



**Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Universidad Nacional de La Plata**

***Hidrocarburos cuticulares de Triatominos: etapas
iniciales de la biosíntesis; rol en la resistencia a
insecticidas. Utilidad para el estudio filogenético del
grupo.***

Licenciada Débora Elizabeth Moriconi

2020

Directores

Dr. Calderón Fernández, Gustavo Mario y la Dra. Juárez, Marta Patricia
Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP) "Prof. Dr. Rodolfo R.
Brenner", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

Trabajos publicados durante la realización de este trabajo de Tesis:

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. doi: 10.1093/jme/tjx151.

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.

* Moriconi D.E. y Dulbecco, A. B. contribuyeron de manera equivalente en el presente trabajo.

Moriconi D. E., Dulbecco A. B., Juárez M. P., Calderón-Fernández, G. M. 2019. A fatty acid synthase gene (FASN3) from the integument tissue of *Rhodnius prolixus* contributes to cuticle water loss regulation. Insect Mol. Biol. doi: 10.1111/imb.12600.

Contenido

Contenido	3
Resumen	8
Introducción	14
Antecedentes	14
Enfermedad de Chagas	14
Triatominos.....	16
Taxonomía de los triatominos	18
Integumento	20
Lípidos cuticulares	23
Acido graso sintasa	24
Resistencia a insecticidas en triatominos	28
Mecanismos de resistencia	31
Resistencia KDR.....	31
Resistencia metabólica	31
Factor cuticular de resistencia a insecticidas	32
Hipótesis	34
Objetivos	34
Objetivos generales	34
Objetivos específicos	34
Metodología	35
Insectos	35
Disección de tejidos	35
Análisis Microscópico del integumento	36
Microscopia óptica	36
Microscopia electrónica de barrido (MEB)	36
Análisis bioinformáticos	37
Identificación y anotación de genes	37
Diseño de cebadores	38
Análisis filogenético.....	42
Análisis estructural de los genes FASN en <i>Rhodnius prolixus</i> y <i>Triatoma infestans</i>	44
Análisis génicos	44
Extracción ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)	44
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	46
PCR convencional o de punto final	47
PCR en Tiempo Real y análisis	49
Amplificación rápida de los extremos de ADNc (RACE)	54

Clonación	57
Secuenciación	59
Técnica de interferencia de ARN (ARNi): Síntesis de doble hebra (dsRNA) e inyección de insectos	61
Técnica de interferencia de ARN (ARNi):	61
Síntesis de ARNdc:	63
Inyección de ARNdc en los insectos y medición de la eficiencia del silenciamiento	64
Análisis bioquímicos.....	64
Extracción de lípidos totales y purificación de ácidos grasos (AG) del integumento	64
Extracción de lípidos totales y purificación de hidrocarburos (HC) del integumento.....	65
Análisis mediante cromatografía gaseosa capilar (CGC).....	66
Bioensayos de tolerancia a diferentes condiciones de humedad relativa (H.R.).....	73
Análisis estadísticos	73
Capítulo 1: Análisis del transcriptoma de integumento de <i>Triatoma infestans</i>	75
Resultados	75
Genes del metabolismo lipídico: abundancia relativa y estudio de la expresión génica relativa en colonias susceptibles y resistentes de <i>Triatoma infestans</i> . (FASNs, ELOVLs, FAR, CYP4Gs)	77
Genes de resistencia metabólica: abundancia relativa y estudio de la expresión génica relativa en colonias susceptibles y resistentes de <i>Triatoma infestans</i> . (CYP clan 3, CCE).....	81
Discusión	83
Capítulo 2: Caracterización molecular y funcional de las Acido graso sintasas de <i>Rhodnius prolixus</i> y <i>Triatoma infestans</i>.....	95
Resultados	95
Caracterización molecular de las ácido graso sintasas en <i>Rhodnius prolixus</i> y <i>Triatoma infestans</i>	95
Amplificación de las secuencias parciales de las ácido graso sintasas de <i>Triatoma infestans</i>	95
Análisis bioinformático de las ácido graso sintasas de <i>Rhodnius prolixus</i> y <i>Triatoma infestans</i>	97
Expresión diferencial de los transcritos de las ácido graso sintasas de <i>Rhodnius prolixus</i> y <i>Triatoma infestans</i> en diferentes tejidos y órganos	100
<i>Rhodnius prolixus</i>	100
<i>Triatoma infestans</i>	102
Expresión diferencial de las ácido graso sintasas de <i>Rhodnius prolixus</i> y <i>Triatoma infestans</i> a lo largo del cuarto estadio ninfal	103
<i>Rhodnius prolixus</i>	103
<i>Triatoma infestans</i>	107
Caracterización funcional de las ácido graso sintasas: Silenciamiento de los transcritos en <i>Rhodnius prolixus</i>	108

Efecto del silenciamiento de los genes RPRC000123, RPRC002909 y RPRC000269 en la supervivencia de los insectos	108
Identificación de ácidos grasos de integumento de <i>Rhodnius prolixus</i>	109
Efecto del silenciamiento de RPRC000123 en el perfil de ácidos grasos	111
Efecto del silenciamiento de RPRC000123 en el perfil de hidrocarburos.....	114
Efecto del silenciamiento de RPRC000123 en insectos expuestos a condiciones de alta H.R.	117
Alteraciones epicuticulares en insectos silenciados con dsRPRC000123	118
Expresión diferencial del receptor de lipoforina (RPRC011390) en el integumento de <i>Rhodnius prolixus</i> en función del estado alimentario.....	119
Efecto del silenciamiento de RPRC000123 en la expresión génica del receptor de lipoforina (RPRC011390).....	120
Efecto del silenciamiento de RPRC000123 en la expresión génica de las citocromo P450 de la familia 4G (RPRC003227 y RPRC013847).....	121
Discusión	122
Capítulo 3: Relaciones filogenéticas entre <i>Triatoma infestans</i> y subcomplejo Sordida	131
Resultados	131
Discusión	132
Conclusiones finales	136
Bibliografía.....	138

Agradecimientos

Este trabajo de Tesis es el producto de mucho esfuerzo y dedicación, transitado junto a personas a las que agradezco enormemente su acompañamiento.

A mis directores la Dra. Juárez y el Dr. Calderón Fernández por su tiempo y dedicación. Al Dr. Pedrini por su enseñanza constante y el aporte de su valiosa experiencia.

Agradezco a la UNLP, en especial a todos los docentes dedicados de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo por la formación adquirida. Al CONICET por otorgarme la beca doctoral que me permitió formarme como profesional y desarrollar mi doctorado.

A todos los integrantes del INIBIOLP, a quienes agradezco los aportes brindados en distintos aspectos y la predisposición a consultas a lo largo de estos años.

Mi agradecimiento a los miembros del laboratorio 12. Al Lic. Mijailovsky y la Lic. Gastaca por su ayuda en los análisis cromatográficos. A la Lic. Fuse y Sr. Bozzolo por su predisposición y cuidado de los insectos.

Un agradecimiento especial a las chicas del laboratorio Carli, Mari, Fla, Eli, Bel Garcia Fabiani, Costi, Bel Davyt, Flor, Guille, Lu, Leti y Yose, por su incondicional compañía y ayuda durante todo este tiempo compartido. Especialmente agradezco a Andre, fiel compañera y amiga durante este camino, por sus enseñanzas e inolvidable ayuda, sin las cuales este trabajo no hubiera sido posible.

Un reconocimiento especial a la Dra. Villalobos, Cocó, por su entera disposición y enseñanza sobre la biología de los insectos y a la Dra. Bruno, Ceci, por su ayuda en los análisis filogenéticos.

A mi familia y amigos, siempre presentes en cada proceso de mi vida, por acompañarme y brindarme todo el apoyo incondicional.

A Pablo, el amor de vida, por el cariño, la compañía, la paciencia, la escucha y muchas cualidades más que admiro de vos y fue un gran sostén durante este proceso. Y a mi pequeña Violeta, que me acompañó todo el tiempo en mi interior durante este último tramo.

A todos,

Muchas Gracias!

Abreviaturas

ACP: proteína transportadora de acilos

ADNc: ADN complementario

AG: ácido graso

ARNi: ARN de interferencia

CCE: carboxilesterasa

CGC: cromatografía gaseosa capilar

HC: hidrocarburos

CHC: hidrocarburos cuticulares

CYP: citocromo P450 monooxigenasa

DAG: diacilglicérido

DH: dehidratasa

ELOVL: acil-CoA elongasa de cadena muy larga

ER: enoil reductasa

EST: marcadores de secuencia expresada

FAD: ácido graso desaturasa

FAME: éster metílico de ácido graso

FAR: acil-CoA reductasas

FAS: ácido graso sintasa

FID: detector de ionización con llama

H.R: humedad relativa

KDR: resistencia knockdown

KI: índice de retención

KR: β - cetoacil reductasa

KS: β -cetoacil ACP sintasa

MAT: malonil/acetil transferasa

MEB: microscopia electrónica de barrido

MS: espectrometría de masas

NJ: Neighbor-Joining

NRQ: cantidad relativa normalizada

PA: días posteriores a la alimentación

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PM: días posteriores a la muda

R: población resistente a piretroides

RACE: amplificación rápida de los extremos de ADNc

RT- qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

S: población susceptible a piretroides

STD: estándar

TE: tioesterasa

VLCFA: ácido graso de cadena muy larga

Resumen

La subfamilia Triatominae (Heteroptera: Reduviidae) incluye aproximadamente 140 especies de insectos hematófagos, vectores de la Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana. Esta es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* y afecta entre 6 y 7 millones de personas en el mundo, principalmente en América Latina. Las especies de la subfamilia Triatominae están agrupadas en complejos y subcomplejos en base a similitudes morfológicas y de distribución geográfica, entre otras características. Las distintas especies de triatominos son capaces de colonizar el hábitat doméstico, peridoméstico y silvestre y se clasifican de acuerdo con el grado de asociación con el ser humano en especies primarias y secundarias.

Las especies primarias más importantes de América Latina son: *Triatoma infestans*, principal vector primario en Argentina y el Cono Sur de América Latina; *Triatoma dimidiata* distribuida en México, toda América Central y el norte y oeste de América del Sur; y *Rhodnius prolixus* localizado en varios países de América del Sur y América Central. Las especies del subcomplejo Sordida (*Triatoma sordida*, *Triatoma guasayana*, *Triatoma patagonica* y *Triatoma garciabesi*) están incluidas, junto con otras, dentro de las especies secundarias de mayor importancia en Argentina y países limítrofes. Este subcomplejo se encuentra ampliamente distribuido en Argentina, Bolivia, sur de Brasil, Paraguay y Uruguay. El uso de insecticidas piretroides para el control de la Enfermedad de Chagas ha reducido tanto el rango geográfico como la prevalencia de infestación con *T. infestans*, *T. dimidiata* y *R. prolixus*. Sin embargo, se han detectado poblaciones de *T. infestans* con niveles altos y muy altos de resistencia a piretroides especialmente en Argentina y Bolivia. La resistencia a insecticidas piretroides es un fenómeno multifactorial que comprende tres mecanismos principales: la insensibilidad del sitio de acción o resistencia knockdown, la actividad aumentada de enzimas detoxificantes o resistencia metabólica y la disminución de la penetración o factor cuticular de resistencia.

El integumento es el tejido más externo de los insectos y está formado por la cutícula y la epidermis subyacente. Tiene una importancia fundamental en el crecimiento, el metabolismo y la fisiología general de los insectos. La cutícula comprende la epicutícula más externa y la procutícula. La epidermis incluye diversos tipos celulares como las células epidérmicas, los oenocitos, las glándulas dermales y las células tricógenas. Además de su activo rol en el metabolismo general del organismo, las células de la epidermis sintetizan todos los componentes de la cutícula y se ha demostrado que en particular los oenocitos están involucrados en la biosíntesis de los hidrocarburos y demás lípidos cuticulares. Los

hidrocarburos cuticulares no sólo están implicados en evitar una pérdida de agua letal por evaporación, sino que participan en la comunicación química y también tienen un rol relevante en evitar la penetración de insecticidas. Estudios de nuestro laboratorio demostraron que la remoción de los hidrocarburos cuticulares incrementaba la penetración de insecticidas y más recientemente se mostró por primera vez en insectos, un incremento significativo de los hidrocarburos cuticulares en ejemplares de *T. infestans* resistentes a piretroides, asociado a una disminución de la penetración de deltametrina. Por otra parte, los hidrocarburos cuticulares han sido usados como marcadores taxonómicos para estudiar la variabilidad inter e intraespecífica en numerosas especies de insectos y en nuestro laboratorio se han usado para analizar la variabilidad intraespecífica de *T. dimidiata* y *T. infestans*, dos de los 3 principales vectores de la Enfermedad de Chagas.

La FAS de insecto es una enzima que contiene siete dominios funcionales y que actúa como homodímero, catalizando la síntesis de ácidos grasos de cadena larga a partir de acetil-CoA y malonil- o metilmalonil-CoA. La síntesis de los hidrocarburos y otros lípidos cuticulares de insecto se inicia a partir de la acción de ácido graso sintasas (FASs) específicas del integumento. Los ácidos grasos de cadena larga participan en diversos procesos biológicos tales como la transducción de señales, constituyen las membranas celulares, actúan como reserva energética, etc. Los productos de las FASs del integumento son a su vez sustrato de elongasas de ácidos grasos (ELOVLs) específicas de sustrato que producen ácidos grasos de cadena muy larga. Los acil-CoA liberados del sistema elongante son sustrato de diversas enzimas como acil-CoA reductasas (FARs) y citocromos P450 de la familia 4G (CYP4Gs) para formar hidrocarburos, alcoholes grasos, ceras y demás lípidos cuticulares.

En este trabajo de tesis, en primer lugar, se llevó a cabo la anotación de genes de la biosíntesis y metabolismo de lípidos cuticulares de *T. infestans* a partir de un transcriptoma de integumento disponible en el laboratorio y se midió mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT- qPCR) la expresión de genes codificantes de enzimas involucradas en la formación de hidrocarburos cuticulares (FAS, ELOVL, FAR, CYP4G) en ejemplares resistentes a piretroides comparada con respecto a ejemplares susceptibles. Se detectó una sobreexpresión en los insectos resistentes de varios genes codificantes de ELOVL y CYP4G, que podría contribuir a explicar el mayor contenido de hidrocarburos cuticulares observado en estos ejemplares. Asimismo, se detectó en los insectos resistentes una sobreexpresión de genes codificantes de esterases y CYPs del clan 3, lo que junto con otros resultados de nuestro laboratorio (aumento del contenido de HC y penetración

disminuida de insecticida) sugiere una participación activa del integumento en el mecanismo de resistencia metabólica.

En segundo lugar, se caracterizaron molecularmente los tres genes codificantes de FAS identificados previamente en el genoma de *R. prolixus* (*RPRC000123*, *RPRC000269* y *RPRC002909*), y dos genes en *T. infestans* (*KY797274* y *KY805857*) obtenidos a partir del transcriptoma de integumento de este insecto. Los análisis mediante RT- qPCR mostraron que los transcritos de los genes *RPRC000123*, *RPRC002909* y *KY805857* se expresan principalmente en el integumento, mientras que los de los genes *RPRC000269* y *KY797274* se expresan en el cuerpo graso. Los genes de FAS ya caracterizados en *D. melanogaster*, junto con el análisis filogenético y de expresión diferencial en distintos tejidos de los genes codificantes de FAS en estos triatominos sugieren que, el gen *RPRC000269* de *R. prolixus* y el gen *KY797274* de *T. infestans* son ortólogos del gen *FASN1* (*CG3523*), el gen *RPRC002909* de *R. prolixus* es ortólogo del gen *FASN2* (*CG3524*), mientras que el gen *RPRC000123* de *R. prolixus* y el gen *KY805857* de *T. infestans* son ortólogos del gen *FASN3* (*CG17374*). Usando como modelo experimental a *R. prolixus*, se silenciaron los tres genes de FAS mediante la técnica de interferencia de ARN. El silenciamiento de los genes *RPRC000269* y *RPRC002909* no afectó la viabilidad de los insectos mientras que los insectos con el gen *RPRC000123* silenciado, criados en condiciones de humedad estándar (45%), murieron inmediatamente luego de la muda al siguiente estadio, sin esclerotizar y oscurecer la cutícula. El análisis de los ácidos grasos e hidrocarburos del integumento de estos últimos, efectuado mediante cromatografía gaseosa capilar acoplada a un detector de ionización de llama (CGC-FID) o de espectrometría de masas (CGC-MS) reveló una disminución significativa en el contenido de ácidos grasos lineales y ramificados y de HC ramificados. Los insectos con el gen *RPRC000123* silenciado y expuestos a condiciones de alta humedad (96%) sobrevivieron durante las 48hs posteriores a la muda. De esta manera se pudo determinar que la *FASN3* de *R. prolixus* es esencial para la formación de los precursores de los hidrocarburos que impermeabilizan la cutícula.

En tercer lugar, se analizaron las relaciones filogenéticas entre *T. infestans* y las diversas especies del subcomplejo Sordida empleando los hidrocarburos cuticulares como caracteres taxonómicos para la construcción de cladogramas según el modelo de Neighbor-Joining. Se pudo determinar a las poblaciones de *T. infestans*, la mayoría de las poblaciones de *T. guasayana* y dos de *T. garciabesi* como grupos monofiléticos. No se pudieron establecer relaciones filogenéticas de la mayoría de las poblaciones de *T. sordida* dado por la presencia de politomías.

Los resultados obtenidos en esta tesis aportan información relevante sobre el rol del integumento en la resistencia a insecticidas. Asimismo, permiten avanzar en el conocimiento de las funciones e importancia de las ácido graso sintetas de insecto, las cuales han sido escasamente estudiadas.

The Triatominae Subfamily (Heteroptera: Reduviidae) includes about 140 species of hematophagous insects, which are vectors of the Chagas disease or American trypanosomiasis. This illness, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, affects 6 to 7 million people worldwide, mostly in Latin America. Triatomine species are grouped in non-taxonomic categories (complexes and subcomplexes) based on similarity in morphology and geographic distribution, among other features. Triatomine species are considered as primary species if they are able to form permanent colonies inside human dwellings, or secondary ones if they live mostly in the peridomestic and sylvatic habitats and occasionally invade human houses. The most important primary species in Latin America are: *Triatoma infestans*, distributed in the Southern Cone region of South America, *Triatoma dimidiata*, with a wide distribution from Mexico, throughout Central America to Northern South America, and *Rhodnius prolixus*, found in some countries of Central and South America. The species belonging to the Sordida subcomplex (*Triatoma sordida*, *Triatoma guasayana*, *Triatoma patagonica* and *Triatoma garciabesi*) are considered secondary vectors of the disease in our region. This subcomplex is distributed in Argentina, Bolivia, Southern Brazil and Uruguay.

The use of pyrethroid insecticides has reduced vector populations and the prevalence of the disease. However, pyrethroid resistance has raised in several *T. infestans* populations from Argentina and Bolivia, reducing the efficacy of control programs.

Insecticide resistance involves three major mechanisms: decreased sensitivity of the insecticide's target site, increased metabolic detoxification of insecticides, and decreased cuticle penetration.

The integument, formed by the cuticle and the underlying epidermis, is the outer insect tissue. It has a major relevance in development, general metabolism and physiology of insects. The cuticle is formed by the outer epicuticle and an inner procuticle. The epidermis includes different cell types such as the epidermal cells, oenocytes, dermal glands and trichogen cells. It is involved in the synthesis of all the cuticle components but also participate in general metabolism, for instance, exchanging lipids with the fat body. In particular, the oenocytes have been shown to be the site of synthesis of the hydrocarbons and other cuticle

lipids. Cuticle hydrocarbons are involved not only in waterproofing the cuticle but also, they participate in chemical communication and more recently, evidence has been gathered on their contribution to diminish the penetration of insecticides and other chemicals through the cuticle. Early studies from our lab showed that solvent-removal of the cuticle lipids increases insecticide penetration and insect mortality in *T. infestans*. More recently, evidences were first provided in an insect, that higher cuticle hydrocarbon content is correlated with diminished deltamethrin penetration in pyrethroid-resistant *T. infestans* samples, compared to pyrethroid-susceptible insects. Due to their species-specificity, cuticle hydrocarbons have been used as taxonomic characters to study the inter- and intraspecific variability of several insect species. In triatomines, cuticle hydrocarbons were used to assess the intraspecific variability of *T. dimidiata* and *T. infestans*, as well as to differentiate between the genera *Triatoma*, *Rhodnius* and *Pastrongylus*.

The insect FAS is a very large protein containing seven enzymatic domains, which catalyze the biosynthesis of long chain fatty acids using acetyl-CoA as primer and either malonyl-CoA or methylmalonyl-CoA as elongating unit. Integument fatty acid synthases (FASs) are involved in the synthesis of the long chain fatty acids, precursors to hydrocarbons and other cuticle lipids. FAS products are elongated to very long chain fatty acids (VLCFAs) by substrate-specific fatty acyl-CoA elongases (ELOVLs), which form carbon chains. VLCFAs are reduced by fatty acyl-CoA reductases (FARs) to form fatty alcohols (FA). FA can be later decarbonylated by cytochromes P450 4G (CYP4Gs) to form hydrocarbons.

In this thesis, I have firstly annotated several genes involved in cuticle lipid biosynthesis and metabolism obtained from a *T. infestans* integument transcriptome. The relative expression of some genes involved in the cuticle hydrocarbon biosynthetic pathway (FAS, ELOVL, FAR, CYP4G) was measured by quantitative PCR (RT-qPCR) in pyrethroid-resistant samples of *T. infestans*, compared to pyrethroid-susceptible samples. Some ELOVL and CYP4G genes were overexpressed in the resistant samples, which might explain their higher cuticle hydrocarbon content. Additionally, some genes coding for carboxylesterases and CYP's from the clan 3 were overexpressed in the resistant insects. Together with other results from our lab, present results support the participation of the integument in insecticide detoxification.

Secondly, I have molecularly characterized the three FASN genes previously identified in the *R. prolixus* genome (*RPRC000123*, *RPRC000269* and *RPRC002909*) and two genes annotated from the *T. infestans* integument transcriptome (*KY797274* and *KY805857*). RT-qPCR analysis showed that *RPRC000123*, *RPRC002909* and *KY805857* genes are

expressed in the integument while *RPRC000269* and *KY797274* are mostly expressed in the fat body. Based in the *D. melanogaster* FAS genes already characterized, the *R. prolixus* *RPRC000269* and the *T. infestans* *KY797274* are orthologues of the *FASN1* (*CG3523*) gene, the *R. prolixus* *RPRC002909* is orthologue of the *FASN2* (*CG3524*) gene, while the *R. prolixus* *RPRC000123* and the *T. infestans* *KY805857* are orthologues of the *FASN3* (*CG17374*) gene. The expression of *R. prolixus* *RPRC000123*, *RPRC000269* and *RPRC002909* genes was silenced by RNA interference. Under standard rearing conditions (45% RH), *RPRC000269*- and *RPRC002909*-silenced insects molted to the next stage and survived normally. In contrast, *RPRC000123*-silenced insects died immediately after molting, without concluding the sclerotization and darkening of the cuticle. Capillary gas chromatography analysis of integument fatty acids and hydrocarbons showed a significant reduction of both lipid classes in silenced insects, compared to controls. Placing the *RPRC000123*-silenced insects into a humid chamber (96% RH) 3 days prior to the expected molt, helped insects to survive for about 24 h after molting, with a complete sclerotization of their cuticles. These experiments showed that the *R. prolixus* *FASN3* (*RPRC000123*) gene is essential in forming the long chain fatty acids, precursors to cuticle hydrocarbons and other lipids that waterproof the insect cuticle.

Thirdly, cuticle hydrocarbons were used as taxonomic characters to analyze the phylogenetic relationship between the species of the *Sordida* subcomplex and *T. infestans*. The analysis showed a monophyletic status for all the *T. infestans* populations and most of the *T. guasayana* and *T. garciabesi* ones. However, the analysis failed in establishing the relationships between most of the *T. sordida* populations due to the presence of polytomies. This thesis contributes to understand the roles of the integument in insecticide resistance. It helps to gain understanding into the function of insect fatty acid synthases, which have been poorly studied.

Introducción

Antecedentes

Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es una infección causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, que afecta entre 6 y 7 millones de personas en el mundo, principalmente en América Latina (WHO, 2019).

La transmisión de esta enfermedad ocurre a través de diversos mecanismos, entre los cuales se puede mencionar: la transmisión vectorial durante la diuresis de insectos vectores infectados; la transmisión transplacentaria o congénita durante el embarazo; la transmisión transfusional ocasionada por donantes infectados con *T. cruzi*; la transmisión oral al consumir alimentos contaminados; la transmisión accidental mediante el contacto con deyecciones de triatominos o cultivos de parásitos en hospitales y laboratorios y la transmisión por transplantes de órganos (Schmunis, 2007; WHO, 2019).

La transmisión vectorial es el mecanismo más frecuente y está mediada por insectos de la subfamilia Triatominae (Heteróptera: Reduviidae) que afectan aproximadamente a unas 120 especies de mamíferos, incluido el ser humano, lo que refleja su carácter zoonótico, representado por complejos y diversos ciclos de transmisión en el ambiente silvestre y doméstico.

La tripanosomiasis americana, originalmente transmitida en la naturaleza entre mamíferos silvestres y triatominos, se convirtió luego en una antropozoonosis por la intrusión del hombre en el medio ambiente natural en el que circula *T. cruzi*. La ocupación de estas áreas por el hombre provocó la introducción activa o pasiva de algunas especies de triatominos en sus hogares y peridomicilios, y el establecimiento de nuevos ciclos de transmisión: el ciclo doméstico que se desarrolla dentro de las viviendas (principalmente viviendas rurales precarias), donde participan humanos y animales domésticos junto con especies de triatominos que presentan un grado variable de adaptación a la vivienda, y el peridoméstico desarrollado en el área que rodea a la vivienda (corrales, depósitos, etc), donde intervienen una gran variedad de animales domésticos (cabras, perros, gatos, roedores, entre otros) y triatominos de varias especies. Este último ciclo representa un nexo entre el ciclo domiciliario y silvestre, favoreciendo el intercambio de triatominos infectados. Por lo tanto, el hombre y los animales domésticos se convirtieron en parte de la cadena epidemiológica, con la posibilidad de intercambio y transmisión vectorial de *T. cruzi* entre los ciclos silvestre, peridoméstico y doméstico (Briceño-León, 2009; Cecere y col., 1999).

La fase aguda puede durar 2 meses luego de la infección y se caracteriza por una gran circulación de los parásitos en sangre y por ser asintomática o con síntomas leves e inespecíficos como fiebre, dolor muscular, dolor de cabeza, etc. Durante la fase crónica, los parásitos se localizan en la musculatura del corazón y el tracto digestivo. En los años siguientes la enfermedad puede llevar a la muerte del paciente, usualmente por falla cardíaca (WHO, 2019).

El inicio de la infección en un mamífero sano comienza tras la picadura del triatomino infectado. Las deyecciones del insecto conteniendo la forma infectiva del parásito son depositadas sobre la superficie de la piel, y los parásitos penetran las diversas capas de la misma, donde se dividen y son capaces de infectar otras células y tejidos hasta ingresar en el torrente sanguíneo. De ahí se trasladan a distintos órganos diana, donde se establecen y reproducen (Figura 1).

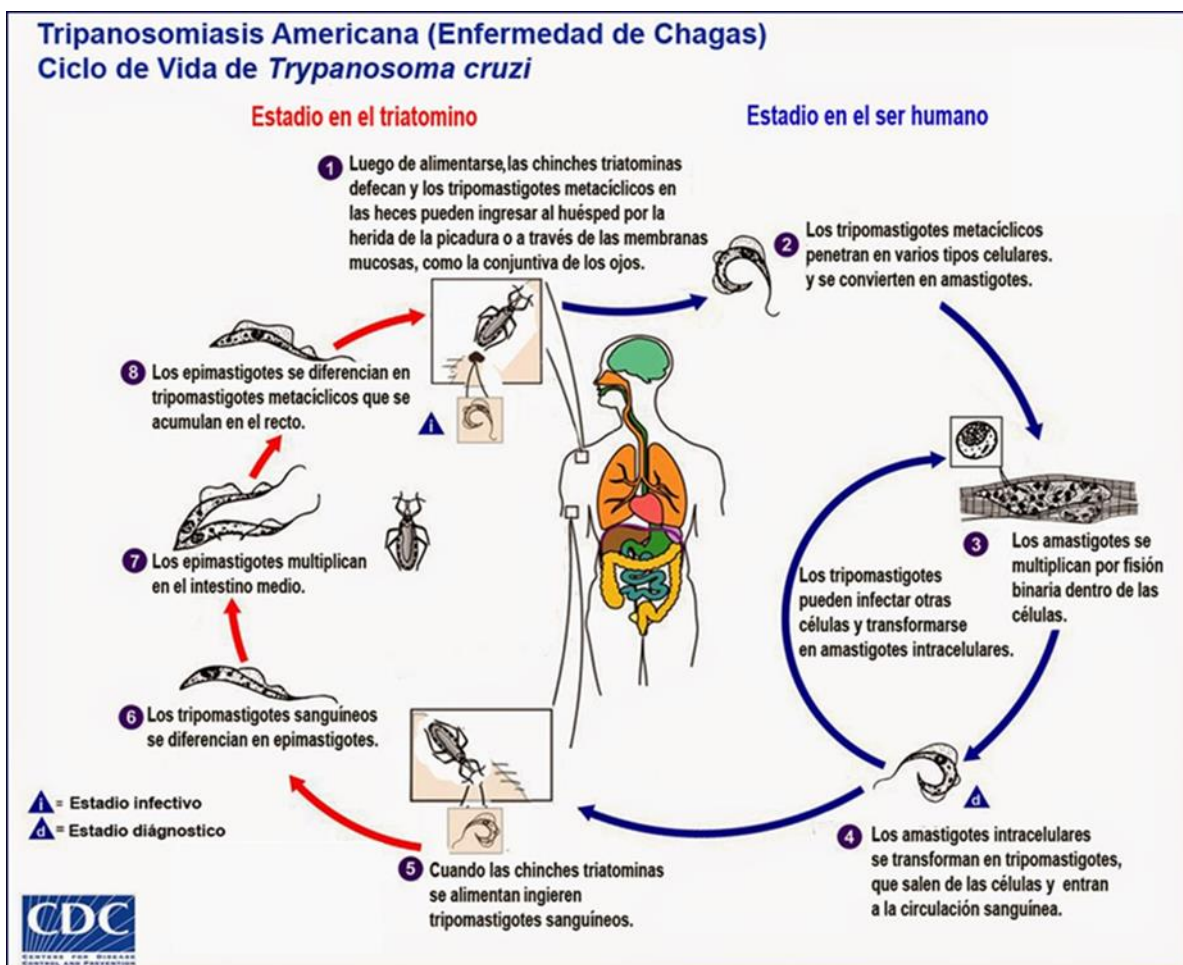


Figura 1: Ciclo de transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas. Modificado de <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmericana/index.html>.

Triatominos

Los insectos del orden Heteróptera se caracterizan por presentar: un par de alas anteriores llamadas hemiélitros con porción basal coriácea (endurecida) y la apical membranosa (Figura 2) y un par de alas posteriores totalmente membranosas, metamorfosis incompleta (hemimetábolos) y aparato bucal picador-suctor. La mayoría son entomófagos o fitófagos, pero hay tres familias que contienen varias especies hematófagas: Polyctenidae, Cimicidae, y Reduviidae.

Los miembros de la subfamilia Triatominae, incluida dentro de la familia Reduviidae, se caracterizan por ser hematófagos obligados, cuya fuente de alimentación puede variar entre mamíferos, aves y reptiles. Las 147 especies actuales de la subfamilia Triatominae están agrupadas en 8 géneros y 5 tribus, en función de características morfológicas, citogenéticas y moleculares (Schofield y Galvão, 2009).

La mayoría de las especies viven en el continente americano con excepción de *Triatoma rubrofasciata* que se encuentra en Europa, junto a 6 especies *Triatoma* del este asiático y especies del género *Linshcosteus* encontrado en la India. Cabe destacar que el género *Triatoma* es el más numeroso, con 80 especies, seguido de *Rhodnius* con 16 especies (Schofield y Galvão, 2009).

En la figura 2 se muestra la morfología externa de los triatominos:

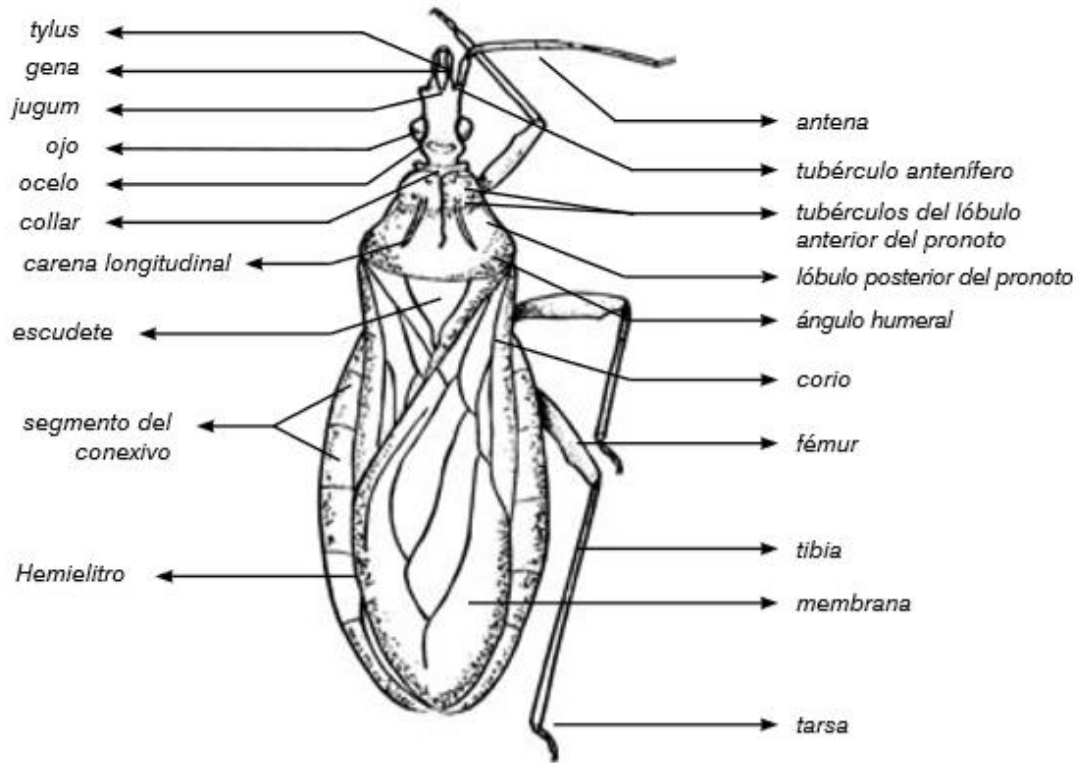


Figura 2: Vista dorsal de morfología externa de triatominos. Dibujo: J. W. Abalos, 1981 (Canale, 2005).

El ciclo de vida de los triatominos consta de la oviposición, 5 estadios ninfales y el estadio adulto, reproductivo. Tanto las ninfas como los adultos tienen gran importancia epidemiológica por ser capaces de transmitir el *T. cruzi* al hombre (Figura 3).

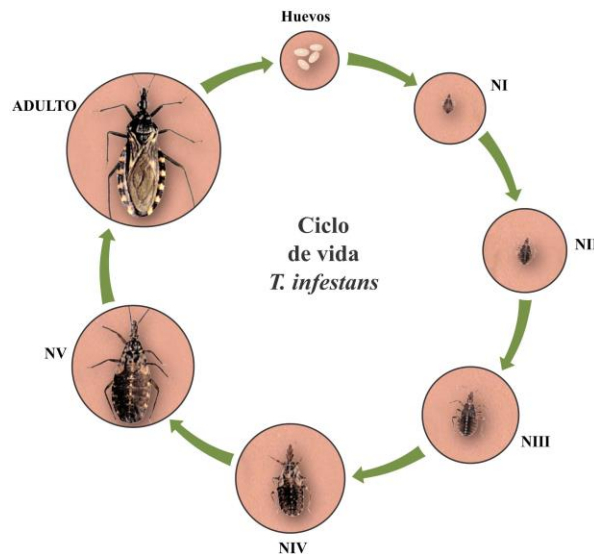


Figura 3: Ciclo de vida de triatominos.

La duración del ciclo de vida depende de la especie, los factores relacionados con el recurso alimentario (cantidad, calidad y frecuencia de alimento) y condiciones climáticas. Los triatominos son activos durante la noche en busca de alimento, oportunidades de apareamiento y sitios de ovoposición (Guerenstein y Lazzari, 2009). La mayoría de las especies toleran un rango de humedad relativa que varía entre 30-80% y la temperatura óptima para su desarrollo oscila entre los 24-27°C. *Rhodnius prolixus* puede desarrollar un ciclo huevo-adulto en 3 a 4 meses en condiciones óptimas, *Triatoma infestans* entre 8 meses y 1 año y *Triatoma dimidiata* entre 1 y 2 años.

De acuerdo con su grado de asociación con el ser humano las especies de triatominos se clasifican en primarias y secundarias (Dias y Diotaiuti, 1998). Las especies primarias colonizan permanentemente y en alta densidad las viviendas, muestran tendencias sinantrópicas y presentan un índice significativo de infección natural con *T. cruzi*, por lo que son consideradas de alta importancia epidemiológica (Noireau y col., 2005). *T. infestans* es el principal vector primario en nuestro país y el Cono Sur de América Latina, mientras que *T. dimidiata* y *R. prolixus*, en menor grado actualmente, lo son en el Norte y Centroamérica y en el norte de América del Sur, respectivamente (WHO, 2019; Ponce, 2007).

Las especies secundarias son generalmente autóctonas de una región y capaces de invadir y colonizar los domicilios en ausencia de las especies primarias. Ocupan generalmente el peridomicilio, están asociados a animales silvestres o peridomésticos y exhiben diferentes grados de antropofilia. Las especies secundarias de importancia en Argentina y países limítrofes son las actualmente incluidas en el subcomplejo Sordida (*Triatoma guasayana*, *Triatoma sordida*, *Triatoma patagonica* y *Triatoma garciabesi*), *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus megistus* y *Triatoma pseudomaculata* (Canale, 2005; Noireau y col., 2005).

Taxonomía de los triatominos

En base a similitudes morfológicas, ecológicas y de distribución geográfica las especies de género *Triatoma* se han agrupado en complejos y subcomplejos. El Complejo Infestans incluye 6 subcomplejos constituidos por 21 especies. Es el complejo más abundante distribuido al sur y norte del Amazonas.

El subcomplejo de mayor importancia epidemiológica es el Subcomplejo Infestans que incluye a uno de los tres vectores más importante de la enfermedad de Chagas: *T. infestans*. Esta especie es principalmente doméstica en todos los países del Cono Sur y considerada primaria desde el punto de vista epidemiológico. Análisis moleculares, morfométricos, citogenéticos y del patrón de hidrocarburos cuticulares, demostraron que *T. infestans*

exhibe una alta variabilidad intraespecífica y sugieren que la especie se divide en al menos tres grupos genéticos principales denominados “Andino” “Intermedio” y “No andino” (Bargues y col., 2006; Calderón-Fernández GM y col., 2012; Catalá y col., 2007; Panzera y col., 2014).

Las especies del subcomplejo Sordida, integrado por *T. sordida*, *T. guasayana*, *T. patagonica* y *T. garciabesi* están ampliamente distribuidas en Argentina, Bolivia, sur de Brasil, Paraguay y Uruguay, colonizando ambientes domésticos, peridomésticos y silvestres. Después de *T. infestans*, la especie de mayor distribución en el Cono Sur es *T. sordida*, abarcando Bolivia, Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina. En este último, se distribuye en las provincias de Salta, Misiones, Corrientes, Formosa, Santa Fe, Santiago del Estero, Córdoba y norte de Chaco. Coloniza los tres hábitats mencionados anteriormente, pudiéndose encontrar en zonas urbanas (Diotaiuti y col., 1993).

T. guasayana se encuentra en Bolivia, Paraguay y Argentina, en este último país abarcando desde el noreste a La Pampa. Vive principalmente en ambientes silvestres, pero puede desarrollar pequeños focos en el peridomicilio. Sólo ingresa al domicilio para alimentarse, y luego se retira (Wisnivesky-Colli y col., 1993). *T. garciabesi* está descrita en el centro y norte de Argentina en las provincias de Salta, Jujuy, Santiago del Estero, Córdoba, Catamarca, La Rioja, San Juan, Mendoza, Santa Fe, Formosa y Chaco. Se encuentra de manera persistente en el hábitat silvestre y peridomiciliario (Jurberg y col., 1998). Por último, *T. patagónica* se ha encontrado sólo en Argentina desde Salta hasta Santa Cruz, en ambientes silvestres y el peridomicilio. Sólo ingresa a las viviendas para alimentarse (Calderón-Fernández, 2008; Nattero y col., 2016).

Si bien se definió al subcomplejo Sordida en base a la similitud morfológica de sus especies, especialmente durante los estadios ninfales, el status específico de algunas de ellas o la validez del grupo en su conjunto fue cuestionado por diversos autores dada la alta variabilidad intraespecífica que muestran las mismas (Pita y col., 2016).

En base a caracteres morfológicos (Gorla y col., 1993; Lent y Wygodzinsky, 1979) y análisis citogenéticos e isoenzimáticos (Panzera y col., 1997; Noireau y col., 1998), se identificaron 3 especies dentro del subcomplejo: *T. sordida*, *T. guasayana* y *T. patagonica* considerando a *T. garciabesi* como una variante de *T. sordida* adaptada a climas más secos. Estudios morfológicos de la cabeza y genitalia, isoenzimáticos y citogenéticos revalidaron el estatus específico de *T. garciabesi*, considerándola una especie diferente de *T. sordida* (Jurberg y col., 1998).

Estudios basados en el patrón de hidrocarburos cuticulares (CHC) sugirieron que *T.*

guasayana presenta la mayor diferenciación dentro del subcomplejo, debido principalmente a la ausencia de varios HC ramificados, así como en la mayor abundancia de isómeros internos trimetil C37 y distintos isómeros 5,x-dimetil C39, ausentes o detectados en nivel de trazas en las restantes especies del subcomplejo. Asimismo, se diferenció a *T. garciabesi* por una serie de HC característicos, el 7,13,17-trimetil C29, C30 y C31, y una mayor abundancia del 3-metil C27. Las poblaciones de *T. sordida* de Rondonópolis (Brasil) y Córdoba (Argentina) revelaron diferencia significativas en las cantidades de las series 4-metil C28-C34, 4,x-dimetil C30-C34 y 3-metil C35, C37 y C39. (Calderón-Fernández y Juárez, 2013).

Estos análisis, junto con otros marcadores, confirman la presencia de dos grupos genéticamente diferenciados, posibles subespecies, y separados en la distribución geográfica con un sentido noreste-suroeste en las localidades estudiadas. La mayor variabilidad y estructuración poblacional de *T. sordida*, sugiere que podría ser la especie más basal dentro del subcomplejo (Calderón-Fernández, 2008). No se pudo encontrar CHC diagnóstico en *T. patagonica* quedando incluida dentro del grupo de poblaciones analizadas de *T. guasayana*, en coincidencia con análisis multivariado de medidas morfológicas en combinación con estructuras antenales y de la genitalia (Gorla y col., 1993).

El género *Rhodnius* se encuentra distribuido en América del Sur y Central. *R. prolixus* puede desarrollar colonias domésticas abundantes por lo que fue un vector importante de *T. cruzi* en Venezuela, Colombia y América Central, aunque actualmente sus poblaciones se encuentran muy reducidas por el éxito del control químico con insecticidas (Schofield, 2000).

En *R. prolixus* se han reportado HC lineales que varían desde C29 al C41. Es característica de *R. prolixus* la presencia de trimetilalcanos de las series 5,X,Y; 3,X,Y; 7,X,Y; 9,X,Y y 11,X,Y de cadenas impares de 29C-41C y componentes tetrametil- ramificados de la serie 5,X,Y,Z; 7,X,Y,Z y 3,X,Y,Z en cadenas 29C, 31C, 35C, 36C, 37C, 38C y 39C (Juárez y col., 2001).

Integumento

El integumento está formado por la cutícula y el tejido subyacente denominado epidermis (Figura 4). El integumento de los artrópodos dio lugar a su exitosa colonización del ambiente terrestre, proporcionando una barrera para el movimiento hídrico, iones, parásitos y productos químicos. Además, tiene profundas implicancias en el crecimiento, respiración y

locomoción. Desempeña un importante papel estructural en la determinación de la forma del cuerpo posibilitando cambios durante la metamorfosis. Los insectos explotan una variedad de diversos hábitats y dietas, gracias a la plasticidad de la forma del cuerpo y la estructura bucal. La rigidez de la cutícula permite la inserción de músculos que permiten realizar movimientos locomotores rápidos y la presencia de receptores sensoriales ubicados estratégicamente posibilita la respuesta a estímulos ambientales.

La epidermis está comprendida por una sola capa de células de origen ectodérmico y presenta una membrana basal que se asocia al resto de los tejidos internos. Está formada por: las glándulas dermales, las células tricogénicas, las células epidérmicas y los oenocitos (Juárez y Calderón-Fernández, 2007; Wigglesworth, 1933).

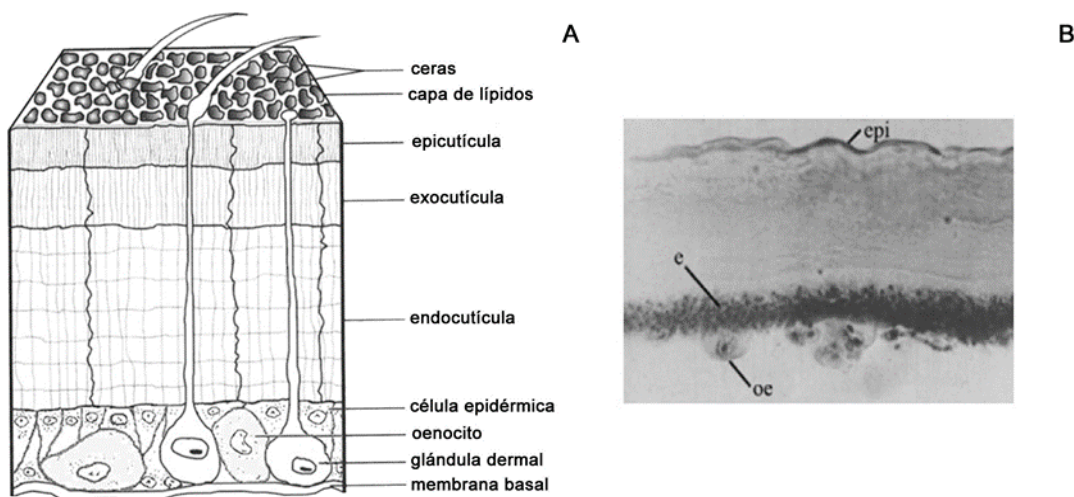


Figura 4: A) Esquema de la cutícula de triatominos. B) Corte transversal de la cutícula de *T. infestans*, donde se observa la epicutícula (epi), y la epidermis, con células epidérmicas (e) y oenocitos (oe). Modificado de Juárez y Calderón-Fernández, 2007.

Las células epidérmicas son células metabólicamente activas responsables de la síntesis y secreción de la quitina, proteínas cuticulares, enzimas encargadas de la esclerotización cuticular, entre otras. Durante el proceso de muda sintetizan y transportan el líquido de la muda; y participan en la reabsorción de varios componentes de la misma (Wigglesworth, 1988).

Los oenocitos son grandes células poliploides, principalmente involucrados en la síntesis de lípidos cuticulares. Su tamaño, número y localización varía entre las especies de insectos (Gould y col., 2001; Martins y Ramalho-Ortigão, 2012). En ninfas y adultos de heterópteros, los oenocitos se ubican entre la membrana basal y la epidermis separándose

de las células del cuerpo graso subyacente. En *R. prolixus* y *T. infestans*, los oenocitos se distribuyen en los tergitos y esternitos abdominales, concentrados hacia ambos lados en las membranas intersegmentales, con tamaños que oscilan entre 10 y 100 μm , dependiendo de la etapa de desarrollo (Juárez y Calderón-Fernández, 2007). En ninfas de IV estadio de *R. prolixus*, los oenocitos son pequeños, redondeados y levemente lobulados previos a la alimentación, incrementando su tamaño rápidamente luego de la ingesta (Wigglesworth, 1933, 1945, 1970). Durante un ciclo de catorce días, dichas células alcanzan el máximo tamaño y lobulación al noveno día luego de la alimentación, persistiendo hasta la próxima muda. Luego de la misma, su tamaño disminuye drásticamente.

La morfología del oenocito es característica de una célula secretora especializada. Estas células contienen un abundante retículo endoplasmático liso, que sugiere un importante papel en la síntesis, procesamiento y secreción de lípidos (Jackson y Locke, 1989). Asimismo, expresan enzimas involucradas tanto en la síntesis como el catabolismo de lípidos y su transporte: acetil CoA carboxilasa, ácido graso sintasa, desaturasas, elongasas, citocromo P450 monooxigenasas, enzimas involucradas en la β oxidación de ácidos grasos, etc. y otras proteínas tales como receptores de lipoforinas (Gutierrez y col., 2007).

Estudios ultraestructurales iniciales sugirieron que los oenocitos intervenían en el metabolismo de lípidos precursores de diversos componentes cuticulares (Wigglesworth, 1933, 1970). Ensayos *in vitro* demostraron que el integumento de *T. infestans* juega un rol esencial en la síntesis y liberación de ácidos grasos e hidrocarburos a la hemolinfa (Juárez y Brenner, 1989). Posteriormente, estudios bioquímico moleculares en oenocitos de *Drosophila* y *Blattella germanica* demostraron que dichas células están involucradas en la síntesis de hidrocarburos cuticulares y en su transporte hacia la epicutícula (Gutierrez y col., 2007; Fan y col., 2003).

La cutícula se organiza en dos capas principales: la procutícula, ubicada sobre las células epidérmicas y la epicutícula más externa.

La procutícula es la capa más gruesa de la cutícula ($\sim 200 \mu\text{m}$) y está formada por una matriz compleja del polisacárido quitina, diversas clases de proteínas cuticulares y también contiene lípidos. Se divide en una exocutícula, externa, en la cual las proteínas cuticulares experimentan un proceso de esclerotización, contribuyendo al oscurecimiento de la cutícula, y una endocutícula, interna, sin esclerotizar. Las proteínas y la quitina interactúan para proporcionar la función mecánica de la cutícula, confiriéndole fuerza y dureza.

La epicutícula consiste en varias capas formadas por proteínas y lipoproteínas, y está cubierta por una mezcla compleja de lípidos (hidrocarburos, ceras, ácidos grasos, alcoholes

grasos, etc). En ninfas de V estadio de *T. infestans* el espesor de la epicutícula es de 2 μm y los hidrocarburos conforman los principales componentes lipídicos de la misma (Juárez y Calderón-Fernández, 2007). La capa de lípidos cubre la superficie del insecto y constituye la principal barrera contra la pérdida de agua, entre otras propiedades (Wigglesworth, 1933, 1970, 1975; Hadley, 1994; Gibbs, 1998).

Lípidos cuticulares

La epicutícula de los insectos está cubierta principalmente por una mezcla compleja de lípidos mayoritariamente no polares. La composición y contenido de los lípidos epicuticulares varía de acuerdo al estado de desarrollo de los insectos y entre las especies. Los principales componentes lipídicos de la epicutícula son hidrocarburos, ceras, alcoholes grasos, aldehídos y ácidos grasos libres y esterificados.

Dentro de las principales funciones que cumplen los lípidos epicuticulares cabe destacar: regular la pérdida de agua a través de la superficie por evaporación, participar en la comunicación química como feromonas, fundamentalmente de contacto, controlar el ingreso de sustancias nocivas y la protección contra el ataque de microorganismos, insectos parásitos y predadores. Los hidrocarburos epicuticulares constituyen mezclas de alcanos y/o alquenos de cadena lineal y metil ramificados (Howard y Blomquist, 2005).

Los lípidos epicuticulares (hidrocarburos, alcoholes grasos, ceras), sintetizados en los oenocitos por la acción coordinada de distintas enzimas y sistemas enzimáticos, tiene como eje común la síntesis de ácidos grasos y su elongación (Juárez y Calderón-Fernández, 2007) (Figura 5). El proceso se inicia con la síntesis de ácidos grasos catalizada por la acción de la ácido graso sintasa (FAS). Se ha descrito en el integumento de *T. infestans* la actividad de dos FASs, una de ellas de localización microsomal, asociada al retículo endoplasmático, y otra citosólica; inicialmente se propuso un rol diferenciado para ambas en cuanto a la formación de cadenas ramificadas y lineales (Juárez y col., 1992,1996).

Los acil-CoA producidos por las FASs son sustrato de un sistema elongante ubicado en el retículo endoplásmico, donde acil-CoA elongasas (ELOVL) con especificidad de sustrato añaden unidades malonil- y metilmalonil-CoA sucesivas obteniendo ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA) (Vaz y col., 1988; Juárez y Brenner, 1989; Juárez, 2004). Los productos de la FAS y las ELOVL pueden ser utilizados como sustrato de las ácido graso desaturasas (FAD) para la síntesis de ácidos grasos insaturados (Blomquist y col., 1987). A su vez, los VLCFA pueden ser reducidos a alcoholes o aldehídos por acción de acil-CoA

reductasas específicas (FAR), y posteriormente decarbonilados mediante un mecanismo de decarbonilación oxidativa catalizado por una citocromo P450 de la familia 4G (CYP4G) (Qiu y col., 2012; Balabanidou y col., 2016; MacLean y col., 2018) formando hidrocarburos. Los productos acil-CoA liberados pueden ser esterificados con alcoholes grasos para formar ceras cuticulares, o con glicerol para formar acilglicéridos.

