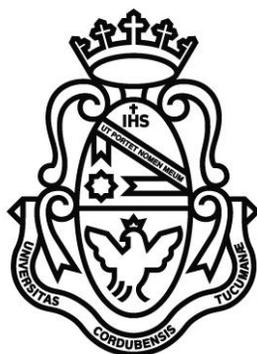


Tesis para optar al Título de Doctor en Ciencias Químicas

**RELEVANCIA FISIOLÓGICA DE LOS RECEPTORES DE LIPOFORINA Y
VITELÓGENINA EN LA REGULACIÓN DE LA OVOGÉNESIS EN LOS
VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS**



Bioq. Fabian Orlando Ramos

Directora de Tesis: Dra. Lilián E. Canavoso

Departamento de Bioquímica Clínica

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET)

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

Córdoba, Argentina.

Directora de Tesis:

Dra. Lilián E. Canavoso

Comisión de Tesis:

Dra. Graciela Panzetta-Dutari

Dra. Maria Ana Contin

Dra. Beatriz Alicia García

Evaluador Externo:

Dr. Jorge Rafael Ronderos

A mi Tatay y a Ramon

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica Clínica, Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET), de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, con el apoyo de las Becas otorgadas por el Fondo Nacional para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT, Beca de iniciación científica) y por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Beca Interna de finalización de Doctorado).

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo de subsidios otorgados por la Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC), CONICET y FONCyT. La estadía en la Florida International University (FIU, USA) fue financiada por el National Institutes of Health, USA (grant R01AI04554 y 1R21AI153689, Investigador Responsable: Dr. Fernando Noriega).

ABREVIATURAS

20HE	20-hidroxiecdisona
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AFT	Atresia folicular temprana
β-ATPasa	Subunidad beta del complejo ATP sintetasa
ASB	Albumina sérica bovina
AKH	Hormona adipocinética
anti-Lp	Anticuerpo anti-lipoforina
anti-Vt	Anticuerpo anti-vitelina
ARGdc	Ácido ribonucleico doble cadena basado en el gen de resistencia a al ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico

ARNdc	Ácido ribonucleico doble cadena
ARGdc	ARN doble cadena del Gen de Resistencia a Ampicilina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARN T7	Secuencia promotora de la polimerasa del ARN T7
ATPasa	Complejo ATP sintetasa
bHLH	Basic helix loop helix, dominio de unión al ADN
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bodipy-FA	4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-ácido hexadecanoico
BS	Buffer salino
CA	Corpora allata
CC	Corpora cardiaca
CCS	Células Competentes Stellar [®]
DAG	Diacilglicerol
DIC	Microscopía de contraste de interferencia diferencial
Dil	1,1'-Dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etiléndiaminotetracético
EEM	Error estándar de la media
EF	Epitelio folicular
EGF	Precursor del factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Enzimoimmunoanálisis

EPM	Estándares de peso molecular
FA	Ácidos grasos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GP	Glándula Protoracica
gVTr	Gránulos de vitelo transitorios
GV	Gránulo de vitelo maduro
HI	Región de homología de inserción
HJ	Hormona juvenil
HJ III	Hormona juvenil III
HJ III-D3	Estándar de Hormona juvenil III deuterado
HJSB₃	Hormona juvenil III skip-bis epóxido
HJAMT	Hormona juvenil ácido metiltransferasa
HPLC	Cromatografía de alta performance
ILP	Peptido Simil Insulina (Insulin-like peptide)
JHBP	Proteína unidora de Hormona Juvenil
LB	Repetición de unión al ligando
LBD	Dominio de unión al ligando
Lp	Lipoforina
LTP	Proteína transferidora de lípidos
ME	Metopreno
Met	Metopreno-tolerante
M-MLV-RT	Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney

MPO	Membrana plasmática del ovocito
MRM	Monitorización de reacción múltiple
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MVAP	Via del mevalonato
NV	Ninfas del V estadio
nt	Nucleótido
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Buffer fosfato salino
PBST	Buffer fosfato salino Tween-20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Primer específico del gen de interés
PM	Peso molecular
PPV	Proteína precursora del vitelo
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RACE	“Rapid Amplification of cDNA End”
RLp	Receptor endocítico de lipoforina
RLpdc	ARN doble cadena del gen <i>RLp</i>
RLDL	Súper familia de genes de receptores de lipoproteína de baja densidad
RVg	Receptor de vitelogenina
TAG	Triacilglicerol
TBS	Buffer Tris salino

Tm	Temperatura de "melting"
Vg	Vitelogenina
Vt	Vitelina

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN.....	13
ABSTRACT	16
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN	19
1.1. Enfermedad de Chagas.....	19
<i>Aspectos generales</i>	<i>19</i>
<i>Vectores de la enfermedad de Chagas y modelo de estudio.....</i>	<i>20</i>
<i>Ciclo reproductivo de D. maxima y su regulación nutricional y hormonal.....</i>	<i>22</i>
1.2. Regulación de la vitelogénesis.....	25
<i>Hormona juvenil: biosíntesis y formas moleculares.....</i>	<i>25</i>
<i>Met: receptor de Hormona juvenil.....</i>	<i>28</i>
<i>Regulación de la reproducción de los triatomíneos.....</i>	<i>31</i>
<i>Proteínas precursoras del vitelo: vitelogenina y lipoforina.....</i>	<i>33</i>
<i>Receptores de vitelogenina (RVg) y lipoforina (RLp) en el desarrollo ovárico.....</i>	<i>36</i>
Capítulo 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
<i>Hipótesis de trabajo:.....</i>	<i>39</i>
<i>Objetivo general:.....</i>	<i>39</i>
<i>Objetivos específicos:.....</i>	<i>39</i>
[1]. Investigar el rol de HJ en el reclutamiento de lípidos y proteínas por los ovocitos.....	39
[2]. Caracterizar la participación de Met en la fisiología del tejido ovárico.....	40
Capítulo 3: MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1. Insumos de laboratorio.....	41

3.2. Insectos.....	42
3.3. Obtención de la hemolinfa, cuerpo graso y ovario.....	43
3.4. Obtención de antisueros.....	43
3.5. Purificación de Lipoforina y Vitelogenina.....	44
3.6. Cuantificación de Vitelogenina y Lipoforina.....	45
3.7. Extracción de ARN, transcripción reversa y PCR en tiempo real.....	46
3.8. Cuantificación de HJ.....	47
3.9. Tratamiento con HJ III.....	49
3.10. Tratamiento con Precocene II.....	50
3.11. Diseño y síntesis de las dobles hebras.....	51
3.12. Silenciamiento de los genes <i>RLp</i> y <i>Met</i> mediante ARNi.....	52
3.13. Clonado y secuenciamiento de <i>Met</i>	53
3.14. Análisis bioinformático.....	55
3.14. Análisis estadístico.....	57
Capítulo 4: RESULTADOS	58
4.1. Cambios en las proteínas precursoras del vitelo y sus receptores durante el ciclo reproductivo de <i>D. maxima</i>	58
4.2. Efecto del tratamiento con HJ III sobre <i>Vg/RVg</i> y <i>Lp/RLp</i> en hembras pre-vitelogénicas de <i>D. maxima</i>	62
4.3. Efecto del tratamiento con Precocene II.....	67
4.4. Efecto del silenciamiento del gen <i>RLp</i> sobre la captación de lipoforina y la transferencia de lípidos a los ovocitos.....	72
4.5. Participación de <i>Met</i> en la fisiología del tejido ovárico.....	75
4.5.1. <i>Expresión de Met en cuerpo graso y tejido ovárico durante el ciclo reproductivo</i>	75

4.5.2 <i>Secuencia de Met y análisis bioinformático</i>	76
4.6. Efecto del silenciamiento del gen <i>Met</i>	82
Capítulo 5: DISCUSIÓN	86
Capítulo 6: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	98
Capítulo 7: REFERENCIAS	104
Capítulo 8: ANEXO	122

RESUMEN

Los triatomíneos son insectos hematófagos obligados con relevancia en salud pública por ser los vectores de la enfermedad de Chagas. Las hembras de estas especies requieren de la ingesta de sangre a los fines de lograr una exitosa ovogénesis, proceso controlado principalmente por la Hormona juvenil (HJ). En este trabajo de Tesis se empleó como modelo a *Dipetalogaster maxima* en diseños experimentales que combinaron ensayos funcionales clásicos con estrategias bioquímicas y moleculares tendientes a lograr una mejor comprensión del rol de HJ en la regulación de la vitelogenénesis y la ovogénesis. En este contexto, los objetivos se focalizaron en el estudio de los procesos de reclutamiento de lípidos y proteínas por los ovocitos en desarrollo y en la participación de Met, el receptor de HJ, en la fisiología del tejido ovárico. Los resultados demostraron que en *D. maxima* los niveles de HJ III skip-bis epóxido (HJSB₃), la forma molecular de HJ presente en la hemolinfa de *D. maxima*, aumentó significativamente luego de la ingesta de sangre. De modo similar, también aumentaron los transcritos de las proteínas precursoras del vitelo (PPV), vitelogenina (Vg) y lipoforina (Lp), en cuerpo graso y sus niveles proteicos en circulación. Concomitantemente, los genes de los receptores endocíticos de las PPV, *RVg* y *RLp* se encontraron regulados positivamente en el ovario. Cuando las hembras pre-vitelogénicas con bajos niveles de HJSB₃ fueron tratadas con HJ exógena se indujo la expresión de los genes *Lp/RLp* y *Vg/RVg*, así como la captación de Lp y Vg por los ovocitos. En tanto, la aplicación de precocene II o el silenciamiento del gen *RLp* mediante ensayos de ARNi en hembras alimentadas interfirieron, en distinta magnitud, con el depósito de las PPV en los ovocitos pero no con el reclutamiento

de lípidos, demostrando que la adquisición de estas reservas se realiza privilegiando la transferencia de lípidos vía Lp a nivel de membrana por sobre la vía Lp/RLp. Los resultados de esta tesis fueron consistentes con el papel de Vg como un gen “respondedor” a HJ y sugieren fuertemente que la señalización de HJ estaría involucrada en el almacenamiento de lípidos en los ovocitos al regular el gen *Lp* en el cuerpo graso y modular la expresión de los genes *RLp* y *RVg* en el tejido ovárico.

En este trabajo también se analizó la participación de Met en la fisiología del tejido ovárico, reportándose por primera vez en un vector de la enfermedad de Chagas los cambios del transcripto *Met* en el cuerpo graso y tejido ovárico en días representativos del ciclo reproductivo de *D. maxima*. Los resultados mostraron que en ambos tejidos, los niveles de ARNm para *Met* aumentaron con el inicio de la vitelogénesis siendo máximos al día 4 post-alimentación. Posteriormente se registró la disminución significativa del transcripto *Met* en días avanzados de la fase vitelogénica y en la post-vitelogénesis, los que mostraron niveles comparables a los registrados en la pre-vitelogénesis. El gen *Met* de *D. maxima* (*DmaxMet*) fue secuenciado, posibilitando la caracterización genómica mediante análisis bio-informáticos, la inferencia sobre su historia evolutiva y la realización del modelado para evaluar, *in silico*, la interacción entre Met y HJ. En este sentido, el modelado mostró por un lado, el mapeo de cargas electrostáticas, revelando dos parches con concentraciones de cargas opuestas; mientras que la inspección de la hidrofobicidad no reveló ninguna distribución distintiva. Finalmente, los ensayos de interacción *in silico* (“docking”) entre *DmaxMet* y sus variantes moleculares HJ III y HJSB₃ mostraron alta afinidad por el dominio PAS B. También se infirió

que es mayor la afinidad de *DmaxMet* por HJSB₃, la forma molecular de HJ presente en la hemolinfa de *D. maxima*.

Desde el punto de vista fisiológico y funcional, el silenciamiento de *Met* indujo una disminución significativa en los niveles del transcripto *Vg2*. Este resultado, esperable para un gen que responde a HJ, permitió inferir que en *D. maxima*, la principal PPV es inducida según la vía clásica HJ-Met descrita en el cuerpo graso de otras especies de insectos. El silenciamiento de *Met* también indujo una “down” regulación de *RVg* y *RLp* y un menor desarrollo del tejido ovárico, sugiriendo que *Met* también sería un actor crítico para modular, vía HJ, el desarrollo de este tejido.

Analizados en conjunto, los avances reportados en esta tesis permitirán analizar en *D. maxima* los eventos cascada abajo implicados en la acción regulatoria de HJ-Met sobre las PPV y sus receptores endocíticos en el desarrollo ovárico. En el contexto de la fisiología de los vectores de la enfermedad de Chagas, estos aspectos son de singular relevancia para el ciclo de vida de las hembras y consecuentemente, para la epidemiología de la enfermedad.

PALABRAS CLAVES: triatominos; enfermedad de Chagas; reproducción; ovogénesis; hormona juvenil; lipoforina; vitelogenina; receptores endocíticos.

ABSTRACT

Triatomines are hematophagous insects whose relevance in public health lies in the fact that they are vectors of the etiological agent of Chagas disease. The females of these species require a blood meal in order to accomplish successfully oogenesis, a process controlled mainly by the juvenile hormone (JH). In this Thesis, *Dipetalogaster maxima* was employed as a model in experimental designs that combined classic functional assays with biochemical and molecular strategies aimed at better understand the role of JH in the regulation of vitellogenesis and oogenesis. In this context, the objectives were focused in the study of lipid and protein recruitment processes by developing oocytes as well as in the participation of the JH receptor, Met, in the physiology of the ovarian tissue. The results demonstrated that the level of JH III skipped bisepoxide (JHSB₃), the molecular form of JH present in the hemolymph of *D. maxima*, increased significantly after a blood meal. Similarly, the transcripts of the yolk protein precursors (YPP) vitellogenin (Vg) and lipophorin (Lp) were upregulated in the fat body and their protein levels increased in the circulation. Concomitantly, the genes of the PPV endocytic receptors, *VgR* and *LpR*, were upregulated in the ovary. When pre-vitellogenic females with low levels of JHSB₃ were treated with exogenous JH, the expression of *Lp/LpR* and *Vg/VgR* genes as well as the uptake of Lp and Vg by the oocytes was induced. The topical application of precocene II or the *LpR* gene silencing by RNAi in fed females interfered, at different degrees, with the storage of YPP in the oocytes but not with lipid recruitment, demonstrating that lipid acquisition is carried out via Lp mainly at the membrane as compared to the Lp-LpR pathway. The findings of this Thesis were consistent with the role

of *Vg* as a JH-responding gene and strongly suggest that JH signaling is involved in lipid storage in oocytes by regulating the *Lp* gene in the fat body and modulating gene expression of *LpR* and *VgR* in the ovarian tissue.

