UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO de Cs. Biológicas.

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Estudios moleculares de la resistencia a insecticidas en
triatominos***

Tesista: Lic. Ivana Samanta Sierra

Directora: Dra. Sheila Ons

Marzo de 2018

A mi amor, Alejo.
A mis padres, Susana y Raúl.
A mi hermano, Darío.

Agradecimientos

Este trabajo de tesis fue financiado con el aporte de las siguientes instituciones:

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

Le quiero agradecer también a las personas que me acompañaron durante estos años e hicieron posible esta tesis.

En primer lugar a mi directora, la Dra. Sheila Ons, por darme la oportunidad de trabajar en el CREG, por guiarme durante estos años con sus conocimientos y compromiso. Por brindarme su confianza y su apoyo en los momentos más necesarios. Por su inagotable y contagioso optimismo, sin el cual no habría podido llegar hasta acá.

A Mario y a Raúl, que me abrieron las puertas del LEPP cuando era una estudiante de grado y me contagiaron tan intensamente su amor por la ciencia que decidí seguir trabajando en esto toda mi vida.

A la gente del CIPEIN que me proveyeron de material biológico cuando hizo falta, pero también de conocimientos y de consejos. Porque siempre logran que sea un gusto ir hasta allá.

A mis compañeros de laboratorio, por la ayuda, los consejos, los mates y la buena onda. Porque aprendemos entre todos en un clima de amistad y compañerismo.

A mis amigos Hugo, Nico, Ari, Dani, Lau, Elio y Seba gracias por la paciencia y por entender que no importa si nos vemos una vez al mes, una vez al año o una vez por década porque siempre va a ser como si hubiera sido ayer. Los amo!

A Gonza, por presentarme a Sheila. Por preocuparse siempre por mí, por ser mi compañero y mi amigo a lo largo de tantos años.

A Lu y Naty, por cuidar mis experimentos como si fueran propios, por enseñarme todo lo que saben y ser siempre un consejo acertado. Por hacerme reír cuando menos ganas tengo, pero más lo necesito. Por preocuparse tanto por mí, por estar siempre que las necesite y por brindarme su amor y amistad incondicional. Ustedes son lo más valioso que me dio el doctorado!

A Lu y a Emi, por entender mis ausencias y siempre esperarme con una sonrisa, un abrazo y un beso listos.

A Lis, Agnes, Nico, Julián y Glory, por apoyarme siempre y por quererme tanto. Gracia familia!

A mi hermano, por ser incondicional conmigo y por esforzarse siempre para darme todo. Sos el mejor hermano y amigo que la vida me pudo haber dado!

A mi papá, que siempre se preocupa por mi, que está presente cada vez que lo necesito, que me entiende cuando no puedo ir, pero que siempre tiene listo algo para el asado por si llego. Gracias por ser el padre más amoroso que una hija puede querer!

A Susana, que fue mi mama y mi maestra, que me enseñó que cuando pasa la tormenta sale el sol más fuerte, me enseñó a luchar por mis sueños y a pelear por lo que quiero y pienso.

A mi marido. Por las charlas acerca de la vida, de la ciencia y del amor. Por ayudarme en todo, todo el tiempo. Por confiar siempre en mi y enseñarme a que yo haga lo mismo. Por amarme incondicionalmente. Por ser mi compañero, mi sostén, mi confidente y mi mejor amigo. Por ser mi mundo.

Parte I

Resumen

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la enfermedad de Chagas es una de las principales enfermedades desatendidas del subcontinente latinoamericano. El agente causante es el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, transmitido a humanos por insectos triatomíneos de distintas especies. Debido a la ausencia de vacunas y tratamientos efectivos para la etapa crónica de la enfermedad, el control del vector sigue siendo el medio elegido para reducir el riesgo de transmisión.

Después de casi 30 años de tratamiento con insecticidas piretroides, han emergido poblaciones de *Triatoma infestans* con altísimos niveles de resistencia, asociadas a fallas en las campañas de control, lo que plantea la necesidad de programas para el manejo de resistencia a nivel regional. Un requerimiento fundamental para ello es la detección temprana de la dispersión de poblaciones e individuos resistentes, así como del surgimiento de nuevos focos. Los piretroides ejercen su acción insecticida modificando el funcionamiento fisiológico de canales proteicos de Na^+ dependientes de voltaje (Na_V), presentes en la membrana de células excitables. Se conoce como *kdr* (*knockdown resistance*) a la reducción en la susceptibilidad a piretroides causada por mutaciones puntuales en el gen Na_V . El mecanismo de resistencia tipo *kdr* ha sido descrito en numerosas especies de insectos de interés económico y sanitario. La gran mayoría de las mutaciones correlacionadas con resistencia a piretroides se encuentra en el dominio II de esta proteína.

El diseño de ensayos moleculares para detección de mutaciones asociadas a resistencia habilita la detección temprana de dispersión y surgimiento de nuevos focos, al permitir detectar la presencia de dichas mutaciones en insectos individuales, cuando la frecuencia poblacional de las mismas aún es baja. La detección temprana no puede conseguirse con ensayos de toxicidad, que detectan resistencia a nivel poblacional y no individual. En este sentido, en la primera parte de esta Tesis se realizó una evaluación de la sensibilidad y una optimización de los métodos moleculares de detección de mutaciones asociadas a resistencia, seguida de un estudio de la presencia de mutaciones para la región IIS4-IIS6 del gen del canal TiNa_V presentes en distintas poblaciones de *T. infestans* resistentes a piretroides provenientes de la ecoregión del Gran Chaco. Por otro lado, a través de una secuencia de TiNa_V detectada en una base de datos transcriptómica depositada en Vectorbase (<https://www.vectorbase.org/>), complementada con el clonado y secuenciación de regiones concretas del gen, se obtuvo la secuencia nucleotídica completa del mismo, y se realizó una caracterización bioinformática de la secuencia aminoacídica. Los resultados de esta parte del trabajo podrían tener aplicabilidad en el manejo de resistencia dentro de las campañas de control primario de Chagas.

Durante el transcurso de la primera parte de la Tesis hemos encontrado que, aunque las mutaciones en el gen TiNa_V parecen ser la principal causa de resistencia a piretroides en *T. infestans* provenientes del Gran Chaco, no toda la resistencia es explicable por estos polimorfismos; distintas poblaciones con la misma frecuencia en una mutación *kdr* presentaron tasas de resistencia muy variables. Esto puede indicar que existen otros mecanismos de resistencia potencialmente involucrados en el fenómeno, tales como procesos de detoxificación y cambios en la penetración cuticular.

En la segunda parte de esta Tesis, se realizó un estudio comparativo de la expresión de diferentes enzimas detoxificativas entre una población sensible y una resistente de *T. infestans* provenientes del Gran Chaco. También se estudió la expresión génica en una población sensible expuesta a deltametrina, a fin de estudiar su posible papel en la respuesta detoxificativa a insecticidas piretroides, y posiblemente en la resistencia. Los experimentos mostraron una sobreexpresión de un citocromo P450 del clado 4 en la población resistente

de *T. infestans* del Gran Chaco. No detectamos cambios en la expresión de las enzimas estudiadas cinco horas después de una topicación con deltametrina.

Se estudió el rol de una Glutación Transferasa del clado Delta (deltaGST) en la detoxificación de deltametrina. Se realizaron estudios bioinformáticos y de fisiología molecular usando como modelo *Rhodnius prolixus*. Se registró un aumento en la letalidad causada por dosis bajas de deltametrina cuando la expresión del gen de *gst delta* fue disminuida significativamente con técnicas de ARN de interferencia.

La llamativa conservación en la estructura, función y farmacología del canal de sodio dependiente de voltaje a través del reino animal, genera que aquellos insecticidas que tengan como blanco esta molécula posean también una toxicidad potencial para otras especies. En vista de ello, y teniendo en cuenta que las moléculas del sistema neuroendocrino (neuropéptidos y sus receptores) han sido propuestos como blanco de insecticidas, en el Capítulo 3 se estudió la expresión diferencial de genes precursores de diferentes neuropéptidos entre una población de *T. infestans* sensible a piretroides y otra resistente, a fin de obtener indicios de su posible papel en procesos asociados a resistencia. Por otra parte, se comparó el efecto de deltametrina en la inducción de la expresión de genes precursores de neuropéptidos en una población susceptible de *T. infestans*.

En el Capítulo 4, a partir de secuencias ortólogas en *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster* y *Tribolium castaneum*, se identificaron genes de receptores de neuropéptidos en transcriptomas de *T. infestans*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma pallidipennis* generados en nuestro laboratorio, así como en el genoma de *R. prolixus*, por medio de búsquedas en bases de datos y análisis filogenéticos. Se espera que esta última parte del trabajo de Tesis aporte conocimientos para ampliar los horizontes en la investigación de posibles nuevos blancos de insecticidas, que sean capaces de reemplazar o complementar a los neurotóxicos dentro de estrategias de manejo integrado de plagas.

Índice General

Dedicatoria	I
Agradecimientos	III
I Resumen	V
Índice General	IX
Lista de Tablas	XIII
Lista de Figuras	XV
II Introducción general	1
III Resultados	29
1. Análisis bioinformático del canal de sodio dependiente de voltaje en <i>T. infestans</i> . Análisis de mutaciones asociadas a resistencia a piretroides en poblaciones del Gran Chaco	31
1.1. Hipótesis	31
1.2. Objetivos específicos	31
1.3. Introducción	31
1.4. Resultados	32
1.4.1. Determinación de la secuencia completa de cDNA del canal de sodio dependiente de voltaje de <i>T. infestans</i> . Caracterización bioinformática estructural	32
1.4.2. Evaluación de la sensibilidad de los métodos moleculares de detección de mutaciones asociadas a resistencia	44

1.4.3.	Estudio de las mutaciones <i>kdr</i> en la región IIS4-IIS6 del gen del canal <i>TiNa_v</i> en poblaciones de <i>T. infestans</i> resistentes a piretroides del Gran Chaco	44
1.4.4.	Evaluación de la frecuencia de la mutación L1014F en poblaciones de <i>T. infestans</i> del Gran Chaco	46
1.5.	Discusión	47
2.	Evaluación de la contribución de enzimas detoxificativas a la resistencia a piretroides en triatominos	51
2.1.	Hipótesis	51
2.2.	Objetivos específicos	51
2.3.	Introducción	51
2.4.	Resultados	55
2.4.1.	Estudio de la implicancia de una CCE del clado E en la resistencia a insecticidas piretroides en <i>T. infestans</i>	55
2.4.2.	Estudio de la implicancia una P450 del clan 4 en la resistencia a insecticidas piretroides en <i>T. infestans</i>	56
2.4.3.	Estudio de la implicancia de GST delta en la resistencia a insecticidas piretroides en <i>T. infestans</i>	57
2.4.4.	Caracterización bioinformática de la GST delta de <i>R. prolixus</i>	58
2.4.5.	Evaluación de la función de la enzima GSTs delta en la detoxificación de piretroides en <i>R. prolixus</i>	61
2.5.	Discusión	63
3.	Estudio de la contribución de hormonas peptídicas a la resistencia a insecticidas y detoxificación en triatominos	67
3.1.	Hipótesis	67
3.2.	Objetivos específicos	67
3.3.	Introducción	67
3.4.	Resultados	72
3.4.1.	Comparación de la expresión de genes precursores de neuropéptidos en <i>T. infestans</i> entre una población sensible y una de alta resistencia a piretroides	72
3.4.2.	Expresión de genes precursores de neuropéptidos en respuesta a deltametrina en una población susceptible a piretroides	74
3.5.	Discusión	76
4.	Transcriptómica y filogenia para la identificación de receptores de neuropéptidos en triatominos	79

4.1. Hipótesis	79
4.2. Objetivos específicos	79
4.3. Introducción	79
4.4. Resultados	81
4.4.1. Identificación de proteínas G acopladas a receptores para neuropéptidos en triatóminos.	81
4.4.1.1. GPCRs para Neuropéptidos Familia A	81
4.4.1.2. GPCRs para Neuropéptidos (Familia B)	84
4.5. Discusión	85
IV Discusión general y conclusiones finales	89
V Materiales y métodos	97
Materiales	99
Insectos	99
Reactivos	99
Soluciones para la extracción de ARN	99
Soluciones para el análisis de ácidos nucleicos por electroforesis	100
Soluciones para extracción de ADN plasmídico (miniprep)	100
Soluciones de antibióticos	100
Medios de cultivo y bacterias	100
Medio LB (Luria-Bertani)	100
Cepas bacterianas	101
<i>Primers</i>	101
Métodos	103
Preparación y análisis de ácidos nucleicos	103
Electroforesis en geles de agarosa	103
Preparación de bacterias <i>E. coli</i> competentes químicas	103
Extracción de ARN y preparación de ADNc	103
Extracción de ADN genómico	106
Evaluación de la sensibilidad de los métodos moleculares de detección de mutaciones asociadas a resistencia	107
Clonado molecular	109

Transformación en bacterias competentes químicas	110
Aislamiento del ADN plasmídico (miniprep)	110
PCR Amplification of Specific Alleles (PASA)	110
Estudio de las mutaciones <i>kdr</i> en la región IIS4-IIS6 del gen del canal $TiNa_v$ existentes en distintas poblaciones de <i>T. infestans</i> resistentes de ecoregión del Gran Chaco	112
Evaluación de la frecuencia poblacional de la mutación L1014F en poblaciones de <i>T. infestans</i> del Gran Chaco	112
Determinación de la secuencia completa de ADNc del Canal de Sodio dependiente de Voltaje de <i>T. infestans</i> . Caracterización bioinformática estructural	113
Estudio de la implicancia de las enzimas detoxificativas y hormonas peptídicas en la resistencia a insecticidas piretroides en <i>T. infestans</i>	114
Caracterización bioinformática de la GST δ de <i>R. prolixus</i>	115
Evaluación de la función de la enzima GSTs δ en la detoxificación de piretroides en <i>R. prolixus</i>	116
Transcriptómica y filogenia para la identificación de receptores de neuropéptidos en triatomíneos	119
Material de partida y secuenciación	119
Generación de bases de datos y búsqueda de secuencias	119
Análisis filogenéticos	120
VI Bibliografía	121
Bibliografía	123

Lista de Tablas

1.1. Composición aminoacídica de los canales de sodio dependientes de voltaje de <i>T. infestans</i> y <i>R. prolixus</i>	37
1.2. Composición atómica de los canales de sodio dependientes de voltaje de <i>T. infestans</i> y <i>R. prolixus</i>	37
1.3. Patrón de estructuras secundarias halladas para los canales de sodio dependientes de voltaje de <i>T. infestans</i> y <i>R. prolixus</i>	38
1.4. Posiciones de las 20 hélices transmembrana con alta probabilidad de ocurrencia en el canal de sodio dependiente de voltaje de <i>T. infestans</i>	40
1.5. Dominios hallados para las secuencias aminoacídicas de los canales de sodio dependiente de voltaje de <i>R. prolixus</i> , <i>T. infestans</i> , <i>C. lectularius</i> y <i>D. melanogaster</i>	43
1.6. Frecuencias para los alelos <i>kdr</i> de nueve poblaciones de <i>T. infestans</i> del Gran Chaco.	47
2.1. Mortalidad de los insectos deficientes en GST (0,1 μ g/Ins, 0,5 μ g/Ins, 1,0 μ g/Ins de ds ARN-GST) que fueron topicados con deltametrina ó acetona (controles).	62
3.1. Funciones de neuropéptidos y hormonas peptídicas en insectos.	70
4.1. GPCRs para neuropéptidos de la familia A identificados en el genoma de <i>R. prolixus</i> y los transcriptomas de <i>Triatoma spp.</i>	86
4.2. GPCRs para neuropéptidos de la familia B identificados en el genoma de <i>R. prolixus</i> y los transcriptomas de <i>Triatoma spp.</i>	87
4.3. <i>Primers</i> utilizados durante el presente trabajo de Tesis.	101
4.4. Formulación de la reacción de la DNAsa.	104
4.5. Detalles de la formulación de la reacción de retrotranscripción.	105
4.6. Formulación de la PCR con los <i>primers</i> del gen de actina para comprobar la calidad del ADNc de <i>R. prolixus</i>	105
4.7. Ciclado de la PCR con los <i>primers</i> del gen de Actina para comprobar la calidad del ADNc de <i>R. prolixus</i>	105

4.8. Detalles de la formulación de la PCR con los <i>primers</i> del gen de tubulina para comprobar la calidad del ADNc de <i>T. infestans</i>	106
4.9. Detalles del ciclado de la PCR con los <i>primers</i> del gen de tubulina para comprobar la calidad del ADNc de <i>T. infestans</i>	106
4.10. Formulación de la PCR 1.	108
4.11. Detalles del ciclado de la PCR 1.	108
4.12. Formulación de la PCR 2.	108
4.13. Detalles del ciclado de la PCR2.	108
4.14. Formulación de la PCR 3.	109
4.15. Detalles del ciclado de la PCR 3.	109
4.16. Mix de ligación del clonado molecular.	109
4.17. Detalles de la formulación del PASA.	111
4.18. Detalles de ciclado del PASA.	111
4.19. Formulación de la PCR en tiempo real.	115
4.20. Detalles de ciclado de PCR en tiempo real.	115
4.21. Formulación de la PCR1 de GST δ	117
4.22. Formulación de la PCR 1 para el gen de la β -lactamasa.	117
4.23. Formulación de la PCR2 de los genes de GST δ y de β -lactamasa para interferencia.	117
4.24. Formulación de la reacción de retrotranscripción.	118
4.25. Detalle del número de insectos interferidos con ARNdc de GST δ o β -lactamasa y topicados con deltametrina ó acetona.	119

Lista de Figuras

1.	Distribución de los principales vectores de la enfermedad de Chagas en América.	4
2.	Triatomíneos, en su estadio adulto, más importantes epidemiológicamente en América	7
3.	Estructura molecular del DEET.	10
4.	Diagrama de la estructura del canal de sodio en insectos.	16
5.	Ejemplos de moléculas de insecticidas sintéticos piretroides y su clasificación.	17
6.	Detalle del sitio de acción descrito por O'Reilly et al. [90](sitio 1).	19
7.	Detalle del sitio de acción descrito por [93](sitio 2).	20
8.	Modelo de estructura transmembrana de la subunidad α del canal de sodio dependiente de voltaje.	21
1.1.	Secuencia de cDNA completa de <i>T. infestans</i> y su traducción.	34
1.2.	Alineamiento de la secuencia aminoacídica de los canales de sodio dependientes de voltaje de <i>D. melanogaster</i> , <i>C. lectularius</i> , <i>R. prolixus</i> y <i>T. infestans</i>	36
1.3.	Patrón de estructuras secundarias que posee el canal de sodio dependiente de voltaje de <i>T. infestans</i>	38
1.4.	Predicción bioinformática de las hélices transmembrana presentes en la secuencia de TiNav obtenida con el programa TMHMM.	39
1.5.	Gráficos obtenidos comparando diferentes bases de datos para los canales de sodio dependiente de voltaje de <i>R. prolixus</i> , <i>T. infestans</i> , <i>C. lectularius</i> y <i>D. melanogaster</i>	41
1.6.	Dominios hallados para las secuencias aminoacídicas de los canales de sodio dependiente de voltaje de <i>R. prolixus</i> , <i>T. infestans</i> , <i>C. lectularius</i> y <i>D. melanogaster</i>	43
1.7.	Determinación de la sensibilidad para el ensayo PASA.	44
1.8.	Mapa del norte de Argentina y el sur de Bolivia que muestra la ubicación de los pueblos donde se colectaron los <i>T. infestans</i>	45
1.9.	Ensayo PASA para cada población analizada.	46
2.1.	Detalle del mecanismo de ARNi.	53

2.2.	Análisis de la expresión génica de la CCE del clado E de <i>T. infestans</i> pertenecientes a una población sensible (S) y otra resistente (R) a piretroides.	55
2.3.	Análisis de la expresión génica de la CCE del clado E de <i>T. infestans</i> pertenecientes a una población de referencia (R).	56
2.4.	Análisis de la expresión génica de una CYP del clan 4 de <i>T. infestans</i> entre una población sensible (S) y otra resistente (R) a piretroides.	56
2.5.	Análisis de la expresión génica de una CYP del clan 4 de <i>T. infestans</i> pertenecientes a una población sensible (S) a piretroides.	57
2.6.	Análisis de la expresión génica de la GST Delta de <i>T. infestans</i> pertenecientes a una población sensible (S) y otra resistente (R) a piretroides.	57
2.7.	Análisis de la expresión génica de la GST de la clase delta en <i>T. infestans</i> pertenecientes a una población sensible (S) a piretroides.	58
2.8.	Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las GSTs de <i>Lygus lineolaris</i> , <i>Acyrtosiphon pisum</i> , <i>Rhopalosiphum maidis</i> , <i>Rhopalosiphum padi</i> , <i>Halymorpha halys</i> y <i>Cimex lectularius</i> con las GST delta de <i>R. prolixus</i> halladas el transcriptoma de antena (comp1124) y en Vectorbase (RPRC013179).	59
2.9.	Secuencia de la GST delta de <i>R. prolixus</i> y predicción de su secuencia aminoacídica.	59
2.10.	Dominios hallados para GST con el programa online del NCBI de <i>CD-search</i> (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi).	60
2.11.	Análisis de similitud secuencial y estructura secundaria de las GST delta de <i>R. prolixus</i> , <i>D. melanogaster</i> , <i>A. gambiae</i> y <i>A. dirus</i> .	61
2.12.	Caída del transcripto para las diferentes concentraciones de ARNdc inyectado.	62
2.13.	Curva de mortalidad en el tiempo obtenida para las concentración de ARNdc GST de 0,1 μ g (p(0,1)=0,3356; n=9), 0,5 μ g (p(0,5)=0,0099; n=8) ó 1,0 μ g (p(1,0)=0,0158; n=18) cuando los insectos son topicados con deltametrina.	63
3.1.	Representación de un precursor de neuropéptidos.	68
3.2.	Síntesis de neuropéptidos.	69
3.3.	Expresión diferencial de los neuropéptidos AKH, CCH-amida, NPLP-1 u OKb/c entre una población de <i>T. infestans</i> sensible (S) y una resistente (R)	73
3.4.	Expresión diferencial de los neuropéptidos ITG-like y NVP-like entre una población de <i>T. infestans</i> sensible (S) y una resistente (R).	74
3.5.	Análisis de la expresión génica de los neuropéptidos AKH, CCH-amida, ITG-like, NPLP 1, NVP-like u OKb/c de <i>T. infestans</i> pertenecientes a una población de referencia (R).	75
4.1.	Árbol resultante del análisis filogenético de GPCRs de la familia A de neuropéptidos de <i>D. melanogaster</i> (Dm), <i>A. mellifera</i> (Am), <i>A. gambiae</i> (Ag), <i>T. castaneum</i> (Tc), <i>B. mori</i> (Bm), <i>R. prolixus</i> (RPRC), <i>T. infestans</i> , <i>T. pallidipennis</i> y <i>T. dimidiata</i> (Td).	84

4.2. Árbol resultante del análisis filogenético de GPCRs de la familia B de neuropéptidos de <i>D. melanogaster</i> (Dm), <i>A. mellifera</i> (Am), <i>An. gambiae</i> (Ag), <i>T. castaneum</i> (Tc), <i>B. mori</i> (Bm), <i>R. prolixus</i> (RPRC) y <i>T. dimidiata</i> (Td).	88
---	----

Parte II

Introducción general

Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una infección parasitaria crónica e incurable que causa discapacidad y muerte [1–3]. Actualmente se calcula que entre 9 y 11 millones de personas en el mundo se encuentran infectadas, mientras que entre 50 y 60 millones se encuentran en riesgo de contraerla [4].

El primer caso fue descrito en 1909 por Carlos Chagas (1879–1934). Este médico brasileño describió ampliamente la dolencia, al incluir no solo al parásito causante en sus estudios, sino también a los vectores y reservorios del mismo, el mecanismo de transmisión y los síntomas en la fase aguda [5]. Posteriormente, Salvador Mazza en Argentina le dio nuevamente importancia a partir de la identificación de casos en la región de Chaco [6].

La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. La forma más común de transmisión es vectorial. Los principales agentes transmisores son *T. infestans*, *Triatoma brasiliensis* y *Panstrongylus megistus* en los países del cono sur; mientras que *Triatoma dimidiata* lo es en los países centroamericanos (Figura 1) [5]. Por otro lado, existen más de 150 especies domésticas y otros mamíferos que pueden funcionar como reservorios del parásito [3, 7].

Figura 1: Distribución de los principales vectores de la enfermedad de Chagas en América. Adaptado de [7].

Si bien las aves, los reptiles y los anfibios son refractarios para la enfermedad de Chagas, los animales del peridomicilio son fuentes de alimento para mantener las poblaciones de triatomíneos en las inmediaciones de las viviendas humanas [5]. Los materiales característicos de las viviendas en amplias regiones rurales empobrecidas de Latinoamérica, tales como adobe, paja, etc, ofrecen una variedad de refugios y acceso a hospederos, donde las colonias de triatomíneos encuentran condiciones ideales para reproducirse. En este sentido, tanto Carlos Chagas como Salvador Mazza remarcaron la existencia de una correlación entre la calidad de las viviendas y la infestación por triatomíneos [8].

Además de la transmisión vectorial, existen formas menos frecuentes de infección de Chagas, entre las que se encuentra la transmisión congénita, la transfusión de sangre y el trasplante de órganos

La enfermedad de Chagas puede dividirse en dos etapas sucesivas, la fase aguda y la crónica. La fase aguda tiene una duración de seis a ocho semanas y es generalmente asintomática. Cuando los síntomas aparecen incluyen fiebre prolongada, malestar, agrandamiento de las glándulas linfáticas, palidez, dolor muscular, dificultad en la respiración, hinchazón y dolor abdominal o del pecho. La transmisión vectorial puede incluir también inflamación en la zona donde ha penetrado el parásito por la piel o por las mucosas [3, 9?]. Una vez que la fase aguda termina, muchos de los pacientes recuperan un estado aparentemente saludable y la infección sólo puede ser verificada mediante pruebas serológicas o parasitológicas. Esta forma asintomática de la fase crónica de la enfermedad de Chagas se la denomina “indeterminada” [10].

En fase crónica, los parásitos se alojan principalmente en el corazón y el músculo digestivo. Hasta un 30 % de los pacientes sufre de desórdenes cardíacos y hasta un 10 % digestivos (generalmente agrandamiento del esófago o el colon), neurológicos, o alteraciones variadas. La infección puede generar muerte súbita o falla cardíaca causada por una destrucción progresiva del músculo cardíaco [1]. De esta forma, la manifestación clínica de esta enfermedad se divide en digestiva, cardíaca y cardio-digestiva. Se ha documentado que la presencia de estos cuadros se da diferencialmente según la zona, lo que ha sido atribuido a la cepa de *T. cruzi* presente en cada área [3].

La forma infecciosa de *T. cruzi* (tripomastigotes) se encuentra en las heces de los insectos triatominos, y es a través de éstas que se realiza el contagio. Los tripanosomas que se encuentran en las heces, que los insectos depositan luego de alimentarse del huésped, penetran en los tejidos a través de abrasiones de la piel, de la mucosa de la boca, o de los ojos [1, 11].

La infección por *T. cruzi* habría sido en un principio enzoótica, pero la migración de personas a los hábitats silvestres, la deforestación, las condiciones de vida deficientes, la pobreza y ciertos factores ecológicos promovieron la adaptación de los triatominos a los ambientes domésticos y peridomésticos. De esta forma, se estableció un nuevo ciclo de infección, por lo que la enfermedad se convirtió en una zoonosis.

La enfermedad de Chagas abarca prácticamente todas las Américas. Se encuentra presente en zonas endémicas de 21 países, desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina y Chile. Epidemiológicamente, Argentina, Brasil y México encabezan la lista con más casos estimados en valores absolutos, seguidos de Bolivia [12]. La mayor cantidad de infectados por transmisión vectorial está dada en la ecorregión del Gran Chaco (ver más adelante). Según la transmisión vectorial la lista se encuentra encabezada por Argentina, México y Colombia. Se estima que un 13 % de la población Latinoamericana está en riesgo de contraer la enfermedad, aproximadamente 60 millones de personas [12]. Si bien los cálculos de las personas infectadas y en riesgo son variables en la bibliografía, entre 9-11 millones de personas en el mundo se encuentran infectadas [4, 9, 13].

La enfermedad de Chagas es hoy un grave problema social y de salud pública en Latinoamérica y la OMS la ha considerado una enfermedad desatendida [9]. Generalmente prevalece en zonas pobres o rurales en América Central y América del Sur, donde la transmisión es principalmente vectorial. Se ha visto una preferencia de los vectores por colonizar aquellas viviendas hechas con barro o adobe que ofrecen múltiples refugios [9].

El tratamiento de la enfermedad de Chagas se realiza con medicamentos como el benznidazol y el nifurtimox, con una tasa de éxito que depende de la fase y del momento en el que son administrados. Son eficaces contra el parásito si se administran al inicio de la etapa aguda, pero a medida que la enfermedad está más avanzada la eficacia disminuye. Además, ambos medicamentos presentan múltiples reacciones adversas: están contraindicados para pacientes embarazadas o con insuficiencia renal. Particularmente el nifurtimox está contraindicado en personas con antecedentes de enfermedades del sistema nervioso, neurológicas o trastornos psiquiátricos [1, 9, 14]. En la actualidad se ha avanzado en la búsqueda de nuevos tratamientos. En modelos murinos se han obtenido muy buenos resultados con inhibidores de la síntesis del ergosterol como el posaconazol, que actúa interfiriendo en la síntesis de la membrana del protozoo. Este tipo de tratamiento ha demostrado también una excelente tolerancia en el ser humano. Se han desarrollado ensayos clínicos para comparar el posaconazol con el benznidazol en pacientes con la fase crónica de la enfermedad en donde, luego de dos meses de tratamiento y 10 de seguimiento, se observó una tasa de fracaso del 80 % (mayor que la del benznidazol 31). Sin embargo, durante el tratamiento casi todos los pacientes mostraron una supresión mantenida de la carga parasitaria, por lo que el posaconazol presenta actividad contra el tripanosoma pero no es capaz de erradicar el parásito [12].

La ausencia de vacunas, así como de tratamientos óptimos para su cura, hace que la estrategia preferida para el control de Chagas sea reducir las poblaciones de insectos triatomíneos, particularmente la colonización en los domicilios humanos. Para el control de vectores, la OMS propone un manejo integrado que incluya medidas de índole social y cultural, como el mejoramiento de las viviendas y la educación sanitaria para aquellas poblaciones que se encuentren en riesgo de transmisión (WHO 2012, 2016) [13]. Se recomienda implementar medidas que permitan reducir el consumo de insecticidas neurotóxicos, los cuales propician la aparición de poblaciones resistentes, y tienen un alto impacto ambiental. En el contexto de un manejo integrado, por otra parte, resulta importante dirigir esfuerzos científicos en la búsqueda de nuevos compuestos insecticidas que permitan complementar o reemplazar a los neurotóxicos.

Insectos Triatominos (Hemiptera: Reduviidae)

La subfamilia *Triatominae* es la única subfamilia de Reduviidae cuyos miembros se alimentan de sangre de vertebrados. Los 149 miembros conocidos de esta subfamilia son potenciales vectores de la enfermedad de Chagas [15, 16]. Los triatominos pueden ser clasificados en cinco tribus: *Alberproseniini*, *Bolboderini*, *Cavernicolini*, *Rhodniini* y *Triatomini* que se dividen en 15 géneros [17]. Estos se distribuyen desde el sur de los Estados Unidos hasta la Patagonia, con algunas especies de *Triatomini* conocidas en la India y Australia. De las cinco tribus, *Rhodniini* y *Triatomini* son las más diversas y epidemiológicamente más relevantes [15]. Si bien muchos triatominos se encuentran en ambientes selváticos, algunos han logrado adaptarse al ambiente doméstico, colonizando viviendas y alimentándose de los seres humanos y animales que habitan en ellas. Aunque todas las especies de triatominos son potenciales transmisores de *T. cruzi*, solo algunas tienen la capacidad de ser buenos vectores, ya que son necesarias ciertas características para ello [11], a saber:

- La adaptación a las viviendas humanas.
- Alto grado de antropofilia.
- Corto espacio de tiempo entre la ingesta de sangre y la defecación.
- Amplia distribución geográfica.

Epidemiológicamente, los vectores más importantes son *T. infestans*, *T. dimidiata* y *R. prolixus* (Figura 2). En el sur de América Latina, el principal vector es *T. infestans* mientras que en países como Venezuela y Colombia es reemplazado por *R. prolixus*. Por su parte, *T. dimidiata* es un vector importante en Ecuador, Perú y el sur de México [11].

Figura 2: Triatominos, en su estadio adulto, más importantes epidemiológicamente en América

Su característica de hematófagos obligados hace que aquellos triatominos adaptados a vivir en viviendas humanas se encuentren generalmente dentro del domicilio, o bien en el

peridomicilio asociados a animales de cría [11]. Son insectos de hábitos nocturnos, por lo que durante el día se esconden en las grietas de las paredes, en los muebles de madera o en techos hechos de materiales como la paja. Durante la noche salen del refugio en busca de alimento [11].

La saliva de estos insectos posee actividad analgésica, lo que les permite un largo periodo de alimentación (20-30 minutos) sin ser detectados. La transmisión de la enfermedad se produce a través de la forma metacíclica de *T. cruzi* (tripomastigote) la cual está presente en las heces del insecto vector, por lo que el tiempo durante el cual éste se alimenta es primordial para que se produzca el contagio [11].

La dispersión de estos insectos puede darse de forma pasiva, a través de humanos que los transportan en prendas o equipaje, o por aves [11, 18]. Aunque también se ha observado que los triatominos pueden volar cerca de 200 metros según sus necesidades nutricionales, estado reproductivo, densidad poblacional y condiciones ambientales [18–26].

Los triatominos atraviesan cinco estadios larvales antes de mudar a adultos. Para que se produzca la muda de un estadio al siguiente se requiere al menos una ingesta abundante de sangre. Tienen en promedio un ciclo de vida largo, de unos 300 días, pero en algunas especies puede llegar a ser de dos años [11]. De igual forma, su ciclo de vida puede variar según la especie, temperatura, humedad, períodos entre cada ingesta de sangre y la fuente de alimentación. Tienen la capacidad de estar meses sin alimentarse; su metabolismo se ve enormemente disminuido durante la época fría [11]. Los adultos pueden ser fácilmente diferenciados de las ninfas por la presencia de alas anteriores y posteriores totalmente formadas, y los machos por el abdomen redondeado, que en las hembras es puntiagudo y lobulado en el vértice. Generalmente, para mantener una colonia de estos insectos se requiere una temperatura óptima entre 27 y 28 C, y unas condiciones de humedad cercanas al 70 u 80 % [11].

Insecticidas, repelentes y resistencia

Las piretrinas fueron usadas intensamente hasta que con la llegada de insecticidas sintéticos como el DDT, el lindano, el paratión y el malatión, pasaron a desuso. Sin embargo, a partir de la década de 1960, dada la toxicidad que presentan estos compuestos en los mamíferos, las piretrinas tuvieron un nuevo auge con la síntesis de sus derivados, los piretroides. Estos últimos presentan alta potencia insecticida y baja toxicidad para los mamíferos.

El primer paso para determinar la toxicidad de un insecticida en una especie son los ensayos toxicológicos [27]. Su estudio es un campo multidisciplinario, que incluye la anatomía de insectos, bioquímica, comportamiento, ecología, fisiología y genética. Para saber cómo un insecticida produce su efecto tóxico es necesario estudiar su toxicocinética y toxicodinámica. La primera se refiere a los movimientos y cambios que el compuesto sufre dentro de un organismo: absorción, distribución, metabolismo y excreción; mientras que la toxicodinámica describe los efectos fisiológicos, bioquímicos y moleculares de los compuestos, y los mecanismos en los que están involucrados [28].

De acuerdo con la OMS la resistencia se define como "la capacidad hereditaria de una cepa de algún organismo para sobrevivir a una dosis de un tóxico que matarían a la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie" [29]. Así, una especie de insectos alcanza resistencia al superar los efectos insecticidas de productos químicos sintéticos o toxinas naturales, lo que permite su supervivencia. Para abordar el problema de la resistencia, se deben estudiar todos los mecanismos a través de los cuales los insectos logran sortear los efectos letales de los insecticidas [30]. Estos mecanismos han sido caracterizados en cuatro grupos: resistencia por comportamiento; resistencia a la penetración; resistencia metabólica y resistencia por mutaciones en el sitio blanco [31–36].

Resistencia por comportamiento

Este tipo de resistencia es menos común que la resistencia fisiológica. Se trata de la capacidad de sobrevivir a las aplicaciones de insecticidas a través de la adaptación del comportamiento. Ha sido descrita en algunos hematófagos. Se ha demostrado, por ejemplo, que una cepa de *Cimex lectularius* L evita quedarse sobre papel de filtro tratado con deltametrina, por lo que estos mecanismos comportamentales reducen la exposición de estas chinches al insecticida. Un tipo de resistencia de comportamiento en el que el insecto se mantiene lejos del piretroide [35].

Repelencia

Ciertos compuestos pueden generar en los insectos repelencia. Los repelentes de insectos son conocidos desde hace muchas décadas y constituyen una importante herramienta de protección personal contra la picadura de mosquitos [37]. A pesar de su amplio uso, la comprensión de por qué y cómo actúan los repelentes es poca y relativamente reciente; por lo tanto, son definidos por las consecuencias prácticas de uso más que por su acción biológica [37]. De esta forma, la definición puede resultar simplemente "algo que hace que los insectos realicen movimientos orientados lejos de su origen" [38].

El repelente estándar más utilizado a nivel mundial desde los años 60 es el NN-dietil-3-metilbenzamida (DEET). Fue descubierto por el USDA, ARS (*United States Department of Agriculture, agriculture research service*), desarrollado por el ejército de los EE. UU. en 1946, e introducido para su uso por la población en 1957. Desde entonces se convirtió en el ingrediente activo más usado en la formulación de los repelentes en EE.UU. [39]. A pesar de su larga historia y eficacia para la protección personal contra los vectores de enfermedades, su mecanismo de acción permaneció desconocido hasta hace poco [37].

En 1981, McIver hizo una primera propuesta sobre el modo de acción de DEET; sugirió que esta molécula no polar (Figura 3) podría tener afinidad con las porciones lipídicas de las membranas celulares en las neuronas olfativas de los mosquitos, perturbando la organización de la membrana de tal forma que las respuestas normales a los atrayentes se alterarían, de manera que a cortas distancias del repelente el insecto no podría detectar los olores del huésped [40]. Muchos años después se presentó evidencia experimental que sugería que el DEET bloqueaba las respuestas electrofisiológicas de las neuronas sensoriales olfativas a los olores atractivos en *Anopheles gambiae* y *Drosophila melanogaster* [41].

Figura 3: Estructura molecular del DEET.

Más tarde, Syed y Leal [42] presentaron evidencia de que los mosquitos realmente huelen DEET, y lo evitan. También sugirieron que los resultados de la atenuación de DEET del sistema olfativo eran un falso positivo, debido a la reducción de las cantidades de estímulos liberados cuando el repelente y el olor se combinan en los cartuchos de estímulo convencionales [42].

Posteriormente, Bohbot y Dickens [43] estudiaron las bases moleculares de la acción del DEET y otros repelentes, y llegaron a la conclusión de que los repelentes pueden actuar como agonistas o antagonistas olfativos, modulando así la actividad de los receptores de olores (ORs) y logrando la concordancia con los modelos conflictivos" [43].

En 1985, Buescher demostró la acción repelente del DEET a altas concentraciones en

R. prolixus [44]. Mientras que el primer informe sobre la repelencia de este compuesto sobre *T. infestans* fue dado por Alzogaray et al. [45], quienes describieron también la reducción en la tasa de alimentación de estos insectos cuando se les daba una paloma para picar a través de una gasa tratada con DEET [45].

La exposición de ninfas de 5^{to} estadio de *R. prolixus* a DEET produce una disminución de la respuesta comportamental dependiente del tiempo, lo que sugiere un mecanismo de adaptación. Este fenómeno se revierte si los insectos expuestos al repelente son dejados en una atmósfera libre de DEET antes de los ensayos comportamentales [46]. La exposición de estos insectos solo a los vapores de DEET mostró que la detección de este repelente se produce vía olfacción [46]. Sin embargo, si bien el DEET repele a los triatomíneos, no parece ser tan efectivo en estos insectos como lo es en mosquitos, ya que la repelencia se produce solo en concentraciones altas [37].

Por último, se ha demostrado que la tasa de repelencia del DEET es muy similar en colonias de *T. infestans* resistentes y sensibles a piretroides, por lo que el proceso sensorial relacionado con la detección del DEET no parece verse modificado en estas poblaciones [47].

Resistencia a la penetración

El tegumento en los insectos funciona como una barrera entre los tejidos y el medio externo. Se encuentra formado por la epicutícula y procutícula, y una capa de tejido de células epidérmicas más delgada que está involucrada en la síntesis y secreción de los principales componentes de la cutícula. En esta última es donde se encuentran los oenocitos, el tipo de célula de insecto, que se cree, secreta lípidos [32, 33, 48]

La epicutícula del insecto es la capa más externa y delgada, con 0.1 a 3 μ m de ancho. Se encuentra cubierta por una delgada capa de lípidos, principalmente hidrocarburos, ésteres de cera, alcoholes grasos y ácidos grasos libres o esterificados que restringen la transpiración del agua y por lo tanto evitan la desecación de los tejidos. Son la primera defensa contra la absorción de productos químicos y la penetración de microorganismos y participan en eventos de comunicación química [32, 33]. El mecanismo de resistencia a la penetración supone alteraciones en la cutícula que reducen la concentración efectiva del tóxico en el sitio de acción [33].

