sino que no habían estado en contacto con otras hembras ni otros especímenes de la misma especie. El crecimiento y la regulación de la población

depende de varios factores ambientales, entre ellos, la temperatura, humedad, hábitat y refugio, y dieta, así como de su propia densidad, esto es, competición intra-específica (Rodríguez and Rabinovich 1980, Gorla 1992). En este contexto, la producción de feromonas sexuales estaría relacionada no sólo con el estado nutricional de la hembra y su madurez sexual, sino también con su entorno. No hay información con respecto a feromonas de contacto, pero hay evidencias que la emisión de feromonas volátiles de un insecto depende de la cantidad de individuos de la misma especie presentes en su entorno. Algunos estudios en lepidópteros han demostrado que las hembras expuestas a feromonas conspecíficas responden aumentando la producción propia de feromonas, generando una competencia intra-específica para aumentar la atracción de los machos para la copulación (Lim et al. 2007, Harari et al. 2011). A su vez, algunos estudios en polillas demuestran que si las hembras perciben una alta densidad de machos en su entorno, reducen la producción de feromonas al advertir que hay abundancia en la posibilidad de encontrar pareja reproductiva (Ashman et al. 2016).

El uso de la técnica de HS-SPME resultó lo suficientemente sensible para la medición de C₂₀-ol y C₂₂-ol en insectos individuales, registrando cantidades de C₂₀-ol 85,7 ± 49,9 ng/hembra y 4,5 ± 2,3ng/macho y de C₂₂-ol 65,4 ± 41,5 ng/ hembra, y 0,42 ± 0,2 ng/macho. Referidos por superficie, las hembras resistentes contienen cantidades de C₂₀-ol que van desde 0,05 ng/mm² hasta 0,31 ng/mm², mientras que los machos presentaron trazas de los mismos en todos los casos (0,009 ng/mm²). El C₂₂-ol, por su parte, registró valores entre 0,05 ng/mm² hasta 0,27 ng/mm². Los machos contienen trazas de los mismos, en un promedio de 0,0009 ng/mm². Este mismo análisis realizado sobre hembras susceptibles, arrojó valores similares aunque en promedio superiores con respecto a las hembras resistentes (C₂₀-ol: desde 0,04 hasta 0,40 ng/mm², C₂₂-ol: 0,05 hasta 0,33ng/mm²). En ambos casos, el C₂₀-ol se encuentra en mayores cantidades respecto al C₂₂-ol. Se ha reportado que en insectos resistentes, ciertas funciones fisiológicas se ven disminuidas por un mecanismo de compensación del gasto energético que conlleva un fenotipo resistente. Por ejemplo, la resistencia a pesticidas en la polilla *Choristoneura rosaceana* reduce la producción de feromonas en las hembras (Delisle and Vincent 2002), las hembras *T. infestans* resistentes presentan una capacidad reducida en cuanto a la fertilidad (Forlani et al. 2015, Germano and Picollo 2015).

Estas grandes variaciones en los niveles de C₂₀-ol y C₂₂-ol en hembras vírgenes y aisladas de otros miembros de su misma especie podrían estar relacionadas a las condiciones fisiológicas de la hembra que los sintetiza. En *Manduca Sexta*, la síntesis de feromonas sexuales de contacto está íntimamente relacionada con una regulación hormonal y disponibilidad de nutrientes en la alimentación (Schal et al. 2003). En polillas, la liberación de feromonas sexuales volátiles demostró estar relacionada al tamaño de la hembra, y hembras de mayor tamaño resultaron ser más atractivas para los machos (Harari et al. 2011). Aún faltaría analizar si esta diferencia en la cantidad de alcoholes entre las hembras les confiere algún tipo de ventaja reproductiva entre ellas.

La producción de alcoholes grasos que participan en comunicación química ha sido reportada previamente en insectos, principalmente compuestos de relativamente bajo peso molecular. Una mezcla de alcoholes de cadenas cortas, sus derivados acetatos y (Z)-11-eicosenol son componentes de la feromona de alarma de las abejas (Pickett et al. 1982). En polillas, la mayor clase de feromonas sexuales en las hembras son compuestos insaturados de 10-18C con grupos funcionales oxigenados, principalmente alcoholes, ésteres de acetato y aldehídos (Jurenka 2003). Como señales químicas de contacto, sólo han sido reportados alcoholes en secreciones defensivas de insectos escamosos (Buckner 1993) y en *T. infestans* (Cocchiararo-Bastias et al. 2011).

En triatominos, el patrón general de apareamiento es similar entre las distintas especies, e involucra comportamientos llevados a cabo por los machos. Ha sido demostrado que odorantes volátiles liberados de las glándulas metasternales de las hembras sirven como activadores, atractantes y afrodisíacos para los machos, promoviendo el apareamiento en *T. infestans* y *R. prolixus* (Manrique and Lorenzo 2012). Hay algunas evidencias que un reconocimiento sexual por contacto también es necesario para generar los intentos de cópula en varias especies de triatominos. Ensayos preliminares en *T. sordida*, *T. delpontei* y *R. prolixus* demostraron comportamientos similares a los reportadas en *T. infestans* en cuanto a que la presencia de algún componente cuticular es requerido para iniciar los intentos de cópula por parte de los machos. En las dos especies del género *Triatoma* se evidenció un marcado dimorfismo sexual en cuanto a los HCs; las hembras de *T. sordida* contienen cantidades significativamente mayores de C₂₇ que los machos, mientras que las hembras *T. delpontei* contienen mayores cantidades de C₂₇ y C₂₉ respecto a los machos

(Juárez and Brenner 1986). Estudios preliminares de comportamiento sugirieron que estas diferencias tendrían un rol de reconocimiento sexual a corta distancia (Calderón-Fernández y Juárez, no publicado). En tanto que el/los compuestos atractantes aún no han sido identificados en *Rhodnius* (Lorenzo Figueiras, no publicado). Los HC cuticulares han sido previamente reportados como feromonas sexuales de contacto, entre otros, en la mosca tse (Carlson et al. 1984). Una vez puesto a punto el procedimiento de derivatización de alcoholes y extracción mediante HS-SPME, se realizó el análisis sobre extractos epicuticulares de especímenes macho y hembras de *T. pallidipennis* y *R. prolixus* disponibles en el laboratorio. En *T. pallidipennis*, se obtuvieron resultados similares a los de *T. infestans*, observando un marcado dimorfismo sexual en C₂₀-ol y C₂₂-ol (datos no mostrados). En cambio, en *R. prolixus* no se registró la presencia de ninguno de ellos en hembras o machos. Dado que el patrón de HC cuticulares en *R. prolixus* tampoco presentó dimorfismo sexual (Juárez et al. 2001; Mijailovsky y col., no publicado), la feromona de contacto en este caso podría corresponder a algún otro componente cuticular o potenciales derivados.

FARs

Las acil-CoA reductasas (FAR) constituyen una familia de genes conservados evolutivamente en todos los reinos de la vida; desempeñan diversos roles, que incluyen la síntesis de aceites de semilla en plantas, la biosíntesis de cera en mamíferos y la biosíntesis de feromonas en insectos (Antony et al. 2016). La bioquímica de la síntesis de alcoholes grasos ha sido estudiada en diversos organismos. En plantas, se ha demostrado que su síntesis se da principalmente por una reducción de 4 electrones del acil-CoA graso precursor para producir al alcohol correspondiente. Aunque esta reacción ocurre con la formación de un aldehído intermediario, no se genera la liberación del mismo. Las FAR generadoras de alcoholes son comúnmente proteínas integrales de membranas, que utilizan tanto NADH como NADPH como cofactor. Por su parte, las FAR formadoras de aldehídos son en general proteínas solubles o asociadas a la membrana periférica, y llevan a cabo la reducción del intermediario acil graso-CoA generando aldehído como producto final (Metz et al. 2000).

En mamíferos y aves, se identificaron dos grupos de isozimas con diferentes propiedades, denominadas FAR1 y FAR2. Por su parte, la familia de genes FAR de insectos es mucho más diversa, con 13 genes putativos FAR en *D. melanogaster* y algunos Lepidópteros, lo que indicaría una mayor especificidad de sustrato (Lassance et al. 2010, Liénard et al. 2010). Pese a esta gran diversidad, sólo hay un número muy reducido de genes codificantes de FAR caracterizados en insectos, que sintetizan alcohol como producto final. Los primeros dos genes FAR aislados de insectos son específicos de las glándulas de feromonas, y están involucrados en la biosíntesis de las mismas. BmFAR, de *Bombyx mori*, es responsable de la producción de la feromona sexual bombykol, (E, Z) -10,12-hexadecadien-1-ol (un alcohol de 16C) (Moto et al. 2003), mientras que OsFARXIII, una acil-CoA reductasa de *Ostrinia scapularis*, cataliza la producción de (Z)-11-tetradecenol (un alcohol de 14C), que se convierte posteriormente en sus derivados acetato o aldehído con actividad de feromona (Antony et al. 2009). Posteriormente se caracterizó otra FAR involucrada en la síntesis de feromonas en polillas (Antony et al. 2016). En *A. mellifera* se identificó una FAR (AmFAR1) involucrada en la producción de una gran cantidad de alcoholes alifáticos, de 14 a 22C, presentes en la cutícula de la abeja. AmFAR1 tiene preferencia por la síntesis de C₁₈-ol, y se encuentra expresada principalmente en la cabeza, donde se observa un mayor contenido de éste alcohol en la cutícula (Teerawanichpan et al. 2010). En *D. melanogaster*, una FAR produce alcoholes grasos de 24 y 26C que confieren propiedades hidrofóbicas a las tráqueas (Jaspers et al. 2014).

En el genoma de *R. prolixus* se identificaron 13 secuencias que codificarían para genes FAR, donde 5 de ellas corresponden a una expansión exclusiva de *Rhodnius* (Majerowicz et al. 2017). En el transcriptoma de integumento de *T. infestans* hemos identificado transcritos que corresponderían a 10 genes FARs. Un análisis filogenético de estas secuencias las agrupa muy cercanas a sus correspondientes ortólogas de *R. prolixus*, y distribuidas en todos los clados de insecto; incluso en el grupo que incluye a las FARs humanas. En cuanto a la funcionalidad, seguramente estén involucradas en la síntesis de componentes cuticulares, ya que la presencia de alcoholes grasos en *T. infestans* y *R. prolixus* es exclusiva del integumento. Sin embargo, es difícil inferir funciones específicas o posible preferencia de sustrato a partir del análisis filogenético debido a dos cuestiones, en primer lugar, la escasa cantidad de genes FAR bien caracterizados limita el análisis; y en

segundo lugar, dentro de los genes caracterizados, no se observa una correlación en cuanto a la función o a la especificidad de longitud de cadena del sustrato en ninguno de los grupos.

El análisis de expresión diferencial de 9 de los 10 genes FAR de *T. infestans* mediante RT-qPCR en integumento mostró una expresión significativamente mayor de dos de ellas en las hembras respecto a los machos (JAS01706 y JAS01707). Se desconoce la participación de estas enzimas en la síntesis de alcoholes o aldehídos. Es interesante destacar que encontramos una diferencia en el contenido relativo de ambos compuestos en función del sexo, además de la síntesis de C₂₀-ol y C₂₂-ol exclusivamente en las hembras. Alguna de estas enzimas sobreexpresadas en hembras podría estar involucrada en la síntesis de los alcoholes con actividad de feromona sexual. Estos resultados preliminares abren el escenario a futuros estudios direccionados a dilucidar las enzimas involucradas en la síntesis de feromonas sexuales de contacto en *T. infestans*. Mediante el uso de técnicas de silenciamiento génico mediante ARN de interferencia, se podría estudiar si el bloqueo en la transcripción de dichos genes se correlaciona con la interrupción en la síntesis de estos componentes en la cutícula.

Para el desarrollo/mejoramiento de nuevas técnicas de control es necesario conocer aspectos biológicos y bioquímicos del insecto plaga o de interés sanitario. El uso más extendido y exitoso de feromonas ha sido en el monitoreo de la aparición de insectos y aumentos poblacionales en el agro. Desplegadas en trampas, las feromonas pueden indicar la presencia de insectos plaga en el momento de la emergencia o la invasión a los cultivos, y ayudar a tomar la decisión de utilizar pesticidas. También se han desarrollado trampas para control vectorial que combinan el uso de compuestos atractantes con insecticidas para eliminar parte de la población; se ha reportado el uso de ovitrampas contra el mosquito transmisor del dengue *Aedes aegyptis* que incluyen el uso de mezclas de compuestos atractantes y el uso de insecticidas tanto químicos como biológicos (Snetselaar et al. 2014).

El conocimiento de los compuestos con función de feromona sexual y las rutas de biosíntesis de dichos compuestos también es clave en el desarrollo de nuevas herramientas de control vectorial, ya que el control químico clásico debe optimizarse empleando

estrategias alternativas en donde se incorporen ingredientes activos no tóxicos a la formulación. Muchas veces, el uso de análogos sintéticos es posible, como es el caso del C₂₀-ol y C₂₂-ol, e incluiría su uso para atraer y matar o interrumpir el apareamiento y reproducción de la especie. En este laboratorio se han desarrollado trampas para *T. infestans* que combinan el uso de extractos lipídicos de composición similar a la epicutícula que sirven como feromonas de agregación (Lorenzo Figueiras et al. 2009) y el uso de hongos entomopatógenos para la eliminación de los mismos (Juárez et al. 2008, Forlani et al. 2014, 2015). El agregado de cantidades precisas de C₂₀-ol y C₂₂-ol a ésta formulación mejoraría la eficiencia de la trampa, al favorecer la permanencia y eliminación de los machos que son atraídos, y así disminuir la capacidad reproductiva de la población.

**5 SECCIÓN II: ESTUDIO DE LOS GENES CITOCROMO P450
(CYP) DEL CLAN 4 EN INTEGUMENTO DE TRIATOMINOS**

5.1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CYP4Gs.

Se comenzó con el estudio de las secuencias codificantes de CYP4G. Se decidió utilizar ejemplares de *R. prolixus* para esta sección ya que su ciclo de vida es muy sincronizado, lo que permite un fácil control sobre las condiciones y tiempos de muda durante un ensayo. Además, el genoma completo de este triatomino se encuentra secuenciado y publicado y es el triatomino modelo sobre el cual hay más información disponible en bibliografía.

La secuencia de CYP4G107 está codificada por el gen RPRC013847 (VectorBase), es la única variante proveniente del corte y empalme de 12 exones, y presenta un tamaño de 1888 pares de bases, incluyendo una región no traducida en su extremo 3' de 247pb (3'UTR). Este transcripto se traduce putativamente en una proteína funcional de 546 residuos aminoacídicos (Figura5-1A). La secuencia de CYP4G106 está codificada por el gen RPRC003227 (VectorBase), también es la única variante del corte y empalme de 12 exones, con un tamaño del transcripto de 1901 pares de bases. La proteína tiene un tamaño de 562 residuos (Figura 5-1B)

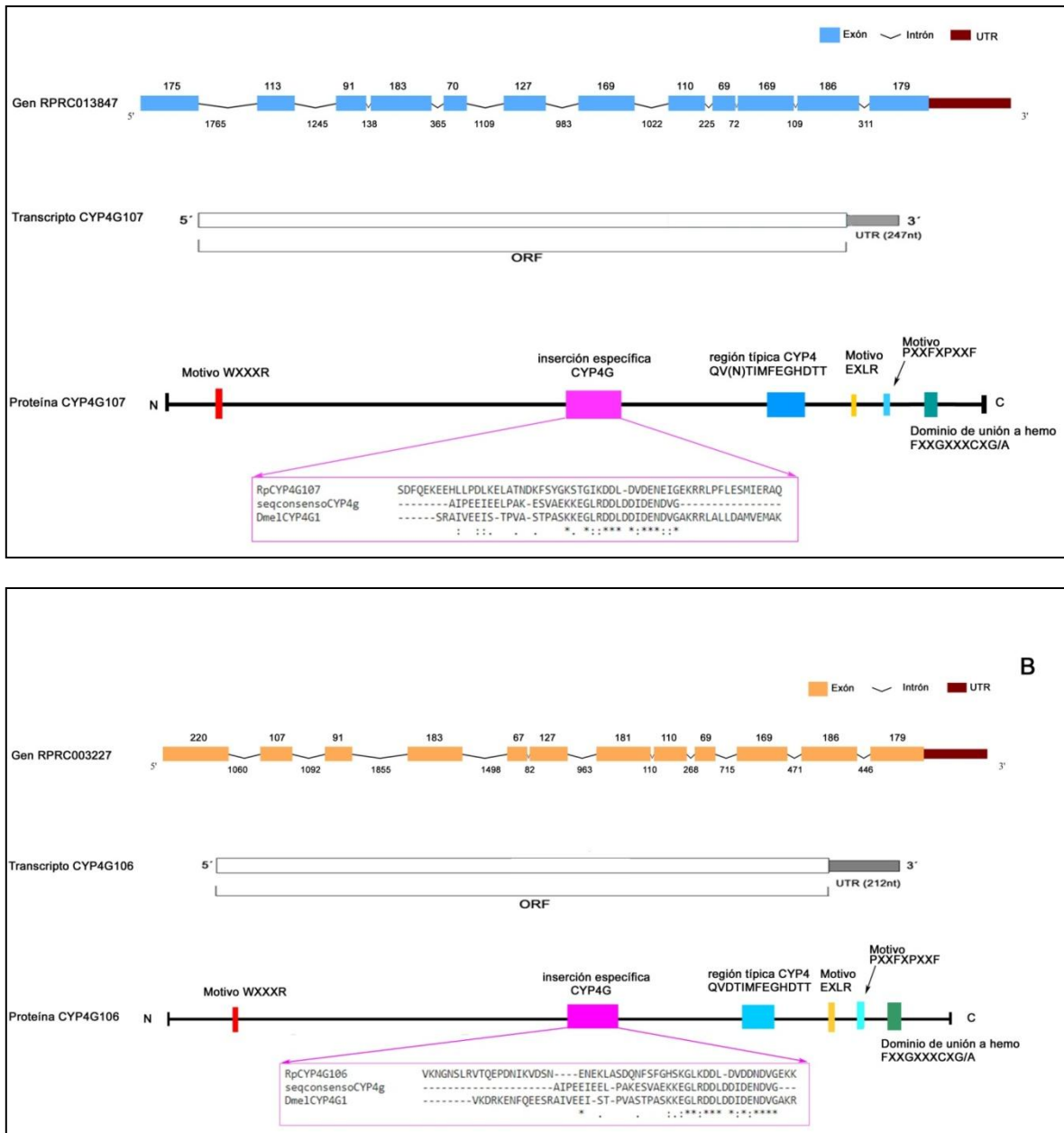


Figura 5-1: Análisis de la secuencias CYP4G107 (A) y CYP4G106 (B) de *Rhodnius prolixus*. Se muestra la organización exón-intrón de cada gen, donde los números corresponden a la longitud en pares de bases de cada uno de ellos, y el ARNm que codifica para la proteína funcional. En la parte inferior de cada figura, se representan los motivos que caracterizan a las proteínas CYP4G, incluyendo 4 motivos conservados de todas las P450 y la región típica que caracteriza al clan 4. La inserción específica de CYP4G se encuentra recuadrada en rosa. La misma se identificó en cada caso al alinear las secuencias de *Rhodnius* con la correspondiente en *Drosophila melanogaster* (Dme1CYP4G1), utilizando la secuencia consenso CYP4G reportada en Qiu et al (2012) mediante el programa Clustal Omega. Los símbolos representan el grado de identidad entre las secuencias.

En ambos casos, las secuencias de aminoácidos deducidas presentan los motivos conservados de las proteínas P450, tal como se indica en la Figura 5-1. Estos motivos son

los responsables de la estructura tridimensional de la proteína y sus interacciones. El motivo de unión al hemo (FXXGXRXCXG/A), cerca del extremo C-terminal contiene cisteína (C), aminoácido fundamental para la unión del grupo hemo. Este ligando es responsable de la absorción típica de 450nm del complejo FeII-CO de P450. La secuencia consenso WXXXR es el elemento estructural de la hélice-C, y es la región que interactúa con el grupo hemo. El motivo **ExLR** se encuentra en la hélice K. Se piensa que estabiliza la estructura general a través de un conjunto de interacciones salinas (**E–R–R**) (E: glutamato; R: arginina) con el otro motivo conservado PxxFxPE/DRF, que se encuentra después de la hélice K frente al motivo **ExLR** (Feyereisen 2012). Los alineamientos de secuencias de aminoácidos mostraron que tanto CYP4G107 y CYP4G106 poseen las secuencias de motivos característicos de P450s. El motivo conservado de 13 residuos EVDTIMFEGHDTT es una característica de la familia 4 de CYP y no es compartido por otras familias CYPs (Bradfield et al. 1991). Finalmente, una inserción característica rica en Asp/Glu (D/E) de 34 residuos es exclusiva de la subfamilia 4G (secuencia consenso de CYP4G) (Qiu et al. 2012).

Con respecto a *T. infestans*, no se disponen de las secuencias completas de los genes CYP4Gs. A partir del transcriptoma de *T. infestans* y la información disponible de *R. prolixus*, se identificaron y caracterizaron las secuencias putativamente codificantes de CYP4G. Para Ti-CYP4G107 se dispone de un transcripto correspondiente de 954 pares de bases de longitud, (318 aminoácidos), que presenta una identidad del 81% con su correspondiente en *R. prolixus*, en la región comprendida entre los pares de base 460 a 1414, que corresponden a los aminoácidos 154 al 471. Este transcripto codifica para los dominios ExLR, PxxFxPE/DRF, el dominio típico de las CYP4 y la inserción de las CYP4G (Código de acceso GenBank JAS02889).

Para el transcripto Ti-CYP4G106, se dispone de dos fragmentos, uno de 485 pares de bases (161 aminoácidos), que presenta una identidad del 84% con su correspondiente en *R. prolixus*, y correspondería a la región comprendida entre 1225 y 1710 pares de bases, aminoácidos 409-562. Este transcripto codifica para los dominios ExLR, PxxFxPE y el dominio de unión a hierro FXXGXRXCXG. El segundo fragmento es de 363 pares de bases (121 aminoácidos), y presenta una identidad del 85% con la región comprendida entre los pares de bases 21 a 384 en la CYP4G106 de *R. prolixus*. Esta región corresponde

al extremo N-terminal y contiene la región que codifica para el dominio WxxxR. Código de acceso GenBank JAS02890.

Mediante un análisis filogenético que se muestra en la Figura 5-2, se observa que ambas secuencias se encuentran muy cercanas a sus ortólogos en *R. prolixus*. Las 4 secuencias se encuentran formando parte del mismo clado que la CYP4G15 de *D. melanogaster* junto con la CYP4G16 de *A. gambiae*. En un clado separado, se encuentran la CYP4G1 de *D. melanogaster* y la CYP4G17 de *A. gambiae*.