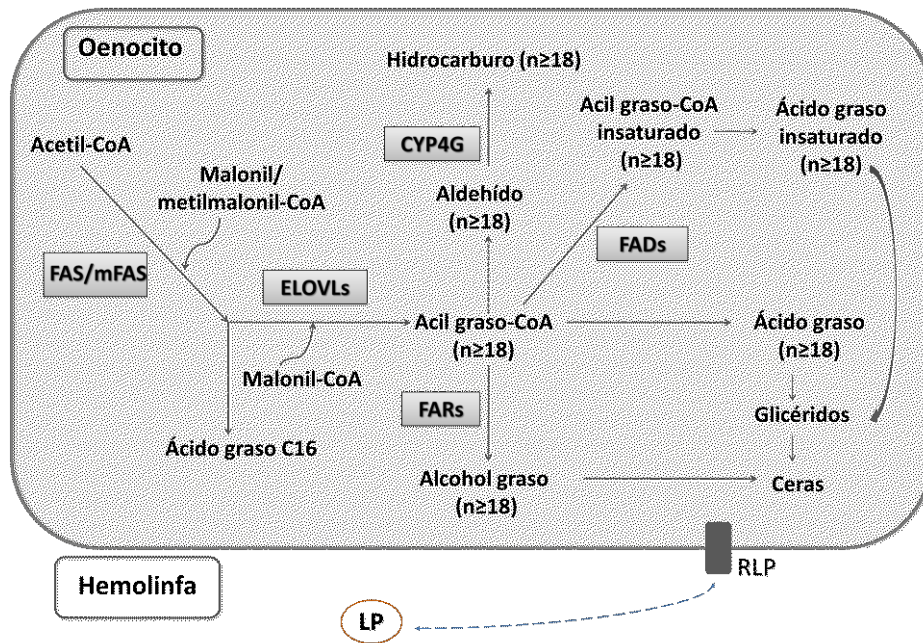


Figura 5: Esquema simplificado de la ruta de biosíntesis de lípidos cuticulares en el oenocito. Las enzimas se muestran en recuadros, las flechas en negrita son procesos enzimáticos ya conocidos y las flechas punteadas corresponden a un mecanismo que no se ha dilucidado por completo. LP: lipoforina, RLP: receptor de lipoforina. Modificado de Calderón-Fernández y col., 2017.

Acido graso sintasa

La FAS es un complejo multienzimático que cataliza la formación de las cadenas carbonadas de ácidos grasos. Existen dos variantes principales: la FAS tipo I y la FAS tipo II.

La FAS tipo I conocida como ácido graso sintasa animal y de hongos, consiste en dos cadenas polipeptídicas multifuncionales de gran tamaño (2500 aminoácidos aproximadamente). Cada polipéptido contiene 7 dominios funcionales discretos. Las dos subunidades funcionales están completamente extendidas y alineadas en una disposición cabeza-cola de modo tal que forman un homodímero funcional (Figura 6). Según este modelo, esta FAS contiene dos sitios de reacción para la síntesis de ácidos grasos (Smith

y col., 2003; Smith y Tsai, 2007).

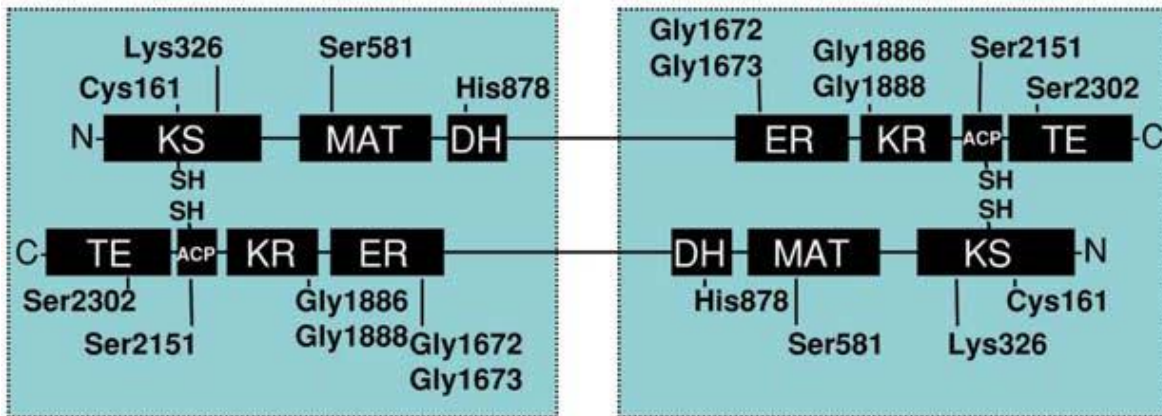


Figura 6: Disposición de las subunidades funcionales de FAS animal de acuerdo con el modelo cabeza-cola. Tomado de Smith y col., (2003).

La FAS tipo II, la ácido graso sintasa bacteriana y vegetal, está compuesta por polipéptidos independientes, de manera que cada proteína cataliza la correspondiente reacción enzimática durante cada ciclo de reacción. Los intermediarios se translocan como tioésteres de una proteína transportadora de acilo (White y col., 2005).

El orden funcional de los dominios enzimáticos de la FAS animal fue establecido a partir de estudios bioquímicos y cristalográficos (Smith y col., 2003; Chakravarty y col., 2004; Lomakin y col., 2007; Maier y col., 2008; Pappenberger y col., 2010), y desde el extremo amino terminal al carboxilo terminal de cada unidad del homodímero comprenden (Figura 7): β -cetoacil ACP sintasa (KS), malonil/acetil transferasa (MAT), deshidratasa (DH), enoil reductasa (ER), β -cetoacil reductasa (KR), proteína transportadora de acilos (ACP) y tioesterasa (TE). Ubicada entre los dominios DH y ER hay una región sin actividad catalítica de aprox. 600 aminoácidos denominada "core", que juega un rol relevante en el mantenimiento de la integridad del dímero mediante la interacción con el "core" de la otra subunidad (Smith y col., 2003).



Figura 7: Organización lineal de los dominios proteicos de la FAS animal. El número de residuos aproximado de cada dominio se ubica por encima del mapa. Las letras N y C indican los extremos amino y carboxilo terminal, respectivamente. Las siglas ubicadas en

El interior de los cuadrados negros indican los dominios β -cetoacil ACP sintasa (KS), malonil/acetil transferasa (MAT), deshidratasa (DH), enoil reductasa (ER), β -cetoacil reductasa (KR), proteína transportadora de acilos (ACP) y tioesterasa (TE); core: corresponde a la región central. Modificado de Smith, 2003.

El proceso de síntesis de un ácido graso implica un número de ciclos donde en cada uno tiene lugar una secuencia de cuatro reacciones enzimáticas sucesivas. En cada ciclo, la cadena carbonada se extiende en dos unidades.

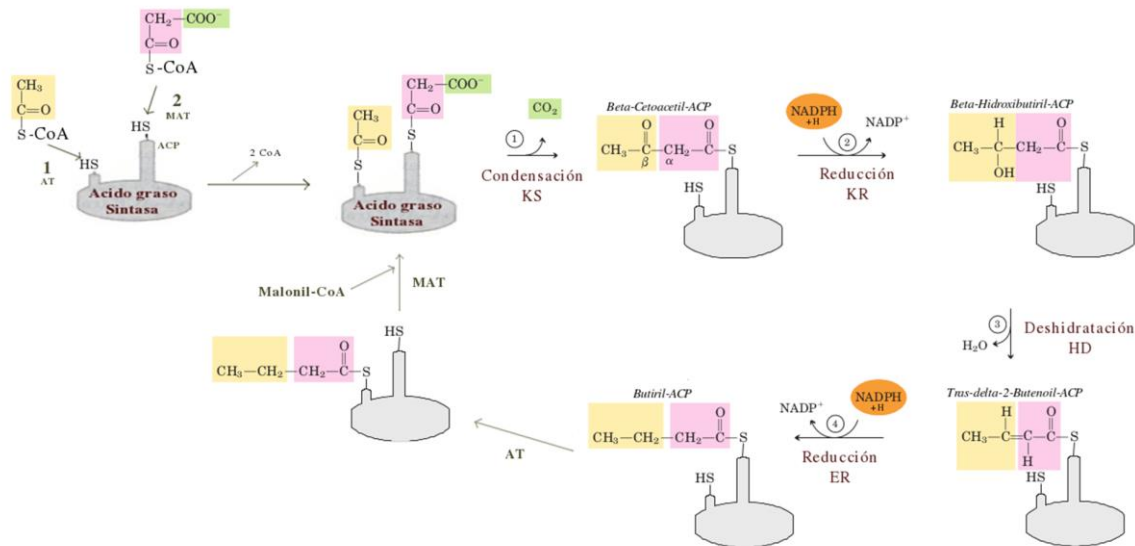


Figura 8: Reacciones de síntesis de ácidos grasos. Modificado de <https://temas-selectos-de-ciencias.blogspot.com/p/biosintesis-acidos-grasos.html>

En el primer ciclo, los grupos acilo usados en el ciclo se cargan en el complejo enzimático: se transfiere el grupo acetilo del acetil-CoA al grupo -SH de la KS, y el grupo malonilo del malonil-CoA al grupo -SH de la ACP, reacciones catalizadas por la MAT. Posteriormente, la KS cataliza la condensación decarboxilativa entre ambos acil-CoA formando el intermediario β -cetobutiril-ACP. Este es reducido por la KR, utilizando NADPH como agente reductor, formando un β -hidroxibutiril-ACP, el cual es sustrato de la DH que libera una molécula de agua y forma un doble enlace en la cadena carbonada en formación, generando un 2-enoil-ACP. Finalmente, la ER, utilizando NADPH como agente reductor, cataliza la reducción del doble enlace para formar un butiril-ACP. Este se transloca al grupo -SH de la KS y queda listo para un nuevo evento de condensación, una vez que un nuevo

malonilo quede cargado en la ACP (Figura 8).

Siete ciclos de actividad de la FAS sintetizarán un palmitoil-ACP. La liberación del producto es catalizada por la TE, la cual hidroliza el enlace tioester acil-SH de la ACP.

Los ácidos grasos de cadena larga (LCFA) productos de la FAS participan en mecanismos de transducción de señales, constituyen las membranas celulares, actúan como reserva energética, son precursores de otros componentes lipídicos, etc.

Además de su importancia en dichos procesos biológicos, el estudio de la FAS ha resurgido en los últimos años por su relación con el desarrollo de cáncer. Ensayos bioquímicos mostraron un aumento de los niveles de FAS en células cancerígenas (Wang y col., 2001). La sobreexpresión de los genes FASN en células de carcinoma de próstata (De Schrijver y col., 2003) y un análisis integrado entre datos de expresión génica de muestras de cáncer de mama y un modelo metabólico humano a escala genómica indicaron que la biosíntesis de LCFA es una característica de las primeras etapas del desarrollo del cáncer (Jerby y col., 2012). Estudios recientes han propuesto el uso del primer inhibidor de FAS como fármaco oncológico en cáncer de mama (Menendez y Lupu, 2017).

Otro aspecto de interés actual basado en estrategias de ingeniería metabólica refiere al uso de LCFA, hidrocarburos y alcoholes grasos para la producción de oleoquímicos y biocombustibles comerciales (Zhou y col., 2016).

A diferencia de las FASs de mamíferos, plantas y bacterias, las FASs de insectos han sido escasamente estudiadas. Recién en 1986 se purificó por primera vez la FAS de cuerpo graso en *D. melanogaster*, responsable de la síntesis de los ácidos grasos, (De Renobales y col., 1986) depositados como triglicéridos, y transportados como diacilglicéridos (DAG) a los distintos tejidos (Arrese y col., 2001).

Juárez y col., (1992) demostraron por primera vez en el integumento de *B. germanica* la presencia de dos FASs obtenidas a partir de las fracciones citosólica y microsomal del tejido. Ensayos *in vitro* mostraron la capacidad de ambas FASs de incorporar tanto malonil-CoA como metilmalonil-CoA en la cadena de ácido graso en formación, a diferencia de la FAS de cuerpo graso que utiliza exclusivamente el malonil-CoA. Además, se demostró que la FAS microsomal tenía más afinidad por el metilmalonil-CoA y podía incorporarlo como único sustrato para la elongación de cadenas acilo. La FAS de la fracción microsomal del integumento fue caracterizada bioquímicamente también en *T. infestans* (Juárez y col., 1996) y *Musca domestica* (Gu y col., 1997). Estos estudios demostraron por primera vez la ruta de biosíntesis de los ácidos grasos ramificados en insecto, precursores de los HC ramificados.

La secuenciación y anotación del genoma de *D. melanogaster* (disponible en la base de datos FlyBase) permitió identificar tres genes codificantes de FAS: CG3523, CG3524 y CG17374 (Adams y col., 2000). Estudios de hibridación de ARN confirmaron la expresión de CG3523 en cuerpo graso, mientras que los transcritos de CG3524 y CG17374 se detectaron exclusivamente en oenocitos (Chung y col., 2014).

Posteriormente, a partir de la secuenciación y anotación del genoma de *R. prolixus* se identificaron tres genes putativos codificantes de FAS (*RPRC000123*, *RPRC002909* y *RPRC000269*) (Majerowicz y col., 2017; Mesquita y col., 2015).

La secuenciación de un número creciente de genomas permitió identificar varios genes FASN en varias especies de insectos. Se reportaron siete genes FASN de *T. castaneus* (<http://beetlebase.org/>), seis y tres genes de *Plutella xylostella* y *B. germanica*, respectivamente (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), nueve genes de *Acyrtosiphon pisum* y *Myzus persicae* (<https://bipaa.genouest.org/is/aphidbase/>), cuatro genes de *Culex quinquefasciatus* (<https://www.vectorbase.org/>), tres genes de *Drosophila mojavensis* (<https://flybase.org/>), entre otros.

La disponibilidad de varios genes FASN en diversas especies de insectos ha permitido profundizar en su estudio evolutivo. La duplicación de genes es considerada una importante fuente de variabilidad que genera distintos destinos evolutivos entre el par de genes parálogos. El genoma de *Drosophila* muestra que los genes CG3523 y CG3524 son contiguos en el cromosoma (Finck y col., 2016) de la misma manera que *RPRC000269* y *RPRC002909* en *R. prolixus* (Majerowicz y col., 2017). La redundancia funcional puede acumular mutaciones perjudiciales en el tiempo u originar nuevas funciones (neofuncionalización) y evolucionar en nuevos fenotipos (Lynch y Conery, 2000). El análisis filogenético de secuencias de FAS de insectos indica que la duplicación de este gen, a partir de un ancestro común pterigota, divergió en múltiples expansiones de genes FASN de manera independiente en los diversos ordenes de insectos. Este análisis sugiere que el aumento en el número de copias de genes FASN se asocia con aquellos grupos de insectos que presentan gran diversidad de CHC metil-ramificados (Finck y col., 2016).

[Resistencia a insecticidas en triatominos](#)

Los insecticidas juegan un rol esencial en el control de las enfermedades transmitidas por insectos vectores. En particular, dada la ausencia de vacunas y tratamientos clínicos efectivos contra la Enfermedad de Chagas, el control químico vectorial es uno de los

métodos más utilizados para prevenir la expansión de dicha enfermedad.

El control químico de la enfermedad de Chagas se inicia a mediados del siglo XX, con el uso de compuestos organoclorados como el DDT, organofosforados y carbamatos. A pesar del éxito como agentes de control, su uso fue prohibido por su riesgo toxicológico y ecotoxicológico.

Durante la década de 1980, los programas de control de la enfermedad de Chagas incorporaron el uso de insecticidas piretroides (deltametrina, cipermetrina, β -ciflutrina, β -cipermetrina, y γ -cialotrina) en países endémicos. Dichas medidas redujeron tanto el rango geográfico como la prevalencia de infestación de *T. infestans*, *T. dimidiata* y *R. prolixus*. Sin embargo, en el año 2000, bioensayos de topicación mostraron la primera evidencia de resistencia a insecticidas piretroides en *R. prolixus* (Venezuela) y *T. infestans* (Brasil) (Vassena y col., 2000).

La resistencia a insecticidas se ha definido como la capacidad de ciertas poblaciones de individuos de una especie de tolerar una dosis de compuestos tóxicos que sería letal en otros organismos de la misma (French-Constant y col., 2004; WHO, 2019). Esta capacidad es parte de la variabilidad genética presente en la población antes de la exposición al insecticida (Oppenoorth, 1985), lo que genera insectos fenotípicamente resistentes a un insecticida. Dichos individuos son seleccionados por el insecticida aumentando la proporción de individuos resistentes en la población. En otras palabras, el desarrollo de la resistencia es un proceso microevolutivo donde el principal factor de cambio en la estructura genética de la población es la selección natural (Mougabure-Cueto, 2004).

El grado de resistencia (RR) se define como la razón entre la dosis letal que mata al 50% de la población evaluada (DL 50) y la DL 50 de la población susceptible (CIPEIN, 1994).

Las poblaciones resistentes de *T. infestans* estuvieron asociadas a la baja eficacia del insecticida en estructuras peridomésticas, irregularidad en la aplicación del mismo, efecto residual reducido causado por una degradación rápida, y el desarrollo de la resistencia a insecticidas (Gaspé y col., 2013; Germano y col., 2014).

En 2002 fueron halladas poblaciones de *T. infestans* con altos niveles de resistencia (RR ~100) a deltametrina en áreas cercanas a Salvador Mazza (Salta) y Yacuiba (Bolivia) (Picollo y col., 2005).

Posteriormente se han detectado numerosas poblaciones resistentes a piretroides en los valles interandinos de Bolivia, sur de Perú y la región del Gran Chaco que se extiende al sur de los llanos orientales de Bolivia, región occidental de Paraguay y parte central del norte argentino, algunas con niveles aun más elevados de resistencia (RR~1000) (Carvajal

y col., 2012; Roca-Acevedo y col., 2013).

Diversas campañas de monitoreo de resistencia realizados por la WHO y por autoridades del Ministerio de Salud detectaron nuevos focos con niveles variables de resistencia en diversas poblaciones de *T. infestans* de Argentina y países limítrofes. En Argentina, las provincias afectadas fueron San Luis, La Rioja, Mendoza, Catamarca, Chaco y Salta (Mougabure-Cueto y Picollo, 2015).

Estas evidencias impulsaron la realización de varios estudios que empleando marcadores moleculares, cromosómicos, fenotipos antenales y el patrón de CHC analizaron la variabilidad genética de la especie, con el fin de correlacionarla con el surgimiento de poblaciones resistentes (Panzera y col., 2004; Catalá y col., 2007; Calderón-Fernández y col., 2012).

Bustamante Gomez y col., (2016) sugieren que las poblaciones resistentes a insecticidas piretroides en la frontera entre Argentina y Bolivia serían el resultado de la presión de selección de insecticidas. Dicho fenómeno, favoreció la persistencia y reproducción de insectos naturalmente resistentes.

En *T. infestans*, los niveles de resistencia estarían definidos por la presencia de mutaciones en el sitio de acción del insecticida, incremento de la actividad de enzimas detoxificantes y disminución de la penetración del insecticida, lo que sugiere que dicho fenómeno estaría determinado por la expresión de varios genes (Fronza y col., 2020; Mougabure-Cueto y Picollo, 2015).

A pesar de los estudios que intentan explicar el origen de dicho fenómeno, las causas de la emergencia de poblaciones resistentes se encuentran actualmente en discusión. Sin embargo, el monitoreo constante, el conocimiento de los mecanismos involucrados en la resistencia, el uso de insecticidas alternativos y el desarrollo de estrategias que no incluyan el control químico en esta y otras especies de triatomíneos de importancia vectorial es indispensable en el diseño de estrategias de control vectorial. En este contexto, el uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico ha sido estudiado como una alternativa eficaz para la eliminación de estos vectores (Juárez y col., 1996, 2008; Pedrini y col., 2009; Forlani y col., 2015).

El control químico de triatomíneos y otros insectos vectores es un fenómeno complejo de carácter multidimensional, es decir, está determinado por: un aspecto biológico (variabilidad genética, susceptibilidad de los insectos a diferentes insecticidas, etc); un aspecto operacional (formulaciones, protocolos de control, regularidad en la aplicación del insecticida, etc) y un aspecto cultural (características de las viviendas, receptibilidad de la

población al uso de dichos compuestos químicos, grado de información o desinformación, etc).

En relación a la resistencia a insecticidas, los insectos vectores más ampliamente estudiados a nivel mundial son los mosquitos de los géneros *Culex* (transmisores de la fiebre del Nilo), *Aedes* (transmisores del Dengue, Zika y fiebre Chicunguña) y *Anopheles* (vector de la Malaria). Sin embargo, el desarrollo de elevados grados de resistencia ha provocado el resurgimiento y avance epidémico de dichas enfermedades, poniendo en peligro a millones de personas (PAHO/WHO, 2016).

Mecanismos de resistencia

La resistencia a insecticidas es un fenómeno multifactorial que involucra tres mecanismos principales: la insensibilidad del sitio blanco por el insecticida, la expresión aumentada de enzimas que pueden detoxificar el insecticida o resistencia metabólica y la disminución de la penetración del insecticida a través de la cutícula o factor cuticular que disminuyen o anulan los efectos producidos por el tóxico.

Resistencia KDR

Los insecticidas piretroides alteran la cinética de los canales de sodio regulados por voltaje en el sistema nervioso, ralentizando la activación y la inactivación de los canales durante la transmisión del impulso nervioso, generando descargas repetitivas en axones motores y sensoriales que causan la parálisis y muerte del insecto (Hemingway y col., 2004).

En la resistencia knockdown (KDR) se produce una disminución o eliminación de la afinidad de los piretroides por los canales de sodio debido a mutaciones puntuales que alteran la forma del canal. Esto da como resultado una disminución de los efectos tóxicos de los insecticidas generando insensibilidad a los mismos (Dong, 2007; Rinkevich y col., 2013). Este mecanismo de resistencia ha sido encontrado en *Drosophila melanogaster* y otras especies de insectos de importancia sanitaria y económica (Soderlund y Knipple, 2003). En *T. infestans* se han identificado las mutaciones puntuales L925I y L1014F asociadas a la resistencia a piretroides (Fabro y col., 2012; Capriotti y col., 2014).

Resistencia metabólica

Ciertos tejidos y órganos de los insectos contienen enzimas detoxificantes, capaces de neutralizar compuestos tóxicos y xenobióticos. Las reacciones de detoxificación

comprenden oxidaciones, reducciones, hidrólisis y conjugaciones de los compuestos tóxicos. La participación de un factor de resistencia metabólica en la inactivación del insecticida está mediada por la sobreexpresión de los genes y actividad aumentada de proteínas pertenecientes a tres familias principales de enzimas: las carboxilesterasas (CCE), las glutatión S-transferasas (GST) y las citocromo P450 monooxigenasas (CYPs) (Hemingway, 2000).

Las CCE son ubicuas y cumplen funciones cruciales en el crecimiento y desarrollo del insecto. Intervienen en procesos de detoxificación hidrolizando enlaces carboxil-éster presentes en una amplia gama de insecticidas (Montella y col., 2012).

Las GST por su parte intervienen conjugando el glutatión reducido con varios sustratos electrofílicos y componentes tóxicos hidrofóbicos para formar derivados no tóxicos de fácil eliminación (Dixon y col., 1998).

Por último, las CYPs catalizan la conversión de compuestos lipofílicos en sus derivados más hidrofílicos, jugando un importante rol tanto en la síntesis y metabolismo de moléculas endógenas como en la degradación de xenobióticos. Se clasifican en familias y subfamilias en función de la similitud de la secuencia aminoacídica (40% y 55% de identidad aminoacídica) y se utiliza una agrupación de mayor orden en clanes: 2, 3, 4 y mitocondrial (Nelson, 1998). Dentro de la diversidad de funciones que se les atribuyen, los miembros de las subfamilias que integran los clanes CYP3 y CYP4 participan en la detoxificación de insecticidas químicos. Se ha descrito que varios genes CYP de los clanes CYP3 y CYP4 se asocian con resistencia a insecticidas en Díptera, Hemíptera y Coleóptera (Zhu y col., 2010; Feyereisen, 2011; David y col., 2013; Grosso y col., 2016). Se ha sugerido que la aparición de expansiones de los genes CYP detectada en los genomas de insectos podría contribuir a una mayor capacidad de detoxificación y de esta manera potenciar la resistencia a insecticidas (Feyereisen, 2011).

En el genoma de *R. prolixus* se han identificado 88 genes CYP representativos de los cuatro clanes, clasificados en 24 familias y 48 subfamilias. Se han encontrado 11 nuevas familias, donde 10 de ellas pertenecen al clan CYP3, y una al clan CYP4 (*CYP3093*).

Además, fueron anotados 63 genes que contienen dominios carboxilesterasas y 29 genes GST (Schama y col., 2015).

Factor cuticular de resistencia a insecticidas

El factor cuticular de resistencia o factor de penetración implica una disminución de la cantidad de insecticida que llega al sitio de acción a través de la cutícula dado por cambios

en el espesor de la misma y/o el contenido de lípidos epicuticulares en varias especies de insectos (Balabanidou y col., 2016; Bass y col., 2014; Juárez y col., 2010; Pedrini y col., 2009; Wood y col., 2010; Zhu y col., 2013). Estudios llevados a cabo en los '90 mostraron que la remoción de los lípidos epicuticulares con solventes orgánicos o la inhibición química de su síntesis estaba asociada a un incremento de la penetración de los insecticidas a través de la cutícula (Motoyama y col., 1992; Juárez, 1994).

En el INIBIOLP se demostró por primera vez en insecto que ejemplares de *T. infestans* resistentes a deltametrina exhibían un engrosamiento cuticular y un mayor contenido de hidrocarburos epicuticulares comparado con insectos susceptibles (Pedrini y col., 2009). Este fenotipo cuticular se correlaciona con una disminución en la penetración de deltametrina a través de la cutícula (Juárez y col., 2010).

Posteriormente, en la última década, el análisis de transcriptomas, microarreglos y proteomas de ejemplares resistentes de varias especies reveló la sobreexpresión de genes codificantes de distintos tipos de proteínas cuticulares estructurales (Awolola y col., 2009; David y col., 2010; Mamidala y col., 2012; Silva y col., 2012; Wang y col., 2015) y de genes relacionados con la formación de lípidos epicuticulares (Ingham y col., 2014; Toé y col., 2015). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos no incluyó estudios funcionales ni el análisis de los fenotipos correspondientes.

Estudios moleculares demostraron una sobreexpresión del gen *CYP4G16* junto con un aumento del contenido de hidrocarburos epicuticulares y disminución de la penetración cuticular de deltametrina en especímenes resistentes a deltametrina del género *Anopheles* en comparación con insectos susceptibles. Estas evidencias sugieren que el factor de penetración contribuye en la resistencia a insecticidas en mosquitos (Balabanidou y col., 2016; Yahouédo y col., 2017).

En *T. infestans* se han descrito los tres principales mecanismos de resistencia: mayor detoxificación del insecticida, insensibilidad del sitio de acción y participación del factor cuticular. El avance en la comprensión de los procesos genéticos y bioquímicos implicados en estos mecanismos contribuirá a perfeccionar las estrategias de control vectorial de los triatominos.

Hipótesis

I- La expresión génica de los transcritos de las ácido graso sintasas del integumento de triatominos regula el contenido y patrón de hidrocarburos cuticulares y su función de barrera cuticular frente a la pérdida de agua.

II- La composición de los hidrocarburos cuticulares constituye un marcador útil para analizar las relaciones filogenéticas intra- e inter-específicas en triatominos.

Objetivos

Objetivo general

Se propone avanzar en el conocimiento de la biosíntesis y función de los hidrocarburos cuticulares de los triatominos, caracterizando molecularmente las enzimas implicadas en la formación de los ácidos grasos precursores de estos compuestos, analizando su rol en la resistencia a insecticidas, y evaluando su utilidad para el estudio de la filogenia y la variabilidad genética del grupo.

Objetivos específicos

I- Identificar los genes involucrados en la ruta metabólica de formación de los hidrocarburos y otros genes del integumento de *Triatoma infestans*, que participarían en la resistencia a insecticidas.

II- Caracterizar molecular y funcionalmente las ácido graso sintasas del integumento en las dos principales especies vectoras de la Enfermedad de Chagas, *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*.

III- Evaluar la utilidad de los hidrocarburos cuticulares como caracteres taxonómicos para inferir las relaciones filogenéticas entre *Triatoma infestans* y las especies del subcomplejo *Sordida*, de importancia vectorial en nuestra región, y comparar los resultados con los de los análisis numéricos realizados previamente.

Metodología

Insectos

Se utilizaron ejemplares de *Triatoma infestans* obtenidos a partir de colonias de laboratorio de insectos susceptibles (S) y resistentes a insecticidas piretroides (R), y ejemplares de *Rhodnius prolixus*. La colonia de *T. infestans* resistente (grado de resistencia RR: 100, determinado según metodologías establecidas por el CIPEIN (WHO, 1994; Picollo y col., 2005) se originó a partir de insectos colectados en la ciudad de Salvador Mazza (Salta) que fueron aportados por el Dr. Rubén Cardozo (Univ. Nacional de Salta). La colonia de *T. infestans* susceptible se originó a partir de insectos colectados en la provincia de Santiago del Estero y aportados por el Servicio Nacional de Chagas, Santa María de Punilla, Córdoba, a cargo del Biól. Raúl Stariolo. Los ejemplares de *R. prolixus* fueron provistos de una colonia mantenida por el Servicio Nacional de Chagas.

Para el análisis filogenético de las especies del subcomplejo Sordida y *T. infestans* se emplearon los datos de abundancia relativa de hidrocarburos cuticulares obtenidos previamente de insectos colectados en diversas localidades de Argentina, Bolivia, Brasil y Paraguay. Estos análisis se obtuvieron a partir de una colaboración internacional dentro del marco de la red ECLAT (European Community – Latin America Network for Research on the Biology and Control of Triatominae) (Calderón-Fernández y col., 2012; Calderón-Fernández y Juárez, 2013).

Los insectos utilizados a lo largo de la tesis estaban libres de infección con *T. cruzi* y se mantuvieron en el insectario del INIBIOLP, a 27°C y 45% de H.R, alimentados con sangre de rata.

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/policies/pages/default.aspx>
- <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>

Diseción de tejidos

Para la obtención de los tejidos de interés, los ejemplares de *T. infestans* y *R. prolixus* fueron previamente anestesiados a 4°C durante 30 minutos y los tejidos y órganos disectados en solución salina (0,9% NaCl). El integumento, intestino, cuerpo grasoso y túbulos de Malpighi se obtuvieron a partir de la región abdominal cortando a los insectos

en los conexivos y separando las regiones tergales y esternales. El cerebro y glándulas salivales se obtuvieron cortando las cabezas longitudinalmente. Los tejidos y órganos para extracción de ARN fueron inmediatamente colocados en reactivo Trizol y guardados a -80°C. Los integumentos para análisis de ácidos grasos e HC fueron envueltos en papel aluminio y guardados a -80°C, mientras que aquellos destinados a la observación mediante microscopía óptica fueron procesados como se describe más adelante.

[Análisis Microscópico del integumento](#)

[Microscopia óptica](#)

De acuerdo con los estudios realizados por Wigglesworth, (1933), se emplearon integumentos de ninfas de IV estadio de *T. infestans* disectados a los 4, 6 y 8 días posteriores a la alimentación de los insectos.

Los integumentos fueron fijados en paraformaldehído 4% (v/v) en buffer PBS (pH= 7,4) durante 30 minutos y lavados en buffer PBS (x4) en agitación. Se tiñeron con hematoxilina durante 40-60 s y se pasaron a agua corriente durante 10 min para el viraje. Luego se tiñeron con eosina durante 6 min en agitación. Se lavaron con buffer PBS (x5) y se montaron con Bálsamo de Canadá. Se midió el perímetro y área de los oenocitos en los tres tiempos definidos mediante el programa TSVIEW. El estudio estadístico se realizó calculando el promedio de dichos parámetros (n=9) para cada uno de los tiempos estipulados.

[Microscopia electrónica de barrido \(MEB\)](#)

La microscopia electrónica de barrido se basa en la incidencia de un haz de electrones sobre la superficie de una muestra. Los electrones son refractados en función de las irregularidades de la superficie de la muestra e inciden sobre un detector que genera una imagen. No permite observar la ultraestructura de la muestra, pero ofrece imágenes de alta resolución de la superficie de la misma.

Se empleó con el fin de observar la superficie cuticular de los insectos con el gen de FASN *RPRC000123* silenciado respecto a insectos control. Se utilizaron ninfas de IV estadio de *R. prolixus* inyectadas con ds*RPRC000123* y con el control provisto con el kit de silenciamiento, y a su vez se observaron ninfas control a las que se les extrajeron los lípidos cuticulares mediante sucesivas inmersiones en hexano (3 lavados, 5 min c/u) (Juárez y Blomquist, 1993).

Las muestras fueron metalizadas mediante recubrimiento con oro. Para la observación

se empleó un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM6360, estableciéndose como campo de observación el segundo tergito. La metalización de las muestras y la observación se realizaron en las instalaciones del Museo de Ciencias Naturales de La Plata.

Análisis bioinformáticos

Identificación y anotación de genes

La secuenciación de nueva generación o alto rendimiento (NGS) está basada en la pirosecuenciación: luminiscencia generada en la incorporación de cada nucleótido y detectada por un programa e interpretada a través de un pirograma. En particular, la tecnología de pirosecuenciación 454 fue la primera alternativa al método tradicional de secuenciación de Sanger (1977). Es un método flexible que permite el procesamiento en paralelo de gran cantidad de datos. Presenta una amplia variedad de aplicaciones como identificación de marcadores moleculares (SNP y SSR), cuantificación de transcritos a partir de bibliotecas de ADN complementario (ADNc) y secuenciación de genomas completos.

Esta metodología consiste en la unión de fragmentos de hebras únicas de ADN a una esfera mediante un adaptador. En el caso de muestras de ARN, se lleva a cabo previamente el enriquecimiento de las mismas y la síntesis de las bibliotecas de ADNc. Posteriormente dichas las hebras se fragmentan en secuencias de 500-800pb y se unen a las esferas.

La muestra es amplificada por emPCR (PCR de emulsion). Dicha amplificación ocurre en una emulsión de agua y aceite donde cada esfera queda en un microambiente aislado. La secuenciación se efectúa en una microplaca, donde cada uno de los pocillos contiene una única esfera con amplicones. La polimerización de las bases produce la liberación de pirofosfatos que generan una emisión de luz detectada por una cámara CCD e interpretada por un programa que construye un pirograma con la secuencia situada en cada pocillo (Papanicolaou y col., 2009; Mannino, 2016) (Figura 9).

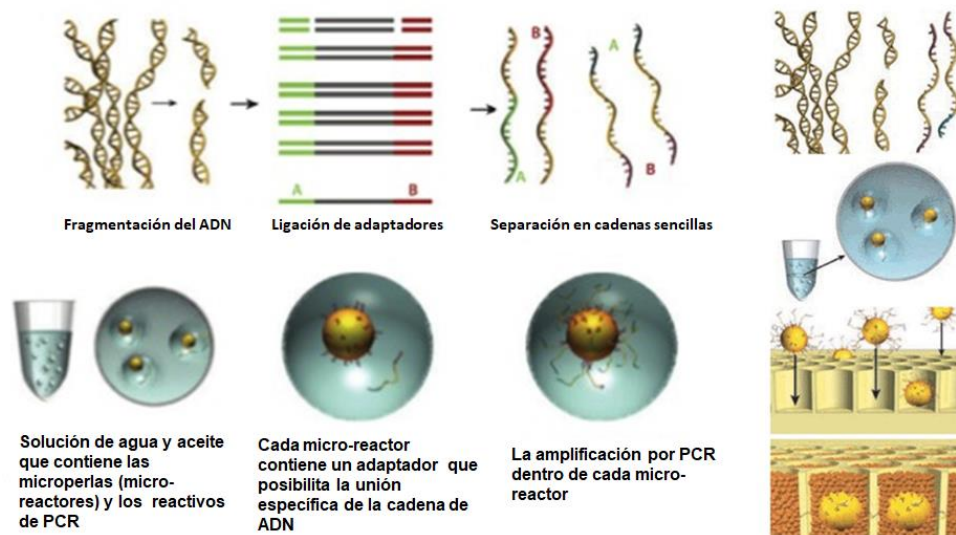


Figura 9: Preparación de ADN y PCR de emulsión. Modificado de Mardis,(2008).

Los datos obtenidos a partir de la generación de lecturas de marcadores de secuencia expresada o EST (expressed sequence tag) o bibliotecas de ADNc han aportado evidencias sobre patrones de expresión génica en distintos tejidos, estados de desarrollo, etc (David y col., 2010).

La secuenciación del transcriptoma del integumento de *T. infestans*, realizada previamente a este trabajo de tesis, fue obtenida a partir de una muestra de ARN total del integumento por Macrogen (Korea) empleando la plataforma 454 GS FLX Titanium. En este trabajo de tesis se realizó la anotación de genes de integumento relacionados con el metabolismo lipídico. La identidad de las secuencias fue asignada mediante el análisis de similitud de secuencias con genes anotados previamente utilizando el programa Blast2Go (<https://www.blast2go.com/>) empleando el algoritmo BLASTx. Eventualmente, se corrigieron manualmente las anotaciones automáticas producidas por el programa. La predicción funcional de las proteínas fue asignada mediante el análisis InterPro Scan, el cual busca regiones codificantes predichas por los dominios funcionales e identifica dominios proteicos evolutivamente conservados. Se asignaron términos GO (Gene Ontology) para cada secuencia y códigos EC para las proteínas con actividad enzimática. La información correspondiente a todas las secuencias identificadas se encuentra disponible en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/> (BioProjects PRJNA238208 y PRJNA314811)).

Diseño de cebadores

Un cebador es una secuencia corta de oligonucleótidos complementaria a la secuencia de ADN específica a amplificar mediante reacción de la cadena de la polimerasa (PCR).

Para lograr dicha amplificación se diseñan dos cebadores que flanqueen la secuencia de interés: un cebador sentido, S, que hibrida con la secuencia 3'-5' y un cebador antisentido, A, que se une a la secuencia 5'-3'. Dentro de los requisitos generales necesarios para lograr que la amplificación de un fragmento sea específica y maximizar su eficiencia podemos mencionar:

- Tamaño del cebador: 18-22 pares de bases (bp).
- Contenido de GC (%GC): 40-60%.
- Temperatura de fusión o melting (T_m): 58°C (57-61°C) similar entre los dos cebadores.
- Temperatura de hibridación o annealing (T_a): pareja entre ambos cebadores siendo la diferencia entre ellas similar a 0.
- Base en extremo 3': C o G, evitando A o T, aunque no se recomienda un exceso de CG que produzca un potencial alineamiento con múltiples sitios del molde "extremos pegajosos".
- Evitar la formación de estructuras secundarias (formación de horquillas o bucles, dímeros), hibridación entre cebadores hacia los extremos 3', reducida complejidad de secuencia y desapareamientos (mismatches) con el molde.

Para llevar a cabo la caracterización molecular de la FAS de *T. infestans* se diseñaron cebadores degenerados y específicos utilizando los programas CODEHOP (<https://4virology.net/virology-ca-tools/j-codehop/>) y GeneRunner v 3.0.1, respectivamente.

Los cebadores degenerados se diseñaron a partir de las secuencias disponibles de *R. prolixus*, *Acyrtosiphon pisum*, *Drosophila melanogaster* y *Tribolium castaneum* disponibles en la base de datos VectorBase (www.vectorbase.org), GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), FlyBase (www.flybase.org) y BeetleBase (www.beetlebase.org), respectivamente.

Los cebadores específicos se diseñaron a partir de las ESTs de FAS de *T. infestans* identificadas.

Para llevar a cabo la medición de expresiones relativas de genes de metabolismo lipídico entre insectos S y R de *T. infestans* se utilizaron secuencias obtenidas del transcriptoma. Para el silenciamiento de *RPRC000123*, *RPRC002909* y *RPRC000269*, medición de la expresión de genes CYP4G y receptor de lipoforina en *R prolixus* se utilizaron las secuencias disponibles en el genoma.

Los cebadores fueron diseñados según los requisitos exigidos por la técnica de PCR en Tiempo Real o cuantitativa (RT- qPCR):

T_m: 60°C

T_a: 55- 60°C

Tamaño de producto: 150-250 pb

Los cebadores utilizados se encuentran listados en la Tabla 1.

Tabla 1: Lista de cebadores utilizados para RT-qPCR.

Espece	Nombre	Cebador sentido	Cebador antisentido
Genes de referencia			
<i>R. prolixus</i>	<i>EF-1</i>	GATTCCACTGAACCGCCTTA	GCC GGGTTATATCCGATTTT
<i>R. prolixus</i>	<i>β-actina</i>	CCATGTACCCAGGTATTGCT	ATCTGTTGGAAGGTGGACAG
<i>T. infestans</i>	<i>β-actina</i>	CACCCCAGCAATGTATGTAG	ACCATCAGGAAGTTTCGTAAG
<i>T. infestans</i>	<i>18S</i>	GGCGGGGGCATTCTGATTG	ATCGCTGGCTGGCATCGTTTAT
Genes FASN			
<i>R. prolixus</i>	<i>RPRC000269</i>	TTGACCAGCGTTACCTCGACC	AATCAAGACGCCAAGAAATTCCG
<i>R. prolixus</i>	<i>RPRC002909</i>	AACTACAGTTGCGCCCAAGAGAC	TTCAAACATTCTCAGCTGCGTTG
<i>R. prolixus</i>	<i>RPRC000123</i>	GGGCAGACTTGATCAGGATTGTG	GGTATTGTTGCCGCCTCTTCC
<i>T. infestans</i>	<i>JAS01714</i>	CACCTGGACAGCGGCAATTGAG	CAATGGGCAGGTATGGGTCGTG
<i>T. infestans</i>	<i>JAR97775</i>	ATGTTGGAGCGGAGTTTGCAATG	TTCTTGTGCCTTTCGGATCCATG
<i>T. infestans</i>	<i>JAR97772</i>	GGTAGACTTGCCAGGAATGTG	TAGCTGCTTCTCCAAGGACATG
Genes ELOVL			
<i>T. infestans</i>	<i>JAR97899</i>	CAGTTGATGGTGCCGAAGAAAC	TGGTATGGCTTTAGGAAGTTGGC
<i>T. infestans</i>	<i>JAR97901</i>	TGGATCGGCTTACATGCAGTC	AACCGTTTGTATTGCAGTGCC
<i>T. infestans</i>	<i>JAR97902</i>	CGTAAAGTGTGGATTGTGTGGGC	TCAACTGGTCGCATCTGAAACAG
<i>T. infestans</i>	<i>JAR97898</i>	TAGCTGGGTTTGTGAAGAAGTGG	TGTCACCATGAACCACCAGCAC
<i>T. infestans</i>	<i>JAR97900</i>	CTGTATGCCTGGGCCTAAACTCG	TCGAGAGGAAATGGCCACAGTG
<i>T. infestans</i>	<i>JAS01869</i>	CAGACATTGCCATCGGTTTATG	TTCAGATCCAGACAGCAACAGGC
<i>T. infestans</i>	<i>JAS01870</i>	ATGGGTGCTTGTAGAAGTCTCC	TGGCTGCTTTCTGAGGACAATG
<i>T. infestans</i>	<i>JAS01868</i>	CTTCTACTGGCATGCAAGCTCC	TTCACATCATGCGATTATCCACC
Genes FAR			
<i>T. infestans</i>	<i>JAR97762</i>	AACGCTTGCCAATCATAATCTTG	TGATCCATTATCGAATGCTGTGC
<i>T. infestans</i>	<i>JAR97764</i>	TTGCAATGTCCACGGGTATGATC	TTGCCAACGAACTACCAGTCTGC
<i>T. infestans</i>	<i>JAR97766</i>	AGACCTGGAGTTGTTGTGGGAAC	TCAGCCGCAGAAGCAATGAG
<i>T. infestans</i>	<i>JAR97768</i>	CAGCTGAAGAACGACTGGAATTG	TAGAGCTGCTGCCGCATGTAC
<i>T. infestans</i>	<i>JAR97763</i>	CTAGAGTGAAATCAGCCTTTGCG	CCTGTACGCGGGTGGATAGAC
<i>T. infestans</i>	<i>JAR97758</i>	AAACGGCTATCATGCAATTGATG	AGACAATCTAAACGGGCCAACTG

<i>T. infestans</i>	JAR97761	GTTACGATCATGTCCGGCTGTC	CAGCCTGACTGATACCAAGCTCC
<i>T. infestans</i>	JAS01708	TTCAGAATGGCAGGTCACCTTGG	TGTTGCCAGAAAGGAAGATGATG
<i>T. infestans</i>	JAS01704	CCGGGTAAGTGGTTCATTCAATG	TGCTAAAGGTTTGCCAGTCTGTG
<i>T. infestans</i>	JAS01703	TGATTGTGGCAGCTTGAAAG	AGGCTTAGAAATTGCTGCATTCC
Genes CYP4G			
<i>T. infestans</i>	JAS02890	CGCTTTCAGTGCAACTGGAGTAC	ACGTTGTTGAACACCTTGTGACG
<i>T. infestans</i>	JAS02889	AAATGGCGATGGACTGACCG	ATCTCTCCAGACATCGCTCCTG
<i>R. prolixus</i>	RPRC013847 (CYP4G107)	CCAGGCAAGAGATCCAGGAGC	ACTGGCACCGGAGGGAAGAG
<i>R. prolixus</i>	RPRC003227 (CYP4G106)	GCAAGGCCGGACATTCAAG	GCTATGATGGGCACAGGTGG
Genes citocromo P450 (CYP clan 3)			
<i>T. infestans</i>	JAS02886	GACAGCAAGCATCTACCAGTTC	CGCCTGGTATGTAAACTGTCC
<i>T. infestans</i>	JAS02907	ATTCTAGGACCACCGCCATAG	CAGCCCTTCATATGGATCCC
<i>T. infestans</i>	JAS02897	GGACCGATGAACGATTGTGG	TTCTGGCTGGGCTAAATTTCC
<i>T. infestans</i>	JAS02896	CAAGGGCTCAAACCAGGTAATG	GGTGAAAGTATGGCGTCAGAGG
<i>T. infestans</i>	JAS02895	CGCTTGCCAGGTTCTATTGTC	CGGCTCGCTGACATATGATGC
<i>T. infestans</i>	JAS02910	CTCGGACATTGTTTCTAGCACG	CGGTCAAGCGTTCCAATTTCC
<i>T. infestans</i>	JAS02887	TCATTGTTACGGCTAAGGATTC	GATTGTCTACAGGGCATAATGG
<i>T. infestans</i>	JAS02899	GGTAAATATGCGCAAGTCGGTC	AATTGAACCAGGACAGGCAGTG
<i>T. infestans</i>	JAS02909	AATGGAGTAAGTGGATGCAATC	CCGGAAACACAAGAACGAG
<i>T. infestans</i>	JAR98725	GAGCAGCCAATTCCACATC	TACAAATATCGGGTGGAGAATG
<i>T. infestans</i>	JAR98720	TTTCTTGCAATGGATTCAC	TGGATGGAAATAAATATGTAGG
<i>T. infestans</i>	JAR98722	GGAAATATCCAAATGAACCAGC	AGCCTTCCATACTTCTCCTTTG
<i>T. infestans</i>	JAS02911	TGCCGCTGGTAAATGCTGGAC	ACCGACCACAACCAATTTCCG
<i>T. infestans</i>	JAS02883	TCTTTGTGGCTGGATTCGAC	TGGCATCATAAGTCAGTTGGC
<i>T. infestans</i>	JAR98721	ACTAATTCCTTCGCCGATCCAG	GCGATACGTGGCATTAACTGG
<i>T. infestans</i>	JAR98723	TACGCCAGCCAATGTTAATG	TTTCCATGTAGCTCCAGATGC
<i>T. infestans</i>	JAR98724	CCAATTGTAGGTGCTGAAATCG	CAGGTGATACGGTGGCTACTTG
<i>T. infestans</i>	JAR98727	AGACCAGCATTATTAATTAGAG	TACATAATCATTCAATCG
Genes carboxilesterasas (CCE)			
<i>T. infestans</i>	JAR98947	AGCCAGCCATGGAGACGATAC	AGTCGCACAGGTTCTCCAAGTG

<i>T. infestans</i>	JAS01831	ACACGGATCAGAGGATTGTTTG	GCTCCGAGACGATAGTTGAGTG
<i>T. infestans</i>	JAS01829	ACGACCTTGTGATAGTGATGCC	CACAAGCAGCTCCAGAGGTG
<i>T. infestans</i>	JAR97864	AGACAGCCAAACTTCATGCAG	GTCAGATGGGTCGTCTTCTATTG
<i>T. infestans</i>	JAS00242	GTGCCAGTTGTGCGACAATG	CTGCCAGTCTCTGTGGACACTTC
<i>T. infestans</i>	JAR95537	GGAGGTGACCCACAGATGATAAC	ACCTGCGTTCTCTGCCAATCC
<i>T. infestans</i>	JAR98945	TGGTGAAAGTGCTGGAGGTGC	CTGCTACACGTTCTGCCTGGAG
<i>T. infestans</i>	JAR98949	GGAAGTGCTGGAGCCGTATC	GAACGTCTTGCTGATTACCACAG
<i>T. infestans</i>	JAR98948	TCCAGGTACGGCTAGGCCATTAG	GCTCCCTCTGCTTCTGGTTCTTG
Gen receptor de lipoforina			
<i>R. prolixus</i>	RPRC011390	GGACAGACACAGGCAAGAATAC	CCAGCTCGTTCAATTCTGC

Análisis filogenético

La Sistemática Filogenética o Cladística presenta como principio fundamental la existencia en la naturaleza de un orden jerárquico que se refleja a través de los patrones de homología entre los organismos, como resultado del proceso de evolución. Estas relaciones están representadas por cladogramas, donde los taxa deben conformar grupos monofiléticos (clados) que se reconocen por los caracteres derivados o apomórficos compartidos entre los miembros del mismo (= sinapomorfias).

Dentro de la Sistemática Filogenética, la Simplicidad o Parsimonia es uno de los principios utilizados en la elección de una hipótesis filogenética, la cual tiene como objetivo la obtención de los árboles más cortos (con menor número de pasos o cambios entre los estados de carácter = mínimas homoplasias) para un conjunto de datos determinado.

El análisis de Máxima Verosimilitud se ha propuesto como una alternativa a la Parsimonia, en el análisis de datos de la secuencia de ADN. La verosimilitud es un concepto estadístico general basado en la probabilidad de obtener los datos observados y para aplicar el análisis es preciso elegir previamente un modelo de evolución molecular o de sustitución nucleotídica, entre varios posibles (Felsenstein, 1981; Lewis, 1998). Luego se evalúa la probabilidad de que las observaciones (caracteres) coincidan con el modelo, de modo que el árbol de máxima verosimilitud será el más ajustado al modelo elegido, es decir el árbol que tiene la mayor probabilidad (Schuh, 2000).

Los árboles de Neighbor-Joining (NJ) es otro de los algoritmos utilizados para construcción de árboles filogenéticos, en este caso, están basados en distancias. Para la obtención del árbol definitivo, se realizan una serie de arreglos o cambios de las

relaciones entre los taxa con respecto a la topología original (Mayr y Ashlock, 1991). Se han propuesto distintas medidas de soporte de los grupos en los cladogramas, las cuales permiten identificar los clados que están mejor justificados por caracteres (Kitching y col., 1998; Schuh, 2000). Para ello es preciso cuantificar el grado de sustentación de los clados. Una de las medidas propuestas, denominada “Bootstrap o remuestreo”, consiste en realizar un remuestreo con reposición de las columnas de la matriz de datos (posiciones de las secuencias de ADN) para obtener una matriz del mismo tamaño que la original (matriz remuestreada o pseudoréplica). Por cada matriz remuestreada se calcula un cladograma y el grado de conflicto entre los mismos se estima mediante un árbol de consenso de mayoría, que incluirá todos los grupos que estén soportados en más del 50% de las pseudoréplicas (Kitching y col., 1998). El porcentaje de veces que aparecen dichos grupos en todos los árboles comparados, se interpreta como una medida estadística de soporte de los mismos, siendo una rama con 95% de Bootstrap soportada al menos por 3 caracteres (Felsenstein, 1985). El uso de 1.000 réplicas de Bootstrap, comúnmente utilizado en la construcción de árboles filogenéticos, proporciona fiabilidad y robustez a los árboles creados.

El análisis filogenético de las FAS y ELOVL de *T. infestans* y *R. prolixus* se llevó a cabo a partir de las ESTs más nuevos fragmentos obtenidos por PCR y ensamblados en el caso de *T. infestans*, y las secuencias disponibles de *R. prolixus* a partir del genoma. Las secuencias fueron alineadas usando el programa Clustal W2, y los cladogramas fueron contruidos usando el algoritmo de Máxima Verosimilitud (Felsenstein, 1981) con 1.000 réplicas Bootstrap utilizando el programa MEGA 6.0 (Tamura y col., 2013).