In this work, the involvement of *Met* in the physiology of the ovarian tissue was also analyzed, describing for the first time in a vector of Chaga's disease the changes of the *Met* transcript in the fat body and ovarian tissue at representative days of the reproductive cycle of *D. maxima*. Results showed that, in both tissues, *Met* mRNA increased with the onset of vitellogenesis being maximal at day 4 after feeding. Thereafter, a significant decrease of *Met* transcript was observed in advanced days of the vitellogenic phase and in the post-vitellogenesis, exhibiting levels comparable to those of the pre-vitellogenesis. The *Met* gene of *D. maxima* (*DmaxMet*) was sequenced, enabling the genomic characterization by bioinformatics analysis including the inference of its evolutionary history. In this sense, the modelling allowed mapping of electrostatic charges, revealing two patches of opposing charges; meanwhile, the hydrophobic inspection did not revealed any distinct distribution. Finally, *in silico* interaction studies (docking) between *DmaxMet* and the molecular variants of it ligands JH III and JHSB₃ showed high affinity for the PAS-B domain. A higher affinity of *DmaxMet* by JHSB₃, the molecular form of JH present in the hemolymph of *D. maxima* was also inferred.

From the physiological and functional viewpoints, *Met* silencing induced a significant decrease in the levels of the *Vg2* transcript. This result, expected for a JH-responding gene, allowed inferring that the main PPV is induced by the classic pathway JH-*Met*, described in the fat body in other insect species. *Met* silencing also induced a downregulation of *VgR* and

LpR and a lower development of the ovarian tissue, suggesting that Met is also a critical actor for modulating of the ovarian development via JH.

Taken together, the findings reported in this Thesis will allow to analyze the downstream events involved in the regulatory action of JH-Met on YPP and their endocytic receptors in the ovarian development in *D. maxima*. These aspects are of singular relevance for the life cycle of the triatomine females and, consequently, for the epidemiology of the Chagas' disease.

KEY WORDS: triatomine; Chagas' disease; reproduction; oogenesis; juvenile hormone; lipophorin; vitellogenin; endocytic receptors.

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad de Chagas.

Aspectos generales

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad, endémica en 21 países de América, constituye uno de los problemas de salud más importante en América Latina, estimándose entre 10.000 y 12.000 la cifra de muertes al año y afectando mundialmente entre 6 y 7 millones de personas ^(1, 2). Es reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una de las 13 enfermedades tropicales más desatendidas del mundo ⁽²⁾ y por la Organización Panamericana de la Salud como la enfermedad más desatendida en las zonas rurales y/o agrícolas de varios países ⁽³⁾.

El parásito *T. cruzi*, ingresa al organismo a través de las mucosas expuestas o laceraciones en la piel realizando en hospedadores vertebrados, incluido el hombre, parte de su ciclo de vida. En esta etapa aguda de la enfermedad se pueden observar en el individuo infectado manifestaciones como fiebre, inflamación de los nódulos linfáticos y otros tejidos, conjuntivitis y lesiones en la piel, aunque estos síntomas pueden estar ausentes. En la mayoría de las personas, la fase aguda de la enfermedad pasa desapercibida, evolucionando así a la fase crónica ⁽⁴⁾. Hasta un 30 % de estos enfermos crónicos presentan alteraciones cardíacas y un 10 % alteraciones digestivas, neurológicas o combinadas que requieren tratamiento médico ⁽²⁾. En este contexto, es importante señalar que la enfermedad de Chagas genera una

importante pérdida económica debido a la incapacidad laboral que ocasiona en quienes la padecen, lo que junto a la elevada prevalencia, impactan notablemente en el presupuesto del sistema sanitario de los países afectados ⁽⁵⁾. La principal vía de adquisición del parásito *T. cruzi* es la vectorial, ya que en un 80 % de los casos la infección es adquirida por esta vía. Sin embargo, existen otras vías de infección que contribuyen a la propagación de la enfermedad como las transfusiones de sangre no controladas y la transmisión vertical de madre a hijo ⁽⁶⁾. En la actualidad diferentes moléculas quiméricas conteniendo antígenos del parásito *T. cruzi* son ensayadas en ratones como estrategia para conferir inmunidad en el huésped ante la infección con resultados promisorios, pero su evaluación en la población humana aún no es factible ^(7, 8). Sumado a esto, no existen fármacos con una elevada efectividad para la fase crónica de la enfermedad. Por todo lo expuesto, el control vectorial constituye la principal estrategia para disminuir la transmisión de la enfermedad.

Vectores de la enfermedad de Chagas y modelo de estudio.

Los vectores de la enfermedad de Chagas “triatominos” son insectos que pertenecen a la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Poseen un ciclo de desarrollo hemimetabólico típico, conformado por el huevo, cinco estadios ninfales y el estado adulto y, dependiendo de la especie y de las condiciones del entorno, puede requerir desde tres meses hasta dos años para completarlo.

Los triatominos se caracterizan por ser insectos hematófagos obligados a lo largo de todo su ciclo de vida, lo que determina su potencialidad y capacidad para la transmisión del parásito.

Entre las características más sobresalientes para la hematofagia se destacan: la capacidad de detectar los niveles de dióxido de carbono eliminado de la respiración de los mamíferos y su temperatura corporal, lo que facilitaría sus hábitos nocturnos de alimentación ⁽⁹⁾. Sin embargo ha sido descrito que ante la escasa disponibilidad de hospedadores vertebrados como fuente alimentaria los triatominos podrían recurrir a la búsqueda del sustento durante cualquier momento del día ⁽¹⁰⁻¹²⁾.

Los vectores de la enfermedad de Chagas se distribuyen a lo largo de todo el continente Americano, entre las latitudes 42° N y 46° S, aunque también se reportó su presencia en África, Asia y Australia, pero sin relevancia vectorial ⁽⁶⁾. Han sido descritas más de 150 especies de triatominos con capacidad para transmitir el parásito, aunque las pertenecientes a los géneros *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius* presentan la mayor relevancia epidemiológica. Todas ellas están adaptadas al domicilio y peridomicilio y poseen capacidad para reproducirse y colonizar viviendas de humanos utilizando grietas y hendiduras como nichos ⁽¹³⁾.

Algunas especies de triatominos habitan naturalmente el ambiente peridomiciliario, de importancia epidemiológica para la enfermedad, o regiones selváticas. Debido al avance de la urbanización en estas regiones, estas especies pueden invadir las viviendas humanas, adquiriendo una mayor relevancia para la salud humana. En este grupo se encuentra *Dipetalogaster maxima*, especie que habita en el sur de la península de Baja California, México (Fig. 1 A). *D. maxima* es la especie de mayor tamaño de la subfamilia Triatominae, alcanzando hasta 4 cm de largo, 2 veces el tamaño de otra especie de triatomo, *Rhodnius prolixus* (Fig. 1 B). Puede adquirir comidas de sangre de gran volumen y debido a que habita

zonas áridas y rocosas, donde la disponibilidad de alimento es escasa, tiene la capacidad de regular la ingesta de sangre durante períodos prolongados ^(14, 15). Si bien *D. maxima* tiene una limitada importancia epidemiológica en la transmisión vectorial del parásito *T. cruzi*, presenta características únicas para su mantenimiento y manipulación en el laboratorio, permitiendo que se consolide como modelo para abordar estudios sobre la biología de la reproducción de los triatominos ⁽¹⁶⁻²⁰⁾.

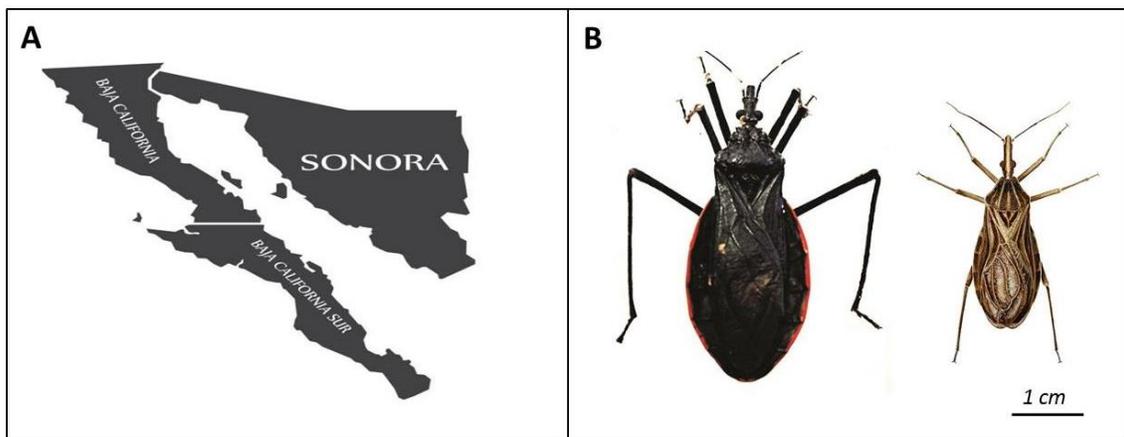


Fig. 1: Se muestra en (A) la región de Baja California donde habita *D. maxima*, la cual es una región semi árida y desierta. En (B) se muestra el tamaño de un macho de *D. maxima* en comparación con un macho de *R. prolixus*.

Ciclo reproductivo de D. maxima y su regulación nutricional y hormonal.

Los triatominos son insectos hematófagos obligados durante todo el ciclo de vida. El aparato reproductor de las hembras de triatominos está compuesto por dos ovarios, conformados a su vez por siete ovariolas del tipo meroístico, subtipo telotrófico, lo que indica que los ovocitos durante las primeras etapas de desarrollo se nutren a través de cordones tróficos de células nutricias ubicadas en el extremo apical de la ovariola o trofario ^(21, 22). En las hembras, la

ingesta de sangre determinará la cantidad y calidad de huevos en cada ciclo gonadotrófico. Si bien varios estudios establecieron un umbral en la ingesta de sangre para una oviposición exitosa ⁽²³⁾, la historia nutricional durante el quinto estadio ninfal resulta determinante ya que define el potencial de autogenia. Ésta se define como la capacidad de oviposición de las hembras a partir de las reservas nutricionales almacenadas en el intestino durante el último estadio ninfal, habiendo sido reportada en *R. prolixus* y *Triatoma infestans* ⁽²⁴⁾. Si bien la autogenia es más frecuente en especies de triatomos más pequeñas, debido a que pueden alcanzar comidas a repleción con una sola alimentación, en condiciones de laboratorio es posible inducirla en especies de mayor tamaño ⁽¹⁶⁾.

Aunque con cierta variabilidad biológica, el ciclo reproductivo de las hembras no autógenas de *D. maxima* en condiciones de crianza y mantenimiento estandarizado consta de tres fases: (a) pre-vitelogénica, (b) vitelogénica y (c) post-vitelogénica ⁽¹⁶⁾ (Fig. 2). La fase pre-vitelogénica transcurre desde que el adulto emerge y hasta que obtiene la primera alimentación en estado adulto. La vitelogénesis inicia a partir de la ingesta de sangre y culmina con la finalización de la oviposición. En esta fase reproductiva, las hembras acumulan reservas nutricionales en los ovocitos en desarrollo, necesarias para sustentar energéticamente el desarrollo embrionario el cual, como en todo organismo ovíparo, tiene lugar en completo aislamiento materno. Por último, la fase post-vitelogénica transcurre a partir de la finalización de la oviposición, cuando las condiciones ambientales o nutricionales no son suficientes para continuar promoviendo la vitelogénesis. En la misma se observa que, algunos folículos degeneran hacia un estado atrésico y son posteriormente resorbidos, proceso conocido como “oosorción” ^(16, 18, 21).

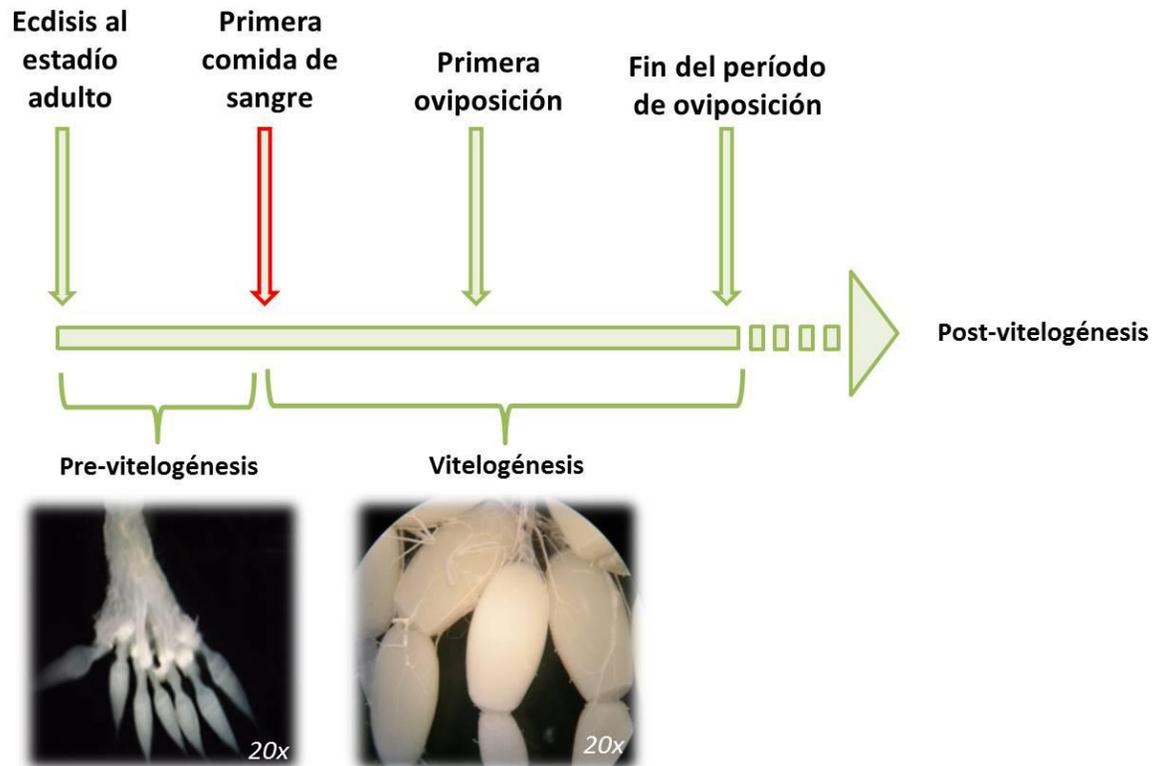


Fig. 2: En condiciones estandarizadas del laboratorio, la fase pre-vitelogénica comprende el período desde la ecdisis al estadio adulto (día 0) hasta la ingesta de sangre (~ 10-12 días post-ecdisis), evento que marca el inicio de la vitelogénesis. La primera oviposición tiene lugar alrededor de los días 8-12 post-alimentación y se extiende hasta los días 25-28 post-alimentación. El cese en la postura de huevos marca el inicio del período post-vitelogénico caracterizado por la degeneración de folículos ováricos (atresia folicular). Las imágenes son representativas de ovarios en las fases pre-vitelogénica y vitelogénica, destacándose en esta última el significativo desarrollo de los folículos terminales (Adaptado de Aguirre y colaboradores, 2011) ⁽¹⁷⁾.