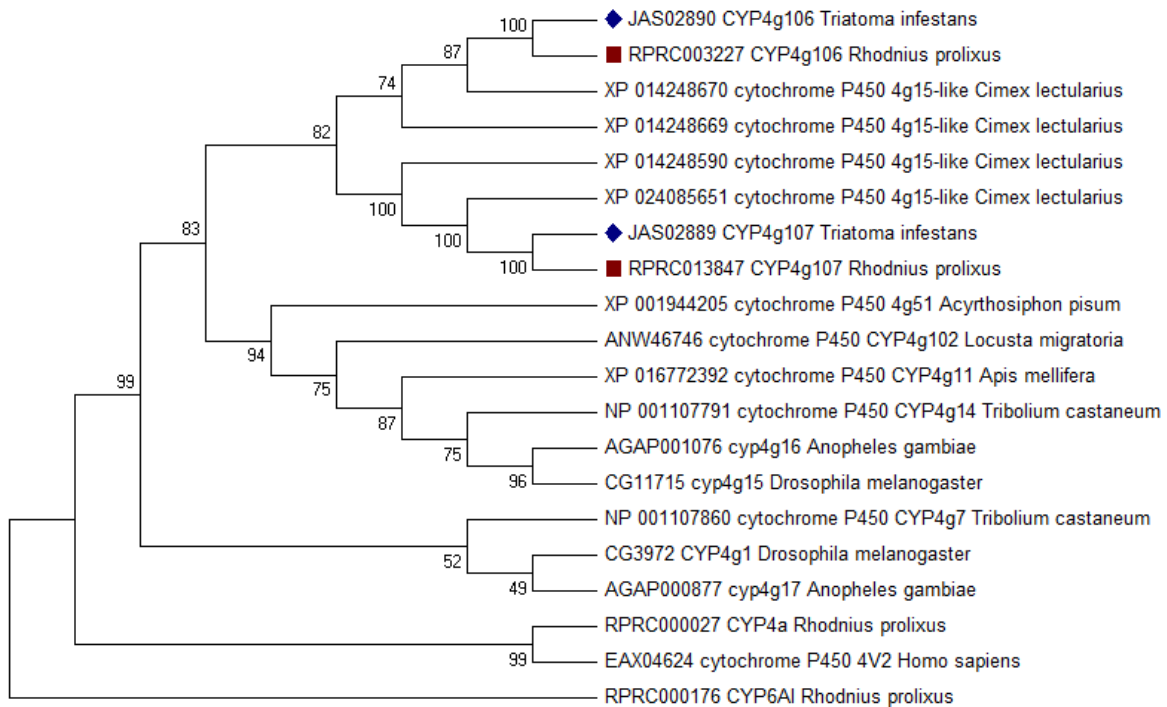


Figura 5-2: Árbol filogenético de máxima verosimilitud de las CYP4G de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*. Los números en los nodos indican el soporte para cada agrupación, como el porcentaje de 1000 réplicas “bootstrap”. Las secuencias del clan 4 CYP4A (*R. prolixus*) y CYP4v2 (*homo sapiens*) y del clan 3 CYP6AI (*R. prolixus*) fueron usadas como grupos externos.

5.1.1 EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE CYP4GS EN DISTINTOS TEJIDOS

El análisis de expresión relativa por qPCR de CYP4G107 y CYP4G106 en integumento, cuerpo graso, intestinos, túbulos de Malpighi, glándulas salivales y tejido nervioso utilizando como genes de referencia la β -actina y el EF1 de *R. prolixus* se muestra en la Figura 5-3. Tanto CYP4G107 como CYP4G106 se expresan principalmente en integumento. Un nivel muy bajo de expresión se detectó en cuerpo graso, que podría estar asociado a contaminación. No se registró expresión en intestinos, túbulos de Malpighi y

glándulas salivales. Con respecto al tejido nervioso, no se detectó expresión de CYP4G107 pero se registró un bajo nivel de expresión de CYP4G106.

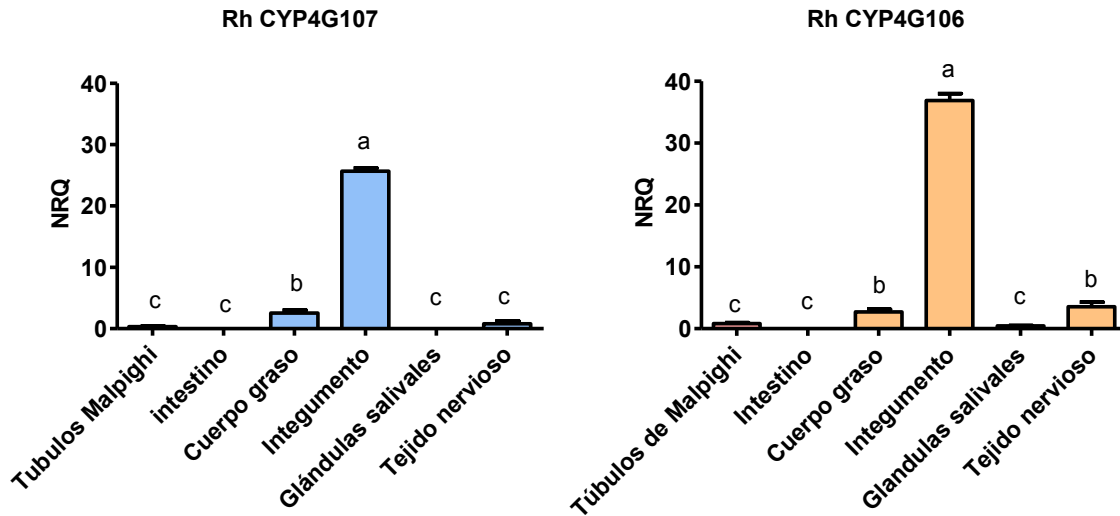
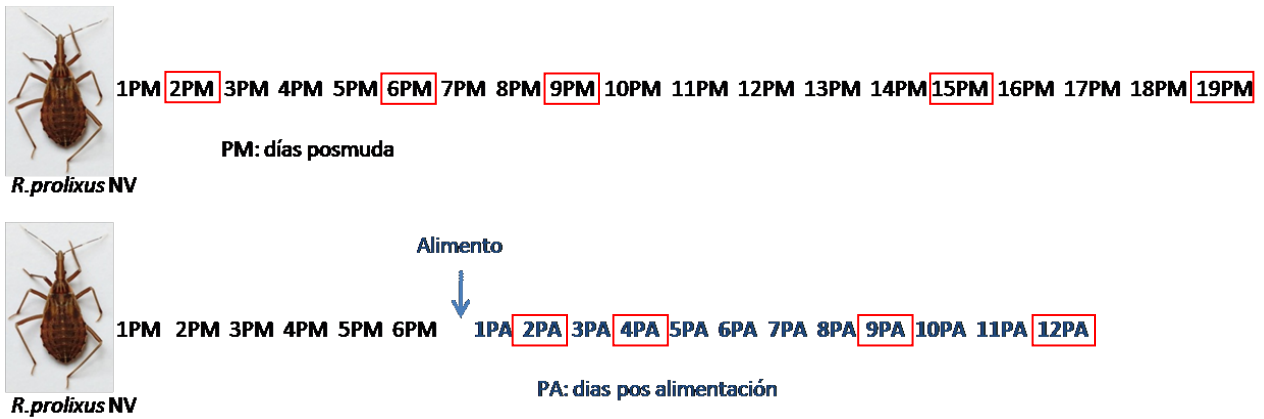


Figura 5-3: Expresión relativa de CYP4G en ninfas NV *Rhodnius prolixus* en distintos tejidos. Se midió por qPCR la expresión de CYP4G en túbulos de Malpighi, intestino medio posterior, glándulas salivales, tejido nervioso, cuerpo graso e integumento. NRQ: cantidad relativa normalizada con dos genes de referencia (actina y EF1). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre los tejidos ($P < 0,05$; ANOVA de un factor; test de Tukey).

5.1.2 EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE CYP4GS EN EL INTEGUMENTO A LO LARGO DEL CUARTO ESTADIO NINFAL

Con el fin de analizar el patrón de expresión de los transcritos CYP4G en integumento durante el estadio NIV de *R. prolixus*, se realizaron extracciones de ARN de integumento en distintos momentos del ciclo. Dado que la alimentación provoca grandes cambios en el metabolismo del insecto, se estudió el patrón de expresión tanto en condiciones de alimentación como en ayunas. A continuación se muestra un diagrama de las condiciones ensayadas.



Se extrajo el ARN del integumento de los insectos en las siguientes condiciones de ayuno: 2, 6, 9, 15 y 19 días pos muda (PM); y en las siguientes condiciones alimentados: 2, 4, 9 y 12 días pos alimentados (PA). Se analizó la expresión de cada CYP4G obteniéndose los siguientes patrones de expresión:

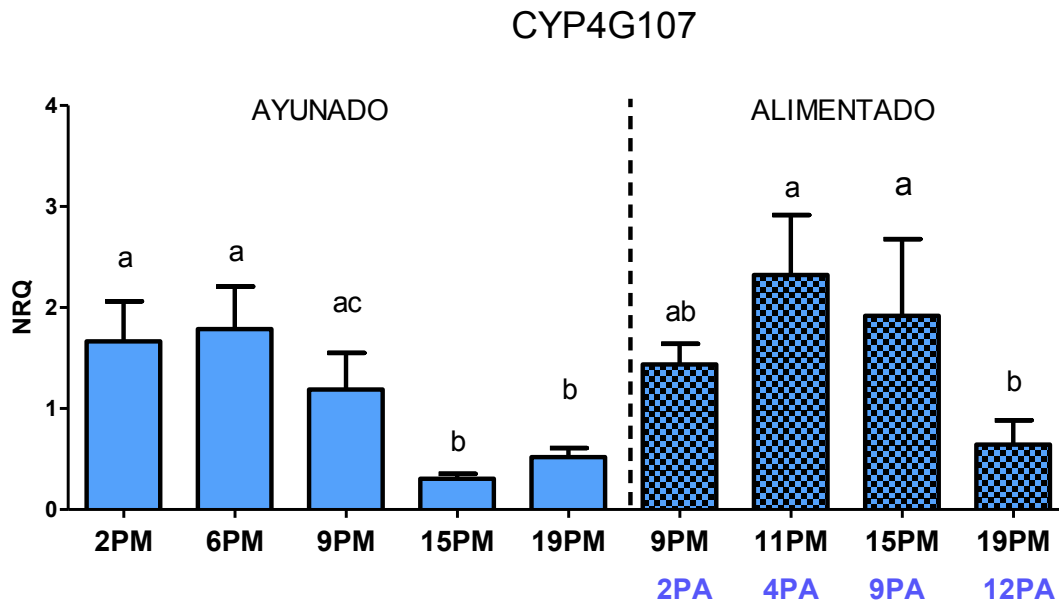


Figura 5-4: Expresión relativa de CYP4G107 en integumento bajo distintas condiciones durante el estadio IV de *Rhodnius prolixus*: ayunados (2PM, 6PM, 9PM, 15PM y 19PM días pos muda) y alimentados (2PA, 4PA, 9PA, 12PA días pos alimentado). NRQ: cantidad relativa normalizada con dos genes de referencia (Actina y EF1). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre los días medidos ($P < 0,05$; ANOVA de un factor; test de Tukey).

Como se ve en el gráfico, la expresión de CYP4G107 dentro de los primeros 9 días PM ayunados presenta valores de expresión similares entre los distintos días. Entre el día 15 y 19M, baja significativamente su expresión. En insectos alimentados, el nivel de expresión es similar a los registrados en ayuno, alcanzando el pico máximo al día 4PA. Al día 12PA cercano a la muda, el nivel de expresión vuelve a caer significativamente.

La mayor diferencia de expresión se registra al día 15PM en el insecto ayunado respecto al alimentado

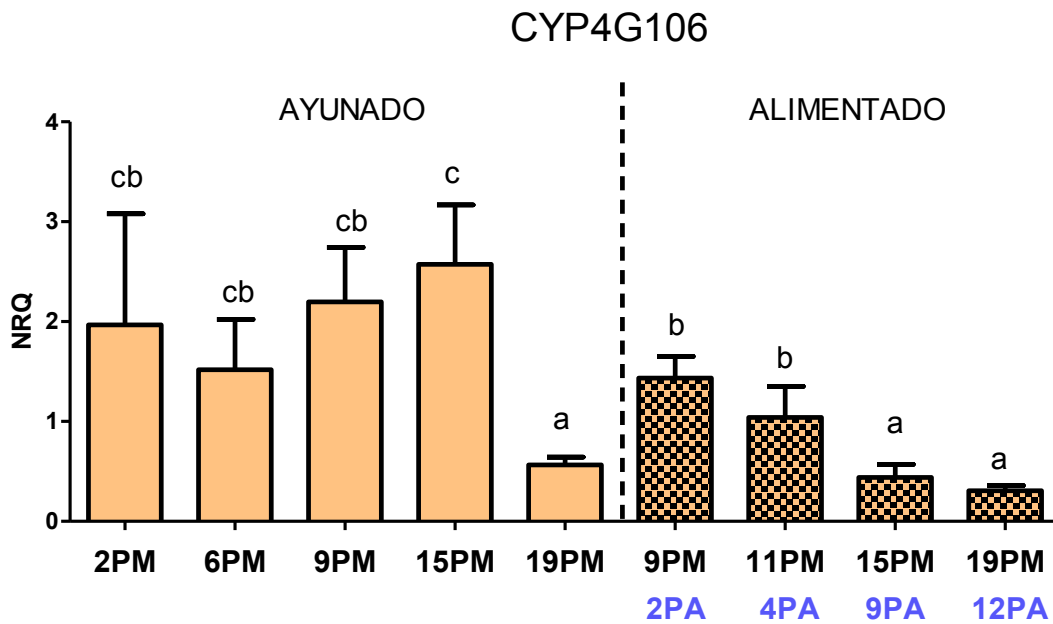


Figura 5-5: Expresión relativa en integumento de CYP4G106 en distintas condiciones del estadio IV de *Rhodnius prolixus* ayunados (2PM, 6PM, 9PM, 15PM y 19PM días pos muda) y alimentados (2PA, 4PA, 9PA, 12PA días pos alimentado). NRQ: cantidad relativa normalizada con dos genes de referencia (Actina y EF1). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre los días medidos ($P < 0,05$; ANOVA de un factor; test deTukey).

Con respecto al transcrito CYP4G106, se observan valores de expresión altos y constantes durante el ayuno, disminuyendo recién al día 19PM. Con el insecto alimentado, el nivel de expresión es mayor al día 2 y 4PA, disminuyendo significativamente en los días 9 y 12PA. El nivel de expresión de CYP4G106 presenta sus niveles máximos durante el ayuno. Nuevamente hay una gran diferencia en el nivel de expresión al día 15PM en condiciones ayunadas y alimentadas.

5.2 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS CYP4Gs

Para continuar con el análisis de las CYP4Gs, se procedió al estudio funcional de las mismas mediante silenciamiento génico empleando la técnica de ARN de interferencia (ARNi).

5.2.1 DISEÑO Y EFICIENCIA DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO

Se sintetizó dsCYP4G106, dsCYP4G107 y dsCTR, y a continuación se inyectó 1 μ l de cada una de las soluciones en el abdomen de insectos *R. prolixus* NIV. Dado que las secuencias de CYP4G106 y CYP4G107 presentan regiones con alta similitud entre ellas (Figura S1), la eficiencia del silenciamiento para cada transcritto incluyó el análisis del cambio de nivel de expresión del transcritto a silenciar así como también del nivel de expresión del otro transcritto CYP4G.

A continuación se representa la región de silenciamiento obtenida a partir de los cebadores elegidos para CYP4G107 (dsCYP4G107).



Figura 5-6: Región de silenciamiento para CYP4G107.

El análisis del silenciamiento de CYP4G107 luego de la inyección de dsCYP4G107 se muestra en la Figura 5-7. La expresión relativa describe cuantas veces se expresa el gen en los insectos silenciados respecto a los controles. Se observa que el nivel de expresión de CYP4G107 es 0,06 veces respecto a su expresión en los insectos controles, evidenciando una reducción en el nivel de expresión del gen en más de un 90% ($P < 0,001$); el gen CYP4G106 no presentó diferencias en su expresión.

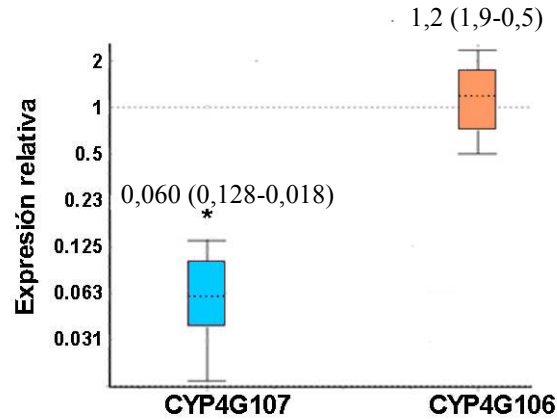


Figura 5-7: Expresión relativa de las CYP4Gs luego de la inyección de dsCYP4G107 en el abdomen de *Rhodnius prolixus* NIV. Los valores de la expresión relativa indican el nivel de expresión del gen de interés en los insectos inyectados dsCYP4G107 respecto al nivel de expresión en los controles dsCTR. El asterisco * indica diferencias significativas (P < 0.05).

Para el silenciamiento de CYP4G106, el par de cebadores elegidos corresponden a la siguiente región del transcripto:

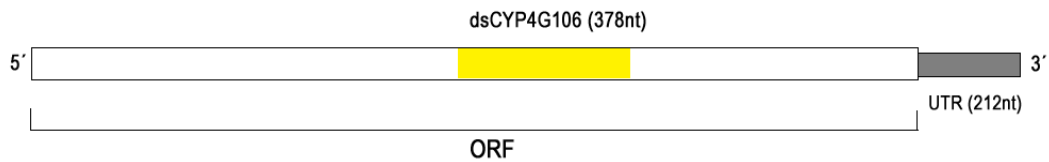


Figura 5-8: Región de silenciamiento para CYP4G106 (dsCYP4G106)

El análisis de expresión relativa en los insectos inyectados con dsCYP4G106, no logró un silenciamiento del gen. Se repitió el ensayo con una dosis mayor de dsCYP4G106. Inyectando 1,6µg de dsCYP4G106 tampoco se logró un silenciamiento efectivo. En este punto, se optó por diseñar un nuevo par de cebadores en una región distinta del transcripto, como se muestra a continuación:

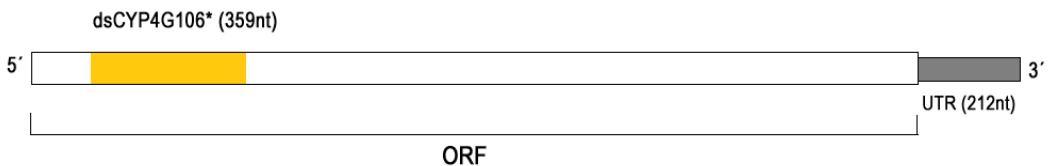


Figura 5-9: Nueva región de silenciamiento para CYP4G106 (dsCYP4g106*)

Se sintetizó dsCYP4G106* a una concentración 1 µg/ul, y se inyectaron insectos. El análisis del silenciamiento en este caso, evidenció una expresión relativa de CYP4G106 en los insectos silenciados respecto a los controles de 0.015 veces (0,010-0,020), representando una disminución significativa del 98 % ($P < 0,001$). El nivel de expresión de CYP4G107 no se vio disminuido, al contrario, se observó un aumento en la expresión relativa respecto de los controles de 1,6 veces (1,2-2,1), representando un aumento del 60 %.

Se repitió el ensayo inyectando una dosis menor de dsCYP4G106* (0,4 µg/ul), obteniendo resultados similares: una disminución en la expresión de CYP4G106 en un factor de 0,046 (0,027-0,069), representando una disminución del 95 % ($P = 0,002$), mientras que la expresión de CYP4G107 aumentó nuevamente en 1,6 veces (1,1-2,7), representando un aumento del 60 % ($P = 0,009$) (Figura 5-10). Estos resultados muestran que la inducción en la expresión de CYP4G107 fue independiente de la concentración de dsCYP4G106 inyectada.

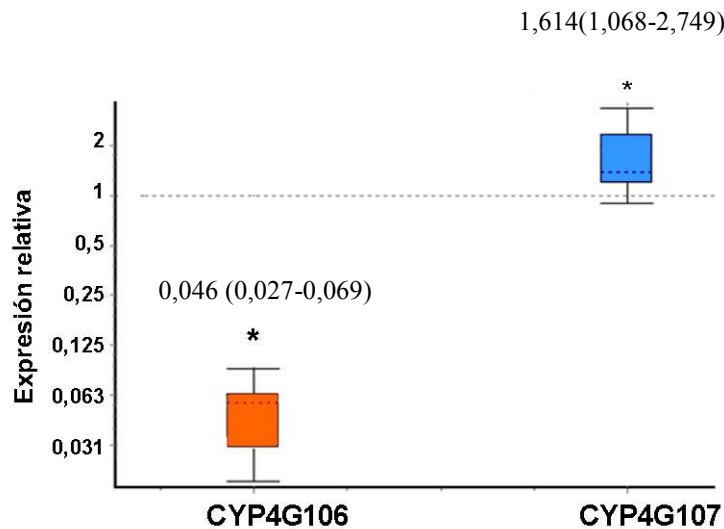


Figura 5-10: Expresión relativa de las CYP4Gs luego de la inyección de dsCYP4g106* en el abdomen de *Rhodnius prolixus* NIV. Los valores de expresión relativa indican el nivel de expresión del gen de interés en los insectos inyectados dsCYP4G106 respecto al nivel de expresión en los controles dsCTR. El asterisco * indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

5.2.2 EFECTO DEL SILENCIAMIENTO EN EL FENOTIPO DE HC

Tal como se describe en Materiales y Métodos, el análisis de los HC resultantes del silenciamiento de CYP4G107 y CYP4G106 en ninfas NIV se analizó en insectos NV. En cada ciclo de muda, la epicutícula es eliminada y se deposita una nueva, que comienza a

sintetizarse durante el estadio anterior. Para evaluar cómo se vio afectado el fenotipo de HC en insectos silenciados, se trabajó una vez que los mismos mudaron a NV.