Particularmente en triatomíneos, se observó que la inhibición de la síntesis de lípidos cuticulares en *T. infestans* generaba una mayor tasa de mortalidad al exponer a los insectos a insecticidas de contacto. Además, la remoción de los lípidos superficiales utilizando acetona aumentaba la penetración de estos insecticidas y daba lugar a una mortalidad más alta [49].

Por otro lado, Pedrini et al. [34] demostraron que una cepa de *T. infestans* resistente a piretroides presentaba cantidades de hidrocarburos (HC) significativamente mayores, tanto en la cantidad de HC epicuticular como la cantidad de HC totales por peso de insecto. Además, por medio de microscopía óptica de barrido, se pudo observar que la población resistente tenía una cutícula engrosada de $32,1 \pm 5,9$ comparada con la de la población sensible de $17,8 \pm 5,4$ [34]. Por último, en una población resistente se reportó una penetración cuticular significativamente reducida de deltametrina. Por otra parte, la medida de la cantidad interna del piretroide dentro de los insectos luego de

su aplicación tópica arrojó concentraciones más de dos veces superiores en la población sensible comparada con la resistente [33].

La resistencia por penetración se ha observado en otras especies de insectos. En este sentido, Koganemaru et al. [50] demostraron que una cepa resistente de *C. lectularius* aumenta la tasa de resistencia a deltametrina 105 veces cuando el piretroide es topicado en la cutícula, y no inyectado directamente en su hemolinfa, lo que sugiere que el tegumento estaría actuando como barrera protectora.

Ha sido documentado recientemente el engrosamiento de la cutícula en el mosquito *A. gambiae*, vector de Malaria, donde una cepa resistente a piretroides presentaba una capa epicuticular más gruesa y un aumento significativo en el contenido de HC cuticular (aproximadamente un 29 %) [51]. También en este insecto, recientemente se ha descrito una cepa libre de mutaciones en el sitio de acción de piretroides, que presentaba una penetración cuticular reducida del insecticida con respecto a una población sensible. Análisis microscópicos mostraron un engrosamiento de la cutícula con respecto a la población sensible [30]. El engrosamiento de la cutícula ha sido también observado en otros insectos como por ejemplo en *C. lectarius*[52] y *Anopheles funestus* [53].

Resistencia metabólica

Los insectos son capaces de metabolizar un xenobiótico tóxico, y transformarlo bioquímicamente en un compuesto menos nocivo que puede ser excretado [31]. Esta acción genera que una menor cantidad de insecticida interactúe con el sitio de acción, y se traduce en una disminución de la susceptibilidad [4].

Estas reacciones pueden ser clasificadas en fases I y II, en función de las transformaciones que sufren los compuestos tóxicos. La fase I incluye reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, que están involucradas en la desintoxicación de xenobióticos. En las reacciones de la fase II, las enzimas de conjugación se unen con toxinas o productos primarios de la fase I y las convierten en derivados más solubles en agua, que pueden ser más fácilmente excretados.

Existen cuatro grandes familias génicas relacionadas con la detoxificación de xenobióticos: carboxil colinesterasas (CCEs), citocromo monooxigenasas P450 (CYPs) y glutatión transferasas (GSTs). La resistencia de tipo metabólica se produce cuando estos mecanismos de detoxificación se encuentran acelerados u optimizados, en relación con una población sensible de la misma especie. Particularmente en triatomíneos los estudios se han centrado en las enzimas P450 y esterasas, debido a que son los principales mecanismos metabólicos responsables de la resistencia a los piretroides [4]. Las CCEs están implicadas en la hidrólisis de ésteres carboxílicos a alcoholes y ácidos y, según su función, pueden clasificarse como:

1. Dietarias: metabolizan una amplia gama de sustratos, incluidos los insecticidas y xenobióticos de la dieta.
2. Degradativas de hormonas y feromonas: en este grupo están incluidas las esterasas de hormonas juveniles y las CCEs degradativas de feromonas.
3. De neurodesarrollo: este grupo contiene proteínas implicadas en funciones de neuro-

desarrollo como las acetilcolinesterasas (AChEs), neuroliginas, neurotactinas, gliotactinas y otras [54].

Se ha observado que en triatominos la clase dietaria se encuentra ausente o muy disminuida con respecto a otras especies [55]. Podría suponerse que esto implicaría un menor potencial de esta clase de enzimas para la desintoxicación de insecticidas. Sin embargo, la actividad de las CCEs ha sido documentada en la degradación de piretroides en *T. infestans*. En este sentido, Santo-Orihuela et al. [56] trabajaron con tres poblaciones resistentes, dos de Argentina provenientes del norte de la provincia de Salta y del sur de la provincia de La Rioja y, una de Bolivia, de la localidad de Yacuiba. Se demostró que la actividad de esterasas específicas determinadas por la hidrólisis del permetato de 7-cumarilo (7-CP) presentaba un aumento significativo en el porcentaje de individuos con mayor actividad piretroide-esterasas en las poblaciones de Salta y La Rioja. Posteriormente los autores determinaron el incremento en la actividad piretroide-esterasa en huevos de 12 días de edad en la población resistente de El Palmar, Bolivia [56, 57]. Por lo tanto, es factible que en esta actividad estén implicadas las CCEs degradadoras de hormonas y feromonas, tal como se ha observado en otras especies [54, 58].

Los citocromos P450 (CYPs) son hemoproteínas cuyo rol más conocido es la actividad monooxigenasa, en la cual catalizan la transferencia de un átomo de oxígeno molecular a un sustrato y reducen otro a agua [59]. Estas monooxigenasas son enzimas metabólicas de la fase I [28]. Poseen actividad oxidasa, reductasa, desaturasa e isomerasa [60]. La superfamilia de genes citocromo P450 también se encuentra implicada en la respuesta de desintoxicación de xenobióticos (incluyendo insecticidas sintéticos) y son factores fundamentales en la adaptación de los insectos al estrés químico [61]. Las CYPs se clasifican en cuatro clanes principales: CYP2, CYP3, CYP4 y clan mitocondrial, cada uno de los cuales se subdividen en varias familias y subfamilias [61]. Recientemente, se ha observado una expansión de genes CYPs en triatominos, con respecto a otras especies [55].

Los genes del CYP mitocondrial parecen estar restringidos a los animales. Algunos están implicados en funciones fisiológicas esenciales, y se conservan entre especies de insectos, al igual que algunos miembros de CYP2.

CYP3 es el clan más abundante en insectos. Los genes de este clan, pertenecientes a las familias CYP6 y CYP9, se han reportado implicados en el metabolismo de xenobióticos y de resistencia a los insecticidas [61].

Los miembros de CYP4 por su parte tienen diferentes funciones, incluidas la biosíntesis de compuestos y el procesamiento de olores [62–64].

El metabolismo de insecticidas por enzimas CYP puede ser un factor clave en la toxicidad de un insecticida, y también puede representar un paso clave en la cadena de eventos que se suceden entre el contacto, la penetración y la interacción con el sitio blanco de un determinado compuesto [59]. Con respecto a la resistencia a insecticidas, probablemente la actividad monooxigenasa sea el mecanismo de resistencia metabólica más frecuente. Se ha observado que la resistencia puede ocurrir debido a la transcripción incrementada de CYPs, lo que genera niveles más altos de proteína y una detoxificación consecuentemente más eficiente [65].

Las familias caracterizadas como involucradas en la resistencia a insecticidas son: 4, 6, 9 y 12 [66]. La presencia aumentada de este tipo de mecanismo detoxificante fue adjudicada a las primeras poblaciones de triatominos resistentes presentes en Latinoamérica (ver más

adelante) [67, 67, 68, 68, 69].

Las Glutación Transferasas (GSTs) son proteínas diméricas citosólicas implicadas en la desintoxicación celular mediante la catalización de la conjugación de glutatión (GSH) con una amplia gama de agentes alquilantes endógenos y xenobióticos, que incluyen carcinógenos, fármacos terapéuticos, toxinas ambientales y productos de estrés oxidativo. Las GST también muestran actividad de peroxidasa GSH y están implicadas en la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos. El plegamiento de las proteínas GST incluye un dominio N-terminal *TRX-fold* (tiorredoxina) y un dominio C-terminal alfa-helicoidal, con un sitio activo localizado en una hendidura entre los dos dominios [70].

Según su ubicación en la célula, las GST son clasificadas como microsomales, citosólicas ó mitocondriales. En insectos sólo se han hallado las dos primeras, pero se ha observado que las GST microsomales no se encuentran implicadas en la detoxificación de insecticidas [71]. Dentro del grupo citosólico, las clases delta, epsilon, omega, sigma, theta y zeta se encuentran en insectos.

La subfamilia de clase delta y epsilon están implicadas en la detoxificación de xenobióticos en insectos por medio de transformaciones pertenecientes a la fase II. Actúan catalizando la conjugación de glutatión reducido (GSH) con compuestos electrofílicos, para producir metabolitos solubles en agua que se excretan fácilmente. También están implicados en la protección contra el daño celular por estrés oxidativo [71]. Se ha sugerido que estas enzimas son importantes en la plasticidad de los insectos para hacer frente a las presiones de selección del medio ambiente [71]. La resistencia a DDT a través de las GST delta y epsilon ha sido reportada en varias especies; particularmente en *A. gambiae* se han realizado estudios de afinidad entre ambos [71, 72].

Los triatomíneos presentan una reducción en las GST de la clase delta con respecto a otras especies, mientras que ningún miembro de la clase epsilon ha sido identificado [55, 73]. Sin embargo, el insecticida DDT ha demostrado tener una muy baja eficiencia contra triatomíneos[2]. Por otro lado, si bien no se ha reportado la acción directa de estas enzimas en la resistencia a piretroides, se ha propuesto que las mismas pueden tener un papel importante en la detoxificación de los productos de la peroxidación de lípidos inducida por estos insecticidas [74].

Resistencia por mutaciones en el sitio blanco

Los insecticidas neurotóxicos ejercen su acción a través de la interacción con determinadas moléculas blanco del sistema nervioso de los insectos. El canal de sodio dependiente de voltaje Na_v es el principal sitio de acción de los insecticidas piretroides y del DDT. Se trata de proteínas transmembrana que se encuentran implicadas en la generación y propagación de los potenciales de acción [75]; en insectos se ha observado que su distribución parece estar limitada a las neuronas [76]. Esta proteína se abre en respuesta a la despolarización de la membrana, lo cual permite la entrada masiva de iones sodio a la célula, generando la despolarización del potencial de membrana. Unos milisegundos después de la apertura del canal, el mismo es cerrado en un proceso denominado inactivación rápida; este último paso es indispensable para la finalización del potencial de acción y previene la despolarización excesiva del potencial de membrana en reposo [75].

El primer canal de sodio clonado en insectos fue el de *D. melanogaster*, a fines de los

años 80. Se encontró que era estructural y funcionalmente homólogo con la subunidad α del canal de sodio en los mamíferos [76, 77]. Las subunidades α del canal de sodio tienen un tamaño aproximado de 260 kDa y cuatro dominios de repetición homólogos (I-IV). Cada dominio posee seis segmentos de hélices transmembrana (S1-S6); los segmentos S1-S4 constituyen el módulo de detección de voltaje. Los segmentos S5 y S6 de los cuatro dominios forman el poro central conductor de iones, mientras que los cuatro *P loops* que conectan los segmentos S5 y S6 forman el filtro selectivo en la parte extracelular del poro. Los *P loops* se encuentran ubicados en la región transmembrana y cada uno está compuesto por dos hélices P1 y P2. Las regiones de giro entre las hélices P1 y P2 contienen los residuos de aminoácidos D, E, K y A en los dominios I, II, III y IV, respectivamente, que forman el filtro de selectividad iónica [75](Figura 4). La subunidad α es la responsable de las propiedades funcionales y farmacológicas al canal [76].

Los canales dependientes de voltaje comparten el segmento anfifílico S4, que contiene múltiples repeticiones de un motivo que consiste en un residuo cargado positivamente, seguido de dos hidrófobos. Mutaciones puntuales en los aminoácidos cargados positivamente en los segmentos S4 de los diferentes dominios generan cambios en la dependencia del voltaje de la activación del canal. La información experimental sugiere que tanto la carga como la estructura son determinantes en la función de los sensores de voltaje S4, y que los cuatro segmentos S4 contribuyen a la activación del canal de sodio dependiente de voltaje [78].

Un dilema derivado de la característica anfifílica de los segmentos S4 recae en la ubicación de los residuos cargados positivamente en un entorno transmembrana. Ante esta disyuntiva, se planteó que los residuos cargados positivamente de estos segmentos forman pares iónicos con los residuos aminoacídicos cargados negativamente de los segmentos vecinos S1, S2 y/o S3. En este modelo, denominado de hélice deslizante, los residuos cargados positivamente en el segmento S4 son atraídos hacia adentro por la fuerza electrostática del potencial de membrana de reposo interno negativo. Tras la despolarización, esta fuerza electrostática se alivia, y los segmentos S4 se mueven hacia afuera a lo largo de una trayectoria en espiral, en un movimiento catalizado por un intercambio isoenergético secuencial de parejas de pares de iones [79]. Este modelo es apoyado por datos experimentales obtenidos tras el marcado fluorescente de residuos en múltiples posiciones de la hélice S4, que proporcionaron evidencia de que este segmento se trasloca hacia afuera y rota hasta 180 durante la activación del canal [79].

Los módulos de detección de voltaje y los de formación de poros se encuentran conectados por el enlazador S4-S5, que sería el responsable de comunicar el cambio conformacional ocurrido en el sensor de voltaje al dominio de formación de poros, a través de una fuerza de tracción en el segmento S5. Esto último conduce a la flexión del segmento S6 y la apertura del poro [79]. Después de una breve apertura, la puerta de inactivación ocluye físicamente el poro interno. Esta puerta se encuentra ubicada el conector intracelular corto que conecta los dominios III-IV y está formada principalmente por un motivo MFM (residuos de aminoácidos M, F y M) en canales de sodio de insectos y un motivo IFM en canales de sodio de mamíferos [75, 80](Figura 4).

Figura 4: Diagrama de la estructura del canal de sodio en insectos. Se detallan gráficamente los residuos cargados positivamente del segmento S4 (+) que constituyen el sensor de voltaje, los aminoácidos que constituyen el filtro de selectividad (DEKA) y la puerta de inactivación ubicada entre los dominios III y IV. Adaptado de Du et al. [80]

A diferencia de los mamíferos, los insectos poseen un solo gen del canal de sodio dependiente de voltaje. Mediante *splicing* alternativo y edición del ARN se obtienen versiones alternativas que poseen propiedades farmacológicas y eléctricas. Se ha observado que las isoformas alternativas son variantes funcionales con diferentes sensibilidades a los insecticidas [75, 81, 82].

Se ha propuesto que los piretroides se unen al canal en su estado abierto y lo estabilizan, lo que causaría la apertura prolongada de mismo [75, 83]. Esto provoca que la célula no pueda volver a su potencial de reposo, y el consiguiente envenenamiento por sobreactivación nerviosa.

Los piretroides son insecticidas sintéticos derivados de las piretrinas, que son los seis compuestos provenientes del extracto de las flores secas de la planta *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Esta planta es originaria de la región Dálmata de la ex Yugoslavia y Persia en la costa mediterránea del mar Adriático, al este de Italia. Se cree que sus propiedades insecticidas se conocían desde 1694, sin embargo, las mismas fueron comprobadas en 1840 y se introdujo de Europa a América cerca de 1855 [84]. A pesar de que aun en algunos países como Kenia, Tanzania, Tasmania y China se sigue extrayendo este insecticida de las flores de *C. cinerariaefolium*, la dilucidación de la estructura de las piretrinas, comenzada en Japón y Suiza a principios del siglo XX, permitió introducir cambios en las moléculas para mejorar algunas de sus características, generando de esta forma los piretroides [84, 85].

A través de décadas de investigación se produjeron una gran cantidad de piretroides estructuralmente diferentes, con múltiples aplicaciones en agricultura, veterinaria y control de insectos en viviendas [83]. Las sucesivas generaciones producidas de estos insecticidas han sido generadas a través de múltiples cambios estructurales en las moléculas, cada uno seguido de evaluaciones biológicas, por lo que en la actualidad son estructuralmente muy diferentes a las piretrinas naturales [83].

Entre las desventajas presentadas por las piretrinas se encuentra su inestabilidad frente a la luz y el aire, ya que para el control de insectos perjudiciales es necesario que el insecticida tenga una actividad residual. A medida que estos compuestos sintéticos se desarrollaron, fueron presentando mayores efectos insecticidas y mayor durabilidad. El descubrimiento de la permetrina (Figura 5) fue anunciado en 1973 y significó la primera evidencia de que los piretroides podían ser lo suficientemente estables para ser utilizados en agricultura. En este compuesto fueron reemplazados los grupos metilo con átomos de

cloro en la cadena lateral ácida, lo que generó el bloqueo del ataque fotoquímico en el doble enlace adyacente, con lo que se logró una mayor estabilidad ambiental sin comprometer la potencia insecticida, la biodegradabilidad o la selectividad [83].

Posteriormente, la búsqueda de compuestos con mayor actividad insecticida llevó a la introducción de un sustituyente ciano en el carbono bencílico del alcohol 3-fenoxibencílico [83]. Con este nuevo descubrimiento, los piretroides pasan a clasificarse como de tipo I ó II según sus características químicas (Figura 5). Un ejemplo importante de piretroides con el grupo α -ciano es la deltametrina [83], que es un piretroide de tercera generación [2]. La deltametrina, descrita por primera vez en 1974, fue el primer piretroide fotoestable evaluado en triatomíneos a nivel de laboratorio [2].

A pesar de que las diferencias entre las clases no son absolutas y existen compuestos con propiedades intermedias [86], los piretroides del tipo II tienen un grupo α -ciano ausente en los de tipo I. Por otro lado, los piretroides del tipo I generan descargas repetitivas en respuesta a un estímulo simple, y los de tipo II causan una despolarización de la membrana, seguida de la supresión de la excitabilidad celular. Además, los síntomas de intoxicación en mamíferos son diferentes para cada tipo: los piretroides tipo I causan hiperexcitación, ataxia, convulsiones y parálisis, mientras que los síntomas del envenenamiento por piretroides tipo II se caracterizan por hipersensibilidad, coreoatetosis, temblores y parálisis. A pesar de algunas diferencias en los síntomas de envenenamiento, el blanco principal para ambos tipos de piretroides es el canal de sodio dependiente de voltaje [87].

Figura 5: Ejemplos de moléculas de insecticidas sintéticos piretroides y su clasificación. Adaptado de [75].

En la actualidad, los piretroides presentan una rápida acción insecticida a dosis bajas, y muestran toxicidad selectiva para los insectos sobre los mamíferos. Estas características hacen que sean ideales para usar como insecticidas domésticos [84].

Los canales de sodio que son modificados por piretroides se abren con un retraso prolongado y durante un tiempo prolongado, que a veces es tan largo como varios segundos

(el tiempo normal de apertura es de milisegundos). Generalmente permanecen abiertos después de la terminación del pulso de despolarización y puede observarse una corriente de sodio que decae lentamente (corriente de cola) [86, 88].

En los experimentos realizados en oocitos de *Xenopus laevis*, un único pulso despolarizante mide la modificación de los canales en estado de reposo; mientras que, las despolarizaciones cortas múltiples, promueven la apertura repetida del canal y revelan la modificación del piretroide en el estado abierto. Mediante diferentes experimentos siguiendo este modelo, se ha podido observar que una sola despolarización larga es suficiente en los piretroides tipo I para inducir corrientes de cola, lo que indica que este tipo de moléculas modifican los canales en reposo o inactivados. Por el contrario, este tipo de despolarización no es suficiente para provocar corrientes de cola en los canales de sodio tratados con un piretroide de tipo II, los cuales requieren despolarizaciones repetidas para inducir corrientes de cola detectables. Por lo tanto, los piretroides tipo II, en contraste con los piretroides tipo I, se unen preferiblemente al estado abierto de los canales de sodio. Las diferencias en los efectos entre los dos tipos de piretroides también se reflejan en la cinética de la disminución de la corriente de cola. En general, la descomposición de las corrientes de cola inducidas por los piretroides tipo II es al menos un orden de magnitud más lenta que las inducidas por los piretroides tipo I. Estos resultados indican que los piretroides tipo II inhiben la desactivación de los canales de sodio mucho más que los piretroides tipo I. Las diferencias cuantitativas en la cinética de la disminución de la corriente de cola entre los dos grupos probablemente explican las diferencias en las acciones de los piretroides de tipo I y II observadas en los sistemas nerviosos de insectos [75, 88]. Es destacable que el DDT se parece a los piretroides tipo I en su acción sobre los canales de sodio [88].

Desde fines de la década del '80, la evidencia electrofisiológica y farmacológica sugiere que los piretroides tienen un sitio receptor en los canales de sodio [75]. Si bien este sitio permanecía sin ser dilucidado, la naturaleza lipofílica de los piretroides hacía suponer que se encontraba en la porción transmembrana del canal [89]. En este aspecto, la identificación de mutaciones en el canal de sodio dependiente de voltaje, al reducir la unión de los piretroides a esta proteína, ha sido extremadamente valiosa para dilucidar las características estructurales de los canales de sodio que son críticas para la unión y acción de estos insecticidas [75].

La suma de los análisis electrofisiológicos y farmacológicos de canales de sodio mutantes expresados en oocitos de *X. laevis* y experimentos de modelado molecular, han sido las principales herramientas para dilucidar la interacción Na_v piretroide [75]. O'Reilly et al. [90] generaron un modelo de homología para el canal de mosca doméstica en base a la estructura del canal de potasio de rata (primera estructura cristalográfica de un canal en su conformación nativa) que predice que los piretroides se unen a la interfaz expuesta a lípidos delimitada por el enlazador S4-S5 del dominio II (IIL45) y los segmentos IIS5 y IIS6. Cuando el canal se encuentra abierto, esta cavidad sería accesible a la bicapa lipídica y, por lo tanto, a los insecticidas liposolubles. Las uniones formadas estabilizarán la conformación abierta del canal. Así, Las mutaciones *kdr* y *super-kdr* M918T, L925I, T929I y L932F (en IIS5) y F1538I (en IIS6), se localizan en este sitio (Figura 6) y probablemente confieren resistencia al reducir la unión de piretroides [90].

Por otro lado, no todas las mutaciones implican residuos capaces de interactuar físicamente con las moléculas de piretroides en ese sitio de acción (ver Figura 8). Ha sido propuesto que estas mutaciones podrían estar alterando la arquitectura de los sitios de interacción Na_v piretroide modificando o restringiendo la flexibilidad conformacional del

Figura 6: Detalle del sitio de acción descrito por O'Reilly et al. [90](sitio 1). Se marcó la interacción de L925 con el resto de alcohol de la molécula de piretroide (fenvalerato). Mutaciones en este aminoácido se han descrito en varias poblaciones de *T. infestans* en Argentina [91]. La imagen fue adaptada de O'Reilly et al. [90].

canal de sodio dependiente de voltaje [92].

Estudios del canal de sodio de *Aedes aegypti* expresado en oocitos de *X. laevis*, implicaron el exámen funcional de nueve mutaciones en el canal de sodio que están asociadas con la resistencia a piretroides en estos insectos. Estos experimentos mostraron que cinco de las nueve mutaciones reducen la sensibilidad del canal a estos insecticidas. Sin embargo, el modelado molecular y el análisis mutacional posteriores, revelaron que si bien dos de las mutaciones mapean al sitio descrito por O'Reilly et al. [90] (sitio 1), las otras tres mutaciones se asignan a un segundo sitio receptor (sitio 2) [93]. Este sitio es análogo al sitio 1 pero se encuentra delimitado por el enlazador S4-S5 del dominio I (IL45) y los segmentos IS5 y IIS6 (Figura 7). Este paradigma de doble receptor no solo responde al interrogante acerca de los mecanismos moleculares a través de los cuales mutaciones en Na_V muy extendidas en insectos como por ejemplo I1011M o L1014F otorgan insensibilidad a los piretroides, sino que también extiende el conocimiento acerca de la selectividad en los canales de sodio de insectos frente a mamíferos [75].

Si bien el principal sitio de acción de los piretroides es Na_V , resulta importante destacar que existen mecanismos adicionales tales como la inhibición de la ATPasa mitocondrial dependiente de Mg^{2+} , acumulación en bio-lípidos, supresión de los canales de potasio retrasados, y supresión de canales de calcio de tipo T y L y de los canales activados por los neurotransmisores GABA (ácido γ -aminobutírico), glutamato y acetilcolina que acentúan el efecto tóxico de estos insecticidas [94].

Tal como se ha comentado en los párrafos anteriores, ciertas mutaciones en los sitios de acción pueden generar insensibilidad a los piretroides. Este mecanismo de resistencia es conocido como *knockdown resistance (kdr)* [75, 95], y ha sido documentado en casi todas las plagas de artrópodos importantes desde el punto de vista médico y agrícola [76, 95, 96]. Este tipo de mecanismo de resistencia fue informado por primera vez en la

Figura 7: Detalle del sitio de acción descrito por [93](sitio 2). Se observa la ubicación de la mutación L1014F. Mutaciones en este aminoácido se han descrito en varias poblaciones de *T. infestans* en Argentina, algunas de las cuales se trabajan en esta tesis Sierra et al. [91]. La imagen fue adaptada de [75]

Musca doméstica en el año 1951, y se aisló genéticamente en 1954 [97, 98]. Las mutaciones del tipo *kdr* confieren resistencia a los síntomas tempranos de intoxicación y al efecto letal tanto de piretrinas y piretroides como de DDT [76].

Desde 1990, la investigación en torno a esta problemática ha permitido conocer su base molecular [99]. A través de la expresión heteróloga de los canales de sodio de diferentes insectos en oocitos de *X. laevis* se ha corroborado que muchas de las mutaciones en el canal de sodio (Figura 8) reducen la susceptibilidad a piretroides [75, 92]. En un principio, los estudios revelaron que en la *M. doméstica* una única mutación de leucina a fenilalanina en la posición 1014 (L1014F) del dominio II era responsable por el fenotipo *kdr*, mientras que la mutación adicional de metionina a treonina (M918T) en el *loop* S4-S5 causaba el fenotipo super-*kdr* de más alta resistencia [99].

La mutación L1014F es la más comúnmente asociada con la resistencia a piretroides, por lo que ha sido muy investigada. La expresión del canal de sodio de la *M. doméstica* con esta mutación en oocitos de *X. laevis* reveló que los canales mutados son 10 veces menos sensibles a cismetrina (piretroide tipo I). También se observó que el canal con esta mutación presenta una aceleración en el decaimiento de la corriente de cola inducida por este insecticida. Por otro lado, se observó que en canales de *D. melanogaster* L1014F la sensibilidad a deltametrina se veía reducida 17 veces. Un análisis más detallado mostró que los canales mutados exhiben una menor afinidad por la deltametrina, así como una disponibilidad reducida de canales abiertos debido a la inactivación mejorada al estado cerrado. Ambos efectos contribuirían a disminuir la sensibilidad a los piretroides de los canales con la mutación L1014F [99].

Hasta 2013, la mutación L1014F ya había podido ser identificada, al menos, en 20 especies de insectos [95]. El reporte de nuestro grupo [100], representa el primer informe

Figura 8: Modelo de estructura transmembrana de la subunidad α del canal de sodio dependiente de voltaje. Los aminoácidos correspondientes a las mutaciones *kdr* (círculos) se marcaron de acuerdo con su posición en la secuencia de la variante de *splicing* más común del canal de sodio *Vssc1* de la *M. doméstica*. Las dos mutaciones asociadas con los rasgos *kdr* y *super kdr* de la *M. doméstica* están marcadas en negrita. Los círculos rellenos en negro identifican mutaciones cuyos efectos sobre la susceptibilidad de los piretroides se han confirmado en experimentos de expresión heterólogos. Los círculos rellenos en gris identifican aquellas mutaciones halladas en *T. infestans*. Adaptado de [92].

indicando la existencia de este tipo de resistencia en triatominos. La investigación se realizó en insectos de la población de Madrejones, al norte de Salta, en Argentina. Posteriormente, se identificó una nueva mutación *kdr* en la población de El Mala, provincia de Chaco, Argentina [101].

La identificación de mutaciones puntuales que confieren resistencia en los insectos ofrece la oportunidad de diseñar herramientas de diagnóstico molecular para facilitar su detección, y el control temprano de resistencia en poblaciones bajo presión de selección [99]. Esto ha sido llevado a cabo en *T. infestans* a partir del descubrimiento de las mutaciones *kdr* [100, 101]. Los ensayos diseñados pueden resultar herramientas para determinar la frecuencia de una mutación de resistencia y los cambios en respuesta a las tácticas de manejo.

El conocimiento de los mecanismos moleculares de la resistencia a los piretroides debido a mutaciones en el canal de sodio tiene implicaciones importantes en la investigación aplicada. La identificación de mutaciones *kdr* proporciona la base para el monitoreo de la resistencia mediante herramientas moleculares[75].

Las estrategias de control de la resistencia a través de marcadores moleculares permiten monitorear la resistencia a insecticidas antes de que ésta llegue a un punto de inflexión donde su eficacia se vea disminuida. De acuerdo con esto, la puesta a punto de las herramientas moleculares en *T. infestans* resulta crucial, ya que permitiría optimizar los ensayos y reducir costos en la producción de resultados confiables. Aún más, la detección temprana de resistencia a insecticidas permite un manejo más eficiente y sostenible, al tiempo que aumenta la vida útil de los compuestos en uso.

Resistencia a insecticidas en triatominos

La estrategia de reducción de contagio de la enfermedad de Chagas a través del control del insecto vector fue propuesta por el mismo Carlos Chagas en 1911 [102]. A partir de la década del '50, el DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano) comenzó a ser utilizado con este fin. Este insecticida había tenido un gran éxito en Europa para combatir la malaria a través del control del mosquito vector, pero su eficacia contra insectos triatominos resultó ser baja, por lo que a partir de 1947 se introdujo el HCH, una mezcla de isómeros de hexaclorociclohexano. La descripción de la efectividad de este producto contra los triatominos puede ser considerada el inicio de la lucha moderna contra estos insectos domiciliarios [8]. Sin embargo, el tratamiento mediante este tipo de insecticidas era costoso y demandaba mucho tiempo para lograr un control exitoso. Por otro lado, los insecticidas clorados conllevan un potencial riesgo toxicológico y ecotoxicológico, por lo que progresivamente se los reemplazó por organoclorados y carbamatos que son menos persistentes y no bioacumulativos [2, 103].

En la década del '50 se realizaron estudios de campo en Brasil y Argentina, se describió la situación general del Chagas en el continente y se reclamó formalmente por una actuación más efectiva de la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Una década después fue posible comenzar con los programas nacionales y regionales regulares contra Chagas en Brasil, Argentina, Venezuela, Chile y Uruguay [8].

En Argentina, la creación del Servicio Nacional de Chagas (SNC) en 1962, representa el inicio del control de triatominos basado en la aplicación de insecticidas. Si bien el pro-

grama redujo la infestación por *T. infestans*, no logró una completa cobertura territorial en las aplicaciones [104]. La utilización de los insecticidas en la región fue evolucionando de manera tal que en 1978 se realizó en Argentina la primera evaluación de la toxicidad de un ciano-piretroide (deltametrina) en *T. infestans* [103]. La efectividad de este tipo de insecticidas hizo que en la década del '80 organoclorados y carbamatos fueran reemplazados por piretroides, con muy buenos resultados. De esta forma, la deltametrina y la cipermetrina comenzaron a utilizarse con éxito en el campo para el control de vectores de Chagas en 1989 [2]. Actualmente el control vectorial se lleva a cabo mediante la aplicación de insecticidas piretroides, con una sustitución alfa-ciano, que tienen un efecto residual de seis a nueve meses. La aplicación se realiza en domicilios y peri-domicilios con alto índice de infestación, combinado con educación sanitaria y actividades de mejora de viviendas [13]. Los piretroides prácticamente no son nocivos para seres humanos y mamíferos, pero presentan una alta toxicidad en peces [13].

El SNC sufrió a fines de 1980 un fenómeno de reducción presupuestaria y descentralización, lo cual obligó a repensar estrategias alternativas para el control de vector que incluyeran una estructura menos verticalista. Este cambio de paradigma dió vida al plan "Ramón Carrillo", el cual se basaba en la participación de la comunidad para el control del vector. Bajo esta estrategia lanzada en 1992, las actividades del SNC se centraron en el entrenamiento de los pobladores locales y los agentes de Atención Primaria de Salud (APS) para el rociado con piretroides, la evaluación de la presencia de *T. infestans* en el domicilio o peridomicilio y el envío de insecticidas y otros suministros a los líderes comunitarios [104].

En 1991, los Ministerios de Salud de Argentina, Brasil, Bolivia, Chile, Paraguay y Uruguay lanzaron la iniciativa del Cono Sur, coordinada por la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Parte del esfuerzo de la iniciativa radica en el control del vector como principal medio para reducir el riesgo de contagio. Seis años más tarde, nacerían las iniciativas de los Países Andinos y Centroamericanos. Como fruto de estos programas, en 2011, se certificó formalmente la ausencia de transmisión de Chagas a través de *R. prolixus* en países de Centroamérica [105].

En América del Sur, si bien el escenario resultó ser más complejo, la iniciativa del Cono Sur tuvo un impacto positivo, principalmente en Argentina, Brasil, Chile y Uruguay [8, 106].

En 1995, en Argentina, el Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CI-PEIN) en colaboración con el SNC comenzó a evaluar la posible aparición de poblaciones de campo de *T. infestans* resistentes. Un año después, el *Tropical Disease Research* (TDR) y *World Health Organization* (WHO), aprobó y recomendó un proyecto para realizar un programa extensivo de evaluación de resistencia en triatominos y para el estudio de los probables mecanismos involucrados. Producto de estas evaluaciones, Vassena et al. [67] detectaron resistencia a piretroides en poblaciones de *R. prolixus* procedentes de la localidad de Carabobo en Venezuela, y *T. infestans* de Río Grande do Sul en Brasil, con tasas de resistencia (RRs) de entre 3,4 y 7 para *T. infestans*, y de 4,5 a 12,4 para *R. prolixus*. Este estudio representó la primera evidencia de resistencia a piretroides en triatominos. Además, se sugirió la implicancia del metabolismo oxidativo en la desintoxicación, ya que la resistencia a deltametrina se veía disminuida en ambos triatominos cuando se los trataba con piperonil butóxido [4, 67, 107].

Como parte de los avances de la Iniciativa del cono Sur, en 1998, Uruguay se constituye

como el primer país de América en estar libre de transmisión vectorial de *T. cruzi*. A partir de ese logro, se establece como meta intermedia de la iniciativa la interrupción de la transmisión vectorial. Un año después, Chile se convierte en el segundo país en alcanzar esta meta intermedia (OPS, VII y IX. Reunión de INCOSUR para la eliminación del Chagas. [108]). A estos avances se suma el notificado para Argentina en la X Reunión de INCOSUR para la eliminación del Chagas, donde los logros se tradujeron en la disminución de la tasa de infección desde un 6,11 % hasta un 1,19 %, si se tomaban los datos recabados en 1992 y los de 1999, respectivamente. Este porcentaje de reducción era aún mayor si como antecedente se tomaban los datos de infestación domiciliaria recabados en 1982.

Sin embargo, cuando los datos de las diferentes provincias argentinas eran desagregados, se evidenciaban resultados diferenciales [108]. Así, en el año 2000, se informaba que en cinco de las provincias argentinas ubicadas en el Gran Chaco, todavía existía transmisión vectorial de *T. cruzi* (La Rioja, Formosa, Santiago del Estero, Córdoba y Chaco). De esta manera, comenzaba a vislumbrarse que la epidemiología observada en esta región haría imposibles las estimaciones temporales planteadas inicialmente para el control del vector [104, 108].

En 2002, se informó del fracaso de las medidas de control de *T. infestans* en zonas que habían sido tratadas con piretroides en el norte argentino, con una tasa de infestación superior al 80 %. La evaluación mediante estudios toxicológicos de las poblaciones de El Chorro, La Toma, El Sauzal y Salvador Mazza, ubicadas en la en la misma zona geográfica de la provincia de Salta, reveló resistencia a piretroides. También se observó que la detoxificación de deltametrina era dependiente de la actividad monooxigenasa, aunque los resultados indicaban que este mecanismo debía de estar actuando de forma colaborativa con otros mecanismos de resistencia. Por último, se vió que estos insectos presentaban susceptibilidad al insecticida organofosforado fenitrotión [68]. Al comprobar la ausencia de resistencia cruzada con este tipo de insecticidas, se decidió recomendar el reemplazo de los piretroides por fenitrotión y DDVP; la aplicación de estas sustancias permitió continuar con éxito las actividades de control en la zona de Salvador Mazza [103].

Hacia 2006 los avances de la Iniciativa del Cono Sur seguían dando sus frutos, de manera que en su decimoquinta reunión, la comisión intergubernamental para la eliminación del mal de Chagas, declaraba libre de *T. infestans* a Brasil para la totalidad de estados que fueron área de dispersión del vector [106] (XVa. Reunión de INCOSUR para la eliminación del Chagas,[108]). La implementación de diferentes medidas en la lucha contra el Chagas, entre las que se encuentran: las aplicaciones de insecticidas, el cribado de donantes de sangre para la presencia de *T. cruzi* y el tratamiento de bebés infectados, logró una reducción de la enfermedad desde 30 millones de personas en 1990 a 9-11 millones en 2006 [104]. Sin embargo, muchos de los objetivos temporales propuestos por diferentes organismos comprometidos con el control del Chagas, entre los que se nombran la ICS, la asamblea mundial de la salud (1998) y la OMS (2007), que se proponían interrumpir la transmisión antes de 2010, no pudieron ser cumplidos. En virtud de ello, se postuló que existen zonas donde las acciones de vigilancia para el control de vector de Chagas fueron irregulares en el tiempo, y que la reinfestación se ha convertido en un problema persistente [109].

Los reportes de infestación con triatomíneos luego de los rociados continuaron sucediéndose. En 2008 se reportó una población de *T. infestans* resistente en la localidad de Yacuiba, al sur de Bolivia, y también en la región del Gran Chaco. Esta población mostró

una alta resistencia a deltametrina, con un RR de 154, pero no así a fenitrotion ni a fipronil. La actividad esterasa de esta población fue más baja que la de la cepa de referencia, motivo por el cual se sugirió la posible participación de resistencia por mutaciones en el sitio blanco (*kdr*) [56]. Luego, se reportó la aparición de más poblaciones resistentes en las localidades bolivianas de Mataral (RR=17.4, Departamento de Cochabamba), Sucre (RR=31.3, Departamento de Chuquisaca), Entre Ríos (RR=174), Tierras Nuevas (RR=542), Villa del Carmen (RR=438), El Palmar (RR=300) y Villamontes (RR=247) (Departamento de Tarija). Los autores señalan que la alta tasa de infestación en estas localidades podría deberse a focos de resistencia [110–112].

Sucesivos estudios toxicológicos se realizaron con diferentes poblaciones ubicadas en provincias argentinas, pertenecientes en su mayoría a la ecorregión del Gran Chaco [4]. Fueron encontradas poblaciones altamente resistentes en la localidad de El Mala, con un RR de 1031 [113]. Por otro lado, en 2013 se reportó la existencia de micro-resistencias en la localidad de La Esperanza (vecina a El Mala). Los autores observaron diferentes respuestas toxicológicas a la deltametrina según la vivienda en la que fueron recolectados los insectos. Así, mientras que algunas casas de la localidad de La Esperanza albergaban triatominos con alta resistencia, en otras viviendas los insectos colectados resultaron sensibles. Si bien en una primera instancia se había determinado un RR de 230, este análisis permitió observar que las tasas de resistencia en esta localidad varían desde la susceptibilidad hasta RRs de 1400 [114, 115].

Si bien la transmisión vectorial por *T. infestans* logró ser interrumpida en Uruguay, Chile, Brasil y el sur de Argentina, en la región del Gran Chaco es aún altamente prevalente [104]. El Gran Chaco es una ecorregión de aproximadamente 1,3 millones de km² que se extiende sobre Argentina (62 %), Paraguay (25 %), Bolivia (12 %) y sudoeste de Brasil (<1 %), con una densidad poblacional menor a cinco habitantes por km² y poblados rurales muy dispersos, de acceso dificultoso, con casas típicamente construidas con barro y paja, o barro y madera. Esta región presenta una economía de subsistencia con altos niveles de pobreza. La presencia del estado en estas áreas es escasa y el control vectorial presenta una capacidad operativa limitada en muchos distritos [116].

Recientemente fue evaluada la susceptibilidad a deltametrina de *T. infestans* en diferentes provincias endémicas de Argentina. Se estudiaron 55 localidades, de las cuales 43 (78 %) eran susceptibles. Los resultados de este trabajo, permitieron observar que el foco de resistencia se encontraba en el departamento de Güemes, en la ecorregión del Gran Chaco. Los autores señalan que a través de estos resultados puede deducirse que la resistencia a insecticidas piretroides en Argentina se encuentra restringida geográficamente a las poblaciones de ciertas zonas del Gran Chaco [117].