Durante la fase vitelogénica se produce la síntesis masiva de proteínas precursoras del vitelo (PPV), principalmente vitelogenina (Vg) y lipoforina (Lp), las que serán captadas y almacenadas por los ovocitos en desarrollo. El cuerpo graso, es el principal involucrado en la síntesis de las PPV, aunque en menor medida, Vg también puede ser sintetizada por los folículos ováricos ^(25, 26).

1.2. Regulación de la vitelogénesis.

Hormona juvenil: biosíntesis y formas moleculares.

Las Hormonas juveniles (HJs) presentan la estructura química de sesquiterpenoides acíclicos y son sintetizadas principalmente en la corpora allata (CA), un par de glándulas endócrinas que en los triatomíinos se fusionan durante el desarrollo conformando una única glándula. La CA está localizada en el sistema nervioso y presenta conexión con la corpora cardíaca ⁽²⁷⁻²⁹⁾. En dípteros la corpora cardíaca y la glándula protorácica, se encuentran asociadas a la CA formando un complejo glandular, y pueden contribuir minoritariamente a la síntesis de HJs ^(30, 31). Aunque la historia evolutiva de los insectos sugiere que la función original de las HJs es la regulación de la reproducción, su rol en el control de la metamorfosis ha sido objeto de estudio en numerosas investigaciones ⁽³²⁾. Durante el ciclo de vida de los insectos, los niveles elevados de HJ mantienen los caracteres larvales/ninfales. Por el contrario, en la ecdisis, los niveles de HJ disminuyen y los de otras hormonas, como 20-Hidroxiecdisona, aumentan ⁽³¹⁾. La síntesis y secreción de HJ reinicia en el estado adulto para regular la reproducción de las hembras, incluyendo la vitelogénesis y la ovogénesis ^(33, 34). Actualmente, un notable volumen de evidencia indica que además de la metamorfosis y la reproducción, las HJs participan en el comportamiento, diapausa, determinación de castas y respuesta al estrés entre otras funciones ⁽³¹⁾.

Los avances en la era post-genómica posibilitaron la caracterización de las enzimas que intervienen en la biosíntesis de las HJs, la evaluación de los cambios en los niveles de sus transcritos y la cuantificación de las HJs en circulación, lo que por muchos años representó

un gran desafío experimental. En los vertebrados, la síntesis de sesquiterpenos comienza con la vía del mevalonato y continúa con la vía del escualeno, originando colesterol ⁽³⁵⁾. En insectos, esta última vía metabólica está ausente por lo que el mevalonato, por acción de una farnesil pirofosfato sintasa y reacciones enzimáticas intermediarias, genera farnesil pirofosfato. En la siguiente etapa de la biosíntesis de HJ III, el farnesil pirofosfato es transformado a farnesol por acción de una farnesil pirofosfatasa. El farnesol sufre 2 reacciones secuenciales de oxidación originando farnesal y ácido farnesoico. Finalmente, las últimas etapas para la síntesis de HJ III, consideradas de mayor especificidad, involucran una metil esterificación, etapa limitante en la síntesis de HJ, catalizada por la enzima HJ ácido-metil transferasa (HJAMT). Por último, ocurre una epoxidación, la cual en la mayoría de las especies de insectos es mediada por una metil farnesoato epoxidasa (Fig. 3 B) ⁽³⁶⁻³⁹⁾.

Desde el punto de vista regulatorio, han sido descritos factores que pueden estimular o inhibir la actividad de la CA y en consecuencia, influenciar la síntesis de HJs. Dependiendo de la especie de insecto y el estadio de desarrollo, estos factores incluyen neuropéptidos que ejercen una acción inhibitoria como las allatostatinas ⁽⁴⁰⁾ o modulan positivamente la síntesis de HJ como la allatotropina ⁽⁴¹⁾, los péptidos símil-insulina (en inglés, ILP) ⁽³⁴⁾, la 20-hidroxiecdisona y la hormona estimulante de la ecdisis (en inglés, “Ecdysis Triggering Hormone”) ⁽⁴²⁾.

Por su naturaleza hidrofóbica, una vez sintetizada HJ es transportada a través de la hemolinfa a los tejidos blancos unida a proteínas específicas o “proteínas unidoras de HJ” (en inglés, JHBP) ⁽⁴³⁾. En este sentido, han sido caracterizadas diferentes clases de proteínas

unidoras de HJ entre las que se incluyen Lp, Vg y las proteínas de almacenamiento o hexamerinas, señaladas como “JHBPs de alto peso molecular con alta afinidad por HJ” (31, 44). Los niveles de HJ en la hemolinfa reflejan el balance entre la síntesis en la CA, la interacción con los tejidos blanco y la degradación en circulación, la cual es mediada por las enzimas HJ epoxi-hidrolasa, HJ esterasa y la HJ diol kinasa (43).

Al presente, han sido reportadas al menos 8 formas moleculares de HJs, de las cuales HJ III es la más común en insectos (37, 43, 45). Mientras que las variantes bis-epoxidadas parecen ser frecuentes en los heterópteros (31), HJ 0, HJ II, HJ III y 4-metil HJ I fueron reportadas en el orden Lepidoptera (46, 47). Al menos una de estas 8 formas moleculares ha sido reconocida en las más de 100 especies de insectos analizados (43) (Fig. 3 B).

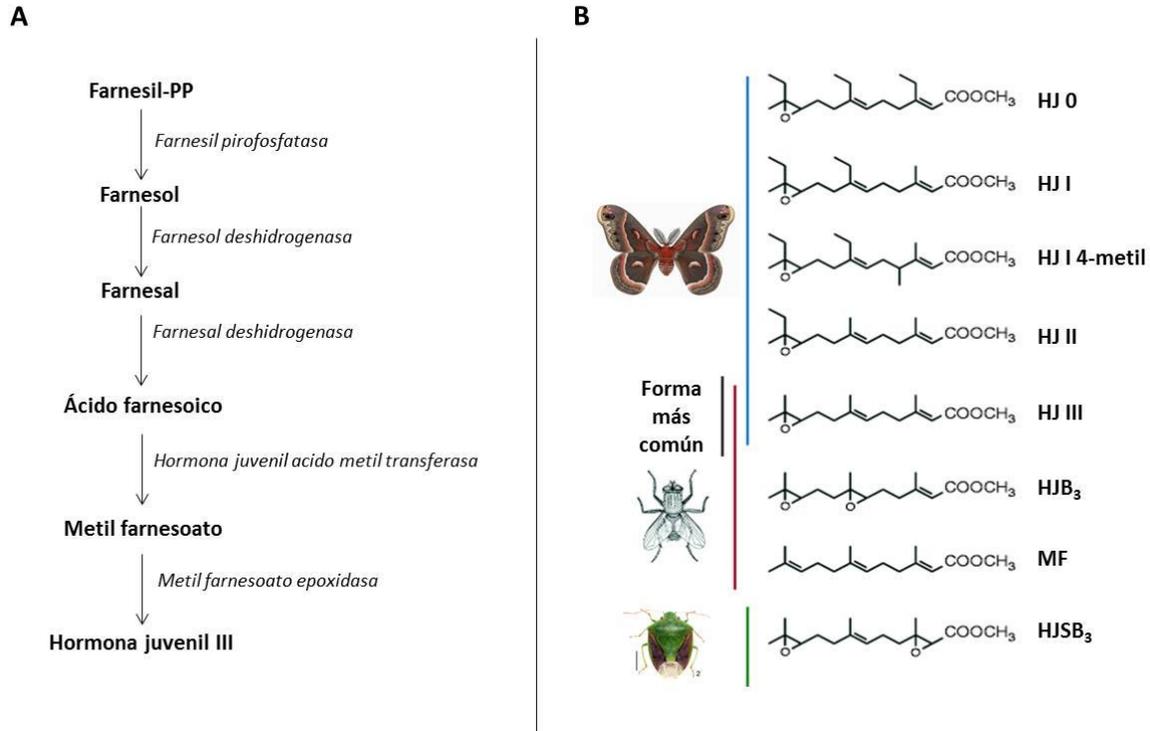


Fig. 3: Síntesis de Hormona juvenil (HJ) y sus variantes moleculares en insectos. (A) Biosíntesis de HJ III, la forma molecular más frecuente de HJ presente en insectos, a partir de farnesil pirofosfato (Farnesil-PP). **(B)** Formas moleculares de HJ en distintas especies de insectos. HJ 0, HJ I, HJ I 4-metil y HJ II fueron descritas en especies del orden Lepidóptera, en Dípteros se hallaron las formas biseóxido de HJ III (HJB₃), además de HJ III y metil farnesoato (MF). Otras formas del biseóxido de HJ (HJSB₃) fueron descritas en especies del orden Heteróptera (Adaptado de Rivera-Pérez et al., 2020) ⁽³¹⁾.

Met: receptor de Hormona juvenil.

A pesar de la relevancia de la HJ en la fisiología de los insectos, los intentos por identificar su receptor y dilucidar el mecanismo de acción resultaron infructuosos durante varios años. En este sentido, en 1986, Wilson y Fabian ⁽⁴⁸⁾ administraron metopreno, un potente análogo de HJ utilizado como insecticida que causa alteraciones en la metamorfosis e individuos inviábiles, a larvas de *Drosophila melanogaster* mediante topicación o en la dieta. Los autores encontraron mutantes resistentes a las dosis administradas de metopreno las cuales no

exhibían los efectos morfogénicos provocados por el insecticida, caracterizando genéticamente esta mutación denominándola *Metopreno-tolerante* o *Met*. De esta manera los autores propusieron que la proteína codificada por el gen *Met* sería indispensable para la acción anti-metamorfosis de HJ ⁽⁴⁸⁾.

La caracterización funcional de *Met* tuvo lugar en el año 2007, más de dos décadas posterior a su descubrimiento, mediante estudios en el escarabajo rojo de la harina, *Tribolium castaneum*. En estos insectos el silenciamiento del gen *Met* produjo la metamorfosis precoz y otras alteraciones con un fenotipo compatible con defectos en la producción o acción de HJ, aportando evidencia fundamental respecto a *Met* como un intermediario clave en la vía de señalización de HJ ⁽⁴⁹⁾. Posteriormente, estudios en la cucaracha *Blattella germanica* ⁽⁵⁰⁾, en el hemíptero *Pyrrhocoris apterus* ⁽⁵¹⁾, en el triatomino *R. prolixus* ⁽⁵²⁾ y otras especies permitieron consolidar a *Met* como el receptor de HJ ⁽⁵³⁾.

Met ha sido identificado como miembro de la superfamilia de factores de transcripción basic helix-loop-helix (bHLH)/Per-Arnt-Sim (PAS) ⁽⁵⁴⁾. La α -hélice presente en el dominio bHLH contiene aminoácidos básicos que facilitan la unión a ADN y es señalado como el responsable de la unión al sitio génico donde ejerce su acción el complejo HJ-*Met*. El dominio PAS está conformado por tres motivos: Period (presente en proteínas que participan en mantener la periodicidad de los ritmos biológicos), el traslocador nuclear de aril-hidrocarburos (Arnt), y Sim (del inglés "Single minded", motivo presente en la proteína Sim involucrada en el desarrollo del sistema nervioso de *D. melanogaster*). Este dominio es el encargado de unión al ligando ⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾. El dominio PAS de la superfamilia de factores de transcripción bHLH/PAS consiste de dos regiones repetidas, PAS-A y PAS-B. Estudios de

unión al ligando empleando constructos de Met conteniendo distintos dominios, determinaron que el dominio PAS-B es necesario y suficiente para la unión de HJ, concluyendo que este dominio es el de unión a HJ ⁽⁵⁸⁾.

En general, los factores de transcripción con el dominio bHLH son diméricos pero en presencia de HJ o sus homólogos moleculares, esta dimerización se reduce drásticamente ⁽⁵⁹⁾. Así, tras la unión de HJ, Met sufre un cambio conformacional que lo libera del complejo homodimérico Met-Met, facilitando la interacción de Met con otra proteína bHLH-PAS, Taiman (Tai), para conformar un factor de transcripción funcional. Una etapa clave en la vía de señalización de HJ es la translocación de Met al núcleo, mediada por la chaperona Hsp83 (del inglés, Heat Shock Protein), que a su vez interacciona con Nucleoporina, un componente del complejo de poros en el núcleo. En el núcleo, el complejo Met-Tai-HJ interacciona con “Elementos Respondedores a HJ” (HJER), presentes en la región promotora de genes “tempranos” como Kruppel-homólogo 1 (Kr-h1) en *Bombyx mori*, *B. germanica* y *A. aegypti*, para inducir la síntesis de Vg en cuerpo graso y la acumulación de lípidos en los ovocitos (Fig. 4) ⁽³⁴⁾. En *T. castaneum*, HJ-Met estimula indirectamente la vitelogénesis mediante los péptidos ILP. En este sentido, tanto HJ como los factores nutricionales inducen la expresión de ILP, evento necesario para la fosforilación del factor represor de transcripción FoxO (del inglés, Forkhead box class O), desacoplándolo de su interacción en el núcleo y promoviendo la expresión de Vg ⁽⁶⁰⁾. En *A. aegypti* ha sido propuesto una vía alternativa/convergente para los eventos de señalización de HJ, involucrando un receptor de membrana acoplado a Fosfolipasa C y mediante el cual, un aumento de inositol-3-fosfato, diacilglicerol y Ca^{+2} intracelular promoverían la fosforilación de

Met y Tai ^(34, 61, 62). Cabe destacar que al presente, este receptor de membrana no ha sido caracterizado.