El perfil de hidrocarburos epicuticulares de *R. prolixus* NV ha sido previamente reportado, y consta principalmente de HC lineales de número impar de átomos de carbono, y de una mezcla compleja de HC mono, di, tri y tetra metil-ramificados de longitudes de cadena entre 35 y 41 carbonos (Juárez et al. 2001). En la Figura 5-11 se muestra el perfil cromatográfico obtenido con los insectos control utilizados en este trabajo. La composición de HC cuticulares e internos es similar, pero se invierten las proporciones entre HC lineales y HC ramificados. En la epicutícula predominan los lineales (Figura 5-11A), mientras que en los internos los ramificados (Figura 5-11B).

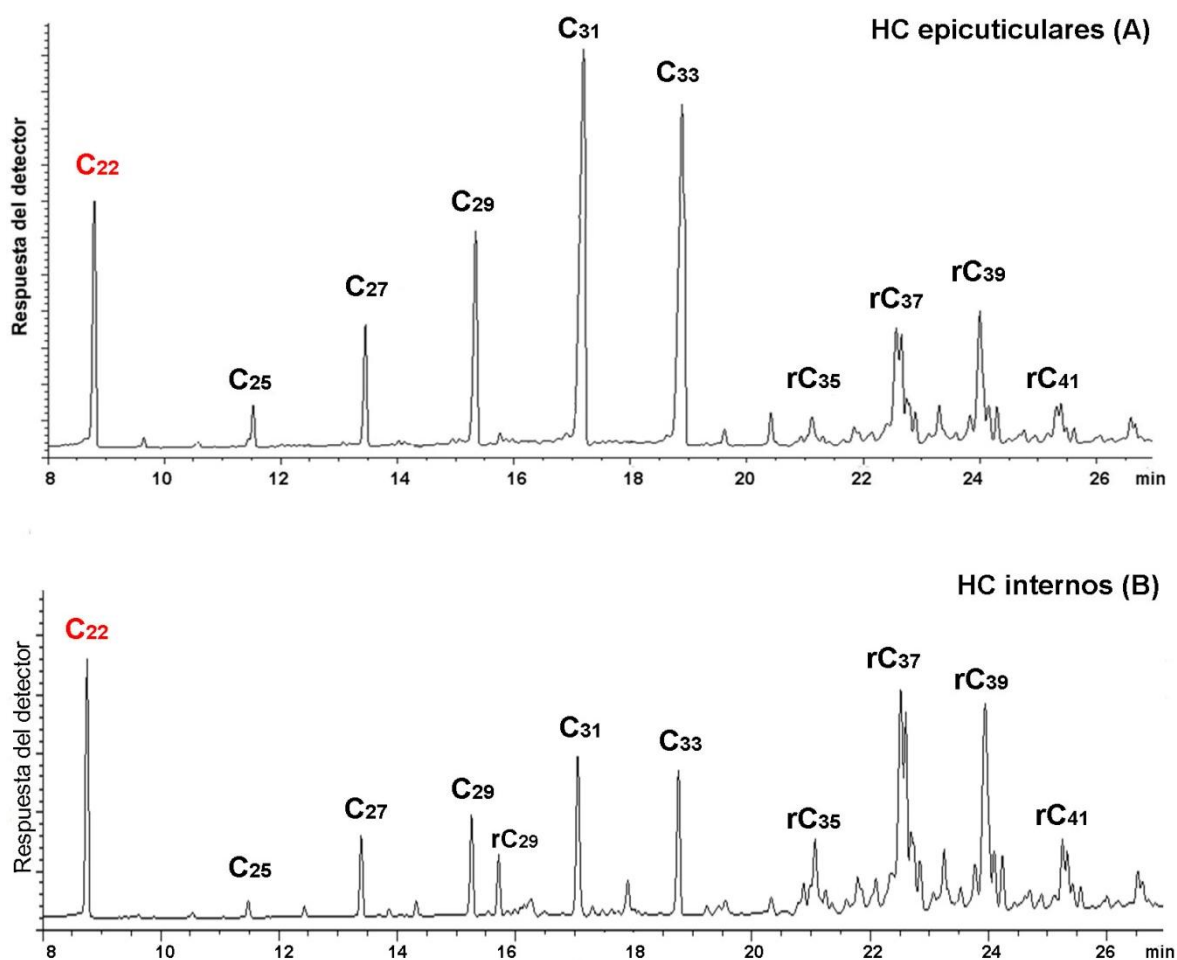


Figura 5-11: Perfil de hidrocarburos epicuticulares e internos extraídos con hexano de *Rhodnius prolixus* NV.

5.2.2.1 SILENCIAMIENTO dsCYP4G107

Se inyectaron ninfas NIV con dsCYP4G107 y dsCTR, se alimentaron y se dejaron mudar al siguiente estadio. El tiempo de muda no se vio modificado, y tanto los insectos control como los silenciados mudaron a NV en el tiempo esperado. Fenotípicamente, los insectos NV dsCYP4G107 presentaron iguales características morfológicas que los controles en cuanto a tamaño y coloración.

Se extrajeron los lípidos epicuticulares e internos de insectos NV dsCYP4G107 y dsCTR, se separó la fracción HC por columna y se analizaron los HC mediante CGC-FID. El análisis de HC epicuticulares e internos se realizó comparando tanto la cantidad total de HC en cada uno de los extractos como la proporción entre HC lineales y ramificados en los insectos dsCTR y dsCYP4G106.

HC epicuticulares.

A continuación se muestra como ejemplo un cromatograma de HC de epicutícula de *R. prolixus* NV dsCTR y dsCYP4G107 (Figura 5-12). El perfil es similar en ambos casos, pero en los insectos dsCYP4G107 se ve una disminución en los HC ramificados.

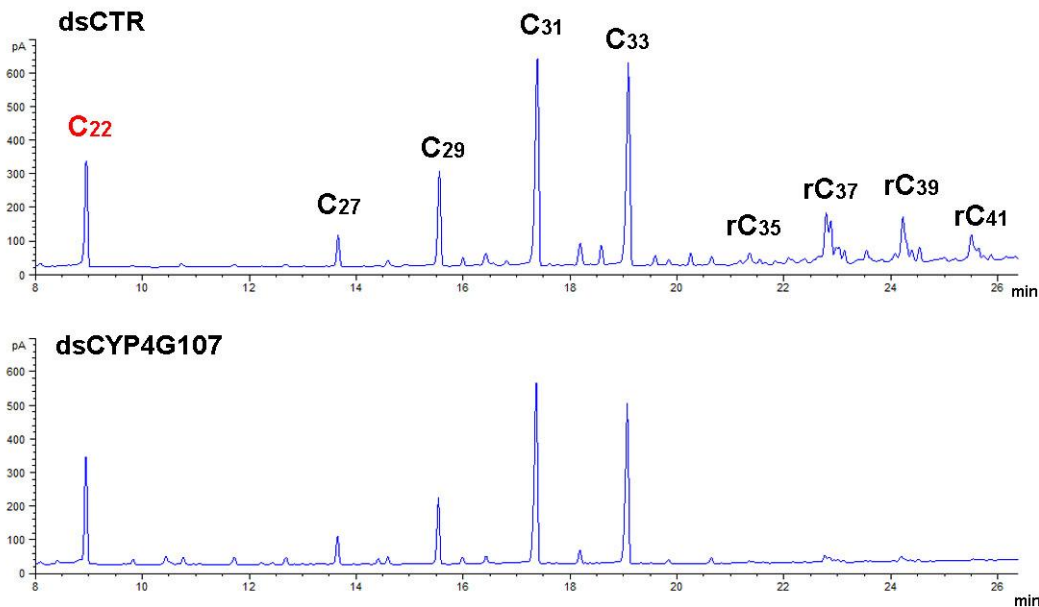


Figura 5-12: Perfil cromatográfico de HC de epicutícula de *Rhodnius prolixus* NV dsCTR y dsCYP4G107.

Se realizó la cuantificación integrando cada uno de los picos presentes en las muestras, refiriéndolo al estándar interno. En la Tabla 7 y en la Figura 5-13 se muestra el análisis cuantitativo del perfil de HC de epicutícula en los insectos dsCTR y dsCYP4G107. En los insectos control la cantidad de HC totales es de 927,6 ng/insecto, con aproximadamente un 70% de HC lineales y un 30% de HC ramificados. Al analizar el perfil de los HC en los insectos dsCYP4G107, se observa una disminución en la cantidad de HC totales (502ng/insecto), debida a una disminución en los HC lineales pero en su mayor parte a una marcada disminución en los HC ramificados de 302,3 a 44,5 ng/insecto.

Tabla 7: Cuantificación de HC epicuticulares totales, lineales y ramificados de insectos *Rhodnius prolixus* NV dsCTR y dsCYP4G107.

	HC epicuticulares totales (ng/insecto \pm SD)	HC epicuticulares lineales (ng/insecto \pm SD)	HC epicuticulares ramificados (ng/insecto \pm SD)
dsCTR	927,6 \pm 142,6	625,3 \pm 90,1	302,3 \pm 76,5
dsCYP4G107	502,0 \pm 104,3	452,4 \pm 92,7	44,5 \pm 13,5

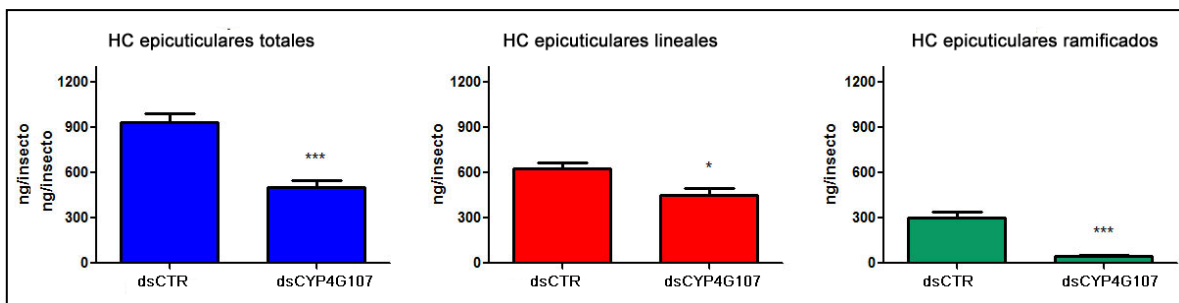
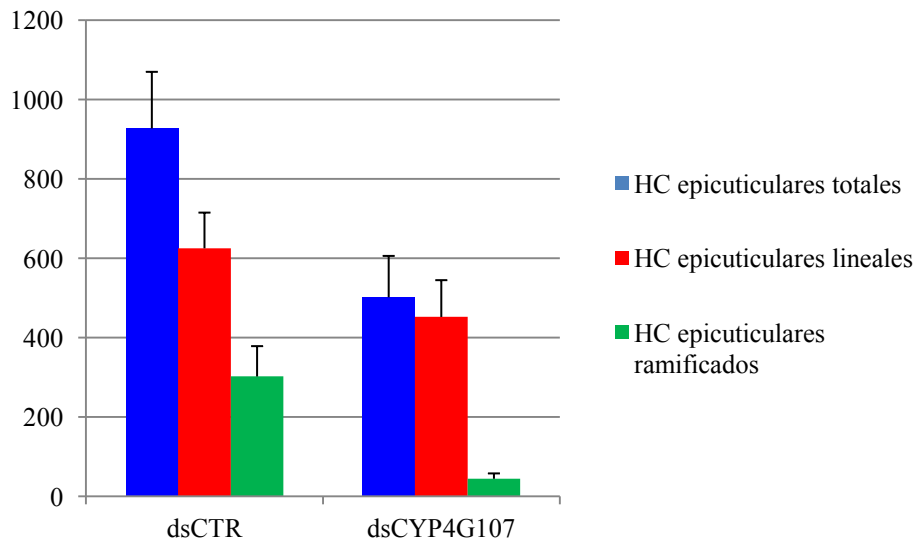


Figura 5-13: Efecto de dsCYP4G107 en el contenido de HC epicuticulares de *Rhodnius prolixus* ninfas V estadio (parte superior). Comparación de HC totales, lineales y ramificados en grupo control y

silenciado. Contenido de HC totales, lineales y ramificados respectivamente en insectos control y silenciados. Los HC se expresan en nanogramos (ng) de HC por insecto. Los datos se muestran como media \pm SD. Los asteriscos *,*** por encima de las barras indican diferencias significativas $P < 0,05$ y $0,001$ respectivamente, entre grupos dsCTR y dsCYP4G107 (parte inferior)

HC internos.

El perfil de HC internos de insectos NV dsCTR y dsCYP4G107 se muestra a continuación (Figura 5-14).

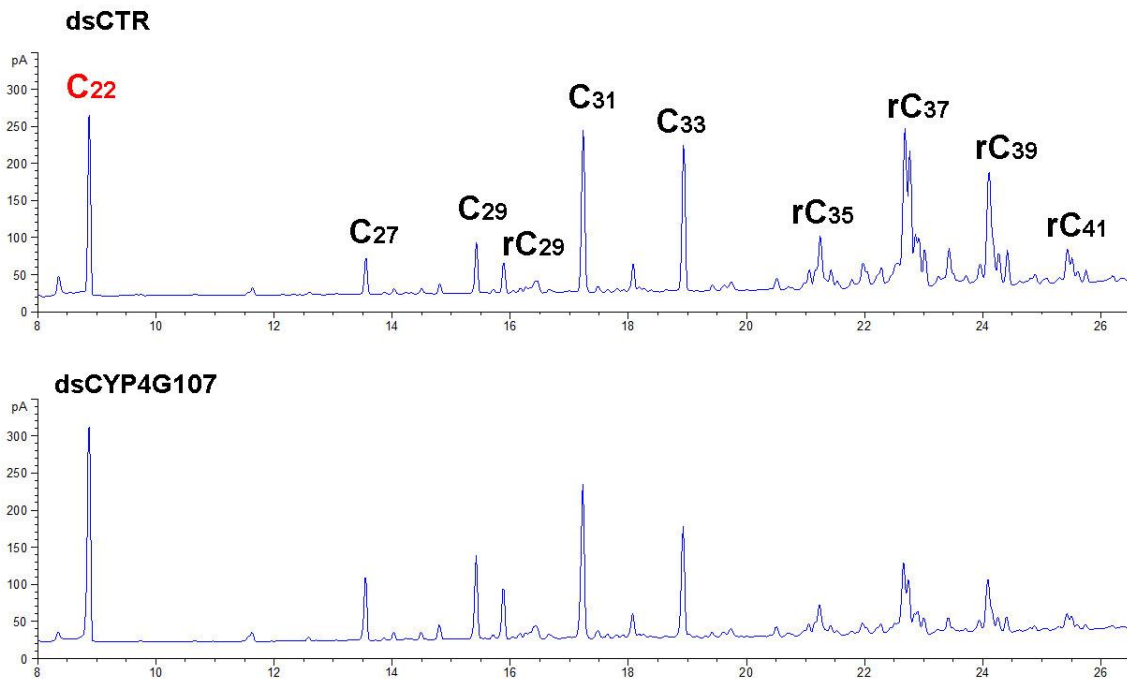


Figura 5-14: Perfil cromatográfico de HC internos de *Rhodnius prolixus* NV dsCTR y dsCYP4G107.

En la Tabla 8 y en la Figura 5-15 se muestra la cuantificación de los HC internos. Los insectos control contienen un total de 1062,7 ng/insecto, donde aproximadamente un 30% corresponden a HC lineales y un 70% a HC ramificados. El análisis de los HC en los insectos dsCYP4G107 muestra una reducción significativa en los HC internos totales (444,5 ng/insecto), que se debe principalmente en una marcada disminución de los HC ramificados (Figura 5-15). La proporción HC lineales/HC ramificados 30:70 en el insecto dsCTR se ve modificada en el insecto dsCYP4G107. La proporción relativa de HC ramificados se ve significativamente disminuida.

Tabla 8: Cuantificación de HC internos totales, lineales y ramificados de insectos *Rhodnius prolixus* NV dsCTR y dsCYP4G107.

	HC internos totales (ng/insecto \pm SD)	HC internos lineales (ng/insecto \pm SD)	HC internos ramificados (ng/insecto \pm SD)
dsCTR	1062,7 \pm 64,4	299,0 \pm 17,2	763,7 \pm 66,2
dsCYP4G107	444,5 \pm 69,8	238,2 \pm 36,1	203,3 \pm 53,9

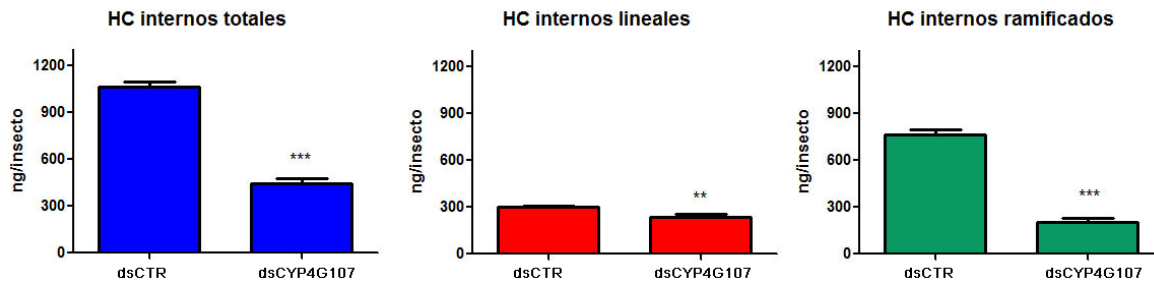
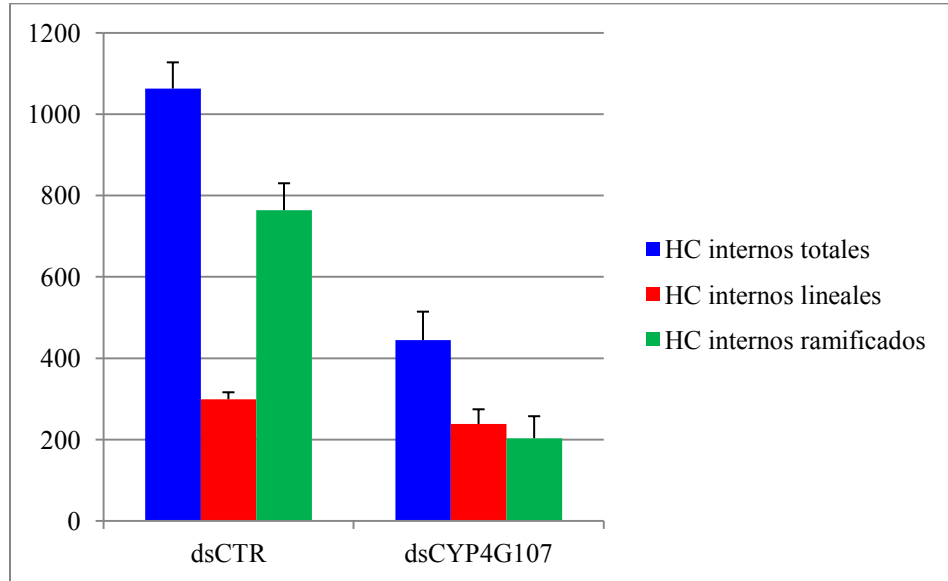


Figura 5-15: Efecto de dsCYP4G107 en el contenido de hidrocarburos (HC) internos en *Rhodnius prolixus* ninfas V estadio (parte superior). Comparación de HC totales, lineales y ramificados internos en grupo control y silenciado. (B), (C) y (D) Contenido de HC totales, lineales y ramificados internos respectivamente en insectos control y silenciados. Los HC se expresan en nanogramos (ng) de HC por insecto. Los datos se muestran como media \pm SD. Los asteriscos **, * por encima de las barras indican diferencias significativas $P < 0,01$ y $0,001$ respectivamente, entre grupos dsCTR y dsCYP4G107 (test de Student) (parte inferior)**

5.2.2.2 SILENCIAMIENTO dsCYP4G106

Se inyectaron ninfas NIV con dsCYP4G106 y dsCTR, se alimentaron y se dejaron mudar al siguiente estadio. En este caso, tampoco se vio afectado el tiempo de muda, y tanto los

insectos control como los silenciados mudaron a NV en el tiempo esperado. Fenotípicamente, los insectos NV dsCYP4G106 presentaron iguales características morfológicas que los controles.

Se extrajeron los lípidos epicuticulares e internos de insectos NV dsCYP4G106 y dsCTR, se separó la fracción HC por columna y se analizaron los HC mediante CGC-FID, tal como se describió para dsCYP4G107.

HC epicuticulares.

El perfil cromatográfico de los HC epicuticulares de insectos NV dsCYP4G106 y dsCTR se muestra en la Figura 5-16. Cualitativamente, se observa un perfil cromatográfico similar aunque disminuido en HC lineales. Los HC ramificados presentan un patrón diferente, donde se observa el aumento específico de 4 picos que se indican con flechas.

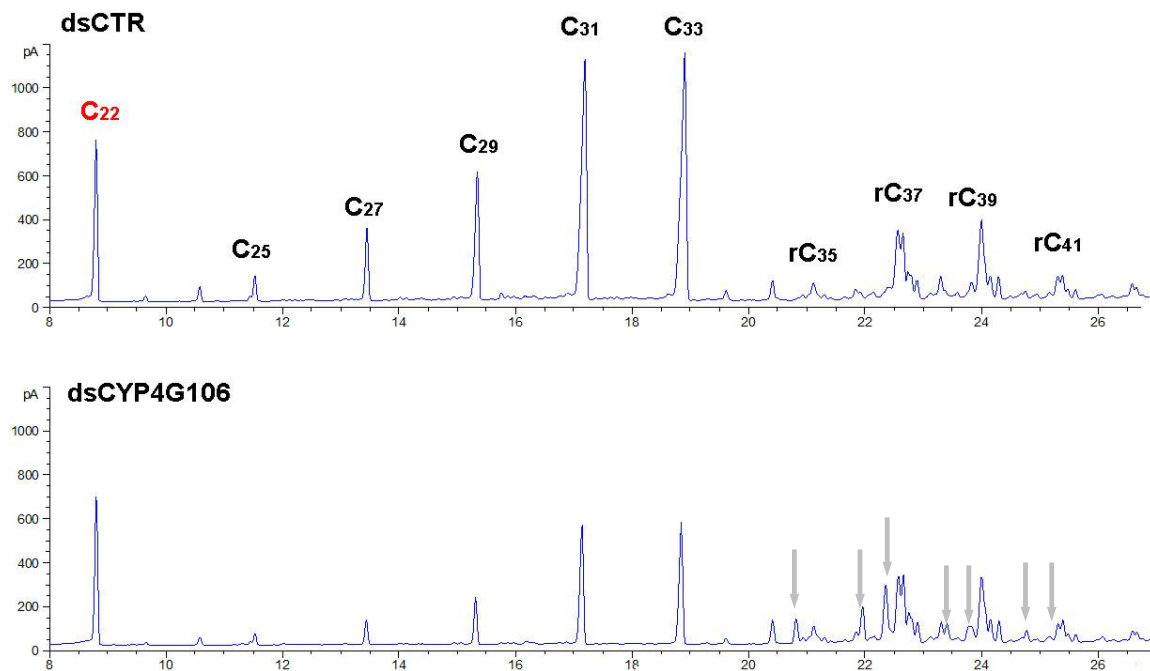


Figura 5-16: Perfil cromatográfico de HC epicuticulares de *Rhodnius prolixus* inyectados con dsCTR y dsCYP4G106. Las flechas señalan picos aumentados en las muestras dsCYP4G106.