Con el objetivo de inferir relaciones filogenéticas entre las especies del subcomplejo Sordida y *T. infestans* se utilizaron los HC cuticulares como caracteres y la abundancia relativa codificada. Se asignaron códigos del 0 al 7 de acuerdo al porcentaje de abundancia relativa de los HC cuticulares. Se adjudicaron los siguientes estados de caracter:

- 0 = ausencia de caracter;
- 1 = abundancia relativa inferior al 0,3%;
- 2 = abundancia relativa entre 0,3 y 1%;
- 3 = abundancia relativa entre 1 y 3%;
- 4 = abundancia relativa entre 3 y 6%;
- 5 = abundancia relativa entre 6 y 10%;
- 6 = abundancia relativa entre 10 y 20%;
- 7 = abundancia relativa mayor al 20%.

El análisis filogenético se llevó a cabo mediante un algoritmo de búsqueda heurística empleando el programa PAUP 4b10 (Swofford, 2002). Para la construcción de la matriz

del árbol se calculó un porcentaje promedio para cada HC entre los fenotipos de cada localidad estudiada. El cladograma fue construido usando el modelo Neighbour joining NJ (Felsenstein, 1981) con 1.000 replicaciones Bootstrap. El cladograma construido fue editado con el programa FigTree v1.4.4.

Análisis estructural de los genes FASN en *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*

La organización genómica de los genes codificantes de FAS de *R. prolixus* (*RPRC000123*, *RPRC000269* y *RPRC002909*) se obtuvo utilizando el servidor online Gene Structure Display Server 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>). Los dominios en las secuencias proteicas se identificaron y analizaron mediante la base de datos InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

Análisis génicos

Extracción ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)

La extracción del ARN total se llevó a cabo mediante Trizol Reagent kit (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se homogeneizaron las muestras en hielo empleando homogeneizadores de teflón de rotación (THOMAS U.S.A, O512 (Glas-Col, Terre Haute, USA). Luego se centrifugaron a 13000 rpm en a 4°C durante 15 minutos para precipitar el contenido extracelular. Se tomó el sobrenadante de las muestras, se le adicionaron 200 µl de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos para obtener una separación definida de fases: fase acuosa superior, interfase y fase orgánica inferior. La fase acuosa superior contiene el ARN, mientras que la interfase y la fase orgánica contienen el ADN y las proteínas. Se transpasaron a un nuevo tubo 350 µl de la fase acuosa superior. Se agregó 1 volumen de isopropanol para lograr la precipitación del ARN; se mezcló cuidadosamente por pipeteo y se guardó a -80°C durante 45 minutos. Se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante, y se lavó dos veces el pellet obtenido con 1 ml de etanol 75%. Se dejó secar el pellet y se resuspendió el ARN en 20-50µl de agua libre de RNAasas.

Posteriormente se cuantificó el ARN utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo, EEUU). Se registraron además los valores de los cocientes de las absorbancias 260nm/280nm y 260nm/230nm 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 evaluar la integridad de ARN se llevó a cabo una Electroforesis en un gel de agarosa 1% p/v en buffer TBE (Tris- Acido Bórico- EDTA 0,5M) preparado con agua MiliQ utilizando bromuro de etidio como agente intercalante para visualizar el ARN. Se sembró 1µg de muestra y se corrió durante 30 min a 100 V. Las bandas características de ARN ribosómico 18S y 28S se visualizaron mediante un transiluminador Hoefer Macrovue UV- 20 y las fotos se tomaron con una cámara Kodak DC 210 y registradas mediante el programa Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics, EEUU).

En la Figura 10 se muestra la Electroforesis correspondiente al ARN total de 8 muestras de integumento de *T. infestans*. Se verificó la integridad del ARN obtenido observando la presencia nítida de las bandas de ARN ribosómico 18S y 28S. Además, no se observa la presencia de ADN genómico en el punto de siembra lo cual indica la ausencia de su contaminación.

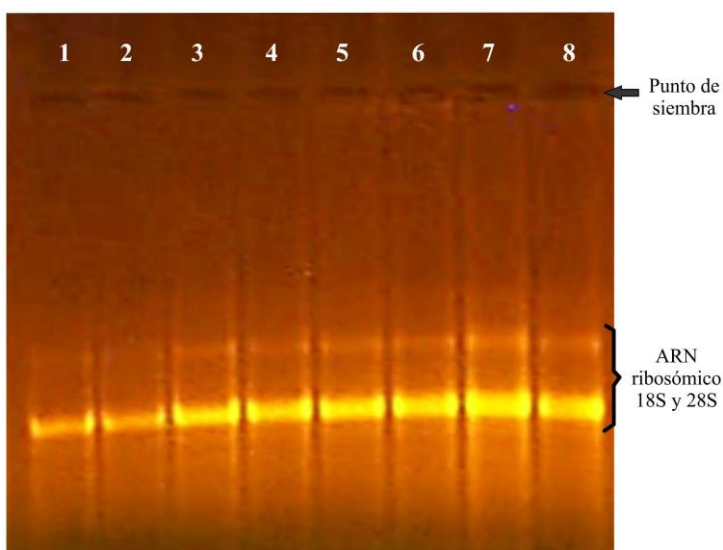


Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa 1% de ARN total de 8 muestras de integumento de *T. infestans*. Se resaltan los puntos de siembra y las bandas de ARN ribosómico.

Para eliminar restos de material genómico no detectado en el gel de agarosa se realizó un tratamiento con DNAsa (TURBO™ DNase, Ambion, EEUU) siguiendo las condiciones del fabricante.

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

Volumen final	10 μ l
---------------	------------

La reacción consiste en dejar actuar la DNasa a 37°C durante 30 minutos, la adición posterior de EDTA en una concentración final de 15mM, y la inactivación de la enzima a 65°C durante 10 minutos. Las muestras se conservaron a -80°C hasta su uso.

La síntesis de ADNc consiste en la retrotranscripción *in vitro* de una hebra de ADN complementaria al ARN utilizado como molde, catalizado por una retrotranscriptasa reversa. Se empleó el kit High iScript cDNA Synthesis (Applied Biosystems, EEUU). Siguiendo las instrucciones del fabricante se usó 1 μ g de ARN total para una reacción final de 20 μ l.

A continuación, se detalla las cantidades de los reactivos utilizados:

ARN	1 μ g
Buffer de reacción 5X	4 μ l
Enzima	1 μ l
H2O	a completar
Volumen final	20 μ l

La reacción incluye 3 pasos: hibridación de los cebadores random al ARN a 25°C durante 5 minutos, polimerización de ADNc catalizado por la enzima a 46°C durante 20 minutos e inactivación de la retrotranscriptasa reversa a 95°C durante 1 minuto.

El tratamiento con DNAasa y la retrotranscripción se llevaron a cabo en un termociclador Veriti (Thermo). Las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la amplificación exponencial de un fragmento específico de ADN, utilizado como molde pequeñas cantidades del ADN original. Dicha replicación es catalizada por una enzima ADN polimerasa que precisa de un molde de ADN monocatenario a partir del cual sea capaz de polimerizar una nueva hebra de ADN y un cebador con un grupo 3'-OH al que puedan agregarse nuevos nucleótidos.

Los cebadores son fragmentos cortos de ADN (17-25 nucleotidos) complementarios a secuencias conocidas en el molde. Para cada una de las cadenas se utiliza un cebador diferente.

La solución para llevar a cabo la reacción incluye el ADN blanco, ADN polimerasa, los cuatro desoxiribonucleosidos trifosfatos (dNTPs), cebadores, iones magnesio y otras

sales necesarias para que se produzca la reacción.

La PCR incluye 3 pasos por ciclo:

Desnaturalización inicial: un calentamiento de la solución a una temperatura entre 90-100°C que produce la rotura de los puentes de hidrogeno del ADN originando dos hebras monocatenarias.

Hibridación de cebadores: enfriamiento de la solución entre 35-65°C que permite la unión de los cebadores a sitios específicos de la cadena molde.

Extensión: calentamiento a 60-70°C que permite la síntesis de las cadenas nuevas de ADN catalizado por la ADN polimerasa mediante el agregado de nucleótidos.

En cada ciclo el material genético se duplica, de manera que aumenta de forma geométrica.

Extensión final: etapa final que se lleva a cabo a una temperatura de 70-74 °C durante 5-15 minutos una vez concluidos los ciclos diseñada para completar la amplificación.

Se detalla a continuación los tipos de PCR utilizados durante la tesis.

PCR convencional o de punto final

La PCR convencional o de punto final se utiliza para amplificar de manera general fragmentos de ADN. La amplificación se visualiza al final de la reacción mediante la electroforesis de los productos de amplificación.

Se usó para amplificar fragmentos de las FASNs de *T. infestans* a partir de las EST, para chequear el funcionamiento de cebadores, utilizando el kit de PCR Taq Pegasus, y Taq Platinum. A continuación, se detalla las cantidades de reactivos requeridas en cada caso.

Componentes	Volumen (µl) Taq Pegasus	Volumen (µl) Taq Platinum
Buffer 10X	2.0	2.0
MgCl ₂ 50mM	0.6	0.6
dNTPs 10mM	0.5	0.4
ADN polimerasa	0.2	0.25
H ₂ O	14.7	14.7
Cebador S (10µM)	0.50	0.50
Cebador A (10µM)	0.50	0.50
Molde (1µg)	1	1
Volumen total (µl)	20	20

Taq Pegasus/Taq Platinum		
Etapas (x 35 ciclos)	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Desnaturalización inicial	94	2:00
Desnaturalización	92	0:30
Hibridación	55/59	0:40
Extensión	72	1:30
Extensión final	72	4:00

En algunos casos, dependiendo de la muestra, hubo que optimizar las reacciones de PCR aumentando progresivamente la temperatura de hibridación de los cebadores para evitar amplicones inespecíficos, variando la concentración final utilizada de cebadores para evitar la formación de dímeros, modificando las concentraciones de magnesio (Mg^{++}), con el fin de amplificar el fragmento específico deseado.

Los ciclos térmicos tuvieron lugar en un termociclador Veriti (Thermo).

Se visualizaron los productos de amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa 1% p/v en TBE como fue explicado anteriormente.

Se sembró un marcador de peso molecular para determinar el tamaño de los amplicones de interés y los respectivos controles positivos y negativos. La Electroforesis duró 60 minutos para lograr una mayor definición de las bandas.

El producto de amplificación fue conservado a $-20^{\circ}C$ hasta su posterior uso.

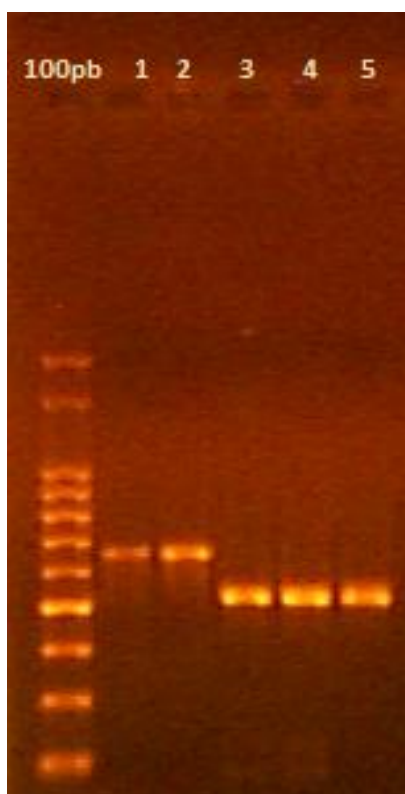


Figura 11: Electroforesis correspondiente a cinco productos de PCR tiempo final. Los números indican el punto de siembra correspondiente a cada una de las muestras. El marcador de peso molecular (100pb) se muestra en la primera calle.

Se llevaron a cabo diversos tipos de PCR convencional: PCR anidada y PCR de colonias.

PCR anidada (Nested PCR): variante que comprende dos rondas de amplificación donde se utiliza como molde de la segunda PCR el producto de amplificación de la primera. Fue utilizada con el objetivo de incrementar la especificidad del fragmento buscado.

PCR de colonias (Colony PCR): variante que tiene como objetivo determinar la ausencia o presencia del fragmento de interés de ADN inserto en plásmidos. Fue utilizada para verificar el tamaño adecuado de los insertos de interés durante el proceso de clonación desarrollado más adelante.

PCR en Tiempo Real y análisis

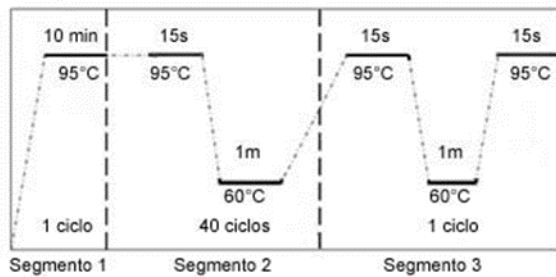
La PCR en Tiempo Real o cuantitativa (RT-qPCR) es una técnica que permite monitorear constantemente (en tiempo real) la cantidad de ADN sintetizado a partir de una cantidad inicial de ADNc presente en las muestras. Mediante diferentes estrategias (sondas específicas o fluoróforos inespecíficos que se intercalan en la doble hebra de ADN) se logra que la fluorescencia emitida en cada tubo a lo largo de los ciclos de PCR sea directamente proporcional a la cantidad de ADN sintetizado en la reacción.

Se utilizó este método de cuantificación relativa para determinar la cantidad relativa de transcritos (ARNm) de los genes de interés en las distintas condiciones de estudio.

Se utilizó el kit comercial Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) que contiene todos los reactivos necesarios (dNTPs, una ADN polimerasa hot start, buffer de reacción apropiado y el fluoróforo inespecífico SYBR Green como agente intercalante). Se usó como molde para estas reacciones el ADNc, diluido 5 o 10 veces. El protocolo para una reacción típica de RT- qPCR fue el siguiente:

Supermix 2X	7,5 µl
Cebador S + Cebador A (5µM o 10µM)	0,4 µl
ADNc dilución 1/5 o 1/10	5 µl
H ₂ O	2,1µl
Volumen final	15 µl

Para el ciclado y la lectura de la fluorescencia se usó un equipo StepOne Plus (Thermo). 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 las reacciones de PCR propiamente dichas y el segmento 3 corresponde a la curva de disociación de

los productos formados.

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 presencia de subproductos indeseados o dímeros de cebadores. 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.) se descarta el experimento.

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 es mínima y relativamente constante, una segunda fase en la que se da un incremento de la fluorescencia, el cual es en forma exponencial (en cada ciclo se duplica el número de copias del fragmento amplificado) en su inicio, y una tercera fase (meseta o plateau) donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia. Un parámetro fundamental en función del cual se realizan los ensayos de cuantificación es el **Ciclo Umbral o Threshold Cycle (CT)**. Este se define como el ciclo en el cual la fluorescencia en una muestra determinada supera el valor umbral. Dicho valor umbral se representa como una recta horizontal en la zona de aumento exponencial y lo calcula el equipo en base al desvío estándar de la fluorescencia durante la primera fase.

El valor del CT se relaciona inversamente con la cantidad inicial de templado ya que será menor el número de ciclos necesarios para cruzar el umbral de fluorescencia cuanto más templado inicial tenga la muestra.

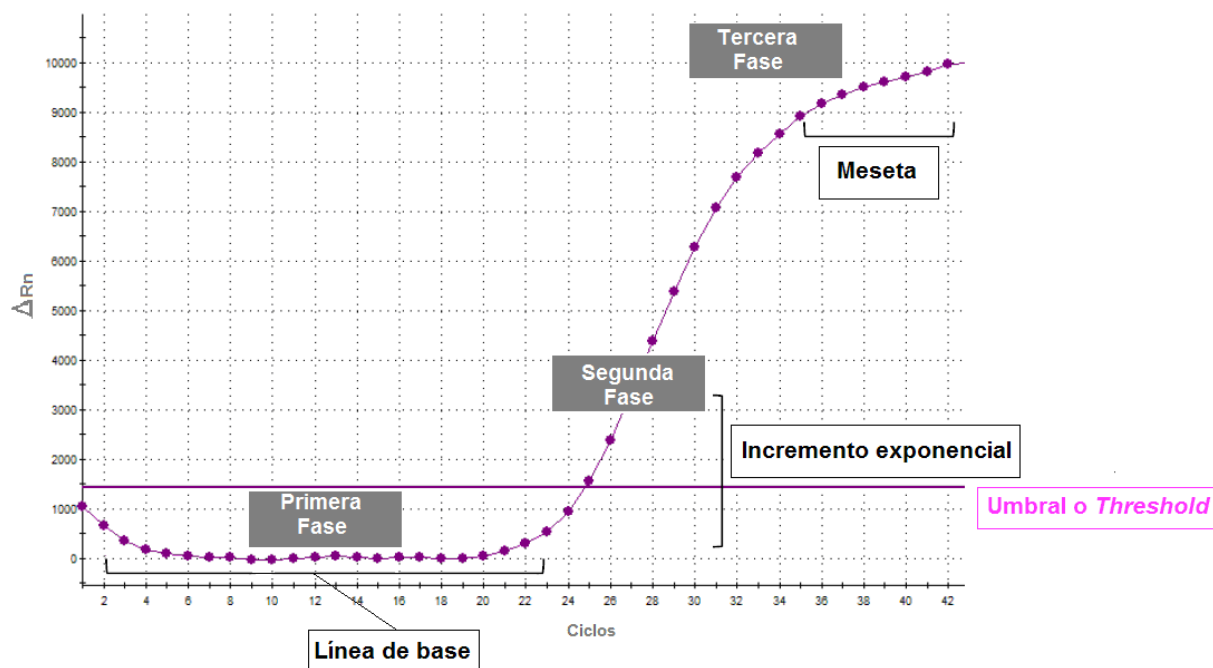


Figura 12: Gráfico de amplificación de PCR en tiempo real mostrando la primera, segunda y tercera fase. Durante la primera fase la fluorescencia emitida no sobrepasa el límite umbral y corresponde a la línea de base. En la segunda fase se produce un aumento exponencial de la fluorescencia en la parte inicial y en la tercera fase la fluorescencia emitida se estabiliza llegando a una meseta. El umbral o threshold corresponde a la línea horizontal en la gráfica donde se produce un cambio significativo en la fluorescencia.

La especificidad y eficiencia de cada par de cebadores fue evaluada mediante curvas de calibración por RT-qPCR. 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, 1/5, 1/25, 1/125 y 1/625. Se utilizó como control negativo agua libre de nucleasas para evaluar la potencial formación de dímeros de cebadores. 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 13 se muestra a modo ilustrativo las curvas de amplificación, curvas de disociación y curva de calibración correspondientes al par de cebadores del gen *RPRC000269*. La línea umbral para las curvas de amplificación es establecida automáticamente por el equipo (Figura 13A). En la curva de disociación se observa un único pico que corrobora que no se generaron amplificaciones inespecíficas o dímeros de cebadores (Figura 13B). La curva de calibración indica para este par de cebadores una eficiencia del 101.29 %, con un coeficiente de determinación R^2 de 0,99 (Figura

13C). 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.

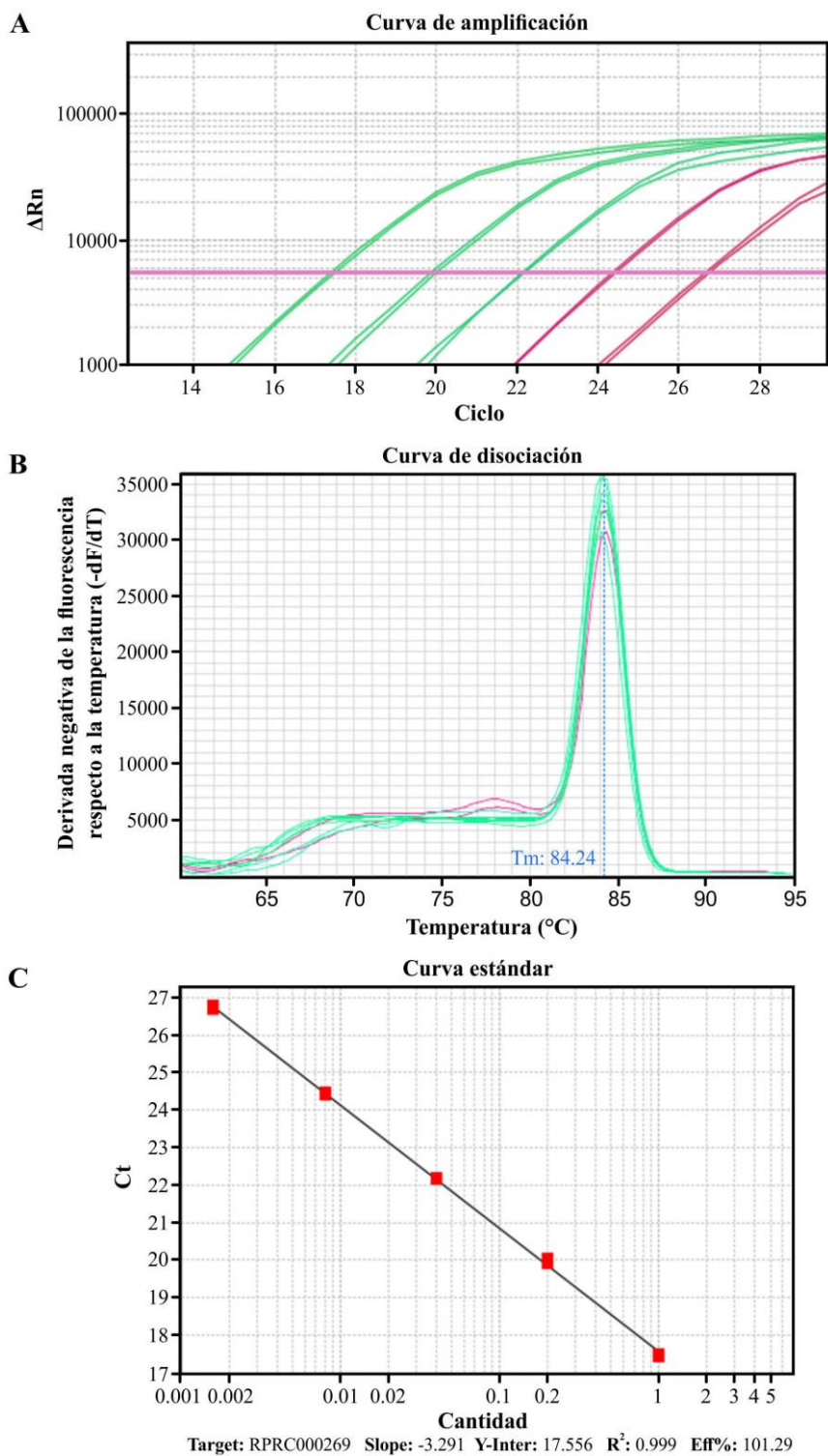


Figura 13: Curvas de amplificación para RT-qPCR del cebador para *RPRC000269*. Se muestra la curva de fluorescencia en el tiempo (curva de amplificación), la curva de desnaturalización y la curva de calibración con los valores obtenidos.

Cuantificación relativa

La cuantificación relativa se emplea para estudiar los cambios en los niveles de ARNm de un determinado gen, en comparación con uno o más genes de referencia. A su vez, la determinación de los niveles de expresión del gen de interés, en la muestra experimental, se realiza comparando la expresión del mismo gen con una muestra calibrador o muestra control. El calibrador representaría la expresión basal de ese gen con el cual comparar. Así se consideran como calibradores dependiendo del experimento a la muestra de tiempo cero de un experimento, la muestra no tratada, o un tejido de referencia, etc. Usando esta estrategia de cuantificación, las diferencias en el valor de CT entre la muestra experimental y la muestra calibrador se verán expresadas como “las veces en que se incrementa o en que disminuye la expresión del gen de interés en la muestra experimental con respecto a la muestra calibrador”. Para poder comparar la expresión del gen de interés en las muestras experimentales y la muestra calibrador, todos los valores de CT deben ser normalizados con uno o varios genes endógenos, también llamados genes de referencia o genes *housekeeping* (GR). Los genes GR son aquellos que se expresan en todos los tejidos y deben tener una expresión constante e invariable tanto en las muestras experimentales como en la muestra calibrador, independientemente de las condiciones del ensayo. Algunos de los genes GR utilizados comúnmente son: ARN ribosomal 18S, GAPDH, β -actina, TBP, entre otros. La normalización, utilizando uno o varios genes de referencia, permite eliminar las variaciones que pueden existir entre muestras, debido a las diferencias principalmente en el proceso de extracción de ARN, en la reacción de retrotranscripción y por error de pipeteo en cada etapa.

Análisis

Se utilizaron dos métodos para el análisis de la expresión diferencial de los genes de interés.

Para los ensayos que involucraron dos condiciones (ej. insectos susceptibles vs. insectos resistentes, insectos control vs. insectos con el gen de interés silenciado) se utilizó el programa REST 2009 (versión 2009, Qiagen), que usa el método de cuantificación relativa utilizando genes de referencia (GR) (Pfaffl y col., 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 (calibrador) y tratado, respecto a la diferencia de expresión de los genes de referencia en las mismas muestras. Utiliza la siguiente ecuación:

$$ER = \frac{E_T^{\Delta C_t T(\text{control-tratado})}}{MG(E_{GR}^{\Delta C_t GR(\text{control-tratado})})}$$

donde ER es la expresión relativa, E es la eficiencia de amplificación de los cebadores de la RT-qPCR, ΔC_t es la diferencia de Ct entre el control y el tratamiento, T es el gen de interés, GR es el gen de referencia y MG es la media geométrica. Como genes de referencia se utilizaron el *18S* y la β -actina de *T. infestans* y *EF-1* y la β -actina de *R. prolixus*.

En el caso de la caracterización molecular de la FAS se estudió: su perfil de expresión en cuerpo graso, integumento, túbulos de Malpighi, glándulas salivales, cerebro e intestino medio de *R. prolixus* y el patrón de expresión a lo largo del IV estadio ninfal del integumento para ambas especies de triatomíneos. Para analizar los perfiles de expresión se aplicó el modelo de cantidades relativas normalizadas (NRQ), que consiste en la conversión de los valores de CT en RQ. Para el cálculo del RQ, se utiliza como primer normalizador el valor promedio de los CT del total de muestras a analizar; 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 GR (Hellemans y col., 2007; Pfaffl y col., 2002). Los valores de NRQ se obtuvieron siguiendo las fórmulas detalladas en Hellemans y col. 2007, y se graficaron en el programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., EEUU). Como GR se usaron EF-1 y la β -actina (Majerowicz y col., 2011; Villalobos-Sambucaro y col., 2015).

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

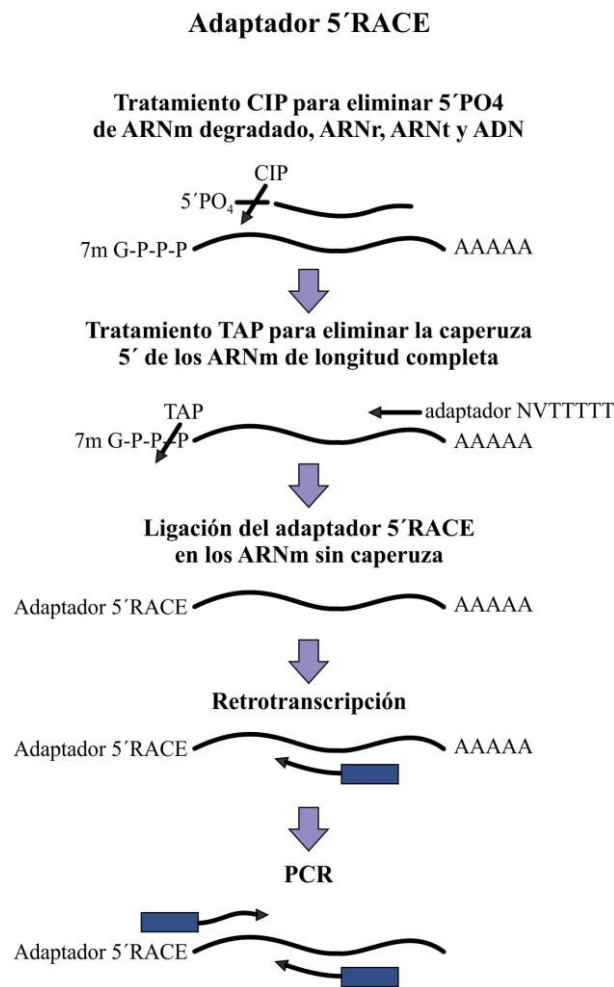
[Amplificación rápida de los extremos de ADNc \(RACE\)](#)

La amplificación rápida de los extremos de ADNc (RACE) es una técnica utilizada para obtener la secuencia completa de un ADNc a partir de una secuencia parcial del mismo. Se basa en el uso de secuencias adaptadoras para los extremos 5' y 3' de los ARNm presentes en la muestra, seguida de retrotranscripción para producir ADNc a partir de los ARNm y luego amplificación mediante PCR empleando cebadores específicos de la secuencia de interés. El origen de las secuencias parciales puede ser diverso (plásmidos, fagos, bibliotecas de ADNc, etc). Las reacciones para la obtención del extremo 5' (5' RACE-PCR) o el extremo 3' (3' RACE-PCR) del ARN son independientes. Se usó la técnica con el fin de obtener las secuencias completas de FAS de *T. infestans* a partir de las ESTs provenientes del transcriptoma de integumento empleando el kit First Choice RLM-RACE (Ambion) y cebadores específicos diseñados a partir de las

ESTs.

A continuación, se detalla el procedimiento realizado para obtener las secuencias faltantes.

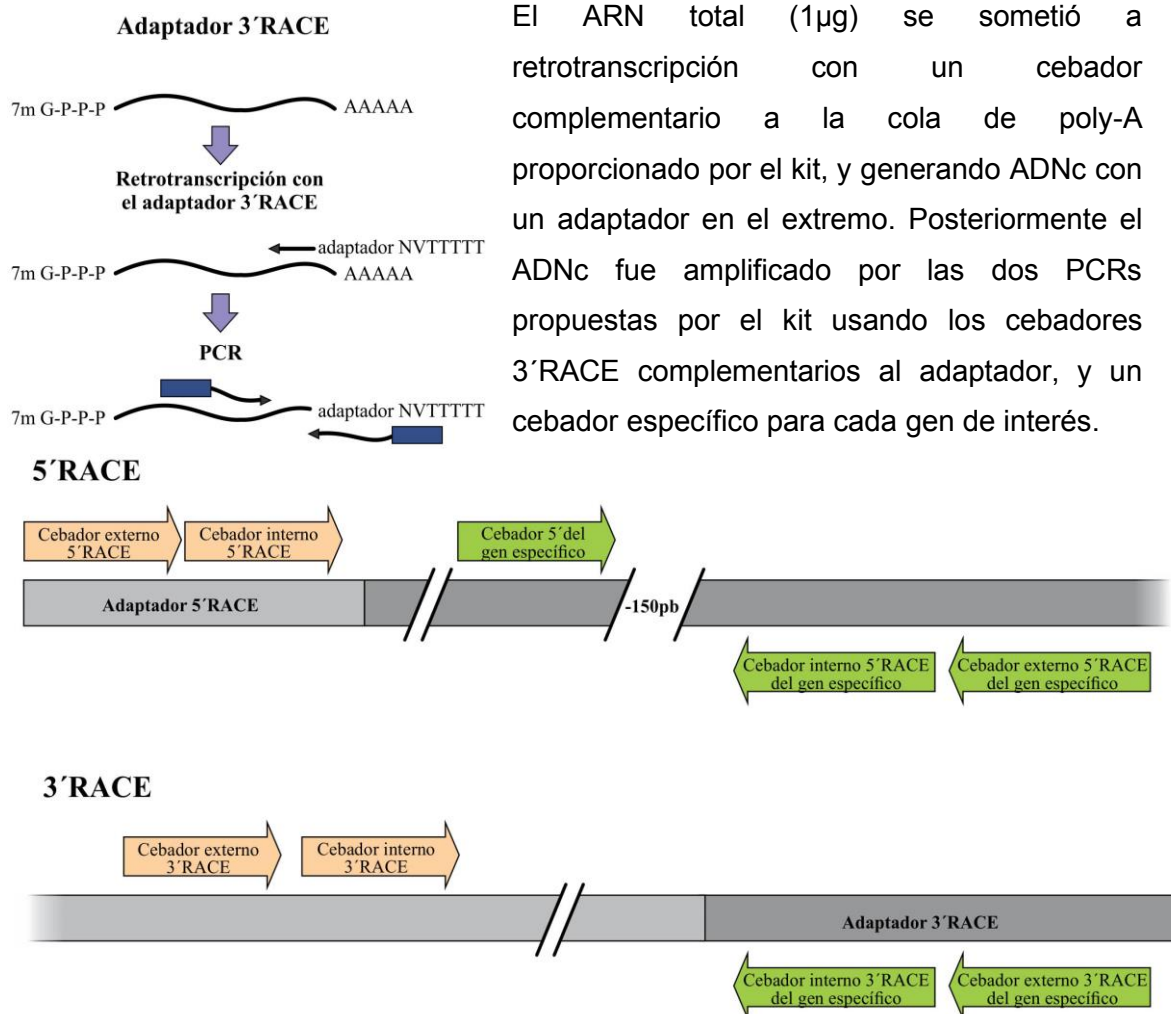
Amplificación del extremo 5':



El ARN total (1µg) se trató con fosfatasa alcalina (CIP) para eliminar los 5'-fosfatos libres del ARN ribosomal, ARNm fragmentado, ARNt y ADN genómico contaminante, sin afectar los extremos de los ARNm intactos. Luego, los ARNm intactos se trataron con una pirofosfatasa ácida (TAP) para eliminar la caperuza 5' y dejar un 5'-monofosfato libre en el extremo 5', al cual se liga un oligonucleótido adaptador de ARN provisto por el kit utilizando la ARN ligasa T4. Posteriormente se llevó a cabo una retrotranscripción con cebadores aleatorios para obtener el ADNc faltante hasta dicho extremo y se concluyó con dos PCR anidadas que amplificaron el extremo 5' utilizando los dos cebadores anidados

correspondientes a la secuencia del adaptador 5'-RACE provisto por el kit y un cebador específico para cada secuencia buscada.

Amplificación del extremo 3':



El ARN total (1µg) se sometió a retrotranscripción con un cebador complementario a la cola de poly-A proporcionado por el kit, y generando ADNc con un adaptador en el extremo. Posteriormente el ADNc fue amplificado por las dos PCRs propuestas por el kit usando los cebadores 3'RACE complementarios al adaptador, y un cebador específico para cada gen de interés.

Figura 14: Esquema que muestra las posiciones de los cebadores 5' y 3' RACE. Los cebadores representados con flechas blancas son universales y provistos por el kit. Los cebadores representados por flechas negras son específicos de cada gen y diseñados por el usuario.

En la tabla 2 se detalla la lista de cebadores específicos diseñados para llevar a cabo la técnica RACE. Las letras S y A corresponden al cebador sentido y antisentido, respectivamente.

Tabla 2: Lista de cebadores específicos utilizados para RACE.

Nombre	Secuencia de cebadores	Región
FASN 1- Outer	S: ACGTCTCAACCGCAAGGAACA	Extremo 3' (Cebador externo 5'RACE)
FASN 1- Inner	S: TTCATTTGGAGCAGCTGTAGCA	Extremo 3' (Cebador interno 5'RACE)
FASN-3-Outer	A: ACCGTCTGTATTTGTGCCAGTGT	Extremo 5' (Cebador externo 3'RACE)

FASN-3-Inner	A: ACACGCTCCATCAGGACTTAACA	Extremo 5' (Cebador interno 3' RACE)
--------------	-------------------------------	--------------------------------------

En ambos casos los resultados obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa 1% p/v en TBE. El resto del producto de amplificación fue conservado a -20°C hasta su posterior clonado y secuenciación.

Clonación

La clonación génica tiene como objetivo la obtención de múltiples copias idénticas (clones) de un fragmento específico de ADN a partir de una secuencia original.

Esta técnica fue utilizada con el fin de lograr la amplificación de las secuencias parciales de FAS de *T. infestans* obtenidas mediante RACE o mediante PCRs para obtener los fragmentos entre ESTs sucesivas. Para ello se utilizó el vector de clonado pGEM-T Easy Vector System (Promega) y se llevó a cabo la transformación de bacterias competentes *Escherichia coli* JM109.

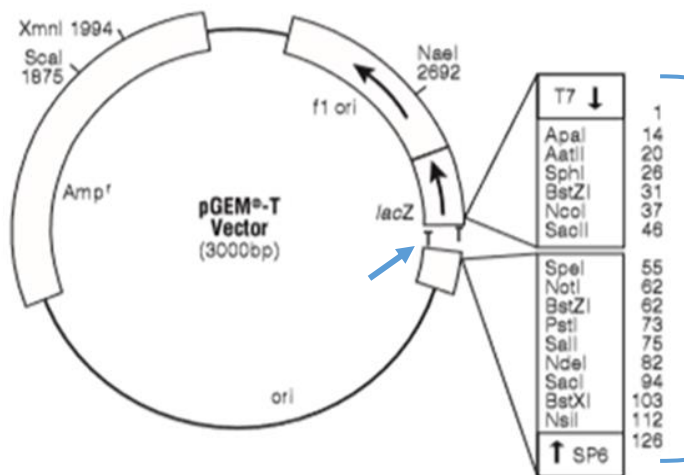


Figura 15: Esquema que muestra las características del vector de clonado pGEM-T. La llave indica sitio de clonación múltiple (MCS). La flecha celeste indica las dos timidinas salientes en el MCS. Amp^r: gen de resistencia a ampicilina. Ori: origen de replicación.

En la figura 15 se resaltan las principales características del vector:

- Origen de replicación (ori).
- Factor de selección: ampicilina resistente (Amp^r)
- Sitio de clonación múltiple (MCS):

El vector posee dos timidinas salientes (T-overhangs) en los extremos 3' que favorecen la linealidad del vector y permiten optimizar la ligación del inserto de interés.

Los productos de PCR a ligar fueron obtenidos por medio de la ADN polimerasa Taq Pegasus, que agrega una adenina 3' terminal a cada uno de los extremos del fragmento. Estas A son complementarias a las T libres del MCS permitiendo el proceso de ligación. La región de inserción está flanqueada por las secuencias de los promotores T7 y SP6 y de sitios de corte para múltiples enzimas de restricción.

El inserto se liga entre el gen lacZ y su promotor. Dicho gen codifica para la enzima β -galactosidasa, que en las bacterias cataliza la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa, y forma parte de la unidad transcripcional del operon lac presente en varias especies de bacterias (genes estructurales del metabolismo de la lactosa).

La ligación se llevó a cabo utilizando la ADN ligasa T4 provista por el kit a 4°C overnight (ON); la cantidad de inserto a utilizar fue optimizada siguiendo las relaciones propuestas por el fabricante.

Las E. coli JM109 competentes se transformaron mediante shock térmico en medio SOC y se dejaron ON a 37°C para su recuperación. Luego se colocaron en placas de cultivo con medio Luria-Bertani-agar suplementado con ampicilina (50mg/ml).

A continuación, se detalla la composición de los medios LB con agar y líquido, preparados para la clonación:

Componentes	LB con agar	LB líquido
CINa	10gr/lt.	10gr/lt.
Triptona	10gr/lt.	10gr/lt.
Extracto de levadura	5 gr/lt	5 gr/lt
Agar	15 gr/lt	-----
Agua destilada estéril	1lt	1lt

Asimismo, al medio de cultivo se le agregaron X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) (20 μ l/placa) e IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) (10 μ l/placa). La ampicilina en el medio de cultivo permitió que crecieran solo las bacterias que fueron transformadas con el vector y que por tener el gen Amp^r en el mismo eran resistentes al antibiótico. El IPTG actúa como un agente inductor de la transcripción del operón Lac, mientras que el X-Gal es un sustrato de la β -galactosidasa, que al ser metabolizado genera un color azul en las bacterias. Las colonias bacterianas que incorporaron el inserto en el vector tendrán interrumpido el gen LacZ y crecerán con un color blanco, mientras que aquellas que no lo incorporaron tendrán el gen funcional, sintetizarán β -galactosidasa y ésta hidrolizará el X-gal formando colonias bacterianas

azules. De esta manera se puede seleccionar aquellas colonias que contienen el amplicón insertado en el vector de aquellas que no. Todas las muestras fueron hechas por duplicado.

Se seleccionaron colonias de bacterias que contenían el inserto (colonias blancas) y se hicieron crecer en medio LB líquido con agitación a 37°C toda la noche (ON).

Se verificó mediante Colony PCR que el tamaño de los insertos correspondiera a los fragmentos génicos de FAS en estudio. Para ello se tomaron 10µl del cultivo bacteriano y se llevaron a 50µl con agua destilada estéril. Se calentaron las mezclas a 95°C durante 5 minutos para el lisado de las bacterias y se centrifugaron a 13000 rpm durante 2 minutos para precipitar los restos celulares. Luego se tomaron 10µl del sobrenadante y se usaron como molde en una PCR empleando los cebadores correspondientes. Los productos obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

Todo el material usado fue esterilizado mediante autoclave o por llama de mechero según corresponda. Asimismo, se manejaron las colonias bacterianas siempre bajo llama de mechero para asegurar condiciones de esterilidad.

Los plásmidos con las secuencias de interés fueron purificados mediante miniprep con el kit QIAprep Miniprep (Qiagen). Este método se basa en una desnaturalización alcalina de todo el ADN bacteriano y una posterior neutralización rápida que renaturaliza selectivamente el ADN plasmídico y permite purificarlo del ADN genómico, el cual permanece desnaturalizado y precipitado. Finalmente se cuantificó el producto obtenido en espectrofotómetro Nanodrop 2000c y se conservó el plásmido purificado a -20°C hasta su secuenciación.

Secuenciación

Las secuencias clonadas según lo descrito en la sección anterior, así como distintos productos de PCR fueron enviados a secuenciar a Macrogen (Korea) o INTA Castelar. Se utilizaron los cebadores universales SP6 y T7 para los fragmentos clonados y cebadores específicos para cada producto de PCR.

Posteriormente se analizaron los electroferogramas (definición e intensidad de los picos, superposición de los mismos) a fin de detectar algún posible error en las secuencias enviadas (Figura 16).

Las secuencias nucleotídica y proteica de los genes FASN de *T. infestans* encontrados, fueron enviadas para su anotación a la base de datos GenBank.

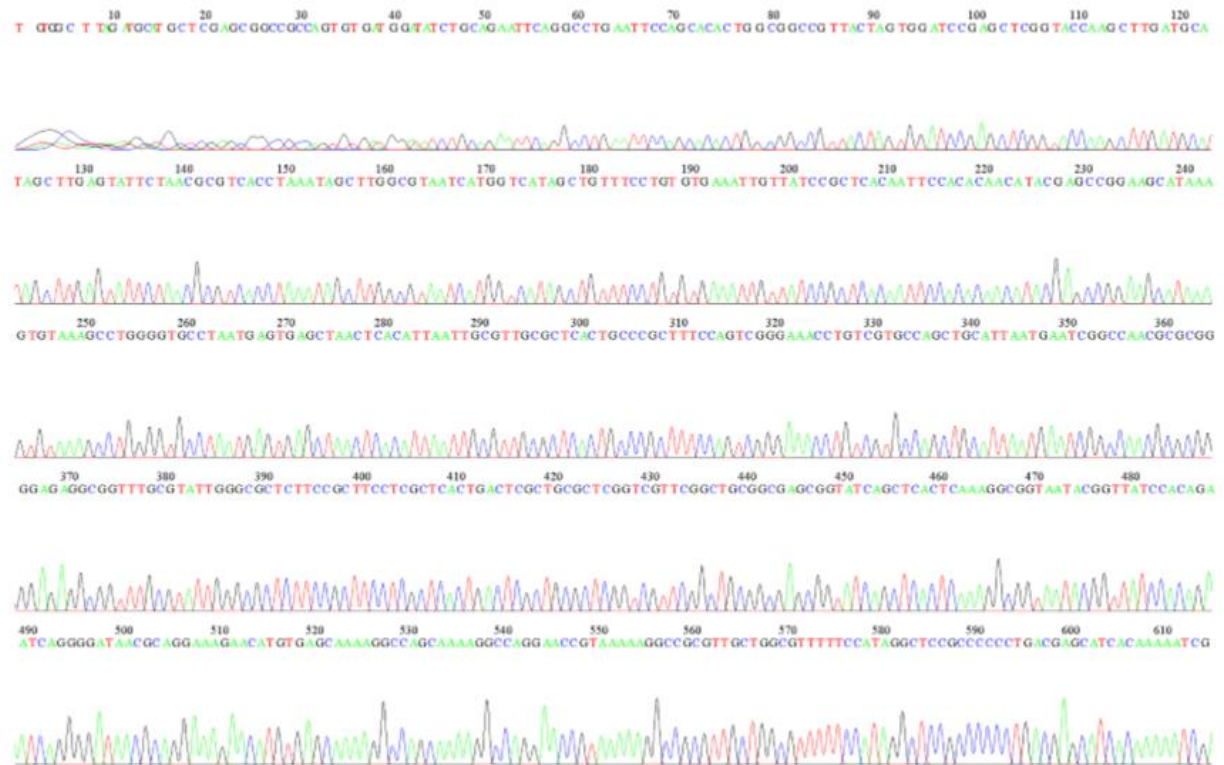


Figura 16: Electroferograma que muestra la secuenciación de un fragmento del gen FASN de *T. infestans*

Lista de cebadores de las secuencias de ADN enviadas a secuenciar durante caracterización molecular de los transcritos correspondientes a las FAS de *T. infestans*.

Nombre del cebador	secuencia	Longitud (pb)
FASN 1	S: ATGCGCAACGGTGAATGTGATG A: TGCTGCAATTCCTCCATCCCAC	461
FASN 1	S: ATTGAGGTCGCTCCACATTGTC A: ACCATTCCAATTCACCAACAGC	796
FASN 1	S: GCAACAAGTTCAAGCTGATCCC A: GATCGCCACGGGTTAATGTG	920
FASN 3	S: TGGGAAGATTGTACATGGAAGG A: ACCTCATCAGATTCATGGAACG	966
FASN 3	S: GTGCGTATTATGGTCCAGTTGG A: ACATGTCATCTGGCACTTCCC	1117
FASN 3	S: CCGGAAGTGATCAGCAAAGG A: CCAAGTTGAATATCCCTGCCAC	1321
* FASN	S:AGTGTGCGCTATAGCTAAAATGATTathgcnatgga	201

* FASN	A: aarccnaarccTCCTCGATTACGAGTACACC	
--------	------------------------------------	--

Las letras S y A corresponden al cebador sentido y antisentido, respectivamente, de cada secuencia. Los asteriscos (*) indican el diseño de cebadores degenerados.

[Técnica de interferencia de ARN \(ARNi\): Síntesis de doble hebra \(dsRNA\) e inyección de insectos](#)

Técnica de interferencia de ARN (ARNi):

La interferencia de ARN (ARNi) es un mecanismo biológico ampliamente distribuido en eucariotas que consiste en el silenciamiento de genes utilizando moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc). Una de las funciones atribuidas a este mecanismo es la regulación de la expresión génica específica. A partir de este conocimiento, se desarrolló la técnica de ARNi para el estudio funcional de genes en organismos, células o tejidos específicos, introduciendo un ARNdc exógeno, homólogo al gen de interés.

En insectos, el ingreso del ARNdc a las células ocurre mediante transporte pasivo por proteínas transmembrana o por endocitosis, según las especies.

El proceso de degradación del ARNm se inicia por el clivaje del ARNdc en pequeños fragmentos de aproximadamente 20-25 nucleótidos (small interfering RNAs o siRNAs) catalizado por una nucleasa, denominada Dicer. Posteriormente, se asocia con el complejo multimérico “complejo de silenciamiento inducido por ARN” (RNA-induced silencing complex, RISC), el cual está formado por varias proteínas: una helicasa, que abre la doble hebra del siRNA, un dominio de unión a ARNdc (dsRNA binding domain, dsRBD) y proteínas de la familia Argonauta (Ago) formado por con un dominio que guía la unión del complejo al ARNm específico y un dominio catalítico, RNAasa. Una vez formado el complejo RISC cargado (RISC loading complex, RLC) constituido por Dicer-dsRBD-siRNA-Ago, la cadena sentido es destruida y la antisentido (cadena guía) permanece unida al complejo para hibridarse con el ARNm específico y mediar su degradación (Barnard y col., 2012; Paim y col., 2013).

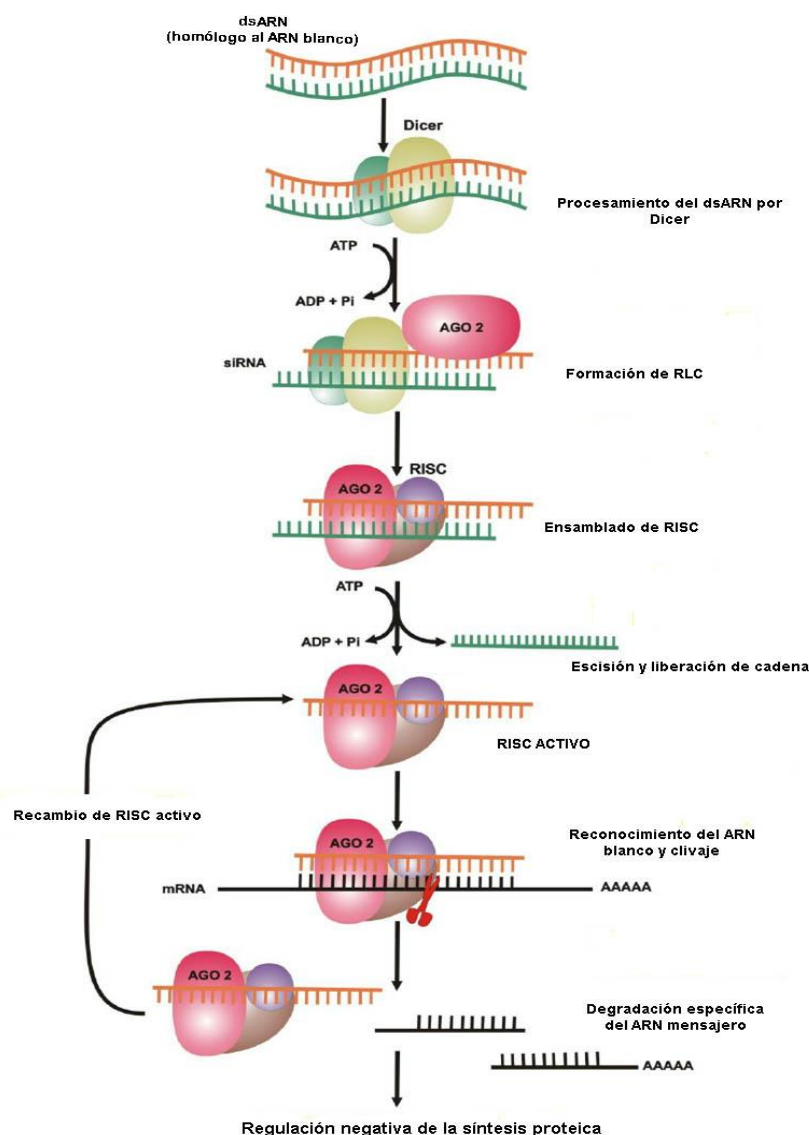


Figura 17: Esquema del mecanismo de acción de la degradación génica mediante ARNi. Modificado de Barnard y col. 2012.

La técnica ARNi ha sido utilizada para el estudio funcional de numerosos genes en diversas especies de insectos, incluyendo el orden Hemiptera y se ha descrito la robustez y persistencia temporal de los efectos del ARNi en triatominos (Paim y col., 2013).

A partir de la información génica brindada por la secuenciación del genoma de *R. prolixus*, se planteó el objetivo de iniciar el estudio funcional de los genes codificantes de FAS en este insecto, mediante el silenciamiento génico postranscripcional de los genes *RPRC000123*, *RPRC002909* y *RPRC000269* utilizando la técnica de ARNi.

Síntesis de ARNdc:

Para la obtención del ARNdc, se usó el kit comercial Megascript RNAi (Ambion, EEUU). En primer lugar, se diseñaron cebadores específicos para cada gen, que contenían la secuencia del promotor de la ARN polimerasa T7 en el extremo 5', utilizando el programa GeneRunner v. 3.1 (<http://www.generunner.net/>). Los mismos se diseñaron con el objetivo de obtener fragmentos de ARNdc de un tamaño aproximado de 400 bp, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Lista de cebadores utilizados para el silenciamiento de los genes FASN de *R. prolixus*.

Nombre	Secuencia específica + secuencia promotor T7 (TAATACGACTCACTATAGGGAGA)	Longitud del fragmento (pb)
RPRC000123	S: TAATACGACTCACTATAGGGAGA TGGGCAAGCTCA GGAACAAC A: TAATACGACTCACTATAGGGAGA AGTTCACACCAAC CATTCCACC	447
RPRC002909	S: TAATACGACTCACTATAGGGAGA GGAAGGGCGAGA TATGGTTACC A: TAATACGACTCACTATAGGGAGA AATGGCCGCATC ACAATCAC	515
RPRC000269	S: TAATACGACTCACTATAGGGAGA GTTGGCGGACTT GGTGGATTAG A: TAATACGACTCACTATAGGGAGA CGAAACCGAAGA GAAGACCACG	448

Los cebadores correspondientes a las FAS RPRC000123 y RPRC002909 fueron diseñados en el dominio KS, los correspondientes a la RPRC000269 se diseñaron en el dominio TE de la secuencia proteica.