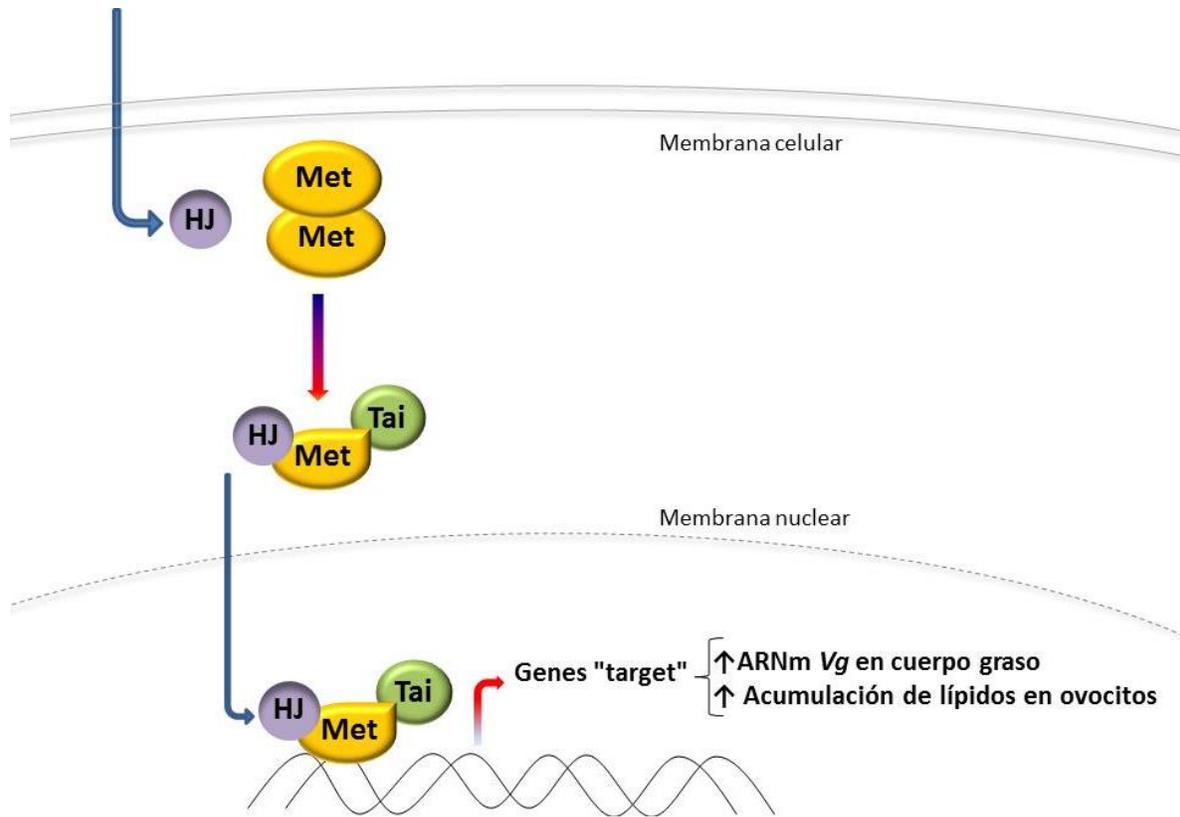


Fig. 4. Modelo propuesto para el mecanismo de acción de Hormona juvenil HJ-Met en la reproducción. El complejo HJ-Met-Tai puede unirse a elementos respondedores en la región promotora de genes "targets" de HJ, induciendo la expresión de genes que intervienen en la vitelogénesis y ovogénesis. (Adaptado de Jindra y col., 2013; Roy y col., 2018) ^(34, 57).

Regulación de la reproducción de los triatominos.

En los triatominos, la vitelogénesis es un proceso bajo un estricto control nutricional y hormonal. Estudios pioneros llevados a cabo por Wigglesworth en la década del '30 ⁽⁶³⁾, y posteriormente por Coles en la década del '60 ⁽⁶⁴⁾ pusieron en evidencia la importancia de HJ en la regulación de la vitelogénesis en el triatominio *R. prolixus*. Actualmente el modelo

aceptado en estos vectores propone que la ingesta de una comida de sangre por parte de la hembra promueve la distensión del intestino, estimulando en la CA la síntesis y liberación a la circulación de HJ ^(23, 65). En este contexto, HJ ejercerá su acción a nivel del cuerpo graso, activando la expresión de genes de las PPV, principalmente *Vg* ^(26, 33, 64). Además, en el ovario, HJ tiene efectos sobre el epitelio folicular, iniciando la formación de canales interfoliculares mediante la fosforilación de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPasa}$. Este proceso, conocido como patencia, facilita el acceso de las PPV en circulación a la membrana del ovocito, para su posterior internalización por endocitosis mediada por receptores ⁽⁶⁶⁾. Un análisis funcional en hembras de *R. prolixus* con el gen *Met* silenciado permitió concluir que *Met* es indispensable para la reproducción, aportando información de los efectos del silenciamiento sobre algunas características del desarrollo como la viabilidad, número de huevos ovipuestos y desarrollo de genitales ⁽⁵²⁾.

En los insectos, el estado nutricional de las hembras está intrínsecamente relacionado con el control endócrino de la vitelogénesis, destacándose la influencia de los neuropéptidos ILP, los que conjuntamente con la vía de señalización mediada por Target de Rapamicina (ToR), modulan la síntesis de HJ y Ecdisona ⁽³⁴⁾. Aunque en los triatomíneos este aspecto ha sido escasamente abordado, un análisis transcriptómico reciente en *R. prolixus* reveló que las hembras sin alimentar están “sensibilizadas” para responder a un aumento de los niveles de ILP activando rápidamente la señalización de ILP/ToR ⁽⁶⁰⁾. La relevancia de esta vía modulando la síntesis de HJ en los vectores de la enfermedad de Chagas permanece sin dilucidar.

Proteínas precursoras del vitelo: vitelogenina y lipoforina.

Al presente han sido descritas varias proteínas precursoras del vitelo (PPV), las que son almacenadas durante la vitelogénesis en el ovocito en desarrollo, y cuya función será proveer al embrión de aminoácidos, lípidos y fosfatos entre otros recursos energéticos ^(25, 26, 67). Dentro de este grupo se destaca Vg, la cual pertenece a una gran familia de proteínas presente en numerosas especies de ovíparos, tanto vertebrados como de invertebrados ⁽⁶⁸⁾. Vg fue caracterizada a nivel bioquímico y molecular en varias especies de insectos hemimetábolos y holometábolos (Fig. 5). Presentan una estructura primaria altamente conservada, siendo codificadas por una súper familia de genes ^(68, 69). Esta homología también fue observada no solo en especies de artrópodos, sino también entre las vitelogeninas de nematodos anfibios y aves ⁽⁷⁰⁾.

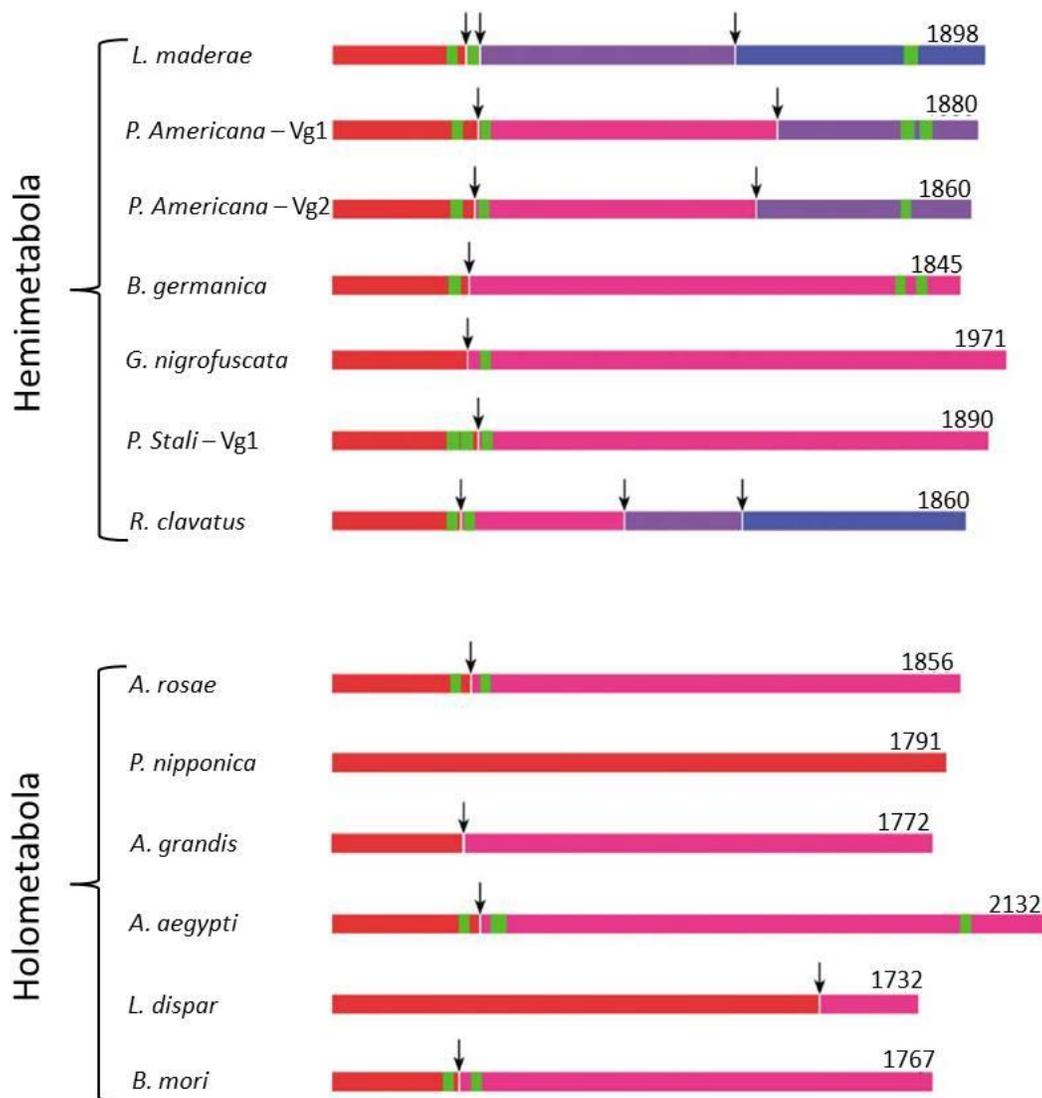


Fig. 5: Comparación de la estructura de las vitelogeninas caracterizadas en 13 especies de insectos. Los números indican los residuos de aminoácidos deducidos desde el inicio de la traducción (excluyendo los péptidos señal). Las flechas indican la secuencia de clivaje consenso (R/K)XX(R/K). Los “boxes” verdes indican los dominios poliserina. El resto de los colores presentes en la Figura forman parte del código utilizado por los autores para indicar el número de subunidades resultantes que conforman las Vg luego del proceso de clivaje proteolítico (Adaptado de Raikhel y col., 2005; Tufail y Takeda, 2008) ^(68, 71)

Vg es sintetizada principalmente en el cuerpo graso, aunque otros órganos pueden contribuir en forma minoritaria ^(25, 26). El gen que codifica para Vg (6-7 Kb) origina un producto proteico

primario de 200 kDa, el cual es clivado por endoproteasas en un sitio consenso (R/K)XX(R/K)⁽⁷²⁾ (Fig. 5), dando lugar a las sub-unidades o “apoproteínas” de Vg las que dependiendo de la especie analizada, pueden presentar un peso molecular aproximado de 50 a 180 kDa. Vg experimenta modificaciones co y post-traduccionales incluidas la glicosilación y fosforilación luego de lo cual, las sub-unidades proteicas son ensambladas y secretadas como una fosfolipoproteína oligomérica de alto peso molecular (200 a 625 kDa según la especie reportada)⁽⁷⁰⁾.

Vg y vitelina (Vt), su forma de depósito en los ovocitos, ha sido caracterizada en pocas especies de triatomíneos entre las que se destacan *Triatoma protracta*⁽⁷³⁾, *T. infestans*⁽⁷⁴⁾, *R. prolixus*⁽⁷⁵⁾ y más recientemente, *D. maxima*⁽¹⁶⁾. En esta última, la Vt purificada a partir de homogenatos de huevos mostró un peso molecular nativo de ~ 443 kDa, estando conformada por dos subunidades mayores (~ 170 y 174 kDa) y dos subunidades más pequeñas (~ 50 y 44 kDa)⁽¹⁶⁾.

Los lípidos constituyen la principal fuente energética para el embrión en desarrollo. No obstante, la capacidad del ovocito para sintetizar lípidos *de novo* es muy limitada^(16, 76). Así, la mayor parte de los lípidos almacenados en el ovocito son adquiridos a partir de las lipoproteínas en circulación, principalmente Lp y Vg^(16, 77). Lp, la principal lipoproteína en insectos, es sintetizada en el cuerpo graso y su contenido en lípidos representa un 30-50% de su estructura. La función más conocida de Lp es la transferencia de diacilglicerol y otras clases de lípidos desde los sitios de síntesis hacia los órganos blancos como por ejemplo, ovario. Lp ha sido descrita como un “transportador reusable” por transferir o aceptar lípidos a nivel de la membrana sin internalización ni degradación^(78, 79). El proceso de transferencia

de lípidos mediado por la Lp implica la interacción de la lipoproteína con sitios de unión específicos en la membrana plasmática de las células diana ⁽⁸⁰⁾. En el intestino, cuerpo graso y ovarios del triatomino *P. megistus*, la subunidad beta del complejo ATP sintasa (β -ATPasa) cumple funciones de receptor no endocítico, facilitando la interacción entre Lp-membrana plasmática y la posterior transferencia de lípidos a las gotas de lípidos o adiposomas ⁽⁸¹⁻⁸³⁾.

Receptores de vitelogenina (RVg) y lipoforina (RLp) en el desarrollo ovárico.

En los organismos ovíparos, la captación de las PPV por los ovocitos en desarrollo, resulta determinante para una ovogénesis exitosa. La incorporación de estas PPV al ovocito ocurre mediante endocitosis mediada por receptor. En insectos este mecanismo fue descrito por primera vez en *A. aegypti* ⁽⁸⁴⁾.