En la Tabla 9 y en la Figura 5-17 se muestra el análisis cuantitativo de los HC epicuticulares en los insectos control y dsCYP4G106. No se observan diferencias significativas en la cantidad total de HC entre los insectos, pero se reporta una marcada disminución significativa en los HC lineales de los dsCYP4G106 (de 625,3 a 299,6 ng/insecto) ($P < 0,001$). Por su parte, los HC ramificados se encuentran aumentados significativamente ($P < 0,01$).

Tabla 9: Cuantificación de HC epicuticulares totales, lineales y ramificados de insectos *Rhodnius prolixus* NV dsCTR y dsCYP4G106

	HC epicuticulares totales (ng/insecto \pm SD)	HC epicuticulares lineales (ng/insect \pm SD)	HC epicuticulares ramificados (ng/insecto \pm SD)
dsCTR	927,6 \pm 142,6	625,3 \pm 90,1	302,3 \pm 76,5
dsCYP4G106	808,3 \pm 60,6	299,6 \pm 26,5	508,7 \pm 58,4

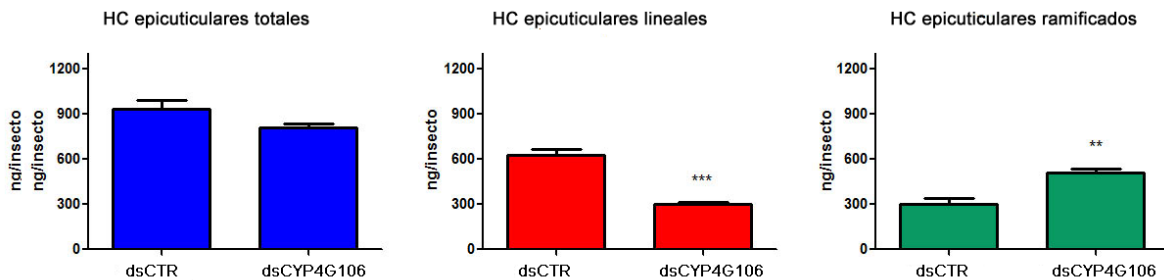
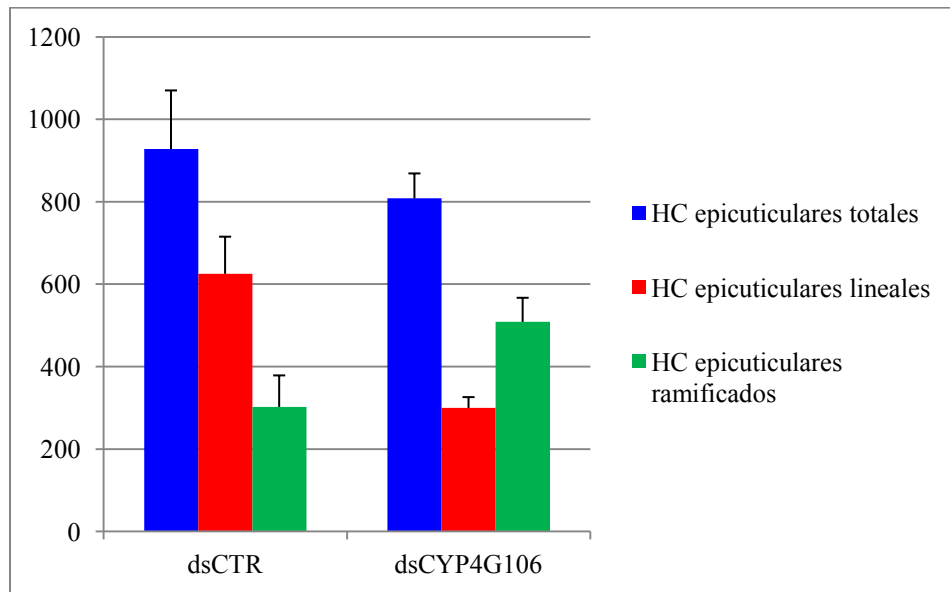


Figura 5-17: Efecto de dsCYP4G106 en el contenido de hidrocarburos (HC) de epicutícula en *Rhodnius prolixus* ninfas V estadio (parte superior). Comparación de HC totales, lineales y ramificados en grupo control y silenciado. Contenido de HC totales, lineales y ramificados respectivamente en insectos

control y silenciados. Los HC se expresan en nanogramos (ng) de HC por insecto. Los datos se muestran como media \pm SD. Los asteriscos **, *** por encima de las barras indican diferencias significativas $P < 0,01$ y $0,001$ respectivamente, entre grupos dsCTR y dsCYP4G106 (test de Student) (parte inferior)

HC internos

El perfil cromatográfico de los HC internos presenta una situación similar, donde se observa una reducción en la cantidad de HC lineales pero el aumento de 4 picos correspondientes a HC ramificados (Figura 5-18).

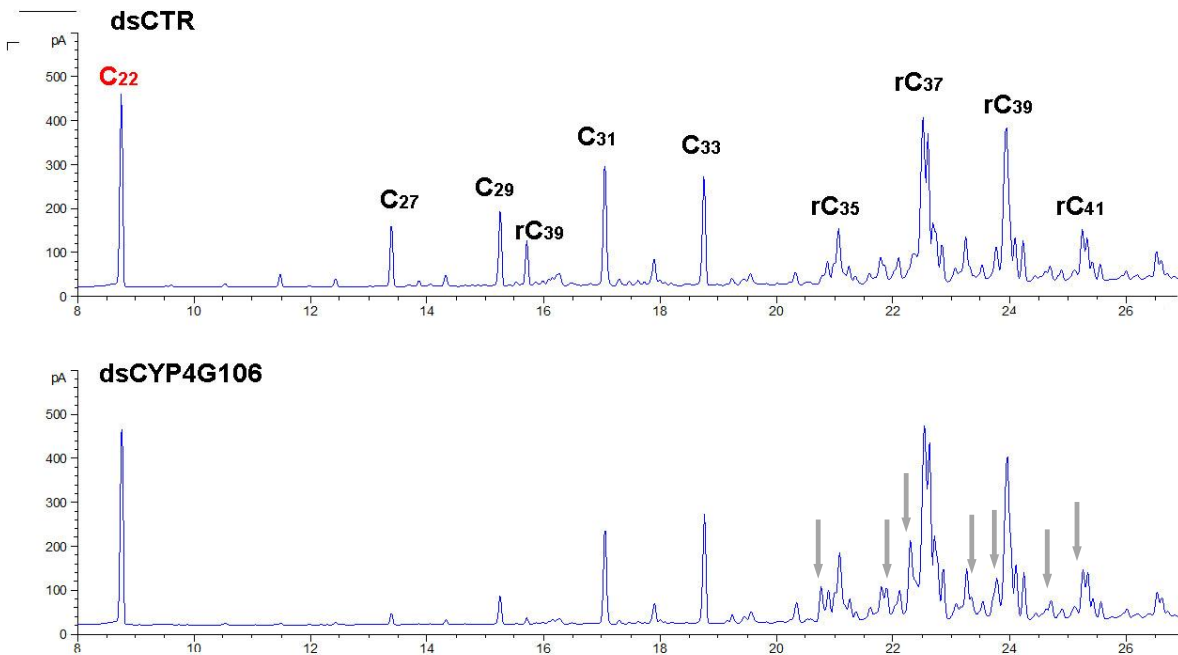


Figura 5-18: Perfil cromatográfico de HC internos de *Rhodnius prolixus* inyectados con dsCTR y dsCYP4G106. Las flechas señalan picos aumentados en las muestras dsCYP4G106.

En la Tabla 10 y en la Figura 5-19 se muestra el análisis cuantitativo de los HC internos, donde no se registra un cambio neto en los HC totales de los insectos dsCYP4G106. Nuevamente se observa una disminución significativa en HC lineales ($P < 0,001$) y un aumento significativo de HC ramificados ($P < 0,01$).

Tabla 10: Cuantificación de HC internos totales, lineales y ramificados de insectos *Rhodnius prolixus* NV dsCTR y dsCYP4G106.

	HC internos totales (ng/insecto ± SD)	HC internos lineales (ng/insecto ± SD)	HC internos ramificados (ng/insecto ± SD)
dsCTR	1062,69 ± 64,43	298,95 ± 17,18	763,74 ± 6,16
dsCYP4G106	1168,50 ± 111,72	187,22 ± 28,34	983,77 ± 123,56

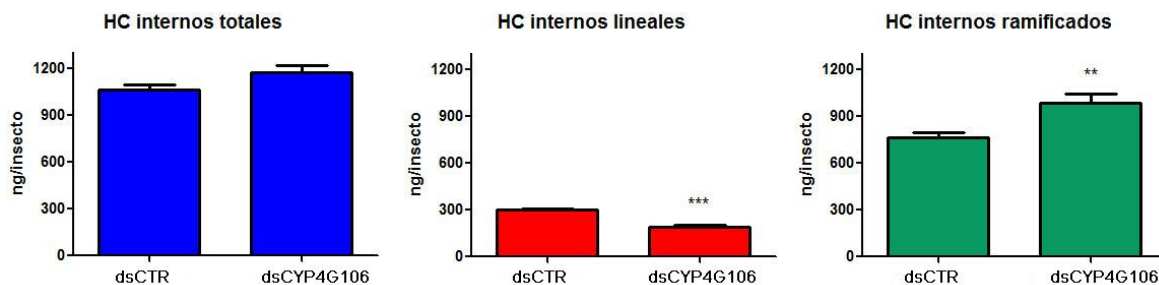
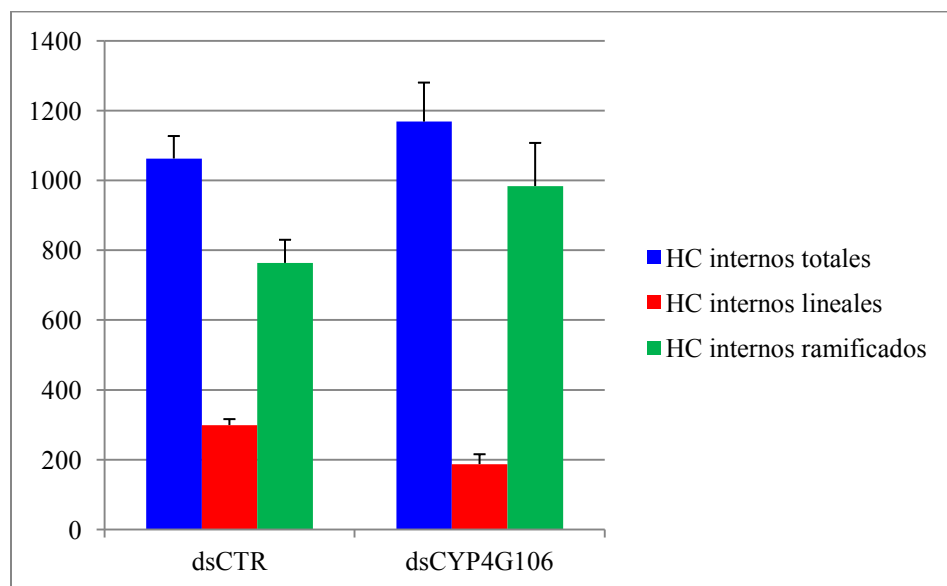


Figura 5-19: Efecto de dsCYP4G106 en el contenido de hidrocarburos (HC) internos en *Rhodnius prolixus* ninfas V estadio (parte superior). Comparación de HC totales, lineales y ramificados en grupo control y silenciado. (B), (C) y (D) Contenido de HC totales, lineales y ramificados respectivamente en insectos control y silenciados. Los HC se expresan en nanogramos (ng) de HC por insecto. Los datos se muestran como media ± SD. Los asteriscos **, * por encima de las barras indican diferencias significativas $P < 0,01$ y $0,001$ respectivamente, entre grupos dsCTR y dsCYP4g106 (test de Student) (parte inferior).**

La identidad de los picos aumentados en los insectos tratados con dsCYP4G106 fue analizada por CGC-MS y se identificaron los compuestos descritos en la Tabla 11.

Tabla 11: Compuestos analizados por CGC-MS junto con su KI y los iones diagnósticos que permitieron su identificación.

KI	Compuesto	Iones diagnósticos (m/z)
3550	5-metil C ₃₅	84/85, 448/449, 491
3700	6,X,Y-trimetil C ₃₆	98/99, 477, 407, 169, 239, 336/337, 533
3756	5-metil C ₃₇	84/85, 476/477, 519
3900	6,X,Y-trimetil C ₃₈	98/99, 505, 561
3950	5-metil C ₃₉	84/85, 504/505, 547
4100	6,X,Y-trimetil C ₄₀	98/99, 533, 463, 168/169, 589
4152	5-metil C ₄₁	84/85, 532/533, 575

Se observa un aumento en los HC de la serie de 5-metil ramificados de 35, 37, 39 y 41C, así como un aumento en la serie de HC 6,X,Y-trimetil ramificados. Todos estos compuestos se encuentran en muy bajas cantidades en los insectos controles. El resto de los HC ramificados no presenta diferencias significativas con el control.

5.2.3 EFECTO DEL SILENCIAMIENTO EN INSECTOS EXPUESTOS A CONDICIONES DE BAJA HUMEDAD RELATIVA

El efecto del silenciamiento de los transcritos correspondientes a CYP4Gs se analizó mediante ensayos de viabilidad en condiciones de baja humedad relativa. Se inyectaron grupos de 10 insectos *R. prolixus* NIV con solución dsCTR, dsCYP4G107 y dsCYP4G106 respectivamente. Se los alimentó y los mismos mudaron a NV. A las 48 hs de muda, se colocaron grupos de a 10 insectos en estufa con humedad relativa entre 4-10 %, y 34 °C de temperatura. Estas condiciones exponen a los insectos a un entorno de muy escasa humedad relativa, considerando que las condiciones usuales de cría son 50 % humedad relativa y 27 °C. Se monitoreó la mortalidad de los insectos cada 24 hs hasta registrar un 100 % en los controles.

En la Figura 5-20 se muestra la curva de mortalidad.

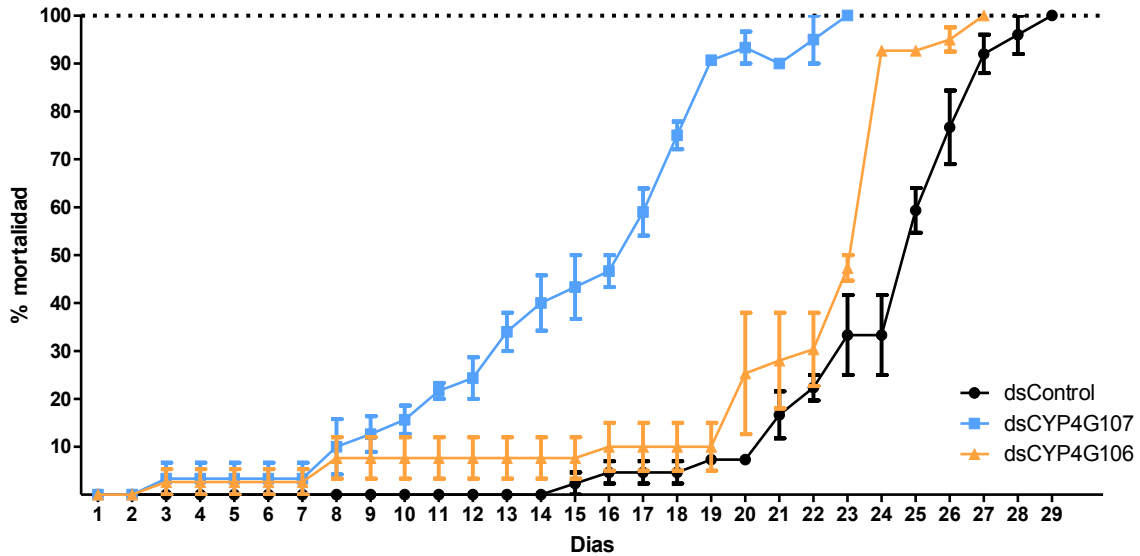


Figura 5-20: Curva de mortalidad de insectos *Rhodnius prolixus* NV dsControl, dsCYP4G107 y dsCYP4G106 bajo condiciones de desecación: 4-10% HR y 34°C. Insectos NV con 4 días de muda.

En el control, la mortalidad de los insectos se registró a partir del día 15, con un 50 % de mortalidad al día 25, alcanzando el 100 % al día 29. En los insectos NV dsCYP4G107, al día 3 se comenzó a registrar mortalidad, alcanzándose el 50 % al día 16. Entre el día 18 y 23 se registra un 90-100 % de mortalidad. Con respecto al control, se registran diferencias significativas a partir del día 10 ($p < 0,05$), aumentando con el paso de los días. En el caso de los insectos NV inyectados con dsCYP4G106, se registró una mortalidad del 10 % a partir del día 3, pero la misma se mantuvo constante hasta el día 19. El 50 % de mortalidad se registró al día 23, y entre los días 24 y 27 se registraron mortalidades entre 90 y 100 %, mostrando una curva de mortalidad similar al control.

5.3 ANÁLISIS DE GENES CYP CLAN 4 CON ACTIVIDAD DETOXIFICANTE EN EL INTEGUMENTO DE *TRIATOMA INFESTANS*

A partir de las secuencias obtenidas del transcriptoma de integumento de *T. infestans*, se identificaron varios transcritos con actividad detoxificante, entre ellos, los correspondientes a esterasas, glutatión transferasas y CYP450s (Calderón-Fernández et al. 2017). Como parte de este trabajo de tesis, se analizaron los genes citocromo P450 pertenecientes al clan 4.

Se identificaron y anotaron 15 genes, de los cuales dos de ellos pertenecen a las subfamilia CYP4G, descritas en la sección 5.1 (código de acceso GenBank JAS02890 y JAS02889), y 6 de ellos a las mayores expansiones CYP de triatominos, CYP3093A y CYP4EM, descritas en el genoma de *R. prolixus*. Las proteínas codificadas por dichos genes fueron nombradas por el comité de nomenclatura P450 como CYP3093A11 (JAR98719), CYP3093A12 (JAC16640), CYP3093A13 (JAC16639), CYP3093A14 (JAC16638), CYP4EM7 (JAC17089) y CYP4EM10 (JAR98714) (Nelson 2009) .

5.3.1 EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN EL INTEGUMENTO DE *T. INFESTANS* RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES A DELTAMETRINA

Para estudiar si algunas de estas enzimas presentes en el integumento de *T. infestans* podrían tener participación en el fenómeno de resistencia a insecticidas, se procedió al análisis de expresión diferencial de todos los miembros identificados del clan 4 en insectos R y S (Figura 5-21). De los 15 genes estudiados, 5 de ellos presentaron una expresión significativamente mayor en los insectos resistentes respecto a los susceptibles: JAS02888 presenta una sobreexpresión de 2,2 veces, JAR98715 de 2.6 veces, CYP3093A12 de 4.3 veces, CYP4EM10 de 7.6 veces y CYP3093A11 está sobreexpresado en 129 veces. Los últimos tres genes mostraron los niveles de sobreexpresión más altos y son parte de las mayores expansiones génicas reportadas en *Rhodnius*, de las subfamilias CYP4EM y CYP3093A. Por el contrario, los otros miembros de estas expansiones, CYP3093A13, CYP3093A14 y CYP4EM7 se expresaron constitutivamente al mismo nivel en insectos R y S.

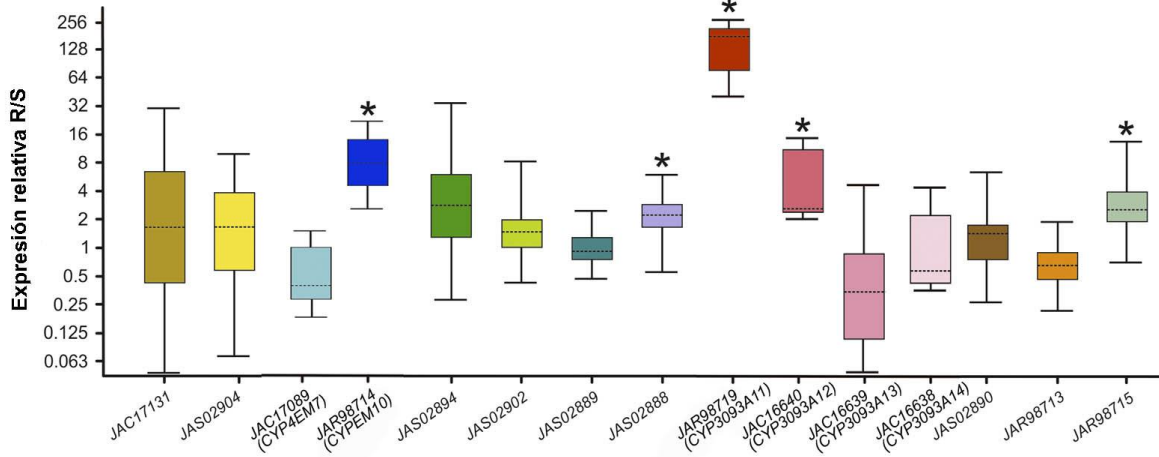


Figura 5-21: Análisis de expresión relativa de genes CYP clan 4 en el integumento de ninfas *Triatoma infestans* resistentes y susceptibles. El área de la caja abarca el 50% de todas las observaciones, la línea de puntos representa la mediana de la muestra de tres réplicas biológicas y las barras verticales representan el otro 50% de las observaciones restantes. Los valores de expresión relativa indican el nivel de expresión del gen de interés en los insectos resistentes respecto al nivel de expresión en los insectos susceptibles. El asterisco * indica diferencias significativas ($P < 0.05$).