Se amplificaron los moldes de ADN necesarios para la síntesis de los ARNdc mediante PCR, usando el kit Platinum Taq DNA Polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, USA), modificando el ciclo térmico según las recomendaciones del fabricante.

Se concentraron los productos de varias reacciones mediante precipitación con Acetato de Sodio-Etanol. Para ello, se agregó 0,1 volúmenes de Acetato de Sodio 3M, pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío a cada solución. Se mantuvieron a -80°C durante 1 hora y se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos. Finalmente, se resuspendieron los pellets en 10µl de agua DEPC para su uso posterior.

Se cuantificaron en espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo, EEUU) los productos obtenidos y se llevó a cabo la síntesis de la ARNdc según las indicaciones del fabricante. El procedimiento consiste principalmente en: la transcripción de las dos hebras de ARN a partir de los moldes de ADN obtenidos inicialmente, hibridación de las cadenas de ARN y formación de la ARNdc, digestión de los restos de ADN y ARN no hibridados mediante nucleasas, purificación del ARNdc y resuspensión en buffer apropiado. Se cuantificó nuevamente el producto obtenido y se corroboró la integridad y calidad del fragmento sintetizado mediante electroforesis en gel de agarosa 1% utilizando marcadores moleculares para confirmar el tamaño del mismo. De esta manera, se obtuvieron los ARNdc para silenciar los genes de interés (dsRPRC000123, dsRPRC002909 y dsRPRC000269).

Inyección de ARNdc en los insectos y medición de la eficiencia del silenciamiento

Li y col., (2013) evaluaron el uso de la técnica de ARNi en más de 15 estudios realizados en diversas especies de hemípteros, concluyendo que la microinyección es el método de introducción de ARNdc más eficiente para lograr la inhibición de la expresión de un gen, en comparación con otros métodos utilizados, tales como la introducción por ingestión.

En nuestro caso se realizó una inyección manual de 1µg/insecto de ARNdc específico (1-2µl de solución) en el primer segmento ventral del abdomen. Se utilizó una jeringa Hamilton de 10 µl con una aguja de calibre 33 (Hamilton Company, Reno, USA).

Se inyectaron ninfas de IV estadio de *R. prolixus*, previamente anestesiadas en hielo, a los 10 días luego de la muda, en condiciones de ayuno. (n=150 para cada tratamiento). Como control negativo, el kit comercial dispone de una solución dsControl para ser inyectada en los insectos controles.

Los insectos fueron alimentados a repleción 3 días después de la inyección, y a los 5 días posteriores a la alimentación se extrajo el ARN de los tejidos de interés (cuerpo graso e integumento). Se sintetizó ADNc y se realizó una RT-qPCR para verificar la eficiencia del silenciamiento. Se analizaron 4 réplicas biológicas independientes de 5 insectos cada una. Con el fin chequear errores de pipeteo cada réplica biológica contó con dos réplicas técnicas. El análisis estadístico del silenciamiento se realizó con el programa REST 2009 (Pfaffl y col., 2002).

Análisis bioquímicos

Extracción de lípidos totales y purificación de ácidos grasos (AG) del integumento

Se llevó a cabo la extracción de los lípidos totales del integumento abdominal de ninfas de *R. prolixus* de IV estadio con el gen codificante de FAS silenciado (dsRPRC000123) y de ninfas control (dsControl) utilizando el método de Folch (Folch y col., 1957). Para ello, los integumentos (5 réplicas biológicas, 5 insectos c/u) fueron homogeneizados en frío en 5ml de solución de Folch (cloroformo: metanol 2:1 v/v), usando homogenizadores de vidrio. Se agregó 1ml de agua miliQ, se agitaron con vortex y se guardaron a -20°C overnight. Luego se descartó la fase acuosa superior (metanol + agua) que contiene las moléculas polares no lipídicas (proteínas y glúcidos) y se filtraron y recuperaron la interfase y fase orgánica inferior (clorofórmica) que contiene los lípidos. Se obtuvieron los ácidos grasos (AG) de las muestras mediante saponificación en medio alcalino a 80°C durante 1 hora, empleando KOH 10% (v/v) en metanol. Luego se eliminaron los lípidos insaponificables con 2 lavados con hexano destilado (Carlo Erba, Italia) y se acidificaron las muestras agregando HCl p. a. concentrado (33M) con el fin de disociar la sal y liberar los AG. Para poder ser analizados mediante cromatografía gaseosa capilar (CGC) los mismos se esterificaron a ésteres metílicos (FAME) durante 90 minutos a 65°C empleando BF₃ 20% (v/v) en metanol (BF₃:2CH₃OH). Luego, se recuperaron los FAME mediante 3 lavados con hexano destilado y se conservaron a -20°C hasta su uso posterior. Todas las reacciones tuvieron lugar bajo atmósfera de N₂ para evitar la oxidación de los lípidos insaturados.

Extracción de lípidos totales y purificación de hidrocarburos (HC) del integumento

Se extrajeron los lípidos totales del integumento abdominal de ninfas de *R. prolixus* de IV estadio con el gen codificante de FAS silenciado (dsRPRC000123) y de ninfas control (dsControl) (3 réplicas biológicas para cada condición, 5 insectos c/u) mediante inmersión de los integumentos en hexano destilado (6 ml/gr de integumento) durante 48 hs a 27°C. La fracción de hidrocarburos (HC) presente en las muestras se separó de otras fracciones lipídicas mediante cromatografía de adsorción en columna utilizando una mini columna de vidrio vertical como soporte y ácido silícico como fase estacionaria, previamente activado a 150 °C durante 1 hora (25 mm x 5 mm I.D., malla de 100-200 µm). El fundamento de esta cromatografía consiste en depositar la muestra en la parte superior de la fase estacionaria, y luego se va eluyendo con una mezcla de solventes (fase móvil). Los componentes de la muestra tendrán distintas tendencias a permanecer adsorbidos en la fase estacionaria o a eluir con el solvente que fluye por la columna de acuerdo con su polaridad, por lo que serán transportados a distintas velocidades, consiguiendo su separación. Con el fin de lograr la elución de la fracción de HC se utilizaron 2 ml de hexano destilado como fase móvil. La misma fue recolectada en un

vial de vidrio de 4 ml, y posteriormente la muestra concentrada en un tubo cónico de 0,5 ml con flujo de N₂ para su análisis mediante cromatografía gaseosa capilar (CGC).

Análisis mediante cromatografía gaseosa capilar (CGC)

La cromatografía gaseosa capilar (CGC) es una técnica analítica que permite la separación de los componentes individuales de una mezcla compleja. Un cromatógrafo gaseoso está compuesto por: un puerto inyector asociado al septum, el cual permite la inyección con una jeringa y aísla el sistema del ambiente externo; una columna termostaticada situada en el interior del horno cromatográfico; y un detector sensible a los analitos que salen de la columna que registra la información en forma de un cromatograma. La muestra se inyecta al sistema cromatográfico a través del puerto inyector, donde es volatilizada y luego entra en la columna capilar dentro del horno. La columna está revestida internamente por distintos polímeros que pueden ser más o menos apolares o polares según el tipo de columna y que constituyen fase estacionaria. La muestra volatilizada es arrastrada por un gas (fase móvil) que es inerte y no interactúa con la muestra. La separación se logra por la interacción diferencial de los componentes de la mezcla con la fase estacionaria ante un aumento de la temperatura del horno, 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. Los componentes detectados se observan como picos en un gráfico donde se representa la respuesta del detector en función del tiempo de elución y la cantidad de los componentes (cromatograma).

CGC acoplada a espectrometría de masas:

La CGC acoplada a espectrometría de masas (MS) se aplica a la identificación y caracterización de compuestos. La MS más empleada es la de impacto electrónico, donde los compuestos son fragmentados e ionizados por una corriente de electrones generando un patrón de fragmentos que es específico de cada molécula. Es característico de la fragmentación de HC la formación de grupos de iones cada catorce unidades de masa, que corresponden al clivaje de las uniones carbono-carbono (CH₂-CH₂) de la cadena principal. El ion al final de la escala de masas es el ion molecular (M⁺), el cual resulta de la pérdida de un electrón de la molécula y corresponde al compuesto sin fragmentar. En el caso de los HC lineales, a presencia del M⁺ permite

una rápida identificación del HC calculando su peso molecular, sin embargo, es difícilmente detectable en los HC de cadena muy larga y en los ramificados.

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 cromatograma de masas más común es un TIC (total ion current) que es la corriente total iónica medida en el tiempo de elución de las sustancias, es lo más similar al cromatograma. Por su parte, en un cromatograma de 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, 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 y cuantificar isómeros dentro de una mezcla.

Todas las muestras se corrieron en un cromatógrafo Hewlett Packard 6890 y se utilizó un espectrómetro de masas Agilent 5975C VL.

Para la determinación de la identidad de los FAME se empleó una columna capilar OmegaWax 250 Supelco (30 m \times 0.25 mm I.D. \times 0.25 μ m de fase estacionaria), con el inyector en modo splitless a 280°C. La temperatura del horno durante la corrida fue de 50°C durante 1 min (inicial), luego incrementándose hasta 175°C a 50°C/min (rampa 1), de 175°C aumentando hasta 260°C a 3°C/min (rampa 2) y por último permaneciendo a 260°C durante 10 min. El espectrómetro de masas se operó en las siguientes condiciones: energía de ionización 70 eV; rango de masas 35-600 uma; fuente a 230°C y cuadrupolo a 150°C. El cuadrupolo (filtro de iones) es uno de los métodos más utilizados para "filtrar" los iones respecto a su relación masa/carga. Se compone de 4 barras alargadas que forman un cuadrado, conectadas eléctricamente entre sí en pares opuestos, y a las cuales se les aplica un campo eléctrico variable. Los fragmentos con carga positiva generados en la fuente de iones quedan retenidos en función de su masa. Los primeros en atravesar el cuadrupolo e impactar sobre el detector serán aquellos que presenten menor masa.

Los FAME se identificaron por comparación de resultados con espectros de masa de biblioteca comercial NIST05.

En la determinación de la identidad de los HC se utilizó una columna capilar Zebron-5HT *inferno* (30 m \times 0.25 mm I.D. \times 0.25 μ m de fase estacionaria) con helio como gas transportador a un flujo de 2ml/min. El inyector se operó en modo splitless a 300°C. El modo splitless utiliza todo el volumen de muestra para determinar pequeñas cantidades o trazas de muestra. 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.; la energía de ionización a 70 eV; línea de transferencia a 360°C; temperatura de cámara de ionización a 280°C y cuadrupolo a 150°C.

Los HC se identificaron por interpretación de sus espectros de fragmentación de masas según Juárez y col., (2001) y los índices de retención de Kovals (KI) con valores publicados anteriormente (Blomquist y col., 1987; Juárez y col., 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.

Los espectros de fragmentación de masas de los HC se interpretan analizando el patrón de fragmentación de los iones diagnósticos más abundantes de cada espectro.

Los metilalcanos se fragmentan preferencialmente a ambos lados de la ramificación, y muestran un incremento en la intensidad del ion M-15 como resultado de la ruptura al nivel de la ramificación metilo. Una característica de la fragmentación de los monometilalcanos internos, es la formación de un fragmento iónico de masa par debida a la pérdida de un átomo de hidrógeno tanto en el fragmento que porta la ramificación como en el fragmento lineal (McCarthy y col., 1968), de tal manera que en el espectro aparecen una serie de dobletes iónicos; por ejemplo, la ruptura en el lado interno de la ramificación del 13-metil-C27, generará un par de iones de masa 196 y 197 (donde el 196 es resultado de la pérdida de un hidrógeno del 197) junto al par 224 y 225. La formación del ion de masa par queda suprimida cuando en la cadena se encuentra más de una ramificación (McCarthy y col., 1968; Blomquist y col., 1987). En la figura 18 se muestran ejemplos del patrón de fragmentación de HC di-tri-tetrametilalcanos.

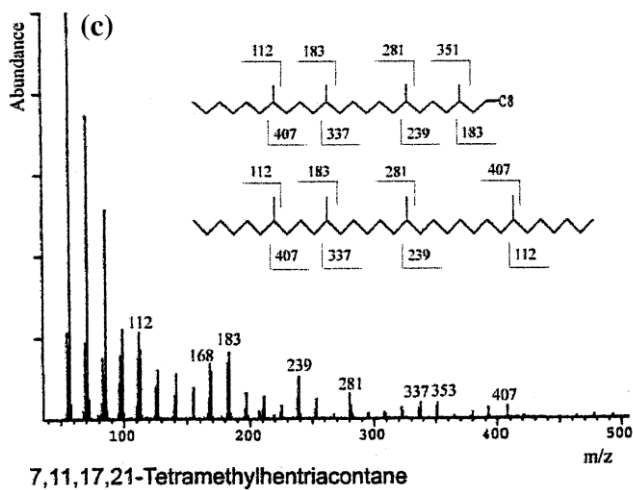
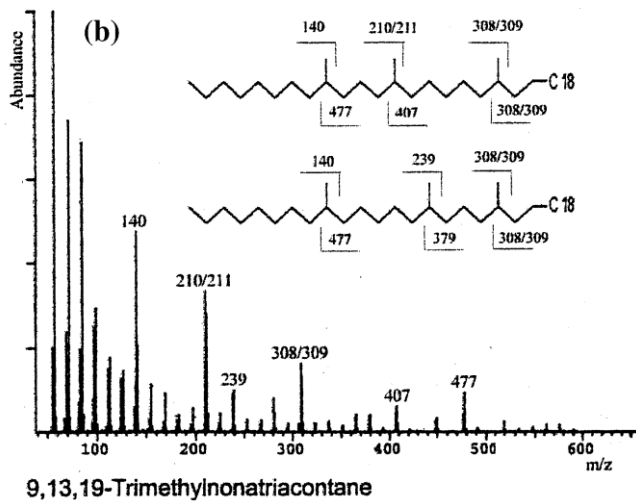
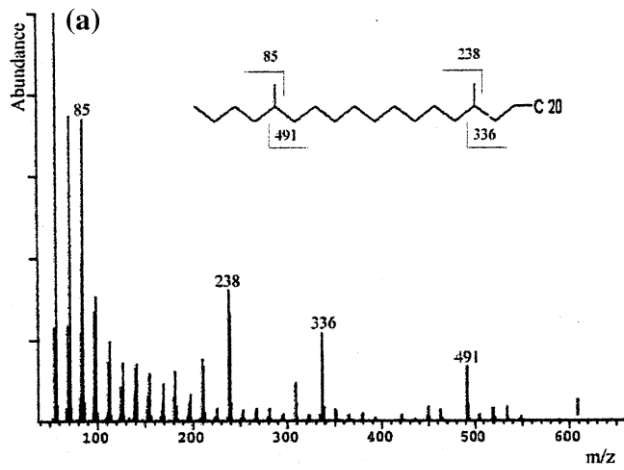


Figura 18: Espectros de masa de hidrocarburos cuticulares de *R. prolixus*. a) 5,15-dimetilheptatriacontano; b) 9,13,19-trimetilnonatriacontano; c) 7,11,17,21-tetrametilhentriacontano. Juárez y col. 2001

Una medida adicional y de gran utilidad, que provee una aproximación a la estructura del compuesto y que da una identificación tentativa del mismo es el KI o Índice de Retención (Kovats, 1965), método de cuantificación que da una medida de la cantidad de carbonos en la cadena y contribuye a determinar la identidad del compuesto en función de los tiempos de elución de diferentes compuestos. Los KIs se calculan tomando de referencia los tiempos de retención de *n*-alcanos de 10 a 44 átomos de carbono analizados en idénticas condiciones, utilizando la siguiente fórmula:

$$KI = 100 * \left[n + (N - n) \frac{\log tr'(\text{desconocido}) - \log tr'(n)}{\log tr'(N) - \log tr'(n)} \right]$$

Donde *n* es el número de carbonos del alcano más corto; *N* es el número de átomos de carbono del alcano más largo; *tr'(n)* es el tiempo de retención ajustado del alcano más corto; y *tr'(N)* el tiempo de retención ajustado del alcano más largo.

Para el cálculo del KI, se inyectaron estándares de hidrocarburos de longitud de cadena conocida en las condiciones cromatográficas de resolución de la muestra, y luego se graficó el tiempo de elución versus la longitud de cadena. De esta manera por interpolación del tiempo de elución de un hidrocarburo y número de carbonos desconocido en la ecuación obtenida a partir del gráfico, se obtuvo su valor de KI. Mediante la inyección de estándares de HC de 22 a 44 átomos de carbono corridos en las mismas condiciones cromatográficas de las muestras, se calcularon los KI de los distintos componentes, aplicando la siguiente fórmula:

$$KI = 100 * (Ca + (Cb - Ca) * ((trX - tra) / (trb - tra))) \text{ donde:}$$

Ca: número de carbonos del estándar que eluye anteriormente

Cb: número de carbonos del estándar que eluye posteriormente

trX: tiempo de retención del hidrocarburo incógnita

tra: tiempo de retención del estándar que eluye anteriormente

trb: tiempo de retención del estándar que eluye posteriormente

En el caso de los HC lineales saturados los KIs tienen valores enteros (ej: *n*C23= KI 2300, *n*C29= KI 2900, *n*C32= KI 3200). En los monometilalcanos, la presencia de una ramificación metilo en la cadena alquílica suele acortar su tiempo de retención comparado al de una cadena normal con el mismo número de carbonos (Figura 19). La posición de la ramificación determina la magnitud de la reducción, de tal manera que los isómeros con la ramificación en el centro tienen los tiempos de retención más cortos (aproximadamente 70 unidades menos), mientras que a medida que la ramificación se

ubica cerca del extremo de la cadena, el valor de KI se aproxima al del correspondiente *n*-alcano con el mismo número de carbonos. En los dimetilalcanos, la presencia de una ramificación metilo extra, aproximadamente duplica el efecto sobre el tiempo de retención por lo que el KI es entre 90 a 160 unidades menor que el correspondiente al *n*-alcano con el mismo número de carbonos; el menor desplazamiento del KI se obtiene cuando una de las ramificaciones se encuentra en posición terminal o subterminal de la cadena. Del mismo modo, en los trimetil y tetrametilalcanos la presencia de ramificaciones adicionales, triplica y cuadruplica respectivamente el efecto sobre el tiempo de retención y el KI disminuye 160 a 220 unidades para los trimetilalcanos y 240 a 290 unidades para los tetrametilalcanos, respecto a un *n*-alcano de la misma cantidad de carbonos (Figura 19) (Blomquist y col., 1987;Lockey, 1988; Carlson y col., 1998). Estas desviaciones dependen a su vez de la longitud de cadena de la porción lineal. En diversas oportunidades y aún en el caso de una buena resolución cromatográfica, el valor de KI de un pico no permite asociarlo de manera unívoca a un hidrocarburo, ya que en ese pico pueden coeluir varios compuestos simultáneamente. Por ejemplo, a partir de la figura 19 se puede apreciar que los monometilalcanos 11-, 13- y 15-Me-C33 coeluyen al igual que los dimetilalcanos 5,11- y 5,9-diMe-C33, y los trimetilalcanos 13,17,21- y 11,15,19-triMe-C33. Más aún, en un mismo pico pueden coeluir mono y dimetilalcanos (4-Me-C33 junto a 15,19-, 13,17- y 11,15-diMe-C33) o dimetil y trimetilalcanos (5,11- y 5,9-diMe-C33 junto a 13,17,21-, 11,15,19- y 9,13,17-triMe-C33) (Carlson y col., 1998).

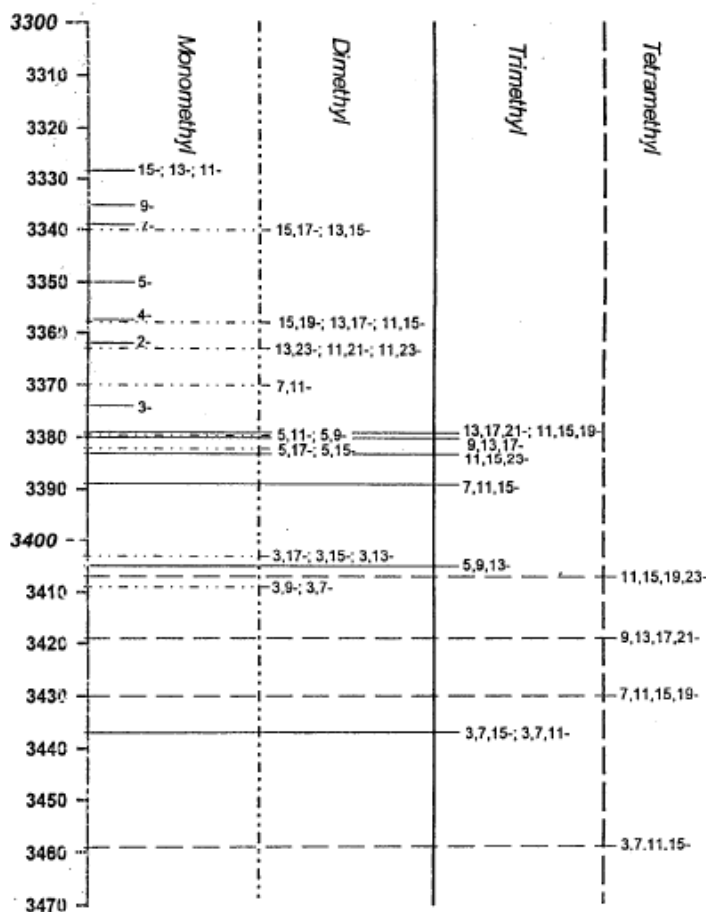


Figura 19: Valores de Índices de Kovats calculados para un hidrocarburo con una a cuatro ramificaciones metilo insertadas en una cadena lineal de 33 átomos de carbono. Modificada de Carlson y col. 1998.

CGC acoplada a un detector de ionización de llama

En el detector de ionización de llama (FID) los analitos que llegan al detector son quemados e ionizados por una llama de hidrógeno y aire y convertidos en una señal eléctrica que luego de ser amplificada, genera el cromatograma. Este tipo de detector se empleó para la cuantificación de los AG e HC en las muestras silenciadas y control. 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 y FAME, 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) (Sigma-Aldich, San Luis, USA) para la cuantificación de HC y ácido 11-icosenoico (20:1 Δ^{11}) (Nu Check Prep, USA) para los FAME. Para ello, se agregó al extracto crudo de cada muestra el estándar correspondiente con jeringa Hamilton EL: 50 μ l de C₂₂ (208 ng) y 300 μ l de 20:1 Δ^{11} (11,25 μ g). 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 la CGC acoplada a MS, y el FID se mantuvo a una temperatura de 320 °C. La masa de cada uno de los picos fue calculada, y referida a su correspondiente estándar interno. Los resultados se expresaron en ng de HC/integumento y μ g de FAME/integumento. 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 o FAME según corresponda.

Bioensayos de tolerancia a diferentes condiciones de humedad relativa (H.R.)

Ejemplares de IV estadio ninfal de *R. prolixus* silenciados con dsRPRC000123 (3 grupos de 15 insectos cada uno) se colocaron en una cámara húmeda (a 96% de H.R y 27°C de temperatura) 3 días antes de mudar a V estadio. Como controles, se utilizaron insectos inyectados con dsControl como así también insectos sin inyectar. El ensayo se realizó por triplicado en cada uno de los casos. Se registró la mortalidad de los insectos silenciados y control a partir del momento de muda a V estadio durante las siguientes 48 hs en dichas condiciones.

Transcurrido ese período de tiempo, se colocaron todos los insectos inyectados con dsControl y los silenciados con dsRPRC000123 que permanecieron vivos en las condiciones estándares del insectario (50 % H.R, 28 °C) y se registró la mortalidad de los mismos durante las siguientes 50hs.

Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico del contenido de HC y AG del integumento de los insectos silenciados respecto de los controles, así como los valores NRQ correspondientes a la

expresión de los genes de interés se utilizó una prueba de Student a una cola entre muestras independientes o ANOVA de un factor seguido de prueba de comparación múltiple de Tukey, según corresponda. Los cálculos fueron realizados con el programa GraphPad Prism versión 5.01.

Para el análisis estadístico de los datos de RT- qPCR entre tratamientos y controles se utilizó el programa REST 2009 (Qiagen, Alemania), que evalúa las diferencias entre los valores de expresión relativa. Dichos gráficos fueron editados con el programa Sigmaplot versión 12.

Para los análisis de supervivencia se utilizó el test de Kaplan Meier que es una técnica inferencial que modeliza el tiempo de ocurrencia de un determinado suceso. Este método calcula para cada tiempo el número de eventos terminales (muerte de los individuos) esperados y realmente observados, asumiendo que no hay diferencias entre grupos. Se obtiene un valor final que puede compararse mediante una distribución chi cuadrado (χ^2) y se utiliza la prueba de rango logarítmico (log-rank) que demuestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas mediante un valor de P.

Capítulo 1: Análisis del transcriptoma de integumento de *Triatoma infestans*

Resultados

Mediante microscopía óptica se observó la morfología de los oenocitos ubicados en el integumento dorsal de ninfas de NIV de *T. infestans* a los días 4, 6 y 8 posteriores a la alimentación (PA) registrando el perímetro y área de los mismos en los tres días medidos.

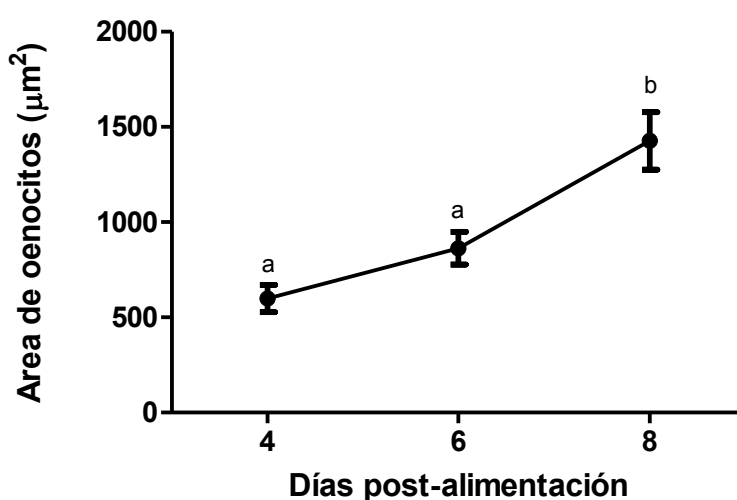


Figura 20: Análisis de la variación del área de los oenocitos en ninfas IV estadio de *T. infestans* 4, 6 y 8 días posteriores a la alimentación (PA). El área está expresada en μm^2 . Cada punto representa la media \pm SEM. Las letras a y b indican diferencias significativas $P < 0,05$ entre los días 4, 6 y 8 (Prueba ANOVA de un factor, seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey, $n=9$ para cada día).

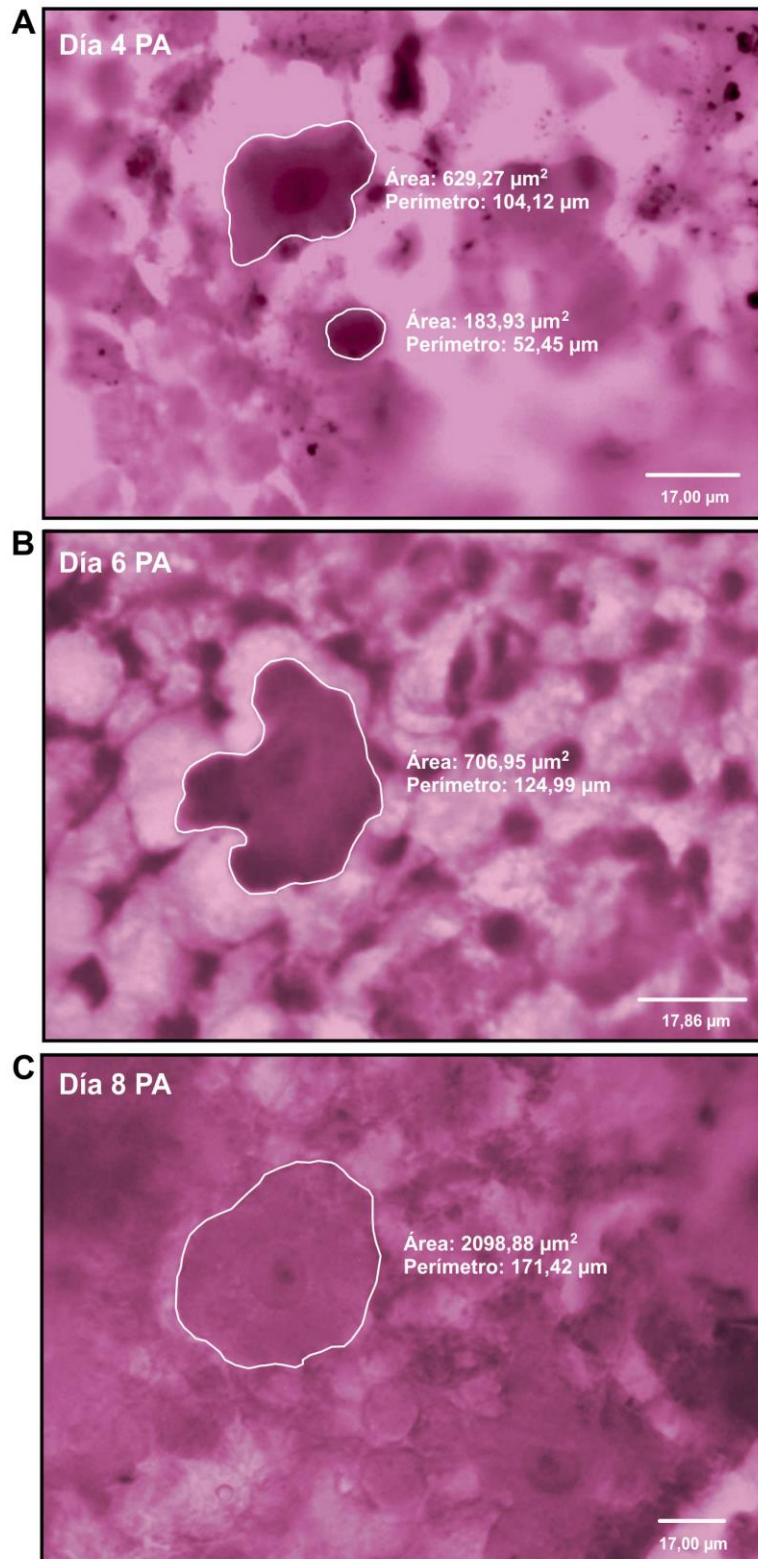


Figura 21: Fotomicrografías de la superficie dorsal de la epidermis de *T. infestans*. Las imágenes obtenidas mediante microscopía óptica muestran la superficie dorsal de integumentos de ninfas IV estadio de *T. infestans*. Superficie dorsal del integumento disectado al día 4 PA (A); al día 6 PA (B) y al día 8 PA (C). La superficie de los oenocitos fue resaltada con las líneas blancas y el Área (μm^2) y el perímetro (μm) fueron medidos con el programa TSVIEW. Barra — = escala. Tinción HE. Aumento 40X. (n=9).

Los resultados muestran que el área de los oenocitos aumenta notoriamente conforme transcurre el período analizado (Figura 20 y 21). Estas células son ovoides y de un área entre 600 y 800 μm^2 a los 4 y 6 días PA, incrementando la misma de una manera estadísticamente significativa hacia el día 8 PA, llegando a cerca de 1500 μm^2 .

Genes del metabolismo lipídico: abundancia relativa y estudio de la expresión génica relativa en colonias susceptibles y resistentes de *Triatoma infestans*. (FASNs, ELOVLs, FAR, CYP4Gs)

A partir de los transcriptos del integumento de *T. infestans* disponibles en el laboratorio con anterioridad al inicio de la tesis, se identificaron 270 secuencias asociadas al metabolismo lipídico del integumento de *T. infestans* de los cuales 90 se vincularon con la biosíntesis de lípidos. En relación al metabolismo de ácidos grasos (AG) las ácido graso sintasas (FASs) representaron un 5%, las acil-CoA elongasas (ELOVLs) comprendieron un 5%, las ácido graso desaturasas (FAD) integraron un 2% y las acil-CoA reductasas (FAR) constituyeron un 6%. Otros transcriptos de dicho metabolismo (CYP4G, acetil-CoA carboxilasa, acetil-CoA acetiltransferasa, malonil-CoA descarboxilasa y otras) conformaron un 15%.

Las enzimas involucradas en el metabolismo de fosfolípidos, glicerolípidos y esfingolípidos representaron un 28%. En tanto, transcriptos relacionados con el transporte de lípidos comprendieron un 28%. Dichos transcriptos codifican para proteínas implicadas en el transporte de cadenas largas de AG, lipoproteínas y receptores de lipoproteínas de baja densidad, receptor de lipoforina y apolipoproteínas. Un 11% de los transcriptos codificaron para otras enzimas involucradas en la formación de lípidos e hidrólisis, tales como palmitoil transferasas, proteínas de unión a gotas lipídicas de superficie, enzimas peroxisomales multifuncionales, lipasas y fosfolipasas. En menores proporciones se identificaron transcriptos relacionados con reacciones de óxido reducción de lípidos, metabolismo de prostaglandinas y otras enzimas (Figura 22).

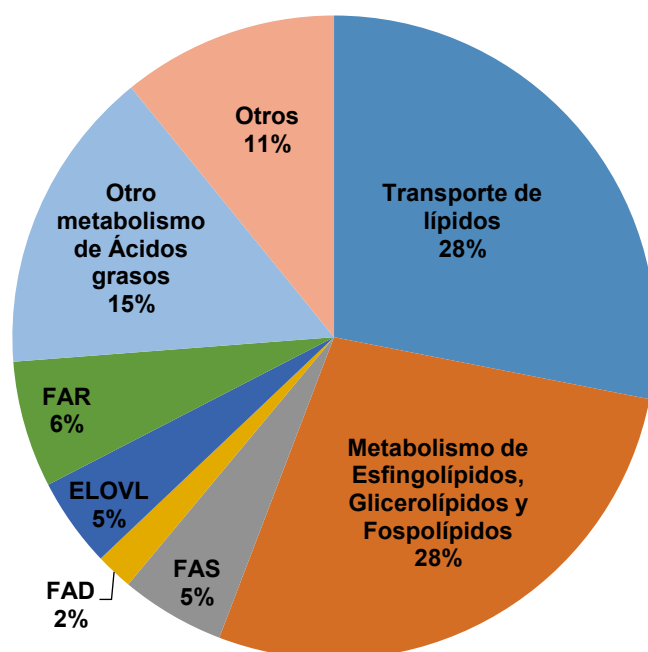


Figura 22: Clasificación y abundancia relativa de los transcritos putativos del integumento de *T. infestans* involucrados en el metabolismo y transporte lipídico. Las siglas FAS, FAD, ELOVL, FAR corresponden a las enzimas ácido graso sintasas, ácido graso desaturasas, acil-CoA elongasas y acil-CoA reductasas, respectivamente. Modificado de Calderon y col, 2017.

EL análisis filogenético de los genes ELOVLs mostró que dos de ellos (*JAR97901* y *JAS01868*) se agruparon en un clado que incluye los genes ELOVL 1 y 7 de humanos. Otro grupo bien soportado fue el clado ELOVL 2/4/5 que incluye el gen *KY574520* de *T. infestans* (ortólogo del gen ELOVL4 de mamíferos) y los genes humanos ELOVL 2, ELOVL 4 y ELOVL 5. El clado ELOVL3/6 incluye el gen *JAS01870* de *T. infestans* y se agrupó junto con los genes humanos ELOVL3 y ELOVL6. Se clasificaron cinco secuencias ELOVL (*JAR97902*, *JAR97899*, *JAR97898*, *JAR97900* y *JAS01869*) en tres clados putativos específicos de insectos (Figura 23).

Se detalla a continuación el árbol filogenético de nueve genes ELOVL encontrados en el integumento de *T. infestans*.

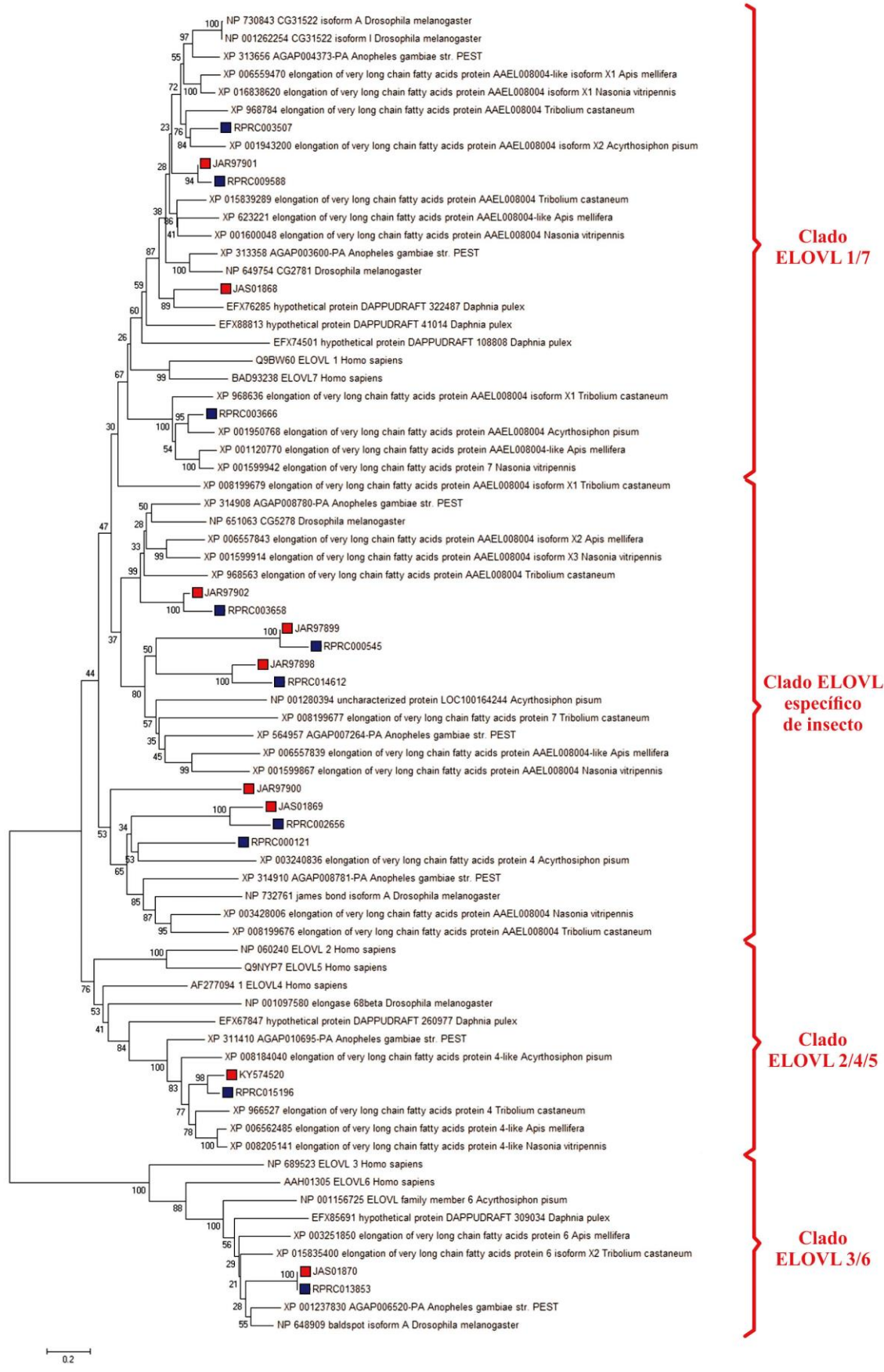


Figura 23: Análisis filogenético de los genes ELOVL de *T. infestans*. Los códigos de secuencia corresponden a números de acceso en GenBank y VectorBase (R).

prolixus). El cladograma se construyó utilizando el método de Máxima Verosimilitud con 1000 repeticiones de Bootstrap. Los números en los nodos indican el soporte de Bootstrap (%). Las secuencias de *T. infestans* (identificados con el número de acceso de GenBank) se resaltan en cuadrados rojos mientras que los genes ortólogos de *R. prolixus* se resaltan con cuadrados azules. Las secuencias ELOVL de *Daphnia pulex* y *Homo sapiens* se utilizaron como grupos externos. Modificado de Calderón-Fernández y col, 2017.

Con el fin de evaluar la posible participación de los genes involucrados en la biosíntesis de hidrocarburos (FASN, ELOVLs, FARs y CYP4Gs) en la resistencia a insecticidas piretroides se midió por RT- qPCR la expresión génica relativa de los mismos en ninfas de IV estadio ninfal de *T. infestans* entre muestras R y S a deltametrina.

El análisis de la expresión génica relativa de las ESTs correspondientes a los transcritos de FAS *JAS01714*, (*FASN1*) *JAR97775* (*FASN2*) y *JAR97772* (*FASN3*) no mostró diferencias significativas en las muestras R en comparación con las muestras S (Figura 24A).

El análisis de expresión génica de los genes ELOVL mostró que el gen *JAS01868* del clado ELOVL 1/7 de humanos, el gen *JAR97899* del clado específico de insectos y el gen *JAS01870*, ortólogo del ELOVL6 de humano, se sobreexpresaron entre 1,5 y 1,8 veces en las muestras R en comparación con muestras S (Figura 24B).

Con respecto a los genes FAR se detectó una subexpresión significativa en los transcritos *JAR97762*, *JAR97764*, *JAR97758*, *JAR97766* y *JAS01704* en insectos R en comparación con insectos S (Figura 24C).

De los dos genes CYP4G presentes en *T. infestans* el transcrito *JAS02890* se sobreexpresó 1,5 veces en insectos R en comparación con especímenes S (Figura 24D).

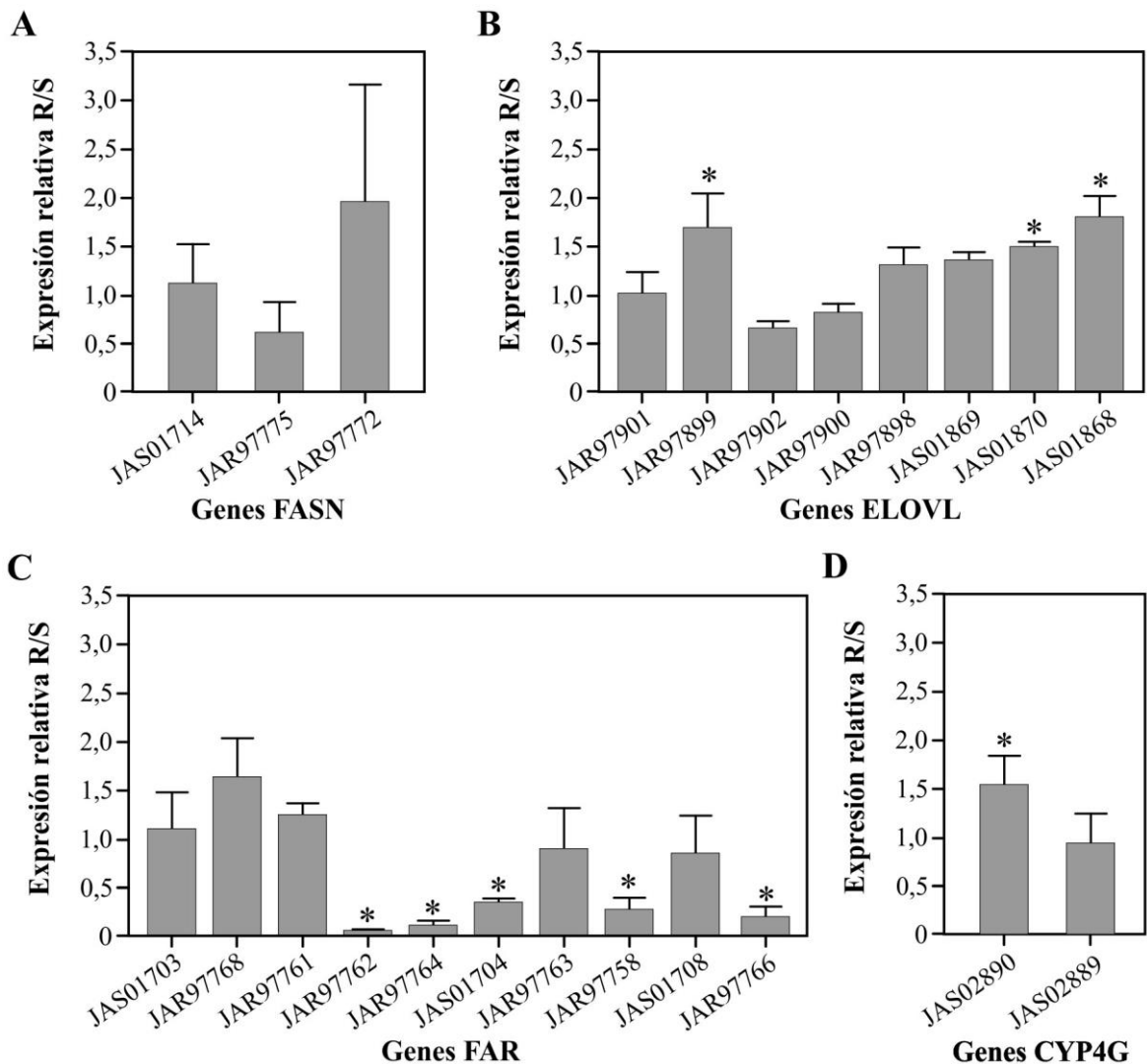


Figura 24: Análisis de la expresión diferencial de los genes involucrados en la biosíntesis de hidrocarburos del integumento en ejemplares de *T. infestans* resistentes y susceptibles a piretroides. Se midió la expresión génica relativa por RT-qPCR de los transcritos FASN (A), ELOVL (B), FAR (C) y CYP4G (D) del integumento de ninfas de *T. infestans*. Los nombres de los genes se corresponden con los códigos asignados en la base de datos de GenBank. Los genes β -actina y 18S fueron utilizados como genes de referencia. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias de 3 réplicas biológicas. El asterisco * indica las diferencias significativas ($P < 0,05$) entre insectos resistentes (R) y susceptibles (S) a deltametrina. Las siglas FASN, ELOVL, FAR y CYP4G corresponden a las enzimas ácido graso sintasas, acil-CoA elongasas, acil-CoA reductasas y citocromo P450 de la familia 4G, respectivamente. Modificado de Calderón-Fernández y col., 2017.

Genes de resistencia metabólica: abundancia relativa y estudio de la expresión génica relativa en colonias susceptibles y resistentes de *Triatoma infestans*. (CYP clan 3, CCE)

A partir de las ESTs obtenidas de la secuenciación del transcriptoma del integumento de *T. infestans* se anotaron 6 genes GST, 14 genes CCE, 46 genes CYP (Calderón-

Fernández y col., 2017).

El análisis de abundancia relativa de los transcritos relacionados con los mecanismos de detoxificación realizado en este trabajo de tesis mostró que el 3% de los transcritos codifican para las glutatión peroxidadas, el 5% para las CCE, 7% para las GST, el 36% de los transcritos codifican para otras enzimas tales como peroxidadas, superóxido dismutasas, oxidadas, etc. y el 46 % de los transcritos para las CYP. Dentro del grupo de las CYP, 29% de los transcritos perteneció al clan 3, 11% formó parte del clan 4, 4% constituyó el clan mitocondrial y 2% se asoció al clan 2 (Figura 25).

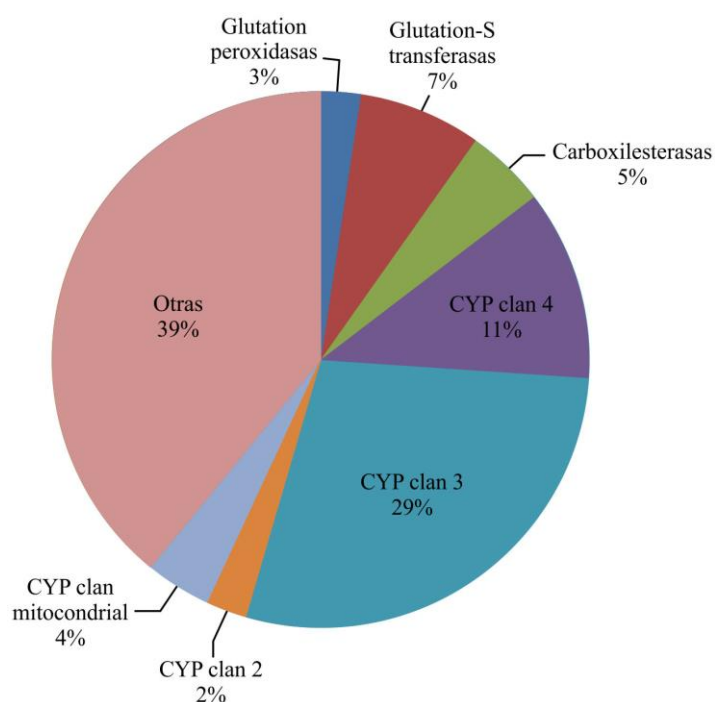


Figura 25: Clasificación y abundancia relativa de los transcritos putativos del integumento de *T. infestans* involucrados en la detoxificación. La sigla CYP corresponde a las enzimas citocromo P450. Modificado de Calderon- Fernández y col., 2017.

La anotación de los genes CYP y CCE del transcriptoma mostró que 18 transcritos CYP clan 3 y 9 transcritos CCE estaban relacionados con la resistencia a insecticidas. Con el fin de corroborar si estos genes pueden estar involucrados en la resistencia a insecticidas piretroides se estudió la expresión génica relativa entre especímenes R y S a deltametrina en ninfas de IV estadio de *T. infestans*.

El análisis de la expresión de los 18 transcritos CYP del clan 3 mostró que *JAS02907*, *JAR98720*, *JAS02911* y *JAR98721* se sobreexpresaron (~ 1.7 a 3.8 veces) en insectos R en comparación con especímenes S (Figura 26A), mientras que, de nueve genes CCE medidos relacionados con la resistencia a insecticidas solo *JAR95537* presentó una

sobreexpresión en un valor de 2,75 veces en los insectos R en comparación con insectos S (Figura 26B).

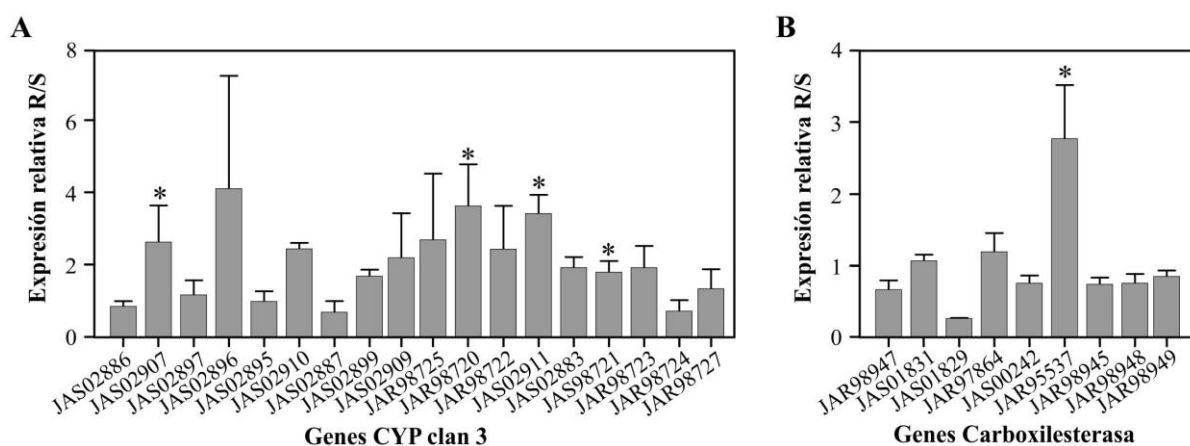


Figura 26: Análisis de la expresión diferencial de los genes potencialmente involucrados en la detoxificación y resistencia metabólica del integumento de ejemplares de *T. infestans* resistentes y susceptibles a piretroides. Se midió por RT-qPCR la génica relativa de los transcritos CYP clan 3 (A) y Carboxilesterasas (CCE) (B) del integumento de ninfas de *T. infestans*. Los nombres de los genes se corresponden con los códigos asignados en la base de datos de GenBank. Los genes β -actina y 18S fueron utilizados como genes de referencia. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias de 3 réplicas biológicas. El asterisco * indica las diferencias significativas ($P < 0,05$) entre insectos resistentes (R) y susceptibles (S) a deltametrina. La sigla CYP corresponde a la enzima citocromo P450. Modificado de Calderón- Fernández y col., 2017.

Discusión

Los estudios descriptivos sobre la morfología y distribución anatómica de los oenocitos de insectos se remontan a más de 150 años. Numerosos análisis de microscopía de luz transmitida y microscopía electrónica indican que la morfología de los oenocitos es característica de una célula secretora especializada. Wigglesworth, (1933) fue pionero en los estudios morfológicos y funcionales descriptos en el integumento de *R. prolixus*. Estas células presentan un citoplasma eosinófilo uniforme, finamente vacuolado que miden hasta 100 μ m de diámetro. Estudios ultraestructurales de oenocitos en *Calpodes ethlius* y *Gryllus bimaculatus* describen un citoplasma que presenta un retículo endoplasmático liso densamente empaquetado, gran cantidad de mitocondrias, una membrana plasmática invaginada, un aparato de Golgi con microvesículas y vacuolas autofágicas. Además, observaciones de preparados de oenocitos examinados con tinciones de Sudán confirman la acumulación de lípidos confinados en cuerpos cilíndricos (Locke, 1969; Romer, 1974). Estudios genético-moleculares en *Drosophila*

melanogaster y *Tribolium castaneum* soportan un origen ectodérmico controlado por los genes Hox (Gould y col., 2001; Makki y col., 2014).