En la actualidad, el amplio conocimiento de los eventos celulares que median la captación de Vg originado principalmente a partir de estudios llevados a cabo en mosquitos, permite postular un modelo que es extensivo para la mayoría de las especies de insectos ⁽⁸⁵⁾. El mismo establece que la Vg circulante en la hemolinfa se une a su receptor RVg localizado en las microvellosidades y en las depresiones recubiertas de clatrina de la membrana perioocítica, para su posterior internalización, conformando vesículas recubiertas. La disociación del complejo Vg/RVg ocurre en endosomas tempranos, que se fusionan conformando gránulos de vitelo transitorios (gVtr). Los gVtr pueden receptar varias moléculas de Vg hasta conformar un gránulo de vitelo maduro (GV). En mosquitos, y más recientemente en *D. maxima*, la evidencia experimental demuestra que la Vg internalizada y

almacenada en los GV, la cual recibe el nombre de vitelina o Vt, tendrá menor contenido en lípidos y será susceptible a los eventos de proteólisis durante el desarrollo embrionario ^(85, 86).

Estudios pioneros que incluyeron el clonado y secuenciamiento del receptor endocítico de Lp (RLp) en la langosta *Locusta migratoria* permitieron postular un mecanismo alternativo para la transferencia de lípidos en insectos ⁽⁸⁷⁾, aunque los mismos también demostraron que la inhibición de la endocitosis no afectó la transferencia de diacilglicerol a las células del cuerpo graso. También fue demostrado que bajos niveles del transcripto *RLp* coincidían con un aumento de Lp asociada a la membrana plasmática ^(87, 88). Con posterioridad, se demostró *in vitro* que los cuerpos grasos aislados de *L. migratoria* reciclan parcialmente la Lp endocitada a la hemolinfa, mediante un proceso que sería tejido específico ⁽⁸⁹⁾.

Al presente los receptores endocíticos de Vg y Lp, (RVg y RLp, respectivamente), han sido caracterizados en varias especies de insectos. Por homología en su secuencia y por su organización en dominios modulares, se pudo determinar que pertenecen a una súper familia de genes de receptores de lipoproteína de baja densidad o RLDL ⁽⁹⁰⁾. Todos ellos presentan una estructura primaria altamente conservada y comparten cinco regiones o dominios diferenciados funcionalmente: (a) un dominio de unión al ligando con predominio de residuos acídicos; (b) un dominio con homología al precursor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), implicado en la disociación del ligando en los endosomas; (c) un dominio de *o*-glicosilación, con funciones estructurales y de protección contra la acción de proteasas; (d) un dominio transmembrana, para el anclaje del receptor a la membrana plasmática y (e), un dominio citoplásmico, que contiene la señal consenso para la internalización de ligandos. A

diferencia de RLp los RVg de insectos poseen dos copias de los dominios de unión al ligando (LBD) y del precursor de EGF (Fig. 6).

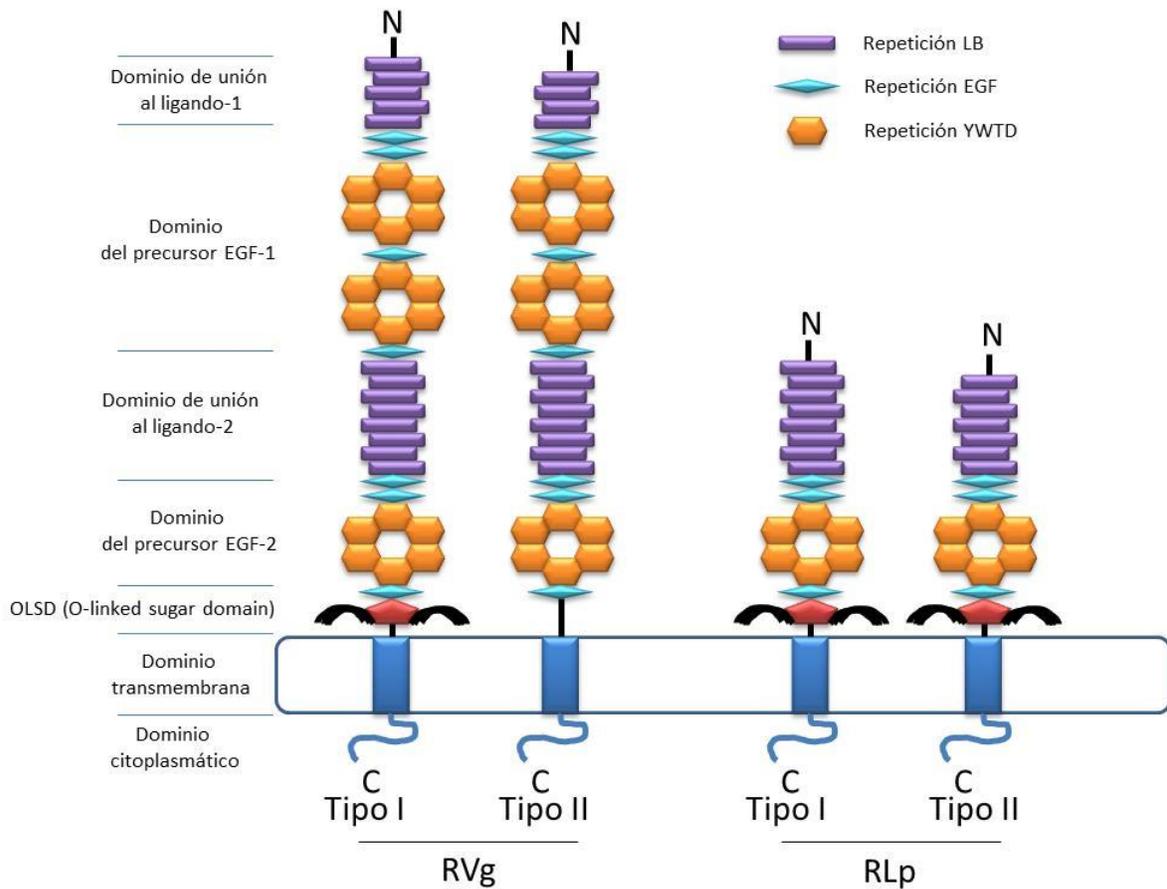


Fig. 6: Estructura de los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en insectos. Se muestra la organización en dominios modulares y los tipos más comunes de RVg y RLp. Los tipos I y II se diferencian en el dominio *o*-glicosilación (RVg) y en el número de repeticiones del dominio EGF (RLp). Puede observarse también que ambos tipos de RVg poseen dos dominios de unión al ligando y dos dominios EGF (Adaptado de Tufail y Takeda 2009) ⁽⁹⁰⁾.

Capítulo 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo:

Vg y Lp, las principales PPV, y sus receptores endocíticos RVg y RLp, respectivamente, son importantes indicadores de la habilidad de un folículo para completar su desarrollo. En los vectores de la enfermedad de Chagas, la implicancia fisiológica de RVg y RLp en la regulación de la ovogénesis sería modulada por la vía de señalización inducida por HJ/Met.

Objetivo general:

Profundizar en el conocimiento de los eventos bioquímicos y moleculares involucrados en la regulación de la ovogénesis, con especial énfasis en la acción de HJ en el desarrollo de tejido ovárico y el depósito de nutrientes en los ovocitos en desarrollo vía RVg/RLp.

Objetivos específicos:

En el estudio se emplearon como modelo de experimentación las hembras no autógenas de *D. maxima* para analizar los siguientes objetivos:

[1]. Investigar el rol de HJ en el reclutamiento de lípidos y proteínas por los ovocitos, para lo cual se procedió a:

[1.1]. Determinar el perfil de expresión de los transcritos *Vg/RVg* y *Lp/RLp* en función del estado nutricional y reproductivo de la hembra. Establecer su correlación con los niveles de Vg y Lp en la hemolinfa.

[1.2]. Evaluar los niveles de HJ en la hemolinfa en las fases del ciclo reproductivo.

[1.3]. Analizar el rol de HJ en la pre-vitelogénesis y vitelogénesis mediante ensayos funcionales con HJ exógena y Precocene II.

[1.4]. Evaluar el efecto del silenciamiento del gen *RLp* en la formación de las reservas lipídicas del tejido ovárico.

[2]. Caracterizar la participación de Met en la fisiología del tejido ovárico, lo que incluyó:

[2.1]. Analizar los cambios en expresión del gen *Met* en cuerpo graso y tejido ovárico durante el ciclo reproductivo.

[2.2]. Caracterizar el gen *Met* mediante secuenciamiento y posterior análisis bioinformático.

[2.3]. Evaluar el impacto del silenciamiento del gen *Met* en el desarrollo del tejido ovárico.

Capítulo 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Insumos de laboratorio.

El Trizol[®] utilizado en la purificación de ARN fue provisto por Invitrogen. Las enzimas y reactivos necesarios para la Reacción de transcripción inversa (RT) y la Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) fueron obtenidos de Promega, en tanto los primers fueron de Macrogen. Los marcadores de peso molecular para ADN ("Ladder 50 pb" PB-L) fueron provistos por Reactivos Bio-Lógicos (Universidad de Quilmes) mientras que el kit para PCR en tiempo real fue adquirido a Thermofisher Scientific. El antisuero anti-inmunoglobulina G de conejo obtenido en cabra conjugado con peroxidasa, la o-fenilendiamina, albúmina sérica bovina (BSA), HJIII, 6,7-dimetoxi-2,2-dimetil-3-cromo (Precocene II), cóctel de inhibidores de proteasas (P8340) y los marcadores fluorescentes 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (DiI), e isotiocianato de fluoresceína (FITC) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich en tanto que 4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-ácido hexadecanoico (Bodipy FL C₁₆) fue provisto por Molecular Probes. La Sepharose 6B fue provista por Sigma-Aldrich y las columnas PD-10 fueron de GE Healthcare. Fluorsave (Calbiochem), placas multipocillos (Greiner Bio-one), concentradores Microcon y Centricon (Millipore), y tubos Quick-Seal (Beckman) fueron obtenidos de las fuentes comerciales indicadas. La hormona juvenil III skip-bis epóxido (HJSB₃), hormona juvenil III marcada con deuterio (HJ IID3), tubos silanizados (Thermofisher Scientific) y kit de RACE, fueron una

donación del Dr. Fernando Noriega (Florida International University). Se empleó el kit MegaScript® RNAi (Thermofisher Scientific) en la síntesis de los ARN doble cadena (ARNdc).

3.2. Insectos.

Los insectos fueron obtenidos a partir de una colonia de *D. maxima* establecida en nuestro insectario, mantenida en las siguientes condiciones: 27 ± 1 °C, 60-70 % de humedad, fotoperiodo de 8:16 h luz: oscuridad ⁽⁹¹⁾. En todos los casos, los insectos fueron alimentados sobre gallinas siguiendo el protocolo aprobado por el comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL, Resol. HCD N° 1392/2016 de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC).

Para los experimentos, los insectos fueron sexados en el estadio NV para la selección de las futuras hembras y posteriormente alimentados con una comida de sangre que representó 5 a 7 veces su peso corporal inicial, a los fines de obtener hembras no autógenas ^(16, 92). Luego de emerger al estado adulto, las hembras fueron individualizadas en frascos junto a dos especímenes machos previamente alimentados. Se trabajó en todos los casos con hembras apareadas y el éxito de la cópula fue controlada por la observación del espermátforo ⁽⁹³⁾.

Excepto que se especifique lo contrario, la hemolinfa, cuerpo graso y el tejido ovárico fueron obtenidos a partir de hembras en días representativos del ciclo reproductivo: días 4 a 6 post-ecdisis (pre-vitelogénesis, sin alimentar), días 4, 6 y 12 días post-alimentación (vitelogénesis) y días 12-14 posterior a la finalización de la oviposición (post-vitelogénesis o atresia folicular temprana).

3.3. Obtención de la hemolinfa, cuerpo graso y ovario.

La hemolinfa se obtuvo por seccionamiento de las extremidades a nivel de las coxas en días representativos del ciclo reproductivo según se indica en 3.2. El material fue colectado con una microjeringa Hamilton y colocado en tubos Eppendorf fríos conteniendo Na₂EDTA (10 mM) y ditiotreitól (5 mM). Luego de una centrifugación para remover los hemocitos (10 min, 10.000 xg), la hemolinfa fue fraccionada en alícuotas y almacenada a - 80 °C con el agregado de un cóctel de inhibidores de proteasas.

El tejido ovárico y cuerpo graso de hembras en días representativos del ciclo reproductivo fueron diseccionados en buffer fosfato salino frío y autoclavado (PBS: Na₂HPO₄/KH₂PO₄ 6,6 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), empleando una lupa estereoscópica (Schonfield). Posteriormente los tejidos fueron procesados según lo indicado para cada ensayo.

3.4. Obtención de antisueros.

El antisuero policlonal anti-lipoforina (anti-Lp) de *P. megistus* fue obtenido según Canavoso y Rubiolo 1995 ⁽⁹¹⁾. Nuestro grupo previamente demostró que este antisuero puede reconocer a Lp de *D. maxima* (Fig. S1) ⁽¹⁹⁾.

El antisuero policlonal anti-vitelina (anti-Vt) fue obtenido a partir de la purificación de Vt de *D. maxima* ⁽¹⁶⁾ según se describió anteriormente, excepto que los conejos fueron inoculados con las dos subunidades mayores de Vt (PM ~ 170 y 174 kDa) obtenidas a partir de geles de poliacrilamida. Previamente nuestro grupo demostró que el antisuero anti-Vt reconoce Vg purificada a partir de la hemolinfa de hembras ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾.

3.5. Purificación de Lipoforina y Vitelogenina.

Lp fue purificada a partir de la hemolinfa de hembras de *D. maxima* colectada 6 días post-alimentación. La hemolinfa fue adecuada a una densidad de 1,300 g/ml con KBr, y sometida a ultracentrifugación (300.000 xg , 4 h, 4 °C). La fracción superior del gradiente salino correspondiente a la Lp (1,140 g/ml) fue sometida a una columna PD-10 y eluída con PBS para la remoción del KBr. La Lp fue finalmente purificada mediante filtración molecular, empleando una columna empaquetada con Sepharose 6B y eluída con PBS. La Lp fue concentrada por ultrafiltración (Centricon 100) y almacenada a -20 °C en presencia de inhibidores de proteólisis, previa determinación de proteínas ⁽⁸²⁾.