5.3.2 EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN TEJIDOS

Dado el gran nivel de sobreexpresión de CYP3093A y CYP4EM10, se continuó con el estudio de dichos transcritos. Para estudiar el posible rol de estas enzimas de detoxificación presentes en el integumento de *T. infestans*, y sobreexpresadas en los insectos resistentes, se midió su expresión relativa R/S en distintos tejidos con conocida actividad detoxificante: túbulos de Malpighi, intestino y cuerpo graso. A su vez, se analizó en nivel de expresión de las expansiones. En la Tabla 12 se muestran los niveles de expresión relativa R/S en los distintos tejidos. En cuerpo graso, los genes más sobreexpresados en integumento no mostraron diferencias significativas en su nivel de expresión (1,3 en CYP3093A11 y 0,4 CYP4EM10), mientras que tanto CYP3093A12 y CYP3093A13 están subexpresadas en el cuerpo graso. Por su parte, CYP3093A14 presenta una leve sobreexpresión en el cuerpo graso de insectos R. En intestino y túbulos de Malpighi, la mitad de los genes estudiados no se expresan en estos tejidos o se encuentran subexpresados.

Tabla 12: Expresión relativa R/S de genes CYP3093 y CYP4EM y sus expansiones en distintos tejidos. Los valores representan la mediana de la muestra de tres réplicas biológicas y las barras verticales representan el 50% de las observaciones restantes. El asterisco * indica diferencias significativas ($P < 0.05$) entre insectos resistentes y susceptibles.

Tejido	Gen (expresión relativa R/S)					
	<i>CYP3093A11</i>	<i>CYP3093A12</i>	<i>CYP3093A13</i>	<i>CYP3093A14</i>	<i>CYP4EM7</i>	<i>CYP4EM10</i>
Integumento	129,1 (59,6-204,1)*	4.3 (2.4-12.2)*	0.2 (0.1-1.0)	0.7 (0.3-2.4)	0.5 (0.3-1.2)	7.6 (4.0-14.4)*
Cuerpo graso	1.3 (0.5-3.7)	0.4 (0.2-0.7)*	0.5 (0.3-0.9)*	2.3 (1.1-4.5)*	0.9 (0.6-1.2)	0.4 (0.1-1.1)
Intestino	No se expresa	0.5 (0.3-0.7)*	No se expresa	No se expresa	0.3 (0.2-0.3)*	0.5(0.3-0.9)*
Túbulos de Malpighi	No se expresa	1.3 (0.6-2.1)	No se expresa	2.6 (0.9-7.6)	0.3 (0.1-0.6)*	No se expresa

5.3.3 SILENCIAMIENTO GÉNICO DE CYP3093A11 Y CYP4EM10

A continuación, se realizaron ensayos de silenciamiento génico mediante ARN de interferencia de los genes CYP3093A11 y CYP4EM10. En primer lugar, se diseñaron cebadores específicos para cada una de estas secuencias, se sintetizaron las dsARN correspondientes (dsCYP30933093A11 y dsCYP4EM10), y se realizó la inyección en el abdomen de insectos *T. infestans* NV R y S.

El silenciamiento con dsCYP3093A11 provocó la disminución en la expresión de CYP3093A11 en un 40%, así como también la de los otros miembros de esta expansión (45% para *CYP3093A12* ($p < 0.03$), 75% para *CYP3093A13* ($p < 0.02$) y 76% para *CYP3093A14* ($p < 0.03$)), y otros genes del clan 4 (Tabla 10). JAR98715 fue el único gen que frente al silenciamiento con dsCYP3093A11 resultó sobreexpresado en 13,1 veces.

En cuanto al silenciamiento con dsCYP4EM10, tanto la expresión de CYP4EM10 como CYP4EM7 fue reducida significativamente en un 87% ($p < 0,02$) y 85% ($p < 0,01$) respectivamente, así como la de otros miembros del clan 4 (Tabla 13). En este caso, la expresión de ninguno de los miembros de la subfamilia CYP3093A fue afectada. Tres genes (JAS02890, JAS02894 and JAC17089) fueron silenciados en ambos tratamientos.

Tabla 13: Expresión relativa de cada uno de los genes del clan 4 en insectos inyectados con dsCYP4093A11 o dsCYP4EM10 con respecto a la inyección con dsControl.

Gen	RNAi	
	dsCYP3093A11	dsCYP4EM10
JAR98719 (<i>CYP3093A11</i>)	0.6 (0.5-0.7)*	1.5 (0.7-3.7)
JAC16640 (<i>CYP3093A12</i>)	0.5 (0.4-0.7) *	1.0 (0.9-1.2)
JAC16639 (<i>CYP3093A13</i>)	0.2 (0.1-0.4) *	0.9 (0.7-1.1)
JAC16638 (<i>CYP3093A14</i>)	0.2 (0.1-0.3) *	0.3 (0.1-1.1)
JAC17089 (<i>CYP4EM7</i>)	0.5 (0.2-0.9) *	0.2 (0.1-0.6) *
JAR98714 (<i>CYPEM10</i>)	1.0 (0.4-2.6)	0.1 (0.0-0.2) *
JAC17131	1.2 (0.8-1.8)	0.1 (0.0-0.1) *
JAS02904	0.3 (0.1-0.7) *	0.3 (0.1-0.6)
JAS02894	0.4 (0.2-0.7) *	0.1 (0.0-0.2) *
JAS02902	0.3 (0.0-1.1)	0.4 (0.1-1.8)
JAS02889 (<i>CYP4G107</i>)	0.5 (0.2-0.9) *	0.9 (0.7-1.1)
JAS02888	0.6 (0.4-0.9)	0.6 (0.4-1.0)
JAS02890 (<i>CYP4G106</i>)	0.4 (0.3-0.5) *	0.7 (0.6-0.8) *
JAR98713	1,6 (0,6-4,4)	0,3 (0,1-0,5) *
JAR98715	13.1 (8.5-20.7) *	0.3 (0.3-0.4) *

5.3.3.1 BIOENSAYO DE MORTALIDAD POR EXPOSICIÓN A DELTAMETRINA

Para analizar el efecto del silenciamiento de estos genes en relación a la susceptibilidad a deltametrina, se evaluó la mortalidad de los insectos topicados con deltametrina. Se registró la mortalidad de los mismos a las 24, 48 y 72 hs (Figura 5-22). En presencia de deltametrina, los insectos tratados tanto con dsCYP3093A11 como con dsCYP4EM10 no mostraron diferencias significativas en comparación con insectos control en ninguno de los tiempos analizados. En todos los casos, la mortalidad de los insectos fue aumentando con el tiempo. No hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$ two.way ANOVA). La mortalidad para los insectos susceptibles fue mayor de un 92 % a las 24 hs, según lo esperado.

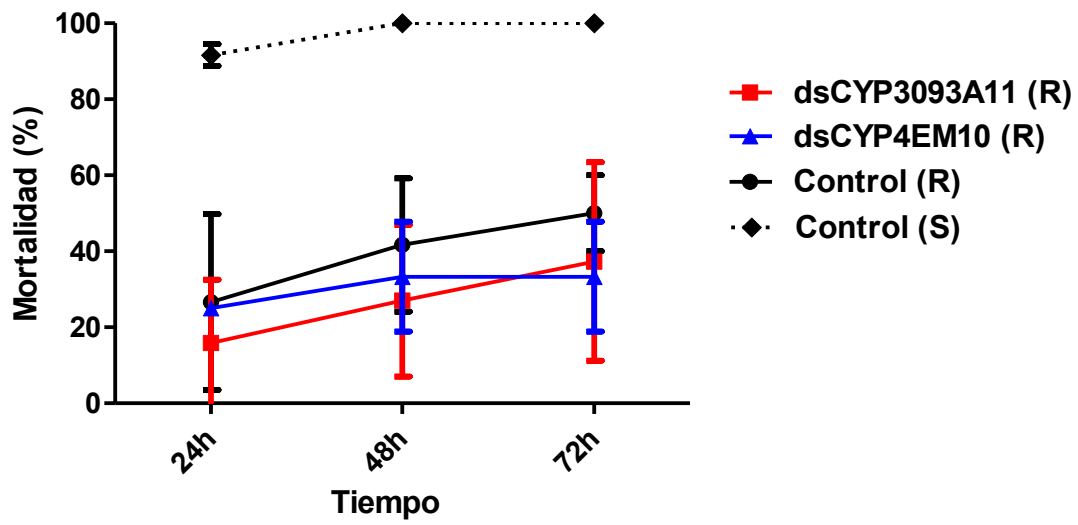


Figura 5-22: Mortalidad de ninfas *Triatoma infestans* resistentes tratadas con dsARN luego de aplicación tópica con deltametrina. Previamente a la aplicación de deltametrina, los insectos fueron inyectados con dsCYP3093A11 (rojo), dsCYP4EM10 (azul) o dsControl (negro). Ninfas S fueron inyectadas con dsControl y sometidas al mismo tratamiento.

5.4 DISCUSIÓN

Dada la importancia de los HC cuticulares en la fisiología de los insectos, se procedió a caracterizar molecular y funcionalmente los genes CYP4G presentes en *Rhodnius prolixus*. Las citocromo P450 son una de las superfamilias de enzimas más abundantes de la naturaleza. Dentro del clan 4, hay entre 20-50 genes que varían ampliamente en cada especie, mientras que en la subfamilia CYP4G hay sólo uno o dos genes en la mayoría de las especies de insectos. Aunque el rol de alguna de estas enzimas ha sido reportado, el de muchas de ellas aún es desconocido (Qiu et al. 2012, Balabanidou et al. 2016). Al menos uno de los genes CYP4G codificado en el genoma de insectos estaría involucrado en catalizar el último paso en la producción de hidrocarburos, mientras que el otro podría tener funciones diferentes, aún no determinadas. El primer reporte que indica que el último paso en la formación de HC de insecto es catalizado por una enzima citocromo P450 específica de insecto fue en 2012, donde los autores informaron que dos genes de la subfamilia CYP4G (CYP4G1 en *Drosophila melanogaster* y CYP4G2 en *Musca domestica*) están involucrados en una decarbonilación oxidativa de un aldehído para producir el HC correspondiente (Qiu et al. 2012). En 2016, Balabanidou et al. demostraron el rol de decarbonilasa oxidativa de una CYP4G de *Anopheles gambiae* (CYP4G16). En *A. gambiae*, los dos genes pertenecientes a la subfamilia 4G, CYP4G16 y CYP4G17, se encuentran sobrepresados en la región abdominal de los mosquitos. Recientemente en 2018 se ha reportado que además del rol de decarbonilasa oxidativa, las CYP4Gs del coleóptero *Dendroctonus ponderosae*, y la CYP4G2 de *M. doméstica* también cumplen el rol de alcohol oxidasa a partir de un alcohol intermediario, para generar el aldehído precursor del HC (MacLean et al. 2018).

En las CYP4G, y a partir de las secuencias disponibles hasta ahora, se encuentran 4 motivos conservados comunes en todas las proteínas P450, una secuencia específica que caracteriza a la familia CYP4, y una inserción típica de las 4G. En el genoma de *R. prolixus* se encuentran 2 genes pertenecientes a la subfamilia 4G, CYP4G107 y CYP4G106. En ambas secuencias, se identificaron los motivos conservados P450 así como la secuencia que caracteriza a la familia CYP4 y la inserción correspondiente a las 4G. Con el fin de dilucidar si estos genes están involucrados en la biosíntesis de HC cuticulares, se procedió a

su caracterización molecular y funcional. Trabajos previos demostraron mediante ensayos bioquímicos que la síntesis de HC se lleva a cabo en el integumento de triatominos, y en el presente trabajo se aportan resultados que evidencian el rol de los genes involucrados en su síntesis. Se demostró que la expresión de ambos genes CYP4G en *R. prolixus* es específica de integumento. Se registró un pequeño nivel de expresión en el cuerpo graso, pero debido a la fuerte asociación del integumento con este tejido, el nivel de expresión registrado en ambos genes podría deberse a trazas de integumento colectadas al momento de la disección. Resultados similares fueron reportados en el patrón de expresión de CYP4G102 de *Locusta migratoria* (Yu et al. 2016). En tejido nervioso no se registró expresión de CYP4G107, pero sí una pequeña expresión de CYP4G106, aunque la expresión en integumento sigue siendo significativamente mayor.

Se estudió el patrón de expresión de dichas enzimas en el integumento a lo largo del estadio NIV de *R. prolixus*. El ciclo de vida de *R. prolixus* consta de 5 estadios ninfales antes de alcanzar el estadio adulto. La duración de cada uno de estos ciclos está determinada principalmente por la alimentación. Cada proceso de muda involucra la síntesis de una nueva cutícula y el desprendimiento de la anterior, proceso denominado ecdisis. Estudios pioneros de Wigglesworth empleando a *R. prolixus* como insecto modelo, han descrito los cambios morfológicos requeridos para que estos procesos se lleven a cabo (Wigglesworth 1933). En *R. prolixus*, el estadio NIV dura aproximadamente 15 días luego de una ingesta de sangre. Durante los primeros días posalimentación las células epidérmicas empiezan a dividirse, hasta aproximadamente el día 9 PA en que la cutícula ya se encuentra totalmente desprendida de la epidermis, y la división de estas células ha concluido. En estos momentos, se empiezan a depositar los componentes de la nueva cutícula; para el día 15, justo antes de la muda, la nueva cutícula está parcialmente formada (Wigglesworth 1933). Con respecto a los oenocitos, una nueva generación surge luego de cada muda. Luego de que las ninfas son alimentadas, los oenocitos crecen rápidamente, alcanzando su máximo tamaño al noveno día PA, con marcadas prolongaciones citoplasmáticas. Muchos de los oenocitos de la generación anterior entran en apoptosis. Luego del día 9PA los oenocitos comienzan a reducirse progresivamente, y continúan incluso un par de días luego de alcanzada la muda (Figura 5-23).

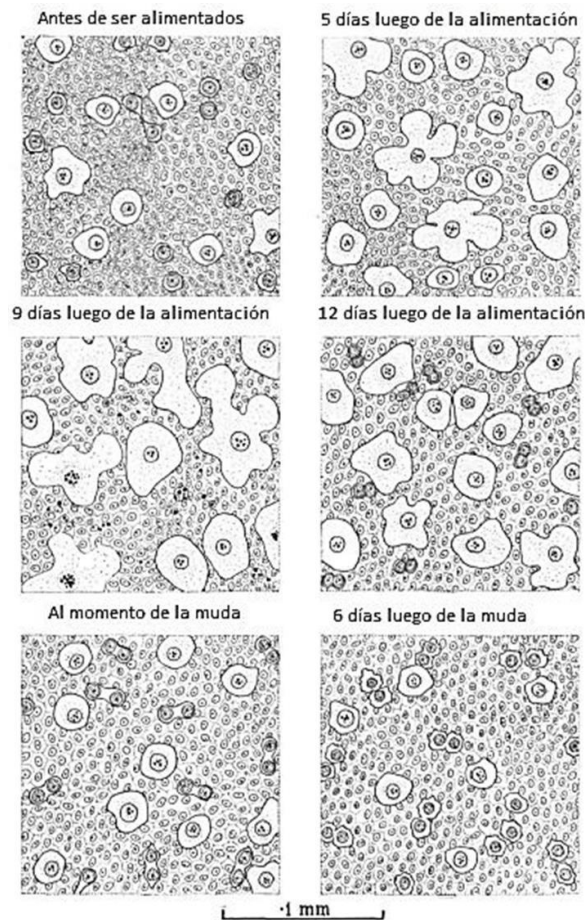


Figura 5-23: Cambios morfológicos en los oenocitos durante la ecdisis de cuarto a quinto estadio en *Rhodnius prolixus*. Modificado de (Wigglesworth 1933)

Tomando como referencia estos cambios morfológicos reportados en el integumento de *R. prolixus*, se analizó el patrón de expresión de las CYP4Gs durante el estadio NIV, en condiciones de ayuno y alimentación. En ayuno, se observa que la expresión de las enzimas se mantiene constante a lo largo de los días, pero comienza a disminuir a partir del día 15 posmuda para la CYP4G107 o a partir del día 19 posmuda para CYP4G106 (Figura 5-4 y 5-5). En insectos alimentados, se observa que la expresión de los genes se mantiene a niveles similares a los valores en el ayuno temprano, disminuyendo a partir del día 12 PA para CYP4G107 (que corresponde a 19 posmuda) y al día 9 PA para CYP4G106 (que corresponde al día 15 posmuda). Aunque la alimentación no induce grandes cambios en la expresión de las CYP4Gs, se observan algunas diferencias en el perfil de expresión de las enzimas, en particular al comparar los valores de expresión a los 15 días posmuda entre insectos alimentados o en ayunas. No sabemos si estas diferencias en el patrón de expresión

de las enzimas podrían correlacionarse con su funcionalidad, pero es evidente que CYP4G107 mantiene mayores niveles de expresión posalimentación, mientras que CYP4G106 presenta sus mayores niveles de expresión durante el período de ayuno.

Para llevar a cabo la caracterización funcional, se recurrió al silenciamiento mediante ARN de interferencia (ARNi), una técnica sencilla y útil que permite suprimir un gen de interés y correlaciona este efecto con un fenotipo o función. Para que la técnica sea exitosa, es necesario realizar un análisis de la eficiencia de la molécula de ARNi a utilizar para asegurar el silenciamiento, tanto por su secuencia como por la cantidad a inyectar. Con respecto a qué región del transcripto es favorable para diseñar el dsARN, no hay estudios exhaustivos del tema, pero hay varios reportes que indicarían que no hay un factor común. Pridgeon et al (2008) mostraron que dsARN correspondiente a la región 3' del gen de apoptosis en *Aedes aegypti* resultó en una eficiencia de silenciamiento mayor con respecto a un dsARN correspondiente a la región 5' o central del gen. En contraste, en *A. pisum*, el silenciamiento del gen *hunchback* (*hb*) resultó más efectivo utilizando dsARN diseñadas cerca del extremo 5' (Mao and Zeng 2012). Por su parte, el silenciamiento del gen de catepsina en este insecto no mostró diferencias significativas en la eficiencia del silenciamiento utilizando distintas regiones del transcripto (Jaubert-Possamai et al. 2007). Estos resultados soportan la importancia del diseño y prueba de la molécula de ARNi, ya que cada gen responde distinto frente al silenciamiento.

En cuanto al gen CYP4G107, se obtuvo un silenciamiento de más de un 90 % del gen utilizando un fragmento dsCYP4G107 ubicado sobre el extremo 3' del transcripto. Para el silenciamiento del gen CYP4G106, el empleo de un fragmento de ARNi ubicado en el segmento central del transcripto no evidenció cambios en la expresión del gen de interés, aún a concentraciones mayores. El uso de un nuevo fragmento de ARNi sobre el extremo 5' del transcripto, resultó en una reducción del transcripto en un 95% respecto a los controles inyectados con dsCTR. En insectos, el silenciamiento de genes no blanco ya ha sido reportado. Dado que una molécula de dsARN puede promover el silenciamiento del gen de interés y de otros genes con regiones de alta similitud con la secuencia de dsRNA (Paim et al. 2013), fue necesario confirmar por qPCR que en ninguno de los tratamientos se obtuvieron silenciamientos cruzados indeseados del otro transcripto CYP4G, ya que al

alinearse las secuencias entre ellas se observan algunas regiones con más de un 80% de similitud entre ellas (Figura S1).

Una vez definidos los fragmentos dsARN correspondientes a cada uno de los genes, se procedió a estudiar el efecto del silenciamiento génico en la síntesis de los HC. Dado que la síntesis de HC epicuticulares de un estadio determinado comienza durante el estadio anterior, el efecto del silenciamiento de las CYP4Gs en NIV se evaluó en insectos NV. Los HC sintetizados de novo por los oenocitos son transportados por lipoproteínas de hemolinfa hacia la superficie exterior, donde son depositados en la epicutícula; gran cantidad quedan almacenados en la hemolinfa e integumento (Juárez & Calderón-Fernández 2007). El perfil de HC epicuticulares se estabiliza pasadas las 24hs de muda a NV (Juárez and Brenner 1985). La composición de los HC epicuticulares de *R. prolixus* ninfas comprende una mezcla compleja de HC lineales y ramificados, con predominio de la fracción lineal. Los HC internos, que corresponden tanto a los HC de hemolinfa como a los de integumento, presentan un perfil cualitativamente similar a la epicutícula, pero con una proporción inversa de HC ramificados y lineales, ya que gran parte de los HC ramificados se encuentran en la hemolinfa (Juárez and Brenner 1985). Esta composición diferencial se debería no sólo a un transporte selectivo de HC entre el sitio de síntesis y el sitio de depósito final (epicutícula), sino también a que la hemolinfa funciona como transporte reusable de HC para ser utilizados, por ejemplo, para reparar pérdidas por abrasión, o en el caso de las hembras, para su aporte a los oocitos en desarrollo (Juárez 1994b, Gu et al. 1995).

El silenciamiento con dsCYP4G107 no produjo alteraciones morfológicas ni en el proceso de muda. Con respecto a los HC se observó una disminución significativa en la cantidad total de HCs, tanto epicuticulares (46%) como internos (59%). Esta disminución se debió principalmente a la disminución de HC ramificados, en un 86% en epicutícula y en un 74% en internos; en tanto los HC lineales disminuyeron un 28% en epicutícula y un 21% en internos. Esta gran disminución en la cantidad de HC ramificados, se correlacionó con un aumento en la mortalidad de los insectos en condiciones de desecación. En base a estos resultados, se puede inferir que CYP4G107 está directamente implicada en la síntesis de HC cuticulares en *R. prolixus*, en particular de HC ramificados.

El efecto del silenciamiento con dsCYP4G106 fue similar al detallado con dsCYP4G107 en cuanto a la ausencia de cambios morfológicos o alteraciones en la muda. El análisis de los HC no evidenció diferencias en la cantidad de HC totales de la epicutícula e internos. Contrariamente a lo observado con dsCYP4G107, hubo una disminución significativa en los HC lineales (53% en epicutícula y 38% en internos); sin embargo se observó un aumento significativo de los HC ramificados (70% en epicutícula y 30% en internos). La disminución en el contenido de HC lineales indicaría la participación de CYP4G106 en la formación de estos componentes. En cambio, el incremento en el contenido de HC ramificados se justificaría por la sobreexpresión simultánea de la CYP4G107; al mismo tiempo reforzaría la conclusión anterior sobre el rol de ésta en la decarbonilación preferencial de las cadenas ramificadas.

En la fracción de los HC ramificados se destaca un aumento significativo en el contenido de 4 componentes ramificados, usualmente presentes en muy bajas cantidades en los insectos control. Se trata de una serie de HC 5-metil ramificados de 35, 37, 39 y 41C, y en menor cantidad de 6,X,Y-trimetil ramificados de 36, 38 y 40C. Desconocemos la razón por la cual aumentarían específicamente estos compuestos, pero posiblemente provengan de una actividad alterada de las FASs de integumento, enzimas que definen la posición y cantidad de ramificaciones de los HC. Precisamente en este laboratorio se obtuvieron evidencias que el silenciamiento de estas FASs en *R. prolixus* también traería aparejada una alteración en la expresión de otros genes que participan en la ruta de síntesis de los HC (Moriconi et al, no publicado).