La infestación de viviendas que han sido tratadas con piretroides en un lapso inferior al esperado (por la acción residual del insecticida) puede deberse a una distribución del insecticida deficiente, una recolonización por insectos de áreas vecinas o, la presencia de resistencia [4]. Los estudios toxicológicos realizados con *T. infestans* en las diferentes poblaciones argentinas resistentes a piretroides indican que no hay resistencia cruzada con insecticidas pertenecientes a otros grupos químicos, como por ejemplo el organofosforado fenitrotión, lo que proporciona un indicio de que el proceso detoxificante para estos insecticidas es diferente del existente para organofosforados y carbamatos en estos insectos [4].

Por último, es de destacar, que la resistencia en triatominos en ausencia de mutaciones

kdr ha sido comprobada por Santo-Orihuela et al. [118], quienes informaron valores de resistencia a deltametrina (RR50) para las poblaciones de *T. infestans* de las comunidades de El Cruce, Guasuantí e Itapicoe, en Bolivia, de 13,90, 2,71 y 10,62, respectivamente. A través del tratamiento con el sinergista PBO, la medida de la hidrólisis enzimática del sustrato fluorescente 7-CP y la evaluación de las mutaciones en el sitio de acción conocidas, los autores determinaron que las vías de detoxificación de piretroides se encontraban definidas por un aumento en la actividad P450 y la actividad piretroide esterasa [118]. Sin embargo, se ha observado que los valores de RR son menores que los encontrados para las poblaciones que portan mutaciones *kdr* [91].

La implicancia de enzimas degradativas, penetración reducida y mutaciones en el sitio de acción en los triatomíneos [33, 34, 49, 56, 57, 67, 68, 91, 100, 101, 118–120] plantea un panorama complejo que requiere estudiar estos procesos de forma plural.

Perspectivas futuras para el control de triatominos

Los piretroides se plantean como los insecticidas elegidos para el control de la enfermedad de Chagas en los países endémicos, pero la evolución de la resistencia puede poner en riesgo esta estrategia [4]. Será tarea de los entomólogos el desarrollo de prácticas sostenibles para controlar eficazmente la re-infestación en áreas endémicas, que ponen en riesgo la salud y la calidad de vida de sus habitantes.

El hecho de que las poblaciones estudiadas presentan susceptibilidad a fenitrotion, plantea la posibilidad de rotar con este tipo de insecticidas. Sin embargo, si se consideran como factores esenciales el riesgo toxicológico y la eficacia, la calidad de las formulaciones y la aceptación de los residentes de las áreas endémicas, la rotación entre fenitrotion y deltametrina no resulta recomendable [4].

Por otro lado, existen estrategias de control de tipo biológico que han sido testeadas con éxito en *T. infestans*. Tal es el caso del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, que al degradar los hidrocarburos y reducir el grosor de la cutícula genera la muerte del insecto, al tiempo que un aumento en la susceptibilidad al tratamiento con otros insecticidas. Este método presenta la ventaja de que el hongo es transmitido de forma horizontal entre los triatominos, gracias al fenómeno de agregación. Otras ventajas son sus bajos costos y su tecnología simple y ecológicamente amigable. Este sistema ha sido probado en campo a través de trampas de atracción basadas en dióxido de carbono, que en su interior contienen al hongo [34]. El método no solo resulta interesante para el control de triatominos en ambientes domésticos, sino que su utilidad principal podría recaer en su utilización de las trampas en ambientes peridomiciliarios (donde los piretroides presentan una eficacia disminuida) y en lugares con presencia de triatominos resistentes.

Por otro lado, la búsqueda de nuevas moléculas blanco de insecticidas es una posibilidad interesante, en la cual existe una búsqueda activa. En este aspecto en los insectos, los neuropéptidos y neurohormonas, desempeñan un papel central en el control de eventos fundamentales como el desarrollo, la reproducción, el comportamiento y la alimentación [121]. Dada su relevancia en la regulación de la fisiología, se han propuesto las moléculas del sistema neuroendocrino de insectos, es decir, neuropéptidos y sus receptores, como blanco atractivo para insecticidas de nueva generación [122, 123]. Además, la señalización neuroendocrina podría contribuir a la tolerancia de la resistencia a los neurotóxicos mediante diferentes mecanismos, como por ejemplo reducir el impacto del estrés causado por los insecticidas [124, 125]. La participación de los neuropéptidos en esta respuesta al estrés o cualquier otro mecanismo que pudiera desembocar en la detoxificación de los insecticidas, es un campo de investigación poco explorado hasta la fecha [121].

El manejo de plagas basado en ARN de interferencia (ARNi) puede resultar de interés debido a su alta especificidad [126]. La disponibilidad de secuencias genómicas de insectos ha abierto las puertas para probar esta tecnología en varios grupos [127]; lo que ha permi-

tido comprobar una alta eficiencia de ARNi en más de 30 especies [128]. Este mecanismo de silenciamiento post-transcripcional ha sido utilizado también con el fin de estudiar el funcionamiento de ciertos genes, por ejemplo en *Locusta migratoria* se ha descubierto la participación de dos carboxilesterasas en la detoxificación del insecticida organofosforado clorpirifos, mediante ARNi seguido de topicación con el insecticida y estudio de la mortalidad. En *R. prolixus* también se ha utilizado esta técnica en estudios de genómica funcional. Por ejemplo, nuestro grupo ha descrito recientemente la participación del neuropéptido Orcokinina en la ecdisis mediante el silenciamiento génico por ARNi [129]. Se estima que con el aumento del conocimiento acerca del proceso de ARNi, esta técnica podría ser aplicada de forma eficiente para el control de plagas en los próximos años [126, 128]

A futuro será necesario ampliar los horizontes en la investigación de nuevos métodos alternativos de control para aquellas áreas que sufren altas tasas de infestación. Resulta de importancia destacar, que la participación de la comunidad y las mejoras en la calidad de vida de las personas que viven en estas áreas es indispensable para el futuro de cualquier iniciativa de control de estos vectores que pretenda ser sostenible en el tiempo.

Parte III

Resultados

Capítulo 1

Análisis bioinformático del canal de sodio dependiente de voltaje en *T. infestans*. Análisis de mutaciones asociadas a resistencia a piretroides en poblaciones del Gran Chaco

1.1. Hipótesis

Existen mutaciones tipo *kdr* en diferentes poblaciones de *T. infestans* provenientes de la ecoregión del Gran Chaco, las cuales son una causa importante de la resistencia a insecticidas piretroides observada.

1.2. Objetivos específicos

- Determinar la secuencia completa de ADNc del gen *TiNa_V* y caracterizar su secuencia aminoacídica.
- Determinar la sensibilidad de las técnicas moleculares existentes para la detección de mutaciones asociadas a resistencia a piretroides en *T. infestans*.
- Analizar polimorfismos poblacionales en el gen *TiNa_V* y estimar la frecuencia de las mutaciones *kdr* en poblaciones del Gran Chaco.

1.3. Introducción

La tripanosomiasis, a escala de salud pública, es una enfermedad difícil de tratar y las vacunas no están disponibles. Por lo tanto, los programas de control endémico priorizan la eliminación del vector de los ambientes domésticos. En esta forma, los métodos más efectivos son la mejora de la vivienda para reducir el número de casas infestadas, y el uso de insecticidas para reducir la intensidad de la infestación (OMS 2006). Sin embargo, la aparición de resistencia a insecticidas piretroides en diferentes poblaciones de *T. infestans* de la ecoregión del Gran Chaco dificulta esta tarea [68, 111].

En diversas especies de insectos, se han reportado mutaciones puntuales en el canal de sodio dependiente de voltaje Na_V que generan resistencia a insecticidas piretroides llamadas mutaciones *kdr* (por *knockdown resistance*). Como, por ejemplo, pueden citarse:

Anopheles gambiae, *Culex pipiens*, *Pediculus humanus capitis*, *C. lectularius* y *T. infestans* [28, 91, 100, 101, 130].

En nuestro laboratorio se consiguió secuenciar el dominio II del gen Na_V en *T. infestans* ($TiNa_V$), y determinar la existencia de una mutación en el mismo, en una población proveniente de la provincia de Salta. Esta población presenta una dosis letal (LD50) para deltametrina unas 35 veces superior a la de una población susceptible (RR=35) [100]. Se trata de la sustitución de una leucina por una fenilalanina en la posición 1014 (L1014F) (por convención se toma el número de posición equivalente en el gen ortólogo de *M. domestica*). La mutación L1014F es la más habitual de las sustituciones *kdr* en el gen Na_V en insectos. Para la detección de esta mutación en *T. infestans*, en nuestro grupo se ha diseñado un ensayo molecular basado en PCR denominado PCR *amplification of specific alleles* (PASA)(patente en trámite número 20110103354) [100].

Los ensayos moleculares pueden habilitar la detección temprana de dispersión y surgimiento de nuevos focos de resistencia, al permitir detectar la presencia de mutaciones *kdr* en insectos individuales, antes de que la resistencia esté presente en la mayoría de la población, como es el caso de las determinaciones toxicológicas. Este tipo de medidas pueden ser útiles a fin de realizar monitoreos y manejo de resistencia dentro de campañas de control de vectores. Sin embargo, el ensayo había sido probado solo en una población (Madrejones, Salta), con grupos de 10 insectos del primer estadio ninfal analizados de manera conjunta [100].

Al comienzo del presente trabajo resultaba importante comprobar la posibilidad de aplicación del ensayo PASA en distintas poblaciones de *T. infestans* provenientes de distintas regiones del Gran Chaco. Del mismo modo, resultaba necesaria su puesta a punto en insectos individuales, para estimar frecuencias en una determinada localidad. Por último, con el fin de aumentar la procesividad de los ensayos, es importante conocer el límite de detección de la técnica: De esta manera, se puede determinar el número más pequeño de insectos que pueden analizarse en conjunto (en un *pool*) y poder continuar detectando la presencia de la mutación en un individuo heterocigota. Esto tiene como fin mejorar las condiciones de costo/beneficio del ensayo, ya que de ser posible determinar la presencia del heterocigota dentro del *pool*, se podrá conocer la situación poblacional invirtiendo en ello menores tiempos y costos.

Como punto de partida se identificó la secuencia completa de $TiNa_V$, y se realizó un estudio completo de la proteína mediante herramientas bioinformáticas. Posteriormente se trabajó en la validación del método PASA para la detección de las mutaciones *kdr* L1014F en distintas poblaciones resistentes de la ecoregión del Gran Chaco, y su límite de sensibilidad para realizar los ensayos con grupos de insectos.

1.4. Resultados

1.4.1. Determinación de la secuencia completa de cDNA del canal de sodio dependiente de voltaje de *T. infestans*. Caracterización bioinformática estructural

Se realizó una búsqueda por homología tipo TBLASTn en una base de datos transcriptómica de glándulas salivales de *T. infestans* depositada en Vectorbase (<https://>

www.vectorbase.org/), utilizando como *query* la secuencia de aminoácidos de Na_V de *R. prolixus*. Con esta aproximación se pudo determinar la secuencia completa de cDNA de *TiNa_V*, con excepción de un pequeño fragmento de 4 pb. En este fragmento, cuatro nucleótidos presentaban identidad no definida (N), lo que nos llevó a inferir que podría existir en esa zona una repetición de nucleótido único que hizo imposible detectar la secuencia completa. La realización de una búsqueda del tipo Blastn nos permitió observar que en esa zona del Na_V, en otras especies, existe una región rica en adeninas. Teniendo en cuenta este factor, se procedió a amplificar por PCR y secuenciar el fragmento en la población sensible de CIPEIN, con el fin de comprobar esta inferencia y obtener la secuencia. En la Figura 1.1 se muestra la secuencia completa de cDNA del gen; se remarcaron los nucleótidos que no se encontraban en la base de datos transcriptómica.

Figura 1.1: Secuencia de cDNA completa de *T. infestans* y su traducción. Los nucleótidos que no se encontraban definidos en la secuencia transcriptómica fueron secuenciados y se muestran en negrita y remarcados.

Una vez obtenida la secuencia aminoacídica de TiNa_V fue posible realizar un alineamiento con proteínas ortólogas de *R. prolixus*, *D. melanogaster* y *Cimex lectularius* (Figura 1.2). Posteriormente, se realizó un análisis bioinformático para determinar las características fisicoquímicas de TiNa_V. Pudo observarse que el aminoácido mayoritario es leucina, distribuida en casi un 10 % de la secuencia. Resultados similares se hallaron tanto en Na_V de *R. prolixus* (Tabla 1.1) como en *D. melanogaster* y *C. lectularius* (datos no mostrados).

La variante de *splicing* de la proteína TiNa_V identificada se compone de un total de 1.965 aminoácidos, tiene un peso molecular de 22.2394,36 Da, y presenta un punto isoeléctrico teórico de 5,20. Por su parte, el de *R. prolixus* (RpNa_V) reconstruido a partir de la información genómica depositada en vectorbase (<https://www.vectorbase.org/>) tiene 2.022 aminoácidos, un peso molecular de 22.8909,75 Da y un punto isoeléctrico de 5,33.

El número total de residuos cargados negativamente (aspartato + glutamato) fue 245 en el caso de TiNa_V, y 248 para RpNa_V; mientras que el número total de residuos cargados positivamente (arginina + lisina) fue 190 para el primero, y 203 para el segundo. La fórmula molecular teórica y el número de átomos se muestran en la Tabla 1.2.

DromeNaV -MTEDSOSISEERSLFRPPTRESLVQTEQIAAEHQELEKRRKADGEV-----IRYDDEDEDEGQPQPTLEQGVFIPVKLGSSFFPELASTPLEDIDDPYISNVLTFVWVK
 CileNaV MSVVDIOTFSEERSIFRPPTRESLQAEVRIAEYAKQHELEKRAEGEG-GRKKKREIRYDEDEDEGQPQPTLEQGVFIPVKLGSSFFPELASTPLEDIDDPYISNVLTFVWVK
 RhpNaV MSVASTDVSITEERSLQFPPTRESLQAEVRIAEYAKQHELEKRAEGEV-----SVRYDEDEDEGQPQPTLEQGVFIPVKLGSSFFPELASTPLEDIDDPYISNVLTFVWVK
 TiaNaV MSVASTDVSITEERSLQFPPTRESLQAEVRIAEYAKQHELEKRAEGEV-----SVRYDEDEDEGQPQPTLEQGVFIPVKLGSSFFPELASTPLEDIDDPYISNVLTFVWVK
 DromeNaV GKDIFRFSASAKMMMDPFPIRRVAIYLVHPLFSLFIITILFNCVIMIMPTFTTVESTVEVFTGTIYTFESAVKVMARGFLLQPTTYLRDANNWLFVVIYALAYTMGIDLGMLAALR
 CileNaV GRDIFRFSATDALMDLDPFPIRRVAIYLVHPLFSLFIITILFNCVIMIMPTFTTVESTVEVFTGTIYTFESAVKVMARGFLLQPTTYLRDANNWLFVVIYALAYTMGIDLGMLAALR
 RhpNaV GRDIFRFSATKALMDLDPFPIRRVAIYLVHPLFSLFIITILFNCVIMIMPTFTTVESTVEVFTGTIYTFESAVKVMARGFLLQPTTYLRDANNWLFVVIYALAYTMGIDLGMLAALR
 TiaNaV GRDIFRFSATNALMDLDPFPIRRVAIYLVHPLFSLFIITILFNCVIMIMPTFTTVESTVEVFTGTIYTFESAVKVMARGFLLQPTTYLRDANNWLFVVIYALAYTMGIDLGMLAALR
 DromeNaV TFRVLRAALKTAIVPGLKTIVGAVIESYKMLRDVIIITMFSLSVFALMGLQIYMGVLTQKCIKFPDGSAGNLTDENNDYHNRSSNWSYSEDE-GISFPLCGNISGAGQCCDDYVCLQG
 CileNaV TFRVLRAALKTAIVPGLKTIVGAVIESYKMLRDVIIITMFSLSVFALMGLQIYMGVLTQKCIKFPDGSAGNLTDENNDYHNRSSNWSYSEDE-GISFPLCGNISGAGQCCDDYVCLQG
 RhpNaV TFRVLRAALKTAIVPGLKTIVGAVIESYKMLRDVIIITMFSLSVFALMGLQIYMGVLTQKCIKFPDGSAGNLTDENNDYHNRSSNWSYSEDE-GISFPLCGNISGAGQCCDDYVCLQG
 TiaNaV TFRVLRAALKTAIVPGLKTIVGAVIESYKMLRDVIIITMFSLSVFALMGLQIYMGVLTQKCIKFPDGSAGNLTDENNDYHNRSSNWSYSEDE-GISFPLCGNISGAGQCCDDYVCLQG
 DromeNaV FGDPHNYGTSFDSFGWAFSAFLMTQDYFNEDLYQLVRAAGPWHMLFFVIIIFLGSFYLVNLILAIVAMSYDELQKKAEEEEAAEEAIREAEEAAAAAARLEERANAQAQAAADAA
 CileNaV FGDPHNYGTSFDSFGWAFSAFLMTQDYFNEDLYQLVRAAGPWHMLFFVIIIFLGSFYLVNLILAIVAMSYDELQKKAEEEEAAEEAIREAEEAAAAAARLEERANAQAQAAADAA
 RhpNaV FGDPHNYGTSFDSFGWAFSAFLMTQDYFNEDLYQLVRAAGPWHMLFFVIIIFLGSFYLVNLILAIVAMSYDELQKKAEEEEAAEEAIREAEEAAAAAARLEERANAQAQAAADAA
 TiaNaV FGDPHNYGTSFDSFGWAFSAFLMTQDYFNEDLYQLVRAAGPWHMLFFVIIIFLGSFYLVNLILAIVAMSYDELQKKAEEEEAAEEAIREAEEAAAAAARLEERANAQAQAAADAA
 DromeNaV AAE-----EALHPEMA-KSPYISCTSYELFVSGEKMD-DNNKMSIRAGEVESESYSIQRO-----PAPT-TAHQATKVRKVSTYIIRNGRGRPIPGSDRKLPLVS
 CileNaV --AAAAAAEADAGSAKSPSDFSASYSYELFVSGEKMD-DNNKMSIRAGEVESESYSIQRO-----PAPT-TAHQATKVRKVSTYIIRNGRGRPIPGSDRKLPLVS
 RhpNaV EAERGGCGGGGDSVAKSPSDFSASYSYELFVSGEKMD-DNNKMSIRAGEVESESYSIQRO-----PAPT-TAHQATKVRKVSTYIIRNGRGRPIPGSDRKLPLVS
 TiaNaV EAERGGCGGGGDSVAKSPSDFSASYSYELFVSGEKMD-DNNKMSIRAGEVESESYSIQRO-----PAPT-TAHQATKVRKVSTYIIRNGRGRPIPGSDRKLPLVS
 DromeNaV TYQDAQHLYPAODSNNAVTFMSEENGALIVPYVYQGLGSRHSSYTSHQGRITTYTHGDLGGMAVMGVSTMTKSLRNANT-RNQSVCATNGGTCLDTHHKLDRHDEIGLEICTEAG
 CileNaV TYLDA-QHLYPAODSNNAVTFMSEENGAMVVPYITGLGSRHSSYTSHASRISYTHGDLGGMAVMGVSTMTKSLRNANT-RNQSVCATNGGTCLDTHHKLDRHDEIGLEICTEAG
 RhpNaV TYLDA-QHLYPAODSNNAVTFMSEENGAMVVPYITGLGSRHSSYTSHASRISYTHGDLGGMAVMGVSTMTKSLRNANT-RNQSVCATNGGTCLDTHHKLDRHDEIGLEICTEAG
 TiaNaV RYKSA-EHLYPAODSNNAVTFMSEENGAMVVPYITGLGSRHSSYTSHASRISYTHGDLGGMAVMGVSTMTKSLRNANT-RNQSVCATNGGTCLDTHHKLDRHDEIGLEICTEAG
 DromeNaV KIRHONDFIEPVQOTVVMKDVVWLVNDIEQAAGKHSRASOR-GVSYYFTTEEDDEGPTFKDRALEVIKMGIDVFCWCCWVLRPQEWVSLIVDFPVELFITLIVVHTMFA
 CileNaV S-KKQONDFIEPAQOQTVVMKDVVWLVNDIEQAAGKHSRASOR-GVSYYFTTEEDDEGPTFKDRALEVIKMGIDVFCWCCWVLRPQEWVSLIVDFPVELFITLIVVHTMFA
 RhpNaV NKRHONDFIEPAQOQTVVMKDVVWLVNDIEQAAGKHSRASOR-GVSYYFTTEEDDEGPTFKDRALEVIKMGIDVFCWCCWVLRPQEWVSLIVDFPVELFITLIVVHTMFA
 TiaNaV NKRHONDFIEPAQOQTVVMKDVVWLVNDIEQAAGKHSRASOR-GVSYYFTTEEDDEGPTFKDRALEVIKMGIDVFCWCCWVLRPQEWVSLIVDFPVELFITLIVVHTMFA
 DromeNaV MDHDMKMEFVLKSGNYFFATFAIEAMKLMAMSPKYVQSGWNIFFDIIIVALSLEIGLEGVGLVLRSPRLLRVFLAKSWPTLNLISIMGRVAGALGNITFVLCITIFFAV
 CileNaV LDHDMKMEFVLKSGNYFFATFAIEAMKLMAMSPKYVQSGWNIFFDIIIVALSLEIGLEGVGLVLRSPRLLRVFLAKSWPTLNLISIMGRVAGALGNITFVLCITIFFAV
 RhpNaV LDHDMKMEFVLKSGNYFFATFAIEAMKLMAMSPKYVQSGWNIFFDIIIVALSLEIGLEGVGLVLRSPRLLRVFLAKSWPTLNLISIMGRVAGALGNITFVLCITIFFAV
 TiaNaV LDHDMKMEFVLKSGNYFFATFAIEAMKLMAMSPKYVQSGWNIFFDIIIVALSLEIGLEGVGLVLRSPRLLRVFLAKSWPTLNLISIMGRVAGALGNITFVLCITIFFAV
 DromeNaV MMDLPGNHYHDKRDFPDGDLPRNMTDFMHSFMIIVFVLGCEWIESMMDCHMGVDSVCIPELATVVIIGNLVVNLFLALLSNFGSSLSAPTADNDNKIAEAFRIGRFSKVR
 CileNaV MMDLPGNHYHDKRDFPDGDLPRNMTDFMHSFMIIVFVLGCEWIESMMDCHMGVDSVCIPELATVVIIGNLVVNLFLALLSNFGSSLSAPTADNDNKIAEAFRIGRFSKVR
 RhpNaV MMDLPGNHYHDKRDFPDGDLPRNMTDFMHSFMIIVFVLGCEWIESMMDCHMGVDSVCIPELATVVIIGNLVVNLFLALLSNFGSSLSAPTADNDNKIAEAFRIGRFSKVR
 TiaNaV MMDLPGNHYHDKRDFPDGDLPRNMTDFMHSFMIIVFVLGCEWIESMMDCHMGVDSVCIPELATVVIIGNLVVNLFLALLSNFGSSLSAPTADNDNKIAEAFRIGRFSKVR
 DromeNaV NIADCFILNKLNTQISDQGSKGVKWCISAEHG--DNELELGNDEILAGLIRKGIKEOTOLEVAIGDSMEFTIHWGNKNNKPKSKYLWNAHIGHSI-NHQQMLHEHINRGLSL
 CileNaV NIADCFILNKLNTQISDQGSKGVKWCISAEHG--DNELELGNDEILAGLIRKGIKEOTOLEVAIGDSMEFTIHWGNKNNKPKSKYLWNAHIGHSI-NHQQMLHEHINRGLSL
 RhpNaV NIADCFILNKLNTQISDQGSKGVKWCISAEHG--DNELELGNDEILAGLIRKGIKEOTOLEVAIGDSMEFTIHWGNKNNKPKSKYLWNAHIGHSI-NHQQMLHEHINRGLSL
 TiaNaV NIADCFILNKLNTQISDQGSKGVKWCISAEHG--DNELELGNDEILAGLIRKGIKEOTOLEVAIGDSMEFTIHWGNKNNKPKSKYLWNAHIGHSI-NHQQMLHEHINRGLSL
 DromeNaV QDDOTASINSYSGKHNFFKDSHKGSATMEGEE-KDASKEDGLDEELDEEGESGEPDGGDIIHAHDEIDILDEYPADCCPDSYKKKFFILAGDDDSFWQGWGLAKTETQLIEN
 CileNaV YDDOTASINSYSGKHNFFKDSHKGSATMEGEE-KDASKEDGLDEELDEEGESGEPDGGDIIHAHDEIDILDEYPADCCPDSYKKKFFILAGDDDSFWQGWGLAKTETQLIEN
 RhpNaV YDDOTASINSYSGKHNFFKDSHKGSATMEGEE-KDASKEDGLDEELDEEGESGEPDGGDIIHAHDEIDILDEYPADCCPDSYKKKFFILAGDDDSFWQGWGLAKTETQLIEN
 TiaNaV YDDOTASINSYSGKHNFFKDSHKGSATMEGEE-KDASKEDGLDEELDEEGESGEPDGGDIIHAHDEIDILDEYPADCCPDSYKKKFFILAGDDDSFWQGWGLAKTETQLIEN
 DromeNaV KYFETAVITMILSSALALEDVHLQRPFLQDILYMDRIFTVIFPLEMLIKWLAGFKYVFTNAWCWDFIIVMVSINIFASMLGAGGQAFETMTLALPLRAVSRWEGMKVY-
 CileNaV KYFETAVITMILSSALALEDVHLQRPFLQDILYMDRIFTVIFPLEMLIKWLAGFKYVFTNAWCWDFIIVMVSINIFASMLGAGGQAFETMTLALPLRAVSRWEGMKVY-
 RhpNaV KYFETAVITMILSSALALEDVHLQRPFLQDILYMDRIFTVIFPLEMLIKWLAGFKYVFTNAWCWDFIIVMVSINIFASMLGAGGQAFETMTLALPLRAVSRWEGMKVY-
 TiaNaV KYFETAVITMILSSALALEDVHLQRPFLQDILYMDRIFTVIFPLEMLIKWLAGFKYVFTNAWCWDFIIVMVSINIFASMLGAGGQAFETMTLALPLRAVSRWEGMKVY-
 DromeNaV VNALVQAIPISENVLLVCLIFWLIFAIMGVOLFAGKYKCEDMNGTKLSHIIIPNRNACESENYTWNSSAMNPDHVGAYLCLFQVATFGKWQIMNSAIDSREVDPQIRETNIMYLY
 CileNaV VNALVQAIPISENVLLVCLIFWLIFAIMGVOLFAGKYKCEDMNGTKLSHIIIPNRNACESENYTWNSSAMNPDHVGAYLCLFQVATFGKWQIMNSAIDSREVDPQIRETNIMYLY
 RhpNaV VNALVQAIPISENVLLVCLIFWLIFAIMGVOLFAGKYKCEDMNGTKLSHIIIPNRNACESENYTWNSSAMNPDHVGAYLCLFQVATFGKWQIMNSAIDSREVDPQIRETNIMYLY
 TiaNaV VNALVQAIPISENVLLVCLIFWLIFAIMGVOLFAGKYKCEDMNGTKLSHIIIPNRNACESENYTWNSSAMNPDHVGAYLCLFQVATFGKWQIMNSAIDSREVDPQIRETNIMYLY
 DromeNaV FVFFIIFGSFPTLNLFIQVIIDNFNQKKAAGSLEMPTEDEQKYYNAMKMGSKKPLKAIIPRFRWRPQAIYFEIVTDKRFDMIIIMLFIGLNMFTMLDLYDASOTYNAVLDYLAIEV
 CileNaV FVFFIIFGSFPTLNLFIQVIIDNFNQKKAAGSLEMPTEDEQKYYNAMKMGSKKPLKAIIPRFRWRPQAIYFEIVTDKRFDMIIIMLFIGLNMFTMLDLYDASOTYNAVLDYLAIEV
 RhpNaV FVFFIIFGSFPTLNLFIQVIIDNFNQKKAAGSLEMPTEDEQKYYNAMKMGSKKPLKAIIPRFRWRPQAIYFEIVTDKRFDMIIIMLFIGLNMFTMLDLYDASOTYNAVLDYLAIEV
 TiaNaV FVFFIIFGSFPTLNLFIQVIIDNFNQKKAAGSLEMPTEDEQKYYNAMKMGSKKPLKAIIPRFRWRPQAIYFEIVTDKRFDMIIIMLFIGLNMFTMLDLYDASOTYNAVLDYLAIEV
 DromeNaV VIFSSDECLLIKALRYHYHFKPWNLFDFVVLISILGLVLSOIIIEKYFVSPITLLRVVRVAKVGRVLRVKGAKGIRTLFALAMSLPALFNICLLFLVMEIFAIFGMSFFMVKRKSGL
 CileNaV VIFSSDECLLIKALRYHYHFKPWNLFDFVVLISILGLVLSOIIIEKYFVSPITLLRVVRVAKVGRVLRVKGAKGIRTLFALAMSLPALFNICLLFLVMEIFAIFGMSFFMVKRKSGL
 RhpNaV VIFSSDECLLIKALRYHYHFKPWNLFDFVVLISILGLVLSOIIIEKYFVSPITLLRVVRVAKVGRVLRVKGAKGIRTLFALAMSLPALFNICLLFLVMEIFAIFGMSFFMVKRKSGL
 TiaNaV VIFSSDECLLIKALRYHYHFKPWNLFDFVVLISILGLVLSOIIIEKYFVSPITLLRVVRVAKVGRVLRVKGAKGIRTLFALAMSLPALFNICLLFLVMEIFAIFGMSFFMVKRKSGL
 DromeNaV NOVNFRTFQSGMILLFQMSITAGWDGVLALINEACDPDNDGYPGMSGATVGTITLLSYLVISFLVINMYIAVILENYSQATEDVQEGTDDDDYIMYIEWQGFDPFGQTVIRY
 CileNaV NOVNFRTFQSGMILLFQMSITAGWDGVLALINEACDPDNDGYPGMSGATVGTITLLSYLVISFLVINMYIAVILENYSQATEDVQEGTDDDDYIMYIEWQGFDPFGQTVIRY
 RhpNaV NOVNFRTFQSGMILLFQMSITAGWDGVLALINEACDPDNDGYPGMSGATVGTITLLSYLVISFLVINMYIAVILENYSQATEDVQEGTDDDDYIMYIEWQGFDPFGQTVIRY
 TiaNaV NOVNFRTFQSGMILLFQMSITAGWDGVLALINEACDPDNDGYPGMSGATVGTITLLSYLVISFLVINMYIAVILENYSQATEDVQEGTDDDDYIMYIEWQGFDPFGQTVIRY
 DromeNaV DQLEDFLOVLEPPIQHKPKYKIVSMDIPICKGDMFCVDILDAKTKDFPARKNGPIETOEIGETA-ARPDTEGVSPVSTLNRQREYCARLIQNAWKHKARQAGGAGTPTG
 CileNaV DQLEDFLOVLEPPIQHKPKYKIVSMDIPICKGDMFCVDILDAKTKDFPARKNGPIETOEIGETA-ARPDTEGVSPVSTLNRQREYCARLIQNAWKHKARQAGGAGTPTG
 RhpNaV DQLEDFLOVLEPPIQHKPKYKIVSMDIPICKGDMFCVDILDAKTKDFPARKNGPIETOEIGETA-ARPDTEGVSPVSTLNRQREYCARLIQNAWKHKARQAGGAGTPTG
 TiaNaV DQLEDFLOVLEPPIQHKPKYKIVSMDIPICKGDMFCVDILDAKTKDFPARKNGPIETOEIGETA-ARPDTEGVSPVSTLNRQREYCARLIQNAWKHKARQAGGAGTPTG
 DromeNaV DQLEDFLOVLEPPIQHKPKYKIVSMDIPICKGDMFCVDILDAKTKDFPARKNGPIETOEIGETA-ARPDTEGVSPVSTLNRQREYCARLIQNAWKHKARQAGGAGTPTG
 CileNaV DQLEDFLOVLEPPIQHKPKYKIVSMDIPICKGDMFCVDILDAKTKDFPARKNGPIETOEIGETA-ARPDTEGVSPVSTLNRQREYCARLIQNAWKHKARQAGGAGTPTG
 RhpNaV DQLEDFLOVLEPPIQHKPKYKIVSMDIPICKGDMFCVDILDAKTKDFPARKNGPIETOEIGETA-ARPDTEGVSPVSTLNRQREYCARLIQNAWKHKARQAGGAGTPTG
 TiaNaV DQLEDFLOVLEPPIQHKPKYKIVSMDIPICKGDMFCVDILDAKTKDFPARKNGPIETOEIGETA-ARPDTEGVSPVSTLNRQREYCARLIQNAWKHKARQAGGAGTPTG
 DromeNaV DQLEDFLOVLEPPIQHKPKYKIVSMDIPICKGDMFCVDILDAKTKDFPARKNGPIETOEIGETA-ARPDTEGVSPVSTLNRQREYCARLIQNAWKHKARQAGGAGTPTG
 CileNaV DQLEDFLOVLEPPIQHKPKYKIVSMDIPICKGDMFCVDILDAKTKDFPARKNGPIETOEIGETA-ARPDTEGVSPVSTLNRQREYCARLIQNAWKHKARQAGGAGTPTG
 RhpNaV DQLEDFLOVLEPPIQHKPKYKIVSMDIPICKGDMFCVDILDAKTKDFPARKNGPIETOEIGETA-ARPDTEGVSPVSTLNRQREYCARLIQNAWKHKARQAGGAGTPTG
 TiaNaV DQLEDFLOVLEPPIQHKPKYKIVSMDIPICKGDMFCVDILDAKTKDFPARKNGPIETOEIGETA-ARPDTEGVSPVSTLNRQREYCARLIQNAWKHKARQAGGAGTPTG

Figura 1.2: Alineamiento de la secuencia aminoacídica de los canales de sodio dependientes de voltaje de *D. melanogaster*, *C. lectularius*, *R. prolixus* y *T. infestans*.

Composición aminoacídica				
Nombre del aminoácido	TiNav		RhNav	
	Nro de residuos	Porcentaje	Nro de residuos	Porcentaje
Ala (A)	137	7.00%	139	6.90%
Arg (R)	91	4.60%	101	5.00%
Asn (N)	87	4.40%	91	4.50%
Asp (D)	123	6.30%	129	6.40%
Cys (C)	35	1.80%	36	1.80%
Gln (Q)	66	3.40%	69	3.40%
Glu (E)	122	6.20%	119	5.90%
Gly (G)	117	6.00%	124	6.10%
His (H)	33	1.70%	30	1.50%
Ile (I)	149	7.60%	144	7.10%
Leu (L)	195	9.90%	201	9.90%
Lys (K)	99	5.00%	102	5.00%
Met (M)	70	3.60%	70	3.50%
Phe (F)	125	6.40%	130	6.40%
Pro (P)	75	3.80%	82	4.10%
Ser (S)	134	6.80%	135	6.70%
Thr (T)	89	4.50%	93	4.60%
Trp (W)	32	1.60%	33	1.60%
Tyr (Y)	59	3.00%	62	3.10%
Val (V)	127	6.50%	132	6.50%
Pyl (O)	0	0.00%	0	0.00%
Sec (U)	0	0.00%	0	0.00%

Tabla 1.1: Composición aminoacídica de los canales de sodio dependientes de voltaje de *T. infestans* y *R. prolixus*.

composición atómica		
	TiNav	RhNav
Carbono C	10058	10349
Hidrógeno H	15594	16042
Nitrógeno N	2588	2680
Oxígeno O	2891	2969
Azufre S	105	106
Nro total de átomos	31236	32146
Fórmula molecular	C ₁₀₀₅₈ H ₁₅₅₉₄ N ₂₅₈₈ O ₂₈₉₁ S ₁₀₅	C ₁₀₃₄₉ H ₁₆₀₄₂ N ₂₆₈₀ O ₂₉₆₉ S ₁₀₆

Tabla 1.2: Composición atómica de los canales de sodio dependientes de voltaje de *T. infestans* y *R. prolixus*.

Se comparó la estructura secundaria de TiNav y RpNav (Tabla 1.3). El patrón de estructura secundaria del canal de *T. infestans* fue graficado con la ayuda del programa Gor4 (Figura 1.3). Las estructuras secundarias más representadas en TiNav son aquellas caracterizadas por tener un alto grado de libertad, del tipo desordenadas o *random coil*,

que ocupan cerca del 42 % de la secuencia. El segundo tipo de estructuras representadas son las hélices α que ocupan un 40,31 % de la secuencia. Por último, las láminas β extendidas tienen un porcentaje de representación del 17,66 %. La comparación de las estructuras secundarias de *R. prolixus* y *T. infestans* reveló una alta similitud entre ambos canales; la representación de estructuras *random coil*, hélice α y lámina β extendida fue del 42,83 %, 38,03 % y 19,14 %, respectivamente, para RpNav.

Estructura secundaria	TiNav		Rhv	
	Nro de aminoácidos	Porcentaje	Nro de aminoácidos	Porcentaje
<i>Alpha helix</i> (Hh)	792	40.31%	769	38.03%
<i>310 helix</i> (Gg)	0	0.00%	0	0.00%
<i>Pi helix</i> (Ii)	0	0.00%	0	0.00%
<i>Beta bridge</i> (Bb)	0	0.00%	0	0.00%
<i>Extended strand</i> (Ee)	347	17.66%	387	19.14%
<i>Beta turn</i> (Tt)	0	0.00%	0	0.00%
<i>Bend region</i> (Ss)	0	0.00%	0	0.00%
<i>Random coil</i> (Cc)	826	42.04%	866	42.83%
<i>Ambiguous states</i>	0	0.00%	0	0.00%
<i>Other states</i>	0	0.00%	0	0.00%

Tabla 1.3: Patrón de estructuras secundarias halladas para los canales de sodio dependientes de voltaje de *T. infestans* y *R. prolixus*.

Figura 1.3: Patrón de estructuras secundarias que posee el canal de sodio dependiente de voltaje de *T. infestans*.

Se realizó un estudio de las hélices transmembrana de TiNav con ayuda del programa TMHMM. Mediante esta predicción, se hallaron 20 hélices transmembrana con una probabilidad posterior de ocurrencia alta, mientras que se encontraron cuatro más con una probabilidad de ocurrencia menor a 0,4. Los detalles de cada una se encuentran en la Tabla 1.4 y en la Figura 1.4.

Teniendo en cuenta que los canales Nav se caracterizan por tener 24 hélices transmembrana distribuidas en cuatro dominios con seis hélices α cada uno [75], se realizó un

estudio más detallado por medio del programa Topcons (<http://topcons.cbr.su.se/>), que trabaja con múltiples bases de datos. El ensayo se realizó comparando las estructuras de los canales Na_V de *T. infestans*, *R. prolixus*, *C. lectularius* y *D. melanogaster*. Los resultados se muestran en la Figura 1.4.

Los cuatro canales Na_V presentan estructuras terciarias similares, que permiten definir bioinformáticamente cuatro dominios de hélices α en cada uno. Sin embargo, resulta de una mayor dificultad predecir la presencia de seis hélices en cada dominio. Diferentes resultados pueden obtenerse según la exigencia de cada programa utilizado para la predicción; una conclusión definitiva en este aspecto resulta imposible sin datos cristalográficos. Sin embargo, la comparación entre los cuatro canales Na_V y la similitud observada entre las diferentes predicciones permiten proponer que tanto el canal de *R. prolixus* como el de *T. infestans* presentan estructuras acordes a lo esperado para este tipo de proteínas.

Figura 1.4: Predicción bioinformática de las hélices transmembrana presentes en la secuencia de TiNa_V obtenida con el programa TMHMM.

TiNa _v			RhNa _v		
Localización	Desde (aa Nro)	Hasta (aa Nro)	Localización	Desde (aa Nro)	Hasta (aa Nro)
Exterior	1	137	Interior	1	149
Hélice TM	138	160	Hélice TM	150	172
Interior	161	172	Exterior	173	213
Hélice TM	173	195	Hélice TM	214	236
Exterior	196	204	Interior	237	242
Hélice TM	205	227	Hélice TM	243	265
Interior	228	233	Exterior	266	274
Hélice TM	234	256	Hélice TM	275	297
Exterior	257	265	Interior	298	407
Hélice TM	266	288	Hélice TM	408	430
Interior	289	396	Exterior	431	790
Hélice TM	397	419	Hélice TM	791	813
Exterior	420	743	Interior	814	833
Hélice TM	744	766	Hélice TM	834	851
Interior	767	786	Exterior	852	865
Hélice TM	787	804	Hélice TM	866	888
Exterior	805	818	Interior	889	918
Hélice TM	819	841	Hélice TM	919	941
Interior	842	868	Exterior	942	995
Hélice TM	869	891	Hélice TM	996	1018
Exterior	892	948	Interior	1019	1272
Hélice TM	949	971	Hélice TM	1273	1291
Interior	972	1216	Exterior	1292	1310
Hélice TM	1217	1235	Hélice TM	1311	1330
Exterior	1236	1254	Interior	1331	1336
Hélice TM	1255	1274	Hélice TM	1337	1359
Interior	1275	1280	Exterior	1360	1401
Hélice TM	1281	1303	Hélice TM	1402	1424
Exterior	1304	1344	Interior	1425	1509
Hélice TM	1345	1367	Hélice TM	1510	1532
Interior	1368	1452	Exterior	1533	1617
Hélice TM	1453	1475	Hélice TM	1618	1640
Exterior	1476	1563	Interior	1641	1652
Hélice TM	1564	1583	Hélice TM	1653	1675
Interior	1584	1595	Exterior	1676	1718
Hélice TM	1596	1618	Hélice TM	1719	1741
Exterior	1619	1661	Interior	1742	1808
Hélice TM	1662	1684	Hélice TM	1809	1831
Interior	1685	1751	Exterior	1832	2022
Hélice TM	1752	1774	---	---	---
Exterior	1775	1965	---	---	---

Tabla 1.4: Posiciones de las 20 hélices transmembrana con alta probabilidad de ocurrencia en el canal de sodio dependiente de voltaje de *T. infestans*.