Vt fue purificada a partir de homogenatos de huevos de *D. maxima* con menos de 12 h desde su oviposición, mediante una doble cromatografía de intercambio iónico empleando una columna empaquetada con DEAE-Trisacryl M (1,5 x 14,5 cm) y equilibrada con buffer Tris-HCl-Na₂EDTA (Tris 20 mM, Na₂EDTA 2,5 mM, pH 8,3) ⁽¹⁶⁾. La Vt fue eluída con un gradiente 0 a 300 mM de NaCl y un flujo constante de 20 ml/h.

La purificación de Lp y Vt fue monitoreada mediante el fraccionamiento por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativa (6%) y desnaturizante (7,5%). Los geles fueron coloreados con Azul Brillante de Coomasie R-250 para la visualización de las proteínas ⁽¹⁶⁾.

3.6. Cuantificación de Vitelogenina y Lipoforina.

La cuantificación de Vg y Lp en los tejidos y en la hemolinfa se evaluó mediante enzimoimmunoanálisis indirecto (ELISA). Para los ensayos, la hemolinfa fue colectada individualmente como se describió en la sección 3.3, en tanto los cuerpos grasos fueron pesados y homogenizados en buffer Tris-NaCl (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas. Los homogenatos fueron centrifugados a 2.500 ×g durante 10 min a 4 °C, luego de lo cual, los “pellets” fueron descartados y los sobrenadantes colectados. El sobrenadante fue sometido a una nueva etapa de centrifugación a 15.000 x g durante 30 min a 4 °C. Los sobrenadantes resultantes fueron alícuotados y utilizados para los ensayos de ELISA, previa cuantificación de proteínas ⁽⁹⁴⁾. La cuantificación de Vg/Vt y Lp en hemolinfa y homogenatos de tejidos se realizó empleando los siguientes anticuerpos: a) anticuerpo policlonal anti-Vt, (1:4.000) ⁽¹⁶⁾; b) anticuerpo policlonal anti-Lp, (1:5.000) ⁽⁹⁵⁾. Las curvas de calibración fueron construidas a partir de diluciones de vitelina y lipoforina purificadas, según lo descrito en 3.5. Brevemente, para los ensayos las microplacas multipocillo fueron cargadas con diluciones de Vg o Lp según corresponda (100 µl/pocillo) o con diluciones de la hemolinfa u homogenatos de tejido en buffer carbonato/bicarbonato (15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, pH 9,6) e incubadas por 120 minutos a 37 °C. Las placas fueron lavadas cuatro veces con PBSTween (PBST: 8,2mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄ 150mM NaCl, 2,7mM KCl, 0,05% Tween 20, pH 7,4) e incubadas con los anticuerpos anti-Vt o anti-Lp (60 min, 37 °C) en PBST conteniendo 0,1% de albúmina sérica bovina (BSA). Las placas fueron lavadas nuevamente según lo descrito e incubadas con un

anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo conjugada con peroxidasa en PBST (1:5.000; 30 min a 37 °C). Luego del lavado, las placas fueron incubadas con *o*-fenilendiamina solubilizada en buffer sustrato (81,5 mM Na₂HPO₄, 33 mM ácido cítrico, 0,08% H₂O₂, pH 5,0). Luego de 30 min, la reacción fue detenida por el agregado de H₂SO₄ 4N ^(16, 17). Las placas fueron leídas a 492 nm empleando un lector de microplacas ⁽¹⁶⁾.

3.7. Extracción de ARN, transcripción reversa y PCR en tiempo real.

Los niveles de los transcritos *Vg* y *Lp*, como así también de *RVg*, *RLp* y *Met* en los tejidos, fueron determinados mediante qPCR, a partir de ARN extraído con TRIZOL según las instrucciones del fabricante ⁽²⁰⁾. Para eliminar el ADN genómico, las muestras fueron tratadas con DNAsa, evaluándose la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los ADNc se sintetizaron a partir de 2 µg de ARN total utilizando el protocolo de transcriptasa reversa de MML-V. Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) y SYBR Green. El método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ fue utilizado para cuantificar los cambios relativos en la expresión de los genes ⁽⁹⁶⁾ empleando el ARN ribosómico 18S (ARNr 18S) como gen de referencia ^(20, 97). Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado. La eficiencia de amplificación de cada par de “primers” se calculó utilizando curvas estándar generadas por diluciones seriadas de ADNc ⁽²⁰⁾. Todas las reacciones mostraron una eficiencia superior al 96% para los diferentes pares de primers probados. Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla S1. El diseño de los primers se basó en la secuencia de ARNm del

triatomino *R. prolixus* ⁽⁹⁸⁾. Los amplicones con los pesos esperados fueron sometidos a secuenciamiento para la confirmación de su identidad (Macrogen, Seúl, Corea).

3.8. Cuantificación de HJ.

Los niveles de HJ en la hemolinfa, que en *D. maxima* corresponde a la forma molecular HJSB₃, fueron cuantificados mediante cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) ^(45, 99). Brevemente, 60 µl de hemolinfa fueron colocados en viales silanizados de vidrio y mantenidos en hielo (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) conteniendo 60 µl de solución anticoagulante (PBS con 10 mM de Na₂EDTA, 26 mM de citrato de sodio, 26 mM de ácido cítrico y 100 mM de glucosa) ⁽¹⁰⁰⁾. Para normalizar las recuperaciones obtenidas en las etapas de preparación, extracción y análisis de la muestra se empleó un análogo de HJ III deuterado (HJ III-D3) como estándar interno ⁽⁴⁵⁾. Paralelamente a las muestras, se corrieron muestras de HJSB₃ (Toronto Research Chemicals) como control. Después de la extracción de la hemolinfa, se añadieron 10 µL de 6,25 ppb de HJ III-D3 en acetonitrilo a cada muestra, seguido de 600 µL de hexano. Las muestras fueron agitadas con vórtex (1 min.) y centrifugadas durante 5 min (4 °C; 2.000 × g). La fase orgánica se transfirió a un nuevo vial silanizado, se secó bajo el flujo de nitrógeno y se almacenó a -20 °C. Para el análisis, los extractos secos fueron suspendidos en 50 µl de acetonitrilo, agitados con vórtex durante 1 min. y transferidos a un nuevo vial silanizado. El “screening” de HJ se realizó utilizando un protocolo de HPLC-MS/MS ⁽⁴⁵⁾. La identificación y cuantificación de HJSB₃ en la hemolinfa de *D. maxima* se basó en la monitorización de reacción múltiple (MRM), utilizando

las dos transiciones de fragmentación más abundantes: 283→233 (primaria) y 283→145 (secundaria) ^(45, 100) (Fig. 7).

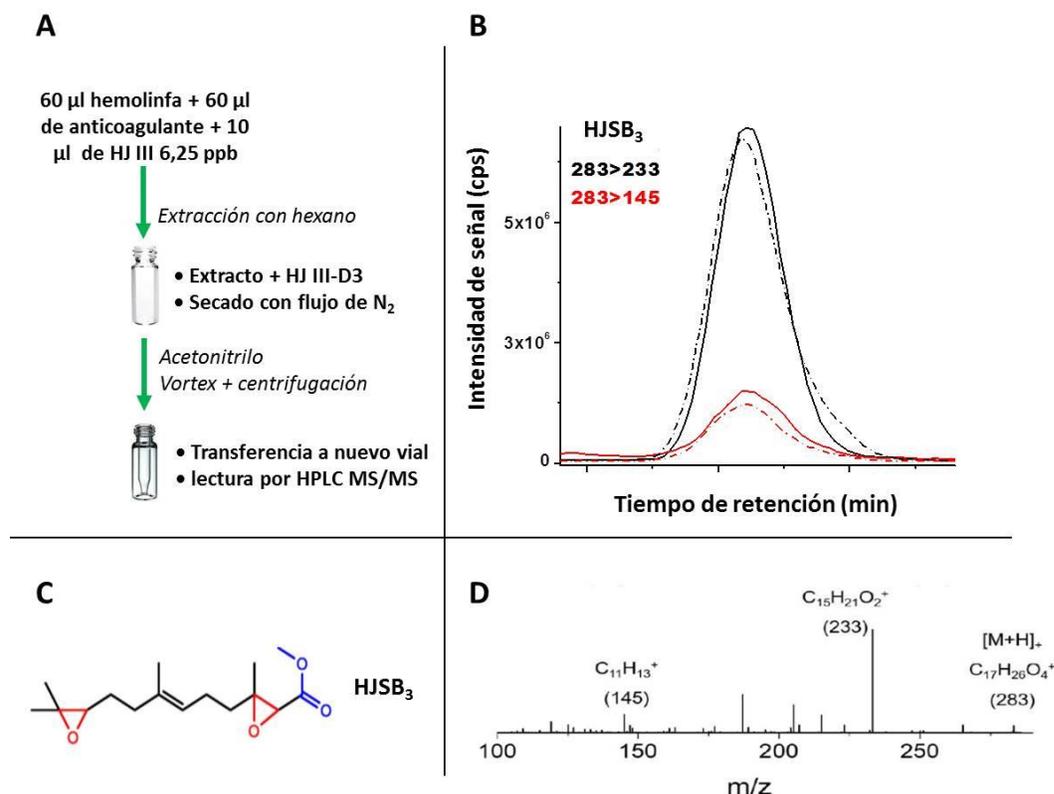


Fig. 7: Cuantificación de HJSB₃ en la hemolinfa de *D. maxima*. (A) Esquema de extracción de HJ a partir de muestras de hemolinfa. (B) Caracterización de HJSB₃ ⁽⁴⁵⁾ mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). En el eje X se muestran los perfiles cromatográficos (tiempo de retención en minutos) y en el eje Y, la intensidad de señal (cps; cuentas por segundo). Las líneas sólidas corresponden a la muestra de hemolinfa, en tanto que las líneas punteadas corresponden al estándar de HJSB₃. Ambas presentan el mismo comportamiento cromatográfico. (C) Estructura química de HJSB₃. (D) Perfil de fragmentación mostrando las dos transiciones indicadas en (B) (283→233 y 283→145) utilizadas para detectar de la presencia de HJSB₃ en la hemolinfa (línea sólida de (B)) y en la muestra estándar (línea de puntos de (B)). Las muestras de hemolinfa de *D. maxima* para la caracterización de HJSB₃ fueron donadas gentilmente por el autor de esta tesis a Ramirez y colaboradores ⁽⁴⁵⁾.

3.9. Tratamiento con HJ III.

Las hembras pre-vitelógenicas a los 4-6 días post-ecdisis fueron topicadas en el abdomen con 150 µg de HJ III por gramo de peso corporal del insecto en 5 µl de acetona, o bien con 5 µl de acetona (control). Se tomaron muestras individuales de cuerpo graso, ovarios y hemolinfa a los 5-6 días del tratamiento, y se procesaron para qPCR o ELISA. Además, para analizar el efecto de la administración de HJ III sobre la captación de Lp y Vg por los ovocitos en la etapa pre-vitelogénica, las hembras tratadas con HJ III o los controles fueron sometidas a estudios funcionales *in vivo*. Brevemente, Lp fue marcada con el fluoróforo no intercambiable Dil (Lp-Dil), mientras que Vg fue conjugada en su fracción proteica con FITC (Vg-FITC) ^(19, 101). Las hembras a los 5-6 días del tratamiento fueron co-inyectadas con Lp-Dil y Vg-FITC (10 µl, 1 µg/µl cada una). En todos los casos, los insectos inyectados se mantuvieron a 28 °C durante 3 h tras lo cual, los ovarios fueron diseccionados en PBS y procesados para el seccionamiento con criostato. Las secciones de tejido (10 µm) se secaron al aire, se montaron en Fluorsave y se examinaron con un microscopio láser confocal Olympus FV300, equipado con láseres de 488 y 453 nm, (Olympus, Tokio, Japón). Las imágenes adquiridas fueron procesadas con el software FluoView FV1000 versión 1.7.1.0.

3.10. Tratamiento con Precocene II.

El Precocene II es un compuesto derivado de plantas del género *Ageratum*, que actúa específicamente sobre el parénquima celular de la CA de insectos sensibles para causar efectos antagónicos a HJ o “anti-HJ” ⁽¹⁰²⁾. Hembras en los días 10-12 posteriores a la ecdisis fueron topicadas en el abdomen con 1 mg de Precocene II por g de peso del insecto disuelto en 5 µl de acetona o con 5 µl de acetona (controles). Un día después, las hembras de ambos grupos experimentales fueron alimentadas con una comida de sangre. Se tomaron muestras de cuerpos grasos, ovarios y hemolinfa de los insectos entre los días 6-8 post-alimentación y se procesaron para qPCR y ELISA. Las muestras de hemolinfa también fueron procesadas para la cuantificación de HJ a los fines de evaluar el efecto inhibitorio de Precocene II sobre los niveles circulantes de HJSB₃.

Para evaluar el efecto del Precocene II en la transferencia de lípidos mediada por Lp a los ovocitos, las hembras tratadas o los controles se sometieron a estudios *in vivo* para seguir el destino de toda la lipoproteína o el de su fracción de lípidos intercambiables. Brevemente, las hembras fueron co-inyectadas 6 a 8 días después de la comida de sangre con Lp-Dil y con Lp conjugada con un análogo fluorescente del ácido palmítico, Bodipy FL C16, que permite evaluar la fracción de lípidos intercambiables de la lipoproteína (10 µl, 1 µg/µl cada uno) ⁽¹⁰¹⁾. En todos los casos, los insectos inyectados se mantuvieron a 28 °C durante 3 h tras lo cual, los ovarios fueron diseccionados en PBS y procesados para el seccionamiento en criostato y posterior examen por microscopía confocal como se describe en la sección 3.9.

3.11. Diseño y síntesis de las dobles hebras.

Para sintetizar las moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc) se utilizaron templados para *RLp* de 693 pares de bases (pb) y de 317 bp para *Met*, (*RLpdc* y *Metdc*, respectivamente) (Fig. 8). Los “primers” específicos para los genes se combinaron con la secuencia promotora de la ARN polimerasa T7 (Tabla S1). La síntesis de los ARNdc se realizó utilizando el kit MEGAScript ARNi, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ARNdc se precipitaron utilizando acetato de amonio/etanol, y luego se suspendieron en agua ultrapura hasta una concentración final de 5 µg/µl. La eficiencia del silenciamiento fue confirmada en cada experimento mediante qPCR. Como control, se utilizó una molécula de ARNdc basada en el gen de resistencia a la ampicilina (*ARGdc*) del sistema pGEM-T Easy Vector ⁽⁶⁰⁾.