La disminución en el contenido total de HC, y en particular de la fracción ramificada en dsCYP4504G107 se relaciona con una menor resistencia a la desecación, en cambio el fenotipo de HC resultante en dsCYP4504G106 es difícil de explicar debido a la sobreexpresión del gen CYP4504G107. No obstante, los resultados obtenidos sugieren que la CYP4G106 estaría involucrada en la formación de cadenas lineales. De todos modos, no es posible aún determinar el grado de solapamiento en la función de ambos genes. La capacidad de la capa de HC cuticulares para prevenir la desecación depende de su composición. Los HC ramificados, que tienen puntos de fusión por encima de la temperatura ambiente, serían importantes para mantener la barrera contra la pérdida de agua por evaporación (Gibbs and Pomonis 1995). Por ejemplo, se ha reportado que el

porcentaje de HC ramificados en dos especies de *Drosophila* varían dependiendo su ubicación geográfica (y por ende, condiciones como el clima, la humedad relativa, la altura, etc.), *D. serrata*, que se encuentra fuera de la selva tropical en la costa este de Australia, es relativamente resistente a la desecación y produce importantes cantidades de HC cuticulares ramificados (29% de todos los HC). En contraste, *D. birchii*, habita exclusivamente en la selva húmeda, es extremadamente sensible a la desecación y produce cantidades muy bajas de HC cuticulares ramificados (3% de todos los HC). La expresión del gen mFAS CG3524, responsable de la síntesis de HC ramificados en *Drosophila*, es indetectable en los oenocitos de *D. birchii* (Chung et al. 2014). Estos autores demostraron mediante ensayos de silenciamiento génico de FAS y ensayos de desecación, que existe una correlación directa en la capacidad de resistir frente a condiciones de desecación y la cantidad de HC ramificados.

Son escasas las CYP4Gs estudiadas in vivo con función en la síntesis de HC cuticulares. En *Locusta migratoria* han utilizando técnicas similares a las empleadas en este trabajo de tesis para silenciar el gen específico de oenocitos CYP4G102. Los insectos silenciados mostraron también una marcada disminución en los HC cuticulares luego de mudar al siguiente estadio (Yu et al. 2016). A su vez, presentaban una cutícula más débil y con menor resistencia mecánica. Estos insectos presentaron una mortalidad del 100 % a las 24 hs de muda. En el áfido *A. pisum*, donde sólo hay un gen de la subfamilia CYP4G en el genoma, Chen et al. (2016) caracterizaron dicho transcripto, y demostraron también su directa implicancia en la síntesis de HC cuticulares. Dado el número limitado de CYP4G que forman hidrocarburos en los insectos y el amplio rango de longitud de la cadena de carbono observado en los hidrocarburos cuticulares, las CYP4G que forman hidrocarburos no serían específicas con respecto a la longitud de la cadena de carbono, a diferencia de las FARs y ELOVLs (MacLean et al. 2018); aún no hay reportados estudios sobre especificidad de las CYP4G respecto de precursores lineales o ramificados. En *A. gambie*, mediante ensayos de inmunofluorescencia, han reportado que las dos proteínas CYP4Gs están localizadas en zonas distintas dentro de lo oenocitos; mientras que CYP4G17 fue localizada a lo largo de todo el compartimento intracelular, como es esperable para una proteína P450 unida al retículo endoplasmático, CYP4G16 se encontró predominantemente asociada al lado citoplasmático de la membrana celular, un sitio único para una proteína

P450 (Balabanidou et al. 2016). La diferente localización podría indicar diferencias en las funciones celulares de CYP4G16 y CYP4G17, o diferentes especificidades de sustrato. Mediante expresión heteróloga de ambos genes, estos autores han encontrado que CYP4G16, pero no CYP4G17, tiene actividad decarboxilasa utilizando un precursor lineal C₁₈-al para producir HC. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el CYP4G17 (y/o CYP4G16) pueda catalizar la conversión de precursores ramificados, o tenga otra función. Nuestros resultados en *R. prolixus* muestran que ambas CYP4Gs se expresan en el integumento, y que existiría una preferencia por la síntesis de HC ramificados por parte de la CYP4G107 e HC lineales por parte de la CYP4G106. No se conocen sus localizaciones subcelulares específicas.

Muchos citocromos P450, incluidos los P450 de la familia CYP4G y las reductasas del citocromo P450, se encuentran en órganos quimiosensoriales de insectos, sin embargo, su rol en dichos órganos es desconocido. En la lombriz *M. brassicae*, la expresión de CYP4G20 en la antena sugiere un rol metabólico, ya que varios odorantes y xenobióticos ingresan al sistema olfatorio desde el ambiente exterior (Maïbèche-Coisne et al. 2005). En *D. melanogaster*, CYP4G15 se encuentra expresada en el sistema nervioso, y los autores sugieren un rol en el metabolismo de compuestos endógenos (Maïbèche-Coisne et al. 2000, Chung et al. 2009). La abeja *Apis mellifera* tiene sólo un gen CYP4G (CYP4G11) que además del cuerpo graso, está altamente expresado en los órganos quimiosensoriales, antenas, patas protorácicas y mesotorácicas (Mao et al. 2015). Su expresión heteróloga demostró su rol de decarboxilasa oxidativa empleando aldehídos lineales de varias longitudes de cadena como precursores para la etapa final de la síntesis de HC (Calla et al. 2018). La colonización de ambientes terrestres expuso a los insectos a nuevas presiones de selección frente al riesgo de desecación y exposición a sustancias volátiles ambientales. Calla y colaboradores (2018) sugieren que la síntesis de los HC epicuticulares como componentes protectores contra la desecación puede haber sido la función original de la subfamilia CYP4G, pero las similitudes estructurales entre los precursores de los HC y las señales químicas volátiles pueden haber facilitado la capacidad de las CYP4G para nuevos sustratos. MacLean y colaboradores (2018) demuestran que CYP4Gs son capaces de sintetizar HC a partir de precursores tanto aldehídos como alcoholes, con un amplio rango de longitudes de cadena de carbono. Estos autores proponen que las enzimas CYP4G

altamente conservadas en insecto habrían evolucionado para participar tanto en la biosíntesis de hidrocarburos cuticulares como en metabolismo de feromonas volátiles. El hecho de que CYP4G106 se exprese en integumento pero que también presente niveles de expresión en tejido nervioso (Figura 5-3) sugiere un rol o especificidad de sustrato diferente entre ambas CYP4Gs en *R. prolixus*. Otro indicio que también sugeriría distintos roles en ambas enzimas es el comportamiento diferencial frente al silenciamiento: CYP4G106 podría cumplir funciones vitales en el insecto, por lo que frente a la disminución en su expresión, se induciría la CYP4G107 con el fin de suplir la falta de CYP4G106.

En cuanto a *T. infestans*, también se identificaron dos transcritos correspondientes a CYP4Gs. Se realizó el análisis de expresión de dichos transcritos en túbulos de Malpighi, cuerpo graso, e integumento que también confirmaron su expresión en integumento. El análisis del patrón de expresión durante los distintos días durante el ciclo NIV muestran perfiles similares a *R. prolixus* (datos no mostrados). Aunque aún faltan caracterizaciones funcionales, el análisis filogenético de las secuencias CYP4G de *T. infestans* las ubica muy cercanas a sus ortólogas en *R. prolixus*, por lo que podrían tener funciones y características similares. Estas secuencias guardan mayor similitud con la CYP4G15 de *D. melanogaster* que con la CYP4G1 caracterizada en Qiu et al. (2012) y MacLean et al. (2018). Dada la limitada información respecto a funcionalidad de los escasos genes CYP4G caracterizados, no es posible hacer muchas inferencias a partir del análisis filogenético. Si bien la función de la CYP4G15 de *D. melanogaster* aun no ha sido determinada, dada su cercana agrupación con la CYP4G16 de *A. gambiae* y con las de *R. prolixus* estudiadas en este trabajo, se podría especular que también participarían en metabolismo de HC.

El estudio de las enzimas CYP4G presenta un escenario prometedor, no sólo por ser enzimas específicas de insecto, sino también por su capacidad de utilizar precursores muy diversos en cuanto a longitud y ramificación de cadena carbonada así como grupo funcional (aldehído o alcohol). A su vez, las enzimas CYP4G han sido vinculadas a la resistencia a insecticidas, con varios reportes de sobreexpresión de las mismas en insectos resistentes (Vontas et al. 2007, Ingham et al. 2014, Yahouédo et al. 2017). En *T. infestans*, pese a reportarse un aumento en la cantidad de HC cuticulares, la expresión de las CYP4G no presenta diferencias significativas en insectos resistentes.

Genes de detoxificación en integumento

Uno de los factores más conocido y estudiado en la resistencia a insecticidas son las proteínas involucradas en la detoxificación de xenobióticos, entre ellas, las citocromo P450. Las P450 son hemo-tiolato proteínas que catalizan reacciones de monooxigenación estereo selectivas en un amplio rango de sustratos lipofílicos, originando derivados más hidrofílicos por la adición de un átomo de oxígeno a partir de oxígeno molecular. Forman parte de un sistema microsomal de dos componentes formado por la NADPH citocromo P450 reductasa (flavoproteína que contiene FAD y FMN) y la hemoproteína P450 monooxigenasa. Debido su mecanismo de reacción, pertenece al grupo de enzimas llamadas oxidasas de función mixta, por oxidar simultáneamente dos sustratos diferentes.

Las bases moleculares de los sistemas multigénicos como el de las citocromo P450s son complejas (Feyereisen 1999). El uso de microarrays ha facilitado su estudio; por ejemplo, en *Drosophila* se demostró que sólo 1 de 90 genes CYP se sobreexpresaba en insectos resistentes (Daborn et al. 2002); en *Aedes aegypti* resistentes cerca del 10% de estos genes se sobreexpresan (Bariami et al. 2012). Otro aspecto importante de los genes P450 en insectos es que el sitio de expresión de estos genes puede variar en respuesta a estímulos fisiológicos y ambientales (Feyereisen 2012).

El mayor interés a nivel genético para el estudio de la resistencia está en las expansiones génicas, que surgen de genes que responden a agentes ambientales. Las características generales de los genes de respuesta ambiental incluyen alta diversidad, proliferación por eventos de duplicación, rápidos índices de evolución y expresión específica de tejido o temporal. Mediante un patrón de expansión a través de la duplicación, se generan nuevas funciones como mecanismo de adaptación a las señales químicas externas (Berenbaum 2002)

A partir de la publicación del genoma completo de *R. prolixus* (Mesquita et al. 2015), se han identificado los genes potencialmente involucrados en los procesos de detoxificación (Schama et al. 2016). Se encontró un conjunto similar de genes de desintoxicación a los del hemíptero *A. pisum* pero más pequeño que el de la mayoría de las especies de Dípteros. En cuanto a las CYP, se encontraron 88 genes con representantes en los cuatro clanes (CYP2, CYP3, CYP4 y mitocondrial). *R. prolixus* parece tener menor cantidad de expansiones

específicas de genes CYP que mosquitos y escarabajos, entre otros. Con el creciente número de genomas secuenciados, se observa que cada especie tiene su propia composición en cuanto a genes de detoxificación (Schama et al. 2016).

A partir de las EST del transcriptoma de integumento de *T. infestans*, y con la información disponible del genoma de *R. prolixus*, se identificaron y anotaron las secuencias de genes correspondientes a genes de detoxificación, 14 carboxilesterasas, 6 genes glutatión transferasas, y 46 genes CYP450 (Calderón-Fernández et al. 2017). Este número representa aproximadamente la mitad de los 88 genes CYP reportados en el genoma de *R. prolixus* (Mesquita et al. 2015). Las secuencias P450 fueron clasificadas en familias y subfamilias según la nomenclatura sugerida por (Nelson 1998), y utilizada en la anotación de los genes de *R. prolixus*. Las secuencias a su vez fueron asignadas a su correspondiente clan (Feyereisen 2011). La mayor parte de las secuencias corresponden al clan 3 seguido del clan 4 (Calderón-Fernández et al. 2017). Los genes de ambos clanes han sido asociados con el potencial de adquirir resistencia a insecticidas (David et al. 2013). Dentro del clan 3, se reportó la sobreexpresión en 4 de 15 genes estudiados en insectos *T. infestans* resistentes (entre 1,7 y 3,8 veces). Varios de los genes anotados en *T. infestans* pertenecen a los mismos grupos de genes de *R. prolixus*, que incluyen expansiones de genes CYP, entre ellas, subfamilias CYP3093A y CYP4EM.

En este trabajo, para estudiar el posible rol de los genes del clan 4 de integumento en la detoxificación de insecticidas, se analizó la expresión diferencial de los transcritos del clan 4 en ninfas *T. infestans* NIV resistentes y susceptibles. De los 15 transcritos medidos, 5 de ellos estaban sobreexpresados en ejemplares resistentes. Llamativamente, los mayores niveles de sobreexpresión se registraron en miembros de las expansiones génicas pertenecientes a las subfamilias CYP3093A y CYP4EM (Figura 5-24).

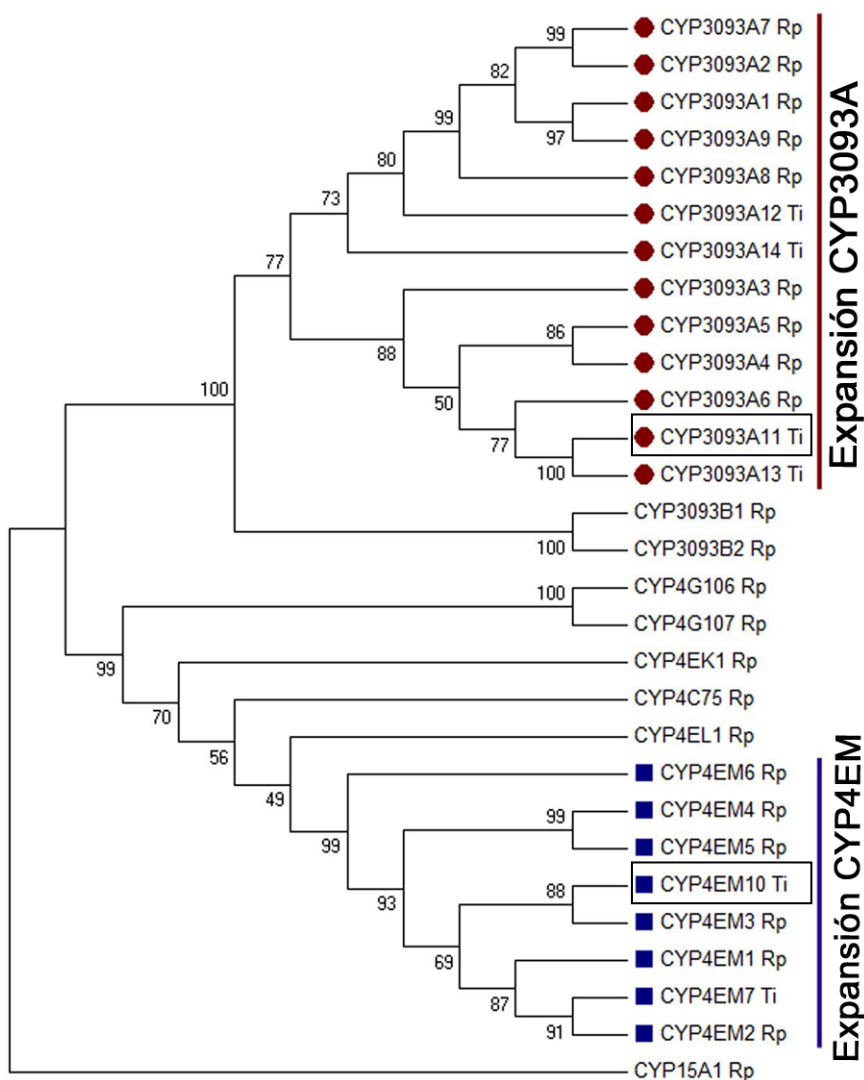


Figura 5-24: Árbol filogenético entre miembros CYP4 de *T. infestans* (Ti) y *R. prolixus* (Rp). En rojo están remarcadas las expansiones génicas de la subfamilia CYP3093A y en azul CYP4EM. Los números en los nodos indican el soporte para cada agrupación, como el porcentaje de 1000 réplicas “bootstrap”. La secuencia CYP15A1Rp (clan CYP2) fue utilizada como grupo externo. Se recuadran los genes con mayor nivel de sobreexpresión registrados en integumento de *T. infestans* resistentes.

En insectos, el intestino y el cuerpo graso son considerados como los sitios primarios de detoxificación, donde se expresan la mayoría de los genes involucrados (Scott et al. 1998). Sin embargo, los insecticidas de contacto encuentran en el integumento la primera barrera y es en este órgano donde se produce la primera interacción. Se demostró que un gen de cada una de estas expansiones presenta altos niveles de sobreexpresión en el integumento de insectos *T. infestans* resistentes a insecticidas: CYP3093A11 (130 veces) and CYP4EM10 (8 veces). No se detectó sobreexpresión de estos genes en otros tejidos con conocida

actividad detoxificante, como intestino, túbulos de Malpighi y cuerpo graso. Los otros miembros de las expansiones mostraron una pequeña o nula diferencia en R respecto de S en todos los tejidos analizados.

Con el fin de caracterizar el rol de CYP3093A11 y CYP4EM10 en la detoxificación de deltametrina, se procedió al silenciamiento génico de CYP3093A11 y CYP4EM10 mediante ARNi. Mediante este método, se logró no sólo la reducción en la expresión de los genes blancos, sino también de los otros genes miembros de la expansión y otros genes del clan 4. No es llamativo el silenciamiento de todos los miembros de una misma expansión, ya que todos comparten alta homología de secuencias; resultados similares fueron reportados en nitroforinas de *R. prolixus*, donde el silenciamiento del gen de interés se vio acompañado del silenciamiento de otros transcritos de nitroforinas con alta homología en sus secuencias (Araujo et al. 2006).

No se observó un fenotipo claro luego de la aplicación tópica con deltametrina sobre los insectos silenciados. Dado que las P450 son miembros de una gran superfamilia de enzimas varios miembros de cada familia o clan pueden realizar funciones similares o solapantes, por ejemplo, detoxificación de insecticidas. Esta redundancia puede llevar a mecanismos de compensación frente a la pérdida de función de los genes blancos, resultando en un fenotipo similar al control tanto para los insectos inyectados con dsCYP3093A11 y con dsCYP4EM10. En este sentido, dentro de todos los genes del clan 4 estudiados, se encontró que un gen (JAR98715) presentó una inducción en su nivel de expresión de 13 veces respecto al control cuando los insectos fueron inyectados con dsCYP3093A11. Esta inducción en la expresión de JAR98715 puede funcionar como un mecanismo de compensación y ser responsable, al menos en parte, de la ausencia de un fenotipo específico frente a la aplicación tópica con deltametrina. Estos resultados plantean la posibilidad de que exista una acción concertada entre ambos genes del integumento para llevar adelante la detoxificación de deltametrina, y por ende, participando en la resistencia metabólica. Una alternativa para dilucidar si el insecticida es eficientemente degradado por estas enzimas es realizar la expresión heteróloga de las mismas con el fin de obtener enzimas funcionales y poder analizar su capacidad de metabolización de la deltametrina.

La principal conclusión de estos resultados es que la detoxificación dependiente de P450 estaría activa en el integumento de *T. infestans*. Esta información no solo contribuye a la hipótesis de que hay múltiples mecanismos participando en la resistencia a insecticidas, sino que también aporta nuevas evidencias sobre el rol del integumento en este fenómeno: además de participar como barrera física (con mayores cantidades de HC y proteínas cuticulares) también contribuiría en la detoxificación de insecticidas. Se incorpora un nuevo rol al factor cuticular: resistencia metabólica en la superficie.

6 CONCLUSIONES

Rol del integumento en la resistencia a insecticidas:

-En base al análisis cuali-cuantitativo de lípidos epicuticulares de *T. infestans*, no se obtuvieron evidencias sobre la participación de aldehídos y alcoholes grasos como componentes del factor lipídico cuticular de la resistencia. Se concluye entonces que los HC serían los principales responsables del componente lipídico del factor de resistencia cuticular.

- Se demostró que las dos CYP4G de *R. prolixus* son específicas de integumento y participan en la síntesis de HC. Se obtuvieron evidencias de un rol diferenciado en función de la presencia o ausencia de ramificaciones en la cadena carbonada. Sería de interés efectuar ensayos de expresión heteróloga a fin de profundizar en el estudio de su funcionalidad, así como para dilucidar el rol de aldehídos y alcoholes como precursores de las CYP4Gs.