Figura 1.5: Gráficos obtenidos comparando diferentes bases de datos para los canales de sodio dependiente de voltaje de *R. prolixus*, *T. infestans*, *C. lectularius* y *D. melanogaster*.

Por último, se realizó un estudio de los dominios presentes en Na_V en *T. infestans*, *R. prolixus*, *D. melanogaster* y *C. lectularius* (Figura 1.6, Tabla 1.5). Pudo observarse que todas las secuencias presentan cuatro dominios pfam00520 (PSSMID 306908) específicos de la superfamilia de proteínas transportadoras de iones (cl26838; PSSMID 331659) de los canales sodio K⁺ y Ca⁺². En algunas subfamilias, como la de los canales Na_V, este dominio se repite cuatro veces [75](http://pfam.xfam.org/family/Ion_trans). Estos cuatro dominios de repetición homólogos (I-IV) están caracterizados por tener seis hélices α transmembrana entre las cuales las últimas dos (S5 y S6) están unidas por *loops* que determinan su selectividad iónica.

También se halló en la secuencia de TiNa_V un *hit* no específico con el dominio citoplásmico del canal de iones Na⁺ regulado por voltaje pfam11933 (PSSMID 314757); este dominio citoplasmático se encuentra al principio de aquellas proteínas transportadoras de iones Na⁺ de células eucariotas y está estrechamente vinculado con los dominios pfam06512 y pfam00520 (descrito en el párrafo anterior).

Puede verse en la predicción que todas las secuencias presentan el dominio pfam06512 (PSSMID 310839) específico de la superfamilia de proteínas transportadoras de Na⁺. Los miembros de esta familia contienen una región que se encuentra exclusivamente en los canales de sodio eucariotas o sus subunidades, muchos de los cuales están controlados por voltaje. Los miembros a menudo también contienen entre una y cuatro copias de pfam00520 (descrito en el primer párrafo) y, con menor frecuencia, una copia de pfam00612 (no hallada en este caso).

Por otro lado, todas las secuencias presentan un *hit* específico con un dominio cd13433 (PSSMID 240441), el mismo se corresponde con la compuerta de inactivación de las subunidades α del canal Na_V; esta región forma parte de la unión intracelular entre los dominios III y IV de las subunidades α de los canales Na_V. Es responsable de la inactivación rápida del canal y es esencial para una función fisiológica adecuada [131]. Esta región estructurada del péptido de compuerta se caracteriza por tener un motivo hidrofóbico definido como IFM y, hacia el extremo C-terminal, una serina que actúa en la modulación de la inactivación a través de su fosforilación mediada por una quinasa C [132]. TiNa_V presenta estos cuatro aminoácidos indispensables para la función del canal. Específicamente en *T. infestans*, los aminoácidos del motivo hidrofóbico son MFMT, esta particularidad puede ser observada (a través del alineamiento de secuencias en el programa Batch web CD-search tool del NCBI) en otras especies como *D. melanogaster* o la pulga de agua *Daphnia pulex*; la serina del motivo de fosforilación pudo ser hallada también en el canal de *T. infestans*.

El programa también predice en la secuencia un *hit* inespecífico con un dominio perteneciente a las familias de canales de Ca⁺²; este dominio tiene que estar estrechamente vinculado al dominio pfam08763 que no se encuentra en la secuencia, por lo que se desestimó la predicción.

Figura 1.6: Dominios hallados para las secuencias aminoacídicas de los canales de sodio dependiente de voltaje de *R. prolixus*, *T. infestans*, *C. lectularius* y *D. melanogaster*.

Organismo	Dominios (intervalo de residuos ocupados en la secuencia)			
	Ion_Trans	Na_Trans_Citop	Na_Trans_Assoc	Na_Channel_Gate
<i>R. prolixus</i>	152-437	489-667	1033-1267	1533-1585
	796-1007			
	1271-1543			
	1593-1843			
<i>T. infestans</i>	143-426	532-618	986-1211	1476-1528
	749-960			
	1215-1486			
	1536-1786			
<i>c. lectularius</i>	151-436	518-651	1039-1274	1539-1591
	802-1013			
	1278-1549			
	1599-1849			
<i>D. melanogaster</i>	141-425	504-651	1022-1276	1541-1593
	785-996			
	1280-1551			
	1601-1851			

Tabla 1.5: Dominios hallados para las secuencias aminoacídicas de los canales de sodio dependiente de voltaje de *R. prolixus*, *T. infestans*, *C. lectularius* y *D. melanogaster*.

1.4.2. Evaluación de la sensibilidad de los métodos moleculares de detección de mutaciones asociadas a resistencia

Se estudió el límite inferior de detección del ensayo PASA, a partir de muestras de ADN plasmídico con distintas proporciones conocidas de cada mutación (detalle en ??). En las condiciones utilizadas, se encontró que la banda de 130 pb correspondiente a la mutación de resistencia, puede ser detectada hasta la proporción F1014:L1014 de 0.5:9.5; por lo que el límite inferior de detección en estas condiciones es de un 5 % (Figura 1.7).

Figura 1.7: Determinación de la sensibilidad para el ensayo PASA. MW indica la posición del marcador de peso molecular. Los números en el borde superior de la figura indican la proporción de la mutación de resistencia en cada muestra (F1014:L1014). La banda de 572 pb se corresponde con el amplicón control. El fragmento de 476 pb se obtiene en presencia del alelo sensible. La banda de 130 pb es el resultante de la amplificación de la mutación de resistencia.

1.4.3. Estudio de las mutaciones *kdr* en la región IIS4-IIS6 del gen del canal *TiNa_v* en poblaciones de *T. infestans* resistentes a piretroides del Gran Chaco

Se evaluó la presencia de la mutación L1014F en nueve poblaciones de *T. infestans* de la región del Gran Chaco (Figura 1.8) a través de la utilización del ensayo molecular PASA seguido de secuenciación, a fin de confirmar los resultados y validar la aplicabilidad del ensayo para distintas poblaciones. En teoría, podrían existir cuatro combinaciones posibles de mutaciones *kdr*: L925 + L1014 (tipo salvaje), L925 + F1014, I925 + L1014 e I925 + F1014.

Los resultados revelaron la existencia de mutaciones *kdr* L925 + F1014 en todas las poblaciones de alta resistencia de la frontera Tarija-Salta.

Las poblaciones de las zonas que bordean la región Argentina del Gran Chaco, que presentan la mutación de resistencia L925I, dieron resultados negativos en el ensayo molecular PASA seguido de secuenciación, por lo que las poblaciones de esta zona del Gran Chaco presentan el alelo I925 + L1014.

Las poblaciones de Pampa Grande y La Gerónima que poseen el polimorfismo L925 y están clasificadas como de resistencia incipiente, presentaron también el alelo L1014 de

tipo salvaje "sensible"(Figura 1.9).

Figura 1.8: Mapa del norte de Argentina y el sur de Bolivia que muestra la ubicación de los pueblos donde se colectaron los *T. infestans* A: Frontera Boliviano–Argentina LE: La Esperanza; LG: La Gerónima; EM: El Malá; EJ: El Juramento; PG: Pampa Grande. B: provincia de Chaco (Argentina). M: Madrejones; VC: Villa El Carmen; TN: Tierras Nuevas; Y: Yacuiba. Barra de escala: 100 km. (Detalle de coordenadas en materiales y métodos).

Figura 1.9: Ensayo PASA para cada población analizada. La banda de 572 pb se corresponde con el amplicón control. El fragmento de 476 pb se obtiene en presencia del polimorfismo no asociado a resistencia. La banda de 130 pb es el resultante de la amplificación de la mutación de resistencia. M: indica la posición del marcador de peso molecular. CS: Control Sensible; LG: La Gerónima; PG: Pampa Grande; TN: Tierras Nuevas; VC: Villa El Carmen; Y: Yacuiba; LE: La Esperanza; J: Juramento; EM: El Malá.

1.4.4. Evaluación de la frecuencia de la mutación L1014F en poblaciones de *T. infestans* del Gran Chaco

El ensayo PASA fue aplicado para hacer una estimación de la frecuencia de la mutación *kdr* L1014F en las distintas poblaciones, y evaluar la correlación entre dicha frecuencia y la tasa de resistencia en cada caso. Se encontró que la mutación *kdr* L1014F está presente en todos los individuos analizados procedentes de Madrejones y Villa del Carmen, mientras que para Tierras Nuevas se encontró una baja frecuencia del el homocigota L1014F y una alta proporción de individuos heterocigotas para la mutación asociada a resistencia (Tabla 1.6).

Tabla de relación de resistencia a Deltametrina (RR) y mutaciones kdr en poblaciones de <i>Triatoma infestans</i> de la región del Gran Chaco												
Población	Provincia/ Departamento	País	Año de la colección	Generación de laboratorio	Deltametrina RR	Fenitrothion RR	Frecuencias de las mutaciones <i>kdr</i>					
							SS	SR1	SR2	R1R1	R1R2	R2R2
Madrejones	Salta	Argentina	2008	F3	35.7 (27.03-47.62)a	ND	0	0	0	0	0	1
Tierras Nuevas	Tarija	Bolivia	2006	F12	541.6 (260.2-1127.3)b	0.42 (0.23- 0.76)	0.27	0	0.64	0	0	0.18
Villa del Carmen	Tarija	Bolivia	2006	F10	438.0 (147.5-1300.6)b	0.95 (0.75- 1.21)	0	0	0	0	0	1
Yacuiba	Tarija	Bolivia	2005	F11	154.4(121.2-169.0)c	0.79 (0.62- 1.02)c	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pampa Grande	Chaco	Argentina	2012	F2	2.08 (1.27- 3.39)	145 (095- 2.21)	1	0	0	0	0	0
La Esperanza	Chaco	Argentina	2011	F2	233.42 (116.8-466.6)d	1.00 (0.75- 1.33)d	0	0	0	1	0	0
La Geronima	Chaco	Argentina	2012	F2	5.51 (3.57- 8.52)	12 (0.87- 1.54)	1	0	0	0	0	0
El Juramento	Chaco	Argentina	2013	F2	>2000	0.84 (0.58- 1.20)	0.07	0	0	0.93	0	0
El Mala	Chaco	Argentina	2011	F3	1031 (909.1- 1213.3)e	2.75 (2.47- 3.12) f	0.18	0.18	0	0.73	0	0
a) Fabro et al.2012; b) Germano et al.2010; c) Santo Orihuela et al.2008; d) Germano et al.2014; e) Carvajal et al.2012.;												
R1= 192S; R2= L1014F; S= Sensible.												
ND= No hay información. En el caso de yacuiba esta población se encontraba prácticamente extinta y no fue posible evaluar su frecuencia para las mutaciones de resistencia kdr.												

Tabla 1.6: Frecuencias para los alelos *kdr* de nueve poblaciones de *T. infestans* del Gran Chaco (ver Figura 1.9).

1.5. Discusión

A partir de la secuencia del canal *RpNa_V* reconstruido previamente en nuestro laboratorio (datos no publicados) fue posible encontrar la secuencia del transcripto *TiNa_V*. Se realizaron múltiples análisis bioinformáticos con el fin de caracterizar la secuencia en profundidad.

El tamaño del transcripto identificado es de 222,394 KDa, lo cual coincide con el tamaño aproximado esperado para este gen, de acuerdo a información en otras especies [75]. En cuanto al análisis de dominios, reveló que la proteína presenta todos los dominios proteicos esperados para un canal iónico de Na^+ dependiente de voltaje, excepto que parece tener incompleto el dominio citoplásmico. El *TiNa_V* presenta homología con este dominio conservado solo desde el residuo número 71; un hecho similar pudo ser observado en la secuencia del canal de *C. lectularius* que presenta incompleta la última parte de este dominio. Esta característica no fue observada en *RpNa_V* ni en *DromeNa_V*. Es importante comentar que la secuencia analizada fue obtenida a partir de una base de datos transcriptómica de glándulas salivales. Puesto que se ha reportado que el gen *Na_V* en insectos es sometido a procesos de *splicing* alternativo [75, 81, 82], no podemos descartar que existan isoformas del gen con características diferentes a las aquí analizadas. Estudios más amplios deberían realizarse para saber con precisión si esta predicción bioinformática revela alguna característica diferencial en la actividad de las proteínas.

Los cuatro dominios de transporte de iones pudieron ser identificados mediante herramientas bioinformáticas. En cuanto a las seis hélices α transmembrana que componen cada uno de estos dominios, se obtuvieron diferentes resultados en las bases de datos utilizadas; 20 de las 24 hélices fueron encontradas con facilidad por cada programa, mientras que algunas hélices posiblemente menos estructuradas, podrían corresponderse con las cuatro faltantes. En este sentido, el programa TMHMM parece mostrar la mejor coincidencia con los datos de dominios hallados en el NCBI.

Una vez realizada la identificación completa de la secuencia del transcripto *TiNa_V* y

su análisis bioinformático estructural, se trabajó en la validación de un ensayo molecular para la detección de mutaciones asociadas a la resistencia a insecticidas piretroides en diferentes poblaciones de *T. infestans*, así como en la determinación de su sensibilidad. Este trabajo es una contribución para abordar el problema de resistencia, ya que resulta importante la implementación de estrategias de monitoreo y manejo de resistencia en las campañas de control de vectores de Chagas. En virtud de ello, el monitoreo eficiente de mutaciones de resistencia en poblaciones de *T. infestans* debe implicar el procesamiento de cientos de insectos por región. Por lo tanto, el uso de un grupo de insectos en un solo ensayo aumentaría la procesividad y reduciría costos. Los métodos presentados requieren equipamiento básico y conocimientos técnicos simples. Están propuestos para el monitoreo de mutaciones *kdr* L1014F en *T. infestans*. En el futuro podría resultar interesante el desarrollo de métodos aún más procesivos, basados en qRT-PCR (sondas *Taqman* o análisis de *High Resolution Melting* [107, 133, 134]. El desarrollo de nuevos métodos implicará una etapa de comparación con los ya existentes, a fin de proponer el más conveniente para cada situación. En ese sentido, una ventaja inicial del PASA es que requiere equipamiento y conocimientos técnicos básicos de biología molecular, sin necesidad de inversiones en equipos y *softwares* costosos como los de PCR cuantitativa. Nuestros resultados indican que el PASA puede utilizarse para una amplia gama de poblaciones de campo, y que permite el análisis simultáneo conjunto de 10 individuos, lo que reduce los esfuerzos de muestreo.

Por último, se realizó una evaluación de la presencia de la mutación L1014 en diferentes poblaciones del Gran Chaco. Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo, sumados a la información previa obtenida en nuestro laboratorio, muestran que las mutaciones que confieren una alta resistencia a los piretroides están muy extendidas en el Gran Chaco boliviano y argentino, lo que sugiere que la resistencia a los insecticidas conferida por mutaciones en el sitio de acción podría ser una razón importante para los fracasos en la eliminación de *T. infestans* en esta ecorregión. En este sentido, Santo-Orihuela et al. [57] demostraron un aumento en la actividad de esterasas en poblaciones de Salta y la Rioja resistentes pero no así en la población boliviana de Yacuiba (RR = 154,4)[56]. En base a esos resultados, los autores propusieron una evolución independiente de la resistencia en ambas áreas. En el presente trabajo de Tesis, hemos demostrado la presencia del polimorfismo *kdr* F1014, lo que indica que esta puede ser una causa principal de resistencia a piretroides en la población de Yacuiba.

Hemos detectado que los focos de resistencia en la frontera boliviano-argentina se caracterizan por la presencia del polimorfismo *kdr* L1014F, asociado a resistencia a piretroides en numerosas especies [130]. Resultados obtenidos en nuestro grupo de forma paralela a la realización de esta Tesis indicaron la presencia de la mutación *kdr* L925I en poblaciones resistentes de *T. infestans* provenientes de la provincia argentina de Chaco [91, 101]. En conjunto, nuestros hallazgos sugieren que existen dos zonas diferenciadas dentro del Gran Chaco, cada una con un tipo distinto de mutación *kdr*: L1014F en el norte de la provincia de Salta y Sur de Bolivia, y L925I en la provincia de Chaco.

Las mutaciones *kdr* fueron detectados en todas las poblaciones de *T. infestans* de alta resistencia a piretroides analizadas en el presente trabajo. Sin embargo, la población más resistente del foco fronterizo boliviano-argentino analizado aquí es Tierras Nuevas (RR: 541,6) [111], donde la mutación L1014F está presente a menor frecuencia que en Madrejones, con tasas más bajas de resistencia reportadas (RR: 35,7) [100](Tabla 1.1). Los diferentes niveles de resistencia observados en las poblaciones portadoras de la misma

mutación a frecuencias similares, como en el caso de Madrejones y Villa del Carmen (RR: 438,0) Germano et al. [111] sugieren que existen mecanismos que contribuyen al fenómeno de resistencia. Así, la resistencia poblacional depende tanto de la frecuencia de los genotipos resistentes, como de la intensidad del fenotipo resistente [4].

En *T. infestans* se han informado mecanismos de resistencia relacionados con la penetración cuticular reducida y el aumento del metabolismo [34, 49, 56, 57, 67, 68, 118–120], los cuales combinados con las mutaciones en el sitio de acción de los piretroides podrían aumentar la intensidad de la resistencia medida poblacionalmente.

Se ha reportado que los insectos resistentes a los piretroides tienen cantidades significativamente mayores de hidrocarburos en la superficie y una cutícula más gruesa que los insectos sensibles [34]. Además, Calderón-Fernández et al. [119] publicaron el primer análisis transcriptómico de un tegumento de triatmino, el cual reveló la expresión de varios genes relacionados a detoxificación (CYP, CCE y GSTs). El estudio de la expresión de representantes de las diferentes familias génicas por qPCR en este tejido demostró la expresión significativamente aumentada de algunos de ellos en una población resistente de *T. infestans*, lo que sugiere la participación del tegumento en la resistencia a los insecticidas, no solo como una barrera física, sino que contribuiría a la resistencia metabólica en la superficie [119]. Por otro lado, como describiremos en el segundo capítulo, nuestro grupo reportó una expresión significativamente superior de un citocromo P450 del clado 4 en la población resistente de *T. infestans* de El juramento (L925I), comparada con la población sensible [55]. Esta población posee la mutación de resistencia L925I en una muy alta frecuencia poblacional [91]. Otro trabajo reciente en el mismo sentido fue publicado por Grosso et al. [120], los autores reportaron la sobreexpresión de enzimas metabólicas en la cepa de *T. infestans* de la localidad de La Esperanza, que también posee una alta frecuencia del alelo L925I, provincia de Chaco [120]. Los resultados de nuestro grupo de trabajo y de otros autores, sugieren la coexistencia de múltiples mecanismos de resistencia en *T. infestans*.

Si bien se ha publicado la resistencia a piretroides en *T. infestans* aún en ausencia de mutaciones *kdr* Santo-Orihuela et al. [118] (ligada únicamente al aumento de la detoxificación a través de vías metabólicas), estas poblaciones presentan un grado de resistencia inferior a aquellas en las que se han encontrado mutaciones de resistencia en el sitio de acción [91, 100, 101].

Todo lo anterior sugiere que la causa principal de la alta resistencia a los piretroides en *T. infestans* es la presencia de mutaciones de tipo *kdr*. Además, los resultados apuntan a que las frecuencias de *kdr* en las poblaciones de campo resistentes son muy altas. Por último, la coexistencia de múltiples mecanismos de resistencia contribuye a las altísimas tasas de resistencia observadas.

Los altos niveles de resistencia a piretroides en las regiones en estudio hacen que estos compuestos no sean efectivos [113]. La detección de mutaciones asociadas a la resistencia a piretroides es una herramienta útil para el monitoreo, ya que la detección de genotipos resistentes cuando aún se hallan en baja frecuencia podría anticiparse a fallas de control. Se ha sugerido que en estos casos los piretroides pueden ser reemplazados por compuestos organofosforados [113, 135]. La alternancia racional permitiría alargar la vida útil de los insecticidas. Por otro lado, estrategias de control del tipo biológico que han sido testeadas en *T. infestans* exitosamente podrían ser de utilidad para el control de vectores ante la aparición de eventos de resistencia [34]. Sin embargo, cualquier iniciativa de control de

vectores, que pretenda ser sostenible en el tiempo, requerirá que se consideren estrategias de control integradas, que incluyan mejoras en la vivienda, vigilancia comunitaria y medidas de gestión ambiental [1].

Capítulo 2

Evaluación de la contribución de enzimas detoxificativas a la resistencia a piretroides en triatominos

2.1. Hipótesis

- Existen causas metabólicas, además de las mutaciones en el canal de sodio, que contribuyen con la la resistencia a insecticidas en triatominos.

2.2. Objetivos específicos

- Estudiar la contribución de diferentes enzimas detoxificativas en la resistencia a piretroides en triatominos.

2.3. Introducción

Si bien se ha visto que las poblaciones de *T. infestans* resistentes a piretroides del Gran Chaco presentan mutaciones del tipo *kdr*, hemos encontrado niveles de resistencia muy diferentes en distintas poblaciones portadoras de una misma mutación en frecuencias similares [91]. Esto sugiere que, además de las mutaciones *kdr*, existen mecanismos contributivos a la resistencia a piretroides en esta especie. En este aspecto, se han reportado previamente mecanismos de resistencia relacionados con la penetración cuticular reducida y el aumento del metabolismo [33, 34, 49, 56, 57, 67–69, 118–120]. Se han documentado tres superfamilias de enzimas implicadas en la detoxificación de xenobióticos y en la resistencia metabólica a insecticidas: Citocromos p450 (CYPs), Carboxil-colinesterasas (CCE) y Glutación transferasas (GSTs) [28].

Las reacciones de detoxificación se producen a través de la fase I (CYPs y CCE) y la fase II (GSTs). En la primera se producen reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis que disminuyen la toxicidad del compuesto y, en la fase II, las GSTs catalizan reacciones de hidrólisis que aumentan la solubilidad de la molécula, ayudando a su rápida excreción [28]. De esta forma, la detoxificación enzimática, actúa disminuyendo la concentración de insecticida que puede interactuar con los sitios de acción. En *T. infestans* la investigación en este campo ha orbitado principalmente en torno a la enzimas p450 y la CCEs, ya

que son los principales mecanismos metabólicos responsables de la resistencia en distintas especies de insectos [4].

Se ha observado que las enzimas p450 son centrales en el metabolismo de los insecticidas y la resistencia [136]. Debido a su diversidad genética, su amplia especificidad de sustrato y versatilidad catalítica, constituyen el único sistema metabólico que puede mediar la resistencia a todas las clases de insecticidas [31]. En triatominos, la resistencia a deltametrina ha sido asociada a las CYPs a través del inhibidor de su actividad piperonil butóxido en poblaciones resistentes, en las cuales dicho tratamiento aumentaba la susceptibilidad a piretroides [67, 68]. Por otro lado, se ha reportado una actividad mayor de CYPs en *T. infestans* resistentes, medida como actividad etoxicumarina-detilasa (ECOD) [68]. Trabajos recientes han demostrado también un aumento en la expresión de determinados genes CYP en poblaciones de *T. infestans* resistentes a estos insecticidas [55, 119, 120]. Por lo anterior, se ha sugerido que la familia CYP está involucrada en la resistencia a piretroides en triatominos.

Las esterasas, por su parte, se encuentran generalmente implicadas en mecanismos de resistencia a organofosforados, carbamatos y piretroides, a través de la sobre-amplificación de genes, la regulación génica positiva o la presencia de mutaciones en las proteínas que aumentan su actividad detoxificativa [31]. En *T. infestans* el aumento en el porcentaje de individuos con mayor actividad piretroide-esterasas fue reportado en poblaciones de Argentina (Salta y la Rioja) y de Bolivia (Yacuiba) [56]. Por otro lado, se encontró un aumento de la actividad de piretroide-esterasas a lo largo del desarrollo embrionario de una población argentina (Campo Largo) y otra boliviana (Entre Ríos), ambas resistentes a deltametrina [137, 138]. En cuanto a la función de GST en triatominos, análisis genómicos y transcriptómicos sugieren que estas especies poseen una única GST perteneciente a la clase delta [55, 73, 119], que es la que ha sido involucrada con la resistencia a insecticidas en otras especies [74, 139, 140]. Sin embargo su participación en la detoxificación de insecticidas piretroides en *T. infestans* no ha sido estudiada [4].

Las GSTs han sido estudiadas en insectos debido a su participación en la detoxificación de insecticidas organofosforados, organoclorados y ciclodienos principalmente [140]. Mediante modelado molecular se ha estudiado la interacción de GSTs con DDT, con la idea de focalizar las investigaciones en aquellas que tengan fuertes interacciones con el insecticida [72]. Si bien no ha sido demostrado que estén involucradas en el metabolismo directo de piretroides [141], la sobreexpresión de GST delta ha sido documentada en insectos resistentes de la especie *Nilaparvata lugens* [139]. La expresión in vitro de esta GST del clado delta permitió observar que la proteína recombinante tenía una alta actividad peroxidasa, por lo que se propuso que podría estar involucrada en la prevención o reparación del daño producido por los productos de peroxidación lipídica inducida por piretroides [74]. Por otro lado, experimentos realizados en *Tenebrio molitor* han permitido proponer que estas proteínas actúan secuestrando el piretroide y evitando que el mismo interactúe con el sitio blanco. [140]. Los trabajos mencionados estudiaron la acción de las GSTs y su actividad en insectos resistentes a través de inhibidores o compuestos químicos, que no logran ser selectivos para una GST específica o, mediante técnicas de bioquímica y biofísica de proteínas, que pierden de vista al insecto en su conjunto [74, 139, 140]. Una metodología alternativa para estudiar la posible implicancia de estas proteínas en la detoxificación de piretroides es el silenciamiento génico a través de ARN de interferencia (ARNi).

El ARNi es una vía de silenciamiento génico post-transcripcional desencadenada por

fragmentos de ARN doble cadena (ARNdc) [128, 142]. Esta técnica ha demostrado ser un poderoso instrumento para la elucidación de la función de genes, y tiene un alto valor potencial para el desarrollo de nuevas herramientas para el manejo de insectos perjudiciales [143].

En los organismos eucarióticos la entrada en la célula de un ARNdc induce la degradación rápida y sostenida de los ARNm que contienen secuencias complementarias al mismo [144]. En el corazón de este proceso se encuentran dos ribonucleasas: la Ribonucleasa III Dicer (Dcr) que, tras la entrada del ARNdc en las células, lo escinde en pequeños fragmentos de ARNdc de aproximadamente 20-25 pb, y posteriormente, RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN) que desenrolla los pequeños ARNdc generados por Dicer y usa la cadena antisentido como guía para encontrar secuencias de ARNm complementarias en la célula. Estos ARNm son escindidos por la RNaseH Argonauta (Ago), que es el componente catalítico de RISC [142] (Figura 2.1).

Figura 2.1: Detalle del mecanismo de ARNi. Adaptado de [145]

Las Dicer generan dos tipos de ARNdc pequeños: los miARN (micro ARN) y los siARNs (*short-interfering ARNs*). En *D. melanogaster*, Dicer-2 produce siARNs, mientras que Dicer-1 reconoce precursores de miARNs. Los siARNs se originan como mecanismo de defensa ante el ingreso de moléculas exógenas de ARNdc derivadas de virus, elementos móviles repetitivos convergentes, repeticiones endógenas invertidas o transcripciones de autoanulación [128, 146]. Por el contrario, los miARNs son transcritos por el propio genoma del organismo y regulan la expresión génica endógena. Los miARNs en animales son complementarios con su secuencia diana solo en extensiones de hasta siete nucleótidos (región semilla), estas pequeñas regiones complementarias se encuentran interrumpidas por *gaps* y *mismatches* por lo cual los miARNs pueden unirse a muchos mARNs diferentes y regular sus niveles de transcripción [147, 148].

De esta forma, el silenciamiento génico dirigido por siARN genera la degradación del ARNm, por lo que parece ser un mecanismo de defensa antiviral, mientras que el

silenciamiento por miARN inhibe la traducción por apareamiento con los sitios diana [128, 149]. A pesar de sus diferencias, estos mecanismos estarían interconectados, compitiendo y colaborando entre sí [150].

En muchos invertebrados, el silenciamiento por ARNi puede obtenerse mediante la inyección de ARNdc "desnudo" en el sistema circulatorio [128] y la interferencia se consigue en todos los tejidos (SysARNi). La eficiencia del SysARNi se ha observado en más de 30 especies de insectos [128], aunque la sensibilidad de la técnica puede variar dependiendo de la especie, el tejido y el gen. Las razones para la variabilidad de la eficiencia por especie pueden ser, por ejemplo, la ocurrencia de mecanismos de degradación capaces de eliminar el ARN extraño, una amplificación y propagación de la señal de ARN deficiente o una baja respuesta de los genes de ARNi luego de la inyección. La variación de la eficiencia dependiente del tejido puede deberse a una baja permeabilidad del ARNdc o a una baja expresión de la maquinaria de ARNi en el tejido. Por último, aquellos genes con un mecanismo de retroalimentación eficiente podrían contrarrestar el silenciamiento con mayores tasas de transcripción; si el ARNm del gen objetivo tiene una vida media breve, la eficiencia también será baja, de la misma forma que si está protegido contra RNAsas [151]. Como herramienta de investigación para estudios genéticos, ARNi tiene una alta potencialidad, así como también para el control de plagas a través del desarrollo de insecticidas específicos [128]. Sin embargo, como se ha descrito, es necesario resolver algunas problemáticas en el camino a la optimización de la técnica.

En el presente capítulo estudiamos la posible implicación de enzimas detoxificativas en la resistencia a insecticidas. Entre todas las enzimas detoxificativas, se seleccionaron algunas pertenecientes a clados previamente involucrados en la detoxificación en insectos. Se abordaron dos aproximaciones experimentales:

En la primera se utilizó la población sensible CIPEIN y una población resistente de la localidad de El Juramento, que como se ha dicho en la primera parte de este trabajo, presenta la mutación *kdr* L925I y tiene una tasa de resistencia, muy superior a la de otras poblaciones evaluadas ($RR > 2000$). Ambas poblaciones son sensibles a Fenitrothion.

En el segundo experimento, se evaluaron los niveles de expresión de genes en una población sensible de *T. infestans* (CIPEIN) frente a la topicación con acetona o con deltametrina.

Por último, se realizó un estudio más profundo de las GSTs delta de triatominos, utilizando como modelo *R. prolixus*. Para esto, se hizo un estudio bioinformático de la estructura y los dominios de la GST de la clase delta detectada en el genoma de *R. prolixus* [55]. Por último, teniendo en cuenta que solo se ha detectado un miembro de esta familia en este insecto [55, 73, 119] se silenció la expresión del gen mediante la técnica de ARNi. Esto resultó de suma importancia ya que es posible conjeturar que al no haber otros miembros de la misma clase, el efecto del silenciamiento génico no sería enmascarado por la actividad de otras enzimas con un papel similar. En función de optimizar la técnica de ARNi, se evaluó la capacidad de silenciamiento de diferentes concentraciones de ARNdc y sus efectos en la toxicidad provocada por deltametrina.

2.4. Resultados

2.4.1. Estudio de la implicancia de una CCE del clado E en la resistencia a insecticidas piretroides en *T. infestans*.

Se compararon los niveles de expresión de una enzima CCE perteneciente al clado E (TIIN_CCE_16; la secuencia y análisis filogenético se presenta en [55]) por qRT-PCR. No se observaron diferencias significativas en la expresión de esta enzima entre los insectos provenientes de la cepa sensible y la población resistente (Figura 2.2) ($p=0,1503$; $n=4$). La exposición a deltametrina de insectos sensibles (0,6 ng/mg-insecto, DL50 de esta población [112]) no modificó significativamente los niveles de expresión del gen a las cinco horas post-topicación ($p=0,343$; $n=4$) (Figura 2.3).

Figura 2.2: Análisis de la expresión génica de la CCE del clado E de *T. infestans* pertenecientes a una población sensible (S) y otra resistente (R) a piretroides ($p=0,1503$; $n=4$).

Figura 2.3: Análisis de la expresión génica de la CCE del clado E de *T. infestans* pertenecientes a una población de referencia (R), cinco horas después de una topicación con 1 μ L de acetona (A) o con deltametrina diluida en acetona hasta su DL 50 (0,6 ng/mg-insecto (D) ($p=0,343$; $n=4$).

2.4.2. Estudio de la implicación de una P450 del clan 4 en la resistencia a insecticidas piretroides en *T. infestans*.

Se compararon los niveles de expresión de una enzima CYP perteneciente al clan 4 (TIIN_CYP4_22; la secuencia y análisis filogenético se presenta en [55]) mediante qRT-PCR. La comparación entre insectos provenientes de las poblaciones sensible y resistente demostró una expresión significativamente mayor en estos últimos (Figura 2.4) ($p<0,05$ (**0.0030); $n=4$). La exposición de insectos sensibles a deltametrina en su DL50, medida a las cinco horas, no modificó los niveles de expresión del gen ($p=0,512$; $n=4$) (Figura 2.5).

Figura 2.4: Análisis de la expresión génica de una CYP del clan 4 de *T. infestans* entre una población sensible (S) y otra resistente (R) a piretroides ($p<0,05$; $n=4$).

Figura 2.5: Análisis de la expresión génica de una CYP del clan 4 de *T. infestans* pertenecientes a una población sensible (S) a piretroides, cinco horas después de un a topicación con 1 μ L de acetona (A) ó con deltametrina diluida en acetona hasta su DL 50 (0,6 ng/mg-insecto (D) ($p=0,512$; $n=4$).

2.4.3. Estudio de la implicancia de GST delta en la resistencia a insecticidas piretroides en *T. infestans*.

Se compararon los niveles de expresión de la GST delta identificada en *T. infestans* (TIIN_GST_10; la secuencia y análisis filogenético se presenta en [55]) mediante qRT-PCR. Los resultados no revelaron diferencias significativas en la expresión de esta enzima entre los insectos sensibles y los resistentes (Figura 2.6) ($p=0,249$; $n=4$). El tratamiento de la población sensible con deltametrina (0,6 ng/mg-insecto, DL50 de esta población [112]) no modificó significativamente la expresión del gen a las cinco horas post-topicación ($p=0,890$; $n=4$) (Figura 2.7)

Figura 2.6: Análisis de la expresión génica de la GST Delta de *T. infestans* pertenecientes a una población sensible (S) y otra resistente (R) a piretroides ($p=0,249$; $n=4$).

Figura 2.7: Análisis de la expresión génica de la GST de la clase delta en *T. infestans* pertenecientes a una población sensible (S) a piretroides, cinco horas después de una topicación con 1 μ L de acetona (A) o con deltametrina diluida en acetona hasta su DL 50 (0,6 ng/mg-insecto (D) ($p=0,890$; $n=4$).

2.4.4. Caracterización bioinformática de la GST delta de *R. prolixus*.

Al igual que el resto de los triatominos analizados hasta el momento a nivel transcrip-tómico (*T. infestans*, *T. dimidiata* y *T. pallidipennis*), el genoma de *R. prolixus* parece codificar una única GST del clado delta, involucrado en resistencia a insecticidas [55, 119]. Para la caracterización bioinformática y estudios moleculares hemos trabajado con *R. prolixus*, porque la información genómica disponible [152] es un recurso importante en este tipo de estudios. El genoma de *T. infestans* no ha sido publicado hasta la fecha. Además, *R. prolixus* es un modelo en estudios de fisiología de insectos desde principios del siglo XX, su cría en laboratorio es relativamente sencilla (la primer colonia fue establecida en 1930) [153, 154], el ciclo de vida es más corto y la tasa reproductiva mayor que en *T. infestans*, por lo tanto resulta un buen modelo para realizar este trabajo.

La secuencia completa de ADNc de la proteína fue obtenida mediante una búsqueda por homología con dominios PFAM de GSTs [55] en la base de datos de Vectorbase (<http://www.vectorbase.org>). La secuencia identificada fue utilizada como *query* en una búsqueda BLASTn en un transcriptoma de antena de *R. prolixus* [155]. Por comparaciones entre la secuencia disponible en vectorbase, el transcriptoma de antenas y proteínas ortólogas de otras especies de insectos (Figura 2.8) se pudo determinar que la reconstrucción de vectorbase era incompleta, y por lo tanto fue utilizada la proteína presente en el transcriptoma de antena para los estudios detallados a continuación.

C-terminal [141]. Los dominios GST N y C terminal correspondientes a las familia de GST delta y epsilon (cd03045) pudieron ser identificados en RpGSTDelta.

Además, se encontró un hit específico con la superfamilia de proteínas disulfuro oxido reductasas y aquellas con plegamiento del tipo tiorredoxinas (cl00388). Algunas tiorredoxinas (TRX) funcionan como proteínas disulfuro oxidoreductasas (PDO), alterando el estado redox de las proteínas diana a través de la oxidación reversible de su sitio activo ditiol. Los miembros de la superfamilia que no funcionan como PDO pero que contienen un dominio TRX incluyen las fosfocinas, peroxirredoxinas, glutatión (GSH) peroxidasas, GSH transferasas (GST, dominio N-terminal), reductasas de arsénico, entre otras.

Se encontró el sitio G en el dominio conservado GST_N_Delta_Epsilon (Figura 2.10). Donde se hallaron los 6 residuos esperados (S-HTI-ES). Este dominio completo se extiende desde el primer residuo de la proteína hasta el 74.

El bolsillo de unión al sustrato (sitio H) se encuentra en el dominio conservado GST_C_Delta_Epsilon (Figura 2.10). Un total de 10 residuos son indispensables para la función de este dominio y todos ellos fueron hallados en la secuencia de la GST delta de *R. prolixus*, este dominio abarca desde el residuo 20 al residuo 88 de la proteína. También fue identificada la interfaz para la formación del dímero con los seis residuos esperados (K-R-Q-YT-F), esta abarca los residuos 88 a 206.

El sitio activo de GST fue hallado en la secuencia. Se encuentra compuesto por un sitio de unión de glutatión reducido específico (sitio G), común a todas las GST, y un sitio de unión de sustrato no específico (sitio H), que varía entre diferentes clases e isotipos. Los residuos del dominio TRX-loop N-terminal forman el sitio G mientras que el sitio H está compuesto principalmente por restos del dominio alfa helicoidal C-terminal. El sitio H es inespecífico y degenerado. Múltiples subsitios hidrofóbicos solapados existen dentro de una única isoforma GST para comprender el sitio de unión a sustrato, además, un único sustrato puede ocupar múltiples posiciones y orientaciones dentro de un único sitio H.

Por último fue identificada la interfaz del dominio N-terminal en el dominio conservado “GST_C_Delta_Epsilon” (Figura 2.10). La proteína de *R. prolixus* comprende en su secuencia los 10 residuos característicos de este dominio.

En la Figura 2.10 se muestran gráficamente los detalles de los dominios hallados.

Figura 2.10: Dominios hallados para GST con el programa online del NCBI de *CD-search* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

Para finalizar el análisis bioinformático se realizó un alineamiento estructural utilizando el programa T-COFFEE (<http://tcoffee.crg.cat>) entre las secuencias aminoácidas de GST delta de *R. prolixus*, *D. melanogaster*, *An. gambiae* y *Anopheles dirus*. El alineamiento estructural fue analizado mediante el programa ESPiPT (<http://espipt.ibcp.fr>), que otorga información acerca de la similitud secuencial y estructura secundaria de las secuencias alineadas. Se utilizaron las estructuras del PDB (*Protein*

Data Bank) de *An. gambiae* (1PN9) y *An. dirus* (3G7I) como información estructural. Éstas últimas fueron elegidas por su homología con la GST de *R. prolixus*. (Figura 2.11).

Figura 2.11: Análisis de similitud secuencial y estructura secundaria de las GST delta de *R. prolixus*, *D. melanogaster*, *A. gambiae* y *A. dirus*. Las estructuras de las GST de *A. gambiae* y *A. dirus* fueron utilizadas como moldes para el alineamiento.

2.4.5. Evaluación de la función de la enzima GSTs delta en la detoxificación de piretroides en *R. prolixus*.

A fin de estudiar la implicancia de GST delta en la detoxificación de deltametrina, utilizamos una aproximación de silenciamiento del gen por ARNi. Se inyectaron ninfas del 5^{to} estadio de *R. prolixus* de siete días post muda, sin alimentar desde el estadio anterior. Se utilizó un fragmento de ARNdc específico del gen de GST delta de *R. prolixus* para el grupo tratado, el cual fue inyectado en tres concentraciones distintas (0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ó 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y un fragmento de secuencia inespecífica en una concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, ausente en el genoma de *R. prolixus* (grupo control: gen de β -lactamasa amplificado a partir del plásmido pGemT). Ocho días después de la inyección, los insectos de ambos grupos fueron topicados con 1,0 μL de acetona (control acetona) ó deltametrina (0,0083 mg/mL en acetona; la DL50 determinada por Mougabure-Cueto et. al., (2017) para estas condiciones, (comunicación personal). La caída del transcripto fue medida por qPCR nueve días después de las inyecciones. Se observó, que la caída del transcripto fue significativa para todas las concentraciones de ARNdc ensayadas ($p(0,1 \mu\text{g})=0,001$; $n=5$; $p(0,5 \mu\text{g})=0,005$; $n=4$; $p(1,0 \mu\text{g})=0,0170$; $n=7$) (Figura 2.12).