Los oenocitos son células poliploides que varían en tamaño, número, forma y localización anatómica entre las especies de insectos, así como a lo largo del ciclo de vida (Gould y col., 2001; Martins y Ramalho-Ortigão, 2012). En estadios larvales, son células grandes con tamaños que oscilan en promedio entre 60-150µm, en comparación con los oenocitos de insectos adultos. Por ejemplo, oenocitos de adultos del género *Culex* miden aproximadamente 15µm (Rössig, 1904). Se ha reportado que la localización de los oenocitos depende de las especies y el estado de desarrollo de los insectos (Martins and Ramalho-Ortigão, 2012). Se encuentran asociados a la epidermis en adultos de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) (Ruvolo Y Cruz-Landim, 1993), ninfas y adultos de *R. prolixus* y *T. infestans* (Wigglesworth, 1933; Juárez y Calderón-Fernández, 2007) y adultos de *B. germanica* (Blattaria: Blattellidae) (Fan y col., 2003). En otros casos, se localizan entre las células del cuerpo graso abdominal organizadas individualmente y/o en grupos (clusters), como sucede en larvas, pupas y adultos de mosquito del género *Aedes*, *Culex* y *Anopheles* (Diptera: Culicidae) (Martins y col., 2011a) *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) (Diehl, 1973), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (Roth, 1942), entre otros.

La observación microscópica de los oenocitos de *R. prolixus* y *T. infestans* confirma las observaciones previas de Wigglesworth, (1933). Estas células se distribuyen de manera similar en los tergitos y esternitos del abdomen en todos los estadios del ciclo de vida. Se observó que espacialmente tienden a concentrarse en el límite entre un tergito o esternito y el siguiente, y hacia ambos laterales, entre las membranas intersegmentales. Estas células sufren cambios durante el proceso de muda. Al pasar a un nuevo estadio se observan dos tipos de oenocitos: una población solitaria y poco lobulada con la cromatina densamente concentrada en el centro del núcleo y una nueva generación de oenocitos pequeña y redondeada con la cromatina distribuida alrededor de la membrana nuclear. De acuerdo con Wigglesworth, (1933) los oenocitos de ninfas de *R. prolixus* crecen rápidamente luego de la alimentación, alcanzando un gran tamaño hacia el día 8 o 9, presentando lobulaciones que se proyectan hacia la periferia. Dicho tamaño podría corresponder con el medido a los 8 días luego de la alimentación en *T. infestans* (Figura 21).

Entre las numerosas funciones propuestas para estas células, se ha demostrado su rol en el metabolismo y transporte lipídico. Los oenocitos expresan enzimas involucradas en la biosíntesis y catabolismo lipídico, acetil CoA carboxilasa, FAS, desaturasas,

ELOVL, CYP monooxigenasas, y enzimas de β -oxidación, y proteínas tales como receptores de lipoforinas, entre otras. Fotomicrografías demostraron que estas células acumulan gotas lipídicas en el citoplasma durante el ayuno producto de la lipólisis y movilización de triglicéridos desde el cuerpo graso en *D. melanogaster* (Gutierrez y col., 2007; Makki y col., 2014; Cinnamon y col., 2016). Estos autores propusieron que los oenocitos de insectos y los hepatocitos de mamíferos cumplirían funciones análogas en el metabolismo de los lípidos.

Los oenocitos están involucrados en la síntesis de los ácidos grasos, hidrocarburos, ceras y alcoholes grasos cuticulares (Fan y col., 2003; Juárez y Calderón-Fernández, 2007). Se ha demostrado su participación en la biosíntesis de CHC insaturados que funcionan como feromonas sexuales en *D. melanogaster*. El silenciamiento del gen *desatF*, expresado en oenocitos de hembras de *D. melanogaster*, sugiere que la expresión de este gen juega un rol esencial en el contenido de dienos (Wicker-Thomas y col., 2009). En esta especie la estimulación o inhibición del cortejo depende en gran medida de la presencia de CHC insaturados. La introducción de los dobles enlaces está catalizada por la acción de desaturasas específicas. Una mutación en el gen *desatI* redujo tanto la producción como el patrón diferencial de feromonas sexuales entre machos y hembras (Marcillac y col., 2005).

El análisis del transcriptoma de *Ae. aegypti* también sugirió que los oenocitos cumplirían un potencial rol en el metabolismo lipídico, respuesta inmune innata y detoxificación en mosquitos. Los transcriptos que codifican para las CYP monooxigenasas se encuentran altamente representadas en los oenocitos de *Ae. aegypti* (Martins y col., 2011b). Las CYP monooxigenasas involucradas en la resistencia metabólica requieren para su funcionamiento de la enzima NADPH citocromo P450 reductasa (CPR). El silenciamiento del gen que codifica para CPR en *Anopheles gambiae* redujo drásticamente su expresión en oenocitos asociada a una penetración aumentada de insecticidas (Lycett y col., 2006).

Análisis del transcriptoma de integumento de *Triatoma infestans*

La disponibilidad de los métodos de secuenciación masiva (Roche 454, Solexa, PacBio etc.) ha permitido la obtención rápida y a gran escala de datos genómicos y transcriptómicos en las distintas especies de insectos (Vera y col., 2008). Los mismos han sido aplicados como herramienta para la secuenciación, ensamblado y anotación de genes expresados en una inmensa variedad de especies de artrópodos no modelo,

tales como *Dermacentor variabilis* (Jaworski y col., 2010); *Cimex lectularius* (Bai y col., 2011); *Anopheles funestus* (Gregory y col., 2011); *Myzus persicae* (Silva y col., 2012); *Anastrepha suspensa* (Nirmala y col., 2013); *Lutzomyia intermedia* (Nirmala y col., 2013); *Corethrella appendiculata* (Ribeiro y col., 2014) y *B. germanica* (Zhou y col., 2014).

Sin embargo, existen escasas evidencias moleculares asociadas a la secuenciación y análisis de transcriptomas de integumento en insectos. El estudio comparativo del transcriptoma de integumento de *Bombyx mori* mostró una expresión diferencial de genes que podrían contribuir al melanismo en cepas mutantes en comparación con el fenotipo salvaje, incluyendo ciertos genes que codifican proteínas cuticulares (Wu y col., 2016).

El primer análisis de transcriptoma de integumento en triatominos ha sido el de *T. infestans*, el cual ha revelado una diversidad de genes involucrados en diversos procesos biológicos (Figura 27) (Calderón-Fernández y col., 2017).

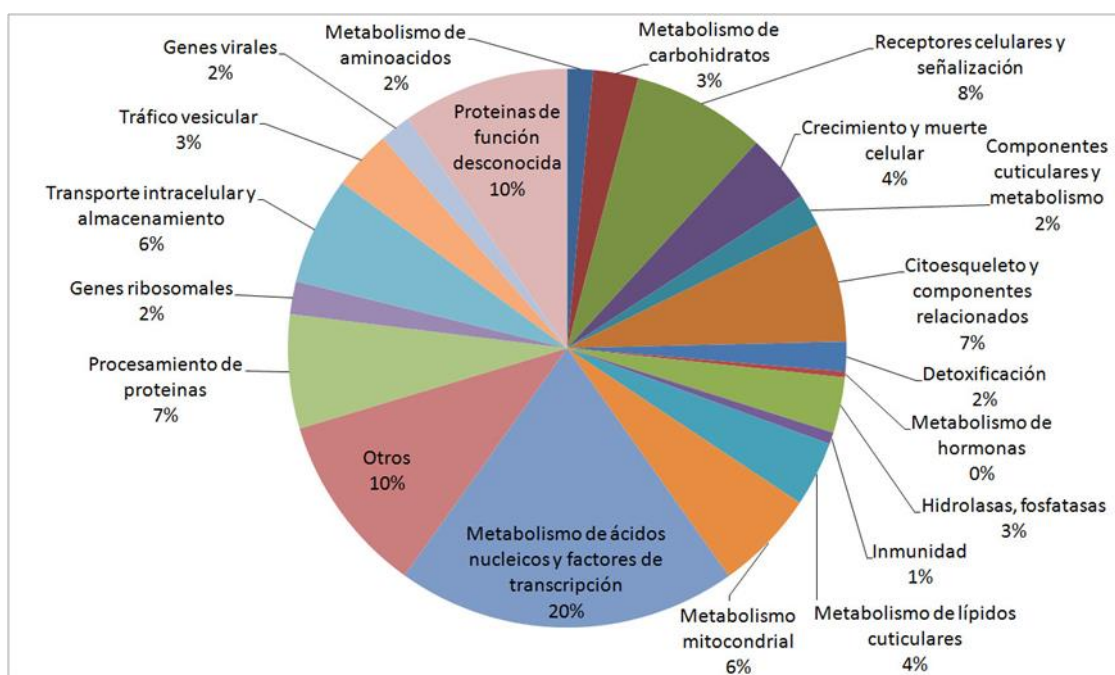


Figura 27: Clasificación preliminar de los transcritos del integumento de *T. infestans* y su abundancia relativa. Las proteínas funcionales putativas se asignaron de acuerdo a la homología de secuencia con genes conocidos disponibles en las bases de datos de GenBank y Vectorbase. Modificado de Calderón- Fernández y col., 2017

El análisis de abundancia relativa de los transcritos del integumento de *T. infestans* mostró que el 35% de los genes identificados codifican enzimas relacionadas con: genes ribosomales, metabolismo de los ácidos nucleicos y factores de transcripción, respuesta

inmune, receptores de membrana y mecanismos de señalización celular, metabolismo energético y de carbohidratos, crecimiento y muerte celular. En relación a los cuatro últimos procesos, estudios moleculares han demostrado que los oenocitos de *D. melanogaster* juegan un rol esencial en la regulación de crecimiento, desarrollo y comportamiento alimenticio de las larvas y pupas. Fotomicrografías de los mismos han sugerido que los oenocitos de *D. melanogaster* acumulan gotas lipídicas transportadas desde el cuerpo graso durante el ayuno (Gutierrez y col., 2007).

La expresión de genes del integumento de *T. infestans* relacionados con el sistema de transporte (proteínas de transporte de AG, LDLp, receptores de LDLp y apolipoproteínas) (Calderón-Fernández y col., 2017) probablemente esté relacionado con el transporte de metabolitos vía hemolinfa entre dicho tejido y el cuerpo graso. El análisis del transcriptoma de oenocitos de *Ae. aegypti* (Martins et al., 2011b) mostró resultados similares. El 18% del total de los transcritos codifican genes ribosomales, el 8% proteínas involucradas en el metabolismo nuclear, el 9% asociado al procesamiento y degradación de proteínas, el 4% proteínas comprometidas con el metabolismo energético, el 4,7% proteínas de señalización celular, el 2,1% proteínas que participan en el sistema de transporte y el 1,9% proteínas que participan en mecanismos de respuesta inmune innata (Martins y col., 2011b).

El 2% de los genes del integumento de *T. infestans* codifican enzimas involucradas en la detoxificación celular (Calderón-Fernández y col., 2017). En *Ae. aegypti* el 8% codifican para distintas superfamilias de proteínas CYPs, el 4,2 % para otras proteínas que intervienen en detoxificación (Martins y col., 2011b). En *C. lectularius*, se ha demostrado que muchos genes expresados en el integumento están relacionados con los diferentes mecanismos de resistencia a insecticidas piretroides (Zhu y col., 2013). Nuestros resultados muestran que del total de los transcritos relacionados con dichos mecanismos (CYPs, esterasas y glutatión transferasas) el 41% pertenecen a CYPs implicadas en la detoxificación de insecticidas (Figura 25). Estas evidencias sugieren la participación del integumento de *T. infestans* en la resistencia metabólica a insecticidas asociado a la superficie del insecto (Calderón-Fernández y col., 2017), como se detallará más adelante.

El 4% de los genes identificados en el transcriptoma de *T. infestans* se relaciona con el metabolismo lipídico de la cutícula (Calderón-Fernández y col., 2017). Evidencias bioquímicas previas demostraron que los ácidos grasos cuticulares e hidrocarburos son sintetizados en el integumento de *T. infestans* (Juárez y Brenner, 1989). En el

transcriptoma de oenocitos de *Ae. aegypti* el 8% de los genes codifican para enzimas del metabolismo lipídico, tales como FAS y ELOVL, entre otras (Martins y col., 2011b). En *D. melanogaster*, estudios moleculares demostraron que los oenocitos juegan un rol esencial en genes relacionados con el metabolismo lipídico (Gutierrez y col., 2007). El silenciamiento de los genes *CG11198*, *CG6660* y *CG17374* que codifican para las enzimas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos (acetil-CoA carboxilasa, ELOVL y FAS, respectivamente) en oenocitos de *D. melanogaster* sugiere que los oenocitos participan en la síntesis de VLCFA (Parvy y col., 2012). El análisis del transcriptoma de integumento de *Apis mellifera*, *Frieseomelitta varia* y *Centris analis* mostró la expresión de genes que codifican desaturasas y elongasas potencialmente involucradas en la biosíntesis de CHC (Falcon y col., 2019). Nuestros resultados mostraron que el 60 % de los genes asociados al metabolismo lipídico del integumento estuvieron asociados a la biosíntesis de lípidos (FAS, ELOVL, FAR, FAD, acetil Co-A carboxilasa, etc) (Figura 22). Estas evidencias sugieren el importante papel que juega el integumento de los insectos en la biosíntesis de los componentes lipídicos cuticulares.

El análisis del transcriptoma del integumento de *T. infestans* mostró la expresión de genes relacionados con proteínas del citoesqueleto, tráfico vesicular, transporte intracelular y almacenamiento (Calderón-Fernández y col., 2017). El 1,9% de los genes identificados en el transcriptoma de oenocitos de *Ae. aegypti* (Martins y col., 2011b) codifican proteínas involucradas en el tráfico vesicular. Estas evidencias sugieren que los oenocitos serían células competentes para vehicular intracelularmente los lípidos y facilitar mecanismos que permitan su transporte a cutícula.

Además, se identificaron genes relacionados con el metabolismo de los componentes estructurales de la cutícula, incluyendo procesos de esclerotización (Calderón-Fernández y col., 2017). El análisis comparativo del transcriptoma de integumento entre el fenotipo *Bombyx mori* salvaje y mutante reveló la expresión de genes relacionados con la formación del exoesqueleto, tales como los que codifican para proteínas cuticulares, trehalasa y los asociados a la síntesis de quitina (Tan y col., 2018). Recientemente, la combinación de metodologías RNA-seq, cuantificación de CHC mediante (CGC-MS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) aplicadas al integumento de tres especies de abejas (*Apis mellifera*, *Frieseomelitta varia* y *Centris analis*) demostró que este tejido expresa genes involucrados en la vía de melanización / esclerotización de la cutícula, genes que codifican proteínas cuticulares estructurales, reguladores del recambio y oscurecimiento de la cutícula, y genes que codifican distintos pigmentos de la melanina (Falcon y col., 2019).

El estudio de la expresión de los genes de oenocitos ha sido escasamente estudiado en las distintas especies de insectos. El análisis de los transcriptomas de integumento de *Bombyx mori* (Wu y col., 2016; Tan y col., 2018), *Apis mellifera*, *Frieseomelitta varia* y *Centris analis* (Falcon y col., 2019) junto con estudios moleculares de oenocitos sugieren que el integumento de los insectos es un tejido metabólicamente activo y los oenocitos estarían involucrados en varios de los diversos procesos biológicos descritos (Gutierrez y col., 2007; Martins y col., 2011b; Parvy y col., 2012). En particular, el análisis del transcriptoma de *T. infestans* aporta las primeras evidencias relacionadas con expresión génica del integumento de triatomíneos y confirma evidencias sobre su rol en el metabolismo lipídico y la resistencia a insecticidas, entre otros mecanismos.

Análisis de expresión diferencial de genes de la biosíntesis de hidrocarburos cuticulares en integumento de colonias resistentes y susceptibles de *Triatoma infestans*

El análisis de la expresión génica de los genes FASN del integumento de *T. infestans* no mostró diferencias significativas en los niveles de expresión en especímenes R y S a deltametrina sugiriendo que la expresión relativa de dichos transcriptos no se encontraría directamente asociada al aumento del contenido de CHC observado en los insectos resistentes.

Los ácidos grasos sintetizados por las FASs de integumento son convertidos en ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA) por adiciones sucesivas de unidades de dos carbonos catalizados por las acil-CoA elongasas (ELOVL). Estudios bioquímicos han caracterizado las reacciones de elongación de los ácidos grasos del integumento de *M. domestica*, *T. infestans* y *B. germanica* (Vaz y col., 1988; Juárez y Brenner, 1989; Juárez, 2004). En el integumento de *T. infestans* se detectaron cadenas de VLCFA entre 18C-34C, los cuales son los precursores de los lípidos cuticulares, HC, componentes de acilglicérols y ácidos grasos libres del integumento y la cutícula de *T. infestans* (Juárez y Brenner, 1989).

Las ELOVLs se encuentran ampliamente distribuidas en eucariotas y se agrupan según su función en dos subfamilias: elongasas S/MUFA que elongan ácidos grasos saturados y monoinsaturados, (ELOVLs 1, 3 y 6) y elongasas PUFA que catalizan la elongación de ácidos grasos poliinsaturados (ELOVLs 2, 4 y 5) (Hashimoto y col., 2008). En mamíferos, se han clasificado siete isoenzimas (ELOVL 1-7) de acuerdo con la especificidad por el sustrato y propiedades fisiológicas (Leonard y col., 2004).

El mayor número de secuencias ELOVL descritas en insectos corresponde a *Drosophila*. Solo dos de veinte secuencias fueron caracterizadas y relacionadas con el metabolismo de feromonas (Chertemps y col., 2007, 2005).

El análisis filogenético de distintas secuencias ELOVL agrupó a los genes ELOVL de *R. prolixus* en cuatro clados: ELOVL 1/7, ELOVL 4, ELOVL 6, ELOVL X (Majerowicz y col., 2017). Dado que las secuencias ELOVL de cada especie codifican genes diferentes, las nueve secuencias identificadas en el integumento de *T. infestans* muestran estrecha similitud con las descritas en *R. prolixus* (Majerowicz y col., 2017; Mesquita y col., 2015) en comparación con la similitud observada entre las secuencias de la misma especie.

El análisis filogenético indica que los genes *JAR97901* y *JAS01868* se asocian junto a los genes ELOVL1 y ELOVL7 de humanos, los cuales elongan acil graso-CoAs de 16C - 20C (Naganuma y col., 2011). El gen *KY574520* de *T. infestans* se agrupa junto a los genes ELOVL 2, ELOVL 4 y ELOVL 5 de humanos, en el clado ELOVL2/4/5. El clado ELOVL 4 se relaciona con los genes ortólogos ELOVL 4 de humanos que sintetizan cadenas de ácidos grasos entre 28C - 36C en mamíferos (Leonard y col., 2004). El gen *JAS01870* de *T. infestans* se agrupa junto a los genes ELOVL 3 y ELOVL 6 de humanos en el clado ELOVL3/6. Estos genes en humanos están involucrados en la elongación de cadenas saturadas y monoinsaturadas de acil graso-CoA de 12C - 16C (Matsuzaka y Shimano, 2009; Naganuma y col., 2011). Los genes *JAR97902*, *JAR97899*, *JAR97898*, *JAR97900*, y *JAS01869* de *T. infestans* se asocian en el clado ELOVL específico de insectos. De las cinco secuencias ELOVL del integumento de *T. infestans* clasificadas dentro de este último clado, el gen *JAR97899* se sobreexpresó en especímenes R a deltametrina en relación con insectos S, junto con los genes *JAS01869* y *JAS01870* clasificadas dentro de los clados ELOVL 1/7 y ELOVL 1/6, respectivamente. En *Aedes albopictus*, la sobreexpresión del transcripto que codifica para una ELOVL en huevos se correlaciona con un incremento de la cantidad de HC de superficie favoreciendo de esta manera la resistencia a la desecación durante el período de diapausa (Urbanski y col., 2010). La sobreexpresión de ELOVLs en *T. infestans* R podría contribuir al mayor contenido de CHC observado en estos insectos comparado con los S (Pedrini y col. 2009).

Los VLCFA formados a partir de las ELOVL son reducidos a alcoholes por acción de acil-CoA reductasas específicas (FAR), y posteriormente decarbonilados mediante un mecanismo de decarbonilación oxidativa catalizado por una citocromo P450 de la familia 4G (CYP4G) (Balabanidou y col., 2016; MacLean y col., 2018; Qiu y col., 2012) formando hidrocarburos.

En *D. melanogaster* la caracterización del gen *CYP4G1* expresado en oenocitos demostró su participación en el paso final de la síntesis de HC (Qiu y col., 2012). El gen CYP4G (*JAS02890*) sobreexpresado en el integumento de *T. infestans* R es ortólogo del gen *CYP4G16* de *A. gambiae* (Calderón-Fernández y col., 2017). La sobreexpresión

de *CYP4G16* en *A. gambiae* se correlacionó con un el aumento en el contenido de CHC y una disminución en la penetración de insecticidas (Balabanidou y col., 2016, 2018).

Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de los genes *ELOVL JAR97899*, *JAS01869* y *JAS01870* y el gen *CYP4G JAS02890* del integumento en especímenes R de *T. infestans* podría estar asociado al aumento y composición diferencial de CHC en los insectos R (Pedrini y col., 2009; Calderón-Fernández y col., 2017).

Los productos de las FASs y ELOVLs se convierten en alcoholes por acción de las acil-CoA reductasas (FAR) utilizando el NADPH como poder reductor.

En algunas especies de insectos, los alcoholes grasos de cadenas muy largas son componentes cuticulares importantes (Juárez y Calderón-Fernández, 2007), en tanto que alcoholes de cadenas más cortas (12C – 18C) participan en la comunicación química (Zhu y col, 1996).

En *T. infestans*, los alcoholes grasos lineales de cadena muy larga (20C – 34C) (Dulbecco, 2019) constituyen uno de los componentes principales de la capa lipídica cuticular (Juárez y col., 1984). Por otra parte, se ha reportado que el eicosanol y docosanol (C_{20} y C_{22}) -alcoholes de bajo peso molecular, presentes en pequeñas cantidades en hembras- actúan como feromonas de contacto jugando un rol principal durante el apareamiento (Cocchiararo-Bastias y col., 2011).

Pocos genes FAR han sido clonados y caracterizados en insectos. En *B. mori* (Moto y col., 2003), *Ostrinia scapularis* (Antony y col., 2009) y *Apis mellifera* (Teerawanichpan y col., 2010) los genes FAR se asocian a la biosíntesis de feromonas sexuales, siendo altamente específicas para sus sustratos.

El análisis del transcriptoma de *T. infestans* reveló la existencia de 10 transcriptos FAR en el integumento, en tanto que un total de 15 genes fueron anotados en el genoma de *R. prolixus* (Majerowicz y col., 2017; Mesquita y col., 2015). Esta diferencia está asociada posiblemente a la secuenciación parcial del transcriptoma de *T. infestans* o a una expresión diferencial de los transcriptos a lo largo del tiempo en el integumento de dicho triatomino. Nuestros resultados mostraron una subexpresión de algunos de los genes FAR (*JAR97762*, *JAR97764*, *JAR97758*, *JAR97766* y *JAS01704*) en especímenes R. Estudios bioquímicos recientes mostraron que las hembras R presentan en la epicutícula un menor contenido de los alcoholes grasos C_{20} y C_{22} respecto a hembras S, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (Dulbecco, 2019). Se requieren estudios más exhaustivos para clarificar y confirmar estos resultados respecto al rol potencial de los alcoholes en la resistencia a insecticidas piretroides.

Genes involucrados en la resistencia metabólica en colonias resistentes y susceptibles de *Triatoma infestans*

El factor de resistencia metabólica a insecticidas está mediado por la sobreexpresión de los genes y la actividad aumentada de proteínas pertenecientes a tres familias de enzimas (carboxil-esterasas, glutatión-S-transferasas y CYP monooxigenasas) involucradas en la detoxificación de insecticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides (Hemingway, 2000).

Las CYP monooxigenasas están involucradas en el metabolismo de piretroides, activación y/o detoxificación de insecticidas organofosforados y en menor medida carbamatos (Hemingway y Ranson, 2000).

Aproximadamente 100 CYPs de insectos se clasificaron en 6 familias (Feyereisen, 1999), de las cuales las familias CYP4, CYP6 y CYP9 se encuentran asociadas a la resistencia a insecticidas. Feyereisen y col., (1989) publicaron las primeras evidencias moleculares que demostraban la sobreexpresión del gen *CYP6A1* asociado a la resistencia a insecticidas en *M. domestica*.

En insectos, todos los genes CYP descritos fueron ubicados en cuatro clanes: clan CYP2, clan CYP3, clan CYP4 y clan mitocondrial (Feyereisen, 2011). Las expansiones en los genes CYP encontradas en muchas especies de insectos probablemente representan una respuesta a estímulos ambientales, que definen grupos de genes CYP en tándem. Estas secuencias son originalmente idénticas en estructura y funcionalidad, aunque pueden divergir a causa de mutaciones o translocaciones. Además, estas copias adicionales pueden ser no funcionales o adquirir nuevas funciones, relacionado con una mayor demanda metabólica, por ejemplo, la capacidad de aumento de la detoxificación favoreciendo así, la resistencia a insecticidas (Schama y col., 2016).

En diversas especies de insectos, los genes del clan CYP3 están representados principalmente por miembros de las familias CYP3, CYP6 y CYP9 mientras que aquellos agrupados dentro del clan CYP4 pertenecen a la familia CYP4 y a una nueva familia, CYP3093. En el genoma de *R. prolixus* se han hallado un gran número de expansiones en genes de ambos clanes (Schama y col., 2016). Los genes CYP clan CYP3 y CYP4 cumplen importantes funciones de detoxificación, potenciando la capacidad de resistencia metabólica a muchos insecticidas (David y col., 2013).

En insectos resistentes a piretroides, se ha reportado actividad citocromo P450 aumentada en poblaciones resistentes de *M. domestica* (Lee y Scott, 1989), *B. germanica* (Valles y col., 2000), *D. melanogaster* (Amichot y col., 2004), *A. aegypti* (French y col., 2013), *Culex pipiens pallens* (Chang y col., 2017), *Culex quinquefasciatus* (Gong y col., 2017), entre otros. Asimismo, en *T. infestans* se reportó actividad esterasa

y P450 asociada con el fenómeno de resistencia (González Audino y col., 2004; Picollo y col., 2005; Santo Orihuela y col., 2008).

En el transcriptoma de *T. infestans* se anotaron 46 transcriptos CYP (Calderón-Fernández y col., 2017), de los cuales el 1% pertenecen al clan CYP3 y CYP4. Estos transcriptos corresponden a genes de las familias CYP3, CYP6, CYP4 y CYP3093. La sobreexpresión de varios de estos genes en el integumento de especímenes R a deltametrina, sugiere que los genes asociados al clan CYP3 y CYP4 participarían en la detoxificación de insecticidas piretroides favoreciendo la evolución de la resistencia metabólica en el integumento de *T. infestans*.

Los genes *JAC16640* (4,3 veces), *JAR98714* (7,6 veces) y *JAR98719* (129 veces) presentaron los mayores niveles de sobreexpresión en el integumento de *T. infestans* y pertenecen a las subfamilias CYP4EM y CYP3093A descritas en *R. prolixus*, las cuales poseen las principales expansiones génicas encontradas en dicho triatomino (Dulbecco y col., 2018).

Los procesos de detoxificación catalizados por las CYPs han sido descrito principalmente en el cuerpo graso e intestino de insecto (Bogwitz y col., 2005; Daborn y col., 2007; Grosso y col., 2016). Sin embargo, el integumento es la primera barrera de contacto que los insecticidas de contacto deben atravesar para accionar sobre las células blanco. En Calderón-Fernández y col., (2017) revelamos las primeras evidencias sobre la posible participación del integumento en procesos de detoxificación de insecticidas. En este trabajo de tesis se llevó a cabo la expresión génica relativa de los genes del clan CYP3 del integumento. La sobreexpresión de las secuencias *JAS02907*, *JAR98720*, *JAS02911* y *JAR98721* en insectos R a deltametrina en comparación con especímenes S (Figura 26A) sugiere una participación de las CYP clan 3 del integumento en la detoxificación de insecticidas piretroides.

En Dulbecco y col., (2018) se profundizó el estudio de la expresión génica de los transcriptos del clan CYP4 anotados en el transcriptoma de integumento de *T. infestans*. Se describieron nuevos miembros de las subfamilias ampliamente expandidas CYP3093A y CYP4EM y se demostró una sobreexpresión exclusiva de los mismos y sus expansiones en el integumento de especímenes R. Además, se demostró actividad citocromo P450 en insectos R del integumento de *T. infestans* (Dulbecco y col., 2018). Además de los genes CYP, se han detectado 14 genes CCE en el transcriptoma del integumento de *T. infestans* (Calderón-Fernández y col., 2017).

La familia de genes CCE juega un rol esencial en la degradación de la hormona juvenil y acetilcolina, forma parte de la membrana basal en distintos tejidos de insectos (glutatinas), interviene en diversos procesos de detoxificación y podría participar en la resistencia a insecticidas (Montella y col., 2012). Se han reportado elevados niveles de

expresión génica en transcritos CCE de insectos R en comparación con especímenes S de los ordenes Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera y Diptera (Li y col., 2007; Bass y Field, 2011). En *T. infestans*, ensayos enzimáticos mostraron elevada actividad esterasa asociada a especímenes R a deltametrina en comparación con insectos S (González Audino y col., 2004; Santo Orihuela y col., 2008). Nuestros resultados mostraron el análisis de expresión relativa de los nueve genes CCE del integumento de ninfas de *T. infestans* (Figura 26B). La sobreexpresión del transcripto *JAR95537* en especímenes R en comparación con insectos S sugiere que este gen contribuiría con el factor de resistencia metabólica en *T. infestans*.

Capítulo 2: Caracterización molecular y funcional de las Ácido graso sintetasas de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*.

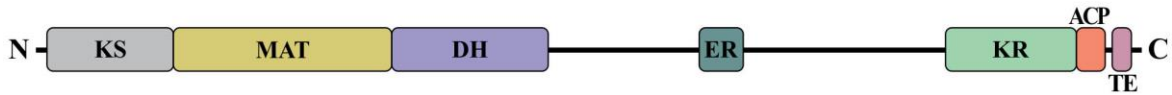
Resultados

Caracterización molecular de las ácido graso sintetasas en *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*

Amplificación de las secuencias parciales de las ácido graso sintetasas de *Triatoma infestans*

Con el objetivo de amplificar las secuencias completas de las FASs de *T. infestans* se ensamblaron las ESTs disponibles a partir de la secuenciación del transcriptoma y nuevos productos obtenidos a partir de reacciones de PCR a tiempo final para amplificar fragmentos entre las ESTs, y reacciones de RACE. Los insectos fueron disectados a los 6 días posteriores a la alimentación. Dichas secuencias fueron subidas a la base de datos GenBank, siendo sus números de acceso *KY797274* y *KY805857*. Las secuencias proteicas se denominaron FASN1 y FASN3 respectivamente, por su homología con los genes de *D. melanogaster*.

En la figura 28 se muestra la secuencia de proteínas obtenidas para cada una de las dos secuencias. La región correspondiente a cada dominio fue resaltada con diferentes colores: KS (gris), MAT (amarillo), DH (lila), ER (verde oscuro), KR (verde claro), ACP (naranja) y TE (violeta). Cabe destacar que este último dominio posee gran similitud de secuencia con el gen de *R. prolixus* *RPRC000391*.



>ATL76713.1 FASN1, partial [Triatoma infestans]

```

FKYNLMNGIDMVTNDERRWPAGLNGLPSRTGKIKDLSKFDASFFGVHAKQAEVMDPQLRMLLEATYEALI
DAGINPNEMRGSKTGVFIGASASESGEYWTLEAERVNGYGLTGCARAMFPNRISFTDFDKGPSFAIDTAC
SSSMLAFHQAVTAMRNGECDAAIVGGVNLKLPNESLQFHRLSMLSPDGACKAFDASNGYVRAEACAIT
LLQKVSDAKRVYATVINTGTNDGNKEQGITFPGSNVQKELILSVFKNAGINPAEVVXVEAHCTGTPPAL
TDGRLQVVDKNWKWDGGIAAINSFGFGGANVHVILRSNPKPKSPPVKDNIPRLVAVSGKTYESVESFLTK
IENMPRDDDFITLHDIHKQNIAGHSCRGYTVLGAEKPTKEISEGDTKSQVWYVFSGMSGQWAGMGRAFM
CLEPFSKAIHHAACAVLKNEGVDDLIIYHGDESVDNILHCFVSIAAVQVALVDLLTALGISPDGIVGHS
AGELGCAYADGAFTAEQTIILAAAYWRGKSLDSSLKPGAMAAVALSWEEAKSRVPNTFAACHNGADSVTV
SGPVKEIDEFVEKLLQEGIFAKKVNSNVAFHSKYIADAAPKLRANLERIIPVAKPRSRKWVSSSIPESG
WSSQLAAYSSAAHYVNNLLSPVLFYEASLHIPEDAIVIEVAPHCLLQAIMKRTVPKSCNTNIGLVKKGISD
EMSYLLSNIGKLYTLGLNPNLSVFRPSTYPVARGTPMLSSLVEWDHSIESVWADFSGRGGSRWGAEIIE
VNSANETDAYVVGHRIDGRVPFPATGFLTLAVESYLTKNISIQKTRKEVITLFKMFHILRSLPAKDGARS
FLVNIIDGSGEFCESGGVVVRGKISKADGIHKDGLNLNKPEADTKHLPLSKQHRYRDLRLRGYEYSGI
FTGIMGADNCGAVGELEWSENWVSFMDTMLQFSLIQKNARGLYLPTLRQVLDIPVYHLSVSPGKGVVEY
HMHKNIGVVKSGGIEIRGMKDSLAPRRQVQADPKWEQYSPFIPYLSKKEICAEAEALNVAMQIVLENSNR
KVKVIEIANNRQPEQLVAPTIVNILESQPQTSAEVTIIDTAVENYSSVAEQIGAKTLKDKDMVEEFTETA
HIVVGVELASDNDFIKVLSIIEKGFLLTEEVKDIKDNHIKFGFKVSKLPIEKKTLFLLRVEDWVVP
KVLNISQKNFDWVENVKEALKDAEKNHQTYVILSENECNCGILGMFNCLKQEPGGEHFSVCFIDSLAPKN
FSVIKIEDHLKGLVNVILRDDEWGSYRYLNICQGESLLNVEHAFINTLTRGDLSSLKWIEGPLSFYRPE
HDVKNELCTVYVYAPLNFRDIMLASGKLPDAPDLPGDLAGEKCEILGFEAGRDSKGNRVMGILEACGLATS
LADPIFLWNIPANWTMEQAATVPVYATSYALIVRGKLRGESVLIHAGTGGVQAAISIALHMGCTVF
TTVGSQQKRDFLKKNPKLNASHIGNSRDITFEQVMMEKTGGRGVDVVLNSLAEDLKQASVCLAKHGFR
LEIGKFDLSNNTPLGMSVLLKNTSIHGILLDSLFEAGSESEDEKMEVVKLIKDISSGAVRPLPSTTFSHS
QIEQSFYMASGKHIGKVLKIRDEEAKVVKNPVTLNVPVPRTYMNPDKSYVIVGGGLGLELETEWL
LTRGATNIVLVSRSVSNQYQSMCLRRWKEKGFNVIVSKENPATSKGAKRLLTQTSALGPVGGIFNLAAV
LRDAFFENQDACKFETVCNAKVDTTIALDKESRALCPQLDYFVVFSSVSCGRGNAGQTNYGMANSAMERI
CEARQLEGLPGMAIQWGAIGDVGLVIESLKGDNDEMEVAGTLPQRITVMTTMDIFLQMHVPVSSMVLAE
KRKAQEKQISLMDTVKNILGIKDVKSVAQTSADLADLGMDSLMGAIEKQTLERNFDIVLSAADIRLTDFD
KLKELDTTNTSQPGTDAEIKSDDQKEPVKTEKLTNGDVLVHFQDKTLMPPQTLVKMKEDFKNKILFIV
HPIEGVSSSELVSRQLCTVWGLQCTSTAPLSTIQELAEYVKEVRKVQPNGPYNISGYSFGAAVAFEM
ALQLESLEKCTLLLDGSPYVLTQTENYRERAKSKNETADESDAFAYFIGLFTGAENYKTEELKAL
PDLKARLKLCSERLKLPTGYDVEDISNAAFSFKKLVAAADKYQPLDTFKGQITLIKAEDNFTKG

```



>ATL76714.1 FASN3, partial [Triatoma infestans]

```

ETRQSSKWLNSINYEYFSKIIIEKEDFNYNKLSDNHAIHQGPCKLSNITRLVPGIYLLLEKNNEYFN
QLTLLDNLGRLYMEGVDFDLGNLYPAVEYVPSRSTPMISPLVKWDHSDDWYVPSYRTQKMIKAGERNIN
ISLKEELEYIAGHVVDGRNLFATGYLWLVWETVSMRGETPFPEVPIVLENVRFHRATNLSKDGSLDFM
VIVQKVSQKFNLYKVGPAIVGTGTYVPQDVNSEMIELNEKREPEVFTLTVSDIYKELRLRGYQYKGLFRS
LTKFNLDSCAKIAWHNNWVAFMDNMLQMKILYIETRGLFVPTAIERLTVDPKRHLQICNQLPSDDKEVL
TCYYKELDLIKSGAIEIRGMQANAIARRKNLSEPVLEKYIFIPFHESEDEYVNEEIVRIMVQLVLENEE
ISIKVVEFAAHPIQLLAPIHAQVLSDLPLIQPDITVLSNSLNPQLTDLQPESLLRRKLPANKSALIGVG
SDLLKAERAELQNCLNSLKDGGYIISIEDVGAEFAMDDIVTVASYACNNKICMLLKKASLRDVENDAVI
KYDSNDFTWIRKAQELISSAENRRIVFFSEKQKHSGLLGFANCLKRENDGKTRFVLMDDNAEKFSIAN
PFYANQLSKDLVINVYKNGRWGTYRHLLIDANNMTAKLVYINITTRGDLSSLTWFSGKFTNSEIAEHSQ
IAYTEYVSLNFRDIMLATNKLAPVISKGRLLGQECVIGFEFSGYLENGKRVMGFMKSRGLASKVLLNSDL
YWEVPPDDMSLEEAATVPVYNTVYAFFLNGNLRKGDVLIHSGTGGVQAAINLALYTGCRVFTVGTGK
EKREFIRETYQPIDEDIGNSRDTSFERMIMERTNTRGVVVLNSLAEDLKASVCLAKGGFRLEIGKF
DFSNNSQLGMEFRKGASFGHMLDNIYEAPEYTRRLSNQTDYELKMGVVKPLPRTVFNRRNQVEQAFRY
MAGGKHIGKVMNMRDPVPKIGRFEALYDAKARFHCKDDMTYILAGGLGGFIELADWVLRGCRKLV
SSRRGISEGYQILRINIWSYGAIVEIESTEDITDEGVKNLLKHAIRLGPVAGIFNLAVVLSDALFEKQT
EESFKISAGPKAIATLLDKYSRQLCPNLENFVIFSSVSCGRGNIGQTNYGQNSVME

```

Figura 28: Secuencias proteicas FASN1 y FASN3 obtenidas en *T. infestans*. Para cada una, se muestran las estructuras proteicas (arriba) y las secuencias de aminoácidos (abajo). Los siete dominios proteicos correspondientes a las FAS de animales están marcados con diferentes colores. Se muestra la ubicación de KS, MAT, DH, ER, KR, ACP y TE desde el extremo amino-terminal (N) al carboxilo-terminal (C); algunos de ellos faltan en las FASs de *T. infestans*.

Análisis bioinformático de las ácido graso sintasas de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*.

Con el fin de inferir las relaciones filogenéticas a partir de las secuencias de proteínas de las FASs de *T. infestans* y *R. prolixus* se construyó un cladograma con las secuencias de diversas especies de insectos.

El análisis filogenético agrupa a los taxones en dos clados monofiléticos con un 100% de soporte de Bootstrap: el Clado I y el Clado II (Figura 29).

Dentro del Clado I se encuentra la secuencia ATL76713 de *T. infestans* que codifica para FASN1; las secuencias RPRC000269 y RPRC002909 de *R. prolixus* y las secuencias FASN1 y FASN2 de *D. melanogaster*. Las secuencias FASs de insectos heterópteros hematófagos conforman un clado monofilético soportados por un 71% de Bootstrap. Este clado está formado por las secuencias RPRC000269 y RPRC002909 de *R. prolixus*, la secuencia ATL76713 de *T. infestans* y las secuencias XP_014250609, XP_014250611 y XP_014243797 de *Cimex lectularius*.

El Clado II está constituido por genes FASN específicos de insectos e incluye la secuencia ATL76714 de *T. infestans*, la secuencia RPRC000123 de *R. prolixus* y la secuencia FASN3 de *D. melanogaster*, y secuencias FASs de *Apis mellifera*, *B. germanica*, *C. lectularius* y *Acyrtosiphon pisum*.

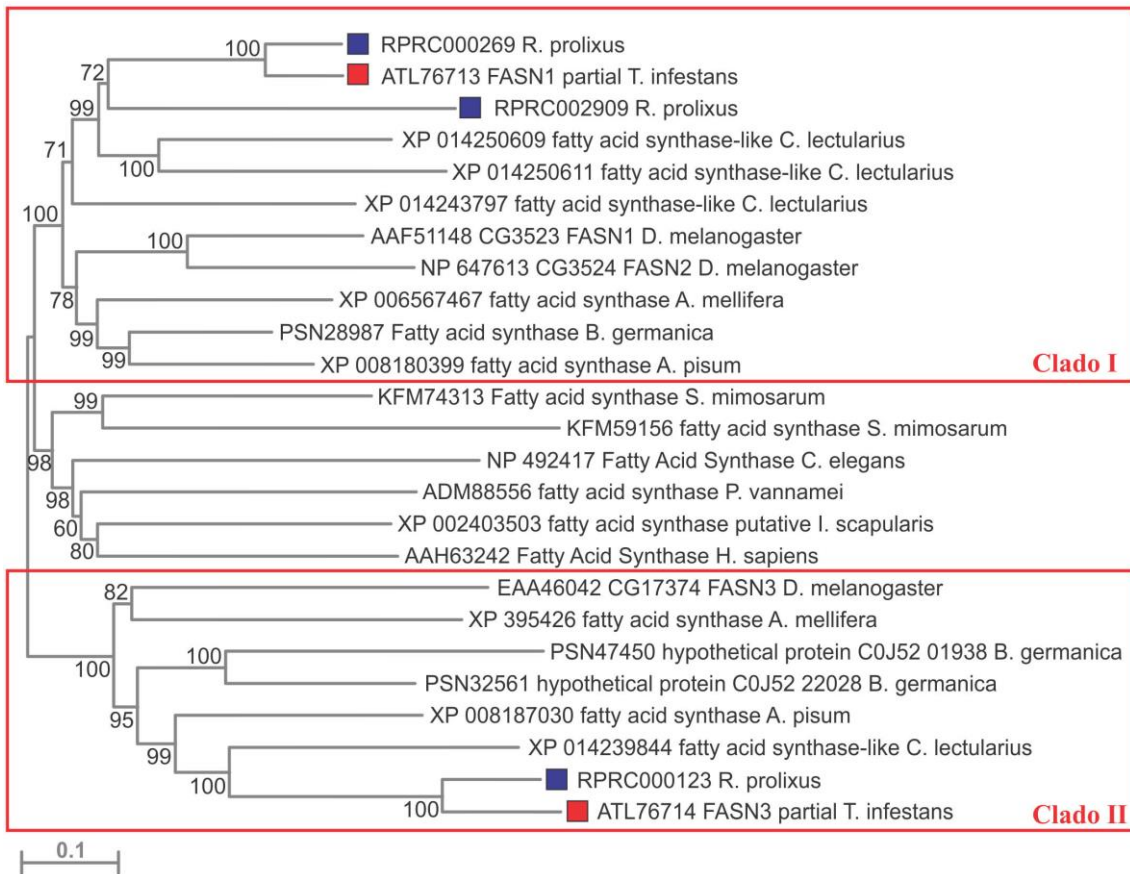


Figura 29: Análisis filogenético de los genes FASN de *R. prolixus* y *T. infestans*. Los códigos de secuencia corresponden a números de acceso en GenBank y VectorBase (*R. prolixus*). El cladograma se construyó utilizando el método de Máxima Verosimilitud con 1000 repeticiones de Bootstrap. Los números en los nodos indican el soporte de Bootstrap (%). Las secuencias de *R. prolixus* y *T. infestans* se resaltan en cuadrados de color azul y rojo respectivamente. Para el análisis filogenético se seleccionaron las secuencias FASs de insectos que contienen los oenocitos asociados al integumento. El árbol agrupó a los taxones en dos clados principales, el Clado I y el Clado II. Se utilizaron las secuencias FASs de *Stegodyphus mimosarium*, *Caenorhabditis elegans*, *Penaeus vannamei*, *Ixodes scapularis* y *Homo sapiens* como grupos externos.

El ensamblado del 95% del genoma de *R. prolixus* (Mesquita y col., 2015) y la identificación y anotación de genes del metabolismo lipídico (Majerowicz y col., 2017) brindaron la información génica necesaria para poder caracterizar molecularmente las FASs de dicho triatomino e iniciar su estudio funcional.

Dentro de la base de datos se identifican 3 genes con sus secuencias nucleotídicas y proteicas correspondientes a FAS: *RPRC000123*, *RPRC002909* y *RPRC000269*. Desde el punto de vista génico, *RPRC000123* consta de 37 exones que abarcan los contigs ACPB03006445.1 y ACPB03006446.1. La secuencia de ADNc presenta una longitud completa es 6546 pb, que codifica para una proteína de 2182 residuos aminoacídicos. La proteína anotada carece de los dominios MAT y TE (Figura 30A). El gen *RPRC002909* consiste en 35 exones que abarcan los contigs ACPB03012543.1 y

7 dominios proteicos. Se muestra la ubicación de KS, MAT, DH, ER, KR, ACP y TE desde el extremo amino-terminal (N) al carboxilo-terminal (C); algunos de ellos faltan en las FASs de *R. prolixus*. La proteína RPRC002909 tiene dos dominios transmembrana (tm) ubicados en posición inmediatamente anterior al dominio ER.

Expresión diferencial de los transcritos de las ácido graso sintasas de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans* en diferentes tejidos y órganos

Con el objetivo de investigar el nivel de expresión de los genes codificantes de FAS en distintos tejidos y órganos de ambas especies de triatomíneos se llevó a cabo la medición de la expresión génica relativa de los mismos mediante RT- qPCR.

Rhodnius prolixus

El análisis de expresión génica relativa por RT-qPCR de *RPRC000123*, *RPRC002909* y *RPRC000269* en ninfas de V estadio de *R. prolixus* en integumento, cuerpo graso, intestino, túbulos de Malpighi, glándulas salivales y cerebro se muestra en la figura 31. Se utilizaron los genes de referencia β -actina y el *EF-1*.

El mayor nivel de expresión de *RPRC000123* y *RPRC002909* se observó en integumento, con un bajo nivel de expresión en cuerpo graso y cerebro (Figura 31). La expresión relativa de *RPRC000269* fue detectada en todos los tejidos y órganos medidos, con un nivel de expresión significativamente mayor en cuerpo graso (Figura 31) ($P < 0,01$; ANOVA de un factor; seguido de prueba de comparación múltiple de Tukey).

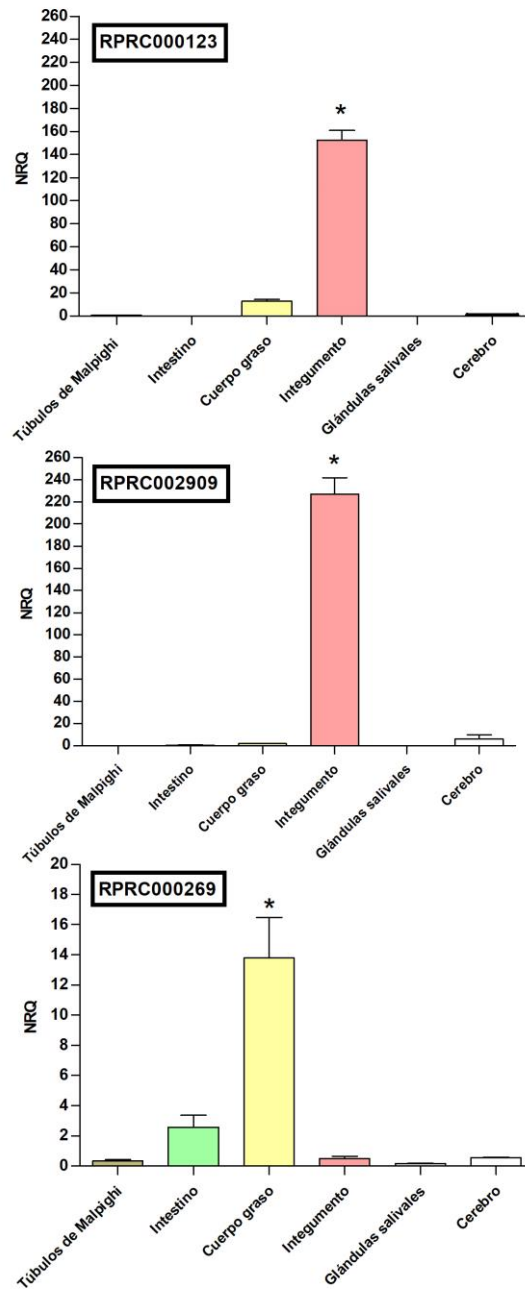


Figura 31: Patrón de expresión de genes FASN en diferentes tejidos y órganos de ninfas de V estadio de *R. prolixus*. Los niveles de transcripción de los genes *RPRC000123*, *RPRC002909* y *RPRC000269* se midieron por RT-qPCR en túbulos de Malpighi, intestino, cuerpo graso, integumento, glándulas salivales y cerebro de *R. prolixus*. *RPRC000123* y *RPRC000269* fueron medidos en muestras disectadas a los 4 días PA, mientras que, *RPRC002909* fue medida en muestras disectadas a los 19 días PA. Para cada gen, la cantidad relativa normalizada (NRQ) se estimó utilizando β -actina y *EF-1* como genes de referencia. Las barras de error representan el SE de las medias de 4 réplicas biológicas (5 insectos cada una). El asterisco * indica las diferencias significativas entre el integumento y los demás tejidos para *RPRC000123* y *RPRC002909* y entre el cuerpo graso y los demás tejidos para *RPRC000269* ($P < 0,05$; ANOVA de un factor, seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey).

Triatoma infestans

El análisis de expresión relativa por RT-qPCR de *KY805857* y *KY797274* en ninfas de IV estadio S de *T. infestans* en integumento, cuerpo graso, intestino y túbulos de Malpighi se muestra en la figura 32 utilizando los genes de referencia *18S* y *EF-1*.

El mayor nivel de expresión de *KY805857* se observó en integumento, con un bajo nivel de expresión en cuerpo graso. La expresión génica relativa de *KY797274* fue detectada en todos los tejidos y órganos medidos, con un nivel significativamente mayor en cuerpo graso (Figura 32).

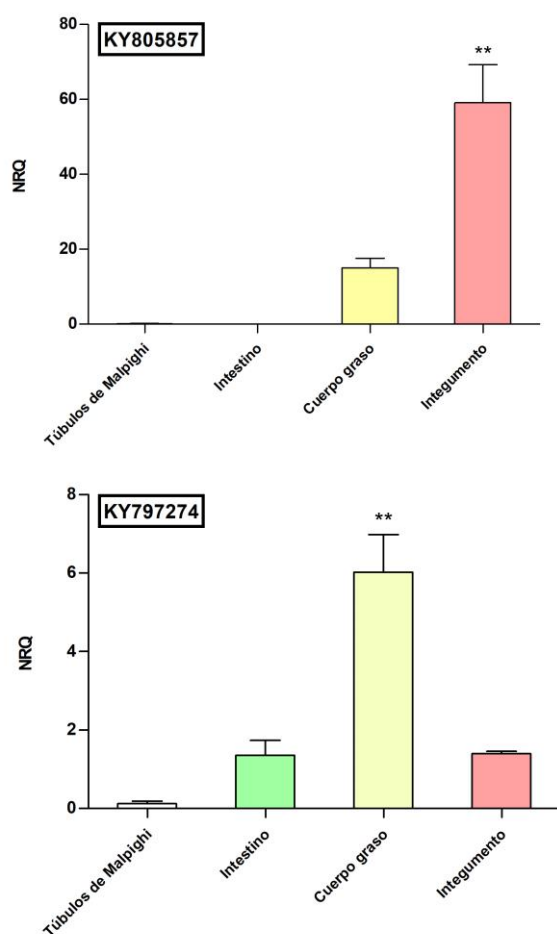


Figura 32: Expresión génica relativa de *KY805857* y *KY797274* en IV estadio S de *T. infestans*. Se midió por RT-qPCR la expresión de los transcritos *KY805857* y *KY797274* a los 7 días PA, en túbulos de Malpighi, intestino, cuerpo graso y integumento. Para cada gen, NRQ se estimó utilizando *18S* y *EF-1* como genes de referencia. Las barras de error representan el SE de las medias de 4 réplicas biológicas (4 insectos cada una). Los asteriscos ** indican las diferencias significativas entre el integumento y los demás tejidos y órganos para *KY805857* y entre el cuerpo graso y los demás tejidos y órganos para *KY797274* ($P < 0,01$; ANOVA de un factor; seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey).