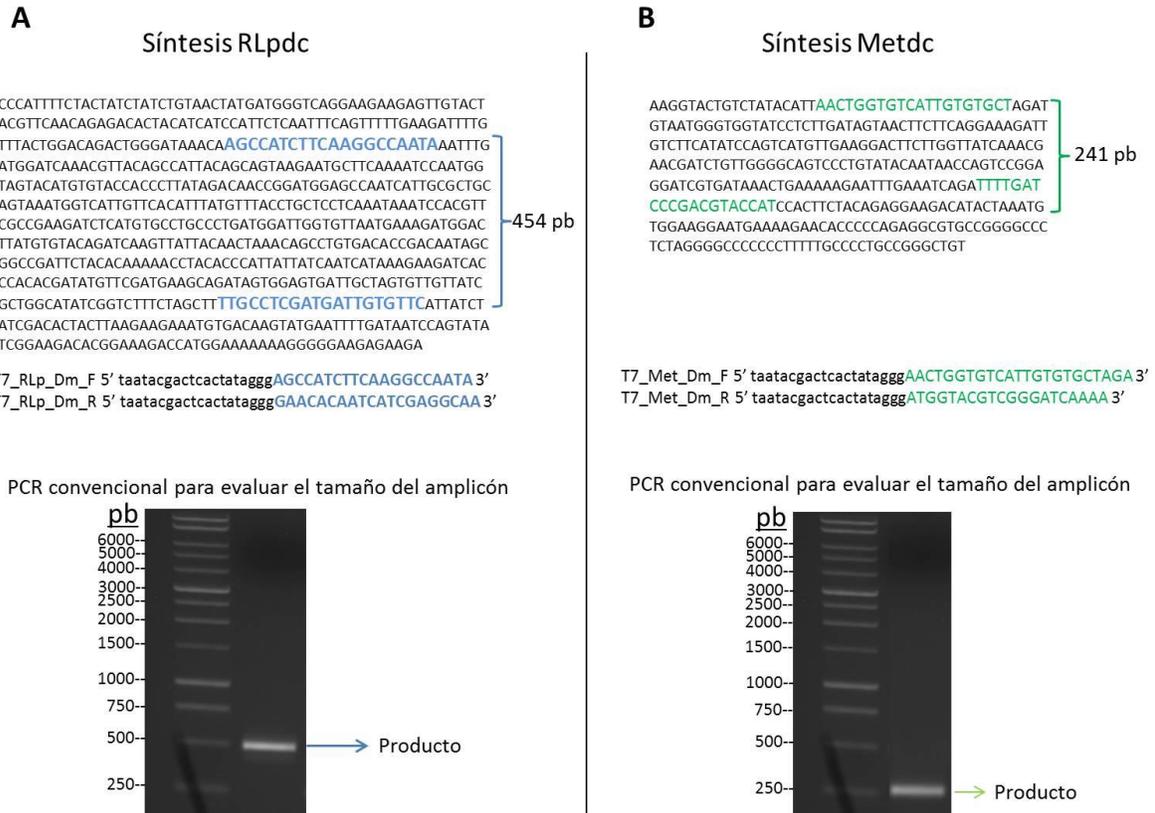


Fig. 8: Síntesis de las dobles hebras para el silenciamiento de los genes *RLp* y *Met*: Se muestra el primer paso de síntesis de las dobles hebras y la secuencia de los “primers” utilizados, la secuencia “molde” y la ubicación en dicho molde de los “primers”. Se puede observar que el producto tiene el tamaño esperado. En (A), el tamaño del molde del gen *RLp* utilizado para la síntesis de la doble hebra fue de 693 pb y el tamaño de *RLpdc* fue de 454 pb. En (B), el tamaño del molde para la síntesis de la doble hebra fue de 317 pb y el tamaño de *Metdc* obtenido fue de de 241 pb.

3.12. Silenciamiento de los genes *RLp* y *Met* mediante ARNi.

Para el silenciamiento del gen *RLp*, las hembras de *D. maxima* a los 10-12 días post-ecdisis fueron inyectadas en el hemocele con 10 µg de *ARGdc* o *RLpdc* en 2 µl de agua ultrapura, utilizando una microjeringa Hamilton (60, 103). A las 24 h post-inyección, los insectos controles y tratados fueron alimentados y 6-8 días post-alimentación, fueron diseccionados para la

obtención de ovarios y cuerpos grasos y procesados para evaluar la transcripción del gen *RLp* mediante qPCR según lo descrito en **3.7**.

Para estudiar el efecto del silenciamiento del gen *RLp* sobre la transferencia de lípidos a los ovocitos, hembras a las 24 h post-inyección con RLpdc o ARGdc fueron alimentadas y a los 6-8 días post-alimentación fueron co-inyectadas con Lp-Bodipy-FA y Lp-Dil (10 μ l; 1 μ g/ μ l). En todos los casos, los insectos inyectados se mantuvieron a 28 °C durante 3 h. Posteriormente los ovarios fueron diseccionados en PBS y examinados en un microscopio láser confocal Olympus FV300.

Para el silenciamiento del gen *Met*, hembras a los días 10-12 días post-ecdisis fueron inyectadas con 10 μ g de Metdc o ARGdc en 1 μ l de agua ultrapura. A las 24 h post-inyección, las hembras tratadas y controles fueron alimentadas y a los 2 días post-alimentación fueron diseccionadas para la obtención de ovarios y cuerpos grasos, los que fueron empleados para evaluar la transcripción del gen *Met* y el efecto del silenciamiento sobre los transcriptos *Vg* y *Lp* en cuerpo graso, *RVg* y *RLp* en ovario y la morfología del tejido ovárico.

3.13. Clonado y secuenciamiento de *Met*.

Utilizando la técnica de RACE (por sus siglas en ingles Rapid Amplification cDNA end), se obtuvo la secuencia completa del transcripto que codifica para *Met*, siguiendo las indicaciones del kit SMARTer® RACE 5'/3' (Takara Bio USA, Inc). Para el primer paso de síntesis de ADNc, se utilizó una mezcla universal de "primers" (MUP) que reconocen regiones específicas de los extremos 3' o 5' (3'RACE-ADNc o 5' RACE-ADNc

respectivamente). La síntesis de los RACE-ADNc se realizó a partir de 1 µg de ARN total de ovario. Para la reacción de amplificación por RACE se utilizaron primers específicos del gen de interés (PEG), en dirección “sentido” para el 3'RACE-ADNc y “anti sentido” para el 5' RACE-ADNc. Para conseguir rendimientos óptimos, los PEG fueron diseñados con una extensión aproximada de 23 a 28 nucleótidos (nt), conteniendo un porcentaje de Guanidina / citosina (GC) del 50-70% y una temperatura de “melting” (Tm) > al 70 %. Adicionalmente, a los PEG se le adicionó una secuencia de 15 nt (GATTACGCCAAGCTT), necesaria para la inserción del gen de interés en el vector p-RACE® (Fig. 9 A y B). La secuencia de los PEG se lista en la tabla S1. Una vez concluida la reacción de amplificación, el tamaño del producto de RACE se verificó mediante un gel de agarosa al 1%, luego del cual la banda obtenida se extrajo utilizando el kit “Nucleo-Spin Gel and PCR Clean-Up”, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para una óptima calidad en el secuenciamiento del gen de interés, se procedió a clonar los fragmentos obtenidos. Para esta etapa, 7 µl del producto de purificación de la banda extraída del gel, se combinaron con 1 µl de p-RACE, y se adicionaron 2 µl de una mezcla conteniendo las enzimas necesarias para la linealización del vector y su fusión con el gen de interés (Fig. 9 B). La mezcla de reacción fue incubada a 50 °C por 15 min. Por último, se procedió a la transformación de las células competentes (CCS de Células Competentes Stellar®). Para ello, en un tubo se colocaron 50 µl de CCS y 2,5 µl del producto obtenido de la fusión del gen de interés con p-RACE. Esta mezcla de reacción se mantuvo en hielo durante 30 min y posteriormente, con el fin de producir un shock térmico, la mezcla fue incubada a 42°C durante 45 segundos. Concluido este paso, el tubo fue nuevamente colocado en hielo por 1 a 2 min y se agregaron 250 µl de medio de cultivo

SOC, rico en extracto de levaduras, sales y glucosa ⁽¹⁰⁴⁾. La mezcla se incubó por 1 h a 37°C en agitación constante (160-225 rpm). Finalmente, la mezcla se esparció en placas de cultivo con medio lisogénico Luria Bertani (LB) ⁽¹⁰⁵⁾ y las células se dejaron crecer durante toda la noche a 37°C. Se seleccionaron clones al azar y mediante PCR se verificó que el amplicon insertado fuera del tamaño esperado. Estos clones fueron secuenciados utilizando un equipo 3130XL Genetic Analyzers.

3.14. Análisis bioinformático.

Para corroborar la secuencia del gen *Met* obtenido en **3.13** se utilizó el algoritmo en línea Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). BLAST también fue utilizado para predecir los dominios principales del receptor nuclear y para “mapear” los exones que componen el transcripto, usando en este último caso, la secuencia homóloga reportada para *R. prolixus* ⁽⁵²⁾. La predicción de la secuencia de aminoácidos fue realizada mediante el uso de la herramienta en línea ExPasy Translate (<https://web.expasy.org/translate/>). Con esta secuencia, se realizó un modelado molecular proteico utilizando el programa I-TASSER package ⁽¹⁰⁶⁾. La estructura tridimensional obtenida a partir del mejor modelo se visualizó con los programas UCSF chimera ⁽¹⁰⁷⁾ y PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC). Se realizó un perfil de hidrofobicidad utilizando para su cálculo la escala Kyte-Doolittle ⁽¹⁰⁸⁾. Para la evaluación de cargas electrostáticas se utilizó la herramienta APBS ⁽¹⁰⁹⁾. Después de esta caracterización parcial de *Met*, la estructura terciaria alcanzada fue utilizada para los ensayos de interacción

in silico. Para este análisis se emplearon las regiones que contienen los dominios PAS, por ser los únicos con moldes cristalizados.

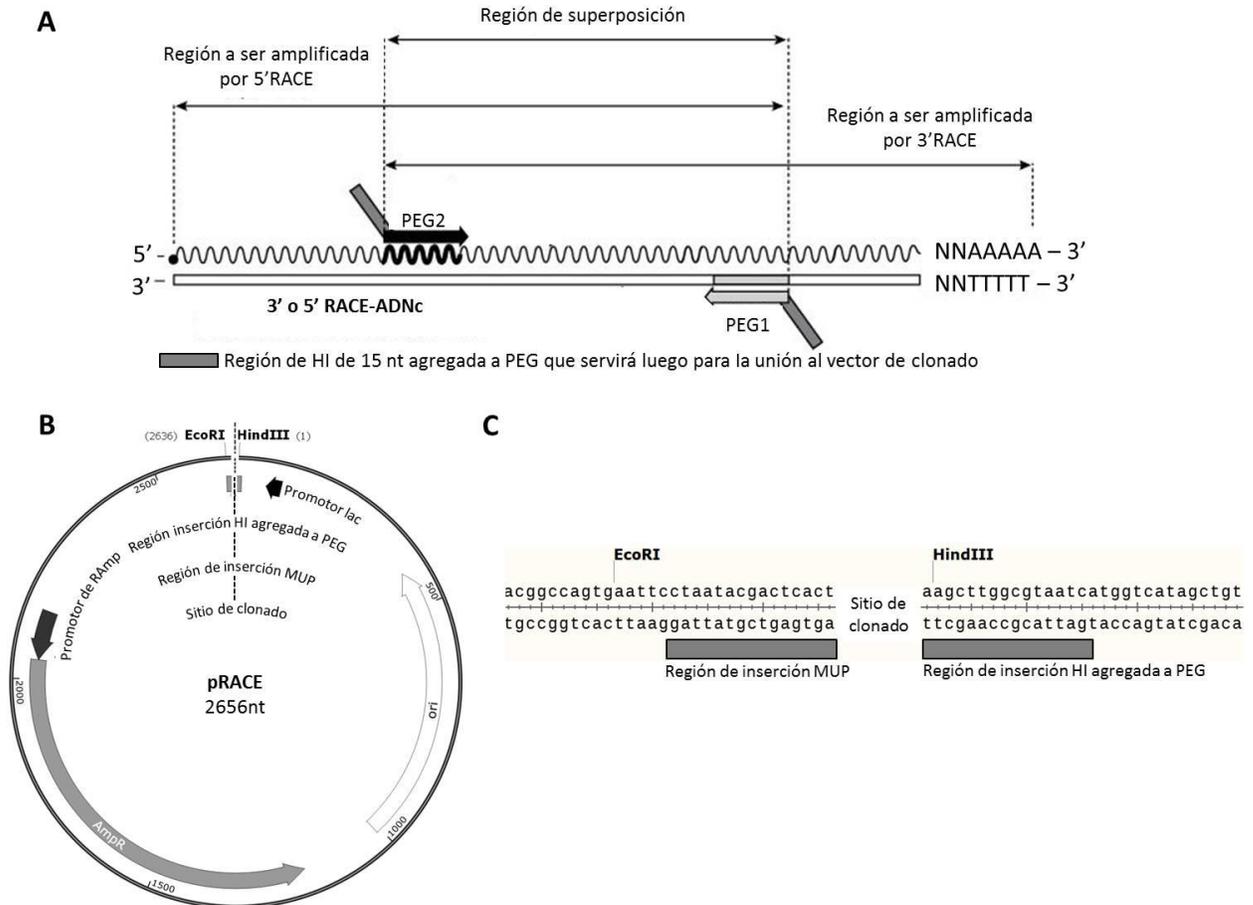


Fig. 9: (A) Esquema de la reacción de RACE, mostrando los primers específicos del gen (PEG) y la región a ser amplificada. (B) Mapa del vector pRACE, de 2656 nt de longitud, mostrando el promotor del gen de resistencia a ampicilina (RAmp), y el promotor lac. Se observa la región de inserción HI donde se unirán los primers, PEG y MUP como así también el sitio de clonado. (C) Ampliación de la región de inserción mostrando los sitios de corte con las enzimas de restricción, EcoRI y Hind III.