Los insectos inyectados con GSTdc comenzaron a morir cuatro horas después de ser topicados con deltametrina, mientras que aquellos a los que se les había inyectado ARNdc inespecífico lo hicieron más tarde (siete hs después de ser expuestos al piretroide) (ver Tabla 2.1, Figura 2.13).

Se observa que la ausencia de la enzima GST genera un aumento en la mortalidad de los insectos. En este sentido, las curvas de supervivencia obtenidas con los insectos

inyectados con 0,5 μg ó 1 μg de ARNdc presentan una mortalidad significativamente mayor a las de los insectos control ($p(0,5 \mu\text{g})=0,0099$; $n=8$; $p(1 \mu\text{g})=0,0158$; $n=18$), cuando son analizadas mediante el test de Log-rank (Mantel-Cox). La dosis de 0,1 μg no presentó diferencias significativas en las curvas de mortalidad, aunque la tendencia es similar ($p=0,3356$; $n=9$) (Figura 2.13).

Resultados de mortalidad obtenidos por el tratamiento con ARNi y la topicación con Deltametrina (DL5024hs)						
Tratamiento (μg de ARNdc/ins)	Mortalidad en el tiempo (expresada como insectos muertos/insectos totales)					
	4 hs	5 hs	6 hs	7 hs	21 hs	24 hs
ARNdc B-Lactamasa	0	0	0	0.166	0.333	0.5
ARNdc GST Delta (0.1)	0.22	0.44	0.44	0.55	0.55	0.66
ARNdc GST Delta (0.5)	0.25	0.375	0.5	0.75	0.875	1
ARNdc GST Delta (1)	0.16	0.38	0.5	0.55	0.77	0.83

Tabla 2.1: Se muestra la mortalidad obtenida para los insectos deficientes en GST (0,1 $\mu\text{g}/\text{Ins}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{Ins}$, 1,0 $\mu\text{g}/\text{Ins}$ de ds ARN-GST) que fueron topicados con deltametrina ó acetona (controles). La mortalidad fue registrada a través de 24 hs, se muestran seis tiempos diferentes

Figura 2.12: Caída del transcripto para las diferentes concentraciones de ARNdc inyectado.

Figura 2.13: Curva de mortalidad en el tiempo obtenida para las concentración de ARNdc GST de $0,1 \mu\text{g}$ ($p(0,1)=0,3356$; $n=9$), $0,5 \mu\text{g}$ ($p(0,5)=0,0099$; $n=8$) ó $1,0 \mu\text{g}$ ($p(1,0)=0,0158$; $n=18$) cuando los insectos son topicados con deltametrina. El control se inyectó con ARNdc inespecífico.

2.5. Discusión

En la primera parte de este Capítulo se estudió la posible implicancia de enzimas detoxificativas en el metabolismo de deltametrina y en la resistencia a piretroides en *T. infestans*. Se utilizó para ello la aproximación de evaluar cuantitativamente la expresión de genes probablemente involucrados en la detoxificación, pertenecientes a las familias CCE, CYP y GST.

Nuestros resultados indican que los insectos resistentes de la población de El Juramento poseen un nivel aumentado de la expresión de un gen que codifica para una enzima CYP4 respecto a la población sensible. Esto es coincidente con trabajos recientemente publicados [119, 120], que apuntan a un aumento en genes CYP en poblaciones resistentes de *T. infestans*. En este sentido, Grosso et al. [120] reportan la sobreexpresión de una enzima CYP4 en la cepa resistente de la localidad de La Esperanza, provincia de Chaco, mantenida en condiciones de laboratorio en el CIPEIN. En nuestro grupo, hemos reportado que esta cepa de *T. infestans* también posee la mutación L925I en una muy alta frecuencia poblacional [91]. De la misma forma, la población con la que se trabajó en esta Tesis, presenta la mutación *kdr* L925I. Como se ha discutido en el Capítulo 1, poblaciones con frecuencia de mutaciones *kdr* aparentemente similares presentan tasas de resistencia muy variables (ver Tabla 1.6), este es el caso de la población de El Juramento ($RR > 2000$). Los resultados presentados apuntan hacia una combinación de la resistencia del tipo *kdr*

(L925I) y una sobreexpresión de las enzimas detoxificativas del clan CYP4, como mecanismo de resistencia a piretroides en *T. infestans* de la provincia de Chaco. Consideramos que pueden existir en paralelo otros mecanismos distintos a los evaluados aquí, tales como diferencias en penetración cuticular, ya reportadas en poblaciones resistentes de otras regiones [33, 34].

Las enzimas metabólicas de las familias CCE y GST no presentaron una expresión diferencial entre la población sensible y la resistente, como así tampoco frente a un tratamiento sub-lethal con deltametrina. Sin embargo, esto no descarta una implicación en estas familias en la resistencia, puesto que otros miembros de las familias GST, CCE o CYP no analizados aquí podrían estar sobreexpresados en poblaciones resistentes. Además, el aumento de la actividad enzimática podría darse por mecanismos distintos a la sobreexpresión del gen evaluada aquí, tales como mutaciones puntuales. Nuestros resultados, así como resultados previos de otros grupos [68, 119, 120], apuntan a un papel preponderante de las enzimas detoxificativas de la familia de las CYPs, particularmente aquellas pertenecientes al clan CYP4, en la resistencia a insecticidas piretroides en *T. infestans*.

Dentro de la familia de las GSTs en triatominos, existe aparentemente un único gen perteneciente al clado delta, relacionado con la detoxificación de xenobióticos [55, 119]. Esto nos permitió profundizar en su función mediante el silenciamiento génico y el análisis bioinformático estructural de la proteína. Mediante el análisis de dominios pudo observarse que la proteína presenta todos los dominios reportados como característicos de esta familia [141]. Por otro lado, el alineamiento estructural con GSTs de otras especies de insectos permitió observar una alta conservación de secuencia, lo que nos permite inferir que la estructura secundaria presenta características similares a las de *An. gambiae* y *An. dirus* que han sido cristalizadas [156, 157] y fueron utilizadas como información estructural.

El gen de la GST delta de *R. prolixus* fue silenciado mediante ARNi. Se estudiaron los efectos del silenciamiento frente a una dosis letal 50 de deltametrina. Los insectos silenciados para el gen de GST delta tienen un aumento en la mortalidad frente al piretroide. Si bien el gen no es diferencialmente expresado en la población resistente de *T. infestans*, ni su expresión es modulada por la exposición al insecticida bajo las condiciones utilizadas, los resultados indican una implicación en la detoxificación de deltametrina en *R. prolixus*. Futuros trabajos podrán investigar los mecanismos de detoxificación de piretroides por parte de GST delta en triatominos.

Existe un creciente interés en utilizar la técnica de ARNi para control de plagas de insectos, al punto que se los considera mecanismos insecticidas de próxima generación [158]. En ese sentido, el hallazgo de un gen que al ser silenciado, puede aumentar la eficacia de insecticidas piretroides, presenta interés desde el punto de vista del control de plagas de insectos. Podría proponerse la combinación de ARNi para el silenciamiento del gen junto con bajas dosis de piretroides como mecanismo de manejo de resistencia y de extender la vida útil de los insecticidas.

La técnica de ARNi para control de insectos hematófagos, por el momento, presenta la dificultad del modo de administración del ARNd. En *R. prolixus* se ha observado una muy buena respuesta a este método por medio de la inyección [129, 159, 160]. Para estudios de genómica funcional es el método predilecto, ya que presenta la ventaja de introducir el ARNd en el tejido de interés o directamente en la hemolinfa del insecto, evitando posibles barreras como el tegumento o el epitelio intestinal, que representan un problema en experimentos de penetración o ingestión [126]. Sin embargo, para pensar

estos métodos como mecanismo de manejo de resistencia será necesario realizar estudios que impliquen otros mecanismos de administración. En este aspecto, ha sido reportado que el silenciamiento del gen específico de la Nitroporina 2 (NP2) de glándulas salivales de *R. prolixus* se consigue mediante la ingestión del ARNdc. Sin embargo, la cantidad de ARNdc requerida para silenciar este gen administrado oralmente fue mucho mayor que mediante inyección [161]. Otro mecanismo de administración ensayado con éxito en *R. prolixus* fue mediante una versión recombinante de la bacteria *Rhodococcus rhodnii*, que puede ser transmitida de forma horizontal de adultos a ninfas vía coprofagia [162]. Estos son temas de intensa investigación en la actualidad; las futuras investigaciones en triatomíneos pueden resolver las dificultades encontradas hasta el momento.

La gran potencialidad de la técnica de ARNi para estudios fisiológico-moleculares en insectos, así como aplicabilidad en el control de plagas, genera que sea clave determinar la cantidad mínima de ARNdc que es necesario inyectar a fin de conseguir un silenciamiento significativo del gen. El costo de producir el ARNdc es elevado en términos económicos y de tiempo, por lo que resulta importante determinar una cantidad mínima efectiva. Llamativamente, un estudio de “dosis de ARNdc-respuesta fisiológica” como el que presentamos aquí no fue reportado previamente hasta nuestro conocimiento en *R. prolixus*.

Resulta de importancia destacar que una caída significativa en la expresión de GST delta es observada en todas las concentraciones de ARNdc inyectados. Sin embargo, el fenotipo de respuesta al insecticida es diferente en la concentración más baja. Esto puede ser producto de que una dosis más alta de ARNdc genera una degradación del transcripto más rápida. Así, es factible que los insectos inyectados con 0,1 μg de ARNdc todavía tengan proteína que no ha sido degradada, disponible para la desintoxicación del piretroide. Una explicación alternativa es que el método de evaluación de la caída de transcripto (qRT-PCR) no es lo suficientemente sensible como para detectar diferencias que, sin embargo, son importantes a nivel de producir un fenotipo. Discernir entre estas posibilidades resulta importante a nivel de diseños experimentales a futuro. Podría evaluarse la actividad GST en las diferentes concentraciones de ARNdc inyectado como una aproximación posible a responder esta pregunta.

Los resultados obtenidos a través de la medida de caída del transcripto y la respuesta fenotípica indican que, para *R. prolixus* de 5^{to} estadio, 0,5 μg son suficientes para el silenciamiento de un gen altamente expresado como GST delta. Esto fue importante para el diseño experimental de distintos ensayos llevados a cabo en nuestro laboratorio, y podrá ser también utilizado por grupos de trabajo que utilicen la técnica de ARNi en *R. prolixus*.

Dos teorías han sido planteadas con respecto al papel que juega GST en la desintoxicación de insecticidas piretroides: la primera es que actúa secuestrando el insecticida, evitando que tome contacto con su sitio de acción [140]. La segunda propone que ayuda a la desintoxicación de forma indirecta, aliviando el estrés oxidativo producido por la acción de los piretroides [74, 139]. La respuesta observada en los insectos inyectados con GSTdc fue sumamente rápida; a partir de las cuatro horas ya pudo observarse mortalidad, lo que sugiere que esta enzima se encontraría implicada en pasos de desintoxicación tempranos. Los mecanismos por los cuales estas enzimas colaboran en la desintoxicación de piretroides son materia de futuros ensayos, algunos de los cuales están en marcha en nuestro laboratorio.

Capítulo 3

Estudio de la contribución de hormonas peptídicas a la resistencia a insecticidas y detoxificación en triatominos

3.1. Hipótesis

- Puesto que las hormonas peptídicas (neuropéptidos) intervienen en la regulación de todos los procesos fisiológicos, algunas de ellas pueden contribuir a la detoxificación de xenobióticos y, por tanto, a la resistencia a insecticidas mediante mecanismos poco estudiados.

3.2. Objetivos específicos

- Estudiar la contribución de hormonas peptídicas a la resistencia a insecticidas y detoxificación en triatominos.

3.3. Introducción

La capacidad de los insectos para generar resistencia a los insecticidas plantea la necesidad de buscar nuevas estrategias de control. Dada su relevancia en la regulación de los procesos fisiológicos, las moléculas del sistema neuroendocrino de insectos han sido propuestas como blanco de plaguicidas [122, 123, 163]. Los neuropéptidos son moléculas de señalización presentes en todos los animales tanto invertebrados como vertebrados.

Los neuropéptidos de insectos tienen una extensión de 5 a 80 aminoácidos. Existen también algunas proteínas más grandes que actúan como hormonas, como por ejemplo PTTH y Bursicon. Las estructuras moleculares de los neuropéptidos de insectos son inmensamente variadas y muestran una gran diversidad en sus patrones de distribución, modos de acción y roles funcionales [164]. Se encuentran codificados genéticamente como proteínas precursoras de mayor tamaño (pre-propéptidos) (Figura 3.1) que una vez transcritas son escindidas enzimáticamente para liberar los péptidos maduros, los cuales tendrán actividad biológica (Figura 3.2). Los precursores de neuropéptidos codifican en su secuencia aminoacídica un péptido señal, y un número variable de péptidos, separados entre sí por sitios de clivaje proteolítico ([165], Figura 3.1, Figura 3.2 A). Los precursores

son guiados al retículo endoplásmico rugoso donde la peptidasa de la señal escinde el péptido señal [166](Figura 3.2 B).

Figura 3.1: Representación de un precursor de neuropéptidos. Se observa en el extremo N-terminal el péptido señal. P1, P2 y P3 representan neuropéptidos codificados en el precursor. RK, RR y KR son posibles sitios de clivaje dibásico.

Después de la escisión del péptido señal, el procesamiento proteolítico adicional ocurre predominantemente en residuos de aminoácidos dibásicos (Arg o Lys) o monobásicos (normalmente Arg en determinadas condiciones) [167](Figura 3.2 C). Posteriormente los péptidos son modificados post-traduccionalmente por diferentes enzimas. La modificación más frecuente es la alfa-amidación C-terminal, aunque también se encuentran otras modificaciones tales como oxidaciones, acetilaciones, etc (Figura 3.2 C, D y E). Estas modificaciones generan grados variables de estabilidad a las peptidasas y son importantes para la actividad biológica [164, 165]. Los péptidos maduros son secretados al medio extracelular para actuar, a través de la interacción con receptores específicos, como neuromoduladores y / u hormonas [121]. Los neuropéptidos típicamente ejercen efectos sobre las células blanco uniéndose y activando receptores de membrana específicos que, en su mayoría, son del tipo GPCR (acoplados a proteína G) [168]

Figura 3.2: Los neuropeptidos se sintetizan a partir de un precursor A) que posee un péptido señal por el cual es guiado al retículo endoplasmático (RE). Allí, el precursor sufrirá la escisión del péptido señal y en el aparato de Golgi, será modificado postraducionalmente a través de reacciones enzimáticas en las cuales los intermediarios darán lugar a los neuropeptidos maduros. Dentro de las vesículas de núcleo denso, el procesamiento (adicional) tiene lugar por las enzimas indicadas. En primer lugar, una endopeptidasa escinde el propéptido C-terminal de sitios de escisión mono o dibásicos. Posteriormente, la carboxipeptidasa elimina la secuencia de escisión C-terminal. Los péptidos bioactivos resultantes son almacenados en las vesículas hasta el momento de su liberación (Adaptado de [166, 169]).

Los precursores de los neuropéptidos también codifican péptidos espaciadores (Figura 3.1). Estos son péptidos codificados en el precursor, pero que carecen del dominio conservado característico de cada familia de neuropéptidos. Si bien se cree que podrían modular la actividad de los péptidos bioactivos, se supone que la actividad biológica reside en los péptidos altamente conservados [170].

Los neuropéptidos son fundamentales en la coordinación de todos los procesos fisiológicos. En los insectos, neuropéptidos y neurohormonas desempeñan un papel central en el control de eventos vitales tales como el desarrollo, la reproducción, el comportamiento y la alimentación [121, 164]. Algunos de estos procesos y sus neuropéptidos asociados se resumen en la Tabla 3.1.

En insectos la función de neuropéptidos y receptores suele ser específica de cada especie o grupo de especies, aunque hay algunos cuya función está conservada a lo largo de toda la clase Insecta [171]. Lo anterior ha generado que a lo largo de los años se haya investigado intensamente acerca de la función de neuropéptidos y la regulación endocrina en una gran variedad de especies, muchas de ellas e interés económico y/o sanitario [164].

En la actualidad, muchos genomas de insectos han sido completamente secuenciados, y se ha identificado el neuropeptidoma y los receptores de neuropéptidos para muchas especies. En el genoma de *R. prolixus* se han identificado 41 genes precursores de neuropéptidos, y receptores para la mayoría de ellos (Ver Capítulo 4 de esta Tesis)[121, 172]. En *T. infestans* se han identificado 20 precursores de neuropéptidos en bases de datos transcriptómicas; un total de 59 neuropéptidos maduros pertenecientes a distintos precursores fueron validados por cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) en cerebro y ganglios nerviosos de *T. infestans* [173].

Funciones encontradas en Neuropeptidos y hormonas peptídicas en insectos	
Función	Peptidos
Muda	PTTH, allatotropina, allatostatinas, eclosion hormone, ecdysis triggering hormone, pre-ecdysis triggering hormone, CCAP, corazonina, FMRFa, myoinhibitory peptide, bursicon
Alimentación	NPF, sNPF, Hugin (pyrokinin)
Crecimiento	Insulin-like peptides
Reproducción	Neuroparsins, insulin-like peptides, PBAN, sNPF, SiFamide
Metabolismo	AKH, insulin-like peptides
Regulación del equilibrio de agua e iones	Diuretic hormones (DH44, DH31), CAPA4, leucokina, ion transport peptide
Comportamiento	IPNamida, SiFamida, PDF, NPF
Miotropicos	Proctolina, FMRFamidas, myosuppressinas, PKs, etc.
Multifuncionales	Allatotropina, CCAP, tachykinin-related, sNPF, proctolina
Pigmentación	Melanization and reddish coloration hormone (PK), DCIN/corazonina

Tabla 3.1: Se describen algunas de las funciones de neuropéptidos y hormonas peptídicas halladas en insectos. Se observan en negrita los neuropéptidos que se estudiaron en el presente capítulo de Tesis. Adaptada de Altstein y Nässel [164], Nässel y Winther [171]

Dada su relevancia en la regulación de la fisiología, las moléculas del sistema neuroendocrino de insectos han sido propuestas como blanco de plaguicidas [122, 123, 163, 174]. Además, la señalización neuroendocrina podría contribuir a la tolerancia o a la resistencia a los neurotóxicos mediante diferentes mecanismos, como por ejemplo reducir el impacto del estrés causado por los insecticidas, ya que determinados neuropéptidos están implicados en hacer frente a estímulos estresantes en insectos [124, 125].

A pesar de la participación de los neuropéptidos en la regulación de todos los procesos fisiológicos [121, 171], su participación en la respuesta de estrés y detoxificativa, o en otros mecanismos implicados en el metabolismo y la resistencia a los insecticidas, es un campo de investigación poco explorado. Por lo anterior y, dada la experiencia de nuestro laboratorio en análisis neuroendocrinos en triatominos, así como en el estudio de la resistencia a insecticidas, decidimos explorar la posible influencia de neuropéptidos en los mecanismos de detoxificación. Se seleccionaron 6 neuropéptidos en base al conocimiento previo acerca de sus diferentes papeles en la regulación fisiológica.

ITG-like, NPLP1 y NVP-like, son neuropéptidos con funciones poco estudiadas en insectos. Resultados previos de nuestro grupo demostraron que la concentración de los tres en el sistema nervioso central de *R. prolixus* es modulada por el consumo de sangre [175]. También identificamos la presencia de péptidos codificados en el precursor NPLP1 en extractos de glándulas salivales de *R. prolixus* [175]. En estos extractos se identificó la presencia de intermediarios de procesamiento (no el péptido completamente maduro), lo que podría indicar que se están sintetizando en las glándulas salivales, en lugar de alcanzarlas mediante los procesos neuronales asociados. La identificación de RhoprNPLP1 en este tejido podría indicar su participación en el control hormonal de la producción o secreción salival, así como en otros eventos relacionados con la alimentación.

La familia de genes OKB, fue identificada por primera vez por nuestro grupo de trabajo [176]. Además, en trabajo reciente se demuestra la implicación de este neuropéptido en la regulación de la ecdisis [129].

El neuropéptido CCHa se ha reportado como involucrado en la alimentación, el crecimiento y el olfato en *D. melanogaster* [177–179]. En nuestro grupo, hemos observado que en *R. prolixus* este neuropéptido parece estar implicado en la regulación de la diuresis (Capriotti N, resultados no publicados).

Por último, AKH fue elegido por su papel fundamental en el metabolismo de las reservas de energía, ya que AKH moviliza reservas energéticas [174]. Este hecho ha sido particularmente estudiado en *R. prolixus* mediante la inyección in vivo de AKH [180] y el silenciamiento génico [181, 182] que indicaron un papel en la movilización de lípidos del cuerpo graso a la hemolinfa. De los neuropéptidos analizados aquí, AKH es el que ha sido mejor estudiado en insectos [183]; se ha reportado un probable papel en la respuesta a los insecticidas [124, 184, 185].

En este capítulo comparamos la expresión basal de los neuropéptidos mencionados más arriba entre dos poblaciones de *T. infestans*: una sensible y una resistente a piretroides. Además, analizamos la respuesta en la expresión génica de estos neuropéptidos frente a la exposición a deltametrina en la población sensible.

3.4. Resultados

3.4.1. Comparación de la expresión de genes precursores de neuropéptidos en *T. infestans* entre una población sensible y una de alta resistencia a piretroides

Se evaluó la expresión diferencial de seis precursores de neuropéptidos (AKH, CCH-amida, ITG-like, NPLP-1, NVP-like y OKb/c) en dos poblaciones que presentan diferentes grados de susceptibilidad a insecticidas piretroides.

No se observaron diferencias significativas en la expresión génica de los precursores de AKH ($p=0,893$; $n=4$), CCH-amida ($p=0,0527$; $n=4$), NPLP-1 ($p=0,228$; $n=4$) u OKb/c ($p=0,077$; $n=4$) (ver Figura 3.3). La expresión de los neuropéptidos ITG-like ($p=0,042$; $n=4$) y NVP-like ($p=0,021$; $n=4$) (Figura 3.4) es significativamente mayor en la población resistente.

Figura 3.3: Expresión diferencial de los neuropeptidos AKH ($p=0,893$; $n=4$), CCH-amida ($p=0,0527$; $n=4$), NPLP-1 ($p=0,228$; $n=4$) u OKb/c ($p=0,077$; $n=4$) entre una población de *T. infestans* sensible (S) y una resistente (R).

Figura 3.4: Expresión diferencial de los neuropéptidos ITG-like ($p=0,042$; $n=4$) y NVP-like ($p=0,021$; $n=4$) entre una población de *T. infestans* sensible (S) y una resistente (R) ($p<0.05$; ANOVA de un factor; $n=4$).

3.4.2. Expresión de genes precursores de neuropéptidos en respuesta a deltametrina en una población susceptible a piretroides

Se evaluó la expresión diferencial de seis precursores de neuropéptidos (AKH, CCH-amida, ITG-like, NPLP-1, NVP-like y OKb/c) en una población de *T. infestans* frente a una topicación con deltametrina (0,6 ng/mg-insecto, DL50 para esta población) [112].

Se vio una expresión aumentada del precursor AKH ($p=0,0463$; $n=4$) (Figura 3.5). No se observaron diferencias significativas en los precursores de CCH-amida ($p=0.0695$; $n=4$), ITG-like ($p=0,5350$; $n=4$), NPLP 1 ($p=0,5921$; $n=4$), NVP-like ($p=0,7808$; $n=4$) u OKb/c ($p=0,3766$; $n=4$) (ver Figura 3.5).

Figura 3.5: Análisis de la expresión génica de los neuropéptidos AKH ($p < 0,05$; ANOVA de un factor, $n=4$), CCH-amida ($p=0,0695$; $n=4$), ITG-like ($p=0,5350$; $n=4$), NPLP 1 ($p=0,5921$; $n=4$), NVP-like ($p=0,7808$; $n=4$) u OKb/c ($p=0,3766$; $n=4$) de *T. infestans* pertenecientes a una población de referencia (R), cinco horas después de una topicación con $1 \mu\text{L}$ de acetona (A) ó con deltametrina diluida en acetona hasta su DL 50 ($0,6 \text{ ng/mg-insecto}$ (D)).

3.5. Discusión

Con la intención de obtener evidencia acerca de la implicación de los neuropéptidos en la resistencia a los insecticidas, a fin de diseñar estudios de fisiología molecular a futuro, se realizaron dos experimentos en los cuales se comparó la expresión de varios genes precursores en distintas condiciones. En la primera parte se estudió su expresión en individuos pertenecientes a una población de *T. infestans* sensible y a la población de alta resistencia de El Juramento (Provincia de Chaco). Como se ha mencionado previamente, esta población posee la mutación *kdr* L925I y un nivel aumentado, de la expresión de un gen que codifica para una enzima CYP4, con respecto a la población sensible. Hemos encontrado que esta población presenta también una expresión significativamente aumentada de los neuropeptidos ITG y NVP. Hasta donde sabemos, este es el primer informe que demuestra una correlación entre la expresión de ITG y NVP y la resistencia a los insecticidas en insectos. Es materia de futuros ensayos si esta correlación es explicada por mecanismos funcionales. En ese sentido, resultados de trabajos que están siendo llevados a cabo actualmente en nuestro laboratorio sugieren que ITG-like podría tener un papel en la detoxificación de deltametrina (Traverso et al resultados no publicados).

Como se ha comentado en párrafos anteriores, en nuestro grupo se ha observado que tanto ITG-like como NVP-like se encuentran modulados por la ingesta de sangre en *R. prolixus* [175]. Se ha visto que la alimentación dispara mecanismos detoxificantes en los insectos hematófagos, por ejemplo se ha reportado un aumento de las p 450 en *Culex pipiens* después de la ingesta de sangre [186]. Por otro lado, se ha observado que existe un aumento en la tolerancia a insecticidas en una cepa resistente a piretroides de *An. funestus* después de una ingesta de sangre. Los autores sugieren que los mecanismos de desintoxicación de insecticidas involucrados en la resistencia son estimulados por la alimentación a base de sangre antes de la exposición al insecticida, lo que lleva a una expresión mejorada del fenotipo de resistencia. De acuerdo con esto, se abre un interrogante acerca de si la sobreexpresión de neuropéptidos asociados a la alimentación en poblaciones resistentes podría estar ligada también a un aumento de la detoxificación de los insecticidas en estas poblaciones [187].

En la segunda parte de este Capítulo, se evaluó el cambio en la expresión de los neuropéptidos especificados frente a la exposición de una población sensible de *T. infestans* a deltametrina.

Existen estudios acerca de un aumento en la expresión de AKH en respuesta a deltametrina en *Schistocerca gregaria* [188]. También se ha observado que la inyección de permetrina causa una elevación en la concentración de AKH en la hemolinfa, medida dos horas después del tratamiento en *Pyrrhocoris apterus* y que la inyección o topicación de este insecticida conjuntamente con AKH genera un aumento significativo de la mortalidad [184, 185]. Por otro lado, recientemente se ha visto que cuando se silencia la expresión de AKH por RNAi en adultos de *Tribolium castaneum* disminuye la mortalidad respecto al grupo control cuando son expuestos a deltametrina [124]. Estos insectos también mostraron un bajo nivel en la producción de dióxido de carbono luego del tratamiento con insecticidas.

AKH ha sido reportado como una hormona de respuesta de estrés que estimula reacciones metabólicas, aumentando la concentración de sustratos de energía en la hemolinfa (lípidos, carbohidratos, prolina) e inhibiendo las reacciones sintéticas (lípidos, proteínas,

ARN). La finalidad es movilizar la energía para eliminar situaciones inminentes de estrés [184, 189]. Por lo tanto, este aumento de la tasa metabólica producido por AKH, podría generar un aumento en el ingreso de la toxina en tejidos y células del insecto [124, 184, 185]. A este respecto, Velki et al (2011) reportaron que la producción de dióxido de carbono en *P. apterus* generada por el tratamiento con endosulfán o malatión aumentaba cuando se suministraba de manera conjunta con AKH [190].

Por sus características (baja capacidad de penetrar la cutícula, rápida degradación enzimática en la hemolinfa, etc.) el uso de neuropéptidos de insectos como moléculas insecticidas tiene que ser optimizado mediante modificaciones en la estructura o en el modo de administración [174]. En el caso particular de AKH, se ha reportado su capacidad para atravesar la cutícula en varias especies de insectos [124, 184, 185]. Esto, sumado a su implicancia en la detoxificación de insecticidas que se sugiere en la bibliografía y en los datos aquí presentados, lo convierte en un blanco de particular interés en estudios aplicados al control de insectos perjudiciales.

La parte del trabajo presentada en este capítulo reporta experimentos que comenzaron a explorar la conexión entre dos líneas de trabajo consolidadas en nuestro laboratorio: la resistencia a insecticidas piretroides y la regulación hormonal por neuropéptidos. Nos resulta llamativo que este campo ha sido poco estudiado en la literatura. Si bien los datos obtenidos en esta primera etapa del trabajo representan correlaciones que es preciso profundizar, los datos obtenidos, junto con datos publicados [175] y sin publicar (Traverso et al.), refuerzan la hipótesis de la implicancia de determinados neuropéptidos en procesos de detoxificación y resistencia a insecticidas.

Capítulo 4

Transcriptómica y filogenia para la identificación de receptores de neuropéptidos en triatominos

4.1. Hipótesis

- Los receptores de neuropéptidos de tipo GPCR intervienen en la regulación de procesos fisiológicos fundamentales, y son un blanco interesante hacia nuevas herramientas de control de insectos perjudiciales. Su identificación estructural en vectores de enfermedades es un primer paso imprescindible con dicho objetivo, y posee interés para estudios funcionales en entomología básica y aplicada.

4.2. Objetivos específicos

- Realizar un estudio transcriptómico y filogenético para la identificación de receptores de neuropéptidos de tipo GPCR en triatominos.

4.3. Introducción

El número de genomas completos o parciales publicados de especies de insectos ha aumentado rápidamente desde que el genoma de *D. melanogaster* se informó por primera vez en 2000 [191]. Actualmente *R. prolixus* es el único triatomino cuyo genoma se encuentra secuenciado y publicado [152] (<https://www.vectorbase.org/>). En este genoma fueron ensambladas 702.6 millones de bases, con una cobertura de 8x. En el ensamble v3.0.1 (designado RproC1) se encuentran 27.872 *scaffolds* con un contenido de CG del 27,1 %, que resulta bajo en comparación con otros hemípteros [152].

Los *contigs* de un genoma son segmentos de ADN que se superponen formando una región consenso [192]. Los *supercontigs* o *scaffolds* son un conjunto de *contigs* ensamblados, que cubren regiones grandes del genoma. Están orientados, ordenados y posicionados uno con respecto al otro en base a las secuencias de sus extremos [193]. Los *supercontigs* se utilizan para el estudio y la identificación de secuencias dentro del genoma de un organismo.

Un transcriptoma, se refiere a los genes que se expresan a partir del genoma y, a di-

ferencia del genoma, además de transmitir identidad también puede representar el nivel de expresión de cada gen. No estarán representados todos los genes expresados a lo largo del ciclo vital, sino aquellos representados en la muestra de origen. En este sentido, para identificar los genes que se transcriben se utilizan los marcadores de secuencia expresada o EST (*expressed sequence tag*) que son fragmentos de secuencias de ARNm derivadas a través de reacciones de secuenciación únicas realizadas en clones seleccionados aleatoriamente de bibliotecas de ADNc. Los genes menos representados pueden no ser detectados si la cobertura de la secuenciación no es lo suficientemente profunda. La descripción del transcriptoma de un organismo proporciona información para comprender aspectos de la biología celular y la bioquímica de este organismo [194].

Se ha propuesto que la información molecular basada en el análisis de genomas completos, transcriptomas y proteomas será crucial tanto para una mejor comprensión de las relaciones taxonómicas, como para identificar genes que podrían proveer nuevas herramientas y estrategias para el control de insectos perjudiciales [191]. La reciente secuenciación del genoma de *R. prolixus* ha dado la oportunidad de analizar importantes familias de genes en triatomíneos, proporcionando información relevante para estudios funcionales adicionales [172].

Como se ha destacado en el capítulo anterior, los neuropéptidos son parte fundamental de todos los procesos fisiológicos en los insectos. Interactúan con receptores de membrana específicos, que son los transductores de señal para generar las respuestas intracelulares. La mayoría de los receptores de neuropéptidos son del tipo acoplados a proteína G (GPCRs), aunque existen algunas excepciones como por ejemplo los péptidos similares a la insulina (*insuline like peptides*, ILP) que activan receptores del tipo Tirosina Kinasa (RTK) o NPLP1 que actúan a través de un receptor de guanilato ciclase unido a la membrana [195].

Los GPCR constituyen una gran superfamilia de proteínas integrales de membrana celular. Median prácticamente todos los procesos fisiológicos y conductuales, al transmitir señales de un amplio rango de ligandos extracelulares, incluyendo hormonas peptídicas y aminos biogénicas, a través de la membrana celular hasta rutas de señalización que dan como resultado respuestas específicas [122].

Los GPCR no comparten entre sí homología de secuencia global, pero conservan la configuración de 7 segmentos transmembrana (7TM), una característica estructural similar que se encuentra notablemente conservada [196]. Cada uno de estos segmentos transmembrana α -helicoidales consta de 20-30 aminoácidos hidrofóbicos y tres bucles extracelulares e intracelulares que conectan las diferentes hélices. El extremo N se encuentra en el sitio extracelular y a menudo posee varios sitios de glicosilación. El C-terminal está orientado hacia el citoplasma y ofrece algunos sitios potenciales de fosforilación. Las partes extracelulares están involucradas en la unión específica del ligando, mientras que las áreas intracelulares interactúan con un miembro de la familia de proteínas de unión a GTP heterotriméricas (proteína G), que consta de subunidades alfa, beta y gama [195].

En base a motivos secuenciales compartidos, los GPCR se clasifican en diferentes subfamilias, tales como: similar a la rodopsina (familia A); similar a secretina (familia B); glutamato metabotrópico (familia C); y las proteínas 7TM atípicas (familia D). Esta clasificación se basa en predicciones de estructuras primarias y secundarias, análisis de secuencias utilizando modelos de Markov ocultos por perfil y búsquedas de homología de secuencias utilizando BLAST [197]. La gran mayoría de los GPCR de neuropéptidos

conocidos pertenecen a la subfamilia similar a la rodopsina (familia A), y algunos de ellos, en insectos particularmente las hormonas diuréticas, pertenecen a la familia similar a la secretina (familia B) [195].

Debido al rol regulador que tienen los GPCRs en los procesos fisiológicos, han sido propuestos como blancos para insecticidas. Es interesante mencionar que 46 GPCRs humanos son utilizados como blanco de fármacos. Entre ellos, 50 % son receptores de las familias A o B (del tipo de neuropéptidos), y 26 % interactúa con aminos biogénicos [123]. Sin embargo, entre los insecticidas, hasta el momento solo el amitraz tiene como blanco un GPCR (que es un receptor de octopaminas) [77, 122]. Si bien el proceso de desarrollo de compuestos es largo, costoso, y constreñido a consideraciones comerciales, la disponibilidad de información genómica puede ayudar en la identificación de numerosos GPCRs en tiempos acelerados respecto a tecnologías previas. En el mediano plazo, esto podría aumentar la disponibilidad de blancos endócrinos para la obtención de nuevos compuestos aplicables al control de plagas de insectos. Se propone que los insecticidas basados en moléculas endócrinas cuentan con una serie de ventajas, entre las que se mencionan especificidad de especie y bajo impacto ambiental, dentro de un manejo integrado de plagas.

En esta parte de la Tesis nos propusimos identificar los GPCRs de neuropéptidos presentes en la base de datos genómica de *R. prolixus*, así como en transcriptomas de *T. dimidiata*, *T. infestans* y *T. pallidipennis* generados en nuestro laboratorio, en colaboración con investigadores del Instituto Nacional de Salud Pública de México (Dres. Mario Henry Rodríguez y Jesús Martínez Barnette).

4.4. Resultados

4.4.1. Identificación de proteínas G acopladas a receptores para neuropéptidos en triatominos.

Se utilizaron secuencias ortólogas en *An. gambiae*, *Apis mellifera*, *Bombyx mori*, *D. melanogaster* y *Tribolium castaneum* para realizar búsquedas tipo tBLASTn en el genoma de *R. prolixus* y transcriptomas normalizados de *T. infestans*, *T. dimidiata* y *T. pallidipennis* [172], a fin de identificar GPCRs. Con las secuencias obtenidas se realizó un análisis filogenético conjunto con genes ortólogos bien clasificados, lo que permitió su clasificación según ligando putativo.

4.4.1.1. GPCRs para Neuropéptidos Familia A

Se identificaron 41 GPCRs de la familia A para neuropéptidos en *R. prolixus*: 36 de ellos fueron reportados por primera vez [172]. Además, se pudo hallar evidencia de estos GPCRs en *T. dimidiata* (23 *contigs*), *T. infestans* y *T. pallidipennis* (21 *contigs* en cada uno) (Tabla 4.1).

Por análisis filogenético y similitud de secuencia los GPCRs de *R. prolixus* se clasificaron en 25 grupos de acuerdo con su potencial ligando (Figura 4.1, Tabla 4.1) : ACP (RPRC000057 + RPRC004783), Allatostatina A (ASTA) (los paralogos RPRC000706, RPRC000708), Allatostatina C (ASTC) (RPRC013486), Allatotropina (AT) (RPRC001663),

Bursicon (RPRC001663), péptidos CAPA (ADG27752, ADG27753), CCHa (RPRC007766, RPRC000608), Crustacean Cardioactive Peptide (CCAP) (RPRC001248, RPRC000969 + RPRC012063), Corazonina (CZ) (RPRC00523), ETH (RPRC008652), FaLP (RPRC001551), FaLP/ Proctolina (RPRC015267), GPA2/GPB5 (RPRC01428), Kinina (RPRC00494), Long Neuropeptide F (LNF) (RPRC008894, GL563029), Mioinhibiting peptide (KF958188), Miosuppressina (MS) (GL56309), Natalisina (RPRC002266), péptido piroglutamilado RFa (RPRC001000), sNPF (RPRC002266 + RPRC002268 + RPRC002269), SIFa (RPRC000835), PBAN (AFO73269, AFO73270, AFO73271, RPRC008528), Sulfakininas (SK) (RPRC012816, RPRC003273), Tachikinina (TK) (RPRC003160) y receptores huérfanos (con ligando desconocido) (RPRC014721, RPRC015456, RPRC004128, RPRC011268, RPRC008570, RPRC000848, RPRC000203). De acuerdo con nuestro análisis, RPRC001000 es similar en secuencia y cercano filogenéticamente a los receptores pyroglutamylated RFamide (Figura 4.1). Sin embargo, ha sido propuesto que se trata de un receptor estrechamente relacionado con FaLPR [198], porque se agrupa con ortólogos de crustáceos y arácnidos.

Algunos ESTs de *Triatoma spp.* podrían ser asignados a grupos de acuerdo con su ligando putativo, en base al análisis filogenético (Figura 4.1, Tabla 4.1): TDIM_H9TUR5Q02GDFPZ es un GPCR de FaLP/proctolina, TINF_IAZY42G02H0ZZ5 es un GPCR de CZ, TDIM_isotig12092 es un GPCR de CCAP, DIM_IAZY42G02GVFWD, TINF_IAZY42G02H4QHT y TPAL_H9TUR5Q02IYTLQ son AT GPCR, TINF_isotig37139 es un GPCR de Alllostatina A, TDIM_H9TUR5Q02INV8X es un SNCR GPCR, TINF_IAZY42G02H6C37 parece ser un receptor de Taquikininas, y TPAL_H9TUR5Q01BIIZA es un PBAN GPCR.

No se encontraron ortólogos de los receptores de Trissina ni de Inotosina en *R. prolixus*. Este es un resultado coincidente con la ausencia de genes que codifican para sus ligandos en el genoma, lo cual confirmaría la ausencia de este sistema neuropeptídico en la especie. Si bien tampoco en este trabajo fue encontrado el receptor ortólogo de RYamida, en un análisis más reciente ha sido posible identificar tanto este neuropéptido cómo reconstruir su posible receptor [121].

B

Figura 4.1: Árbol resultante del análisis filogenético de GPCRs de la familia A de neuropéptidos de *D. melanogaster* (Dm), *A. mellifera* (Am), *A. gambiae* (Ag), *T. castaneum* (Tc), *B. mori* (Bm), *R. prolixus* (RPRC), *T. infestans*, *T. pallidipennis* y *T. dimidiata* (Td). El árbol está arraigado por el receptor metabotrópico de glutamato de *D. melanogaster* (AAF59402). Se indican ligandos asignados para *D. melanogaster* y *T. castaneum*. Las secuencias de *R. prolixus* se indican con un círculo negro.