Expresión diferencial de las ácido graso sintasas de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans* a lo largo del cuarto estadio ninfal

Con el fin de analizar el patrón de expresión de los transcritos de las FASs durante el estadio IV ninfal de *T. infestans* y *R. prolixus* se realizaron extracciones de ARN del integumento y cuerpo graso en distintos momentos del ciclo y se midió por RT-qPCR la expresión relativa de *RPRC000123*, *RPRC002909* y *RPRC000269* de *R. prolixus* y *KY797274* y *KY805857* de *T. infestans*. Dado que la alimentación provoca grandes cambios en el metabolismo del insecto, se estudió el patrón de expresión tanto en la condición de alimentado como sin alimentar. Las ninfas de IV estadio de *R. prolixus* y *T. infestans* fueron alimentadas a repleción a los 10 y 15 días posteriores a la muda, respectivamente.

Rhodnius prolixus

Para el análisis de la expresión de los transcritos *RPRC000123*, *RPRC002909* y *RPRC000269* se extrajo el ARN de integumento a los 2, 6, 9, 14 y 19 días posteriores a la muda (PM) y el ARN de cuerpo graso de insectos sin alimentar a los 2, 6, 14 y 19 días posteriores a la muda (PM). Otros lotes de insectos fueron alimentados a repleción en el día 10 PM y el ARN de integumento y cuerpo graso se extrajo a los 12, 14, 19 y 22 días PM (correspondientes a los días 2, 4, 9 y 12 posteriores a la alimentación (PA) (Figuras 33, 34 y 35). Se midió la expresión de los transcritos *RPRC000123* y *RPRC002909* en integumento y del transcripto *RPRC000269* en cuerpo graso.

En las figuras 33, 34 y 35 se muestra el patrón de expresión de los transcritos a lo largo del cuarto estadio ninfal.

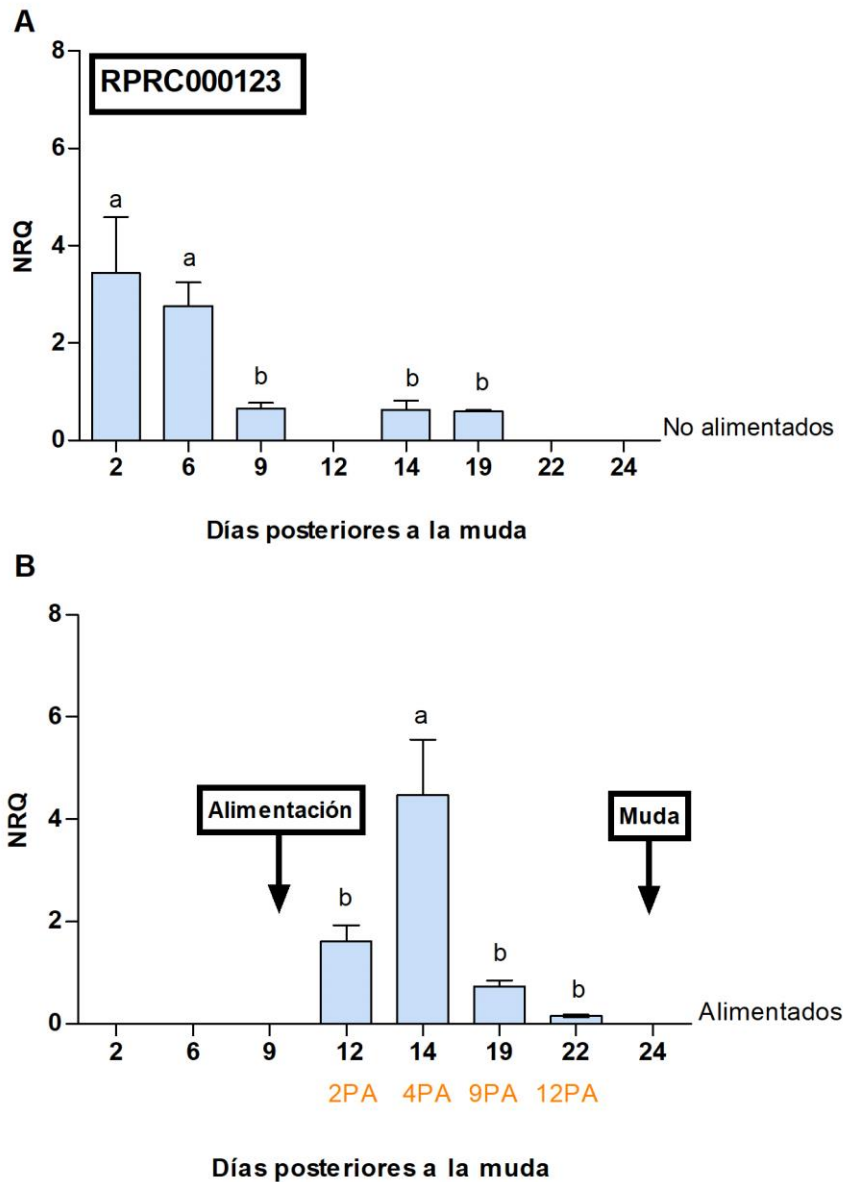


Figura 33: Expresión génica relativa de *RPRC000123* en el integumento de ninfas IV estadio de *R. prolixus* durante el ciclo ninfal. Se midió por RT-qPCR la expresión de *RPRC000123* a los 2, 6, 9, 14 y 19 días PM en insectos sin alimentar (A) y a los 12, 14, 19 y 22 días PM en insectos alimentados a repleción (2, 4, 9, 12 PA respectivamente) (B). Para cada gen, NRQ se estimó utilizando β -actina y *EF-1* como genes de referencia. Las barras de error representan el SE de las medias de 4 réplicas biológicas (4 insectos cada una). Las diferentes letras indican las diferencias significativas a distintos tiempos en condiciones de ayuno (A) o alimentados (B) ($P < 0,05$; ANOVA de un factor; seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey).

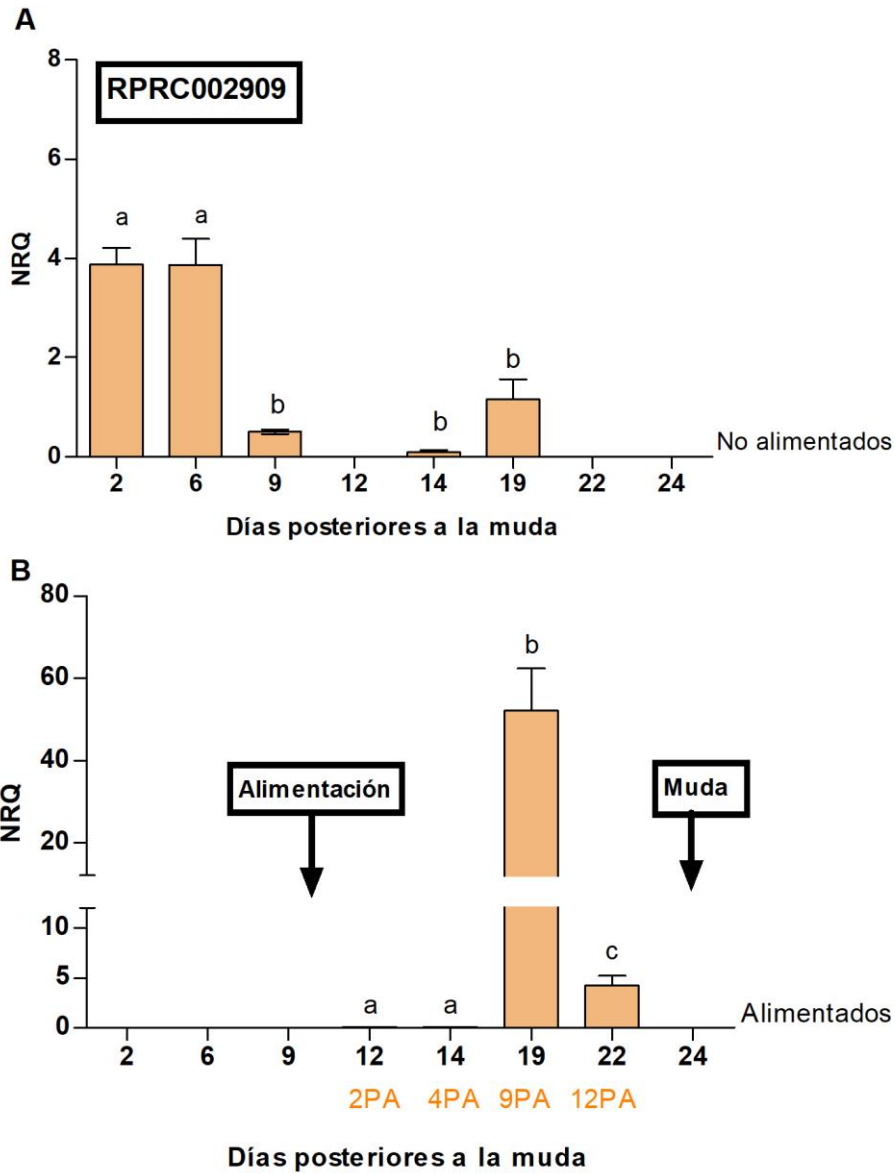


Figura 34: Expresión génica relativa de *RPRC002909* en el integumento de ninfas IV estadio de *R. prolixus* durante el ciclo ninfal. Se midió por RT-qPCR la expresión de *RPRC002909* a los 2, 6, 9, 14 y 19 días PM en insectos sin alimentar (A) y a los 12, 14, 19 y 22 días PM en insectos alimentados a repleción (2, 4, 9, 12 PA respectivamente) (B). Para cada gen, NRQ se estimó utilizando β -actina y *EF-1* como genes de referencia. Las barras de error representan el SE de las medias de 4 réplicas biológicas (4 insectos cada una). Las diferentes letras indican las diferencias significativas a distintos tiempos en condiciones de ayuno (A) o alimentados (B) ($P < 0,05$; ANOVA de un factor; seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey).

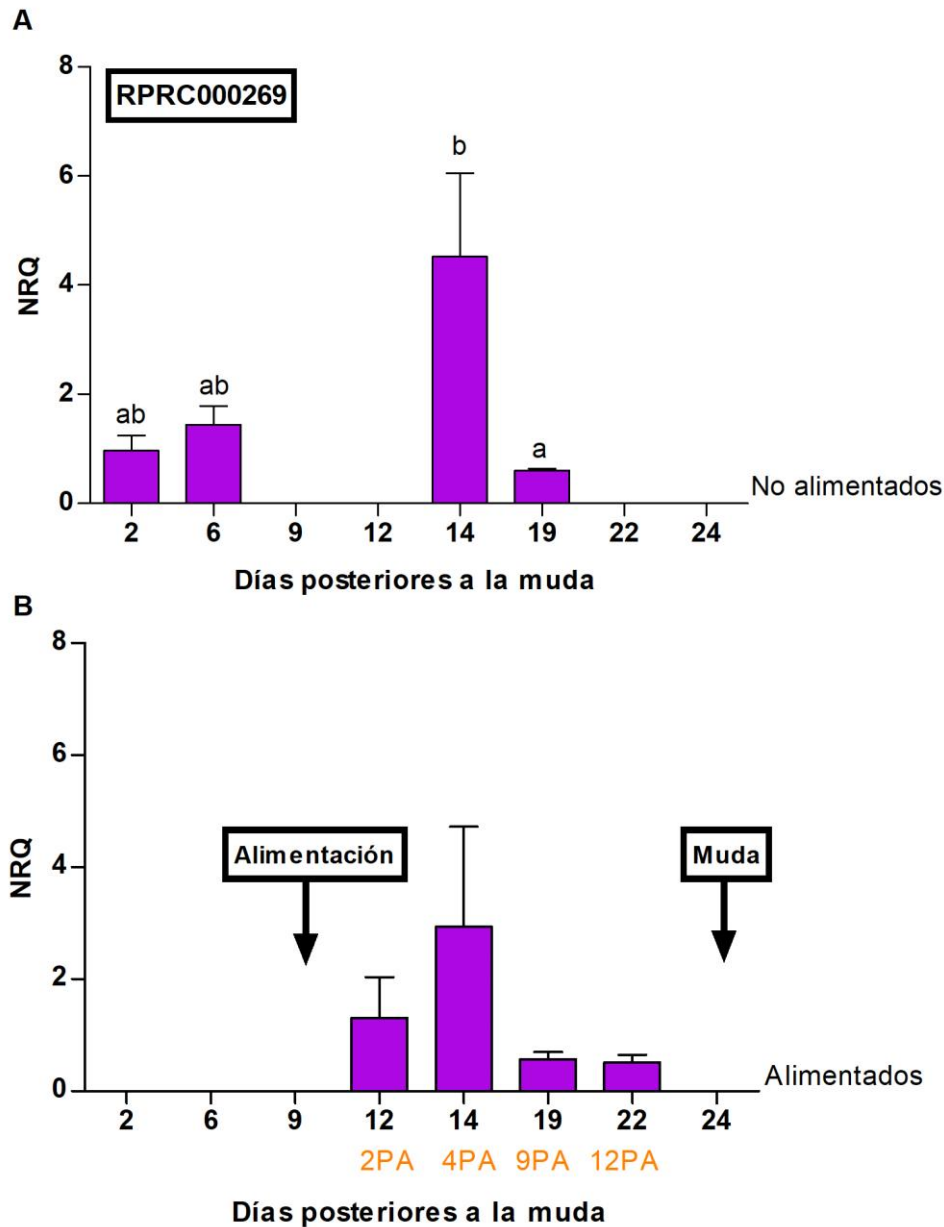


Figura 35: Expresión génica relativa de *RPRC000269* en el cuerpo graso de ninfas IV estadio de *R. prolixus* durante el ciclo ninfal. Se midió por RT-qPCR la expresión de *RPRC000269* a los 2, 6, 14 y 19 días PM en insectos sin alimentar (A) y a los 12, 14, 19 y 22 días PM en insectos alimentados a ración (2, 4, 9, 12 PA respectivamente) (B). Para cada gen, NRQ se estimó utilizando β -actina y *EF-1* como genes de referencia. Las barras de error representan el SE de las medias de 4 réplicas biológicas (4 insectos cada una). Las diferentes letras indican las diferencias significativas a distintos tiempos en condiciones de ayuno (A) o alimentados (B) ($P < 0,05$; ANOVA de un factor; seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey).

En condiciones de ayuno, los valores más altos de expresión génica de *RPRC000123* y *RPRC002909* corresponden a los días 2 y 6 PM (Figuras 33A y 34A). En cambio, la expresión de *RPRC000269* mostró los valores más altos de expresión génica al día 14 PM (Figura 35A). En insectos alimentados, los mayores valores de expresión génica de

RPRC000123 y *RPRC000269* fueron detectados al día 4 PA en tanto que los valores a los 12 días PA fueron prácticamente indetectables (Figuras 33B y 35B). Sin embargo, *RPRC002909* mostró los valores más altos de expresión al día 9 PA (Figura 34B), siendo superiores a los valores máximos de expresión detectados en *RPRC000123* y *RPRC000269*.

Triatoma infestans

Para el análisis de la expresión de los transcritos *KY797274* y *KY805857* en ninfas S de IV estadio de *T. infestans* se extrajo el ARN de integumento y cuerpo graso a los 15 días PM en condiciones de ayuno. Otro lote de insectos fue alimentado ese día a repleción y el ARN de integumento y cuerpo graso se extrajo a los 18, 21, 25 y 29 días PM (día 3, 6, 10 y 14 PA, respectivamente). Se midió la expresión génica relativa mediante RT-qPCR de los transcritos *KY797274* en cuerpo graso y *KY805857* en integumento. En la figura 36 se muestra el patrón de expresión de ambos transcritos a lo largo del cuarto estadio ninfal.

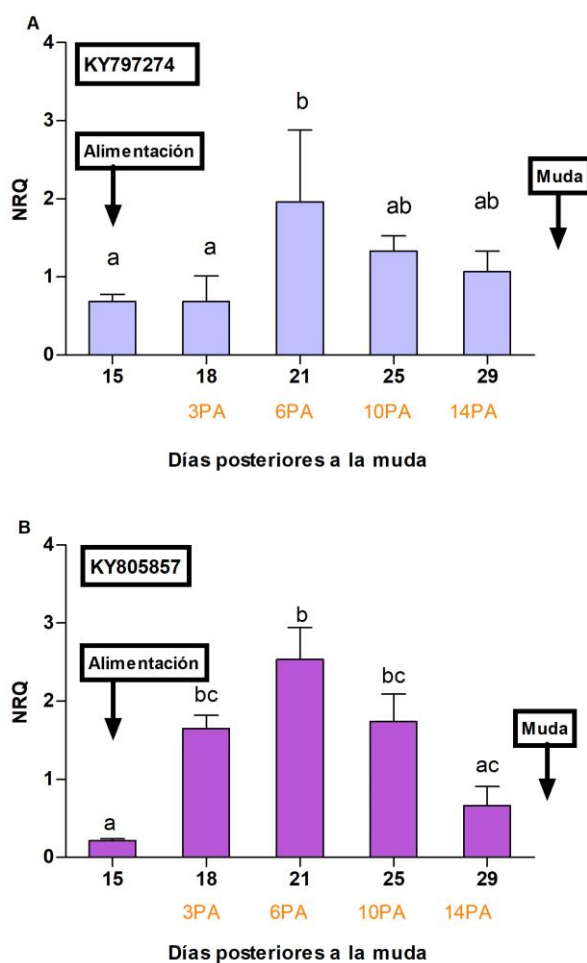


Figura 36: Expresión génica relativa de KY797274 en cuerpo graso y KY805857 en integumento de ninfas S de IV estadio de *T. infestans*: Se midió por RT-qPCR la expresión relativa de los transcritos KY797274 (A) y KY805857 (B) en dos condiciones: en un lote de insectos se midieron los transcritos el día 15 PM en condiciones de ayuno y otro lote fue alimentado el día 15 PM y se midieron los transcritos los días 18, 21, 25 y 29 PM (3, 6, 10 y 14 días PA). Para cada gen, NRQ se estimó utilizando *18S* y *EF-1* como genes de referencia. Las barras de error representan el SE de las medias de 4 réplicas biológicas (4 insectos cada una). Las diferentes letras indican las diferencias significativas a los distintos tiempos medidos ($P < 0,05$; ANOVA de un factor; seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey).

La expresión génica relativa de KY797274 en cuerpo graso mostró diferencias significativas entre el día 6 PA y los días 3PA y 15 PM en condiciones de ayuno.

La expresión génica relativa de KY805857 en integumento mostró diferencias significativas entre los días 3, 6 y 10 PA en comparación con el día 15PM en condiciones de ayuno. Se pudo observar que el patrón de expresión es similar al obtenido para *R. prolixus* en las mismas condiciones.

Caracterización funcional de las ácido graso sintasas: Silenciamiento de los transcritos en *Rhodnius prolixus*

Para continuar con el análisis de las FASs, se procedió al estudio funcional de las mismas mediante el silenciamiento de los genes FASN de *R. prolixus* empleando la técnica de ARNi. El acceso al genoma de *R. prolixus* permitió el estudio funcional de los tres genes que codifican para FAS. El ciclo de vida de dicho triatomino está muy sincronizado respecto al momento de alimentación en el laboratorio lo que facilita el diseño experimental, a diferencia de *T. infestans*.

Efecto del silenciamiento de los genes *RPRC000123*, *RPRC002909* y *RPRC000269* en la supervivencia de los insectos.

Se sintetizaron las ARNdc correspondientes a los genes *RPRC000123*, *RPRC002909* y *RPRC000269* (ds*RPRC000123*, ds*RPRC002909*, y ds*RPRC000269*) y Control del kit (dsControl) y a continuación se inyectó 1 μ l de cada una de las soluciones en el abdomen de insectos de ninfas de IV estadio.

Los insectos se mantuvieron en las condiciones del insectario (27°C, 45% de H.R.); la inyección se efectuó a los 10 días luego de mudar a IV estadio y se alimentaron a repleción 3 días después de la inyección. La eficacia del silenciamiento génico se midió mediante RT-qPCR 8 días después de la inyección, obteniendo como resultado una reducción significativa de la expresión relativa de los genes FASN (*RPRC000123*, 94,4% \pm 2,9%; *RPRC002909*, 87,5% \pm 5,9%; *RPRC000269*, 95% \pm 1,2%).

Las ninfas tratadas con dsRPRC002909 o dsRPRC000269 mudaron a V estadio y sobrevivieron normalmente, al igual que las inyectadas con dsControl. Sin embargo, los insectos tratados con dsRPRC000123 murieron entre las 0-4hs después de la muda, sin haber concluido el proceso de esclerotización y oscurecimiento de la cutícula (Figura 37).

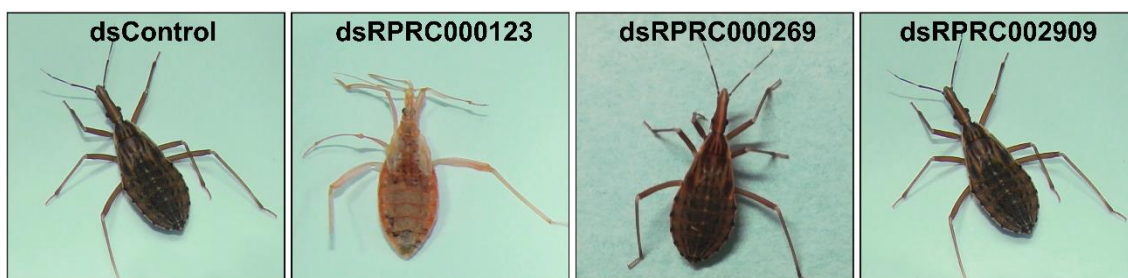


Figura 37: Fenotipos resultantes del silenciamiento de los genes FASN en ninfas de IV estadio de *R. prolixus*. Ninfas de IV estadio fueron inyectadas con la ARNdc de cada gen FASN (dsRPRC000123, dsRPRC000269 o dsRPRC002909), o con el ARNdc del Control del kit (dsControl). Los insectos se mantuvieron a 27°C y 45% de H.R. y se alimentaron a repleción 3 días después de la inyección. Se observaron diariamente hasta la muda a V estadio. Los insectos inyectados con dsRPRC000269 y dsRPRC002909 sobrevivieron normalmente después de la muda, al igual que los insectos inyectados con dsControl. Los insectos inyectados con dsRPRC000123 murieron entre las 0-4hs después de la muda, mostrando una esclerotización incompleta de la cutícula.

Identificación de ácidos grasos de integumento de *Rhodnius prolixus*.

La FAS de insectos cataliza la formación de ácidos grasos (AG) mediante la incorporación de acetil-CoA, malonil-CoA y metil malonil-CoA como metabolitos precursores. Como resultado del proceso se liberan AG de cadenas lineales y ramificadas saturadas.

Los AG se obtuvieron a partir de un extracto de lípidos totales de integumento de ninfas de IV de *R. prolixus* a los 11 días PA y los mismos fueron identificados por CGC-MS.

En la figura 38 puede verse su perfil cromatográfico. Se obtuvo una serie continua de AG de cadenas de número par e impar de carbonos, de 12C a 24C. El 99,2% corresponde a AG saturados e insaturados lineales. El 9-C18:1 es el AG mayoritario, representando por un 51% de los AG totales, seguido del C16:0 (16%), C18:0 (12%), 9,12-C18:2 (8%) y 9-C16:1 (4%). El C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, y-C15:1, 7-C16:1, C17:0, y-C17:1, 6,9,12-C18:3, C20:0, 11-C20:1, 5,8,11,14-C20:4, C22:0, y-C22:1 y C24:0 conforman un grupo de AG minoritarios, representando entre un 0,10 y 1,96% de la muestra. Las cadenas de AG metil-ramificadas x-metil C13:0, y los diversos isómeros de x-metil C14:0, x-metil C15:0 y x-metil C16:0 constituyen el 0,8% del total de los AG identificados (Tabla 3).

La posición de las ramificaciones no fue determinada dado que para ello se requiere de grandes cantidades de muestra, necesaria para su conversión en los correspondientes HC (Juárez y col., 1992; Juárez, 1994b; Juárez y col., 2001) u otros derivados que permiten asignar la posición de la ramificación.

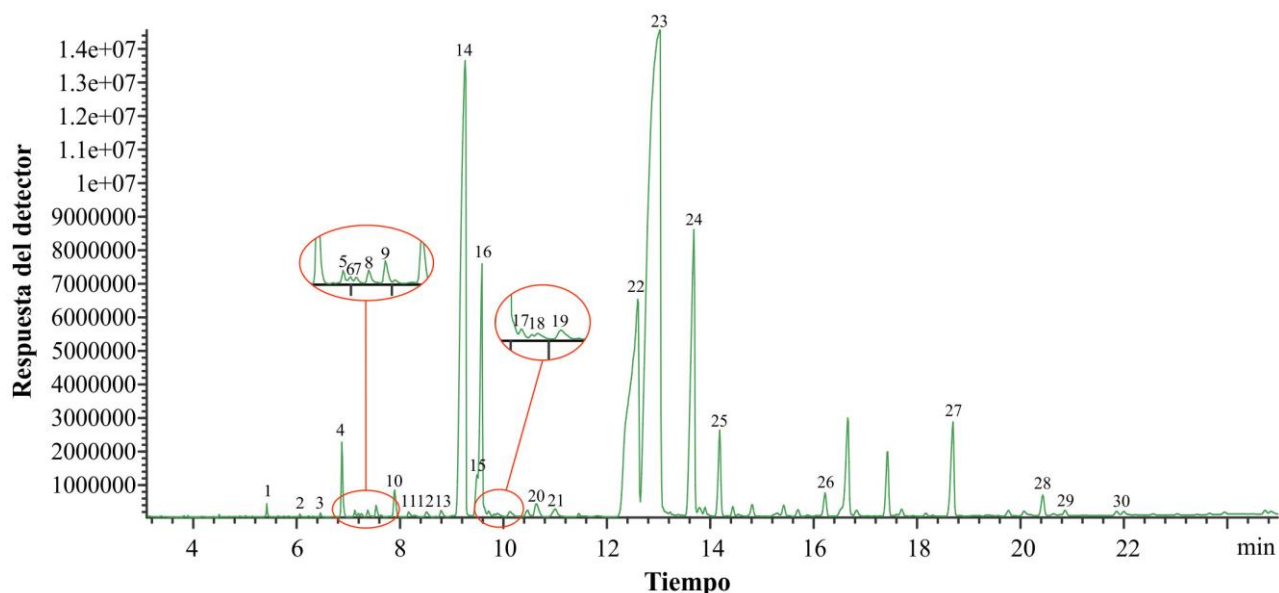


Figura 38: Perfil cromatográfico de los AG del integumento de ninfas de IV estadio de *R. prolixus* a partir de un extracto de los lípidos totales de integumento. Los integumentos fueron disectados 11 días PA; los lípidos totales fueron extraídos mediante la técnica de Folch, los AG se derivatizaron y posteriormente se analizaron por CGC-MS.

Tabla 3: Los ácidos grasos (FAME) del integumento de *R. prolixus*, identificación y abundancia relativa.

Pico ^a	Acido graso	Tx/TrC16:0	A%
1	C12:0 ME	0,58	0,10
2	C13:0 ME	0,65	0,03
3	x-metil C13:0 ME	0,69	0,04
4	C14:0 ME	0,74	0,88
5	x-metil C14:0 ME	0,77	0,06
6	x-metil C14:0 ME	0,77	0,05
7	x-metil C14:0 ME	0,78	0,04
8	x-metil C14:0 ME	0,79	0,09
9	x-metil C14:0 ME	0,81	0,16
10	C15:0 ME	0,85	0,46
11	y-C15:1 ME	0,88	0,10
12	x-metil C15:0 ME	0,92	0,11
13	x-metil C15:0 ME	0,95	0,13
14	C16:0 ME	1,00	16,48
15	7-C16:1 ME	1,02	0,83
16	9-C16:1 ME	1,03	4,17
17	x-metil C16:0 ME	1,04	0,10

18	x-metil C16:0 ME	1,06	0,08
19	x-metil C16:0 ME	1,09	0,16
20	C17:0 ME	1,14	0,39
21	y-C17:1 ME	1,18	0,26
22	C18:0 ME	1,35	14,67
23	9-C18:1 ME	1,40	42,07
24	9,12-C18:2 ME	1,47	7,95
25	6,9,12-C18:3 ME	1,52	1,62
26	C20:0 ME	1,74	0,48
27	5,8,11,14-C20:4 ME	2,01	2,14
28	C22:0 ME	2,20	0,46
29	y-C22:1 ME	2,24	0,11
30	C24:0 ME	2,66	0,08

^a Número de Pico se refiere a los picos marcados en la Figura 38. Tx/TrC16:0 = Tiempo de retención relativo (Tiempo de retención FAME/ Tiempo de retención C16:0). A% = Area del pico en porcentaje. ME: éster metílico. Los prefijos x- e y- representan la posición del grupo metilo y doble enlace, respectivamente (no determinadas).

Efecto del silenciamiento de *RPRC000123* en el perfil de ácidos grasos

Para comprobar si el fenotipo letal de los insectos silenciados con dsRPRC000123 (Figura 37) se correlaciona con alteraciones en los productos de la FAS, se extrajeron los AG e HC de integumento a partir de insectos disectados 14 días luego de la inyección con dsRPRC00123 y dsControl y se analizaron mediante CGC-FID (5 réplicas de 5 insectos cada una).

En la figura 39 se muestran los cambios en las cantidades absolutas de los AG de integumento de los insectos silenciados con dsRPRC000123 y dsControl. Para llevar a cabo las cuantificaciones de AG tanto de integumentos de insectos silenciados con dsRPRC000123 como de insectos control se utilizó el C20:1 como estándar interno. No se incluye la comparación de las cantidades relativas de C13:0, algunos isómeros x-metil C14:0 y del C24:0 entre las muestras silenciadas y control debido a que se encontraron presentes como trazas (<0,1%) lo cual impide una estimación precisa de las correspondientes áreas.

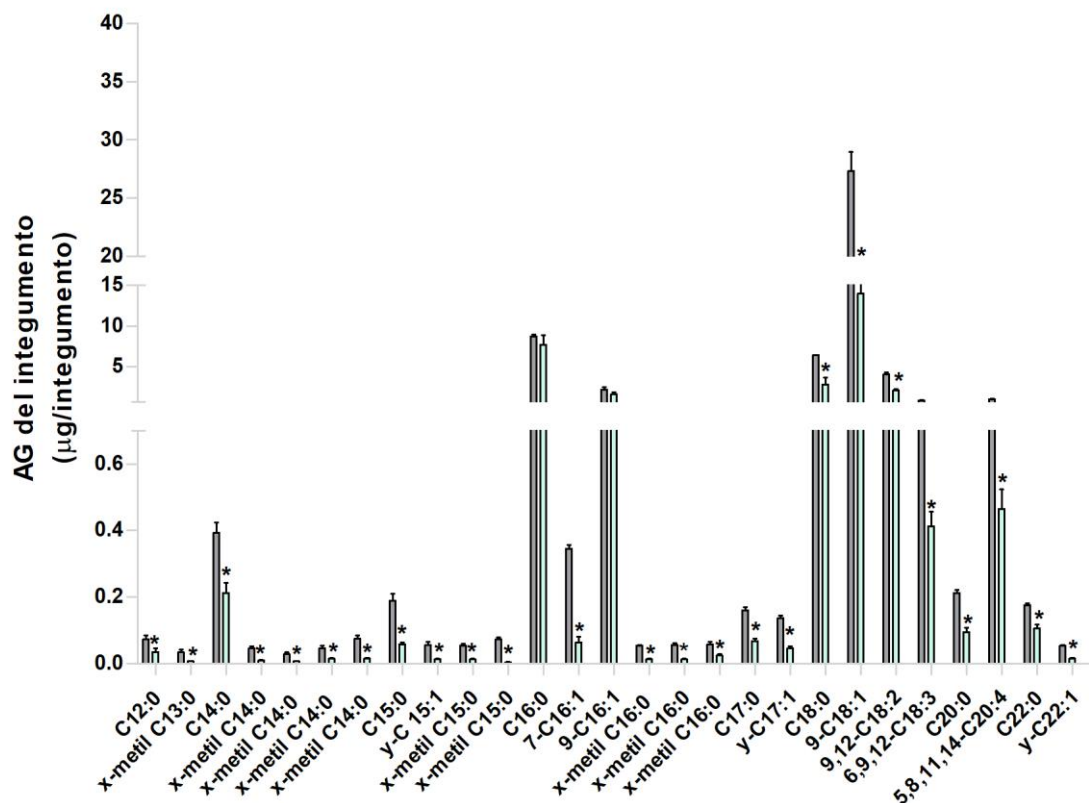


Figura 39: Efecto del silenciamiento de *RPRC000123* en las cantidades relativas de AG del integumento de ninfas de IV estadio de *R. prolixus*. Análisis de los AG constituyentes del integumento de *R. prolixus* en insectos inyectados con dsRPRC000123 (barras celestes) y dsControl (barras grises). Los AG de cadena lineal saturados e insaturados disminuyeron significativamente en los insectos silenciados con dsRPRC000123 respecto de los controles, excepto el C16:0 y el 9-C16:1 que no mostraron diferencias significativas con sus respectivos controles. Los AG metil-ramificados disminuyeron significativamente en los insectos silenciados con dsRPRC000123 respecto de los controles. Las barras de error representan el SE de las medias de 5 réplicas biológicas (5 insectos cada una). El asterisco * indica las diferencias significativas para los diferentes componentes ($P < 0,05$), entre los grupos dsControl y dsRPRC000123, determinado por una prueba de Student a una cola entre muestras independientes.

Las cantidades relativas de los AG de cadena lineal, excepto en el caso del C16:0 y 9-C16:1, y las cantidades relativas de los AG metil-ramificados fueron significativamente menores en los insectos silenciados con *RPRC000123* respecto de los controles. La cantidad de AG totales fue significativamente menor en insectos silenciados con *RPRC000123* ($34,04 \pm 3,55 \mu\text{g} / \text{integumento}$) respecto de los controles ($53,26 \pm 2,44 \mu\text{g} / \text{integumento}$) (Figura 40A). La fracción de AG lineales disminuyó significativamente en los insectos silenciados con *RPRC000123* ($33,93 \pm 3,54 \mu\text{g} / \text{integumento}$) en comparación con los controles ($52,85 \pm 2,44 \mu\text{g} / \text{integumento}$) (Figura 40B). La fracción de AG ramificados mostró una reducción estadísticamente muy significativa en los insectos silenciados con *RPRC000123* ($0,11 \pm 0,01 \mu\text{g} / \text{integumento}$) en comparación

con los controles ($0,41 \pm 0,05 \mu\text{g} / \text{integumento}$) (Figura 40C).

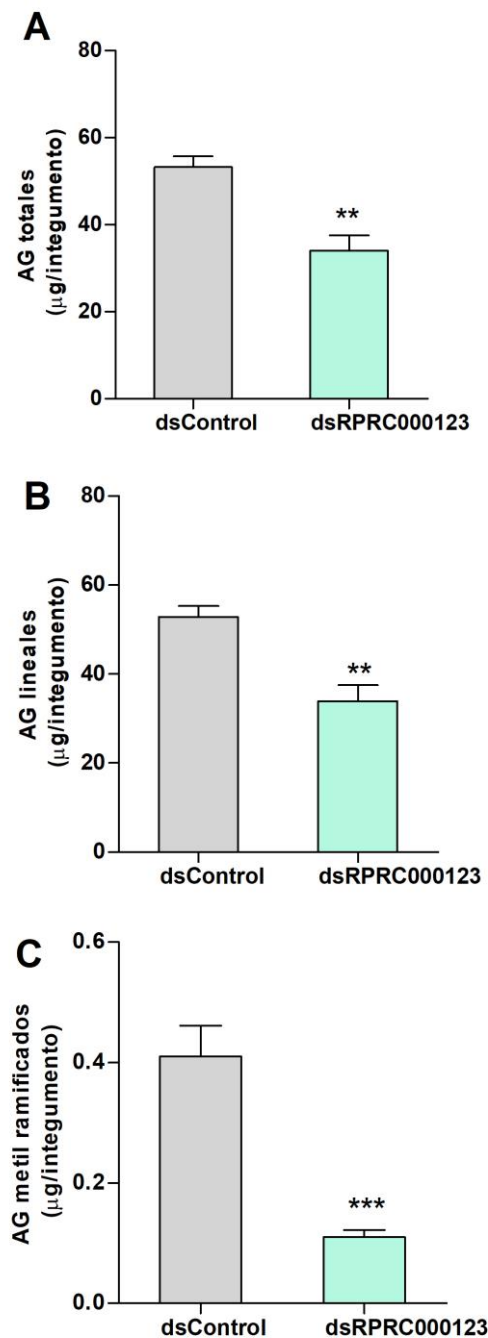


Figura 40: Efecto del silenciamiento de *RPRC000123* en el contenido de AG del integumento abdominal de ninfas de IV estadio de *R. prolixus*. Ninfas de IV estadio fueron inyectadas con dsRPRC000123 y dsControl y 14 días después, se extrajeron los integumentos y se analizaron los AG por CGC-FID. Los AG totales (A) se redujeron significativamente un 36%. Los AG lineales (B) disminuyeron significativamente un 36%. Los AG metil-ramificados (C) se redujeron significativamente un 73%. Los AG se expresan en microgramos (μg) por integumento. Las barras de error representan el SE de las medias de 5 réplicas biológicas (5 insectos cada una). Los asteriscos **, *** por encima de las barras indican las diferencias significativas $P < 0,01$ y $0,001$ respectivamente, entre los grupos dsControl y dsRPRC000123, determinado por una prueba de Student a una cola entre muestras independientes

Efecto del silenciamiento de *RPRC000123* en el perfil de hidrocarburos

Los HC del integumento de *R. prolixus* se obtuvieron a partir de ninfas de IV estadio, a los 11 días PA (3 réplicas de 5 insectos cada una). El análisis cuantitativo de los mismos se realizó mediante CGC-FID y la identificación mediante CGC-MS.

El análisis por CGC-MS mostró una serie continua de HC lineales saturados de C₂₃ a C₃₃, junto con una gran cantidad de HC mono, di, tri y tetra- metil ramificados de C₂₃ a C₅₁ (Figura 42). El 90% del total de HC corresponde a cadenas mono, di, tri y tetra- metil ramificadas, donde los isómeros dimetil-C₃₇, 39, 41, 43 y 45 constituyen el 55% de los mismos. El resto de los HC metil-ramificados representan el 30% del total de HC. La identificación de la mayoría de los HC internos y cuticulares de *R. prolixus* ya ha sido publicada (Juárez y col., 2001). Sin embargo, la posibilidad de contar en la actualidad con equipos más modernos y columnas cromatográficas de altas temperaturas, capaces de operar hasta 350°C, permitió la identificación de nuevos componentes. En este trabajo se identificaron nuevos HC de la serie mono, di, tri y tetra-metil ramificados de C₄₃, 45, 47, 49 y 51 en el esqueleto carbonado.

Los componentes mayoritarios están representados por los isómeros dimetil-ramificados de cadena impar de la serie 5, X- y 7, X- (X= 17, 19, 21). Es característico la presencia de isómeros trimetil-ramificados de cadena impar de las series 7,X,Y- y 9,X,Y- (X=11,13; Y= 21,23). Por último, los isómeros monometil-ramificados y aquellos con número par de carbonos representan componentes minoritarios.

Se detalla a continuación el espectro de masa del isómero 5,7-dimetil C₄₃ del integumento de *R. prolixus*:

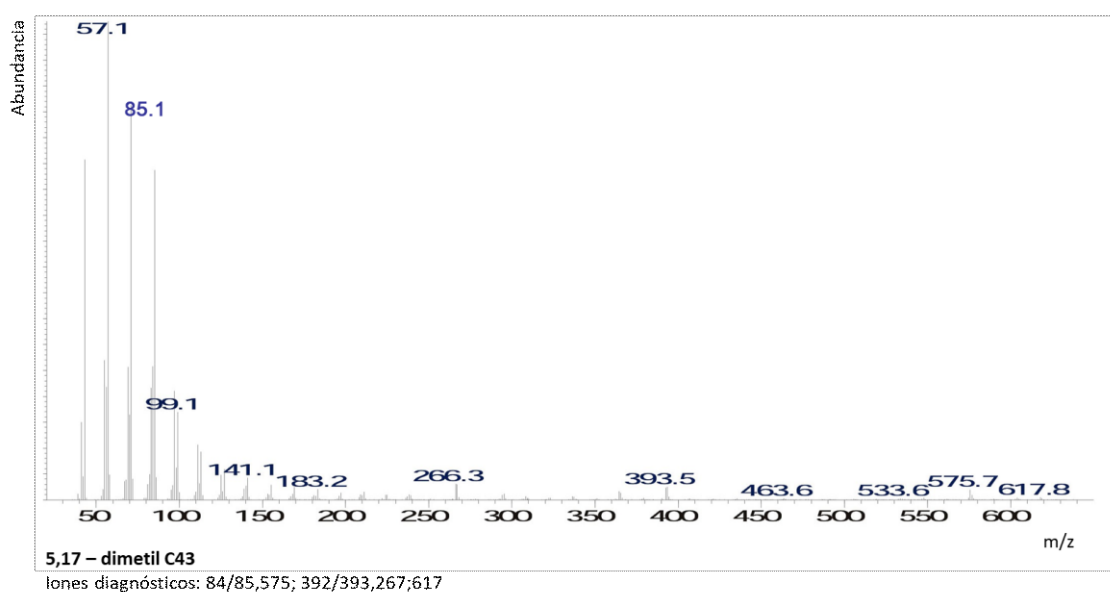


Figura 41: Espectro de masa e iones diagnósticos del hidrocarburo 5,7-dimetil C₄₃ del integumento de *R. prolixus*

La cantidad absoluta de dicha serie ($71,20 \pm 5,64$ ng / integumento) representa el 29% del total de HC.

La fracción lineal constituye el 10% de los HC totales de integumento representando los HC C27, 29, 31 y 33 el 8% de los mismos. El resto de los HC lineales saturados representan el 2%.

A continuación, se estudió el efecto del silenciamiento del gen *RPRC000123* en el contenido de los HC del integumento de las ninfas. En la figura 42 se muestran los cambios en las cantidades absolutas de los HC de integumento en los insectos silenciados con dsRPRC000123 en comparación con los inyectados con dsControl.

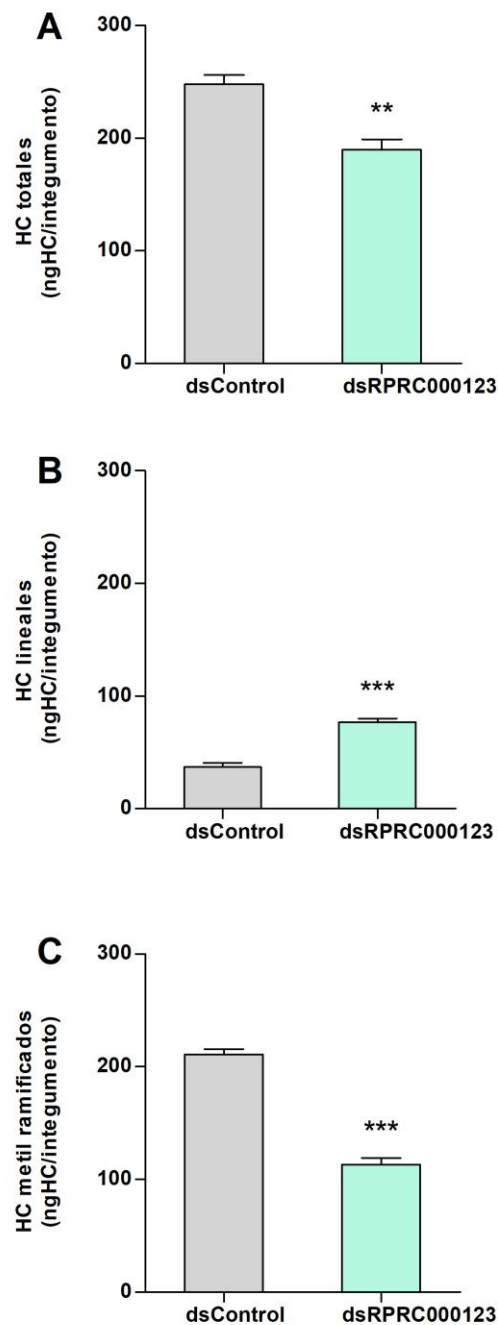


Figura 42: Efecto del silenciamiento de *RPRC000123* en el contenido de HC del integumento abdominal de ninfas de IV estadio de *R. prolixus*. Ninfas de IV estadio fueron inyectadas con dsRPRC000123 y dsControl y 11 días después se extrajeron los integumentos y se analizaron los HC por GC-FID. Los HC totales (A) se redujeron significativamente un 23%. Los HC metil-ramificados (C) se redujeron significativamente 46%. Los HC lineales (B) aumentaron significativamente 106%. Los HC se expresan en nanogramos (ng) por integumento. Las barras de error representan el SE de las medias de 3 réplicas biológicas (5 insectos cada una). Los asteriscos **, *** indican las diferencias significativas $P < 0,01$ y $0,001$ respectivamente, entre los grupos dsControl y dsRPRC000123, determinado por una prueba de Student a una cola entre muestras independientes.

La cantidad de HC total del integumento disminuyó significativamente en las ninfas silenciadas con dsRPRC000123 ($189,93 \pm 9,22$ ng / integumento) en comparación con las ninfas control ($248,02 \pm 8,30$ ng / integumento) (Figura 42A). Una reducción significativa de la cantidad de HC metil ramificados en las ninfas silenciadas con dsRPRC000123 ($113,06 \pm 6,06$ ng / integumento) en comparación con las muestras control ($210,87 \pm 4,82$ ng / integumento) explica la disminución HC totales (Figura 42C); esta fracción representa el 90% de los HC de integumento. La presencia de una cantidad significativa de HC lineales insaturados (19% del total de HC) en los insectos silenciados con dsRPRC000123, ausentes en los controles (Figura 43) explica en parte el aumento significativo de la cantidad de HC lineales totales en las ninfas silenciadas con dsRPRC000123 ($76,86 \pm 3,16$ ng / integumento) en comparación con los controles ($37,14 \pm 3,63$ ng / integumento) (Figura 42B).

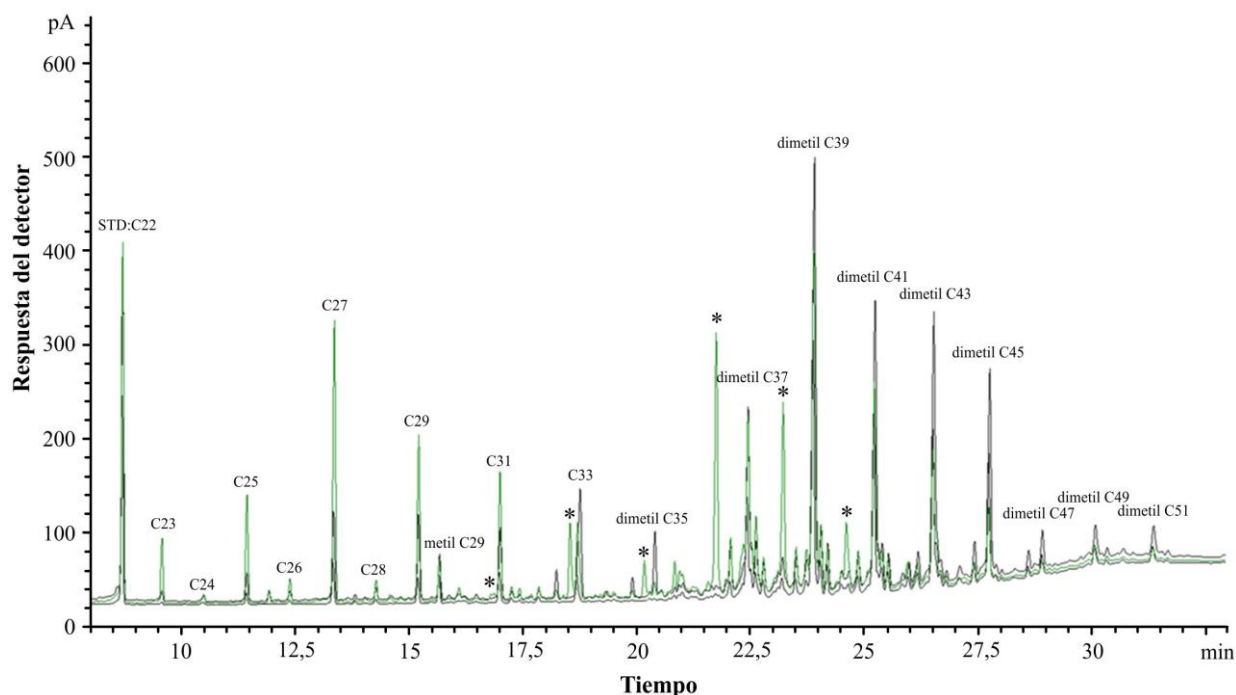


Figura 43: Perfil cromatográfico de los HC del integumento de ninfas de IV estadio de *R. prolixus*. Análisis comparativo del perfil cromatográfico de los HC de los insectos

silenciados con dsRPRC000123 (picos verdes) superpuesto con el perfil cromatográfico de los HC de los insectos inyectados con dsControl (picos negros). El hidrocarburo por encima de los picos indica el más abundante de la serie. El asterisco * en los picos verdes señala los HC lineales insaturados de los insectos silenciados con dsRPRC000123 significativamente aumentados en relación a los controles.

Efecto del silenciamiento de *RPRC000123* en insectos expuestos a condiciones de alta H.R.

Con el fin de investigar si la muerte de las ninfas silenciadas con dsRPRC000123 (Figuras 37 y 44A) al mudar a V estadio estaba relacionada con pérdida de agua a través de la cutícula, se expuso a los insectos inyectados con dsRPRC000123 y dsControl a condiciones de elevada H.R.

Las ninfas de IV estadio inyectadas con dsRPRC000123 y dsControl se colocaron en una cámara húmeda (96% H.R., 27°C) 3 días antes de su muda a V estadio. Bajo estas condiciones, tanto las ninfas silenciadas con dsRPRC000123 como los controles sobrevivieron luego de la muda, esclerotizaron y oscurecieron la cutícula (Figura 44B). Transcurridas 48-72 hs, se observó que todos los insectos inyectados con dsControl sobrevivieron normalmente, mientras que el 25% de las ninfas silenciadas con dsRPRC000123 murieron aún en dichas condiciones de alta H.R. Posteriormente, se colocaron los insectos inyectados con dsControl y los insectos vivos silenciados con dsRPRC000123 en las condiciones estándares del insectario (45% H.R., 27°C) y se registró la mortalidad de los mismos a lo largo del tiempo. Todos los insectos silenciados con dsRPRC000123 murieron al cabo de 50 hs mientras que los insectos control sobrevivieron normalmente (Figura 45).

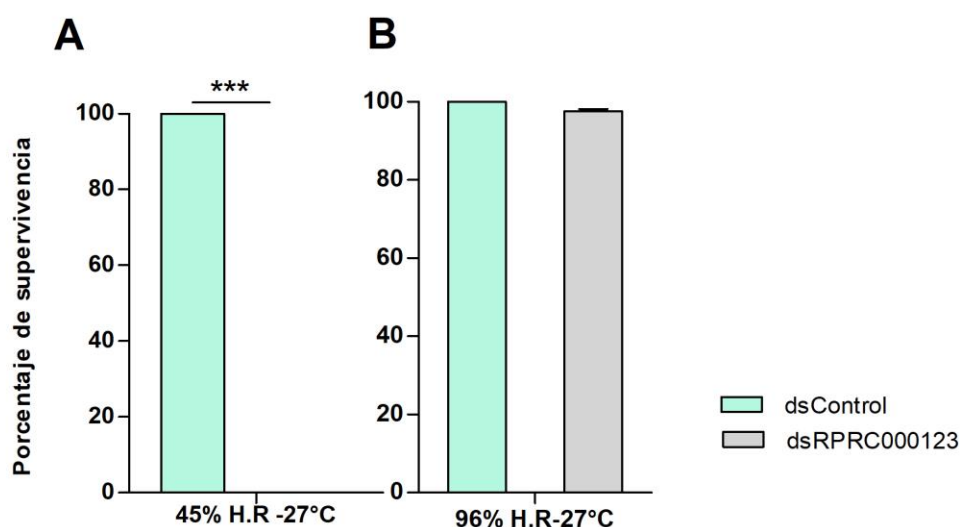


Figura 44: Supervivencia de ninfas de V estadio inyectadas con dsRPRC000123 y

dsControl expuestas a diferentes condiciones de H.R. Cuando los insectos inyectados con dsRPRC000123 y dsControl mantenidos en las condiciones estándar del insectario (45% H.R, 27°C) mudaron a V estadio, las ninfas silenciadas con dsRPRC000123 murieron entre las 0-4 hs posteriores a la muda, mientras que las ninfas inyectadas con dsControl sobrevivieron normalmente después de la muda (A). Cuando ambos grupos de insectos se colocaron en una cámara húmeda (96% H.R., 27°C) 3 días antes de la muda, las ninfas silenciadas con dsRPRC000123 mudaron, esclerotizaron y oscurecieron la cutícula al igual que los controles. Luego de aproximadamente 48-72 hs, el 25% de los insectos silenciados murió en condiciones de elevada H. R., mientras que los controles permanecieron vivos por más tiempo (n = 45 para cada condición) (B). Los asteriscos *** indican una diferencia significativa entre el control y las ninfas silenciadas con dsRPRC000123, determinada por una prueba t de Student de una cola entre muestras independientes (P<0,001).