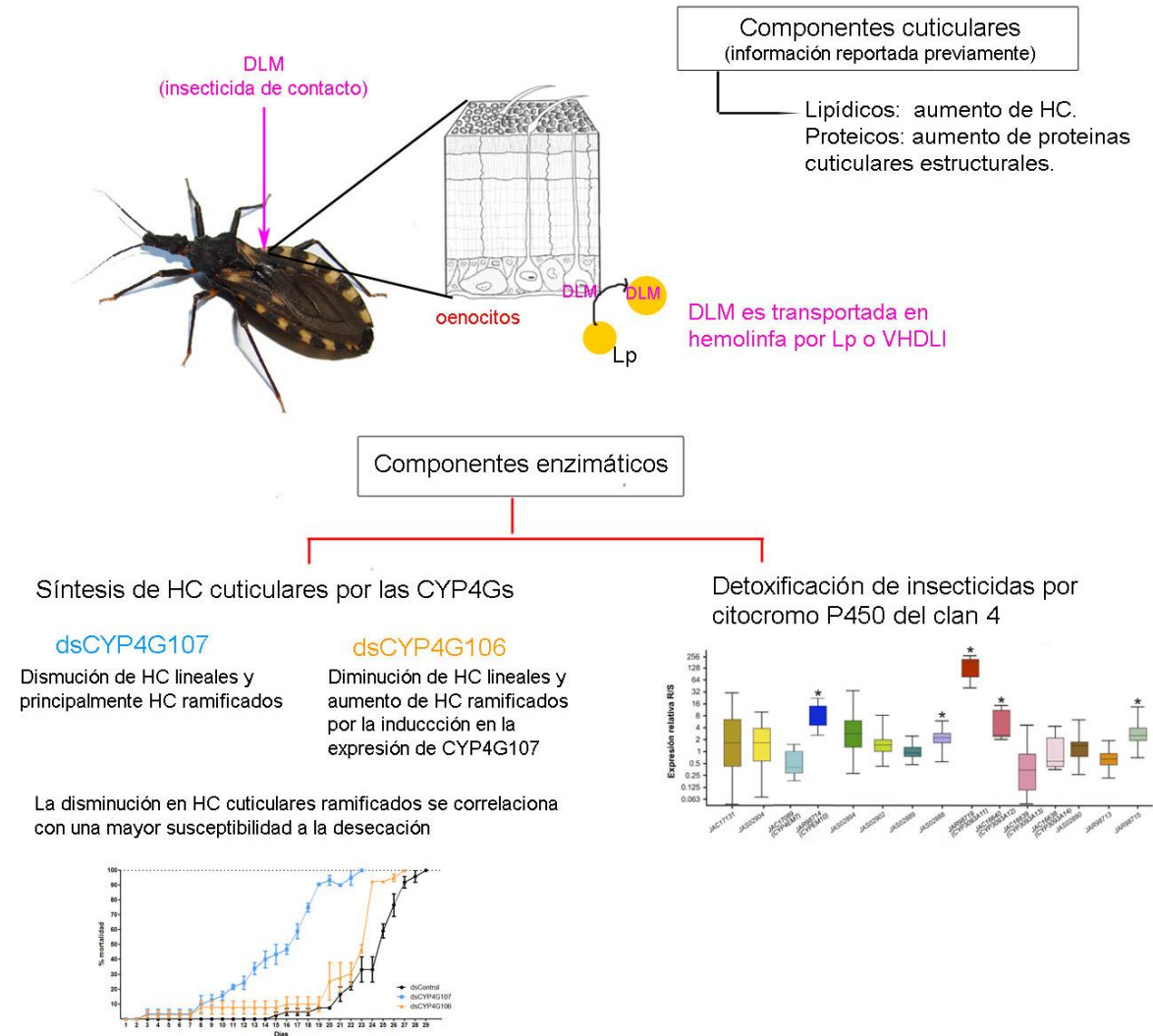
- Dentro de los genes de detoxificación reportados en el integumento de *T. infestans*, se identificaron los genes pertenecientes al clan 4 de las citocromo P450 que se sobreexpresan en insectos resistentes. Se propone así un nuevo componente en el factor cuticular de la resistencia a insecticidas. Para confirmar el rol de las correspondientes enzimas en la detoxificación de deltametrina, se sugieren ensayos futuros de expresión heteróloga de las mismas para estudiar su capacidad de metabolizar el insecticida.

Transporte de insecticidas:

-La deltametrina es ligada principalmente por lipoforina y en menor medida por VHDL I. La cantidad transportada por las proteínas de hemolinfa no estaría relacionada con la susceptibilidad al insecticida. Para avanzar en el conocimiento de los mecanismos iniciales de intoxicación con insecticidas de contacto, se continuará con el estudio de los receptores

de lipoproteínas así como en los transportadores ABC cuyos transcritos se encuentran presentes en el integumento de insectos *T. infestans*.

ROL DEL INTEGUMENTO EN LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS



Rol del integumento en comunicación química de contacto:

- Se cuantificaron las feromonas de contacto sexual C₂₀-ol y C₂₂-ol presentes en la epicutícula de hembras de *T. infestans*; su contenido estaría influenciado por la presencia de otras hembras. La ausencia de otros componentes epicuticulares con un marcado dimorfismo sexual confirmaría el rol exclusivo de estos alcoholes en el reconocimiento

sexual por contacto. Esta información será de utilidad para contribuir a optimizar trampas de atracción-infección para el control de *T. infestans*.

La sobreexpresión de dos acil-CoA reductasas (FAR) en hembras respecto de machos sugieren su posible participación en la síntesis de C₂₀-ol y C₂₂-ol. Se propone la realización de estudios de ARN de interferencia dirigidos a silenciar dichos transcritos, para evaluar el efecto del silenciamiento en la producción de estos compuestos.

7 BIBLIOGRAFÍA

- [WHO] **World Health Organization. 1994.** Protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre Triatomíneos. *Acta Toxicol Arg.* 2: 29–32.
- [WHO] **World Health Organization. 2017.** Chagas disease (American trypanosomiasis). ([http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)))).
- Adams, R. 2007.** Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. *Identif. Essent. oil components by gas Chromatogr. Spectrom.*
- Antony, B., B. Ding, K. Moto, S. Aldosari, and A. Aldawood. 2016.** Two fatty acyl reductases involved in moth pheromone biosynthesis. *TL - 6. Sci. Rep.* 6 VN-re: 29927.
- Antony, B., T. Fujii, K. Moto, S. Matsumoto, M. Fukuzawa, R. Nakano, S. Tatsuki, and Y. Ishikawa. 2009.** Pheromone-gland-specific fatty-acyl reductase in the adzuki bean borer, *Ostrinia scapulalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39: 90–95.
- Araujo, R., A. Santos, F. Pinto, N. Gontijo, M. Lehane, and M. Pereira. 2006.** RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 683–693.
- Arrese, E., L. Canavoso, Z. Jouni, J. Pennington, K. Tsuchida, and M. Wells. 2001.** Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.*
- Ashman, K., K. McNamara, and M. Symonds. 2016.** Experimental evolution reveals that population density does not affect moth signalling behaviour and antennal morphology. *Evol. Ecol.* 30: 1009–1021.
- Awolola, T., O. Oduola, C. Strode, L. Koekemoer, B. Brooke, and H. Ranson. 2009.** Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae* sensu stricto from Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103: 1139–1145.
- Balabanidou, V., A. Kampouraki, M. MacLean, G. Blomquist, C. Tittiger, M. Juárez, S. Mijailovsky, G. Chalepakis, A. Anthousi, A. Lynd, S. Antoine, J. Hemingway, H. Ranson, G. Lycett, and J. Vontas. 2016.** Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113: 9268–9273.
- Bariami, V., C. Jones, R. Poupardin, J. Vontas, and H. Ranson. 2012.** Gene Amplification, ABC Transporters and Cytochrome P450s: Unraveling the Molecular Basis of Pyrethroid Resistance in the Dengue Vector, *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis.* 6.
- Barnard, A., A. Nijhof, W. Fick, C. Stutzer, and C. Maritz-Olivier. 2012.** RNAi in arthropods: Insight into the machinery and applications for understanding the pathogen-vector interface. *Genes (Basel).* 3: 702–741.
- Bass, C., A. Puinean, C. Zimmer, I. Denholm, L. Field, S. Foster, O. Gutbrod, R. Nauen, R. Slater, and M. Williamson. 2014.** The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 51: 41–51.
- Berenbaum, M. 2002.** Postgenomic Chemical Ecology: From Genetic Code to Ecological

- Interactions. *J. Chem. Ecol.* 28: 873–896.
- Bern, C., S. Kjos, M. Yabsley, and S. Montgomery. 2011.** Trypanosoma cruzi and Chagas' Disease in the United States. *Clin. Microbiol. Rev.* 24: 655–81.
- Blomquist, G. 2010.** Biosynthesis of cuticular hydrocarbons, pp. 35–52. *In* Blomquist, G.J., Bagnères, A.-G. (eds.), *Insect Hydrocarb.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Blomquist, G., and L. Jackson. 1979.** Chemistry and biochemistry of insect waxes. *Prog. Lipid Res.* 17: 319–345.
- Blomquist, G., R. Jurenka, C. Schal, and C. Tittiger. 2012.** Pheromone Production: Biochemistry and Molecular Biology, pp. 523–567. *In* Gilbert, L. (ed.), *Insect Endocrinol.*
- Blomquist, G., D. Nelson, and M. De Renobales. 1987.** Chemistry, biochemistry, and physiology of insect cuticular lipids. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 6: 227–265.
- Blomquist, G., and R. Vogt. 2003.** Biosynthesis and detection of pheromones and plant volatiles, introduction and overview., pp. 231–252. *In* Blomquist, G.J., Vogt, R.G. (ed.), *Insect Pheromone Biochem. Mol. Biol. Biosynth. Detect. Pheromones Plan Volatiles.* Elsevier Academic Press, London.
- Bradfield, J., Y. Lee, and L. Keeley. 1991.** Cytochrome P450 family 4 in a cockroach: molecular cloning and regulation by regulation by hypertrehalosemic hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88: 4558–62.
- Buckner, J. 1993.** Cuticular polar lipids of insects., pp. 227–270. *In* Stanley-Samuelson, D.W., Nelson, D.R. (eds.), *Insect Lipids Chem. Biochem. Biol.* Lincoln, Nebraska.
- Bustamante Gomez, M., L. Gonçalves Dioetauti, and D. Gorla. 2016.** Distribution of pyrethroid resistant populations of *Triatoma infestans* in the southern cone of South America. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10: e0004561.
- Calderón-Fernández, G., J. Girotti, and M. Juárez. 2012.** Cuticular hydrocarbon pattern as a chemotaxonomy marker to assess intraspecific variability in *Triatoma infestans*, a major vector of Chagas' disease. *Med. Vet. Entomol.* 26: 201–209.
- Calderón-Fernández, G., and M. Juárez. 2013.** The cuticular hydrocarbons of the *Triatoma sordida* species subcomplex (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro.* 108: 778–784.
- Calderón-Fernández, G., D. Moriconi, A. Dulbecco, and M. Juárez. 2017.** Transcriptome analysis of the *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) integument. *J. Med. Entomol.*
- Calla, B., M. MacLean, L. Liao, I. Dhanjal, C. Tittiger, G. Blomquist, and M. Berenbaum. 2018.** Functional characterization of CYP4G11-a highly conserved enzyme in the western honey bee *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*
- Canavoso, L., Z. Jouni, K. Karnas, J. Pennington, and M. Wells. 2001.** Fat metabolism in insects. *Annu. Rev. Nutr.* 21: 23–46.
- Canavoso, L., and M. Wells. 2001.** Role of lipid transfer particle in delivery of diacylglycerol from midgut to lipophorin in larval *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 783–790.
- Cardé, R. 2014.** Defining Attraction and Aggregation Pheromones: Teleological Versus Functional Perspectives. *J. Chem. Ecol.* 40: 519–520.
- Cardozo, R., F. Panzera, A. Gentile, M. Segura, R. Pérez, R. Díaz, and M. Basombrío. 2010.** Inheritance of resistance to pyrethroids in *Triatoma infestans*, the main Chagas disease vector in South America. *Infect. Genet. Evol.* 10: 1174–1178.

- Carlson, D., D. Nelson, P. Langley, T. Coates, T. Davis, and M. Leegwater-Van Der Linden. 1984.** Contact sex pheromone in the tsetse fly *Glossina pallidipes* (Austen) Identification and Synthesis. *J. Chem. Ecol.* 10: 429–450.
- Catalá, S., D. Gorla, F. Panzera, M. Juárez, M. Picollo, F. Noireau, J. Dujardin, E. Zerba, R. Vassena, R. Pérez, G. Calderón-Fernández, L. Abrahan, M. Hernandez, R. Cardozo, E. López, X. Porcasi, M. Moreno, J. Schater Broide, L. Calleros, M. Ferreira, R. Gurtler, C. Lucero, I. Ferrandis, L. Cardozo, J. Girotti, S. Mijailovski, W. Richer, P. Kengne, M. Perrineau, A. Cohuet, D. Fontenille, B. Herrera, A. Gentile, A. Gemio, P. Alderete, P. Diosque, N. Acosta, P. Alcaraz, A. Llanos, and A. Uncos. 2007.** Analytical appraisal, Southern Cone – biological and environmental causes of the spatial structuration in *Triatoma infestans* and the implications for vector control programmes, pp. 13–18. *In Proc. SSA/EC Am. Trypanos. Updat. Work.* Asunción, Paraguay.
- Chase, J., K. Touhara, G. Prestwich, C. Schal, and G. Blomquist. 1992.** Biosynthesis and endocrine control of the production of the German cockroach sex pheromone 3,11-dimethylnonacosan-2-one. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 6050–4.
- Chen, N., Y. Fan, Y. Bai, X. Li, Z. Zhang, and T. Liu. 2016.** Cytochrome P450 gene, CYP4G51, modulates hydrocarbon production in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 76: 84–94.
- Christie, W. 1989.** Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide. THE OILY PRESS, Bridgwater, Somerset, United Kingdom.
- Chung, H., and S. Carroll. 2015.** Wax, sex and the origin of species: Dual roles of insect cuticular hydrocarbons in adaptation and mating. *Bioessays.* 37: 822–30.
- Chung, H., D. Loehlin, H. Dufour, K. Vaccarro, J. Millar, and S. Carroll. 2014.** A single gene affects both ecological divergence and mate choice in *Drosophila*. *Science.* 343: 1148–1151.
- Chung, H., T. Sztal, S. Pasricha, M. Sridhar, P. Batterham, and P. Daborn. 2009.** Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 5731–6.
- Cocchiararo-Bastias, L., S. Mijailovsky, G. Calderón-Fernández, A. Lorenzo Figueiras, and M. Juárez. 2011.** Epicuticle Lipids Mediate Mate Recognition in *Triatoma infestans*. *J. Chem. Ecol.* 37: 246–252.
- Coura, J., and J. Dias. 2009.** Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104 Suppl: 31–40.
- Cvačka, J., P. Jiroš, J. Šobotník, R. Hanus, and A. Svatoš. 2006.** Analysis of Insect Cuticular Hydrocarbons Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *J. Chem. Ecol.* 32: 409–434.
- David, J., E. Coissac, C. Melodelima, R. Poupardin, M. Riaz, A. Chandor-Proust, and S. Reynaud. 2010.** Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. *BMC Genomics.* 11: 216.
- David, J., H. Ismail, A. Chandor-Proust, and M. Paine. 2013.** Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368: 20120429–20120429.
- Delisle, J., and C. Vincent. 2002.** Modified pheromone communication associated with insecticidal resistance in the obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Chemoecology.* 12: 47–51.

- Dermauw, W., and T. Leeuwen. 2014.** The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 45: 89–110.
- Dong, Z., W. Zhang, Y. Zhang, X. Zhang, P. Zhao, and Q. Xia. 2016.** Identification and Characterization of Novel Chitin-Binding Proteins from the Larval Cuticle of Silkworm, *Bombyx mori*. *J. Proteome Res.* 15: 1435–1445.
- Dulbecco, A., S. Mijailovsky, J. Girotti, and M. Juárez. 2015.** Deltamethrin binding to *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) lipoproteins. Analysis by solvent bar microextraction coupled to gas chromatography. *J. Med. Entomol.* 52: 1254–1259.
- Farquhar, J. 1962.** Identification and gas-liquid chromatographic behavior of plasmalogen aldehydes and their acetal, alcohol, and acetylated alcohol derivatives. *J. Lipid Res.* 3: 21–30.
- Feyereisen, R. 2011.** Arthropod CYPomes illustrate the tempo and mode in P450 evolution. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1814: 19–28.
- Feyereisen, R. 2012.** Insect CYP Genes and P450 Enzymes., pp. 236–316. *In* Gilbert, L.I. (ed.), *Insect Mol. Biol. Biochem.* Elsevier B.V., Amsterdam.
- Ffrench-Constant, R. 2013.** The molecular genetics of insecticide resistance. *Genetics.*
- Ffrench-Constant, R., P. Daborn, and G. Le Goff. 2004.** The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet.* 20: 163–170.
- Fichera, L., and R. Brenner. 1982.** Isolation and characterization of the hemolymph lipoproteins of the *Triatoma infestans*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 72: 71–75.
- Forlani, L., M. Juárez, S. Lavarías, and N. Pedrini. 2014.** Toxicological and biochemical response of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* after exposure to deltamethrin. *Pest Manag. Sci.* 70: 751–756.
- Forlani, L., N. Pedrini, J. Girotti, S. Mijailovsky, R. Cardozo, A. Gentile, C. Hernández-Suárez, J. Rabinovich, and M. Juárez. 2015.** Biological Control of the Chagas Disease Vector *Triatoma infestans* with the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* Combined with an Aggregation Cue: Field, Laboratory and Mathematical Modeling Assessment. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9: e0003778.
- Germano, M. 2012.** Herencia y efectos demográficos de la resistencia a deltametrina en *Triatoma infestans*. <http://digital.bl.fcen.uba.ar>.
- Germano, M., and M. Picollo. 2015.** Reproductive and developmental costs of deltamethrin resistance in the Chagas disease vector *Triatoma infestans*. *J. Vector Ecol.* 40: 59–65.
- Gibbs, A. 2002.** Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. *J. Insect Physiol.* 48: 391–400.
- Gibbs, A., and J. Pomonis. 1995.** Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: The effects of chain length, methyl-branching and unsaturation. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 112: 243–249.
- Gibbs, A., and S. Rajpurohit. 2010.** Water-proofing properties of cuticular lipids, pp. 100–120. *In* Blomquist, G.J., Bagnères, A.G. (eds.), *Insect Lipids Biol. Biochem. Chem. Biol.* Cambridge Publisher.
- Ginzl, M. 2010.** Hydrocarbons as contact pheromones of longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae). *In* Bagnères, G.J.B. and A.G. (ed.), *Insect Hydrocarb. Biol. Biochem. Chem. Ecol.* Cambridge Press, New York.
- Girotti, J., I. Malbrán, G. Lori, and M. Juárez. 2010.** Use of solid phase microextraction coupled to capillary gas chromatography-mass spectrometry for screening *Fusarium*

- spp. based on their volatile sesquiterpenes. *World Mycotoxin J.* 3: 121–128.
- Girotti, J., S. Mijailovsky, and M. Juárez. 2012.** Epicuticular hydrocarbons of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Physiol. Entomol.* 37: 266–277.
- Gorla, D. 1992.** Population dynamics and control of *Triatoma infestans*. *Med. Vet. Entomol.* 6: 91–7.
- Gorla, D. 2002.** Variables ambientales registradas por sensores remotos como indicadores de la distribución geográfica de *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Ecol. austral.* 12: 117–127.
- Gorla, D., X. Porcasi, G. Hrellac, and S. Catalá. 2009.** Spatial stratification of house infestation by *Triatoma infestans* in La Rioja, Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80: 405–9.
- Grosso, C., M. Blariza, G. Mougabure-Cueto, M. Picollo, and B. García. 2016.** Identification of three cytochrome P450 genes in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans*: Expression analysis in deltamethrin susceptible and resistant populations. *Infect. Genet. Evol.* 44: 459–470.
- Gu, X., D. Quilici, P. Juárez, G. Blomquist, and C. Schal. 1995.** Biosynthesis of hydrocarbons and contact sex pheromone and their transport by lipophorin in females of the German cockroach (*Blattella germanica*). *J. Insect Physiol.* 41: 257–267.
- Gürtler, R., U. Kitron, M. Cecere, E. Segura, and J. Cohen. 2007.** Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 16194–9.
- Gutierrez, E., D. Wiggins, B. Fielding, and A. Gould. 2007.** Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism. *Nature.* 445: 275–280.
- Harari, A., T. Zahavi, and D. Thiéry. 2011.** Fitness cost of pheromone production in signaling female moths. *Evolution (N. Y.)*. 65: 1572–1582.
- Hellems, J., G. Mortier, A. De Paepe, F. Speleman, and J. Vandesompele. 2007.** qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8: R19.
- Helling, D., C. Brownie, and F. Guthrie. 1986.** Binding of insecticides by hemolymph proteins of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Pestic. Biochem. Physiol.* 25: 125–132.
- Hemingway, J. 2000.** The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 1009–1015.
- Hemingway, J., N. Hawkes, L. McCarroll, and H. Ranson. 2004.** The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 653–665.
- Ingham, V., C. Jones, P. Pignatelli, V. Balabanidou, J. Vontas, S. Wagstaff, J. Moore, and H. Ranson. 2014.** Dissecting the organ specificity of insecticide resistance candidate genes in *Anopheles gambiae*: known and novel candidate genes. *BMC Genomics.* 15: 1018.
- Jallon, J., and C. Wicker-Thomas. 2003.** Genetic studies on pheromone production in *Drosophila*. *Insect Pheromone Biochem. Mol. Biol.* 253–281.
- Jaspers, M., R. Pflanz, D. Riedel, S. Kawelke, I. Feussner, and R. Schuh. 2014.** The fatty acyl-CoA reductase waterproof mediates airway clearance in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 385: 23–31.
- Jaubert-Possamai, S., G. Le Trionnaire, J. Bonhomme, G. Christophides, C. Rispe, and D. Tagu. 2007.** Gene knockdown by RNAi in the pea aphid *Acyrtosiphon*

- pisum. *BMC Biotechnol.* 7: 63.
- Juárez, M. 1994a.** Inhibition of cuticular lipid synthesis and its effect on insect survival. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 25: 177–191.
- Juárez, M. 1994b.** Hydrocarbon Biosynthesis in *Triatoma infestans* Eggs. *Arch. Biochem. Physiol.* 25: 193–206.
- Juárez, M. 1996.** Composición de efecto insecticida, método de aplicación.
- Juárez, M. 2004.** Fatty Acyl-CoA elongation in *Blattella germanica* integumental microsomes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 56: 170–178.
- Juárez, M., S. Ayala, and R. Brenner. 1996.** Methyl-Branched Fatty Acid Biosynthesis in *Triatoma infestans*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 599–605.
- Juárez, M., G. Blomquist, and C. Schofield. 2001.** Hydrocarbons of *Rhodnius prolixus*, a Chagas disease vector. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 129: 733–746.
- Juárez, M., and R. Brenner. 1985.** The epicuticular lipids of *triatoma infestans*-II. Hydrocarbon dynamics. *Comp. Biochem. Physiol.* 82B: 793–803.
- Juárez, M., and R. Brenner. 1986.** [Biochemistry of the evolutive cycle of *Triatoma infestans*. IX. Composition of cuticular hydrocarbons compared to other *Triatominae*]. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 36: 47–57.
- Juárez, M., and R. Brenner. 1987.** Hydrocarbons of *Triatoma pallidipennis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 87: 233–239.
- Juárez, M., and R. Brenner. 1989.** Fatty acid biosynthesis in the integument tissue of *Triatoma infestans*. *Comp. Biochem. Physiol.* 93: 763–772.
- Juárez, M., R. Brenner, and E. Gros. 1984.** The epicuticular lipids of *Triatoma infestans*-I. Glycerides. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* 78: 427–431.
- Juárez, M., and G. Calderón-Fernández. 2007.** Cuticular hydrocarbons of triatomines. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 147: 711–730.
- Juárez, M., D. Carlson, P. Salazar Schettino, S. Mijailovsky, and G. Rojas. 2002.** Cuticular hydrocarbons of Chagas disease vectors in Mexico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97: 819–827.
- Juárez, M., J. Chase, and G. Blomquist. 1992.** A Microsomal Fatty Acid Synthetase from the Integument of *Blattella Germanica* Synthesizes Methyl-Branched Fatty Acids, Precursors to Hydrocarbon and Contact Sex Pheromone. *Arch. Biochem. Biophys.* 293: 333–341.
- Juárez, M., N. Pedrini, J. Girotti, and S. Mijailovsky. 2010.** Pyrethroid resistance in Chagas disease vectors: The case of *Triatoma infestans* cuticle. *Resist. Pest Manag. Newsletter.* 19: 59–61.
- Juárez, M., N. Pedrini, J. Girotti, S. Mijailovsky, and A. Lorenzo Figueiras. 2008.** Trampa para insectos hematófagos, método de control y método de detección de dichos insectos.
- Jurenka, R. 2003.** Biochemistry of female moth sex pheromones. *Insect Pheromone Biochem. Mol. Biol.* 53–80.
- Jurenka, R. 2004.** Insect Pheromone Biosynthesis, pp. 97–132. *In* . Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kaib, M., P. Jmhasly, L. Wilfert, W. Durka, S. Franke, W. Francke, R. Leuthold, and R. Brandl. 2004.** Cuticular Hydrocarbons and Aggression in the Termite *Macrotermes Subhyalinus*. *J. Chem. Ecol.* 30: 365–385.
- Klowden, M. 2010.** *Physiological Systems in Insects* (Google eBook). Elsevier/Academic