4.4.1.2. GPCRs para Neuropéptidos (Familia B)

Los GPCR de la familia B incluyen *calcitonin-like diuretic hormone* (CT-DH), *CRF-like diuretic hormone* (CRF-DH) y *pigment dispersing factor* (PDF). Han sido descritas previamente tres GPCR de CT-DH en *R. prolixus* [199]. Aquí se presentan por primera vez dos receptores de CT-like DH (RPRC004735 y una secuencia predicha manualmente en el *supercontig* GL561032, cuatro receptores CRF-DH (RPRC015285, RPRC000578 y dos secuencias reconstruidas manualmente en *supercontigs* GL562334 y GL563066) y un receptor de PDF (RPRC009680) (ver Figura 4.1, Tabla 4.2, [172]). No se pudo asignar un ligando claro para RPRC011083, sin embargo las similitudes de secuencia sugieren que podría ser un ortólogo del receptor de hormona paratiroidea (PTHr). Se ha identificado PTHr en varios insectos, incluyendo el hemíptero *Nilaparvata lugens* [198]. Es interesante observar que varios GPCRs de la familia B para hormonas diuréticas parecen estar duplicados en *R. prolixus*. Esto podría reflejar la necesidad de una regulación eficaz del equilibrio hídrico en los insectos que se alimentan de sangre, que deben ocuparse de enormes volúmenes de líquido durante y después de la ingesta. Hemos encontrado EST para los receptores de la familia B en *T. dimidiata* (7), *T. infestans* (2) y en *T. pallidipennis* (6). La similitud de secuencias y el análisis filogenético sugieren que TPAL_H9TUR5Q01C6ORS es un ortólogo de RPRC011083; TINF_IAZY42G01CE3S1, TDIM_H9TUR5Q02I463C, TPAL_H9TUR5Q02GKO1O son receptores CRF-DH y TDIM_isotig15491 es un recep-

tor CT-DH (Tabla 4.2, Figura 4.2).

4.5. Discusión

Nuestro análisis genómico y transcriptómico de GPCRs para neuropeptidos proporciona información de esta familia génica en *R. prolixus*, *T. dimidiata*, *T. infestans* y *T. pallidipennis*. Los resultados sugieren un alto grado de conservación a nivel de secuencia en genes del sistema neuroendocrino en los triatominos.

Como se ha comentado, la familia de las GPCRs comparten una homología del tipo conformacional 7TM pero son proteínas que presentan una alta variación en su secuencia, por lo que para estudiar sus familias no es suficiente con una búsqueda por homología, sino que es requerimiento completarla con un análisis filogenético.

A través de las comparaciones realizadas con otras especies de insectos que han sido bien estudiadas, no parece haber diferencias significativas en el número de GPCR entre holometábolos y hemimetábolos [198, 200–202]. Los datos presentados aquí son el primer análisis exhaustivo de GPCRs expresados en triatominos. Este análisis genómico y transcriptómico ha permitido caracterizar estructuralmente esta importante familia génica, y brinda información de secuencia imprescindible para futuros ensayos de genética y fisiología molecular.

R. prolixus N° de receptor	ligando endógeno probable	T. castaneum	D. melanogaster	A. gambiae	A. mellifera	B. mori	T. dimidiata E-value	T. albicans E-value	T. pallidus E-value
RPPO00057+RPPO004793	ACP	EE239354	AA081923	XP_302581	NP_001035554	NP_001037149	3.00E-06	0	6.00E-08
RPPO004706	Alarmonin A	-	NP_534700	XP_000455508	XP_000502052	NP_001037035	7.00E-06	2.00E-14	-
RPPO013496	Alarmonin C	NP_001289521	NP_534700	XP_000455508	XP_000502052	NP_001037035	4.00E-06	3.00E-15	-
KF140716	Albinogen	XP_006189726	AA020725	XP_300074	XP_000502052	NP_001037035	-	2.00E-19	-
RPPO001983	Burdon	XP_006189726	-	XP_301711	XP_000502052	NP_001037144	6.00E-08	1.00E-64	9.00E-87
AD027752	CHPA peptides	NM_001289616	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-
AD027753	CHPA peptides	NM_001289616	AF032739	AF030017	NM_001036232	NM_001134629	3.00E-45	0	2.00E-31
RPPO007796	COXa	XP_006189726	-	-	NM_001036232	NM_001134629	0	0	2.00E-31
RPPO000608	COXa	EE243072	NP_611241	XP_311366	XP_000502052	NP_001037144	-	-	-
RPPO001248	Crutaxen Cardioactive Peptide	XP_006189726	AA010041	XP_341100	XP_000502052	NP_001037144	4.00E-09	5.00E-08	5.00E-08
RPPO00089+RPPO12083	Crutaxen Cardioactive Peptide	NM_001036307	AA058808	XP_300074	XP_000502052	NP_001037144	0	6.00E-08	-
RPPO000523	Cruzeonin	-	NP_646571	XP_302585	NP_001137689	NP_001127719	-	0	2.00E-08
RPPO000892	Endops Triggering Hormone	NP_001037032	NP_650255	XP_000455508	NP_001137689	NP_001127719	-	-	-
RPPO000468	Endops Triggering Hormone	NP_001037032	NP_650255	XP_000455508	NP_001137689	NP_001127719	-	-	-
RPPO001581	FALP	NP_001289540	NP_650255	XP_000455508	NP_001137689	NP_001127719	-	-	-
RPPO001428	FALP	NP_001289540	NP_650255	XP_000455508	NP_001137689	NP_001127719	-	-	-
RPPO001587	FALP	NP_001289540	NP_650255	XP_000455508	NP_001137689	NP_001127719	-	-	-
RPPO001428	FALP	NP_001289540	NP_650255	XP_000455508	NP_001137689	NP_001127719	-	-	-
RPPO00484	Ken	XP_006189726	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-
GL56338a	Ken	XP_006189726	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-
RPPO008894	Long Neuropeptide F	-	-	-	-	-	-	-	-
KF368788	Long Neuropeptide F	-	-	-	-	-	-	-	-
GL56338a	Long Neuropeptide F	-	-	-	-	-	-	-	-
RPPO001887	Myosupressin	NP_001289540	NP_650255	XP_000455508	NP_001137689	NP_001127719	-	-	-
AF012389	Natation	XP_006189726	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-
AF012370	PSAN	XP_006189726	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-
AF012371	PSAN	XP_006189726	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-
RPPO008538	PSAN	XP_006189726	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-
RPPO001000	PSAN	XP_006189726	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-
RPPO002256+RPPO001289+RPPO001289	PSAN	XP_006189726	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-
RPPO000835	PSAN	XP_006189726	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-
GL545664_GL563047_GL563883	PSAN	XP_006189726	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-
RPPO001216	PSAN	XP_006189726	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-
RPPO001160	PSAN	XP_006189726	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-
RPPO014771	PSAN	XP_006189726	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-
RPPO015456	PSAN	XP_006189726	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-
RPPO004128	PSAN	XP_006189726	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-
RPPO008564	PSAN	XP_006189726	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-
RPPO011286	PSAN	XP_006189726	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-
RPPO004565	PSAN	XP_006189726	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-
RPPO004705	PSAN	XP_006189726	AA058808	AF032739	NP_001036232	NP_004808655	-	-	-

Tabla 4.1: GPCRs para neuropéptidos de la familia A identificados en el genoma de *R. prolixus* y los transcriptomas de *Triatoma spp.*

<i>R. prolixus</i> N° de receptor	Ligando endogeno probable	<i>T. castaneum</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. mellifera</i>	<i>B. mori</i>	<i>T. dimidiata</i> E-value	<i>T. infestans</i> E-value	<i>T. pallidipennis</i> E-value
AHB86317	Calcitonin-like diuretic hormone	XP_008190378	NP_725278	XP_318856	XP_006564466	NP_001127732	1,00E-06	-	-
AHB86318	Calcitonin-like diuretic hormone	XP_008190378	NP_725278	XP_318856	XP_006564466	NP_001127735	1,00E-06	-	-
AHB86571	Calcitonin-like diuretic hormone	XM_008195698	NP_725278	XM_318856	XP_006564469	NP_001127735	0	-	0,00000000008
GL561032a	Calcitonin-like diuretic hormone	XP_008190378	NP_725278	XM_318856	XP_006564469	NP_001127735	-	-	-
RPRC004735	Calcitonin-like diuretic hormone	XM_008195698	NM_165979	XM_321982	XM_006564406	NM_001134263	-	-	-
GL562334a	CRF-like diuretic hormone	XP_008192711	NP_725175	XP_315468	XP_397268	XP_004933474	0	0	0
GL563066a	CRF-like diuretic hormone	XP_008192711	NP_610960	XP_315468	XP_397268	XP_004933474	2,00E-09	-	2,00E-24
RPRC015285	CRF-like diuretic hormone	XP_008192711	NP_610960	XP_315468	XP_397268	XP_004933474	2,00E-09	-	2,00E-24
RPRC000578	CRF-like diuretic hormone	XP_008192711	NP_610960	XP_315468	XP_397268	XP_004933474	6,00E-34	5,00E-29	3,00E-56
RPRC009680	Pigment Dispersing Factor	XP_008193265	AHN59297	XP_313426	XP_006559533	NP_001127733	-	-	-
RPRC011083	Orphan	XP_969953	-	-	XP_006566899	-	0	-	-

Tabla 4.2: GPCRs para neuropeptidos de la familia B identificados en el genoma de *R. prolixus* y los transcriptomas de *Triatoma spp.*

Figura 4.2: Árbol resultante del análisis filogenético de GPCRs de la familia B de neuropeptidos de *D. melanogaster* (Dm), *A. mellifera* (Am), *An. gambiae* (Ag), *T. castaneum* (Tc), *B. mori* (Bm), *R. prolixus* (RPRC) y *T. dimidiata* (Td). El árbol está arraigado por el receptor metabotrópico de glutamato de *D. melanogaster* (AAF59402). Se indican ligandos asignados para *D. melanogaster* y *T. castaneum*. Las secuencias de *R. prolixus* se indican con un círculo negro.

Parte IV

Discusión general y conclusiones finales

Para prevenir la enfermedad de Chagas en América Latina el control del insecto vector se ha postulado como el método más útil (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>) Sin embargo, la resistencia a insecticidas tiene un fuerte impacto negativo en el resultado de las intervenciones de control basadas en insecticidas para las enfermedades vectoriales [203]. Comprender la base molecular por la cual los insectos se vuelven resistentes es esencial para el diseño de programas de monitoreo sensibles, la comprensión de la genética de la población y la evolución de la resistencia, así como para el diseño de contramedidas eficaces [204]. Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis contribuyen a aumentar la plataforma de conocimiento existente en cuanto a la resistencia a piretroides en triatominos.

A través de nuestro trabajo pudimos demostrar que las mutaciones *kdr* L1014F se encuentran sectorizadas a la frontera boliviano-argentina. Otros trabajos de nuestro grupo han demostrado además que las mutaciones de resistencia L925I se encuentran restringidas al Chaco argentino [91]. Los resultados nos permiten proponer que las mutaciones *kdr* en *T. infestans* están ubicadas en dos focos diferenciados: L925I en el Chaco argentino y L1014F en la frontera boliviano-argentina (Salta-Tarija), por lo que el surgimiento de resistencia se habría dado en paralelo en las dos regiones, y no se trataría de una dispersión desde un foco original. Los conocimientos acerca de las características de los individuos resistentes puede ser de alta relevancia para determinar los pasos en el control de *T. infestans* [112], lo que resulta imperioso ya que la resistencia puede provocar fallas en el control de vectores, con importantes consecuencias en la salud pública [204].

El caso de la infestación del Gran Chaco debe ser estudiado a través de sus particularidades ambientales, biológicas, culturales, políticas y económicas. Se trata de una región en donde las condiciones climáticas, socioeconómicas y culturales favorecen al vector. Las viviendas de la zona suelen estar construidas con materiales aptos para que el insecto pueda colonizar el domicilio y el peridomicilio; en este último la eficacia de los rociados con piretroides es menor, y su degradación acelerada. Así, el peridomicilio es muchas veces una fuente de reinfestación hacia los domicilios. Además, las condiciones políticas de los países que componen la región ha llevado a una falta de continuidad espacial y temporal en las acciones de control [4]. En este sentido, en las campañas de control, los insecticidas solo funcionan si se usan de manera en que la cobertura sea lo suficientemente extensa dentro de un área endémica, y el tratamiento se repita cuando los niveles caigan por debajo de la concentración umbral. Un rociado deficiente con dosis subletales de insecticida reduce el impacto sobre los vectores de enfermedades y puede acelerar el surgimiento y la fijación de la resistencia [203].

El conocimiento de la susceptibilidad de los insectos perjudiciales a los insecticidas, la observación y el seguimiento de las tendencias de resistencia y la comprensión de los mecanismos de resistencia son la base para construir el componente de aplicación de insecticida de un programa de control [205]. En este aspecto la OMS, en su plan de respuesta mundial para el control de vectores 2017-2030, ha establecido como prioritaria la vigilancia sistemática de los vectores en lugares representativos de aquellas zonas en que las enfermedades transmitidas por vectores son endémicas, y de aquellas que tienen condiciones favorables para la transmisión de patógenos, aunque dicha transmisión sea reducida o inexistente en ese momento. Una estrategia de manejo de la resistencia con marcadores moleculares es crucial porque puede monitorear la resistencia a los insecticidas en momentos tempranos, antes de que la eficacia de los mismos disminuya [205].

Como pilar del plan 2017-2030 de la OMS, se plantea mejorar la vigilancia de los

vectores y el monitoreo y la evaluación de las intervenciones. Se destaca que las actividades de vigilancia deben planificarse de forma estratégica y deliberada para obtener información que permita estratificar las zonas en las que seguir investigando o priorizar recursos, detectar incrementos del riesgo de transmisión e identificar amenazas específicas para la eficacia del control de vectores, como la resistencia a los insecticidas.

En el presente trabajo se presenta la validación de los ensayos para la detección de mutaciones asociadas a resistencia a insecticidas piretroides en diferentes poblaciones de *T. infestans* del Gran Chaco, así como la determinación de su sensibilidad. Esto resulta importante para la utilización del ensayo PASA a campo en estrategias de vigilancia para campañas de control de vectores más eficientes. Como ha sido comentado, los métodos de detección presentados requieren equipamiento básico y conocimientos técnicos simples. Los resultados demuestran que puede utilizarse en distintas poblaciones de la región, con *backgrounds* genéticos diferentes. En las decenas de ensayos realizados no se ha detectado nunca un falso positivo o un falso negativo, por lo que podemos proponer que la incidencia de falsos resultados del PASA sería extremadamente baja. Además, su sensibilidad permite que sean utilizados en *pooles* de 10 insectos lo que disminuye los costos y los tiempos de monitoreo y aumenta su procesividad respecto al análisis de insectos individuales.

La alternancia racional de insecticidas en base a un conocimiento de la situación genética de la población podría ayudar a prevenir o retrasar la fijación de la resistencia, y extender la vida útil de los compuestos. En ese sentido, se ha visto que las poblaciones resistentes a piretroides son sensibles a fenitrotión [56, 68], con lo que se cuenta con un compuesto de reemplazo como alternativa a los piretroides cuando se detectan mutaciones *kdr*. Sin embargo, es necesario abocar esfuerzos de investigación científica al desarrollo e implementación de estrategias insecticidas bajo impacto ambiental, a fin de reducir el uso de neurotóxicos a un mínimo.

Si bien durante este trabajo de Tesis hemos encontrado que las mutaciones *kdr* tienen una importancia drástica en los altos niveles de resistencia a piretroides registrados en poblaciones del Gran Chaco, también hemos observado que las características de resistencia en *T. infestans* comprenden mecanismos más amplios. En tal sentido, se ha reportado la implicancia de enzimas degradativas, penetración reducida y mutaciones en el sitio de acción en los triatomíneos [33, 34, 56, 57, 67–69, 91, 100, 101, 118–120]. Estos mecanismos múltiples de resistencia plantean un panorama amplio en la respuesta a insecticidas en los vectores de *T. cruzi*. La variabilidad en las tasas de resistencia de ciertas poblaciones de *T. infestans* nos llevaron a indagar sobre posibles mecanismos que actúen de forma conjunta con las mutaciones *kdr*.

En la segunda parte de la Tesis observamos que la población de alta resistencia a piretroides de El Juramento presenta una sobreexpresión en un CYP del clado 4. Esto fue observado también por otros autores que estudiaron una población resistente cercana a El Juramento (La Esperanza), con el mismo tipo de mutación *kdr* [120]. Lo anterior sugiere que la sobreexpresión de determinadas enzimas del clado CYP4 contribuye a las altas tasas de resistencia a piretroides detectadas en la Provincia de Chaco. Por otra parte, la sobreexpresión de enzimas CYP también fue observada en una población resistente proveniente de la frontera Argentina-Bolivia [119], lo cual indica que este tipo de mecanismo puede estar extendido en las poblaciones de *T. infestans* resistentes de toda la región del Gran Chaco. Si bien la resistencia en ausencia de mutaciones en el sitio de acción ha sido reportada de manera reciente [118], las tasas de resistencia de estas poblaciones son inferiores a las de aquellas portadoras de cualquiera de las dos mutaciones *kdr*.

La alternancia o rotación de insecticidas con diferentes modos de acción y la combinación con otras medidas de control pueden disminuir la presión de selección que de otro modo acelerarán el desarrollo de la resistencia. Sin embargo, la amenaza de resistencia metabólica afecta a todos los xenobióticos, y es difícil predecir la resistencia cruzada basada en el metabolismo [136]. Por otra parte, el riesgo toxicológico, la eficacia, la calidad de las formulaciones y la aceptación de los residentes de las áreas endémicas, hace que el fenitrotion no resulte un compuesto ideal de reemplazo de piretroides [4].

El descubrimiento y la validación de nuevos objetivos que proporcionen modos de acción novedosos para insecticidas son herramientas indispensables para el control de insectos perjudiciales hacia futuro [136]. Algunos hallazgos en este aspecto resultan prometedores, como la acción bio-insecticida del hongo entomopatógeno *B. bassiana*, que representa una metodología de control biológico simple, de bajo costo e independiente de la resistencia a piretroides en *T. infestans* [34]. Si bien con una perspectiva a más largo plazo, los métodos basados en ARNi pueden también aumentar la sensibilidad a los insecticidas, o ser un mecanismo insecticida en sí mismo. En este sentido, el hecho de que los triatomíneos presenten una reducción en la familia delta de las GSTs nos permitió abordar la estrategia de silenciamiento del gen por medio de la técnica de ARNi en *R. prolixus*. La técnica fue puesta a punto para un gen altamente expresado como éste, determinando la cantidad mínima a inyectar de ARNdc para generar además del silenciamiento del gen un cambio fenotípico. El descubrimiento de que los insectos que expresan menores concentraciones de esta enzima aumentan su susceptibilidad hacia deltametrina sugiere que la delta GST está involucrada en la detoxificación de piretroides en insectos triatomíneos, al tiempo que abre perspectivas para futuros ensayos.

Además de propiciar la aparición de poblaciones resistentes, los insecticidas neurotóxicos causan mortalidad en especies benéficas y tienen un alto impacto ambiental, lo cual reduce las opciones para el control. La búsqueda de mecanismos insecticidas eficientes y amigables con el medio ambiente resulta necesaria para la implementación de programas integrados de manejo de vectores, que reduzcan a un mínimo el uso de neurotóxicos [195]. De acuerdo con esto y teniendo en cuenta su implicancia en el desarrollo de resistencia en muchas especies de insectos, las P450 han sido propuestas como blanco de inhibidores [136]. Otras propuestas recaen en el sistema neuroendocrino de los insectos. Como ha sido descrito, la participación de los neuropéptidos en procesos fisiológicos críticos, incluidos el metabolismo, la homeostasis, el desarrollo, la reproducción y el comportamiento, los hacen candidatos ideales para las estrategias de control de insectos perjudiciales. Por otra parte, los neuropéptidos específicos de insectos ofrecen especificidad de objetivo y compatibilidad ambiental [174]. En este marco, el Capítulo 3 se ha indagado en la respuesta de determinados genes precursores de neuropéptidos frente a deltametrina, su expresión diferencial en poblaciones de *T. infestans* resistentes a piretroides. Hemos demostrado que el neuropéptido AKH, se modula por el tratamiento con deltametrina en este insecto. Si bien este hecho ha sido descrito en otros insectos, la bibliografía al respecto es sumamente acotada, aunque se lo ha implicado a la respuesta a estrés oxidativo causada por el insecticida y su silenciamiento ha sido asociado a los cambios de expresión de enzimas metabólicas [124, 183–185]. También hemos encontrado que dos neuropéptidos de función prácticamente desconocida se encuentran sobreexpresados en la población resistente de El Juramento. Estos neuropéptidos han sido involucrados en la respuesta a la ingesta de sangre en *R. prolixus*; a su vez, la ingesta de sangre está asociada al aumento metabólico y la disminución de la susceptibilidad a los insecticidas en *C. pipiens* y *An.*

funestus [175, 186, 187]. Los resultados obtenidos con estos tres neuropéptidos crean a nuevas hipótesis acerca de una posible implicancia de estas moléculas en la modulación de la detoxificación en *T. infestans*. Nuevos experimentos para dilucidar esta posibilidad se han puesto en marcha en nuestro laboratorio (traverso et al. , resultados no publicados).

La secuenciación del genoma de *R. prolixus* provee información genética básica que facilita enfoques de fisiología molecular [152]. Estos a su vez podrían conducir al desarrollo de métodos de control innovadores, como aquellos basados en blancos endócrinos. Sin embargo, para poder ser utilizada, la información genómica “cruda” debe ser interpretada, los genes deben ser identificados y clasificados en familias. Los resultados del Capítulo 4 representan el esfuerzo de identificación y clasificación de GPCRs de neuropéptidos, moléculas fundamentales en la regulación neuroendócrina.

Por su potencial, e incluso por los antecedentes de su uso en la industria farmacéutica, estas proteínas han sido ampliamente propuestas como blanco para nuevas moléculas insecticidas [122, 123, 195]. En ese sentido, la identificación y análisis estructural de GPCRs de neuropéptidos en especies perjudiciales es un primer paso para análisis funcionales aplicados al control. Sin embargo, debe reconocerse que el desarrollo de insecticidas con blancos endócrinos tiene como contra que no brindará resultados seguros y a corto plazo, lo que muchas veces es priorizado por la industria por sobre propuestas innovadoras pero riesgosas o a más largo plazo [27]. Es desde el sector público donde estas investigaciones pueden tener mayor impulso.

En resumen, durante el transcurso de esta Tesis se han podido estudiar los mecanismos moleculares de la resistencia y la detoxificación de insecticidas piretroides en triatominos. Se han aportado herramientas moleculares para el control de la dispersión de insectos resistentes, así como también se ha ampliado la plataforma de conocimiento acerca de los mecanismos detoxificadores de piretroides en estos insectos. Por último, hemos intentado aportar información útil para la búsqueda de posibles nuevas proteínas blanco de insecticidas, que puedan reemplazar o complementar a los neurotóxicos a largo plazo. Una estrategia completa en el control de los triatominos debe incluir tanto el manejo de resistencia (estudios de mecanismos de resistencia, estrategias de monitoreo de las poblaciones que se encuentran bajo control químico, estudios de los procesos biológicos involucrados en la resistencia) como medidas de índole social (participación comunitaria, la mejora de las viviendas y de la situación socioeconómica de los pobladores del Gran Chaco), lo cual no podrá lograrse a menos que exista voluntad política.

Por último, esta tesis ha dejado abiertas las puertas para futuros trabajos que continuarán en nuestro laboratorio:

- Con la obtención de la secuencia del canal de sodio de *T. infestans* será posible evaluar la presencia de otras mutaciones ligadas a resistencia en las poblaciones del Gran Chaco.
- Avanzar en el estudio del rol de las enzimas detoxificativas en la resistencia a piretroides en triatominos. En este sentido, se estudiará especialmente el rol de GST delta.
- Estudiar la implicancia de AKH, ITG-like y NVP-like en la resistencia a insecticidas utilizando por ejemplo la técnica de RNAi
- Avanzar en la búsqueda de nuevas posibles herramientas para el control de triato-

minos.

Parte V

Materiales y métodos

Materiales

Insectos

En aquellos experimentos en que se trabajó con *T. infestans* fue utilizada como referencia la cepa de laboratorio denominada CIPEIN, la cual nunca fue expuesta a insecticidas. Las poblaciones resistentes de *T. infestans* fueron provistas por el Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN, CITEFA-CONICET). Las mismas fueron recolectadas en las localidades de Madrejones (M) (22° 02' S, 63° 37' W) (provincia de Salta, Argentina); La Esperanza (LE) (26° 03' S, 60° 27' W), Pampa Grande (PG) (27° 06' S, 60° 59' W), La Geronima (LG) (26° 04' S, 60° 16' W), El Juramento (EJ) (25° 54' S, 60° 24' W) y El Mala (EM) (25° 56' S, 60° 27' W) (provincia de Chaco, Argentina); Villa El Carmen (VC) (21° 47' S, 63° 34' W), Tierras Nuevas (TN) (21° 44' S, 63° 33' W) y Yacuiba (Y) (22° 01' S, 63° 40' W) (Departamento de Tarija, Bolivia). (ver mapa en la Figura 2.8)

En el caso de *R. prolixus* se utilizó una cepa provista por el Servicio Nacional de Chagas (Valle de Punilla, Córdoba), la cual nunca fue expuesta a insecticidas.

Los insectos fueron criados bajo condiciones controladas de temperatura ($28 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad (50-70 %) y fotoperíodo (12:12 L: O). Los mismos fueron alimentados con aves (palomas o gallinas).

Reactivos

Se utilizaron reactivos de grado analítico. Las soluciones preparadas fueron esterilizadas por tratamiento de calor en autoclave a 121 °C a 1 atmósfera de sobrepresión antes de su utilización. Para las soluciones se utilizó agua bidestilada esterilizada en autoclave.

Las enzimas y *kits* utilizados fueron provistos por las empresas: Promega (Madison, EE.UU.), PB-L (Buenos Aires, Argentina), Roche Applied Science (Mannheim, Alemania), Clontech (Mountain View, EE.UU.), Inbio-Highway (Tandil, Argentina), Fermentas (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EE.UU.), y Sigma (St. Louis, EE.UU.)

Soluciones para la extracción de ARN

TRIZOL® Reagent o TRI Reagent (Sigma Aldrich Argentina): este reactivo es una solución monofásica de tiocianato de guanidina y fenol. El mismo mantiene la integridad del ARN durante la homogeneización del tejido. Alcoholes: Isopropanol (BioPack) y

Etanol 75 % (Cicarelli) Agua con DEPC (Sigma Aldrich, Argentina), libre de RNAsas.

Soluciones para el análisis de ácidos nucleicos por electroforesis

Buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 3X: Tris (Merck) 0,25M, Ácido bórico (Merck) 0,25M, Na₂EDTA pH=8,6 mM. En el caso de los geles para ARN, la solución fue autoclavada antes de utilizarse.

Buffer de siembra: Tris 0,5 M, glicerol 40 %. Colorantes: xilen cianol FF y azul de bromofenol.

Bromuro de Etidio (BrEt): se preparó una solución *stock* 10 mg/ml, y se almacenó en oscuridad. Para su uso, se agregaron 2 μ l de BrEt por cada 50ml de solución de agarosa.

Geles de agarosa: 1gr de agarosa (Promega/ Biodinamics) en 100 ml de *buffer* TBE 1X. (1 %) o 2 gr de agarosa en 100 ml de *buffer* TBE 1X. (2 %)

Formamida (Merck).

Soluciones para extracción de ADN plasmídico (miniprep)

Buffer TELT: Tris-HCl 50mM pH=7,5, EDTA 62,5mM, Tritón-X100 0,4 %, LiCl 2,5M.

Lisozima (Sigma-Aldrich, Argentina): se llevó a una concentración final de 10 mg/ml en Tris-HCl. 10 mM pH=8.

Alcoholes: Isopropanol (BioPack) y Etanol 70 % (Cicarelli).

Soluciones de antibióticos

Se utilizó como marcador de selección el antibiótico ampicilina, que fue adicionado cuando fue necesario al medio de cultivo bacteriano (LB) a partir de soluciones concentradas. Para su preparación se disolvió en agua destilada estéril a una concentración final de 50 mg/ml. Al momento de uso, se diluyó 1000 veces la solución *stock* de ampicilina en el medio LB.

Medios de cultivo y bacterias

Medio LB (Luria-Bertani)

Este medio fue utilizado para cultivar las bacterias *Escherichia coli*. Para 1 litro se mezclaron 10 g de bactotripton (Britania), 5 g de extracto de levadura (Britania) y 5 g de NaCl. Se llevó a un volumen de 800 ml con agua destilada, se ajustó el pH a 7 y se llevó a aforo con agua destilada. En el caso del medio sólido (LB-ágar) se agregaron 15 g de ágar (Biokar diagnostics) por cada litro de LB líquido antes de llevar a volumen. En ambos casos, los medios fueron esterilizados en autoclave.

Cepas bacterianas

Se utilizaron bacterias *E. coli* competentes de la cepa *DH5-α*.

Primers

Se utilizaron los *primers* detallados en la tabla 4.3

Nombre	Organismo	Secuencia
ActinaFw	<i>T. infestans</i>	CTCTGGCAGAACAACTGGTATC
ActinaRv	<i>T. infestans</i>	GCCAAGTCCAAACGAAGAATTG
GST Delta_RNAi_Fw	<i>Rh prolixus</i>	TAATACGACTCACTATAGGGCTCTTCTTCGATCTTGGTTC
GST Delta_RNAi_Rv	<i>Rh prolixus</i>	TAATACGACTCACTATAGGGCTAAGGAATAATCAGCGATAG
KDR Cont Rev	<i>T. infestans</i>	TTAACCCGAACAAGAATATA
KDR Mut Fwd	<i>T. infestans</i>	CAACAGTAGTTATAGGAAATTTT
KDR WT Rev	<i>T. infestans</i>	AAATATATAAAGTACTTACAAC
Oligo DT	----	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
RhoprACTINFW1	<i>Rh prolixus</i>	ACACCCAGTTTGTCTACGG
RhoprACTINRV1	<i>Rh prolixus</i>	GTTTCGGCTGTGGTGATGA
RNAiAMPI FW	----	TAATACGACTCACTATAGGGGAAGTGGATCTCAACAG
RNAiAMPI REV	----	TAATACGACTCACTATAGGGGATCTTCACCTAGATC
T7 Full	----	ATAGAATTCTCTCTAGAAGCTTAATACGACTCACTATAGGG
Ti Na Rev6	<i>T. infestans</i>	GCTGAGCAACAAGGCCAGAAACAAG
TI_AKH_Fw	<i>T. infestans</i>	ATGGCCACCACTGTGTTA
TI_AKH_Rv	<i>T. infestans</i>	GGTGTAATGTGAATTTGTGC
TI_CCHa_Fw	<i>T. infestans</i>	TTCAGCATTTGGACATTCCTG
TI_CCHa_Rv	<i>T. infestans</i>	ATATCTGCTGGCGGTATTCG
TI_ITG-like_Fw	<i>T. infestans</i>	CTGATTTGCTCTGACACTGG
TI_ITG-like_Rv	<i>T. infestans</i>	TCATGGTACATTCTTCGCTGT
TI_NPLP-1_Fw	<i>T. infestans</i>	TCTAAGGCAAGCGGTGACG
TI_NPLP-1_Rv	<i>T. infestans</i>	TATGTTCTCTCCCGTGTC
TI_NVP-like_Fw	<i>T. infestans</i>	TCAACAAAaTCGAGCACCAAG
TI_NVP-like_Rv	<i>T. infestans</i>	GCTTGAGGAACAATTGTGG
TI_OKb-c_Fw	<i>T. infestans</i>	AGAAGGAAGGCGGCACATTG
TI_OKb-c_Rv	<i>T. infestans</i>	TTTCGTGTTCTAATTGTCTCCA
TiNa Fwd	<i>T. infestans</i>	TGGCCAACATTGAATTTATTGATATC
TINA rev3	<i>T. infestans</i>	TGTTACGATTTGATGATAACCGGGATA
TINF_G6PDH_Fw	<i>T. infestans</i>	GGGACGTGGCGGTTATTT
TINF_G6PDH_Rv	<i>T. infestans</i>	TTTCCATGGCAACAAGACTTA
TINF_TUBULINA_Fw	<i>T. infestans</i>	CAGACTGTGCTTTTCATGGTAGA
TINF_TUBULINA_Rv	<i>T. infestans</i>	CTGCCCTATCAGTCTGTCCAAG
TRIIN_CYP4_22_Fw	<i>T. infestans</i>	CGTACGCCATATATACATTTCAGC
TRIIN_CYP4_22_Rv	<i>T. infestans</i>	CTCAGTATTGTAGAGAGGACAACCTT
TRIINF_CCE_16_Fw	<i>T. infestans</i>	CCAGAATACGTTACGGTAAACCTC
TRIINF_CCE_16_Rv	<i>T. infestans</i>	GTTGCATCTAATACTTTCTTCCAAGG
TRIINF_GST_10_Fw	<i>T. infestans</i>	GCCGTGCTATTGCAACTTAC
TRIINF_GST_10_Rv	<i>T. infestans</i>	CTGATCCACGATGGCTTTCT

Tabla 4.3: *Primers* utilizados durante el presente trabajo de Tesis.

Métodos

Preparación y análisis de ácidos nucleicos

Electroforesis en geles de agarosa

Se prepararon geles de agarosa de diferentes concentraciones según los requerimientos del ensayo. Los geles se elaboraron calentando en horno microondas la agarosa en *buffer* TBE hasta completar su disolución. Se agregaron 2 μL de BrEt por cada 50 μL de *buffer* antes de la gelificación. Los geles fueron armados en moldes de acrílico con peines. Una vez gelificada la agarosa, se colocaron en cubas de electroforesis y se les agregó TBE hasta cubrirlos por completo. Las muestras se sembraron en las calles junto con *buffer* de siembra o formamida, según los requerimientos del ensayo (3 μL por cada 10 μL de muestra). Como marcador de peso molecular se utilizó el Ladder 100 pb (PB-L). Para la separación de las bandas, se realizaron corridas entre 80 y 100 V de 40 min a 1 hora. Los geles fueron revelados con un transiluminador de luz ultravioleta de 310 nm. Las imágenes fueron capturadas con una cámara marca Cannon. El ADN fue cuantificado a partir de los geles mediante el programa informático *Image J*.

Preparación de bacterias *E. coli* competentes químicas

Se inocularon 10 ml de medio LB con 1ml de *stock* de bacterias *E. coli DH5- α* . Se dejaron crecer toda la noche a 37 C. Los 10 ml fueron sembrados en 250 mL de medio LB estéril, y se agitó a 37 C hasta llegar a una densidad óptica de 0,6 a 600 nm (2 horas aproximadamente). Se centrifugó en ultracentrífuga a 4 C durante 10 min a 10.000 rpm. El precipitado fue resuspendido en 100 mL de CaCl_2 50 mM, y se dejó a 4 C por 15 min. Después de centrifugar durante 2 min a 4C, se resuspendió en 18,75 mL de CaCl_2 50mM y 5,7 mL de glicerol 50 %. La suspensión de bacterias fue alicuotada en tubos de a 200 μL , que fueron congelados rápidamente en N_2 líquido.

Extracción de ARN y preparación de ADNc

Para los experimentos en los que se sintetizó ADNc fueron utilizadas ninfas del 5^{to} estadio, de 15 días, sin alimentar. Se disecó el sistema nervioso completo, intestino medio anterior y posterior, recto, túbulos de malpighi y cuerpo graso del abdomen. Se trabajó con tejido blando ya que se observó que el uso del insecto completo disminuye la eficiencia

de las reacciones de amplificación debido a la presencia de inhibidores de PCR. Los tejidos fueron colocados en un tubo conteniendo 200 μL de TRIZOL (Ambion, sao Paulo, Brazil) o TRI Reagent (Sigma Aldrich).

El tejido blando fue disgregado dentro de un tubo de 1,5 mL junto con el tri/trizol con la ayuda de un mortero, la solución fue mantenida durante todo el procedimiento en un estado cercano a la congelación por medio de una gradilla fría. La muestra homogeneizada se centrifugó a 12.000 x g por 10 min y se tomó el sobrenadante, evitando tomar la película lipídica superior. El sobrenadante conteniendo ARN se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente para facilitar la disociación del complejo nucleoproteico y se le adicionaron 40 μL de cloroformo (BioPack). La mezcla se agitó vigorosamente en forma manual durante 15 seg, se incubó dos minutos a temperatura ambiente y se centrifugó nuevamente a 12.000 x g.

El procedimiento anterior genera una solución de tres fases: la inferior orgánica que contiene el fenol-cloroformo, una acuosa intermedia de aproximadamente el 50 % del volumen que contiene el ARN, y una capa superior lipídica. Se inclinó el tubo a 45° y se retiró con la ayuda de una pipeta la fase acuosa, que fue transferida a un tubo nuevo de 1,5 mL. Se le adicionaron 100 μL de isopropanol (BioPack) y se lo dejó incubando a -20 °C durante una hora para favorecer la precipitación del ARN. Posteriormente, se centrifugó a 12.000 x g, se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado con 100 μL de etanol 75 % y centrifugando a 7.500 x g. Se descartó el sobrenadante y se secó el precipitado por aproximadamente 3 min a 37°C.

El ARN obtenido se resuspendió con 15 μL de H₂O con DEPC, se dejó 10 min a temperatura ambiente, y se mezcló con la ayuda de una pipeta. Se incubó a 55 °C por 10 min. La integridad de la muestra se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % en condiciones de esterilidad; las soluciones necesarias para la electroforesis fueron previamente autoclavadas, y los materiales plásticos (cubas y peines) fueron esterilizados con NaOH 1 M.

La solución de ARN obtenida fue conservada a -80 °C hasta su utilización. En ese momento, 1 μg de ARN total fue tratado con DNasa I libre de RNAsas (Promega, Wisconsin, USA) e incubado durante 30 min a 37 °C. Los detalles de formulación se encuentran detallados en la Tabla 4.4.

Reactivo	volumen
RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer	1 μL
RNase-Free DNase 1U/ μL	1 μL
RNA	1 μg
H2O con DEPC	volumen necesario
Volumen final	10 μL

Tabla 4.4: Formulación de la reacción de la DNasa.

El ARN libre de ADN fue utilizado para la síntesis de ADNc con la enzima M-MLV *Reverse Transcriptase* (Promega). Para esto se le adiciono 1 μL de EDTA 50 mM (Thermo Scientific), se incubó 10 min a 65 °C y se le agregó 1 μL de oligo DT 100 μM . Se incubó 5 min a 70 °C y se transfirió inmediatamente a un baño helado por 5 min. Posteriormente se le adicionó la mezcla de reacción de la enzima (ver detalles en Tabla 4.5) se incubó 2

min a 37 °C y se le agregó 1 μ L de M-MLV. Para la extensión se lo incubó 2 hs a 42 °C. Se inactivó la reacción a 85 °C durante 5 min y luego en hielo por 5 min.

Reactivo	Volumen (ul)
M-MLV 5X Reaction Buffer	5
RiboLock RNase Inhibitor 40 U/ul	0.5
10 mM DNTPs Mix	2.5
H2O mQ	4.5
Volumen final	12.5

Tabla 4.5: Detalles de la formulación de la reacción de retrotranscripción.

La calidad del ADNc se evaluó por medio de una reacción de PCR con *primers* de *Tubulina* en el caso de *T. infestans* y de *Actina* en el caso de *R. prolixus*. Los detalles de formulación y ciclado se presentan en las Tablas 4.6, 4.7, 4.8 y 4.9. El resultado se analizó en gel de agarosa 2% y 1%, respectivamente. El ADNc se almacenó a -20 °C hasta el momento de su utilización.

Reactivo	Volumen (ul)
Buffer 10x	1
50 mM MgCl2	0.4
10 mM DNTPs Mix	0.3
10 μ M RhoprACTINFW1 primer	0.3
10 μ M RhoprACTINRv1 primer	0.3
cDNA	0.5
Pegasus taq DNA Polimerasa 5 U/ul	0.1
H2O mQ	7.1
Volumen final	10

Tabla 4.6: Formulación de la PCR con los *primers* del gen de actina para comprobar la calidad del ADNc de *R. prolixus*.

Número de ciclos	Etapa del ciclado	Tiempo	Temperatura
1 ciclo	Desnaturalización inicial	5 min	95°C
30 ciclos	Amplificación	desnaturalización	30 seg 95°C
		<i>annealing</i>	30 seg 52°C
		extensión	30 seg 72°C
1 ciclo	elongación final	10 min	72°C

Tabla 4.7: Ciclado de la PCR con los *primers* del gen de Actina para comprobar la calidad del ADNc de *R. prolixus*.

Reactivo	Volumen (ul)
Buffer 10x	1
50 mM MgCl ₂	0.4
10 mM dNTPs Mix	0.3
10 µM TINF_TUBULINA_Fw primer	0.3
10 µM TINF_TUBULINA_Rv primer	0.3
cDNA	0.5
Pegasus taq DNA Polimerasa 5 U/ul	0.1
H ₂ O mQ	7.1
Volumen final	10

Tabla 4.8: Detalles de la formulación de la PCR con los *primers* del gen de tubulina para comprobar la calidad del ADNc de *T. infestans*.

Número de ciclos	Etapas del ciclo		Tiempo	Temperatura
1 ciclo	Desnaturalización inicial		5 min	95°C
30 ciclos	Amplificación	desnaturalización	30 seg	95°C
		<i>annealing</i>	30 seg	58°C
		extensión	30 seg	72°C
1 ciclo	elongación final		10 min	72°C

Tabla 4.9: Detalles del ciclo de la PCR con los *primers* del gen de tubulina para comprobar la calidad del ADNc de *T. infestans*.