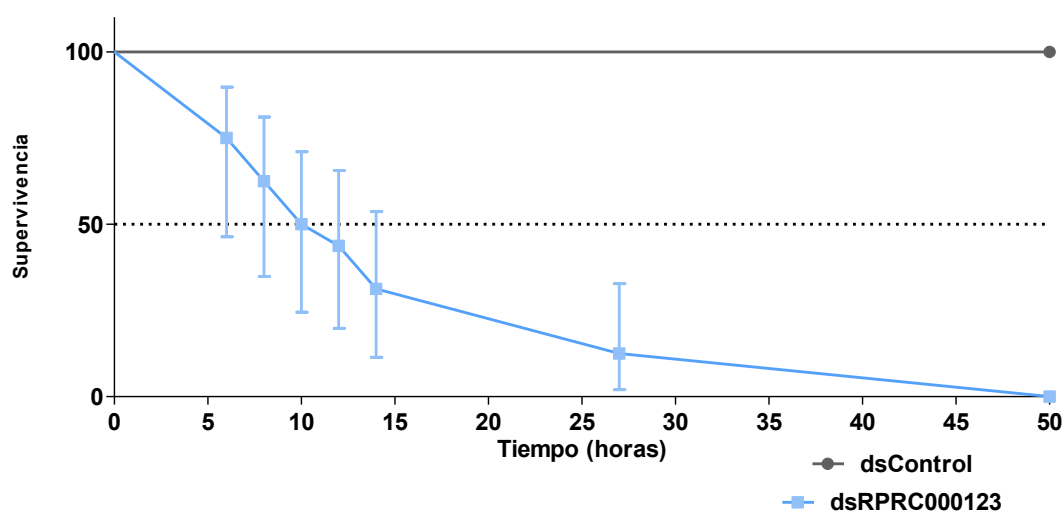


Figura 45: Porcentaje de supervivencia en ninfas de V estadio de *R. prolixus* inyectadas con dsRPRC000123 y dsControl a 45% H.R, 27°C. Ninfas V inyectadas con dsRPRC000123 y dsControl fueron colocadas en las condiciones estándar del insectario (45% H.R, 27°C) luego de permanecer vivas 3 días posteriormente a la muda dentro de la cámara húmeda (96% H.R., 27°C), y se registró la mortalidad cada dos horas. Los insectos silenciados con dsRPRC000123 (línea celeste) murieron durante las siguientes 50 hs, mientras que los controles (línea gris) sobrevivieron en un 100% al cabo de 50 hs. De acuerdo con el análisis de sobrevivencia de Kaplan Meier se estimó el tiempo medio de sobrevivencia (ST50) de 11 horas en los insectos silenciados. El 100% de los insectos control se retiraron vivos finalizado el estudio. Según la prueba de rango logarítmico (log-rank) se registraron diferencias significativas entre los insectos silenciados con dsRPRC000123 (línea celeste) y los insectos control (línea grises) ($\chi^2=35,17$, $df=1$, $P<0,0001$, 16 insectos para cada condición).

Alteraciones epicuticulares en insectos silenciados con dsRPRC000123

Con el fin de comprobar si la reducción de la tolerancia a la desecación de los insectos silenciados por dsRPRC000123 podía deberse a una disminución en la capa lipídica de la epicutícula, se analizó mediante MEB la superficie cuticular de ninfas V control, ninfas V con el gen *RPRC000123* silenciado, muertas tras mudar, y ninfas V control cuyos lípidos epicuticulares fueron removidos con hexano inmediatamente después de la

muda. Todos los insectos fueron mantenidos en condiciones estándar del insectario (45% H.R., 27°C). Las fotomicrografías revelan una película delgada y con algunas fracturas sobre la superficie cuticular que corresponde a la capa lipídica epicuticular en los insectos inyectados con dsControl (Figura 46A). Dicha capa no se visualiza ni en los insectos control lavados con hexano (Figura 46B) ni en los insectos silenciados con dsRPRC000123 (Figura 46C).

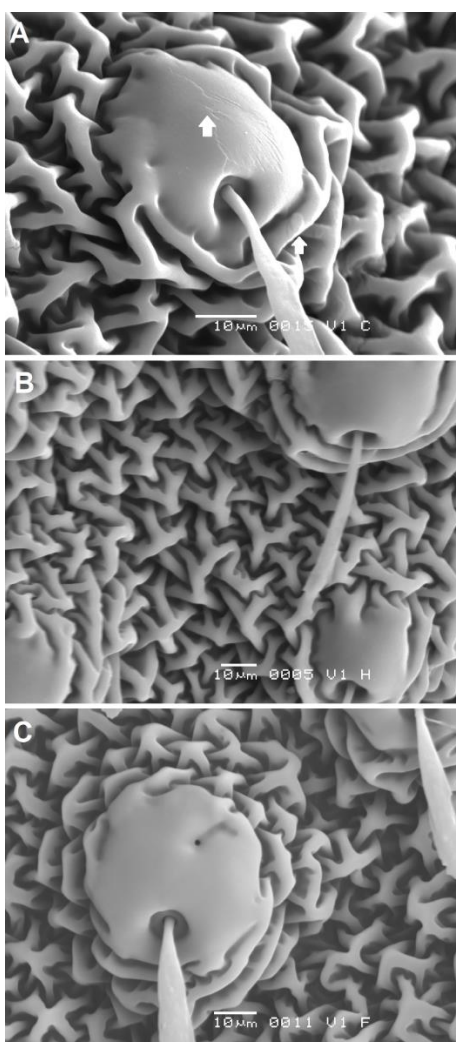


Figura 46: Imágenes de MEB de la superficie epicuticular dorso abdominal de ninfas V de *R. prolixus*. Estas fotomicrografías se obtuvieron a partir de ninfas V recién mudadas, que habían sido previamente inyectadas en IV estadio con dsControl (A), deslipidizadas por lavado con hexano (B) e inyectadas con dsRPRC000123 (C). Las flechas en la imagen A señalan una capa delgada y cerosa de lípidos presente sobre el patrón cuticular estrellado de las ninfas inyectadas con dsControl; esta capa está ausente en las imágenes B y C de los insectos control lavados con hexano y silenciados con dsRPRC000123, respectivamente (n = 3 para cada condición).

Expresión diferencial del receptor de lipoforina (*RPRC011390*) en el integumento de *Rhodnius prolixus* en función del estado alimentario.

Estudios previos han demostrado que los oenocitos de *D. melanogaster* acumulan gotas lipídicas durante el ayuno (Gutierrez y col., 2007). Fotomicrografías recientes realizadas en el INIBIOLP mostraron la presencia de gotas lipídicas en oenocitos en ninfas de IV estadio de *R. prolixus* en dichas condiciones (Dulbecco y col, no publicado). A partir de estas evidencias, se midió la expresión génica relativa del gen que codifica el receptor de lipoforina (*RPRC011390*) en el integumento de ninfas de IV estadio de *R. prolixus* en condiciones de ayuno y en insectos alimentados con el objetivo de investigar el posible transporte de lípidos desde la hemolinfa hacia los oenocitos.

Un grupo de insectos se mantuvo en ayuno desde el momento de la muda a IV estadio y los integumentos fueron disectados a los 2, 6 y 19 días PM. Otro lote de insectos se alimentó al día 10 PM y los integumentos se disectaron a los 2, 4, 9 y 12 días PA.

En la figura 47 se muestra que la expresión del transcripto *RPRC011390* es significativamente mayor en las condiciones de ayuno en comparación con los insectos alimentados.

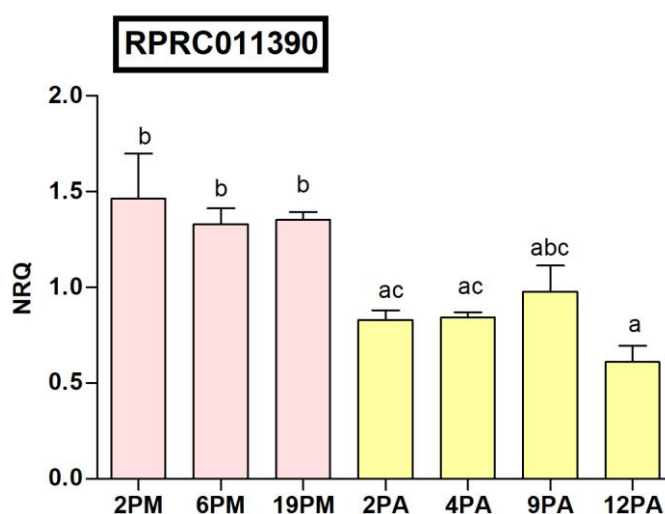


Figura 47: Expresión relativa de *RPRC011390* en el integumento de ninfas de *R. prolixus* a lo largo del IV estadio ninfal. Se midió la expresión génica relativa de *RPRC011390* en el integumento de ninfas de IV estadio de *R. prolixus* a los 2, 6, y 19 días PM en condiciones de ayuno (barras rosas) y a los 2, 4, 9, 12 PA en condiciones de alimentación (barras amarillas). NRQ se estimó utilizando β -actina y *EF-1* como genes de referencia. Las barras de error representan el SE de las medias de 4 réplicas biológicas (4 insectos cada una). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre los días medidos ($P < 0,05$; ANOVA de un factor; seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey).

Efecto del silenciamiento de *RPRC000123* en la expresión génica del receptor de lipoforina (*RPRC011390*)

Con el objetivo de estimar si la ausencia de variación en las cantidades relativas de los

AG de C16:0 y 9-C16:1 del integumento de los insectos silenciados con dsRPRC000123 respecto a los insectos control se debía al transporte de lípidos desde la hemolinfa hacia el integumento se midió la expresión del gen que codifica para el receptor de lipoforina (*RPRC011390*) en el integumento de insectos inyectados con dsRPRC000123 y dsControl a los 12 días PA.

La medición por RT-qPCR de la expresión relativa de *RPRC011390* en insectos silenciados con dsRPRC000123 en comparación con insectos control no mostró diferencias estadísticamente significativas (Figura 48).

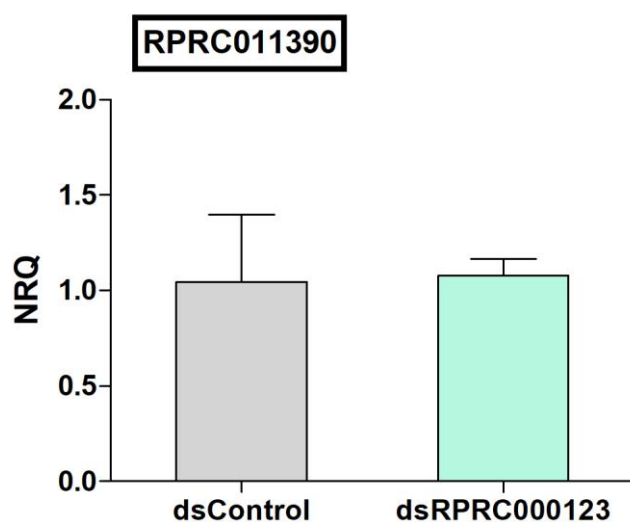


Figura 48: Expresión relativa de *RPRC011390* en el integumento de ninfas de *R. prolixus*. Se midió por RT-qPCR la expresión génica relativa del transcrito *RPRC011390* en el integumento de insectos silenciados con dsRPRC000123 (barras celestes) en comparación con los controles (barras grises) a los 12 días PA. NRQ se estimó utilizando β -actina y *EF-1* como genes de referencia. Las barras de error representan el SE de las medias de 4 réplicas biológicas (4 insectos cada una). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los insectos silenciados con dsRPRC000123 y los controles ($P > 0,05$; prueba t de Student a una cola entre muestras independientes; $N=3$).

Efecto del silenciamiento de *RPRC000123* en la expresión génica de las citocromo P450 de la familia 4G (*RPRC003227* y *RPRC013847*)

A fin de interpretar el aumento del contenido de HC lineales en los insectos silenciados con dsRPRC000123 respecto de los insectos control se midió la expresión relativa de los genes que codifican las enzimas CYP4G de *R. prolixus* (*RPRC003227* (*CYP106*) y *RPRC013847* (*CYP107*)), las cuales están involucradas en el paso final de la síntesis de HC (Qiu y col., 2012; Balabanidou y col., 2016). Ambos genes se sobreexpresaron en insectos silenciados con dsRPRC000123 respecto de los controles (*CYP106*, 241%

± 40%; *CYP107*, 161%± 14,5%) (Figura 49).

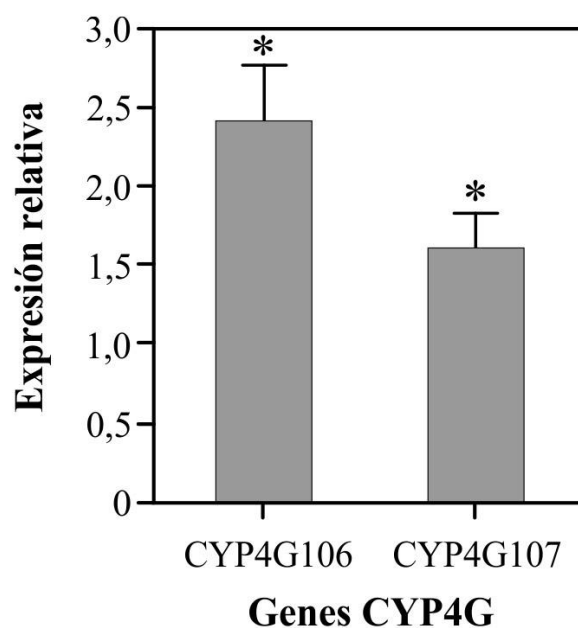


Figura 49: Expresión relativa de los genes CYP4G en el integumento de ninfas de *R. prolixus*. Se midió por RT-qPCR la expresión génica relativa de los transcritos *CYP4G106* y *CYP4G107* en el integumento de insectos silenciados con dsRPRC000123 e inyectadas con dsControl en muestras disectadas a los 4 días PA. Se utilizó β -actina y *EF-1* como genes de referencia. Las barras de error representan el SE de las medias de 4 réplicas biológicas (4 insectos cada una). El asterisco * indica la diferencia significativa entre los insectos silenciados con dsRPRC000123 y los controles ($P > 0,05$; prueba t de Student a una cola entre muestras independientes).

Discusión

Caracterización molecular de los genes FASN de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*

Análisis bioinformático de los genes FASN

Las FASs de insectos son las responsables de la biosíntesis de AG, esenciales para el metabolismo energético y precursores de los lípidos. En particular, los lípidos cuticulares son los principales responsables de la impermeabilización de la cutícula y participan en la comunicación química (Cocchiararo-Bastias y col., 2011; Wicker-Thomas y col., 2015). Los genes FAS de insectos parecen haber sufrido un proceso de especialización a través de la expansión génica y una expresión específica en distintos tejidos.

Las FASs de *R. prolixus* y *T. infestans*, al igual que todas las FASs de animales, se organizan en distintos dominios proteicos ordenados funcionalmente desde extremo amino terminal al carboxilo terminal en: KS, MAT, DH, ER, KR, ACP, TE. Entre los dominios DH y ER se encuentra una región sin actividad catalítica, la región central, que juega un rol relevante en el mantenimiento de la integridad del homodímero (Smith y col., 2003) (Figuras 28 y 30).

Estudios filogenéticos previos mostraron la aparición de modificaciones en uno o más dominios específicos de las secuencias FAS, tales como el truncamiento o la pérdida completa de los mismos. La pérdida de MAT evolucionó independientemente en al menos tres órdenes de insectos (Orthoptera, Coleoptera, Diptera). Las secuencias FAS de tucuras del género *Chorthippus* mostraron la ausencia del dominio MAT y modificaciones en los dominios DH, ER, KR, PP y TE (Finck y col., 2016). Modificaciones en la arquitectura de los dominios de *T. castaneum* y el escarabajo *Colaphellus bowringi*, (Tan y col., 2017) y la ausencia de los dominios MAT, PP y TE en tres secuencias de *B. germanica* (Pei y col., 2019) sugieren que la organización estructural de las secuencias FAS podría estar asociada a diferentes funciones de los genes.

El análisis bioinformático de los genes FASN en *R. prolixus* -realizado en este trabajo de tesis- muestra que, debido a su tamaño, los genes FASN ocupan dos contigs dentro del genoma, y la ausencia de algunos dominios (MAT y TE en *RPRC000123*, TE en *RPRC002909* y ACP y TE en *RPRC000269*) podría deberse al resultado de errores en el ensamblaje y la anotación del genoma (Mesquita y col., 2015). De hecho, el dominio TE del gen *RPRC000269* fue anotado automáticamente como un gen independiente (*RPRC000391*) en el genoma (Moriconi y col., 2019). Nuestros resultados mostraron un alto grado de similitud entre la secuencia de este gen y la región correspondiente al dominio TE del gen *KY797274* obtenido en *T. infestans*.

El análisis filogenético de las secuencias FAS de insectos (Finck y col., 2016) agrupó a los genes FASN en tres clusters (cluster I, cluster II y cluster III). Estos resultados sugieren que la duplicación de un gen ancestral común a todos los insectos pterigotos habría evolucionado en dos clados (cluster I y cluster II) que contienen los siete dominios proteicos característicos del complejo FAS. En muchos órdenes de insectos, estas dos copias habrían experimentado eventos de duplicación específicos originando expansiones independientes dentro de la familia FASN. En varios órdenes de insectos, la pérdida de MAT constituyó la modificación estructural más frecuente dentro del cluster II. Las secuencias FAS del cluster III presentan modificaciones en los dominios DH, ER, KR, PP y TE. Estas evidencias sugieren que dichas secuencias habrían evolucionado

independientemente a partir de duplicaciones específicas de secuencias FAS del cluster II (Finck y col., 2016).

El análisis filogenético de secuencias FAS de insectos que contienen los oenocitos asociados al integumento (Figura 29) (Moriconi y col., 2019) reunió a los genes FASN en dos clados. El Clado I agrupó los ortólogos de *D. melanogaster* *FASN1* y *FASN2* (CG3523 y CG3524, respectivamente). Asimismo, las secuencias que reúnen a los triatomíneos y a *Cimex lectularius* parece haber divergido del resto de las FASs, incluyendo las de otros hemípteros como *Acyrtosiphon pisum*.

El Clado II está constituido por genes FASN ortólogos de la *FASN3* (CG17374) de *D. melanogaster* y secuencias FAS de otros insectos. Llamativamente los genes de otras especies usadas como grupos externos, que abarcan arañas, ácaros, crustáceos, nematodos y hasta mamíferos se agrupan en conjunto con el Clado I, lo que sugiere que el Clado II podría agrupar genes específicos de insectos. El grado de similitud entre las secuencias FAS de *T. infestans* y *R. prolixus* sugiere que tanto los genes *KY797274* (*FASN1*) y *RPRC000269* como los genes *KY805857* (*FASN3*) y *RPRC000123* serían genes ortólogos (Figura 29) (Calderón-Fernández y col., 2017; Moriconi y col., 2019).

Recientemente, el análisis filogenético de los siete genes FASN de *B. germanica* agrupó a las secuencias en cinco clusters, de acuerdo con la organización de los dominios. La ausencia o irregularidades de los dominios AT y TE en los clusters III, IV, V sugiere que estas diferencias podrían deberse a la existencia de una especialización de las funciones biológicas de los genes FASN de *B. germanica* (Pei y col., 2019).

Los genes FASN de diversas especies de insectos se ubican en tandem, tales como los de *D. melanogaster* (CG3523 (*FASN1*) y CG3524 (*FASN2*), <http://flybase.org/>), *Tribolium castaneum* (TC015337 y TC015339, <http://beetlebase.org/>), *Anopheles gambiae* (AGAP028049 y AGAP008468, <https://www.vectorbase.org/organisms/anopheles-gambiae>) y *R. prolixus* (*RPRC000269* y *RPRC002909*, https://www.vectorbase.org/organisms/Rhodnius-prolixus_), lo que refuerza la idea de eventos de expansión génica y duplicación con la adquisición de nuevas funciones (Finck y col., 2016; Majerowicz y col., 2017).

Análisis de expresión diferencial de los genes FASN de *R. prolixus* y *T. infestans* en distintos órganos y tejidos

En insectos, los genes FASN se expresan principalmente en cuerpo graso y oenocitos. Respecto a la expresión de estos genes, el tejido adiposo y células hepáticas de mamíferos podrían ser considerados análogos (Gutierrez y col., 2007; Parvy y col.,

2012). La expresión diferencial de los genes FASN de insectos en distintos órganos y tejidos podría estar asociada a diferencias funcionales del complejo FAS.

El cuerpo graso juega un rol esencial en la síntesis de AG y almacenamiento de los lípidos como triglicéridos de reserva (Arrese y col., 2001). Los primeros estudios bioquímico funcionales revelaron que la FAS de cuerpo graso de *D. melanogaster* poseía un requerimiento específico de malonil-CoA, -como unidad elongante de 2 carbonos- durante la biosíntesis de AG (De Renobales y col., 1986).

La evidencia de actividad de FAS en la fracción citosólica y microsomal del integumento de insectos, fue demostrada por primera vez en *B. germanica* y *T. infestans* (Juárez y col., 1992, 1996). La capacidad de las FASs del integumento de incorporar además del malonil-CoA, metilmalonil-CoA como unidad elongante, en contraste con la FAS del cuerpo graso, evidenciaba ya en esos estudios iniciales la existencia de distintas isoformas con funciones específicas.

Estudios de hibridación *in-situ* de ARN de los tres genes FASN de *D. melanogaster*, CG3523 (*FASN1*), CG3524 (*FASN2*) y CG17374 (*FASN3*), mostraron que CG3523 se expresa en cuerpo graso mientras que CG3524 y CG17374 se expresan en los oenocitos, asociados al integumento (Chung y col., 2014). El silenciamiento mediante ARNi de los genes FASN de *D. melanogaster* sugiere que el gen CG17374 expresado en oenocitos participaría en la impermeabilidad del sistema traqueal (Parvy y col., 2012), el gen CG3524 codificaría para la FAS de oenocitos responsable de la síntesis de CHC metil-ramificados (Chung y col., 2014) y el gen CG3523 expresado en cuerpo graso modularía la acumulación de triglicéridos de reserva (Garrido y col., 2015); se ha propuesto que los AG sintetizados en el cuerpo graso podrían constituir un pool adicional de precursores usados en los oenocitos para la síntesis de CHC (Wicker-Thomas y col., 2015).

Recientemente, el análisis de expresión génica de los siete genes FASN de *B. germanica* (*BgFas1-7*) mostró que *BgFas1*, *BgFas3*, *BgFas4* y *BgFas7* exhiben elevados niveles de expresión en integumento, mientras que *BgFas2* se expresa principalmente en cuerpo graso. El silenciamiento mediante ARNi del gen *BgFas1*, agrupado en el cluster II, sugiere que este gen cumpliría un rol esencial en la síntesis de CHC metil-ramificados y ácidos grasos cuticulares (Pei y col., 2019).

El análisis de la expresión génica de los transcritos FASN de *R. prolixus* y *T. infestans* realizado en este trabajo de tesis (Figuras 31 y 32) mostró que la expresión génica del transcrito *RPRC000269* de *R. prolixus* y *KY797274* de *T. infestans*, predomina significativamente en cuerpo graso y que los genes *RPRC000123* y *RPRC002909* de *R.*

prolixus y KY805857 de *T. infestans* se expresan principalmente en el integumento. No fue posible la amplificación de la secuencia FAS de *T. infestans* ortóloga del gen *RPRC002909* de *R. prolixus*. Ensayos posteriores realizados en este trabajo de tesis mostraron una mínima expresión del gen *RPRC002909* en ninfas de *R. prolixus* a los 4 días PA (Figura 34B).

La presencia de dos dominios transmembrana en el gen *RPRC002909* y los elevados niveles de expresión génica del transcrito en el integumento de *R. prolixus* sugiere que dicho gen sería ortólogo del gen que codifica para la proteína ortóloga de FAS obtenida en la fracción microsomal de *B. germanica*, *M. domestica* y *T. infestans* (Juárez y col., 1992,1996; Gu y col., 1997). El gen *BgFas1* de *B. germanica* codificaría para dicha FAS microsomal (Pei y col., 2019). La ausencia de los dominios transmembrana en el gen KY805857 de *T. infestans* y en el gen *RPRC000123* de *R. prolixus*, y los elevados niveles de expresión de los transcritos en el integumento, sugiere que dichos genes codificarían para la proteína ortóloga de FAS obtenida en la fracción citosólica del integumento (Juárez y col., 1992,1996).

Análisis de expresión diferencial de los genes FASN de *R. prolixus* y *T. infestans* a lo largo del IV estadio ninfal.

El cuerpo graso lleva a cabo muchas de las funciones de almacenamiento y utilización de nutrientes, almacenamiento de lípidos y glucógeno y metabolismo lipídico relacionadas con las del tejido adiposo e hígado de mamíferos (Arrese y Soulages, 2010). En *D. melanogaster* se ha demostrado que los oenocitos expresan genes ortólogos a los de hepatocitos de mamíferos, asociados al metabolismo lipídico. Los oenocitos juegan un rol esencial en la síntesis de HC y otros lípidos cuticulares (Fan y col., 2003; Gutierrez y col., 2007). Estas evidencias sugieren la existencia de rutas metabólicas similares (Gutierrez y col., 2007).

Fotomicrografías de oenocitos de larvas de *D. melanogaster* mostraron una acumulación de gotas lipídicas en el oenocito durante el ayuno. Estudios moleculares revelaron que moléculas señalizadoras que modulan la disponibilidad de nutrientes del cuerpo graso, también regulan la acumulación de lípidos en oenocitos. Estas evidencias sugieren una relación metabólica lipídica bidireccional entre los oenocitos y el cuerpo graso (Gutierrez y col., 2007).

Los triglicéridos son transportados como DAG por la lipoforina, desde cuerpo graso hacia las células musculares, ovarios, células epidérmicas y oenocitos. La lipoforina descarga los DAG en las células de los tejidos diana y estos componentes son hidrolizados. La β - oxidación de AG asegura la generación de los metabolitos necesarios

para la obtención de energía y la utilización en vías catabólicas (Klowden, 2007). En oenocitos de *D. melanogaster* se ha reportado la expresión de dos genes (*CG31094* y *CG31092*) que codifican para los respectivos receptores de lipoforina, LpR1 y LpR2 (Gutierrez y col., 2007). Estudios moleculares posteriores sugieren que la inanición induciría la expresión de LpR2 requerido para la incorporación de gotas lipídicas en los oenocitos de *D. melanogaster* (Parvy y col., 2012).

La mayor expresión génica del receptor de lipoforina (*RPRC011390*) en el integumento de ninfas de IV estadio de *R. prolixus* sin alimentar respecto a las alimentadas (Figura 47) sugiere un aumento del ingreso de lípidos al integumento desde la hemolinfa durante el ayuno. Esta evidencia, que coincide con lo observado en *D. melanogaster*, sugiere que este mecanismo se ha conservado en la evolución, actuando tanto en insectos hemimetábolos, como los triatomíneos, como en holometábolos como *Drosophila*.

El gen *FASN1* de *R. prolixus* (*RPRC000269*) tiene una expresión moderada en cuerpo graso durante el ayuno que se incrementa notoriamente al día 14 PM (Figura 35). Esto podría deberse al agotamiento de las reservas presentes en el intestino (sangre, con gran contenido de AG) y correspondientemente la necesidad de síntesis de novo de lípidos debido ante un déficit de las reservas.

Los HC de insectos, sintetizados en los oenocitos, se forman a partir de AG precursores, productos finales de la FAS, que son elongados a VLCFA por acción de las ELOVL y finalmente descarboxilados a HC mediante la acción de las CYP4G (Blomquist y Bagnères, 2010; Qiu y col., 2012). Se ha reportado que la expresión de los dos genes anotados en el genoma de *R. prolixus*, *CYP4G107* y *CYP4G106*, es específica de integumento (Dulbecco, 2019).

La mayor expresión de *RPRC000123* y *RPRC002909* en el integumento de ninfas de *R. prolixus* se detectó a los días 2 y 6 PM de insectos sin alimentar (Figuras 33 y 34); esto sugiere que dichos genes podrían estar jugando un importante papel en la síntesis de precursores lipídicos cuticulares durante las etapas iniciales del ayuno.

El análisis de expresión diferencial de estos genes FASN en insectos alimentados sugiere una compensación en el patrón de expresión de los mismos a lo largo del IV estadio ninfal detectando los valores más altos de expresión del transcripto *RPRC000123* a mayor tiempo post muda (los días 2 y 4 PA) (Figura 33) mientras que los niveles de expresión más elevados del transcripto *RPRC002909* fueron detectados al día 9 PA, próximo a la muda al siguiente estadio (Figura 34B). Es necesario profundizar los estudios bioquímicos y moleculares a fin de dilucidar los motivos de la llamativa expresión del gen *RPRC002909* a los 9 días PA.

Los estudios bioinformáticos de los genes FASN de insectos han permitido el

descubrimiento de numerosos genes FASN exclusivos de los genomas de insectos. Futuros estudios proporcionarán nuevos avances sobre la caracterización funcional de los mismos y aspectos fisiológicos adicionales de las FASs de insectos. Además, la relación fisiológica entre los oenocitos y otros tejidos, como el cuerpo graso, constituye un importante área de investigación futura (Makki y col., 2014).

Caracterización funcional de los genes FASN de *Rhodnius prolixus*

La función de los genes FASN de insectos ha sido estudiada exhaustivamente sólo en algunas especies de *Drosophila* (Chung y col., 2014; Tan y col., 2017; Wicker-Thomas y col., 2015).

El silenciamiento mediante ARNi de *FASN2* y *FASN3* de oenocitos en *D. serrata* mostraron un fenotipo letal con el gen *FASN3* silenciado y una reducción de los CHC metil-ramificados asociado con la disminución a la resistencia a la desecación al silenciar *FASN2* (Chung y col., 2014). En *D. melanogaster* el silenciamiento de *FASN3* estuvo asociado a una disminución a la tolerancia a la desecación, sin afectar el contenido de CHC, mientras que el silenciamiento de *FASN2* mostró una reducción de CHC metil ramificados sin inducir cambios en la resistencia a la desecación (Wicker-Thomas y col., 2015). Tan y col., (2017) sugieren que el silenciamiento de *FAS2* de *Coleophellus bowringi* (Coleoptera: Chrysomelidae) expresado principalmente en cuerpo graso, produce una disminución de los lípidos de reserva, afectando negativamente la expresión de genes relacionados con la tolerancia al estrés oxidativo y aumentando el contenido de agua en hembras durante la diapausa.

Nuestros resultados revelan que la FAS codificada por el gen *RPRC000123* de *R. prolixus*, ortólogo de *FASN3* de *D. melanogaster*, está involucrada de manera esencial en la formación de los AG precursores de los HC que participan en la impermeabilidad de la cutícula. El silenciamiento de *RPRC000269* y *RPRC002909*, ortólogos de *FASN1* y *FASN2* de *D. melanogaster*, no alteraron la supervivencia de las ninfas bajo las condiciones estándares del insectario (27°C, 45% H.R.).

El silenciamiento de *RPRC000123* en ninfas de IV estadio de *R. prolixus* estuvo asociado a la muerte de la totalidad de las ninfas silenciadas luego de mudar al V estadio entre las 0-4 hs posteriores a la muda (Figura 37). La supervivencia de los insectos silenciados con dsRPRC000123 expuestos a altas condiciones de humedad (96% H.R.) durante 48-72 hs posteriores a la muda a V estadio (Figura 44) y la muerte de la totalidad de los mismos al cabo de las siguientes 50 hs de exposición a las condiciones estándares del insectario (27°C, 45% H.R.) (Figura 45) sugiere que las elevadas condiciones de H.R., evitan la muerte por desecación de los insectos con el gen de

FASN silenciado, sin embargo el silenciamiento acarrearía otras alteraciones que imposibilitarían la supervivencia de los insectos.

Estudios bioquímicos y moleculares previos han demostrado que el silenciamiento del gen que codifica para FASN1 en otros organismos o la inhibición de la enzima afectan la expresión de numerosos genes involucrados en diversos procesos, tales como la detención del ciclo celular y la apoptosis (De Schrijver y col., 2003; Ingham y col., 2014; Jones y Infante, 2015; Knowles y Smith, 2007; Pizer y col., 1998).

La observación de fotomicrografías de la superficie cuticular de los insectos silenciados sugiere una disminución de la capa de lípidos epicuticulares (Figura 46). La disminución del contenido de los lípidos de la cutícula recién formada en insectos silenciados con dsRPRC000123 podría ser la responsable de la muerte de los mismos por la pérdida de agua a través de la cutícula una vez eliminada la exuvia.

La reducción significativa del contenido de los AG totales, lineales y ramificados (Figura 40) en los insectos silenciados con dsRPRC000123 en comparación con los controles sugiere que el gen *RPRC000123* expresado en el integumento codificaría para la enzima FAS encontrada en la fracción citosólica de integumento capaz de incorporar tanto metil malonil-CoA como malonil-CoA durante el proceso de síntesis de AG de dicho tejido (Juárez y col., 1996, 1992).

El análisis del contenido de los AG del integumento (Figura 39) mostró que el ácido palmítico y palmitoleico exhiben cantidades absolutas equivalentes (μg / integumento) en insectos inyectados con dsRPRC000123 y dsControl. Dado que era esperable que el silenciamiento de *RPRC000123* afectara negativamente el contenido de AG, se intentó determinar si ocurría un mecanismo compensatorio vía transporte por hemolinfa de lípidos asociados a lipoforina. Sin embargo, la expresión relativa del gen que codifica para el receptor de lipoforina (*RPRC011390*) no mostró diferencias significativas entre insectos silenciados con dsRPRC000123 e insectos inyectados con dsControl. Estos resultados sugieren profundizar en el estudio de componentes adicionales del sistema de transporte (proteínas de transporte de AG, lipoforinas y apolipoproteínas) que puedan explicar si ocurre ingreso significativo de AG desde la hemolinfa hacia los oenocitos de *R. prolixus*, y si el transporte afecta las cantidades absolutas de los AG en insectos silenciados con dsRPRC000123.

Los productos de la FAS son precursores de la formación de CHC tanto lineales como ramificados. El silenciamiento de *RPRC000123* redujo significativamente el contenido de los HC totales y ramificados (Figura 42A,C). Sorprendentemente, se produjo un aumento del contenido de los HC lineales (106,22%) en los insectos silenciados con dsRPRC000123 comparado con los controles (Figura 42B) y particularmente, de HC lineales insaturados ausentes en los insectos control (Figura 43).

Con el fin de explicar el incremento significativo del contenido de HC lineales en los insectos silenciados se midió la expresión relativa de los genes CYP4G (*RPRC003227* y *RPRC013847*) expresados en el integumento de *R. prolixus* en insectos silenciados con dsRPRC000123 y controles. Dichos genes codifican para las CYP4G involucradas en la etapa final de la formación de CHC (Qiu y col., 2012; Balabanidou y col., 2016). La sobreexpresión de ambos genes (*RPRC003227* (*CYP106*) 241% ± 40%; *RPRC013847* (*CYP107*) 161% ± 14,5%) en los insectos silenciados con dsRPRC000123 podría deberse a una alteración en la regulación de la transcripción de las CYP4G, a modo de mecanismo fisiológico compensatorio, incrementando la formación del contenido de HC lineales en la cutícula de dichos insectos a partir de los AG disponibles. Estudios bioinformáticos (docking molecular) y moleculares recientes demostraron por primera vez que ambos genes participan en la síntesis de HC pero con diferente especificidad de sustrato (Dulbecco y col, 2020 enviado a publicar).

En próximos estudios se investigará la expresión de los genes que codifican para las desaturasas expresadas en el integumento de *R. prolixus* a fin de interpretar el incremento significativo del contenido de HC lineales insaturados en insectos silenciados con *RPRC000123*.

La disminución significativa del contenido de los HC metil ramificados (46,38%) en las ninfas de *R. prolixus* silenciadas con dsRPRC000123, asociado con el fenotipo letal, sugiere que estos componentes podrían ser esenciales en la regulación del balance hídrico del insecto. Estudios biofísicos previos demostraron que los HC metil ramificados presentan puntos de fusión más bajos en relación a HC lineales del mismo número de carbonos (Gibbs y Pomonis, 1995). El silenciamiento del gen *CG3524* que codifica para la *FASN2* en oenocitos de *D. serrata*, mostró una disminución de la producción de CHC metil ramificados y una reducción en la resistencia a la desecación de estos insectos (Chung y col., 2014). Recientemente, el silenciamiento de *BgFas1* de *B. germanica* mostró una drástica disminución del contenido de CHC metil-ramificados asociado con una disminución a la resistencia a la desecación. Estas evidencias sugieren el importante rol que juegan los CHC, particularmente las cadenas metil-ramificadas en la resistencia a la desecación (Chung y col., 2014; Moriconi y col., 2019; Pei y col., 2019). Futuros estudios permitirán profundizar en el importante rol que esta enzima juega en la fisiología de los insectos, así como también, explorar nuevas rutas bioquímicas que utilizan AG como precursores. Además, la letalidad selectiva del silenciamiento de *FASN3* indica que este gen podría resultar esencial en diversos mecanismos fisiológicos vitales en insectos y aún por dilucidar. Esta evidencia podría contribuir al diseño de nuevas estrategias de control de vectores basadas en ARNi.

Capítulo 3: Relaciones filogenéticas entre *Triatoma infestans* y subcomplejo Sordida

Resultados

Se utilizaron las abundancias relativas de los hidrocarburos cuticulares (CHC) de diversas poblaciones de las especies del subcomplejo Sordida (*T. sordida*, *T. garciabesi*, *T. guasayana* y *T. patagónica*) y *T. infestans* con el objetivo de inferir relaciones filogenéticas entre las especies. El patrón de CHC de *T. dimidiata* fue utilizado como grupo externo. En la figura 50 se muestra el cladograma obtenido:



Figura 50: Análisis filogenético del patrón de CHC de las especies del subcomplejo Sordida y *T. infestans*. Las abundancias relativas de los CHC corresponden a especímenes de *T. sordida*, *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagónica* y *T. infestans* colectados en diversas localidades ubicadas dentro del área de distribución de cada especie. El cladograma se construyó utilizando el modelo de Neighbor-Joining con 1000 repeticiones de Bootstrap. Los números en los nodos indican el soporte de Bootstrap (%). Los recuadros de colores indican grupos monofiléticos: *T. infestans* (rosa); *T. patagónica* y *T. guasayana* (azul); *T. garciabesi* (amarillo); *T. sordida* (verde). Abreviaturas: Tsor, *T. sordida*; Tgar, *T. garciabesi*; Tgua, *T. guasayana*; Tpat, *T. patagonica*; Tinf, *T. infestans*; Tdim, *T. dimidiata*; Pte. Presidente; Sgo., Santiago. El patrón de CHC de *T. dimidiata* de Costa Rica fue utilizado como grupo externo.

Las poblaciones de *T. infestans* se agrupan formando un clado monofilético con un 99% de soporte de Bootstrap separando a las poblaciones de Cochabamba y Arequipa de las poblaciones de Tarija, Catamarca, Chaco, San Pedro y Presidente Hayes. Este último clado no resuelve relaciones filogenéticas entre las poblaciones que lo integran. Dentro del subcomplejo Sordida la mayoría de las poblaciones de *T. sordida*, una población de *T. guasayana* (Mataral) y una población de *T. garciabesi* (Salta) forman una politomía (poli, muchos; tomía, corte): nodo o punto de ramificación del cual derivan

más de dos ramas (Holt, 2009).

La abundancia relativa de los CHC de estas poblaciones no resuelve relaciones filogenéticas. La población de *T. sordida* de Isozog G2 se agrupa junto a la población de Formosa y la población de Boqueron junto a la población de Pte. Hayes formando dos clados pequeños.

Las poblaciones de *T. guasayana* de Pte. Hayes, Boqueron y Santiago del Estero y la población de *T. patagónica* de Santa Fe conforman un clado con un 72% de soporte de Bootstrap. *T. patagónica* queda incluida dentro del clado que integra *T. guasayana*. Ambas poblaciones forman un clado monofilético con un elevado soporte estadístico (93,7% de soporte de Bootstrap).

Las poblaciones de *T. garciabesi* de Santiago del Estero y Formosa constituyen un grupo monofilético con un 87% de soporte de Bootstrap.

Discusión

Las especies de triatomíneos están asociadas en complejos y subcomplejos de acuerdo a similitudes morfológicas, patrones cromáticos, distribución geográfica, comportamiento y aspectos ecológicos (Schofield y Galvão, 2009).

El complejo *Infestans* es el más abundante e incluye 6 subcomplejos constituidos por 21 especies. El subcomplejo *Infestans* es considerado el subcomplejo de mayor importancia epidemiológica y contiene a uno de los tres vectores más importantes de la enfermedad de Chagas: *T. infestans*. Esta especie es principalmente doméstica en todos los países del Cono Sur y es considerada una especie primaria desde el punto de vista epidemiológico.

Estudios moleculares y morfométricos demostraron que *T. infestans* exhibe una alta variabilidad intraespecífica y que la especie se dividiría en tres grupos genéticos principales denominados “Andino” “Intermedio” y “No andino” (Bargues y col., 2006; Catalá y col., 2007; Pita y col., 2017). El análisis del patrón de CHC (Calderón-Fernández y col., 2012) reveló que las poblaciones de *T. infestans* se separan en dos grupos principales: “Andino” que incluyen poblaciones de Perú y Bolivia y “No Andino” formado por poblaciones de Argentina y Paraguay junto a especímenes de Tarija, quedando incluido dentro de este último el grupo “Intermedio”.

El análisis filogenético (Figura 50) sugiere que el clado formado por las poblaciones de Arequipa y Cochabamba coincidirían con el grupo “Andino” y el resto de las poblaciones analizadas corresponderían con el grupo “No andino” descrito por Calderón-Fernández y col., (2012).

El subcomplejo Sordida, incluido dentro del complejo *Infestans*, está formado por cuatro especies distribuidas en cuatro países: *T. sordida* (Stal 1859) abarca centro y sur de Brasil, la totalidad de Paraguay, centro y sur de Bolivia y centro de Argentina; *T. guasayana* Wygodzinsky and Avalos (1949) ocupa el sur de Bolivia y Paraguay y el norte y centro de Argentina; *T. garciabesi* Carcavallo, Cichero, Martínez, Prosen y Ronderos (1967) habita exclusivamente en el centro y norte de Argentina y *T. patagónica* Del Ponte (1929) reside en la región central de la Argentina y la Patagónica.

Dentro del subcomplejo Sordida, *T. sordida* es considerada una de las especies de mayor importancia epidemiológica (WHO, 2019) debido a su amplia distribución y a la capacidad de invadir el ambiente doméstico, particularmente en sitios donde poblaciones de *T. infestans* han sido controladas por la aplicación de insecticidas (Panzera y col., 1997). *T. garciabesi* se encuentra asociada al hábitat silvestre y al peridomicilio. *T. guasayana* ha sido colectada comunmente en el peridomicilio y ocasionalmente en las viviendas y *T. patagónica* es la especie más selvática y generalista del subcomplejo (Panzera y col., 2015).

La validéz taxonómica de las especies del subcomplejo Sordida, sus relaciones evolutivas, y especialmente, la variación intrapoblacional dentro de *T. sordida*, ha sido controversial durante muchos años e incluso permanecen en discusión actualmente.

Los primeros estudios morfológicos de *T. sordida* sugirieron la existencia de dos poblaciones diferenciadas en Argentina: una de ellas formada por especímenes de mayor tamaño y colores claros que ocupaban las viviendas en las regiones húmedas de noreste y la otra constituida por insectos oscuros y de menor tamaño que habitaban en el ambiente selvático de las regiones secas del noroeste (Carcavallo y col., 1985; Usinger y col., 1966). Estudios bioquímicos posteriores diferenciaron las poblaciones domésticas de Brasil de las selváticas de Argentina (Actis y col., 1965), y estas últimas fueron agrupadas en una nueva especie llamada *T. garciabesi* en base a diferencias morfológicas con *T. sordida* y *T. guasayana* (Carcavallo y col., 1967). Posteriormente, *T. garciabesi* fue considerada como una variante de *T. sordida* de las regiones del noroeste argentino (Lent and Wygodzinsky, 1979). Sin embargo, la especie fue revalidada en función de caracteres morfológicos y citogenéticos (Jurberg y col., 1998). Además, estudios cromosómicos en especímenes de *T. sordida* corroboraron la distinción entre las poblaciones brasileras y argentinas (Panzera y col., 1997). Análisis isoenzimáticos revelaron la existencia de dos posibles especies crípticas entre poblaciones de *T. sordida* del Chaco Boliviano, coexistiendo en simpatria con poblaciones de *T. guasayana* (Noireau y col., 1998). Recientemente, estudios cromosómicos sugieren que las poblaciones de *T. sordida* involucran al menos tres taxa, dos de ellas coexistiendo en simpatria en la región este que abarca gran parte de

Argentina, Brasil, Bolivia y centro y este de Paraguay (Panzera y col., 2015). Medidas morfométricas de la cabeza y las alas soportan la existencia de tres especies crípticas de *T. sordida* (*T. sordida* de Brasil, *T. sordida* de Argentina y *T. sordida* de Bolivia) (Nattero y col., 2017).

El uso de técnicas multivariadas para analizar el patrón de CHC de las cuatro especies del subcomplejo (Calderón-Fernández y Juárez, 2013) como marcadores taxonómicos (Calderón-Fernández y col., no publicado) mostraron que las poblaciones de *T. sordida* están separadas en al menos dos taxa. El Grupo 1 de *T. sordida* formado por las poblaciones domésticas, peridomesticas y silvestres de Brasil, centro y este de Paraguay y parte del Chaco Boliviano, en coincidencia con el taxón llamado *T. sordida* en sentido estricto (Panzera y col., 2015) y *T. sordida* de Brasil y Bolivia (Nattero y col., 2017). El Grupo 2 de *T. sordida*, principalmente silvestre, distribuido en Argentina, oeste de Paraguay y parte de Bolivia, en coincidencia con el taxón *T. sordida* Argentina (Nattero y col., 2017; Panzera y col., 2015) (Figura 51).

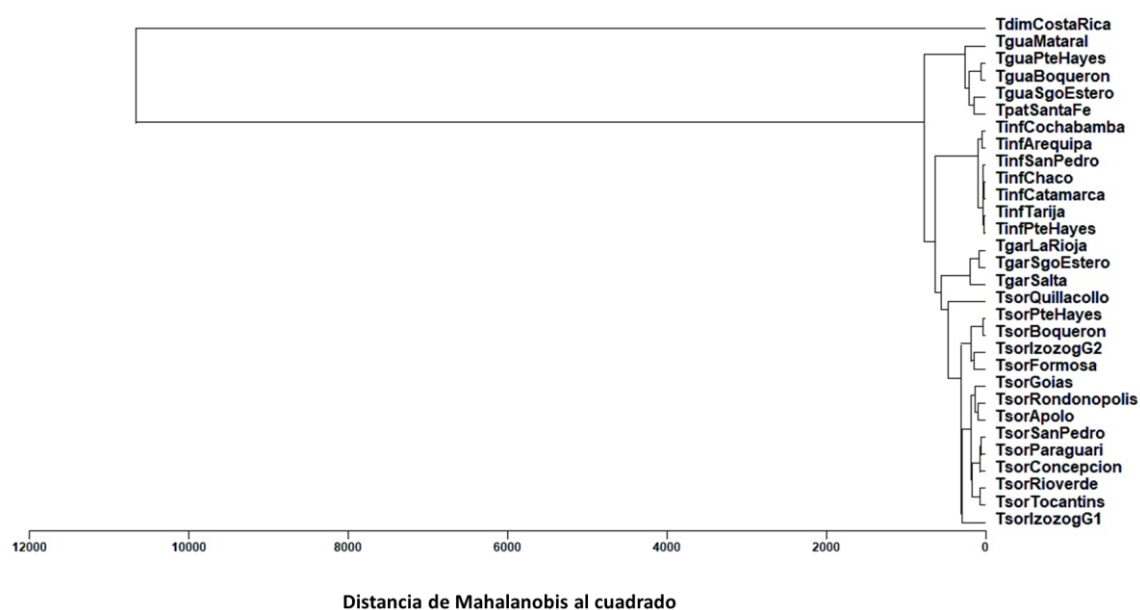


Figura 51: Método de pares de grupos de distancia no ponderados de Mahalanobis con dendrograma aritmético promedio basado en análisis discriminantes del patrón de CHC de las cuatro especies del subcomplejo Sordida y *T. infestans*. El patrón de CHC de *T. dimidiata* de Costa Rica fue utilizado como grupo externo. Abreviaturas: Tzor, *T. sordida*; Tgar, *T. garciabesi*; Tgua, *T. guasayana*; Tpat, *T. patagonica*; Tinf, *T. infestans*; Tdim, *T. dimidiata*; Pte. Presidente; Sgo., Santiago. Modificado de Calderón-Fernández y col., no publicado.

El análisis filogenético (Figura 50) entre las especies del subcomplejo Sordida y las poblaciones de *T. infestans* sugiere que el patrón de CHC no resulta adecuado como marcador filogenético para definir relaciones de parentesco evolutivo entre *T. infestans* y las especies que integran el subcomplejo Sordida.

Estudios isoenzimáticos, cromosómicos y filogenéticos (Figura 50) del patrón de CHC sugieren que las poblaciones de Bolivia (IzozogG2), oeste de Paraguay (Pte Hayes y Boqueron) y Argentina (Formosa) que definen el taxón *T. sordida* Argentina podrían ser consideradas una nueva especie.

A pesar de la similitud morfológica, la distribución geográfica compartida (simpatría) y los ambientes silvestres y peridomiciliarios comunes ocupados por *T. sordida* y *T. guasayana*, estudios isoenzimáticos mostraron un aislamiento reproductivo entre ambas especies (Noireau y col., 1999). Marcadores genéticos (isoenzimas, cromosómicos y secuencias mitocondriales) diferenciaron claramente a *T. guasayana* y *T. patagónica* del resto de las especies del subcomplejo (Almeida y col., 2009; Noireau y col., 1998; Panzera y col., 1997; Pita y col., 2016). Estudios genéticos y cromosómicos sugieren que *T. guasayana* y *T. patagónica* estarían incluidas dentro del subcomplejo Rubrovaria (Almeida y col., 2009; Panzera y col., 2015; Pita y col., 2016). Estudios taxonómicos (Calderón-Fernández no publicado) y filogenéticos (Figura 50) del patrón de CHC sugieren que *T. guasayana* y *T. patagónica* se agruparían juntas y constituirían el mismo clado filogenético. Además, estos estudios coinciden en agrupar estas taxa por fuera del subcomplejo Sordida.

Estudios morfológicos, análisis isoenzimáticos, citogenéticos, moleculares y cromosómicos soportan la validez taxonómica de *T. garciabesi* (Gurgel-Gonçalves y col., 2011; Justí y col., 2014; Panzera y col., 2015, 1997, 2012). El complejo patrón de CHC (Calderón-Fernández y Juárez, 2013), el análisis discriminante de todo el subcomplejo (Calderón-Fernández no publicado) y las relaciones filogenéticas obtenidas recientemente (Figura 50) refuerzan la hipótesis propuesta. Nattero y col., (2017) proponen que la búsqueda de híbridos naturales entre *T. sordida* y *T. garciabesi* podría ayudar a comprender el posible proceso de especiación entre ambas especies e indagar la posibilidad de la existencia de mecanismos de aislamiento que operen en las poblaciones naturales.

En conclusión, análisis fenotípicos, citogenéticos y moleculares adicionales, así como cruzamientos experimentales entre individuos de las distintas poblaciones naturales serían oportunos para comprender el estatus taxonómico de las especies del subcomplejo Sordida y entre las poblaciones de *T. infestans*, así como las inferencias evolutivas de las mismas con *T. infestans*.

Conclusiones finales

Rol del integumento de *Triatoma infestans* en la resistencia a insecticidas

-Estudios histológicos de los oenocitos de *T. infestans* asociados al integumento mostraron cambios morfológicos a lo largo del IV estadio ninfal similares a los descritos previamente en *R. prolixus*.

-El análisis del transcriptoma del integumento de *T. infestans* reveló la expresión de numerosos genes indicando que este tejido es metabólicamente muy activo y participa en diversos procesos fisiológicos de los insectos como el intercambio de metabolitos con el cuerpo graso y otros órganos, la detoxificación de compuestos y la biosíntesis de los lípidos y demás componentes cuticulares.

-Estudios moleculares del integumento de *T. infestans* mostraron una sobreexpresión génica relativa de los genes que codifican para enzimas involucradas en la resistencia metabólica (CYP clan 3 y CCE) y en la biosíntesis de hidrocarburos cuticulares (ELOVL, FAR, CYP4G) en especímenes resistentes a insecticidas piretroides. Estos resultados sugieren la activa participación del integumento en la resistencia a insecticidas.

Caracterización molecular de los genes FASN de triatominos y el rol en el contenido y función de CHC.

-El análisis bioinformático y molecular de las secuencias FAS de triatominos demostró la existencia de tres genes y varios fragmentos génicos expresados tanto en diferentes tejidos y órganos como a lo largo del ciclo de vida. La presencia de genes en tándem y fragmentos génicos sugiere que la expansión génica podría estar jugando un papel importante en la evolución de los genes FASN. Futuros estudios genéticos de los genes FASN en otras especies de insectos ayudarán a dilucidar dicha hipótesis.