- Press.
- Koganemaru, R., D. Miller, and Z. Adelman. 2013.** Robust cuticular penetration resistance in the common bed bug (*Cimex lectularius* L.) correlates with increased steady-state transcript levels of CPR-type cuticle protein genes. *Pestic. Biochem. Physiol.* 106: 190–197.
- Lassance, J., A. Groot, M. Liénard, B. Antony, C. Borgwardt, F. Andersson, E. Hedenström, D. Heckel, and C. Löfstedt. 2010.** Allelic variation in a fatty-acyl reductase gene causes divergence in moth sex pheromones. *Nature.* 466: 486–489.
- Liénard, M., A. Hagström, J. Lassance, and C. Löfstedt. 2010.** Evolution of multicomponent pheromone signals in small ermine moths involves a single fatty-acyl reductase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 10955–10960.
- Lilly, D., S. Latham, C. Webb, and S. Doggett. 2016.** Cuticle thickening in a pyrethroid-resistant strain of the common bed bug, *Cimex lectularius* L. (Hemiptera: Cimicidae). *PLoS One.* 11: 6–16.
- Lim, H., K. Park, T. Baker, and M. Greenfield. 2007.** Perception of conspecific female pheromone stimulates female calling in an Arctiid moth, *Utetheisa ornatrix*. *J Chem Ecol.* 33: 1257–1271.
- Liu, N. 2015.** Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annu. Rev. Entomol.* 60: 537–559.
- Locke, M. 1984.** Epidermal cells, pp. 502–522. *In* J. Bereiter-Hahn, A.G.M. and K.S.R. (ed.), *Biol. Integument. 1. Invertebr.*
- Lorenzo Figueiras, A., J. Girotti, S. Mijailovsky, and M. Juárez. 2009.** Epicuticular lipids induce aggregation in Chagas disease vectors. *Parasit. Vectors.* 2: 8.
- MacLean, M., J. Nadeau, T. Gurnea, C. Tittiger, and G. Blomquist. 2018.** Mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae*) CYP4Gs convert long and short chain alcohols and aldehydes to hydrocarbons. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 102: 11–20.
- Maïbèche-Coisne, M., C. Merlin, M. François, P. Porcheron, and E. Jacquin-Joly. 2005.** P450 and P450 reductase cDNAs from the moth *Mamestra brassicae*: cloning and expression patterns in male antennae. *Gene.* 346: 195–203.
- Maïbèche-Coisne, M., L. Monti-Dedieu, S. Aragon, and C. Dauphin-Villemant. 2000.** A new cytochrome P450 from *Drosophila melanogaster*, CYP4G15, expressed in the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273: 1132–7.
- Majerowicz, D., M. Alves-Bezerra, R. Logullo, A. Fonseca-De-Souza, J. Meyer-Fernandes, G. Braz, and K. Gondim. 2011.** Looking for reference genes for real-time quantitative PCR experiments in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Mol. Biol.* 20: 713–722.
- Majerowicz, D., G. Calderón-Fernández, M. Alves-Bezerra, I. De Paula, L. Cardoso, M. Juárez, G. Atella, and K. Gondim. 2017.** Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus*: lessons from the genome. *Gene.* 596: 27–44.
- Makki, R., E. Cinnamon, and A. Gould. 2014.** The development and functions of oenocytes. *Annu. Rev. Entomol.* 59: 405–425.
- Mamidala, P., A. Wijeratne, S. Wijeratne, K. Kornacker, B. Sudhamalla, L. Rivera-Vega, A. Hoelmer, T. Meulia, S. Jones, and O. Mittapalli. 2012.** RNA-Seq and molecular docking reveal multi-level pesticide resistance in the bed bug. *BMC Genomics.* 13: 6.
- Manrique, G., and M. Lorenzo. 2012.** The Sexual Behaviour of Chagas' Disease Vectors: Chemical Signals Mediating Communication between Male and Female Triatomine

- Bugs. *Psyche A J. Entomol.* 2012: 1–8.
- Mao, J., and F. Zeng.** 2012. Feeding-Based RNA Interference of a Gap Gene Is Lethal to the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS One.* 7: e48718.
- Mao, W., M. Schuler, and M. Berenbaum.** 2015. Task-related differential expression of four cytochrome P450 genes in honeybee appendages. *Insect Mol. Biol.* 24: 582–588.
- Martins, G., B. Guedes, L. Silva, J. Serrão, C. Fortes-Dias, J. Ramalho-Ortigão, and P. Pimenta.** 2011. Isolation, primary culture and morphological characterization of oenocytes from *Aedes aegypti* pupae. *Tissue Cell.* 43: 83–90.
- Martins, G., J. Ramalho-Ortigão, N. Lobo, D. Severson, M. McDowell, and P. Pimenta.** 2011. Insights into the transcriptome of oenocytes from *Aedes aegypti* pupae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 106: 308–315.
- McKinney, R., C. Vernier, and Y. Ben-Shahar.** 2015. The neural basis for insect pheromonal communication. *Curr. Opin. insect Sci.* 12: 86–92.
- Mesquita, R., R. Vionette-Amaral, C. Lowenberger, R. Rivera-Pomar, F. Monteiro, P. Minx, J. Spieth, A. Carvalho, F. Panzera, D. Lawson, A. Torres, J. Ribeiro, M. Sorgine, R. Waterhouse, M. Montague, F. Abad-Franch, M. Alves-Bezerra, L. Amaral, H. Araujo, R. Araujo, L. Aravind, G. Atella, P. Azambuja, M. Berni, P. Bittencourt-Cunha, G. Braz, G. Calderón-Fernández, C. Carareto, M. Christensen, I. Costa, S. Costa, M. Dansa, C. Daumas-Filho, I. De-Paula, F. Dias, G. Dimopoulos, S. Emrich, N. Esponda-Behrens, P. Fampa, R. Fernandez-Medina, R. da Fonseca, M. Fontenele, C. Fronick, L. Fulton, A. Gandara, E. Garcia, F. Genta, G. Giraldo-Calderón, B. Gomes, K. Gondim, A. Granzotto, A. Guarneri, R. Guigó, M. Harry, D. Hughes, W. Jablonka, E. Jacquin-Joly, M. Juárez, L. Koerich, A. Lange, J. Latorre-Estivalis, A. Lavore, G. Lawrence, C. Lazoski, C. Lazzari, R. Lopes, M. Lorenzo, M. Lugon, D. Majerowicz, P. Marcet, M. Mariotti, H. Masuda, K. Megy, A. Melo, F. Missirlis, T. Mota, F. Noriega, M. Nouzova, R. Nunes, R. Oliveira, G. Oliveira-Silveira, S. Ons, I. Orchard, L. Pagola, G. Paiva-Silva, A. Pascual, M. Pavan, N. Pedrini, A. Peixoto, M. Pereira, A. Pike, C. Polycarpo, F. Prosdociami, R. Ribeiro-Rodrigues, H. Robertson, A. Salerno, D. Salmon, D. Santesmasses, R. Schama, E. Seabra-Junior, L. Silva-Cardoso, M. Silva-Neto, M. Souza-Gomes, M. Sterkel, M. Taracena, M. Tojo, Z. Tu, J. Tubio, R. Ursic-Bedoya, T. Venancio, A. Walter-Nuno, D. Wilson, W. Warren, R. Wilson, E. Huebner, E. Dotson, and P. Oliveira.** 2015. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112: 14936–14941.
- Metz, J., M. Pollard, L. Anderson, T. Hayes, and M. Lassner.** 2000. Purification of a jojoba embryo fatty acyl-coenzyme A reductase and expression of its cDNA in high erucic acid rapeseed. *Plant Physiol.* 122: 635–44.
- Mnzava, A., T. Knox, E. Temu, A. Trett, C. Fornadel, J. Hemingway, and M. Renshaw.** 2015. Implementation of the global plan for insecticide resistance management in malaria vectors: progress, challenges and the way forward. *Malar. J.* 14: 173.
- Moto, K., T. Yoshiga, M. Yamamoto, S. Takahashi, K. Okano, T. Ando, T. Nakata, and S. Matsumoto.** 2003. Pheromone gland-specific fatty-acyl reductase of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 9156–61.
- Motoyama, N., T. Sukanuma, and Y. Maekoshi.** 1992. Biochemical and physiological characteristics of insecticide resistance in diamondback moth. *Diamondback moth*

- other Crucif. pests Proc. Second Int. Work. Tainan, Taiwan, 10-14 December 1990 / N.S. Talekar, Ed.
- Mougabure-Cueto, G., and M. Picollo. 2015.** Insecticide resistance in vector Chagas disease: Evolution, mechanisms and management. *Acta Trop.* 149: 70–85.
- Napolitano, R., and M. Juárez. 1997.** Entomopathogenous Fungi Degrade Epicuticular Hydrocarbons of *Triatoma infestans*. *Arch. Biochem. Biophys.* 344: 208–214.
- Nation, J. 2008.** *Insect Physiology and Biochemistry*, Second Edition. CRC Press.
- Nelson, D. 2009.** The Cytochrome P450 Homepage. *Hum. Genomics.* 4: 59–65.
- Nojima, S. 2005.** Identification of the Sex Pheromone of the German Cockroach, *Blattella germanica*. *Science (80-)*. 307: 1104–1106.
- Nojima, S., K. Shimomura, H. Honda, I. Yamamoto, and K. Ohsawa. 2007.** Contact sex pheromone components of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. *J. Chem. Ecol.* 33: 923–933.
- OMS. 2012.** Plan mundial para el manejo de la resistencia a insecticidas en los vectores de malaria. World Heal. Organ.
- PAHO/WHO. 2016.** Development of a research agenda for characterizing the Zika virus outbreak and its public health implications in the Americas. PAHO.
- Pan, C., Y. Zhou, and J. Mo. 2009.** The clone of laccase gene and its potential function in cuticular penetration resistance of *Culex pipiens pallens* to fenvalerate. *Pestic. Biochem. Physiol.* 93: 105–111.
- Panzer, F., M. Ferreiro, S. Pita, L. Calleros, R. Pérez, Y. Basmadján, Y. Guevara, S. Brenière, and Y. Panzer. 2014.** Evolutionary and dispersal history of *Triatoma infestans*, main vector of Chagas disease, by chromosomal markers. *Infect. Genet. Evol.* 27: 105–113.
- Panzer, F., R. Pérez, Y. Panzer, I. Ferrandis, M. Ferreiro, and L. Calleros. 2010.** Cytogenetics and Genome Evolution in the Subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Cytogenet. Genome Res.* 128: 77–87.
- Pedrini, N., R. Crespo, and M. Juárez. 2007.** Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.*
- Pedrini, N., S. Mijailovsky, J. Girotti, R. Stariolo, R. Cardozo, A. Gentile, and M. Juárez. 2009.** Control of pyrethroid-resistant chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3: e434.
- Pereira, K., F. Schmidt, A. Guaraldo, R. Franco, V. Dias, and L. Passos. 2009.** Chagas' disease as a foodborne illness. *J. Food Prot.* 72: 441–6.
- Pfaffl, M., G. Horgan, and L. Dempfle. 2002.** Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30: e36.
- Pickett, J., I. Williams, and A. Martin. 1982.** (Z)-11-eicosen-1-ol, an important new pheromonal component from the sting of the honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae.). *J. Chem. Ecol.* 8: 163–175.
- Piccolo, M., C. Vassena, P. Santo Orihuela, S. Barrios, M. Zaidemberg, and E. Zerba. 2005.** High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J. Med. Entomol.* 42: 637–642.
- Pignatelli, P., V. Ingham, V. Balabanidou, J. Vontas, G. Lycett, and H. Ranson. 2018.** The *Anopheles gambiae* ATP-binding cassette transporter family: phylogenetic

- analysis and tissue localization provide clues on function and role in insecticide resistance. *Insect Mol. Biol.* 27: 110–122.
- Porcasi, X., S. Catalá, H. Hrellac, M. Scavuzzo, and D. Gorla. 2006.** Infestation of rural houses by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in southern area of Gran Chaco in Argentina. *J. Med. Entomol.* 43: 1060–7.
- Prata, A. 2001.** Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.* 1: 92–100.
- Puinean, A., S. Foster, L. Oliphant, I. Denholm, L. Field, N. Millar, M. Williamson, and C. Bass. 2010.** Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *PLoS Genet.* 6: 1–11.
- Qiu, Y., C. Tittiger, C. Wicker-Thomas, G. Le Goff, S. Young, E. Wajnberg, T. Fricaux, N. Taquet, G. Blomquist, and R. Feyereisen. 2012.** An insect-specific P450 oxidative decarboxylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109: 14858–14863.
- Ranson, H., C. Claudianos, F. Ortell, C. Abgrall, J. Hemingway, M. Sharakhova, M. Unger, F. Collins, and R. Feyereisen. 2002.** Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science.* 298: 179–81.
- Rassi, A. J., A. Rassi, and J. Marin-Neto. 2010.** Chagas disease. *Lancet.* 375: 1388–1402.
- Reed, J., D. Vanderwel, S. Choi, J. Pomonis, R. Reitz, and G. Blomquist. 1994.** Unusual mechanism of hydrocarbon formation in the housefly: cytochrome P450 converts aldehyde to the sex pheromone component (Z)-9-tricosene and CO₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 10000–4.
- Ribeiro, J., T. Assumpção, V. Pham, I. Francischetti, and C. Reisenman. 2012.** An insight into the sialotranscriptome of *Triatoma rubida* (Hemiptera: Heteroptera). *J. Med. Entomol.* 49: 563–572.
- Ribeiro, J., F. Genta, M. Sorgine, R. Logullo, R. Mesquita, G. Paiva-Silva, D. Majerowicz, M. Medeiros, L. Koerich, W. Terra, C. Ferreira, A. Pimentel, P. Bisch, D. Leite, M. Diniz, J. Junior, M. Da Silva, R. Araujo, A. Gandara, S. Brosson, D. Salmon, S. Bousbata, N. González-Caballero, A. Silber, M. Alves-Bezerra, K. Gondim, M. Silva-Neto, G. Atella, H. Araujo, F. Dias, C. Polycarpo, R. Vionette-Amaral, P. Fampa, A. Melo, A. Tanaka, C. Balczun, J. Oliveira, R. Gonçalves, C. Lazoski, R. Rivera-Pomar, L. Diambra, G. Schaub, E. Garcia, P. Azambuja, G. Braz, and P. Oliveira. 2014.** An Insight into the Transcriptome of the Digestive Tract of the Bloodsucking Bug, *Rhodnius prolixus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8: e2594.
- Rimoldi, O., J. Soulages, G. Finarelli, and R. Brenner. 1999.** Purification and properties of a small lipid-binding protein from the hemolymph of *Triatoma infestans*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 122: 97–104.
- Rimoldi, O., J. Soulages, M. Gonzalez, R. Peluffo, and R. Brenner. 1990.** Biochemistry of the evolution of *Triatoma infestans*, XI. Hemolymph lipophorin. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 40: 239–255.
- Rimoldi, O., J. Soulages, S. Gonzalez, R. Peluffo, and R. Brenner. 1989.** Purification and properties of the very high density lipoprotein from the hemolymph of adult *Triatoma infestans*. *J. Lipid Res.* 30: 857–864.
- Rodriguez, D., and J. Rabinovich. 1980.** The Effect of Density on Some Population Parameters of *Rhodnius Prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) Under Laboratory

- Conditions. *J. Med. Entomol.* 17: 165–171.
- Savoldelli, S., and P. Trematerra. 2011.** Mass-trapping, mating-disruption and attracticide methods for managing stored-product insects: success stories and research needs. *Stewart Postharvest Rev.* 7: 1–8.
- Schal, C., Y. Fan, and G. Blomquist. 2003.** Regulation of pheromone biosynthesis, transport, and emission in cockroaches, pp. 283–322. *In* Blomquist, G.J., Vogt, R.G. (eds.), *Insect Pheromone Biochem. Mol. Biol.* Elsevier Academic Press.
- Schama, R., N. Pedrini, M. Juárez, D. Nelson, A. Torres, D. Valle, and R. Mesquita. 2016.** *Rhodnius prolixus* supergene families of enzymes potentially associated with insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 69: 91–104.
- Schofield, C., and C. Galvão. 2009.** Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop.* 110: 88–100.
- Shen, G., and H. Lee. 2002.** Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides. *Anal. Chem.* 74: 648–54.
- Silva, A., G. Jander, H. Samaniego, J. Ramsey, and C. Figueroa. 2012.** Insecticide resistance mechanisms in the green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) I: A transcriptomic survey. *PLoS One.* 7: 9–11.
- Snetselaar, J., R. Andriessen, R. Suer, A. Osinga, B. Knols, and M. Farenhorst. 2014.** Development and evaluation of a novel contamination device that targets multiple life-stages of *Aedes aegypti*. *Parasit. Vectors.* 7: 200.
- Soderlund, D. 2008.** Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels, pp. 610–616. *In* *Pest Manag. Sci.* Wiley-Blackwell.
- Soderlund, D., and D. Knipple. 2003.** The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 563–77.
- Soliday, C., G. Blomquist, and L. Jackson. 1974.** Cuticular lipids of insects. VI. Cuticular lipids of the grasshoppers *Melanoplus sanguinipes* and *Melanoplus packardii*. *J. Lipid Res.* 15: 399–405.
- Sreng, L., A. Cloarec, and C. Rivault. 1998.** Cuticular extracts inducing aggregation in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *J. Insect Physiol.* 44: 909–918.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013.** MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725–2729.
- Teerawanichpan, P., A. Robertson, and X. Qiu. 2010.** A fatty acyl-CoA reductase highly expressed in the head of honey bee (*Apis mellifera*) involves biosynthesis of a wide range of aliphatic fatty alcohols. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40: 641–649.
- Toé, K., S. N’Falé, R. Dabiré, H. Ranson, and C. Jones. 2015.** The recent escalation in strength of pyrethroid resistance in *Anopheles coluzzi* in West Africa is linked to increased expression of multiple gene families. *BMC Genomics.* 16: 146.
- Vassena, C., M. Picollo, and E. Zerba. 2000.** Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Med. Vet. Entomol.* 14: 51–55.
- Vaz, A., G. Blomquist, and R. Reitz. 1988.** Characterization of the fatty acyl elongation reactions involved in hydrocarbon biosynthesis in the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem.* 18: 177–184.
- Villalobos-Sambucaro, M., F. Riccillo, G. Calderón-Fernández, M. Sterkel, L. Diambra, and J. Ronderos. 2015.** Genomic and functional characterization of a methoprene-tolerant gene in the kissing-bug *Rhodnius prolixus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 216: 1–8.
- Villaverde, M., J. Girotti, S. Mijailovsky, N. Pedrini, and M. Juárez. 2009.** Volatile

- secretions and epicuticular hydrocarbons of the beetle *Ulomoides dermestoides*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 154: 381–6.
- Vontas, J., J. David, D. Nikou, J. Hemingway, G. Christophides, C. Louis, and H. Ranson. 2007.** Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect Mol. Biol.* 16: 315–324.
- Wang, W., Y. Lv, F. Fang, S. Hong, Q. Guo, S. Hu, F. Zou, L. Shi, Z. Lei, K. Ma, D. Zhou, D. Zhang, Y. Sun, L. Ma, B. Shen, and C. Zhu. 2015.** Identification of proteins associated with pyrethroid resistance by iTRAQ-based quantitative proteomic analysis in *Culex pipiens pallens*. *Parasit. Vectors.* 8: 95.
- Wigglesworth, V. 1933.** The Physiology of the Cuticle and of Ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Triatomidae, Hemiptera); with special reference to the function of the oenocytes and of the dermal glands. *J. Cell Sci.* 76: 269–318.
- Wigglesworth, V. 1975.** Incorporation of lipid into the epicuticle of *Rhodnius* (Hemiptera). *J Cell Sci.* 19: 459–485.
- Wigglesworth, V. 1985.** Sclerotin and lipid in the waterproofing of the insect cuticle. *Tissue Cell.* 17: 227–248.
- Willis, J. 2011.** Structural cuticular proteins from arthropods: annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era. *Insect Biochem Mol Biol.* 40: 189–204.
- Winter, C., O. Giannotti, and E. Holzacker. 1975.** DDT-lipoprotein complex in the American cockroach hemolymph: A possible way of insecticide transport. *Pestic. Biochem. Physiol.* 5: 155–162.
- Wood, O., S. Hanrahan, M. Coetzee, L. Koekemoer, and B. Brooke. 2010.** Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasites and Vectors.* 3: 67.
- Yahouédo, G., F. Chandre, M. Rossignol, C. Ginibre, V. Balabanidou, N. Mendez, O. Pigeon, J. Vontas, and S. Cornelie. 2017.** Contributions of cuticle permeability and enzyme detoxification to pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Sci. Rep.* 7: 11091.
- Yu, Z., X. Zhang, Y. Wang, B. Moussian, K. Zhu, S. Li, E. Ma, and J. Zhang. 2016.** *LmCYP4G102*: An oenocyte-specific cytochrome P450 gene required for cuticular waterproofing in the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Sci. Rep.* 6: 29980.
- Zhu, F., H. Gujar, J. Gordon, K. Haynes, M. Potter, and S. Palli. 2013.** Bed bugs evolved unique adaptive strategy to resist pyrethroid insecticides. *Sci. Rep.* 3: 1456.
- Zhu, F., R. Parthasarathy, H. Bai, K. Woithe, M. Kausmann, R. Nauen, D. Harrison, and S. Palli. 2010.** A brain-specific cytochrome P450 responsible for the majority of deltamethrin resistance in the QTC279 strain of *Tribolium castaneum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 8557–8562.