Extracción de ADN genómico

Se extrajo ADN genómico a partir del *kit* comercial Wizard® (Promega, Madison, EE.UU), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante para el aislamiento de tejidos de origen animal.

Dos muestras de tejido diferentes fueron usadas según los requerimientos del experimento: un *pool* de 10 insectos de primer estadio ninfal o insectos individuales de los estadios ninfales 3, 4 y 5, sin alimentar.

La muestra se disgregó en frío dentro de un tubo eppendorf de 1,5 mL en 50 µL de solución de lisis, con la ayuda de un mortero. Posteriormente, se le adicionaron 250 µL de esta solución y se homogeneizó utilizando mismo mortero. El lisado fue incubado a 65 °C por 20 min. Se le agregaron 1,5 µL de solución de RNasa y se incubó a 37 °C por 30 min. Luego, se enfrió a temperatura ambiente por 5 min, se le adicionaron 100 µL de solución para la precipitación de proteínas y se lo mezcló vigorosamente con la ayuda de un vortex por 20 segundos antes de poner en hielo por 5 min. La muestra se centrifugó a máxima velocidad durante 4 min.

Se trasladó el sobrenadante a un tubo tipo *eppendorf* conteniendo 300 µL de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a velocidad máxima por 1 min. El

sobrenadante fue descartado, se le adicionó al precipitado 300 μL de etanol al 70 % a temperatura ambiente, se mezcló manualmente y se centrifugó a velocidad máxima por 1 min. Posteriormente, se descartó el sobrenadante, se secó el precipitado por 5 min a 37 °C, y se resuspendió en 20 μL de agua MQ. La solución de ADN genómico obtenida fue guardada a -20 °C hasta el momento de su utilización.

Evaluación de la sensibilidad de los métodos moleculares de detección de mutaciones asociadas a resistencia

Para el experimento fueron utilizados individuos de *T. infestans* sensible (Pampa Grande) y portadores de la mutación L1014F (Villa del Carmen). Se preparó ADN genómico a partir de un *pool* de 10 insectos de primer estadio ninfal de cada una de las poblaciones utilizando el Kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega), según el protocolo indicado en el apartado correspondiente.

La zona del dominio II del canal de sodio TiNa_V que contiene las mutaciones de interés fue amplificada mediante PCR con una estrategia del tipo semi-anidada. Para la misma se utilizó la enzima *Taq Platinum DNA polymerase* 5 U/ μL (Invitrogen, São Paulo, Brazil) y los *primers* Tina Fw y Tina Rv3 (PCR 1). Los parámetros utilizados en la PCR se indican en las Tablas 4.10, 4.11.

Para la PCR 2 se utilizó 1 μL del producto de PCR 1 como molde, la enzima Taq TaKaRa DNA Polymerase (Clontech) y los *primers* TiNa Fw y TiNa Rev 6. Los parámetros utilizados para esta PCR se encuentran detallados en las Tablas 4.12 y 4.13.

Para amplificar el fragmento específico del gen TiNa_V (PCR 3) se utilizó como molde 1 μL de PCR 2, la enzima Taq Platinum DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil), y los *primers* Tina Fw y *Kdr* Cont Rev con los parámetros detallados en las Tablas 4.14 y 4.15.

El producto de la PCR 3 fue sometido a electroforesis en gel de agarosa, y aislado mediante el *kit* QIAquick, *gel extraction* (Qiagen) a fin de lograr una menor competencia de los amplicones inespecíficos durante el clonado molecular.

Para esto se aisló la banda obtenida en el gel de agarosa cortándola con la ayuda de bisturí e intentando reducir al mínimo la agarosa en la que se encontraba contenido el amplicón. El taco obtenido fue disuelto en el *buffer* QG de acuerdo a su peso, en una relación 1:3 incubándolo por 10 min a 50 °C en agitación. Posteriormente se adicionó isopropanol en cantidad equivalente a 1 volumen de gel, se mezcló por inversión y se transvasó la solución resultante a la columna QIAquick que previamente había sido colocada en el tubo colector provisto por el *kit*. Se centrifugó 1 min a 13.000 rpm y el eluyente obtenido fue descartado. Se adicionaron 0,75 mL de *buffer* PE a la columna y se incubó 2 min a temperatura ambiente antes de centrifugar como en el paso anterior. El eluyente fue descartado y se centrifugó nuevamente para eliminar el etanol residual que haya quedado en la columna. Posteriormente se colocó la columna en tubo de tipo *ependorf* limpio y se eluyó el ADN adicionando a la columna 30 μL de agua MQ, incubando 4 min y centrifugando a 13.000 rpm.

El amplicon eluido del gel se llevó a una concentración de 16 ng/ μL y se guardó a -20 °C hasta el momento de su utilización.

Reactivo	Volumen (ul)
Buffer 10x	2.5
50 mM MgCl ₂	0.75
10 mM dNTPs Mix	0.5
10 µM TiNa forward primer	0.5
10 µM TiNa reverse3 primer	0.5
DNA genómico (aprox 20 ng)	1
Platinum taq DNA Polimerasa	0.25
H ₂ O mQ	19
Volumen final	25

Tabla 4.10: Formulación de la PCR 1.

Número de ciclos	Etapa del ciclado	Tiempo	Temperatura
1 ciclo	Desnaturalización inicial	30 seg	95°C
30 ciclos	Amplificación	desnaturalización	30 seg 95°C
		<i>annealing</i>	30 seg 60°C
		extensión	4 min 72°C
1 ciclo	elongación final	10 min	72°C

Tabla 4.11: Detalles del ciclado de la PCR 1.

Reactivo	Volumen (ul)
Buffer 10x	5
10 mM dNTPs Mix	4
10 µM TiNa forward primer	1
10 µM TiNa reverse6 primer	1
DNA (PCR1)	1
Takara taq DNA Polimerasa (5 unid/ul)	0.25
H ₂ O mQ	37.75
Volumen final	25

Tabla 4.12: Formulación de la PCR 2.

Número de ciclos	Etapa del ciclado	Tiempo	Temperatura
1 ciclo	Desnaturalización inicial	30 seg	95°C
30 ciclos	Amplificación	desnaturalización	30 seg 95°C
		<i>annealing</i>	30 seg 60°C
		extensión	6 min 75°C
1 ciclo	elongación final	10 min	72°C

Tabla 4.13: Detalles del ciclado de la PCR2.

Reactivo	Volumen (ul)
Buffer 10x	2.5
50 mM MgCl ₂	0.75
10 mM dNTPs Mix	0.5
10 µM TiNa forward primer	0.5
10 µM kdr control reverse primer	0.5
DNA (PCR3)	1
Platinum taq DNA Polimerasa 5 U/ul	0.25
H ₂ O mQ	19
Volumen final	25

Tabla 4.14: Formulación de la PCR 3.

Número de ciclos	Etapas del ciclo	Tiempo	Temperatura
1 ciclo	Desnaturalización inicial	5 min	95°C
30 ciclos	Amplificación	desnaturalización	30 seg 95°C
		<i>annealing</i>	50 seg 52°C
		extensión	50 seg 72°C
1 ciclo	elongación final	10 min	72°C

Tabla 4.15: Detalles del ciclo de la PCR 3.

Clonado molecular

El fragmento amplificado del gen *TiNa_V* fue clonado en el vector pGemT *easy vector System* (Promega). Se utilizaron 50 ng de plásmido y 28,56 ng de inserto; la cantidad apropiada de inserto para la ligación fue determinada según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Longitud del inserto (pb)} \times 50 \text{ ng de vector}}{\text{Longitud del vector (3015 pb)}} \times 3 = \text{ng de inserto necesarios para un radio 3:1 inserto/vector}$$

Reactivo	volumen (µl)
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5
pGEM-T (50 ng)	1
Producto de PCR	1.8
DNA Ligasa T4 (3U/µl)	1
H ₂ O	1.2
Vf	10

Tabla 4.16: Mix de ligación del clonado molecular.

La mezcla de ligación (Tabla 4.16) se incubó 1 hs a temperatura ambiente y luego 48 hs a 4 °C. Posteriormente se transformaron células de *E. coli DH5-α* competentes.

Transformación en bacterias competentes químicas

Se incubaron 50 μL de bacterias *E. coli DH5- α* con 5 μL del producto de ligación en un baño de agua helada por 30 min. Posteriormente se transfirieron por 30 seg a un baño a 42 °C y fueron devueltas al baño de agua helada. Se agregó al tubo que contenía las bacterias 950 μL de medio LB sin antibióticos, y se dejó crecer durante una hora a 37 °C con agitación.

Una alícuota de 100 μL de bacterias transformadas fue sembrada en placa LB-agar con ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 100 μL IPTG (0,1 M), 50 μL X-gal (50 ng/mL) y se incubó por 24 hs a 37 °C en estufa.

El sitio múltiple de clonado del vector pGEM-T interrumpe una región codificante para el péptido- α de la enzima β -galactosidasa, la cual cuando se expresa cliva el sustrato X-gal, generando un producto de color azul. Por lo tanto, adicionando el inductor de expresión IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) y el sustrato X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) pueden ser reconocidos los recombinantes, en los cuales el inserto habrá interrumpido la secuencia de la β -galactosidasa, a partir del método de screening de colonias blancas/azules en placa de LB. Las colonias blancas son las probables portadoras del inserto.

Las mismas fueron tomadas con un tip p10 estéril y trasladadas a tubos de ensayo estériles con 5 mL de medio LB con ampicilina. Las bacterias se crecieron toda la noche en medio LB líquido a 37 °C con agitación (200 rpm). Los cultivos líquidos fueron utilizados luego para la obtención de ADN plasmídico.

Aislamiento del ADN plasmídico (miniprep)

Se centrifugaron 3 mL de medio líquido saturado con la suspensión de bacterias a velocidad máxima durante 1 min. Se descartó el sobrenadante, y se agregaron 450 μL de *buffer* TELT y 40 μL de lisozima (10 mg/mL). Los tubos se incubaron 2 min en un baño a 100 C, e inmediatamente se colocaron en un baño de agua helada. Se centrifugó durante 10 min a velocidad máxima, y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio, donde se le adicionaron 400 μL de isopropanol (Cicarelli). Se centrifugó 10 min a velocidad máxima. Se descartó el sobrenadante, y se agregaron 175 μL de etanol 70 % al precipitado. Se centrifugó 5 min a velocidad máxima, se removió el etanol y se secó el precipitado por aproximadamente 3 min a 37 °C. Por último, se resuspendió en 20 μL de H₂O destilada estéril que contenía 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de RNasa A.

Se llevó a una concentración final de plásmido de 15 ng/ μL , que fue utilizada como molde para determinar el límite de detección del ensayo, mezclandolas en las siguientes relaciones molares: 0:10, 0,25: 9,75, 0,5: 9,5; 1: 9, 2: 8, 3: 7, 5: 5 y 10: 0 (polimorfismo *kdr* L1014F: polimorfismo salvaje no asociado a resistencia a piretroides).

PCR Amplification of Specific Alleles (PASA)

Para detectar la presencia o ausencia de la mutación L1014F el ensayo molecular PASA utiliza cuatro *primers*, de los cuales dos no son selectivos (TiNa Fwd y KDRCont Rev) y dan como resultado una banda control de 562 pb. Los dos *primers* internos, sin embargo,

son específicos para la mutación en el extremo 3'; solamente amplifican el fragmento si el nucleótido respectivo se encuentra presente en la muestra. Estos *primers* son KDR wt Rev (selectivo para L1014, TTA) y KDR Mut Fwd (selectivo para el F1014, TTT). Estos *primers* tienen sentidos opuestos y dan como resultado fragmentos de diferentes tamaños en combinación con los *primers* externos: 130pb para los *primers* KDR Mut Fwd y KDR Cont Rev y 476 pb para los *primers* TiNa Fwd y KDR wt Rev. De esta manera ambos alelos pueden ser detectados en una única reacción.

Para el ensayo fueron utilizadas las mezclas de concentraciones conocidas descritas en el punto anterior. La reacción se realizó con la enzima Taq Platinum (Invitrogen). En las Tablas 4.17 y 4.18 se indican los parámetros utilizados.

El resultado fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa 2 %.

El fin de utilizar para el ensayo ADN plasmídico fue el de asegurar la composición genética de la muestra y obtener suficiente material para las diversas réplicas y diluciones requeridas. Es necesario aclarar que no puede descartarse algún grado de interferencia en la PCR si se utiliza ADN genómico. La tasa de falsos positivos fue ensayada para el PASA con muestras de genotipo conocido homocigotas y heterocigotas, ya sea a partir de plásmido o ADN genómico. Una vez que se optimizaron las condiciones de PCR como se describió anteriormente, no se obtuvieron falsos positivos o falsos negativos. Sin embargo, las condiciones para el PASA (temperatura de *annealing*, número de ciclos, calidad de la ADN polimerasa, etc.) son cruciales para evitar la amplificación inespecífica, y probablemente deberían ajustarse antes de su implementación en diferentes laboratorios.

Reactivo	Volumen (ul)
Buffer 10x	5
50 mM MgCl ₂	1.5
10 mM DNTPs Mix	1
10µM TiNa forward primer	1
10 µM Mut forward primer	1
10 µM kdr control reverse primer	1
10 µM wild type reverse primer	1
DNA plasmidico (15 ng)	1
Platinum taq DNA Polimerasa 5 U/ul	0.25
H ₂ O mQ	37.25
Volumen final	50

Tabla 4.17: Detalles de la formulación del PASA.

Número de ciclos	Etapas del ciclo		Tiempo	Temperatura
1 ciclo	Desnaturalización inicial		5 min	95°C
30 ciclos	Amplificación	desnaturalización	30 seg	95°C
		<i>annealing</i>	50 seg	52°C
		extensión	50 seg	72°C
1 ciclo	elongación final		10 min	72°C

Tabla 4.18: Detalles de ciclado del PASA.

Estudio de las mutaciones *kdr* en la región IIS4-IIS6 del gen del canal TiNa_V existentes en distintas poblaciones de *T. infestans* resistentes de ecoregión del Gran Chaco

Para el experimento fueron utilizados representantes de *T. infestans* sensibles (CI-PEIN) y resistentes de las poblaciones de la frontera Boliviano–Argentina: La Esperanza, La Gerónima, El Malá, El Juramento, Pampa Grande; y de la provincia de Chaco (Argentina): Madrejones, Villa El Carmen, Tierras Nuevas, Yacuiba. Se preparó ADN genómico de cada una de las poblaciones, con el cual se efectuaron sucesivamente las reacciones de la PCR 1, PCR 2 y PASA. Los protocolos para cada una de las reacciones de amplificación se detallan en las Tablas 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17 y 4.18 en la sección anterior.

Los resultados obtenidos fueron analizados en gel de agarosa 2 %.

Evaluación de la frecuencia poblacional de la mutación L1014F en poblaciones de *T. infestans* del Gran Chaco

Para el experimento se extrajo ADN genómico de insectos individuales de *T. infestans* de las poblaciones de la provincia de Chaco: La Esperanza (n=10), La Gerónima (n=5), El Malá (n= 11), El Juramento (n= 14), Pampa Grande (n= 10); y de la frontera Boliviano–Argentina : Madrejones (n= 10), Villa El Carmen (n= 9), Tierras Nuevas (n= 11). Los insectos fueron provistos por el CIPEIN, a partir de cepas mantenidas en el laboratorio, provenientes de cada una de las poblaciones citadas. No fue posible estudiar la frecuencia poblacional de esta mutación en la población de Yacuiba de la provincia de Chaco ya que la misma se encontraba extinta.

Se observó que la presencia de sangre en insectos recientemente alimentados reducía la eficiencia de las reacciones de PCR. En insectos adultos, el ADN genómico obtenido presentó baja calidad para las reacciones de amplificación. Por último, se observó que de estadios ninfales pequeños se obtenía poco material genético de partida, lo que dificultaba las reacciones de PCR subsiguientes. Por lo tanto, la extracción de ADN genómico se realizó en insectos no alimentados de estadios ninfales 3, 4 y 5.

A partir del ADN genómico se efectuaron sucesivamente las PCR 1, PCR 2 y PASA. Los protocolos para cada una de las reacciones de amplificación se detallan en las Tablas 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17 y 4.18 en la sección anterior.

Los resultados fueron evaluados por electroforesis en geles de agarosa 2 %.

Determinación de la secuencia completa de ADNc del Canal de Sodio dependiente de Voltaje de *T. infestans*. Caracterización bioinformática estructural

La secuencia incompleta de ADNc del gen $TiNa_V$ fue identificada mediante una búsqueda por homología tipo t-BLASTn en Vectorbase (<https://www.vectorbase.org/>), utilizando como *query* la secuencia aminoacídica reconstruida del canal de sodio dependiente de voltaje de *R. prolixus* ($RpNa_V$).

La secuencia almacenada en la base de datos de vectores presentaba cuatro nucleótidos no definidos. Se diseñaron *primers* flanqueando la zona y se amplificó por PCR un fragmento de 273 pb que contenía esta secuencia. La misma se clonó en el vector pGemt y se transformó en bacterias *E. coli* de la cepa *DH5 α* tal como se indica en las secciones correspondientes. La muestra fue enviada para su pirosecuenciación al servicio de MacroGen (Seúl, Corea). El análisis bioinformático de la secuencia completa de la proteína incluyó los siguientes puntos:

- Predicción de la secuencia aminoacídica (<http://web.expasy.org/translate/>), la traducción se realizó utilizando un código genético “standard” y se seleccionó el primer marco de lectura “5’3’ Frame 1”, que mostraba el marco de lectura abierto completo de la proteína.
- Alineamiento de las proteínas $TiNa_V$, $RpNa_V$, $DmNa_V$ (*Drosophila melanogaster*) y $ClNa_V$ (*Cimex lectularius*) con el programa Clustal Ω (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).
- Predicción de las características fisicoquímicas de la proteína con el programa protparam (<https://web.expasy.org/protparam/>).
- Predicción de las características de la estructura secundaria de la proteína por medio del programa GOR IV (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html) y predicción de los dominios transmembrana a través del programa TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), donde se eligió el formato de salida extendido, con gráficos. Por último, se realizó un estudio más detallado por medio del programa Topcons (<http://topcons.cbr.su.se/>), que trabaja con múltiples bases de datos. Se compararon las estructuras de los canales $TiNa_V$, $RpNa_V$, $DmNa_V$ y $ClNa_V$.
- Alineamiento de las proteínas $TiNa_v$, $RpNa_v$, $DmNa_v$ y $ClNa_v$ seguido de un análisis conjunto de sus dominios a través del programa *Batch web CD-search tool* del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>).

Estudio de la implicancia de las enzimas detoxificativas y hormonas peptídicas en la resistencia a insecticidas piretroides en *T. infestans*

Se estudió el papel de tres superfamilias de enzimas detoxificativas Citocromos p450 (CYPs), Carboxil-colin esterasas (CCE) y Glutación transferasas (GSTs) en la detoxificación de insecticidas piretroides. Por otro lado del repertorio de neuropéptidos identificados en *T. infestans* [55], se seleccionaron seis para dilucidar su papel en la resistencia a insecticidas y detoxificación en triatomíneos. Tanto los neuropéptidos como las enzimas ensayadas fueron seleccionadas de acuerdo a criterios biológicos y antecedentes previos descritos en el Capítulo correspondiente.

Se llevaron a cabo dos aproximaciones experimentales. En la primera, se utilizó la población sensible CIPEIN y una población resistente de la localidad de Juramento, que presenta la mutación *kdr* L925I y tiene una tasa de resistencia extremadamente alta, muy superior a la de otras poblaciones evaluadas ($RR > 2000$). Ambas poblaciones son sensibles a Fenitrothion; en el segundo experimento, se evaluaron los niveles de expresión de genes en una población sensible de *T. infestans* (CIPEIN) frente a un tratamiento con acetona (control) o deltametrina de grado técnico (99,6) (Sigma Aldrich, Alemania) en su dosis letal 50 (tratados). En este caso los insectos fueron topcados de acuerdo a su peso con 0,6 ng/mg ($\pm 0,02$ ng/mg) de deltametrina y colectados 5 hs después de las topicaciones para evaluar la expresión génica [112].

En ambos casos se extrajeron los tejidos blandos, se aisló el ARN y se preparó el ADNc tal como se describió más arriba.

Para medir la expresión diferencial de genes se utilizaron como referencia β -actina, α -tubulina y G6PDH, seleccionados por haber sido previamente reportados como estables bajo distintas condiciones para *R. prolixus* (Omondi, B. A., 2015). Las reacciones de amplificación de ADNc fueron hechas por triplicado en un volumen final de 25 μ L (el detalle de formulación de la reacción y los *primers* utilizados se detallan en las tablas 4.3 y 4.19). Se utilizó un equipo para *Real Time PCR MiniOpticon Real-Time PCR Detector Separate MJR* (Bio-Rad Laboratories, California, USA). Los detalles del ciclado se muestran en la tabla 4.20. Los resultados fueron registrados y analizados con el *software CFX Manager 3.0* (Bio-Rad Laboratories).

La eficiencia de los *primers* fue medida utilizando diluciones 1:2, 1:4 y 1:10 del ADNc de tejido blando de *T. infestans* preparado bajo las mismas condiciones que las muestras experimentales. Con la ayuda del programa excel (Microsoft office) se graficó el logaritmo en base 10 de las diluciones vs el promedio de los *threshold cycle* (CTs) para cada una. Se obtuvo la ecuación de la recta que pasa por los tres puntos (con un valor de R^2 de entre 0.98 y 1 para todos los *primers* evaluados) y se aplicó la siguiente fórmula:

$$[(10^{1/\text{pendiente de la recta}}) - 1] \times 100 = \text{Porcentaje de eficiencia}$$

Se obtuvieron valores de eficiencia mayores a 85 % y menores a 110 % para todos los *primers*. En los casos en que los valores se alejaron de estos límites, los *primers* fueron

descartados y re-diseñados.

Para realizar la PCR en tiempo real se realizó una dilución a la mitad de los ADNc de las muestras experimentales. Para calcular la expresión génica se utilizó el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ [206]. El CT (*threshold cycle*) es el ciclo en el que el nivel de fluorescencia alcanza una cierta cantidad (el umbral). Este método utiliza la información de CT generada a partir de un sistema de qPCR para calcular la expresión génica relativa en muestras de referencia y objetivo, utilizando un gen de referencia como el normalizador.

Los resultados se analizaron estadísticamente con ANOVA de un factor con la ayuda del programa *GraphPad Prism 5*.

Reactivo	volumen (μl)
<i>FastStart Essential DNA Green Master</i>	12.5
cDNA (DIL 1:2)	2
<i>forward primer</i>	0.5
<i>reverse primer</i>	0.5
H2O	9.5
Vf	25

Tabla 4.19: Formulación de la PCR en tiempo real.

Número de ciclos	Etapas del ciclo		Tiempo	Temperatura
1 ciclo	Desnaturalización inicial		5 min	95°C
30 ciclos	Amplificación	desnaturalización	30 seg	95°C
		<i>annealing</i>	30 seg	52°C
		extensión	30 seg	72°C
1 ciclo	elongación final		10 min	72°C

Tabla 4.20: Detalles de ciclado de PCR en tiempo real.

Caracterización bioinformática de la GST δ de *R. prolixus*

La secuencia completa de ADNc de la proteína fue obtenida mediante una búsqueda por homología con dominios PFAM de GSTs [55] en la base de datos de Vectorbase (www.vectorbase.org). La secuencia identificada fue utilizada como *query* en una búsqueda BLASTn en un transcriptoma de antena de *R. prolixus* [155]. Por comparaciones entre la secuencia disponible en Vectorbase, el transcriptoma de antenas y proteínas ortólogas de otras especies de insectos se pudo determinar que la reconstrucción de Vectorbase era incompleta, y por lo tanto fue utilizada la proteína presente en el transcriptoma de antena para los estudios realizados.

El análisis bioinformático de la secuencia completa de la proteína incluyó los siguientes puntos:

- Predicción de la secuencia aminoacídica (<http://web.expasy.org/translate/>). La traducción se realizó utilizando un código genético “standard” y se seleccionó el marco de lectura que mostraba la proteína completa sin codones de *stop*.
- Analisis de los dominios de la proteína mediante el programa online *CD-search tool* del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).
- Alineamiento estructural utilizando el T-COFFEE (<http://tcoffee.crg.cat>) entre las secuencias aminoacídicas de GST δ de *R. prolixus*, *D. melanogaster*, *Anopheles gambiae* y *Anopheles dirus*. El mismo fue analizado mediante el programa ESPript (<http://espript.ibcp.fr>), que otorga información acerca de la similitud secuencial y estructura secundaria de las secuencias alineadas. Se utilizaron las estructuras del Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) de *An. gambiae* (1PI9) y *A. dirus* (3G7I) como información estructural. Éstas últimas fueron elegidas por su homología con la GST de *R. prolixus*.

Evaluación de la función de la enzima GSTs δ en la detoxificación de piretroides en *R. prolixus*

A fin de estudiar la implicancia de GST δ en la detoxificación de deltametrina, utilizamos una aproximación de silenciamiento del gen por ARNi [207].

Para generar el ARN doble cadena para la interferencia fueron amplificados un fragmento del gen de la GST δ de 190 pb y un fragmento del gen heterólogo de resistencia a ampicilina de la β -lactamasa (ARNdc inespecífico utilizado para los controles) mediante dos reacciones de PCR consecutivas.

Para la primera reacción de amplificación se diseñaron *primers* conteniendo la secuencia específica del gen y un fragmento de 23 nucleótidos correspondiente a la secuencia del promotor T7 RNA polimerasa en el extremo 5'. En la segunda reacción de amplificación se utilizó como molde 1 μ L de la primera PCR y como *primers* la secuencia completa del promotor T7 (ver secuencias en la Tabla 4.3).

Para la amplificación del gen de la GST δ se utilizó como molde ADNc preparado a partir de tejido blando de ninfas del 5^{to} estadio de *R. prolixus*, de acuerdo a lo detallado en apartados anteriores. Como molde para la amplificación del gen de la β -lactamasa se utilizó el vector pGEM-T. Los detalles de las reacciones de amplificación se muestran en las tablas 4.21, 4.22 y 4.23.

Reactivo	Volumen (ul)
Buffer 10x	2.5
50 mM MgCl ₂	0.75
10 mM dNTPs Mix	0.5
GST Delta_RNAi_Fw	0.5
GST Delta_RNAi_Rv	0.5
cDNA Rh prolixus	1
Platinum taq DNA Polimerasa	0.25
H ₂ O mQ	19
Volumen final	25

Tabla 4.21: Formulación de la PCR1 de GST δ .

Reactivo	Volumen (ul)
Buffer 10x	2.5
50 mM MgCl ₂	0.75
10 mM dNTPs Mix	0.5
RNAiAMPI FW	0.5
RNAiAMPI REV	0.5
Vector pGENT	0.3
Platinum taq DNA Polimerasa	0.25
H ₂ O mQ	19.7
Volumen final	25

Tabla 4.22: Formulación de la PCR 1 para el gen de la β -lactamasa.

Reactivo	Volumen (ul)
Buffer 10x	2.5
50 mM MgCl ₂	0.75
10 mM dNTPs Mix	0.5
T7 Full	1
Molde de PCR1	1
Platinum taq DNA Poli	0.25
H ₂ O mQ	19
Volumen final	25

Tabla 4.23: Formulación de la PCR2 de los genes de GST δ y de β -lactamasa para interferencia.

Al amplicón obtenido de la segunda PCR se lo extrajo y precipitó de la siguiente forma:

Se le adiciono un volumen de fenol: cloroformo:isoamílico (25:24:1) y se centrifugó 5 min. a 13.000 rpm, la fase acuosa se transvaso a un tubo tipo *eppendorf* nuevo y se le adicionaron 2,5 volúmenes de tanol absoluto frío y 0,1 volúmenes de NaAc 3 M, pH= 4,7; se dejó a -20 °C por 12 horas. Posteriormente se centrifugó la muestra a 13.000 rpm por 20 min, se descartó el sobrenadante, se le adicionaron al precipitado 1000 μL de etanol 75 % y se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm por 5 min. Se retiró el sobrenadante y se secó el precipitado a 37 °C por 3 min; luego se resuspendió en la cantidad de agua MQ necesaria para una concentración final de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Los ARNdc se generaron mediante transcripción in vitro utilizando la enzima ARN Polimerasa T7 (Promega, EE. UU.) e incubando la reacción durante 12 hs a 37 °C (ver los componentes de la reacción de retrotranscripción en la Tabla 4.24). Posteriormente los productos de la transcripción se calentaron durante 10 min a 95 °C en un baño de agua. El baño conteniendo los tubos de reacción fue mantenido a temperatura ambiente durante 4-5 horas a fin de permitir la formación del ARNdc por hibridación de las cadenas. Por último, se los trató con DNasa I y RNasa A y se los incubó 30 min a 37°C, para eliminar el molde de ADN y el ARN simple cadena que pudiera quedar luego de la transcripción. La calidad del producto obtenido se observó en gel de agarosa 2 % y se cuantificó mediante el programa *Image J* por comparación con una banda de concentración conocida.

Al ARNdc obtenido se lo extrajo y precipito de la misma forma indicada en el paso anterior, con excepción del último paso, en el cual el precipitado se resuspendio con solución salina como se indica a continuación.

Los ARNdc del gen inespecífico fueron diluidos hasta una concentración final de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ mientras que los de GST δ fueron llevados a concentraciones de 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con solución salina. Todos se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su utilización.

Reactivo	Volumen (μL)
Buffer 5x	10
10 mM rNTPs Mix	10
Ribolock	1,25
DNA (PCR2) (1 μg)	2
T7 RNA Polimerasa	1.5
H2O mQ	26.5
Volumen final	50

Tabla 4.24: Formulación de la reacción de retrotranscripción.

Para el experimento de silenciamiento se utilizaron ninfas del 5^{to} estadio de *R. prolixus* sin alimentar desde la última ecdisis. Las mismas fueron ventralmente inyectadas en el abdomen con 2 μL de las diferentes concentraciones de ARNdc de GST δ (tratados) o de β -lactamasa a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (controles) a los siete días post muda con una jeringa NanoFi (*World Precision Instruments*, USA) de 10 μL . Las ninfas tratadas fueron topicadas con 1 μL de deltametrina diluida en acetona hasta una concentración de 0,0083 mg/mL o con 1 μL de acetona ocho días después de la inyección.

La concentración de deltametrina utilizada fue seleccionada por tratarse de la dosis que mata al 50 % de los insectos a las 24 hs luego del tratamiento bajo estas condiciones, según

determinaciones realizadas por el grupo dirigido por el Dr. Gastón Mougabure (Centro de Referencia de Vectores, Córdoba) (comunicación personal). El tratamiento realizado y los grupos se muestran en la tabla 4.25.

La mortalidad se evaluó a las 4, 5, 6, 7, 21 y 24 hs y fue definida como la imposibilidad de la ninfa de caminar hasta el borde de un papel de filtro de 11 cm de diámetro, con o sin estimulación mecánica con un pincel y/o pinza.

Inyección	Nro de insectos topicados	
	Acetona	Deltametrina
dsARN B-Lactamasa	6	6
dsARN GSTDelta 0.1 µg	9	9
dsARN GSTDelta 0.5 µg	8	8
dsARN GSTDelta 1 µg	18	18

Tabla 4.25: Detalle del número de insectos interferidos con ARNdc de GST δ o β -lactamasa y topicados con deltametrina ó acetona.

Transcriptómica y filogenia para la identificación de receptores de neuropéptidos en triatominos

Material de partida y secuenciación

Para el presente trabajo se utilizó una *library* de ADNc construida a partir del ARN expresado en todos los estadios del desarrollo (desde huevo temprano hasta adulto) de tres especies de triatominos: *T. infestans*, *T. dimidiata* y *T. pallidipennis*. La secuenciación del ADNc se realizó utilizando el equipo Roche 454 GS FLX que utiliza la tecnología de pirosecuenciación [208].

Generación de bases de datos y búsqueda de secuencias

Se generó una base de datos de los genes GPCRs ortólogos con la información hallada en la bibliografía, utilizando todos los GPCRs de *D. melanogaster* [209], *An. gambiae* [210], *A. mellifera* [200], *B. mori* [211] y *T. castaneum* [201].

Se realizó la búsqueda por homología de los genes que forman parte de la base de datos descripta mediante el algoritmo TBLASTN [212] en las bases de datos transcriptómicas (RproC1.1) y en los *scaffolds* del genoma (RproC1.1) de *R. prolixus*, disponibles en Vectorbase (www.vectorbase.org). La búsqueda se realizó asignando un *e-value* de 0,00001.

Las secuencias completas de las proteínas candidatas se identificaron y / o reconstruyeron a partir de las bases de datos de Vectorbase por análisis manual. Cada secuencia fue analizada manualmente y comparada con secuencias ortólogas mediante alineamiento. En los casos indicados, el análisis indicó que dos o más predicciones del *set* RproC1.1 formaban parte de un único GPCR. En estos casos las secuencias fueron reconstruidas manualmente de acuerdo a las predicciones y comparaciones con secuencias

ortólogas. Los dominios 7TM y los métodos de análisis filogenético se adoptaron como criterios para este estudio. La información estructural para cada candidato GPCRs se predijo con el programa TMHMM (v2.0) del Centro de Análisis de Secuencia Biológica (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

Posteriormente, con el fin de identificar GPCR en las bases de datos transcriptómicas de *T. infestans*, *T. dimidiata* y *T. pallidipennis* se utilizaron las secuencias predichas para *R. prolixus* (descriptas en el párrafo anterior) e informes previos. [199, 213, 214] como base de datos. Además, para aquellas moléculas que no se identificaron en las bases de datos de *R. prolixus* se utilizaron los ortólogos de *D. melanogaster*, *An. gambiae*, *A. mellifera*, *B. mori* y *T. castaneum*. Las búsquedas se realizaron mediante BLAST local [212] y un *e-value* de 0,00001.

Análisis filogenéticos

Se utilizó el programa *BioEdit* [215] para generar alineamientos, con el algoritmo ClustalW [216]. Estos alineamientos fueron utilizados para el análisis filogenético mediante inferencia bayesiana y con el *software* *Beast* v1.75 [217]. Los parámetros usados para el análisis fueron: Número de tipos de sustitución: 6 (GTR), Modelo de sustitución: Blosum62, Número de generaciones: 200,000 y un árbol de muestra cada 10 generaciones. Los árboles fueron graficados mediante el *software* *Figtree* (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>), quemando los primeros cinco árboles.

Parte VI

Bibliografía

Bibliografía

- [1] World health organization. <http://www.who.int/es/>. Acceso: 2018-03-01.
- [2] E.N. Zerba. *Susceptibility and resistance to insecticides of chagas disease vectors. Medicina.* **59**(2):41–46, 1999.
- [3] A. Rassi Jr, A. Rassi, y J.A. Marin-Neto. *Chagas disease. The Lancet.* **375**(9723): 1388–1402, 2010.
- [4] G.A. Mougabure-Cueto y M.I. Picollo. *Insecticide resistance in vector chagas disease: evolution, mechanisms and management. Acta Tropica.* **149**:70–85, 2015.
- [5] A. Rassi y J.M. de Rezende. *American trypanosomiasis (chagas disease). Infectious Disease Clinics.* **26**(2):275–291, 2012.
- [6] C. Franco-Paredes, M.E. Bottazzi, y P.J. Hotez. *The unfinished public health agenda of chagas disease in the era of globalization. PLoS Neglected Tropical Diseases.* **3** (7):e470, 2009.
- [7] S. Sosa-Estani y E.L. Segura. *Integrated control of chagas disease for its elimination as public health problem-a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* **110**(3): 289–298, 2015.
- [8] J.C.P. Dias. *Southern cone initiative for the elimination of domestic populations of triatoma infestans and the interruption of transfusion chagas disease: historical aspects, present situation, and perspectives. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* **102**:11–18, 2007.
- [9] J.A. Pérez-Molina y I. Molina. *Chagas disease. The Lancet.* 2017.
- [10] A. Moncayo y A.C. Silveira. *Current epidemiological trends of chagas disease in latin america and future challenges: epidemiology, surveillance, and health policies.* In *American Trypanosomiasis Chagas Disease (Second Edition)*, pages 59–88. Elsevier, 2017.
- [11] H. Lent, P. Wygodzinsky, et al. *Revision of the triatominae (hemiptera, reduviidae), and their significance as vectors of chagas’ disease.. Bulletin of the American Museum of Natural History.* **163**(3):123–520, 1979.
- [12] I. Molina, F. Salvador, y A. Sánchez-Montalvá. *Actualización en enfermedad de chagas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* **34**(2):132–138, 2016.
- [13] J.R. Coura y J.C.P. Dias. *Epidemiology, control and surveillance of chagas disease: 100 years after its discovery. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* **104**:31–40, 2009.

- [14] I. Molina, J. Gómez i Prat, F. Salvador, B. Treviño, E. Sulleiro, N. Serre, D. Pou, S. Roure, J. Cabezos, L. Valerio, et al. *Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic chagas' disease. New England Journal of Medicine.* **370**(20): 1899–1908, 2014.
- [15] S.A. Justi, C. Galvão, y C.G. Schrago. *Geological changes of the americas and their influence on the diversification of the neotropical kissing bugs (hemiptera: Reduviidae: Triatominae).* *PLoS Neglected Tropical Diseases.* **10**(4):e0004527, 2016.
- [16] S.A. Justi y C. Galvão. *The evolutionary origin of diversity in chagas disease vectors. Trends in Parasitology.* **33**(1):42–52, 2017.
- [17] C.J. Schofield y C. Galvão. *Classification, evolution, and species groups within the triatominae. Acta Tropica.* **110**(2-3):88–100, 2009.
- [18] L.B. Abrahan, D.E. Gorla, y S.S. Catalá. *Dispersal of triatoma infestans and other triatominae species in the arid chaco of argentina: flying, walking or passive carriage? the importance of walking females. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* **106**(2):232–239, 2011.
- [19] C.J. Schofield y J.N. Matthews. *Theoretical approach to active dispersal and colonization of houses by triatoma infestans.. The Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* **88**(3):211–222, 1985.
- [20] C.J. Schofield, M.J. Lehane, P. McEwen, S.S. Catala, y D.E. Gorla. *Dispersive flight by triatoma infestans under natural climatic conditions in argentina. Medical and Veterinary Entomology.* **6**(1):51–56, 1992.
- [21] S. Vallvé, O. Muscio, M. Ghillini, A. Alberti, y C. Wisnivesky-Colli. *Dispersal flight by triatoma infestans in an arid area of argentina. Medical and Veterinary Entomology.* **2**(4):401–404, 1988.
- [22] M.J. Lehane y C.J. Schofield. *Flight initiation in triatoma infestans (klug)(hemiptera: Reduviidae). Bulletin of Entomological Research.* **72**(3):497–510, 1982.
- [23] M.J. Lehane, P.K. McEwen, C.J. Whitaker, y C.J. Schofield. *The role of temperature and nutritional status in flight initiation by triatoma infestans. Acta Tropica.* **52**(1):27–38, 1992.
- [24] P.K. McEwen y M.J. Lehane. *Factors influencing flight initiation in the triatomine bug triatoma sordida (hemiptera: Reduviidae). International Journal of Tropical Insect Science.* **14**(4):461–464, 1993.
- [25] P.K. McEwen y M.J. Lehane. *Relationships between flight initiation and oviposition in triatoma infestans (klug)(hem., reduviidae). Journal of Applied Entomology.* **117**(1-5):217–223, 1994.
- [26] N.G. Williams y C.J. Schofield. *The role of temperature in flight initiation of triatomine bugs. In Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* volume 79, pages 282–282. ROYAL SOC TROPICAL MEDICINE MANSON HOUSE 26 PORTLAND PLACE, LONDON, ENGLAND W1N 4EY, 1985.

- [27] R.A. Alzogaray y E.N. Zerba. *Rhodnius prolixus intoxicated*. *Journal of Insect Physiology*. **97**:93–113, 2017.
- [28] P. Mamidala, S.C. Jones, y O. Mittapalli. *Metabolic resistance in bed bugs*. *Insects*. **2**(1):36–48, 2011.
- [29] WHO Expert Committee on Insecticides, World Health Organization, et al. *Expert committee on insecticides: seventh report [of a meeting held in geneva from 10 to 17 july 1956]*. 1957.
- [30] G.A. Yahouédo, F. Chandre, M. Rossignol, C. Ginibre, V. Balabanidou, N.G.A. Mendez, O. Pigeon, J. Vontas, y S. Cornelie. *Contributions of cuticle permeability and enzyme detoxification to pyrethroid resistance in the major malaria vector anopheles gambiae*. *Scientific Reports*. **7**(1):11091, 2017.
- [31] X. Li, M.A. Schuler, y M.R. Berenbaum. *Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics*. *Annual Review of Entomology*. **52**: 231–253, 2007.
- [32] M.P. Juárez y G.C. Fernández. *Cuticular hydrocarbons of triatomines*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. **147**(3): 711–730, 2007.
- [33] M.P. Juárez, N. Pedrini, J.R. Girotti, y S.J. Mijailovsky. *Pyrethroid resistance in chagas disease vectors: The case of triatoma infestans cuticle.. Review*. *Resistant Pest Management Newsletter*. **19**(2):59–61, 2010.
- [34] N. Pedrini, S.J. Mijailovsky, J.R. Girotti, R. Stariolo, R.M. Cardozo, A. Gentile, y M.P. Juárez. *Control of pyrethroid-resistant chagas disease vectors with entomopathogenic fungi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. **3**(5):e434, 2009.
- [35] A. Romero, M.F. Potter, y K.F. Haynes. *Behavioral responses of the bed bug to insecticide residues*. *Journal of Medical Entomology*. **46**(1):51–57, 2009.
- [36] V. Salgado. *BASF Insecticide Mode of Action Technical Training Manual*. 12 2013.
- [37] P.F. Zermoglio, H. Martin-Herrou, Y. Bignon, y C.R. Lazzari. *Rhodnius prolixus smells repellents: behavioural evidence and test of present and potential compounds inducing repellency in chagas disease vectors*. *Journal of Insect Physiology*. **81**: 137–144, 2015.
- [38] G.B. White, S.J. Moore, M. Debboun, S.P. Frances, et al. *Terminology of insect repellents*. *Insect Repellent, Handbook*, 2015.
- [39] G.B. White. *Terminology of insect repellents. insect repellents. principles, methods and uses*. edited by: Debboun m, frances sp, strickman d. 2007.
- [40] S.B. McIver. *A model for the mechanism of action of the repellent deet on aedes aegypti (diptera: Culicidae)*. *Journal of Medical Entomology*. **18**(5):357–361, 1981.
- [41] M. Ditzen, M. Pellegrino, y L.B. Vosshall. *Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent deet*. *Science*. **319**(5871):1838–1842, 2008.