- De los tres genes FASN presentes en el genoma de *R. prolixus*, *FASN1*, *FASN2* y *FASN3*, el silenciamiento de este último resultó letal para los insectos. Estudios bioquímicos demostraron que el silenciamiento de *FASN3* (*RPRC000123*) estuvo asociado a una disminución de la síntesis de AG lineales y ramificados e HC ramificados del integumento. Aunque aún falta dilucidar la existencia de un posible transporte de AG lineales vía hemolinfa, estos resultados sugieren un esencial aporte de los productos de biosíntesis de la *FASN3* en la formación de CHC metil ramificados.

-La letalidad selectiva del silenciamiento de *RPRC000123* sugiere una esencial participación del gen en procesos fisiológicos vitales de triatominos. Futuros estudios

que profundicen el importante rol fisiológico de la enzima FASN3 podrían ser claves en el diseño de nuevas estrategias de control vectorial.

Rol de los CHC como marcadores filogenéticos

-El análisis filogenético de los CHC del subcomplejo Sordida y *T. infestans* no ha resuelto completamente las relaciones evolutivas entre las especies. Aunque el patrón de CHC ha sido considerado como un excelente marcador taxonómico (Calderón-Fernández y col., 2012, 2011, 2005; Calderón-Fernández y Juárez, 2013; Juárez y col., 2000), estos resultados sugieren que no sería un marcador filogenético apropiado para discernir las relaciones evolutivas entre las especies del subcomplejo Sordida y particularmente entre las poblaciones de *T. sordida*.

Bibliografía

- [WHO], 2019. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) [WWW Document]. URL [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (accessed 10.19.19).
- [WHO], 1994. World Health Organization. Protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre Triatomíneos. *Acta Toxicol Arg* 2, 29–32.
- Abraham, M., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J., Hess, B., Lindahl, E., 2015. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2, 19–25. <https://doi.org/10.1016/J.SOFTX.2015.06.001>
- Actis, A., Traversa, O., Carcavallo, R., 1965. Estudios taxonómicos sobre el género *Triatoma* mediante la electroforesis de la linfa. *An Esc Nac C Biol.* 13, 97–106.
- Adams, M., Celniker, S., Holt, R., Evans, C., Gocayne, J., Amanatides, P., Scherer, S., Li, P., Hoskins, R., Galle, R., George, R., Lewis, S., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S., Sutton, G., Wortman, J., Yandell, M., Zhang, Q., Chen, L., Brandon, R., Rogers, Y., Blazee, R., Champe, M., Venter, J., 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* (80-). 287, 2185–2195.
- Almeida, C., Marcet, P., Gumie, M., Takiya, D., Cardozo-de-Almeida, Pacheco, R., Lopes, C., Dotson, E., Costa, J., 2009. Phylogenetic and phenotypic relationships among *Triatoma carcavallo* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species collected in domiciles in Rio Grande do Sul State. *Brazil J Vector Ecol.* 34, 164–73.
- Amichot, M., Sophie Tare, S., Brun-Barale, A., Arthaud, L., Bride, J., Berge, J., 2004. Point mutations associated with insecticide resistance in the *Drosophila* cytochrome P450 Cyp6a2 enable DDT metabolism. *Eur. J. Biochem.* 271, 1250–1257. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04025.x>
- Antony, B., Fujii, T., Moto, K., Matsumoto, S., Fukuzawa, M., Nakano, R., Tatsuki, S., Ishikawa, Y., 2009. Pheromone-gland-specific fatty-acyl reductase in the adzuki bean borer, *Ostrinia scapulalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.10.008>
- Arrese, E., Canavoso, L., Jouni, Z., Pennington, J., Tsuchida, K., Wells, M., 2001. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00102-8](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00102-8)
- Arrese, E., Soulages, J., 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 207–25.
- Awolola, T., Oduola, O., Strobe, C., Koekemoer, L., Brooke, B., Ranson, H., 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. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.08.021>
- Bai, X., Mamidala, P., Rajarapu, S., Jones, S., Mittapalli, O., 2011. Transcriptomics of the bed bug (*Cimex lectularius*). *PLoS One* 6, e16336.
- Balabanidou, V., Kampouraki, A., MacLean, M., Blomquist, G.J., Tittiger, C., Juárez, M.P., Mijailovsky, S.J., Chalepakis, G., Anthousi, A., Lynd, A., Antoine, S., Hemingway, J., Ranson, H., Lycett, G.J., Vontas, J., 2016. Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 9268–9273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608295113>
- Bargues, M., Klisiowicz, D., Panzera, F., Noireau, F., Marcilla, A., Perez, R., Rojas, M., O'Connor, J., Gonzalez-Candelas, F., Galvão, C., Jurberg, J., Carcavallo, R., Dujardin, J., Mas-Coma, S., 2006. Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. *Inf Gen Evol* 6, 46–62.
- Barnard, A., Nijhof, A., Fick, W., Stutzer, C., Maritz-Olivier, C., 2012. RNAi in arthropods: Insight into the machinery and applications for understanding the pathogen-vector interface. *Genes (Basel)*. 3, 702–741. <https://doi.org/10.3390/genes3040702>
- Bass, C., Field, L., 2011. Gene amplification and insecticide resistance. *Pest Manag Sci* 67, 886–890.
- Bass, C., Puinean, A., Zimmer, C., Denholm, I., Field, L., Foster, S., Gutbrod, O., Nauen, R., Slater, R., Williamson, M., 2014. The evolution of insecticide resistance in the peach

- potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 51, 41–51.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.05.003>
- Blomquist, G.J., Bagnères, A.G., 2010. Introduction: History and overview of insect hydrocarbons, in: Blomquist, G., Bagnères, A. (Eds.), *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*. Cambridge University Press, pp. 1–18.
<https://doi.org/10.1007/BF00994653>
- Blomquist, G.J., Nelson, D.R., De Renobales, M., 1987. Chemistry, biochemistry, and physiology of insect cuticular lipids. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 6, 227–265.
<https://doi.org/10.1002/arch.940060404>
- Bogwitz, M., Zhu, F., Parthasarathy, R., Bai, a H., Woithe, K., Kausmann, M., Nauen, R., Harrison, D., Subba, R., 2005. Cyp12a4 confers lufenuron resistance in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102, 12807–12812.
- Briceño-León, R., 2009. La enfermedad de Chagas en las Américas : una perspectiva de ecosalud Chagas disease in the Americas : an ecohealth perspective. *Cad. Saúde Pública* 71–82.
- Bustamante Gomez, M., Gonçalves Dioetaiuti, L., Gorla, D., 2016. Distribution of pyrethroid resistant populations of *Triatoma infestans* in the southern cone of South America. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004561. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004561>
- Calderón-Fernández, G., 2008. Hidrocarburos Cuticulares De Triatominos: Su Aplicación Como Marcadores Taxonómicos. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. UNLP.
- Calderón-Fernández, G., Girotti, J., Juárez, M., 2012. Cuticular hydrocarbon pattern as a chemotaxonomy marker to assess in- traspecific variability in *Triatoma infestans*, a major vector of Chagas disease. *Med Vet Entomol* 26, 201–209.
- Calderón-Fernández, G.M., Girotti, J.R., Juárez, M.P., 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.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2011.00978.x>
- Calderón-Fernández, G.M., Girotti, J.R., Juárez, M.P., 2011. Cuticular Hydrocarbons of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae): Intraspecific Variation and Chemotaxonomy. *J. Med. Entomol.* 48, 262–271. <https://doi.org/10.1603/ME10141>
- Calderón-Fernández, G.M., Juárez, M.P., 2013. The cuticular hydrocarbons of the *Triatoma sordida* species subcomplex (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro* 108, 778–784. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108062013015>
- Calderón-Fernández, G.M., Juárez, M.P., Monroy, M.C., Menes, M., Bustamante, D.M., Mijailovsky, S., 2005. Intraspecific Variability in *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) Populations from Guatemala Based on Chemical and Morphometric Analyses. *J. Med. Entomol.* 42, 29–35. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.1.29>
- Calderón-Fernández, G.M., Moriconi, D.E., Dulbecco, A.B., Juárez, M.P., 2017. Transcriptome Analysis of the *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Integument. *J. Med. Entomol.* 54, 1531–1542. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx151>
- Canale, D., 2005. Artrópodos de interés médico en Argentina: Triatominæ - Vinchucas, Fundación. ed.
- Capriotti, N., Mougabure-Cueto, G., Rivera-Pomar, R., Ons, S., 2014. L925I mutation in the Para-type sodium channel is associated with pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* from the Gran Chaco region. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2659.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002659>
- Carcavaijo, R., Rabinovich, J., Tonn, R.J., E., 1985. Factores Biologicos y Ecologicos de la Enfermedad de Chagas.
- Carcavallo, R., Cichero, J., Martínez, A., Prosen, A., Ronderos, R., 1967. Una nueva especie del género *Triatoma* Laporte (Hemiptera, Reduviidae, Triatominæ). *2as Jorn Entomoepidemiol Argentinas.* 2, 43–8.
- Carlson, D., Bernier, U., Sutton, B., 1998. Elution patterns from capillary GC for methyl-branched alkanes. *J. Chem. Ecol.* 24, 1845–1865.
- Carvajal, G., Mougabure-Cueto, G., Toloza, A., 2012. Toxicity of non-pyrethroid insecticides against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 675–679. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000500015>
- Catalá, S., Gorla, D., Panzera, F., Juárez, M.P., Picollo, M.I., Noireau, F., Dujardin, J.P., Zerba, E., Vassena, R., Pérez, R., Calderón-Fernández, G.M., Abraham, L., Hernandez, M.L., Cardozo, R., López, E., Porcasi, X., Moreno, M., Schater Broide, J.I., Calleros, L.,

- Ferreiro, M.J., Gurtler, R., Lucero, C., Ferrandis, I., Cardozo, L., Girotti, J.R., Mijailovski, S., Richer, W., Kengne, P., Perrineau, M.M., Cohuet, A., Fontenille, D., Herrera, B., Gentile, A., Gemio, A., Alderete, P., Diosque, P., Acosta, N., Alcaraz, P., Llanos, A., Uncos, A., 2007. Analytical appraisal, Southern Cone – biological and environmental causes of the spatial structuration in *Triatoma infestans* and the implications for vector control programmes, in: Proceedings SSA/EC American Trypanosomiasis Update Workshop. Asunción, Paraguay, pp. 13–18.
- Cecere, M., Castañera, M., Canale, D., Chuit, R., Gürtler, R., 1999. *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma infestans* and other triatomines: Long-term effects of a control program in rural northwestern Argentina. *Rev. Panam. Salud Publica/Pan Am. J. Public Heal.* 5, 392–399. <https://doi.org/10.1590/S1020-49891999000500003>
- Chakravarty, B., Gu, Z., Chirala, S., Wakil, S., Quiocho, F., 2004. Human fatty acid synthase: Structure and substrate selectivity of the thioesterase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15567–15572. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406901101>
- Chang, K., Kim, H., Klein, T., Ju, Y., 2017. Insecticide resistance and cytochrome-P450 activation in unfed and blood-fed laboratory and field populations of *Culex pipiens pallens*. *J Pest Sci* 90, 759–771. <https://doi.org/doi:10.1007/s10340-016-0820-1>
- Chertemps, T., Duportets, L., Labeur, C., Ueda, R., Takahashi, K., Saigo, K., Wicker-Thomas, C., 2007. A female-biased expressed elongase involved in long-chain hydrocarbon biosynthesis and courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4273–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608142104>
- Chertemps, T., Duportets, L., Labeur, C., Wicker-Thomas, C., 2005. A new elongase selectively expressed in *Drosophila* male reproductive system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 1066–1072. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.015>
- Chung, H., Loehlin, D., Dufour, H., Vaccarro, K., Millar, J., Carroll, S., 2014. A single gene affects both ecological divergence and mate choice in *Drosophila*. *Science* 343, 1148–1151. <https://doi.org/10.1126/science.1249998>
- Cinnamon, E., Makki, R., Sawala, A., Wickenberg, L.P., Blomquist, G.J., Tittiger, C., Paroush, Z., Gould, A.P., 2016. *Drosophila* Spidey/Kar Regulates Oenocyte Growth via PI3-Kinase Signaling. *PLoS Genet.* 12, 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006154>
- CPIPEIN, 1994. Protocolo de evaluación de efecto insecticida en *Triatoma infestans*. *Cent. Investig. Plagas e Insecticidas.* 1–11.
- Cocchiararo-Bastias, L.M., Mijailovsky, S.J., Calderón-Fernández, G.M., Lorenzo Figueiras, A.N., Juárez, M.P., 2011. Epicuticle Lipids Mediate Mate Recognition in *Triatoma infestans*. *J. Chem. Ecol.* 37, 246–252. <https://doi.org/10.1007/s10886-011-9927-2>
- Daborn, P., Boey, A., Wong, W., French-Constant, R., Batterham, P., 2007. Evaluating the insecticide resistance potential of eight *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes by transgenic over-expression. *Insect Biochem Mol Biol.* 37, 512–519.
- David, J., Coissac, E., Melodelima, C., Poupardin, R., Riaz, M., Chandor-Proust, A., Reynaud, S., 2010. Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. *BMC Genomics* 11, 216. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-216>
- David, J., Ismail, H., Chandor-Proust, A., Paine, M., 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. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0429>
- De Renobales, M. DE, Woodin, T.S., Blomquist, G.J., 1986. *Drosophila melanogaster* fatty acid synthetase: Characteristics and effect of protease inhibitors. *Insect Biochem.* 16, 887–894.
- De Schrijver, E., Brusselmans, K., Heyns, W., Verhoeven, G., Swinnen, J., 2003. RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res.* 63, 3799–3804.
- Dias, J., Diotaiuti, L., 1998. Vectores secundarios de la enfermedad de Chagas en el Brasil y perspectivas para su control., in: Jaramillo, G.F. and, (Eds), CA, C.T. (Eds.), *Control de Tripanosomiasis Americana y Leishmaniosis: Aspectos Biológicos, Genéticos y Moleculares.* Santafé de Bogotá, DC, Colombia, pp. 154–159.
- Diehl, P., 1973. Paraffin synthesis in the oenocytes of the desert locust. *Nature* 243, 468–470.
- Diotaiuti, L., Loiola, C., Falcao, P., Dias, J., 1993. The ecology of *T. sordida* in natural environments in two different regions of the state of Minas Gerais, Brazil. *Rev. del Inst. Med. Trop.*

- Dixon, D., Cummins, I., Cole, D., Edwards, R., 1998. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 258–266.
- Dong, K., 2007. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert. Neurosci.* 7, 17–30.
- Dulbecco, A.B., 2019. Rol de la cutícula en la resistencia a insecticidas y en la comunicación química de insectos vectores de la Enfermedad de Chagas. *Trab. Tesis Dr. Fac. Ciencias Exactas. UNLP.*
- Dulbecco, A.B., Moriconi, D.E., Calderón-Fernández, G.M., Lynn, S., McCarthy, A., Roca-Acevedo, G., Salamanca-Moreno, J.A., Juárez, M.P., Pedrini, N., 2018. Integument CYP genes of the largest genome-wide cytochrome P450 expansions in triatomines participate in detoxification in deltamethrin-resistant *Triatoma infestans*. *Sci. Rep.* 8, 10177. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28475-x>
- Fabro, J., Sterkel, M., Capriotti, N., Mougabure-Cueto, G., Germano, M., Rivera-Pomar, R., Ons, S., 2012. Identification of a point mutation associated with pyrethroid resistance in the para-type sodium channel of *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Infect. Genet. Evol.* 12, 487–491. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.006>
- Falcon, T., Daniel, G., Pinheiro, M., Ferreira-Caliman, I.C., Turatti, F., Pinto de A, J., Galaschi-Teixeira, J., Martins, M., Michelle, P., Marcela, B., Vera, L., Norberto, P., Zilá, L., Carlos, A., Márcia, M., 2019. Exploring integument transcriptomes, cuticle ultrastructure, and cuticular hydrocarbons profiles in eusocial and solitary bee species displaying heterochronic adult cuticle maturation. Published: March 14, 2019 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213796>
- Fan, Y., Zurek, L., Dykstra, M., Schal, C., 2003. Hydrocarbon synthesis by enzymatically dissociated oenocytes of the abdominal integument of the German Cockroach, *Blattella germanica*. *Naturwissenschaften* 90, 121–126. <https://doi.org/10.1007/s00114-003-0402-y>
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution (N. Y.)* 39, 783–791.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368–76. <https://doi.org/10.1007/BF01734359>
- Feyereisen, R., 2011. Arthropod CYPomes illustrate the tempo and mode in P450 evolution. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1814, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.06.012>
- Feyereisen, R., 1999. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 44, 507–533. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.507>
- Feyereisen, R., Koener, J., Farnsworth, D., DW, N., 1989. Isolation and sequence of cDNA encoding a cytochrome P-450 for insecticide-resistant strain of the house fly, *Musca domestica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1465–1469.
- Ffrench-Constant, R., Daborn, P., Le Goff, G., 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet.* 20, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.01.003>
- Finck, J., Berdan, E., Mayer, F., Ronacher, B., Geiselhardt, S., 2016. Divergence of cuticular hydrocarbons in two sympatric grasshopper species and the evolution of fatty acid synthases and elongases across insects. *Sci. Rep.* 6, 33695. <https://doi.org/10.1038/srep33695>
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G., 1957. A simple method for the isolation y purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497–509.
- Forlani, L., Pedrini, N., Girotti, J.R., Mijailovsky, S.J., Cardozo, R.M., Gentile, A.G., Hernández-Suárez, C.M., Rabinovich, J.E., Juárez, M.P., 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003778>
- French, P., Rodríguez, C., Bisset, L., Ricardo, L., Gutiérrez, B., Fuentes, L., 2013. Increased activity of cytochrome P450 monooxygenase enzymes in reference insecticide-resistant *Aedes aegypti* strains from Cuba. *Rev Cuba. Med Trop* 65, 328–338.
- Fronza, G., Roca-Acevedo, G Mougabure-Cueto, G., Sierra, I., Capriotti, N., Toloza, A., 2020. Insecticide Resistance Mechanisms in *Triatoma infestans* (Reduviidae: Triatominae): The Putative Role of Enhanced Detoxification and Knockdown Resistance (kdr) Allele in a Resistant Hotspot From the Argentine Chaco. *J. Med. Entomol.* tjz249. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jme/tjz249>
- Garrido, D., Rubin, T., Poidevin, M., Maroni, B., Le Rouzic, A., Parvy, J., Montagne, J., 2015. Fatty Acid Synthase Cooperates with Glyoxalase 1 to Protect against Sugar Toxicity.

- PLoS Genet. 11, 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004995>
- Gaspe, M., Gurevitz, J., Gürtler, R., Dujardin, J., 2013. Origins of house reinfestation with *Triatoma infestans* after insecticide spraying in the Argentine Chaco using wing geometric morphometry. *Infect. Genet. Evol.* 17, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.044>
- Germano, M., Picollo, M., Spillmann, C., Mougabure-Cueto, G., 2014. Fenitrothion: An alternative insecticide for the control of deltamethrin-resistant populations of *Triatoma infestans* in northern Argentina. *Med. Vet. Entomol.* 28, 21–25. <https://doi.org/10.1111/mve.12014>
- Gibbs, A., 1998. Water-Proofing Properties of Cuticular Lipids. *Am. Zool.* 38, 471–482.
- Gibbs, A., Pomonis, J., 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. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)00081-X](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)00081-X)
- Gibbs, A., Rajpurohit, S., 2010. Cuticular lipids and water balance. *Insect Hydrocarb. Biol. Biochem. Chem. Ecol.* 100–120. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511711909.007>
- Gong, Y., Li, T., Feng, Y., Liu, N., 2017. The function of two P450s, CYP9M10 and CYP6AA7, in the permethrin resistance of *Culex quinquefasciatus*. *Sci Rep* 7 587. <https://doi.org/doi:10.1038/s41598-017-00486-0>
- González Audino, P., Vassena, C., Barrios, S., Zerba, E., Picollo, M., 2004. Role of Enhanced Detoxication in a Deltamethrin-resistant Population of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro* 335, 335–335.
- Gorla, D., Jurberg, J., Catalá, S., Schofield, C., 1993. Systematics of *Triatoma sordida*, *T. guasayana* and *T. patagonica* (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* <https://doi.org/10.1590/S0074-02761993000300006>
- Gould, A., Elstob, P., Brodu, V., 2001. Insect oenocytes: A model system for studying cell-fate specification by Hox genes. *J. Anat.* 199, 25–33. <https://doi.org/10.1017/S0021878201008317>
- Gregory, R., Darby, A., Irving, H., Coulibaly, M., Hughes, M., 2011. A de novo expression profiling of *Anopheles funestus*, malaria vector in Africa, using 454 pyrosequencing. *PLoS One* 6, e17418.
- Grosso, C., Blariza, M., Mougabure-Cueto, G., Picollo, M., García, B., 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. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.027>
- Gu, P., Welch, W., Guo, L., Schegg, K., Blomquist, G.J., 1997. Characterization of a novel microsomal fatty acid synthetase (FAS) compared to a cytosolic FAS in the housefly, *Musca domestica*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 118B, 447–456. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(97\)00112-0](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(97)00112-0)
- Guerenstein, P., Lazzari, C., 2009. Cómo los triatomíneos adquieren y utilizan la información para encontrar sangre. *Acta Trop.* 110, 148–158.
- Gurgel-Gonçalves, R., Ferreira, J., Rosa, A., Bar, M., Galvão, C., 2011. Geometric morphometrics and ecological niche modelling for delimitation of near-sibling triatomine species. *Med Vet Entomol.* 25, 84–93.
- Gutierrez, E., Wiggins, D., Fielding, B., Gould, A., 2007. Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism. *Nature* 445, 275–280. <https://doi.org/10.1038/nature05382>
- Hadley, N., 1994. *Water Relations of Terrestrial Arthropods*. Academic Press, San Diego, California.
- Hashimoto, K., Yoshizawa, A., Okuda, S., Kuma, K., Goto, S., Kanehisa, M., 2008. The repertoire of desaturases and elongases reveals fatty acid variations in 56 eukaryotic genomes. *J. Lipid Res.* 49, 183–191. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700377-JLR200>
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J., 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8, R19. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>
- Hemingway, J., 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 1009–1015. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00079-5](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00079-5)
- Hemingway, J., Hawkes, N., McCarroll, L., Ranson, H., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 653–665.

- <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.018>
- Hemingway, J., Ranson, H., 2000. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 371–391. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev.ento.45.1.371>
- Holt, J., 2009. "Polytomy," (Politomía). *Dictionary of Terms*.
- Howard, R.W., Blomquist, G.J., 2005. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 371–393. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130359>
- Ingham, V., Jones, C., Pignatelli, P., Balabanidou, V., Vontas, J., Wagstaff, S., Moore, J., Ranson, H., 2014. Dissecting the organ specificity of insecticide resistance candidate genes in *Anopheles gambiae*: known and novel candidate genes. *BMC Genomics* 15, 1018. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1018>
- Jackson, A., Locke, M., 1989. The formation of plasma membrane reticular systems in the oenocytes of an insect. *Tissue Cell* 21, 463–73.
- Jaworski, D., Zou, Z., Bowen, C., Wasala, N., Madden, R., Al., E., 2010. Pyrosequencing and characterization of immune response genes from the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (L.). *Insect Mol Biol* 617–630.
- Jerby, L., Wolf, L., Denkert, C., Stein, G., Hilvo, M., Oresic, M., Geiger, T., Rupp, E., 2012. Metabolic associations of reduced proliferation and oxidative stress in advanced breast cancer. *Cancer Res.* 72, 5712–5720.
- Jones, S., Infante, J., 2015. Molecular Pathways: Fatty acid synthase. *Clin. Cancer Res. Clin Cancer Res.* 21, 5434–8. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0126>
- Juarez, M., 2015. PATENTE N AR068790B1.
- Juárez, M., Blomquist, G., Schofield, C., 2001. Hydrocarbons of *Rhodnius prolixus*, a Chagas disease vector. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 129, 733–746. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00380-3](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00380-3)
- Juárez, M., Fernández, R., Schofield, C., Dujardin, J., 2000. Intergeneric comparison of epicuticular hydrocarbons in Triatominae. *Res Rev Parasitol* 60, 121–127.
- Juárez, M.P., 2004. Fatty Acyl-CoA elongation in *Blattella germanica* integumental microsomes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 56, 170–178. <https://doi.org/10.1002/arch.20007>
- Juárez, M.P., 1994a. Inhibition of cuticular lipid synthesis and its effect on insect survival. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 25, 177–191.
- Juárez, M.P., 1994b. Hydrocarbon Biosynthesis in *Triatoma infestans* Eggs. *Arch. Biochem. Physiol.* 25, 193–206.
- Juárez, M.P., Ayala, S., Brenner, R.R., 1996. Methyl-Branched Fatty Acid Biosynthesis in *Triatoma infestans*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 599–605.
- Juárez, M.P., Blomquist, G.J., 1993. Cuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans* and *Triatoma mazzottii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B, 667–674.
- Juárez, M.P., Blomquist, G.J., Schofield, C.J., 2001. Hydrocarbons of *Rhodnius prolixus*, a Chagas disease vector. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 129, 733–746.
- Juárez, M.P., Brenner, R.R., 1989. Fatty acid biosynthesis in the integument tissue of *Triatoma infestans*. *Comp. Biochem. Physiol.* 93, 763–772.
- Juárez, M.P., Brenner, R.R., Gros, E.G., 1984. The epicuticular lipids of *Triatoma infestans*-I. Glycerides. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* 78, 427–431. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(84\)90053-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(84)90053-1)
- Juárez, M.P., Calderón-Fernández, G.M., 2007. Cuticular hydrocarbons of triatomines. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 147, 711–730. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.08.031>
- Juárez, M.P., Chase, J., Blomquist, G.J., 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.P., Pedrini, N., Girotti, J.R., Mijailovsky, S.J., 2010. Pyrethroid resistance in Chagas disease vectors: The case of *Triatoma infestans* cuticle. *Resist. Pest Manag. Newsletter.* 19, 59–61.
- Juárez, M.P., Pedrini, N., Girotti, J.R., Mijailovsky, S.J., Lorenzo Figueiras, A.N., 2008. Trampa para insectos hematófagos, método de control y método de detección de dichos insectos.
- Jurberg, J., Galvão, C., Lent, H., Monteiro, F., Macedo, C., Panzera, F., Pérez, R., 1998. Revalidação de *Triatoma garciabesi* Carcavallo, Cichero, Martinez, Prosen & Ronderos 1987 (Hemiptera-Reduviidae). *Entomol. y Vectores* 5, 107–122.
- Justi, S., Russo, C., Mallet, J., Obara, M., Galvão, C., 2014. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasites and Vectors.* 7, 149.

- Kitching, I., Forey, P., Humphries, C., Williams, D., 1998. Cladistics. The theory and practice of parsimony analysis, 2nd ed. The Systematics Assoc. Publication N°11. Oxford Univ. Press Inc., New York.
- Klowden, M., 2007. Physiological Systems in Insects, second. ed.
- Knowles, L., Smith, J., 2007. Genome-wide changes accompanying knockdown of fatty acid synthase in breast cancer. *BMC Genomics* 8, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-168>
- Kovats, E., 1965. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Adv. Chromatogr* 1, 229-247.
- Lee, S., Scott, J., 1989. Microsomal cytochrome P450 monooxygenases in the house fly (*Musca Domestica* L.). Biochemical changes associated with pyrethroid resistance and phenobarbital induction. *Pest Biochem Physiol* 35, 1-10.
- Lent, H., Wygodzinsky, P., 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the AMNH* ; v. 163, article 3.
- Leonard, A., Pereira, S., Sprecher, H., Huang, Y., 2004. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 43, 36–54. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00040-7](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00040-7)
- Lewis, P., 1998. Maximum likelihood as an alternative to parsimony for inferring phylogeny using nucleotide sequence data., in: Soltis D.E., P.S.S. y I.J.D. (eds. . (Ed.), *Molecular Systematics of Plants. DNA Sequencing*. Kluwer Academic Publications, Boston. Dordrecht, London, pp. 32–162.
- Li, J., Wang, X., Wang, M., Ma, W., Hua, H., 2013. Advances in the use of the RNA interference technique in Hemiptera. *Insect Sci.* 20, 31–39. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2012.01550.x>
- Li, X., Schuler, M., Berenbaum, M., 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Ann Rev Entomol* 52, 231–253.
- Locke, M., 1969. The ultrastructure of the oenocytes in the molt/intermolt cycle of an insect. *Tissue Cell* 1, 103–54.
- Lockey, K., 1988. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 89B, 595-645.
- Lomakin, I., Xiong, Y., Steitz, T., 2007. The Crystal Structure of Yeast Fatty Acid Synthase, a Cellular Machine with Eight Active Sites Working Together. *Cell* 129, 319–332. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.013>
- Lycett, G., McLaughlin, L., Ranson, H., Hemingway, J., Kafatos, F., Loukeris, T., Paine, M., 2006. *Anopheles gambiae* P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility. *Insect Mol. Biol.* 15, 321–327. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00647.x>
- Lynch, M., Conery, J., 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* (80-). 290, 1151–1155.
- MacLean, M., Nadeau, J., Gurnea, T., Tittiger, C., Blomquist, G.J., 2018. Mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae*) CYP4Gs convert long and short chain alcohols and aldehydes to hydrocarbons. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 102, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.09.005>
- Maier, T., Leibundgut, M., Ban, N., 2008. The crystal structure of a mammalian fatty acid synthase. *Science* (80-). 321, 1315–1322. <https://doi.org/10.1126/science.1161269>
- Majerowicz, D., Alves-Bezerra, M., Logullo, R., Fonseca-De-Souza, A., Meyer-Fernandes, J., Braz, G., Gondim, K., 2011. Looking for reference genes for real-time quantitative PCR experiments in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Mol. Biol.* 20, 713–722. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2011.01101.x>
- Majerowicz, D., Calderón-Fernández, G.M., Alves-Bezerra, M., De Paula, I.F., Cardoso, L.S., Juárez, M.P., Atella, G.C., Gondim, K.C., 2017. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus*: lessons from the genome. *Gene* 596, 27–44. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.09.045>
- Makki, R., Cinnamon, E., Gould, A., 2014. The development and functions of oenocytes. *Annu. Rev. Entomol.* 59, 405–425. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162056>
- Mamidala, P., Wijeratne, A., Wijeratne, S., Kornacker, K., Sudhamalla, B., Rivera-Vega, L., Hoelmer, A., Meulia, T., Jones, S., Mittapalli, O., 2012. RNA-Seq and molecular docking reveal multi-level pesticide resistance in the bed bug. *BMC Genomics* 13, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-6>
- Mannino, M., 2016. Desarrollo de herramientas moleculares para la evaluación de la calidad genética y productividad en la cría artificial de *Diachasmimorpha longicaudata*, agente de control biológico de moscas plaga de los frutos. Trab. Tesis Dr. Fac. Ciencias Exactas.

UNLP.

- Marcillac, F., Bousquet, F., Alabouvette, J., Savarit, F., Ferveur, J., 2005. A mutation with major effects on *Drosophila melanogaster* sex pheromones. *Genetics* 171, 1617–28.
- Mardis, E., 2008. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9, 387–402. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164359>
- Martins, G., Guedes, B., Silva, L., Serrão, J., Fortes-Dias, C., Ramalho-Ortigão, J., Pimenta, P., 2011a. Isolation, primary culture and morphological characterization of oenocytes from *Aedes aegypti* pupae. *Tissue Cell* 43, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2010.12.003>
- Martins, G., Ramalho-Ortigão, J., 2012. Oenocytes in insects. *Isj* 9, 139–152.
- Martins, G., Ramalho-Ortigão, J., Lobo, N., Severson, D., McDowell, M., Pimenta, P., 2011b. Insights into the transcriptome of oenocytes from *Aedes aegypti* pupae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 308–315. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000300009>
- Matsuzaka, T., Shimano, H., 2009. Elovl6: a new player in fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *J. Mol. Med.* 87, 379–384. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0449-0>
- Mayr, E., Ashlock, P., 1991. *Principles of Systematic Zoology*. Mc Graw-Hill, Inc., New York.
- McCarthy, E., Han, J., Calvin, M., 1968. Hydrogen Atom Transfer in Mass Spectrometric Fragmentation Patterns of Saturated Aliphatic Hydrocarbons. *Anal. Chem.* 10, 1475-1480.
- Menendez, J., Lupu, R., 2017. Fatty acid synthase (FASN) as a therapeutic target in breast cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* 21, 1001–1016. <https://doi.org/DOI:10.1080/14728222.2017.1381087>
- Mesquita, R.D., Vionette-Amaral, R.J., Lowenberger, C., Rivera-Pomar, R., Monteiro, F.A., Minx, P., Spieth, J., Carvalho, A.B., Panzera, F., Lawson, D., Torres, A.Q., Ribeiro, J., Sorgine, M., Waterhouse, R., Montague, M., Abad-Franch, F., Alves-Bezerra, M., Amaral, L., Araujo, H., Araujo, R., Aravind, L., Atella, G., Azambuja, P., Berni, M., Bittencourt-Cunha, P., Braz, G., Calderón-Fernández, G.M., Carareto, C., Christensen, M., Costa, I., Costa, S., Dansa, M., Dumas-Filho, C., De-Paula, I., Dias, F., Dimopoulos, G., Emrich, S., Esponda-Behrens, N., Fampa, P., Fernandez-Medina, R., da Fonseca, R., Fontenele, M., Fronick, C., Fulton, L., Gandara, A., Garcia, E., Genta, F., Giraldo-Calderón, G., Gomes, B., Gondim, K., Granzotto, A., Guarneri, A., Guigó, R., Harry, M., Hughes, D., Jablonka, W., Jacquín-Joly, E., Juárez, M.P., Koerich, L., Lange, A., Latorre-Estivalis, J., Lavore, A., Lawrence, G., Lazoski, C., Lazzari, C., Lopes, R., Lorenzo, M., Lugon, M., Majerowicz, D., Marcet, P., Mariotti, M., Masuda, H., Megy, K., Melo, A., Missirlis, F., Mota, T., Noriega, F., Nouzova, M., Nunes, R., Oliveira, R., Oliveira-Silveira, G., Ons, S., Orchard, I., Pagola, L., Paiva-Silva, G., Pascual, A., Pavan, M., Pedrini, N., Peixoto, A., Pereira, M., Pike, A., Polycarpo, C., Prosdociimi, F., Ribeiro-Rodrigues, R., Robertson, H., Salerno, A., Salmon, D., Santessmasses, D., Schama, R., Seabra-Junior, E., Silva-Cardoso, L., Silva-Neto, M., Souza-Gomes, M., Sterkel, M., Taracena, M., Tojo, M., Tu, Z., Tubio, J., Ursic-Bedoya, R., Venancio, T., Walter-Nuno, A., Wilson, D., Warren, W., Wilson, R., Huebner, E., Dotson, E., Oliveira, P., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506226112>
- Montella, I., Schama, R., Valle, D., 2012. The classification of esterases: An important gene family involved in insecticide resistance - A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 437–449. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000400001>
- Moriconi, D.E., Dulbecco, A.B., Juárez, M.P., Calderón-Fernández, G.M., 2019. A fatty acid synthase gene (FASN3) from the integument tissue of *Rhodnius prolixus* contributes to cuticle water loss regulation. *Insect Mol. Biol. imb*.12600. <https://doi.org/10.1111/imb.12600>
- Moto, K., Yoshiga, T., Yamamoto, M., Takahashi, S., Okano, K., Ando, T., Nakata, T., Matsumoto, S., 2003. Pheromone gland-specific fatty-acyl reductase of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9156–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.1531993100>
- Motoyama, N., Sukanuma, T., Maekoshi, Y., 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., 2004. Caracterización de la resistencia a insecticidas piretroides en *Pediculus humanus capitis* De Geer 1778 (Phthiraptera: Pediculidae): estudio comparativo entre estados embrionarios y post-embrionarios. In: Ph.D. Thesis. University of Buenos

- Aires. Ph.D. Thesis. Univ. Buenos Aires 125.
- Mougabure-Cueto, G., Picollo, M., 2015. Insecticide resistance in vector Chagas disease: Evolution, mechanisms and management. *Acta Trop.* 149, 70–85. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.014>
- Naganuma, T., Sato, Y., Sassa, T., Ohno, Y., Kihara, A., 2011. Biochemical characterization of the very long-chain fatty acid elongase ELOVL7. *FEBS Lett.* 585, 3337–3341. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.09.024>
- Nattero, J., Piccinali, R., Macedo, L., Hernández, M., Abrahan, L., Lobbia, P., Rodríguez, C., Carbajal De La Fuente, A., 2017. Morphometric variability among the species of the *Sordida* subcomplex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae): Evidence for differentiation across the distribution range of *Triatoma sordida*. *Parasites and Vectors* 10, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2350-y>
- Nattero, J., Pita, S., Calleros, L., Crocco, L., Panzera, Y., Rodríguez, C., Panzera, F., 2016. Morphological and genetic differentiation within the southernmost vector of chagas disease: *Triatoma patagonica* (hemiptera-reduviidae). *PLoS One* 11, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168853>
- Nelson, D., 1998. Metazoan cytochrome P450 evolution. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 121, 15–22.
- Nirmala, X., Schetelig, M., Yu, F., Handler, A., 2013. An EST database of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *Gene* 517, 212–217.
- Noireau, F., Carbajal-De-La-Fuente, A., Lopes, C., Diotaiuti, L., 2005. Some considerations about the ecology of Triatominae. *An. Acad. Bras. Cienc.* 77, 431–436. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652005000300006>
- Noireau, F., Gutierrez, T., Flores, R., Brenière, F., Bosseno, M., Wisnivesky-Colli, C., 1999. Ecogenetics of *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana* (Hemiptera: Reduviidae) in the Bolivian Chaco. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94, 451–7.
- Noireau, F., Gutierrez, T., Zegarra, M., Flores, R., Brenière, F., Cardozo, L., Dujardin, J., 1998. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the Bolivian Chaco. *Trop. Med. Int. Heal.* 3, 364–372. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1998.00219.x>
- Oppenoorth, F., 1985. Biochemistry and genetics of insecticide resistance, in: Kerkut, G.A., Gilbert, C.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, pp. 731–773.
- PAHO/WHO, 2016. Development of a research agenda for characterizing the Zika virus outbreak and its public health implications in the Americas. PAHO.
- Paim, R., Araujo, R., Lehane, M., Gontijo, N., Pereira, M., 2013. Application of RNA interference in triatomine (Hemiptera: Reduviidae) studies. *Insect Sci.* 20, 40–52. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2012.01540.x>
- Panzera, F., Dujardin, J., Nicolini, P., Caraccio, M., Rose, V., Tellez, T., Bermúdez, H., Barges, M., Mas-Coma, S., O'Connor, J., Pérez, R., 2004. Genomic Changes of Chagas Disease Vector, South America. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 438–446. <https://doi.org/10.3201/eid1003.020812>
- Panzera, F., Ferreira, M., Pita, S., Calleros, L., Pérez, R., Basmadján, Y., Guevara, Y., Brenière, S., Panzera, Y., 2014. Evolutionary and dispersal history of *Triatoma infestans*, main vector of Chagas disease, by chromosomal markers. *Infect. Genet. Evol.* 27, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.006>
- Panzera, F., Hornos, S., Pereira, J., Cestau, R., Canale, D., Diotaiuti, L., Dujardin, J., Perez, R., 1997. Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera-Reduviidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57, 732–739. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.57.732>
- Panzera, F., Pita, S., Nattero, J., Panzera, Y., Galvão, C., Chavez, T., Rojas De Arias, A., Cardozo Téllez, L., Noireau, F., 2015. Cryptic speciation in the *Triatoma sordida* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae) revealed by chromosomal markers. *Parasites and Vectors* 8. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1109-6>
- Panzera, Y., Pita, S., Ferreira, M., Ferrandis, I., Lages, C., Pérez, R., Silva, A., Guerra, M., Panzera, F., 2012. High dynamics of rDNA cluster location in kissing bug holocentric chromosomes (Triatominae, Heteroptera). *Cytogenet Genome Res.* 138, 56–67.
- Papanicolaou, A., Stierli, R., French-Constant, R.H., Heckel, D., 2009. Next generation transcriptomes for next generation genomes using est2assembly. *BMC Bioinformatics* 10, 447. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-447>
- Pappenberger, G., Benz, J., Gsell, B., Hennig, M., Ruf, A., Stihle, M., Thoma, R., Rudolph, M.,

2010. Structure of the Human Fatty Acid Synthase KS-MAT Didomain as a Framework for Inhibitor Design. *J. Mol. Biol.* 397, 508–519. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.01.066>
- Parvy, J., Napal, L., Rubin, T., Poidevin, M., Perrin, L., Wicker-Thomas, C., Montagne, J., 2012. *Drosophila melanogaster* Acetyl-CoA-Carboxylase Sustains a Fatty Acid-Dependent Remote Signal to Waterproof the Respiratory System. *PLoS Genet.* 8, e1002925. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002925>
- Pedrini, N., Mijailovsky, S.J., Girotti, J.R., Stariolo, R., Cardozo, R.M., Gentile, A., Juárez, M.P., 2009. Control of pyrethroid-resistant chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e434. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000434>
- Pei, X., Chen, N., Bai, Y., Qiao, J., Li, S., Fan, Y., Liu, T., 2019. BgFas1: A fatty acid synthase gene required for both hydrocarbon and cuticular fatty acid biosynthesis in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 103203. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.103203>
- Pfaffl, M., Horgan, G., Dempfle, L., 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. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>
- Picollo, M., Vassena, C., Santo Orihuela, P., Barrios, S., Zaidemberg, M., Zerba, E., 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. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585\(2005\)042\[0637:HRTPIA\]2.0.CO;2](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585(2005)042[0637:HRTPIA]2.0.CO;2)
- Pita, S., Lorite, P., Nattero, J., Galvão, C., Alevi, K., Teves, S., Azeredo-Oliveira, M., Panzera, F., 2016. New arrangements on several species subcomplexes of *Triatoma* genus based on the chromosomal position of ribosomal genes (Hemiptera - Triatominae). *Infect. Genet. Evol.* 43, 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.028>
- Pita, S., Panzera, F., Mora, P., Vela, J., Cuadrado, Á., Sánchez, A., Palomeque, T., Lorite, P., 2017. Comparative repeatome analysis on *Triatoma infestans* Andean and Non-Andean lineages, main vector of Chagas disease. *PLoS One* 12, e0181635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181635>
- Pizer, E., Chrest, F., DiGiuseppe, J., Han, W., 1998. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Res* 58, 4611–4615.
- Ponce, C., 2007. Current situation of Chagas disease in Central America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102, 41–44.
- Qiu, Y., Tittiger, C., Wicker-Thomas, C., Le Goff, G., Young, S., Wajnberg, E., Fricaux, T., Taquet, N., Blomquist, G.J., Feyereisen, R., 2012. An insect-specific P450 oxidative decarboxylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 14858–14863. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208650109>
- Ribeiro, J., Genta, F., Sorgine, M., Logullo, R., Mesquita, R., Paiva-Silva, G., Majerowicz, D., Medeiros, M., Koerich, L., Terra, W., Ferreira, C., Pimentel, A., Bisch, P., Leite, D., Diniz, M., Junior, J., Da Silva, M., Araujo, R., Gandara, A., Brosson, S., Salmon, D., Bousbata, S., González-Caballero, N., Silber, A., Alves-Bezerra, M., Gondim, K., Silva-Neto, M., Atella, G., Araujo, H., Dias, F., Polycarpo, C., Vionette-Amaral, R., Fampa, P., Melo, A., Tanaka, A., Balczun, C., Oliveira, J., Gonçalves, R., Lazoski, C., Rivera-Pomar, R., Diambra, L., Schaub, G., Garcia, E., Azambuja, P., Braz, G., Oliveira, P., 2014. An Insight into the Transcriptome of the Digestive Tract of the Bloodsucking Bug, *Rhodnius prolixus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2594. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002594>
- Rinkevich, F., Du, Y., Dong, K., 2013. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pestic. Biochem. Physiol.* 106, 93–100.
- Roca-Acevedo, G., Picollo, M., Santo-Orihuela, P., 2013. Expression of Insecticide Resistance in Immature Life Stages of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* 50, 816–818. <https://doi.org/10.1603/me12116>
- Romer, F., 1974. Ultrastructural changes of the oenocytes of *Gryllus bimaculatus* DEG (Saltatoria, Insecta) during the moulting cycle. *Cell Tissue Res.* 151, 27–46.
- Ronderos, J., Sterkel, M., Riccillo, F., Calderón-Fernández, G., Diambra, L., Villalobos-Sambucaro, M., 2015. Genomic and functional characterization of a methoprene-tolerant gene in the kissing-bug *Rhodnius prolixus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 216, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.04.018>
- Rössig, H., 1904. Von welchen Organen der Gallwespenlarven geht der Reiz zur Bildung der Pflanzengalle aus? Untersuchung der Drüsenorgane der Gallwespenlarven, zugleich ein

- Beitrag zur postembryonalen Entwicklung derselben. Zool. Jahrb. 20, 19–90.
- Roth, L., 1942. The oenocytes of *Tenebrio*. Ann. Entomol. Soc. Am. 35, 81–84.
- Ruvolo, M., Cruz-Landim, C., 1993. Morphologic and morphometric aspects of oenocytes of *Apis mellifera* queens and workers in different phases of life. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 88, 387–395.
- Santo Orihuela, P., Vassena, C., Zerba, E., Picollo, M., 2008. Relative contribution of monooxygenase and esterase to pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. J. Med. Entomol. 45, 298–306. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45)
- Schama, R., Pedrini, N., Juárez, M.P., Nelson, D.R., Torres, A., Valle, D., Mesquita, R.D., 2016. *Rhodnius prolixus* supergene families of enzymes potentially associated with insecticide resistance. Insect Biochem. Mol. Biol. 69, 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.06.005>
- Schmunis, G., 2007. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 102 Suppl, 75–85.
- Schofield, C., 2000. Challenges of Chagas disease vector control in Central America. Position Pap. WHO/CDS/WHOPES/GCDPPH/2000.1. WHO, Commun. Dis. Control. Prev. Eradication, WHO Pestic. Eval. Scheme, Geneva, Switz.
- Schofield, C., Galvão, C., 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. Acta Trop. 110, 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.01.010>
- Schuh, R., 2000. Biological systematics. Principles and applications. Cornell Univ. Press, Ithaca.
- Silva, A., Jander, G., Samaniego, H., Ramsey, J., Figueroa, C., 2012. Insecticide resistance mechanisms in the green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) I: A transcriptomic survey. PLoS One 7, 9–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036366>
- Smith, S., Tsai, S., 2007. The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. Nat Prod Rep. 24, 1041–1072. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Smith, S., Witkowski, A., Joshi, A., 2003. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. Prog. Lipid Res. 42, 289–317. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(02\)00067-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(02)00067-X)
- Soderlund, D., Knipple, D., 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. Insect Biochem. Mol. Biol. 33, 563–77.
- Swofford, D., 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Assoc. Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30, 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tan, D., Hu, H., Tong, X., Han, M., Wu, S., Ding, X., Dai, F., Lu, C., 2018. Comparative Analysis of the Integument Transcriptomes between Stick Mutant and Wild-Type Silkworms. Int J Mol Sci. 19, 3158. <https://doi.org/10.3390/ijms19103158>
- Tan, Q., Liu, W., Zhu, F., Lei, C., Wang, X., 2017. Fatty acid synthase 2 contributes to diapause preparation in a beetle by regulating lipid accumulation and stress tolerance genes expression. Sci. Rep. 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep40509>
- Teerawanichpan, P., Robertson, A., Qiu, X., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.06.004>
- Toé, K., N'Falé, S., Dabiré, R., Ranson, H., Jones, C., 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. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1342-6>
- Urbanski, J., Benoit, J., Michaud, M., Denlinger, D., Armbruster, P., 2010. The molecular physiology of increased egg desiccation resistance during diapause in the invasive mosquito, *Aedes albopictus*. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 277, 2683–2692. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0362>
- Usinger, R., Wygodzinsky, P., Ryckman, R., 1966. The biosystematics of Triatominae. Annu Rev Entomol 11 309–330.
- Valles, S., KeDong, Brenner, R., 2000. Mechanisms Responsible for Cypermethrin Resistance in a Strain of German Cockroach, *Blattella germanica*. Pestic. Biochem. Physiol. 66, 195–205. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/pest.1999.2462>

- Vassena, C., Picollo, M., Zerba, E., 2000. Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Med. Vet. Entomol.* 14, 51–55. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2000.00203.x>
- Vaz, A., Blomquist, G., Reitz, R., 1988. Characterization of the fatty acyl elongation reactions involved in hydrocarbon biosynthesis in the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem* 18, 177–184.
- VERA, J., WHEAT, C., FESCEMYER, HW FRILANDER, MJ CRAWFORD, D., HANSKI, I., MARDEN, J., 2008. Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing. *Ecol. Mol.* 17, 1636–1647. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1365-294x.2008.03666.x>
- Wang, W., Lv, Y., Fang, F., Hong, S., Guo, Q., Hu, S., Zou, F., Shi, L., Lei, Z., Ma, K., Zhou, D., Zhang, D., Sun, Y., Ma, L., Shen, B., Zhu, C., 2015. Identification of proteins associated with pyrethroid resistance by iTRAQ-based quantitative proteomic analysis in *Culex pipiens pallens*. *Parasit. Vectors* 8, 95. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0709-5>
- Wang, Y., Kuhajda, F., Sokoll, L., Chan, D., 2001. Two-site ELISA for the quantitative determination of fatty acid synthase. *Clin Chim Acta* 304, 107–15.
- White, S., Zheng, J., Zhang, Y., Rock, C., 2005. The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 791–831.
- Wicker-Thomas, C., Garrido, D., Bontonou, G., Napal, L., Mazuras, N., Denis, B., Rubin, T., Parvy, J., Montagne, J., 2015. Flexible origin of hydrocarbon/pheromone precursors in *Drosophila melanogaster*. *J. Lipid Res.* 56, 2094–2101. <https://doi.org/10.1194/jlr.M060368>
- Wicker-Thomas, C., Guenachi, I., Keita, Y., 2009. Contribution of oenocytes and pheromones to courtship behavior in *Drosophila*. *BMC Biochem* 10, 21.
- Wigglesworth, V., 1988. The source of lipids and polyphenols for the insect cuticle: The role of fat body, oenocytes and oenocytoids. *Tissue Cell* 20, 919–932. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(88\)90033-X](https://doi.org/10.1016/0040-8166(88)90033-X)
- Wigglesworth, V., 1975. Incorporation of lipid into the epicuticle of *Rhodnius* (Hemiptera). *J Cell Sci* 19, 459–485.
- Wigglesworth, V., 1970. Structural lipids in the insect cuticle and the function of the oenocytes. *Tissue Cell* 2, 155–179.
- Wigglesworth, V., 1945. Transpiration through the cuticle of insects. *J. Exp. Biol.* 21, 97–114.
- 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.B., 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. *Quart. J. Micr. Sci.* 76, 269–318.
- Wisnivesky-Colli, C., Gürtler, R., Solarz, N., Schweigmann, N., Pietrokovsky, S., Alberti, A., Flo, J., 1993. Dispersive flight and house invasion by *Triatoma guasayana* and *Triatoma sordida* in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* <https://doi.org/10.1590/S0074-02761993000100006>
- Wood, O., Hanrahan, S., Coetzee, M., Koekemoer, L., Brooke, B., 2010. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasites and Vectors* 3, 67. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-67>
- Wu, S., Tong, X., Peng, C., Xiong, G., Lu, K., Hu, H., Tan, D., Li, C., Han, M., Lu, C., Dai, F., 2016. Comparative analysis of the integument transcriptomes of the black dilute mutant and the wild-type silkworm *Bombyx mori*. *Sci. Rep.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep26114>
- Yahouédo, G., Chandre, F., Rossignol, M., Ginibre, C., Balabanidou, V., Mendez, N., Pigeon, O., Vontas, J., Cornelie, S., 2017. Contributions of cuticle permeability and enzyme detoxification to pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Sci. Rep.* 7, 11091. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11357-z>
- Zhou, X., Qian, K., Tong, Y., Zhu, J., Qiu, X., Al., E., 2014. De Novo Transcriptome of the Hemimetabolous German Cockroach (*Blattella germanica*). *PLoS ONE* 9 9, e106932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106932>
- Zhou, Y., Buijs, N., Zhu, Z., Qin, J., Siewers, V., Nielsen, J., 2016. Production of fatty acid-derived oleochemicals and biofuels by synthetic yeast cell factories. *Nat. Commun.* 7, 11709. <https://doi.org/10.1038/ncomms11709>
- Zhu, F., Gujar, H., Gordon, J., Haynes, K., Potter, M., Palli, S., 2013. Bed bugs evolved unique

- adaptive strategy to resist pyrethroid insecticides. *Sci. Rep.* 3, 1456.
<https://doi.org/10.1038/srep01456>
- Zhu, F., Parthasarathy, R., Bai, H., Woithe, K., Kausmann, M., Nauen, R., Harrison, D., Palli, S., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000059107>
- Zhu, J., Zhao, C., Lu, F., Bengtsson, M., Lofstedt, C., 1996. Reductase specificity and the ratio regulation of E/Z isomers in pheromone biosynthesis of the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 171–176.