- [42] Z. Syed y W.S. Leal. *Mosquitoes smell and avoid the insect repellent deet. Proceedings of the National Academy of Sciences.* **105**(36):13598–13603, 2008.
- [43] J.D. Bohbot y J.C. Dickens. *Insect repellents: modulators of mosquito odorant receptor activity. PLoS One.* **5**(8):e12138, 2010.
- [44] M.D. Buescher, L.C. Rutledge, R.A. Wirtz, y J.H. Nelson. *Laboratory repellent tests against rhodnius prolixus (heteroptera: Reduviidae). Journal of Medical Entomology.* **22**(1):49–53, 1985.
- [45] R.A. Alzogaray, A. Fontán, y E.N. Zerba. *Repellency of deet to nymphs of triatoma infestans. Medical and Veterinary Entomology.* **14**(1):6–10, 2000.
- [46] V. Sfara, G. Mougabure-Cueto, E.N. Zerba, y R.A. Alzogaray. *Adaptation of the repellency response to deet in rhodnius prolixus. Journal of Insect Physiology.* **57**(10):1431–1436, 2011.
- [47] V. Sfara, E.N. Zerba, y R.A. Alzogaray. *Toxicity of pyrethroids and repellency of diethyltoluamide in two deltamethrin-resistant colonies of triatoma infestans klug, 1834 (hemiptera: Reduviidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* **101**(1):89–94, 2006.
- [48] C.T. Lewis. *The penetration of cuticle by insecticides.* In *Cuticle Techniques in Arthropods*, pages 367–400. Springer, 1980.
- [49] M.P. Juárez. *Inhibition of cuticular lipid synthesis and its effect on insect survival. Archives of Insect Biochemistry and Physiology.* **25**(3):177–191, 1994.
- [50] R. Koganemaru, D.M. Miller, y Z.N. Adelman. *Robust cuticular penetration resistance in the common bed bug (cimex lectularius l.) correlates with increased steady-state transcript levels of cpr-type cuticle protein genes. Pesticide Biochemistry and Physiology.* **106**(3):190–197, 2013.
- [51] V. Balabanidou, A. Kampouraki, M. MacLean, G.J. Blomquist, C. Tittiger, M.P. Juárez, S.J. Mijailovsky, G. Chalepakis, A. Anthousi, A. Lynd, et al. *Cytochrome p450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in anopheles gambiae. Proceedings of the National Academy of Sciences.* **113**(33):9268–9273, 2016.
- [52] D.G. Lilly, S.L. Latham, C.E. Webb, y S.L. Doggett. *Cuticle thickening in a pyrethroid-resistant strain of the common bed bug, cimex lectularius l.(hemiptera: Cimicidae). PLoS One.* **11**(4):e0153302, 2016.
- [53] O.R. Wood, S. Hanrahan, M. Coetzee, L.L. Koekemoer, y B.D. Brooke. *Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector anopheles funestus. Parasites & Vectors.* **3**(1):67, 2010.
- [54] J. Oakeshott, C. Claudianos, P.M. Campbell, R.D. Newcomb, R. Russell, y L.I. Gilbert. *Biochemical genetics and genomics of insect esterases. Comprehensive Molecular Insect Science.* **5**, 2005.

- [55] L. Traverso, A. Lavore, I. Sierra, V. Palacio, J. Martinez-Barnette, J.M. Latorre-Estivalis, G. Mougabure-Cueto, F. Francini, M.G. Lorenzo, Ma.H. Rodríguez, et al. *Comparative and functional triatomine genomics reveals reductions and expansions in insecticide resistance-related gene families. PLoS Neglected Tropical Diseases.* **11** (2):e0005313, 2017.
- [56] P.L. Santo-Orihuela, C.V. Vassena, E.N. Zerba, y M.I. Picollo. *Relative contribution of monooxygenase and esterase to pyrethroid resistance in triatoma infestans (hemiptera: Reduviidae) from argentina and bolivia. Journal of Medical Entomology.* **45**(2):298–306, 2008.
- [57] P.L. Santo-Orihuela, G. Carvajal, M.I. Picollo, y C.V. Vassena. *Analysing deltamethrin susceptibility and pyrethroid esterase activity variations in sylvatic and domestic triatoma infestans at the embryonic stage. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* **108**(8):1031–1036, 2013.
- [58] C. Claudianos, H. Ranson, R.M. Johnson, S. Biswas, M.A. Schuler, M.R. Berenbaum, R. Feyereisen, y J.G. Oakeshott. *A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. Insect Molecular Biology.* **15**(5):615–636, 2006.
- [59] R. Feyereisen. *Insect cytochrome p450.* 2005.
- [60] D. Mansuy. *The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes p4501. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology.* **121**(1-3):5–14, 1998.
- [61] R. Feyereisen. *Evolution of insect p450,* 2006.
- [62] M. Maibèche-Coisne, L. Monti-Dedieu, S. Aragon, y C. Dauphin-Villemant. *A new cytochrome p450 from drosophila melanogaster, cyp4g15, expressed in the nervous system. Biochemical and Biophysical Research Communications.* **273**(3):1132–1137, 2000.
- [63] M. Maibèche-Coisne, E. Jacquin-Joly, M.C. François, N.L. Meillour, et al. *cDNA cloning of biotransformation enzymes belonging to the cytochrome p450 family in the antennae of the noctuid moth mamestra brassicae. Insect Molecular Biology.* **11** (3):273–281, 2002.
- [64] M. Maibèche-Coisne, C. Merlin, M.C. François, P. Porcheron, y E. Jacquin-Joly. *P450 and p450 reductase cdnas from the moth mamestra brassicae: cloning and expression patterns in male antennae. Gene.* **346**:195–203, 2005.
- [65] N. Liu y J.G. Scott. *Increased transcription of cyp6d1 causes cytochrome p450-mediated insecticide resistance in house fly. Insect Biochemistry and Molecular Biology.* **28**(8):531–535, 1998.
- [66] R. Feyereisen. *Insect p450 enzymes. Annual Review of Entomology.* **44**(1):507–533, 1999.
- [67] C.V. Vassena, M.I. Picollo, y E.N. Zerba. *Insecticide resistance in brazilian triatoma infestans and venezuelan rhodnius prolixus. Medical and Veterinary Entomology.* **14** (1):51–55, 2000.

- [68] M.I. Picollo, C. Vassena, P. Santo Orihuela, S. Barrios, M. Zaidemberg, y E. Zerba. *High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in triatoma infestans (hemiptera: Reduviidae) from northern argentina. Journal of Medical Entomology.* **42**(4):637–642, 2005.
- [69] C.V. Vassena y M.I. Picollo. *Monitoreo de resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de triatoma infestans y rhodnius prolixus, insectos vectores de la enfermedad de chagas. Revista de Toxicología (en línea).* **3**, 2003.
- [70] A.J. Ketterman, C. Saisawang, y J. Wongsantichon. *Insect glutathione transferases. Drug Metabolism Reviews.* **43**(2):253–265, 2011.
- [71] A.A. Enayati, H. Ranson, y J. Hemingway. *Insect glutathione transferases and insecticide resistance. Insect Molecular Biology.* **14**(1):3–8, 2005.
- [72] V. Aravindan, S. Muthukumaravel, y K. Gunasekaran. *Interaction affinity of delta and epsilon class glutathione-s-transferases (gsts) to bind with ddt for detoxification and conferring resistance in anopheles gambiae, a malaria vector. Journal of Vector Borne Diseases.* **51**(1):8, 2014.
- [73] R. Schama, N. Pedrini, M.P. Juárez, D.R. Nelson, A.Q. Torres, D. Valle, y R.D. Mesquita. *Rhodnius prolixus supergene families of enzymes potentially associated with insecticide resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology.* **69**:91–104, 2016.
- [74] J.G. Vontas, J. Graham, D.C. Nikou, H. Ranson, y J. Hemingway. *Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione s-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, nilaparvata lugens. Biochemical Journal.* **362**(2):329–337, 2002.
- [75] K.S. Silver, Y. Du, Y. Nomura, E.E. Oliveira, V.L. Salgado, B.S. Zhorov, y K. Dong. *Voltage-gated sodium channels as insecticide targets. In Advances in Insect Physiology*, volume 46, pages 389–433. Elsevier, 2014.
- [76] D.M. Soderlund. *Sodium channels. Comprehensive Insect Science. Pharmacology.* **5**, 2005.
- [77] J.E. Casida y K.A. Durkin. *Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. Annual Review of Entomology.* **58**:99–117, 2013.
- [78] K.J. Kontis, A. Rounaghi, y A.L. Goldin. *Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains. Journal of General Physiology.* **110**(4):391–401, 1997.
- [79] W.A. Catterall. *Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. Neuron.* **67**(6):915–928, 2010.
- [80] Y. Du, Y. Nomura, B.S. Zhorov, y K. Dong. *Sodium channel mutations and pyrethroid resistance in aedes aegypti. Insects.* **7**(4):60, 2016.
- [81] W. Song, Z. Liu, J. Tan, Y. Nomura, y K. Dong. *Rna editing generates tissue-specific sodium channels with distinct gating properties. Journal of Biological Chemistry.* **279**(31):32554–32561, 2004.

- [82] J. Tan, Z. Liu, Y. Nomura, A.L. Goldin, y K. Dong. *Alternative splicing of an insect sodium channel gene generates pharmacologically distinct sodium channels. Journal of Neuroscience.* **22**(13):5300–5309, 2002.
- [83] D.M. Soderlund, J.M. Clark, L.P. Sheets, L.S. Mullin, V.J. Piccirillo, D. Sargent, J.T. Stevens, y M.L. Weiner. *Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. Toxicology.* **171**(1):3–59, 2002.
- [84] Y. Katsuda, N. Matsuo, y T. Mori. *Pyrethroids: From chrysanthemum to modern industrial insecticide.* 2012.
- [85] D.M. Soderlund. *Metabolic considerations in pyrethroid design. Xenobiotica.* **22** (9-10):1185–1194, 1992.
- [86] D.M. Soderlund y J.R. Bloomquist. *Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. Annual Review of Entomology.* (1):77–96, 1989.
- [87] V. Raymond-Delpech, K. Matsuda, B.M. Sattelle, J.J. Rauh, y D.B. Sattelle. *Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. Invertebrate Neuroscience.* **5**(3-4):119–133, 2005.
- [88] T. Narahashi. *Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* **79**(1):1–14, 1996.
- [89] J.R. Bloomquist. *Ion channels as targets for insecticides. Annual Review of Entomology.* **41**(1):163–190, 1996.
- [90] A.O. O'Reilly, B.P.S. Khambay, M.S. Williamson, L.M. Field, B.A. Wallace, y T.G.E. Davies. *Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. Biochemical Journal.* **396**(2):255–263, 2006.
- [91] I. Sierra, N. Capriotti, G. Fronza, G. Mougabure-Cueto, y S. Ons. *Kdr mutations in triatoma infestans from the gran chaco are distributed in two differentiated foci: Implications for pyrethroid resistance management. Acta Tropica.* **158**:208–213, 2016.
- [92] D.M. Soderlund. *Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. Pest Management Science.* **64**(6):610–616, 2008.
- [93] Y. Du, Y. Nomura, G. Satar, Z. Hu, R. Nauen, S.Y. He, B.S. Zhorov, y K. Dong. *Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. Proceedings of the National Academy of Sciences.* **110**(29):11785–11790, 2013.
- [94] E. Zlotkin. *The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. Annual Review of Entomology.* **44**(1):429–455, 1999.
- [95] F.D. Rinkevich, Y. Du, y K. Dong. *Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. Pesticide Biochemistry and Physiology.* **106**(3):93–100, 2013.
- [96] D.M. Soderlund. *Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. Archives of toxicology.* **86**(2):165–181, 2012.

- [97] J.R. Busvine et al. *Mechanism of resistance to insecticide in houseflies.. Nature*, 1951.
- [98] R. Milani. *Comportamento mendeliano della resistenza alla azione abbatante del ddt: correlazione tran abbattimento e mortalità in musca domestica l. Rivista Parasitologia*. **15**:513–42, 1954.
- [99] D.M. Soderlund y D.C. Knipple. *The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **33**(6):563–577, 2003.
- [100] J. Fabro, M. Sterkel, N. Capriotti, G.A. Mougabure-Cueto, M. Germano, R. Rivera-Pomar, y S. Ons. *Identification of a point mutation associated with pyrethroid resistance in the para-type sodium channel of triatoma infestans, a vector of chagas' disease. Infection, Genetics and Evolution*. **12**(2):487–491, 2012.
- [101] N. Capriotti, G. Mougabure-Cueto, R. Rivera-Pomar, y S. Ons. *L925i mutation in the para-type sodium channel is associated with pyrethroid resistance in triatoma infestans from the gran chaco region. PLoS Neglected Tropical Diseases*. **8**(1):e2659, 2014.
- [102] J.C.P. Dias y C.J. Schofield. *The evolution of chagas disease (american trypanosomiasis) control after 90 years since carlos chagas discovery. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **94**:103–121, 1999.
- [103] R.A. Alzogaray. *El control químico de triatoma infestans en argentina. Revista de Toxicología en línea Retel*. **9**:1–18, 2003.
- [104] G.M. Vazquez-Prokopec, C. Spillmann, M. Zaidenberg, U. Kitron, y R.E. Gürtler. *Cost-effectiveness of chagas disease vector control strategies in northwestern argentina. PLoS Neglected Tropical Diseases*. **3**(1):e363, 2009.
- [105] K. Hashimoto y C.J. Schofield. *Elimination of rhodnius prolixus in central america. Parasites & Vectors*. **5**(1):45, 2012.
- [106] C.J. Schofield, J. Jannin, y R. Salvatella. *The future of chagas disease control. Trends in Parasitology*. **22**(12):583–588, 2006.
- [107] H.R. van Doorn, E.C. Claas, K.E. Templeton, A.G. van der Zanden, A. te Koppele Vije, M.D. de Jong, J. Dankert, y E.J. Kuijper. *Detection of a point mutation associated with high-level isoniazid resistance in mycobacterium tuberculosis by using real-time pcr technology with 3-minor groove binder-dna probes. Journal of Clinical Microbiology*. **41**(10):4630–4635, 2003.
- [108] *Reunión de incosur para la eliminación del chagas*. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=4062&Itemid=270&lang=es/. Acceso: 2018-03-01.
- [109] R.E. Gürtler. *Sustainability of vector control strategies in the gran chaco region: current challenges and possible approaches. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **104**:52–59, 2009.

- [110] A.C. Toloza, M. Germano, G. Mougabure-Cueto, C. Vassena, E. Zerba, y M.I. Picollo. *Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instars of triatoma infestans (hemiptera: Reduviidae) from argentina and bolivia. Journal of Medical Entomology.* **45**(3):421–426, 2008.
- [111] M.D. Germano, G. Roca-Acevedo, G.A. Mougabure-Cueto, A.C. Toloza, C.V. Vassena, y M.I. Picollo. *New findings of insecticide resistance in triatoma infestans (heteroptera: Reduviidae) from the gran chaco. Journal of Medical Entomology.* **47**(6):1077–1081, 2010.
- [112] M.D. Germano. *Herencia y efectos demográficos de la resistencia a deltametrina en Triatoma infestans.* PhD thesis, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, 2012.
- [113] G. Carvajal, G.A. Mougabure-Cueto, y A.C. Toloza. *Toxicity of non-pyrethroid insecticides against triatoma infestans (hemiptera: Reduviidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* **107**(5):675–679, 2012.
- [114] M.D. Germano, M.I. Picollo, y G.A. Mougabure-Cueto. *Microgeographical study of insecticide resistance in triatoma infestans from argentina. Acta Tropica.* **128**(3): 561–565, 2013.
- [115] M.D. Germano, M.I. Picollo, C. Spillmann, y G.A. Mougabure-Cueto. *Fenitrothion: an alternative insecticide for the control of deltamethrin-resistant populations of triatoma infestans in northern argentina. Medical and Veterinary Entomology.* **28**(1):21–25, 2014.
- [116] R.E. Gürtler. *Eco-epidemiología regional de la transmisión vectorial: Enfermedad de chagas en el gran chaco. La enfermedad de Chagas. A la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia ancestral.* **100**:1909–2006, 2007.
- [117] G. Fronza, A.C. Toloza, M.I. Picollo, C. Spillmann, y G.A. Mougabure-Cueto. *Geographical variation of deltamethrin susceptibility of triatoma infestans (hemiptera: Reduviidae) in argentina with emphasis on a resistant focus in the gran chaco. Journal of Medical Entomology.* **53**(4):880–887, 2016.
- [118] P.L. Santo-Orihuela, C.V. Vassena, G. Carvajal, E. Clark, S. Menacho, R. Bozo, R.H. Gilman, C. Bern, y P.L. Marcet. *Toxicological, enzymatic, and molecular assessment of the insecticide susceptibility profile of triatoma infestans (hemiptera: Reduviidae, triatominae) populations from rural communities of santa cruz, bolivia. Journal of Medical Entomology.* **54**(1):187–195, 2016.
- [119] G.M. Calderón-Fernández, D.E. Moriconi, A.B. Dulbecco, y M.P. Juárez. *Transcriptome analysis of the triatoma infestans (hemiptera: Reduviidae) integument. Journal of Medical Entomology.* **54**(6):1531–1542, 2017.
- [120] C.G. Grosso, M.J. Blariza, G.A. Mougabure-Cueto, M.I. Picollo, y B.A. García. *Identification of three cytochrome p450 genes in the chagas' disease vector triatoma infestans: Expression analysis in deltamethrin susceptible and resistant populations. Infection, Genetics and Evolution.* **44**:459–470, 2016.

- [121] S. Ons. *Neuropeptides in the regulation of rhodnius prolixus physiology. Journal of Insect Physiology.* **97**:77–92, 2017.
- [122] N. Audsley y R.E. Down. *G protein coupled receptors as targets for next generation pesticides. Insect Biochemistry and Molecular Biology.*
- [123] H. Verlinden, R. Vleugels, S. Zels, S. Dillen, C. Lenaerts, K. Crabbé, J. Spit, y J.V. Broeck. *Receptors for neuronal or endocrine signalling molecules as potential targets for the control of insect pests.* In *Advances in Insect Physiology*, volume 46, pages 167–303. Elsevier, 2014.
- [124] I. Plavšín, T. Stašková, M. Šerý, V. Smýkal, B.K. Hackenberger, y D. Kodrík. *Hormonal enhancement of insecticide efficacy in tribolium castaneum: oxidative stress and metabolic aspects. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* **170**:19–27, 2015.
- [125] J.A. Veenstra. *Does corazonin signal nutritional stress in insects?. Insect Biochemistry and Molecular Biology.* **39**(11):755–762, 2009.
- [126] N. Yu, O. Christiaens, J. Liu, J. Niu, K. Cappelle, S. Caccia, H. Huvenne, y G. Smagghe. *Delivery of dsrna for rnaï in insects: an overview and future directions. Insect Science.* **20**(1):4–14, 2013.
- [127] R. Katoch, A. Sethi, N. Thakur, y L.L. Murdock. *Rnai for insect control: current perspective and future challenges. Applied Biochemistry and Biotechnology.* **171**(4): 847–873, 2013.
- [128] N. Wynant, D. Santos, y J.V. Broeck. *Biological mechanisms determining the success of rna interference in insects.* In *International Review of Cell and Molecular Biology*, volume 312, pages 139–167. Elsevier, 2014.
- [129] J.P. Wulff, I. Sierra, M. Sterkel, M. Holtorf, P. Van Wielendaele, F. Francini, J.V. Broeck, y S. Ons. *Orcokinin neuropeptides regulate ecdysis in the hemimetabolous insect rhodnius prolixus. Insect Biochemistry and Molecular Biology.* **81**:91–102, 2017.
- [130] K. Dong, Y. Du, F. Rinkevich, Y. Nomura, P. Xu, L. Wang, K. Silver, y B.S. Zhorov. *Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology.* **50**:1–17, 2014.
- [131] C.A. Rohl, F.A. Boeckman, C. Baker, T. Scheuer, W.A. Catterall, y R.E. Klevit. *Solution structure of the sodium channel inactivation gate. Biochemistry.* **38**(3): 855–861, 1999.
- [132] J.W. West, R. Numann, B.J. Murphy, T. Scheuer, y W.A. Catterall. *A phosphorylation site in the na⁺ channel required for modulation by protein kinase c. Science.* **254**(5033):866–868, 1991.
- [133] M.J. Espy, J.R. Uhl, L.M. Sloan, S.P. Buckwalter, M.F. Jones, E.A. Vetter, J.D.C. Yao, N.L. Wengenack, J.E. Rosenblatt, F.R. Cockerill, et al. *Real-time pcr in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clinical Microbiology Reviews.* **19**(1):165–256, 2006.

- [134] C. Pasay, L. Arlian, M. Morgan, D. Vyszanski-Moher, A. Rose, D. Holt, S. Walton, y J. McCarthy. *High-resolution melt analysis for the detection of a mutation associated with permethrin resistance in a population of scabies mites. Medical and Veterinary Entomology.* **22**(1):82–88, 2008.
- [135] M.D. Germano, P. Santo-Orihuela, G. Roca-Acevedo, A.C. Toloza, C.V. Vasse-na, M.I. Picollo, y G.A. Mougabure-Cueto. *Scientific evidence of three different insecticide-resistant profiles in triatoma infestans (hemiptera: Reduviidae) popula-tions from argentina and bolivia. Journal of Medical Entomology.* **49**(6):1355–1360, 2014.
- [136] R. Feyereisen. *Insect p450 inhibitors and insecticides: challenges and opportunities. Pest management science.* **71**(6):793–800, 2015.
- [137] G. Roca-Acevedo, M.I. Picollo, y P. Santo-Orihuela. *Expression of insecticide resis-tance in immature life stages of triatoma infestans (hemiptera: Reduviidae). Journal of Medical Entomology.* **50**(4):816–818, 2013.
- [138] G. Roca-Acevedo, M.I. Picollo, N. Capriotti, I. Sierra, y P.L. Santo-Orihuela. *Exa-mining mechanisms of pyrethroid resistance in eggs of two populations of the chagas’ disease vector triatoma infestans (hemiptera: Reduviidae). Journal of Medical En-tomology.* **52**(5):987–992, 2015.
- [139] J.G. Vontas, J. Graham, y J. Hemingway. *Glutathione s-transferases as antioxi-dant defence agents confer pyrethroid resistance in nilaparvata lugens. Biochemical Journal.* **357**(1):65–72, 2001.
- [140] I. Kostaropoulos, A.I. Papadopoulos, A. Metaxakis, E. Boukouvala, y E. Papadopolou-Mourkidou. *Glutathione s-transferase in the defence against py-rethroids in insects. Insect Biochemistry and Molecular Biology.* **31**(4-5):313–319, 2001.
- [141] H. Ranson y J. Hemingway. *Glutathione transferases.* 2005.
- [142] S.M. Hammond. *Dicing and slicing. FEBS Letters.* **579**(26):5822–5829, 2005.
- [143] L. Gu y D.C. Knipple. *Recent advances in rna interference research in insects: Implications for future insect pest management strategies. Crop Protection.* **45**:36–40, 2013.
- [144] C.C. Mello y C. Jr. Darryl. *Revealing the world of rna interference. Nature.* **431**(7006):338, 2004.
- [145] G.J. Hannon. *Rna interference. Nature.* **418**(6894):244, 2002.
- [146] X.H. Wang, R. Aliyari, W.X. Li, H.W. Li, K. Kim, R. Carthew, P. Atkinson, y S.W. Ding. *Rna interference directs innate immunity against viruses in adult drosophila. Science.* **312**(5772):452–454, 2006.
- [147] C.D. Kuhn y L. Joshua-Tor. *Eukaryotic argonautes come into focus. Trends in Biochemical Sciences.* **38**(5):263–271, 2013.

- [148] L. He y G.J. Hannon. *Micrnas: small rnas with a big role in gene regulation. Nature Reviews Genetics.* **5**(7):522, 2004.
- [149] R.W. Carthew y E.J. Sontheimer. *Origins and mechanisms of mirnas and sirnas. Cell.* **136**(4):642–655, 2009.
- [150] M. Ghildiyal y P.D. Zamore. *Small silencing rnas: an expanding universe. Nature Reviews Genetics.* **10**(2):94, 2009.
- [151] X. Bellés. *Beyond drosophila: Rnai in vivo and functional genomics in insects. Annual Review of Entomology.* **55**:111–128, 2010.
- [152] R.D. Mesquita, R.J. Vionette-Amaral, C. Lowenberger, R. Rivera-Pomar, F.A. Monteiro, P. Minx, J. Spieth, A.B. Carvalho, F. Panzera, D. Lawson, et al. *Genome of rhodnius prolixus, an insect vector of chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. Proceedings of the National Academy of Sciences.* **112**(48):14936–14941, 2015.
- [153] P.A. Buxton. *The biology of a blood-sucking bug, rhodnius prolixus. Ecological Entomology.* **78**(2):227–256, 1930.
- [154] V.B. Wigglesworth. *Memoirs: The physiology of ecdysis in rhodnius prolixus (hemiptera). ii. factors controlling moulting and ‘metamorphosis’. Journal of Cell Science.* **2**(306):191–222, 1934.
- [155] J.M. Latorre-Estivalis, H.M. Robertson, K.K.O. Walden, J. Ruiz, L.O. Gonçalves, A.A. Guarneri, y M.G. Lorenzo. *The molecular sensory machinery of a chagas disease vector: expression changes through imaginal moult and sexually dimorphic features. Scientific Reports.* **7**:40049, 2017.
- [156] L. Chen, P.R. Hall, X.E. Zhou, H. Ranson, J. Hemingway, y E.J. Meehan. *Structure of an insect δ -class glutathione s-transferase from a ddt-resistant strain of the malaria vector anopheles gambiae. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography.* **59**(12):2211–2217, 2003.
- [157] J. Wongsantichon, R.C. Robinson, y A.J. Ketterman. *Structural evidence for conformational changes of delta class glutathione transferases after ligand binding. Archives of Biochemistry and Biophysics.* **521**(1-2):77–83, 2012.
- [158] J.P. Burand y W.B. Hunter. *Rnai: future in insect management. Journal of Invertebrate Pathology.* **112**:S68–S74, 2013.
- [159] M. Sterkel, H.D. Perdomo, M.G. Guizzo, A.B.F. Barletta, R.D. Nunes, F.A. Dias, M.H.F. Sorgine, y P.L. Oliveira. *Tyrosine detoxification is an essential trait in the life history of blood-feeding arthropods. Current Biology.* **26**(16):2188–2193, 2016.
- [160] N. Esponda Behrens. *Estudios funcionales comparados de la evolución de la segmentación en insectos.* PhD thesis, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, 2014.
- [161] R.N. Araujo, A. Santos, F.S. Pinto, N.F. Gontijo, M.J. Lehane, y M.H. Pereira. *Rna interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug rhodnius prolixus (hemiptera: Reduviidae) by dsrna ingestion or injection. Insect Biochemistry and Molecular Biology.* **36**(9):683–693, 2006.

- [162] M.M.A. Whitten, P.D. Facey, R. Del Sol, L.T. Fernández-Martínez, M.C. Evans, J.J. Mitchell, O.G. Bodger, y P.J. Dyson. *Symbiont-mediated rna interference in insects*. In *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, volume 283, page 20160042. The Royal Society, 2016.
- [163] G. Gäde y G.J. Goldsworthy. *Insect peptide hormones: a selective review of their physiology and potential application for pest control*. *Pest Management Science*. **59** (10):1063–1075, 2003.
- [164] M. Altstein y D.R. Nässel. *Neuropeptide signaling in insects*. In *Neuropeptide systems as targets for parasite and pest control*, pages 155–165. Springer, 2010.
- [165] D.R. Nässel. *Neuropeptides in the nervous system of drosophila and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones*. *Progress in Neurobiology*. **68** (1):1–84, 2002.
- [166] L.D. Fricker. *Neuropeptides and other bioactive peptides: from discovery to function*. In *Colloquium Series on Neuropeptides*, volume 1, pages 1–122. Morgan & Claypool Life Sciences, 2012.
- [167] J.A. Veenstra. *Mono-and dibasic proteolytic cleavage sites in insect neuroendocrine peptide precursors*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. **43**(2):49–63, 2000.
- [168] M.R. Elphick, O. Mirabeau, y D. Larhammar. *Evolution of neuropeptide signalling systems*. *Journal of Experimental Biology*. **221**(3):jeb151092, 2018.
- [169] D. Pauls, J. Chen, W. Reiher, J.T. Vanselow, A. Schlosser, J. Kahnt, y C. Wegener. *Peptidomics and processing of regulatory peptides in the fruit fly drosophila*. *EuPA Open Proteomics*. **3**:114–127, 2014.
- [170] C. Wegener y A. Gorbashov. *Molecular evolution of neuropeptides in the genus drosophila*. *Genome Biology*. **9**(8):R131, 2008.
- [171] D.R. Nässel y A.M. Winther. *Drosophila neuropeptides in regulation of physiology and behavior*. *Progress in Neurobiology*. **92**(1):42–104, 2010.
- [172] S. Ons, A. Lavore, M. Sterkel, J.P. Wulff, I.S. Sierra, J. Martínez-Barnette, M.H. Rodriguez, y R. Rivera-Pomar. *Identification of g protein coupled receptors for opsines and neurohormones in rhodnius prolixus. genomic and transcriptomic analysis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **69**:34–50, 2016.
- [173] L. Traverso, I. Sierra, M. Sterkel, F. Francini, y S. Ons. *Neuropeptidomics in triatoma infestans. comparative transcriptomic analysis among triatomines*. *Journal of Physiology*. **110**(3):83–98, 2016.
- [174] W.G. Bendena. *Neuropeptide physiology in insects*. In *Neuropeptide Systems as Targets for Parasite and Pest Control*, pages 166–191. Springer, 2010.
- [175] M. Sterkel, H. Urlaub, R. Rivera-Pomar, y S. Ons. *Functional proteomics of neuropeptidome dynamics during the feeding process of rhodnius prolixus*. *Journal of Proteome Research*. **10**(8):3363–3371, 2011.

- [176] M. Sterkel, P.L. Oliveira, H. Urlaub, S. Hernandez-Martinez, R. Rivera-Pomar, y S. Ons. *Okb, a novel family of brain-gut neuropeptides from insects. Insect Biochemistry and Molecular Biology.* **42**(7):466–473, 2012.
- [177] H. Sano, A. Nakamura, M.J. Texada, J.W. Truman, H. Ishimoto, A. Kamikouchi, Y. Nibu, K. Kume, T. Ida, y M. Kojima. *The nutrient-responsive hormone cchamide-2 controls growth by regulating insulin-like peptides in the brain of drosophila melanogaster. PLoS Genetics.* **11**(5):e1005209, 2015.
- [178] G.R. Ren, F. Hauser, K.F. Rewitz, S. Kondo, A.F. Engelbrecht, A.K. Didriksen, S.R. Schjøtt, F.E. Sembach, S. Li, K.C. Sogaard, et al. *Cchamide-2 is an orexigenic brain-gut peptide in drosophila. PLoS One.* **10**(7):e0133017, 2015.
- [179] A. Farhan, J. Gulati, E. Große-Wilde, H. Vogel, B.S. Hansson, y M. Knaden. *The cchamide 1 receptor modulates sensory perception and olfactory behavior in starved drosophila. Scientific Reports.* **3**:2765, 2013.
- [180] H. Patel, I. Orchard, J.A. Veenstra, y A.B. Lange. *Reprint of “the distribution and physiological effects of three evolutionarily and sequence-related neuropeptides in rhodnius prolixus: Adipokinetic hormone, corazonin and adipokinetic hormone/corazonin-related peptide”. General and Comparative Endocrinology.* **203**: 307–314, 2014.
- [181] M. Alves-Bezerra, I.F. De Paula, J.M. Medina, G. Silva-Oliveira, J.S. Medeiros, G. Gäde, y K.C. Gondim. *Adipokinetic hormone receptor gene identification and its role in triacylglycerol metabolism in the blood-sucking insect rhodnius prolixus. Insect Biochemistry and Molecular Biology.* **69**:51–60, 2016.
- [182] M. Zandawala, Z. Hamoudi, A.B. Lange, y I. Orchard. *Adipokinetic hormone signalling system in the chagas disease vector, rhodnius prolixus. Insect Molecular Biology.* **24**(2):264–276, 2015.
- [183] G. Gäde y H.G. Marco. *Akh/rpch peptides.* In *Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition)*, pages 185–190. Elsevier, 2013.
- [184] D. Kodrík y R. Socha. *The effect of insecticide on adipokinetic hormone titre in the insect body. Pest Management Science.* **61**(11):1077–1082, 2005.
- [185] D. Kodrík, I. Bárt, y R. Socha. *Adipokinetic hormone (pyrap-akh) enhances the effect of a pyrethroid insecticide against the firebug pyrrhocoris apterus. Pest Management Science.* **66**(4):425–431, 2010.
- [186] G.D. Baldridge y R. Feyereisen. *Blood meal and cytochrome p-450 monooxygenases in the northern house mosquito, culex pipiens. Pesticide Biochemistry and Physiology.* **25**(3):407–413, 1986.
- [187] B.L. Spillings, M. Coetzee, L.L. Koekemoer, y B.D. Brooke. *The effect of a single blood meal on the phenotypic expression of insecticide resistance in the major malaria vector anopheles funestus. Malaria Journal.* **7**(1):226, 2008.
- [188] D.J. Candy. *Adipokinetic hormones concentrations in the haemolymph of schistocerca gregaria, measured by radioimmunoassay. Insect Biochemistry and Molecular Biology.* **32**(11):1361–1367, 2002.

- [189] D. Kodrík, A. Bednářová, M. Zemanová, y N. Krishnan. *Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects—an update. International Journal of Molecular Sciences.* **16**(10):25788–25816, 2015.
- [190] M. Velki, D. Kodrík, J. Večeřa, B.K. Hackenberger, y R. Socha. *Oxidative stress elicited by insecticides: a role for the adipokinetic hormone. General and Comparative Endocrinology.* **172**(1):77–84, 2011.
- [191] J.C. Hsu, T.Y. Chien, C.C. Hu, M.J.M Chen, W.J. Wu, H.T. Feng, D.S. Haymer, y C.Y. Chen. *Discovery of genes related to insecticide resistance in bactrocera dorsalis by functional genomic analysis of a de novo assembled transcriptome. PloS One.* **7**(8):e40950, 2012.
- [192] S.G. Gregory. *Contig assembly. eLS.* 2005.
- [193] E.W. Myers, G.G. Sutton, A.L. Delcher, I.M. Dew, D.P. Fasulo, M.J. Flanigan, S.A. Kravitz, C.M. Mobarry, K.H.J. Reinert, K.A. Remington, et al. *A whole-genome assembly of drosophila. Science.* **287**(5461):2196–2204, 2000.
- [194] V.E. Velculescu, L. Zhang, W. Zhou, J. Vogelstein, M.A. Basrai, D.E. Bassett, P. Hieter, B. Vogelstein, y K.W. Kinzler. *Characterization of the yeast transcriptome. Cell.* **88**(2):243–251, 1997.
- [195] J. Caers, H. Verlinden, S. Zels, H.P. Vandersmissen, K. Vuerinckx, y L. Schoofs. *More than two decades of research on insect neuropeptide gpcrs: an overview. Frontiers in Endocrinology.* **3**:151, 2012.
- [196] U. Gether. *Uncovering molecular mechanisms involved in activation of g protein-coupled receptors. Endocrine Reviews.* **21**(1):90–113, 2000.
- [197] T. Brody y A. Cravchik. *Drosophila melanogaster g protein-coupled receptors. The Journal of Cell Biology.* **150**(2):F83–F88, 2000.
- [198] Y. Tanaka, Y. Suetsugu, K. Yamamoto, H. Noda, y T. Shinoda. *Transcriptome analysis of neuropeptides and g-protein coupled receptors (gpcrs) for neuropeptides in the brown planthopper nilaparvata lugens. Peptides.* **53**:125–133, 2014.
- [199] M. Zandawala, S. Li, F. Hauser, C.J.P. Grimmlikhuijzen, y I. Orchard. *Isolation and functional characterization of calcitonin-like diuretic hormone receptors in rhodnius prolixus. PLoS One.* **8**(11):e82466, 2013.
- [200] F. Hauser, G. Cazzamali, M. Williamson, W. Blenau, y C.J.P. Grimmlikhuijzen. *A review of neurohormone gpcrs present in the fruitfly drosophila melanogaster and the honey bee apis mellifera. Progress in Neurobiology.* **80**(1):1–19, 2006.
- [201] F. Hauser, G. Cazzamali, M. Williamson, Y. Park, B. Li, Y. Tanaka, R. Predel, S. Neupert, J. Schachtner, P. Verleyen, et al. *A genome-wide inventory of neurohormone gpcrs in the red flour beetle tribolium castaneum. Frontiers in Neuroendocrinology.* **29**(1):142–165, 2008.
- [202] C. Li, X. Yun, X. Hu, Y. Zhang, M. Sang, X. Liu, W. Wu, y B. Li. *Identification of g protein-coupled receptors in the pea aphid, acyrthosiphon pisum. Genomics.* **102**(4):345–354, 2013.

- [203] M.J.I. Paine y B. Brooke. *Insecticide resistance and its impact on vector control*. In *Advances in Insect Control and Resistance Management*, pages 287–312. Springer, 2016.
- [204] J.G. Scott. *Cytochromes p450 and insecticide resistance*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **29**(9):757–777, 1999.
- [205] F. Zhu, L. Lavine, S. O’Neal, M. Lavine, C. Foss, y D. Walsh. *Insecticide resistance and management strategies in urban ecosystems*. *Insects*. **7**(1):2, 2016.
- [206] K.J. Livak y T.D. Schmittgen. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2- $\delta\delta$ ct method*. *Methods*. **25**(4):402–408, 2001.
- [207] A. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, y C.C. Mello. *Potent and specific genetic interference by double-stranded rna in caenorhabditis elegans*. *Nature*. **391**(6669):806, 1998.
- [208] M. Margulies, M. Egholm, W.E. Altman, S. Attiya, J.S. Bader, L.A. Bemben, J. Berka, M.S. Braverman, Y. Chen, Z. Chen, et al. *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors*. *Nature*. **437**(7057):376, 2005.
- [209] R.S. Hewes y P.H. Taghert. *Neuropeptides and neuropeptide receptors in the drosophila melanogaster genome*. *Genome Research*. **11**(6):1126–1142, 2001.
- [210] C.A. Hill, A.N. Fox, R.J. Pitts, L.B. Kent, P.L. Tan, M.A. Chrystal, A. Cravchik, F.H. Collins, H.M. Robertson, y L.J. Zwiebel. *G protein-coupled receptors in anopheles gambiae*. *Science*. **298**(5591):176–178, 2002.
- [211] Y. Fan, P. Sun, Y. Wang, X. He, X. Deng, X. Chen, G. Zhang, X. Chen, y N. Zhou. *The g protein-coupled receptors in the silkworm, bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **40**(8):581–591, 2010.
- [212] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, y D.J. Lipman. *Basic local alignment search tool*. *Journal of Molecular Biology*. **215**(3):403–410, 1990.
- [213] J.V. Paluzzi y M.J. O’Donnell. *Identification, spatial expression analysis and functional characterization of a pyrokinin-1 receptor in the chagas’ disease vector, rhodnius prolixus*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **363**(1-2):36–45, 2012.
- [214] J.V. Paluzzi, A.S. Haddad, L. Sedra, I. Orchard, y A.B. Lange. *Functional characterization and expression analysis of the myoinhibiting peptide receptor in the chagas disease vector, rhodnius prolixus*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **399**:143–153, 2015.
- [215] T. Hall. *Bioedit v. 7.0. 1*. department of microbiology, north carolina state university, 2004.
- [216] J.D. Thompson, D.G. Higgins, y T.J. Gibson. *Clustal w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. *Nucleic Acids Research*. **22**(22):4673–4680, 1994.
- [217] A.J. Drummond y A. Rambaut. *Beast: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees*. *BMC Evolutionary Biology*. **7**(1):214, 2007.