La historia evolutiva fue inferida usando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo basado en la matriz de JTT ⁽¹¹⁰⁾. Las secuencias de nucleótidos de los artrópodos utilizadas para el análisis, se encuentran depositadas en la base de datos de NCBI. Estas fueron alineadas usando MAFFT ⁽¹¹¹⁾ y veinte alineaciones alternativas de longitud completa fueron

combinadas a través de GUIDANCE2 ⁽¹¹²⁾ y usadas para inferir la filogenia de la proteína. La filogenia se realizó con PhyML ⁽¹¹³⁾ bajo el modelo de Máxima Probabilidad y LG+G+I ^(114, 115) y utilizando el análisis de soporte de ramas (Approximate likelihood-ratio test for branches, aLRT) ⁽¹¹⁶⁾.

3.14. Análisis estadístico.

Excepto que se indique lo contrario, los resultados son presentados como la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes. Los gráficos y los tests estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism 6.0 y GraphPad InStat 3.0. (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Todos los datos fueron analizados para normalidad y homogeneidad de la varianza utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo empleando el test *t* de Student o ANOVA de una vía y utilizando el test de Student-Newman-Keuls para múltiples comparaciones como post-test. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Todos los conjuntos de datos pasaron la normalidad y pruebas de homocedasticidad.

Capítulo 4: RESULTADOS

4.1. Cambios en las proteínas precursoras del vitelo y sus receptores durante el ciclo reproductivo de *D. maxima*.

En una primera instancia se evaluaron los cambios en los transcritos de *Lp* y *Vg* en cuerpo graso, y la de sus receptores *RLp* y *RVg* en tejido ovárico. En el cuerpo graso se detectaron bajos niveles de ARNm de *Lp* durante la pre-vitelogénesis, y un aumento significativo en los primeros días de la vitelogénesis, con un máximo al día 4 post-alimentación (Fig. 10 A D y G respectivamente). Los niveles del transcrito *Lp* disminuyeron con el progreso de la fase vitelogénica siendo al día 12 post-alimentación comparable a lo registrado en la fase pre-vitelogénica. En la post-vitelogénesis, los niveles de ARNm para *Lp* fueron bajos y comparables a la vitelogénesis tardía (día 12 post-alimentación). Por otro lado, en el tejido ovárico el perfil de transcripción del gen *RLp* fue similar al del gen *Lp* en cuerpo graso, destacándose un incremento significativo durante los días 4 y 6 post- alimentación (Fig. 10 C). En relación a la concentración de *Lp* en hemolinfa evaluada por ELISA, se observó un aumento durante la vitelogénesis con niveles máximos entre los días 4 y 12 post-alimentación. Sorprendentemente, la concentración de *Lp* en la hemolinfa permaneció elevada en la post-vitelogénesis (Fig. 10 B).

A semejanza de lo reportado en el triatomino *T. infestans* ⁽¹¹⁷⁾, la evaluación transcripcional de *Vg* en cuerpo graso permitió detectar dos genes que codifican las isoformas *Vg1* y *Vg2*.

Ambas aumentaron su expresión significativamente en los días evaluados de la vitelogénesis con respecto a la pre-vitelogénesis, registrándose una disminución marcada de ambos transcritos en la fase de atresia temprana. Sin embargo, se destaca que a todos los tiempos analizados de la vitelogénesis, los niveles para *Vg2* fueron mayores a *Vg1* (Fig. 10 D y G). En cuanto a los niveles de Vg en circulación, se observó un aumento significativo durante la vitelogénesis (Fig. 10 E), en correlación con el aumento del ARNm de ambos genes *Vg* en cuerpo graso (Fig. 10 D y G). No obstante, los niveles de Vg en hemolinfa permanecieron elevados en la atresia. En el tejido ovárico, los niveles del transcripto *RVg* aumentaron durante la transición de la pre-vitelogénesis a la vitelogénesis, alcanzando un máximo al día 6 post-alimentación. Posteriormente disminuyeron significativamente en la atresia folicular temprana (post-vitelogénesis) (Fig. 10 F).

En conjunto, los resultados obtenidos permitieron caracterizar el perfil de expresión de los transcritos *Vg/RVg* y *Lp/RLp* en función del estado nutricional y reproductivo de las hembras de *D. maxima*, y establecer su correlación con los niveles de Vg y Lp en la hemolinfa. Se observó una correlación entre los cambios en los niveles de ARNm de las PPV en el cuerpo graso, su concentración en la hemolinfa y los cambios en los niveles de los transcritos *RVg* y *RLp* en el tejido ovárico. La comida de sangre desencadenó la vitelogénesis, con un aumento de los niveles de transcripción de *Lp* y *Vg* en el cuerpo graso, y de *RLp* y *RVg* en el ovario.

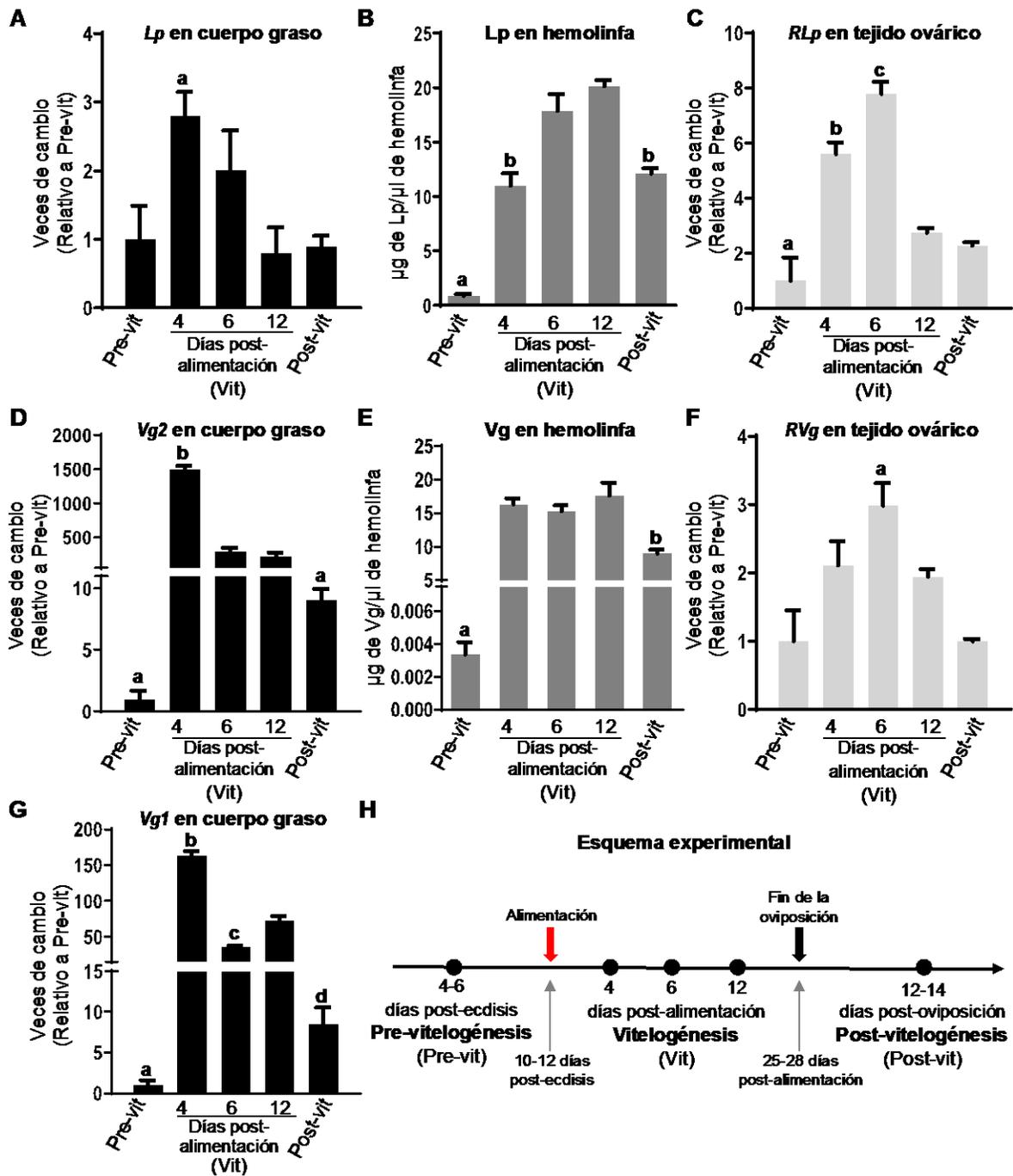


Fig. 10: Expresión temporal de las proteínas precursoras del vitelo (PPV) y sus receptores durante el ciclo reproductivo. Las hembras de *D. maxima* fueron diseccionadas en días representativos del ciclo: día 4-6 post-ecdisis (Pre-vit); días 4, 6 y 12 pos-alimentación (vitelogénesis, Vit); y días 12-14 luego de finalizada la oviposición (Post-vit). Los niveles de ARNm para *Vg1*, *Vg2* y *Lp* y *RVg* y *RLp* fueron evaluados mediante qPCR en cuerpo graso y ovario. Los niveles de *Vg* y *Lp* en la hemolinfa fueron cuantificados por ELISA y se expresaron como µg por µl de hemolinfa. (A) ARNm de *Lp* en cuerpo graso: ^a*P*< 0,05 vs. Pre-vit, 12 días Vit

y Post-vit. **(B) ARNm de *RLp* en ovario:** ^a*P*< 0,001 vs. 4 y 6 días Vit; ^b*P*< 0,05 vs. 12 días Vit y Post-vit, ^c*P*< 0,001 vs. 12 días Vit y Post-vit. **(C) *Lp* en hemolinfa:** ^a*P*< 0,001 vs. 4, 6 y 12 días Vit; ^b*P*< 0,01 vs. 6 y 12 días Vit. **(D) ARNm de *Vg1* en cuerpo graso:** ^a*P*< 0,001 vs. 4, 6 y 12 días Vit; ^b*P*< 0,0001 vs. 6 y 12 días Vit y Post-vit; ^c*P*< 0,01 vs. 12 días Vit y Post-vit; ^d*P*< 0,01 vs. 12 días Vit. **(E) ARNm de *RVg* en tejido ovárico:** ^a*P*< 0,01 vs. Pre-vit y Post-vit. **(F) *Vg* en hemolinfa:** ^a*P*< 0,001 vs. Pre-vit y Post-vit, ^b*P*< 0,05 vs. 4, 6 y 12 días Vit. **(G) ARNm de *Vg2* en cuerpo graso:** ^a*P*< 0,05 vs. 6 y 12 días Vit; ^b*P*< 0,0001 vs. Pre-Vit y 6 y 12 días Vit; ^c*P*< 0,05 vs. 6 y 12 días Vit. **(H)** Cronograma para el esquema experimental. Los resultados son mostrados como la media ± EEM de tres experimentos independientes. Un valor de *P* <0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

Con el objetivo de integrar la dinámica de expresión de los genes *Vg/RVg* y *Lp/RLp* con el control nutricional y endocrino de la reproducción, se cuantificaron los niveles de HJ en la hemolinfa de *D. maxima* mediante CL-MS/MS. Recientemente, Ramirez y col. caracterizaron la forma molecular de HJ presente en la hemolinfa de las hembras de *D. maxima*, la cual corresponde a HJSB₃ (Hormona juvenil III skip-bis epóxido) ⁽⁴⁵⁾. Los niveles de HJSB₃ en la pre-vitelogénesis (~ 50 pg/ml) registraron un aumento significativo y sostenido de hasta 3 veces luego del estímulo de la alimentación (fase vitelogénica) (Fig. 11).

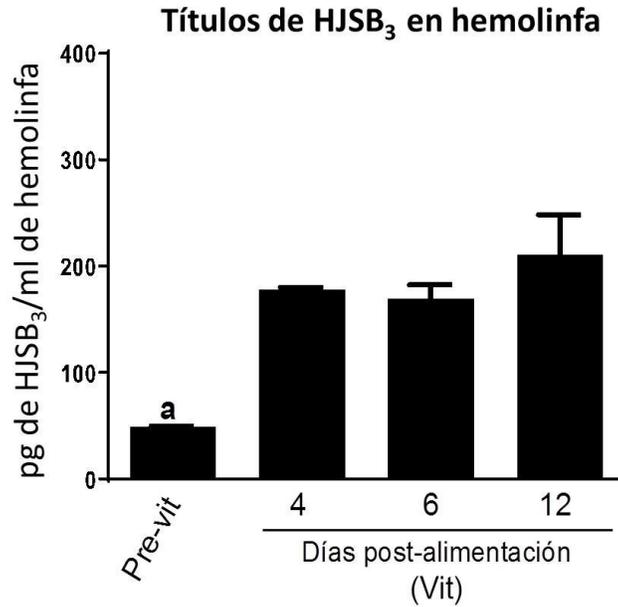


Fig. 11: Niveles de HJSB₃ en circulación en días representativos del ciclo reproductivo de *D. maxima*. Se colectaron muestras de hemolinfa de hembras en el día 4 post-ecdisis (pre-vitelógenesis o Pre-vit) y a los días 4, 6 y 12 post-alimentación (vitelógenesis o Vit). Los niveles de HJSB₃ se cuantificaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) y fueron expresados en pg/ml. Los resultados son mostrados como media ± EEM de tres experimentos independientes. ^a*P* < 0,05 vs. 4, 6 y 12 días post-alimentación.

4.2. Efecto del tratamiento con HJ III sobre *Vg/RVg* y *Lp/RLp* en hembras pre-vitelogénicas de *D. maxima*.

Para lograr una mejor comprensión respecto al papel de HJ en la regulación de la expresión de las PPV y sus receptores durante la ovogénesis en *D. maxima*, las hembras en la fase pre-vitelogénica, en las cuales los niveles de HJSB₃ son bajos (Fig. 11), fueron estimuladas mediante la administración de HJ III (Fig. 12 A). Los resultados mostraron que HJ III promovió un aumento significativo de los transcritos *Vg1* y *Vg2* en el cuerpo graso a los días 4-6 post-

tratamiento (Fig. 12 B y C). Como consecuencia de la administración de HJ III, también se observó un incremento en la expresión del ARNm de *Lp* (Fig. 12 D), y en el contenido de Vg y *Lp* en el cuerpo graso (Fig. 12 E y F). En concordancia con estos resultados, la concentración de Vg y *Lp* en circulación fue mayor en hembras tratadas con HJ III vs. hembras controles (Fig. 12 G y H), aunque tal efecto fue más pronunciado sobre los niveles de Vg. En tanto, en el tejido ovárico se observó un aumento en los niveles de ARNm para los genes *RVg* y *RLp* (Fig. 12 I y J).

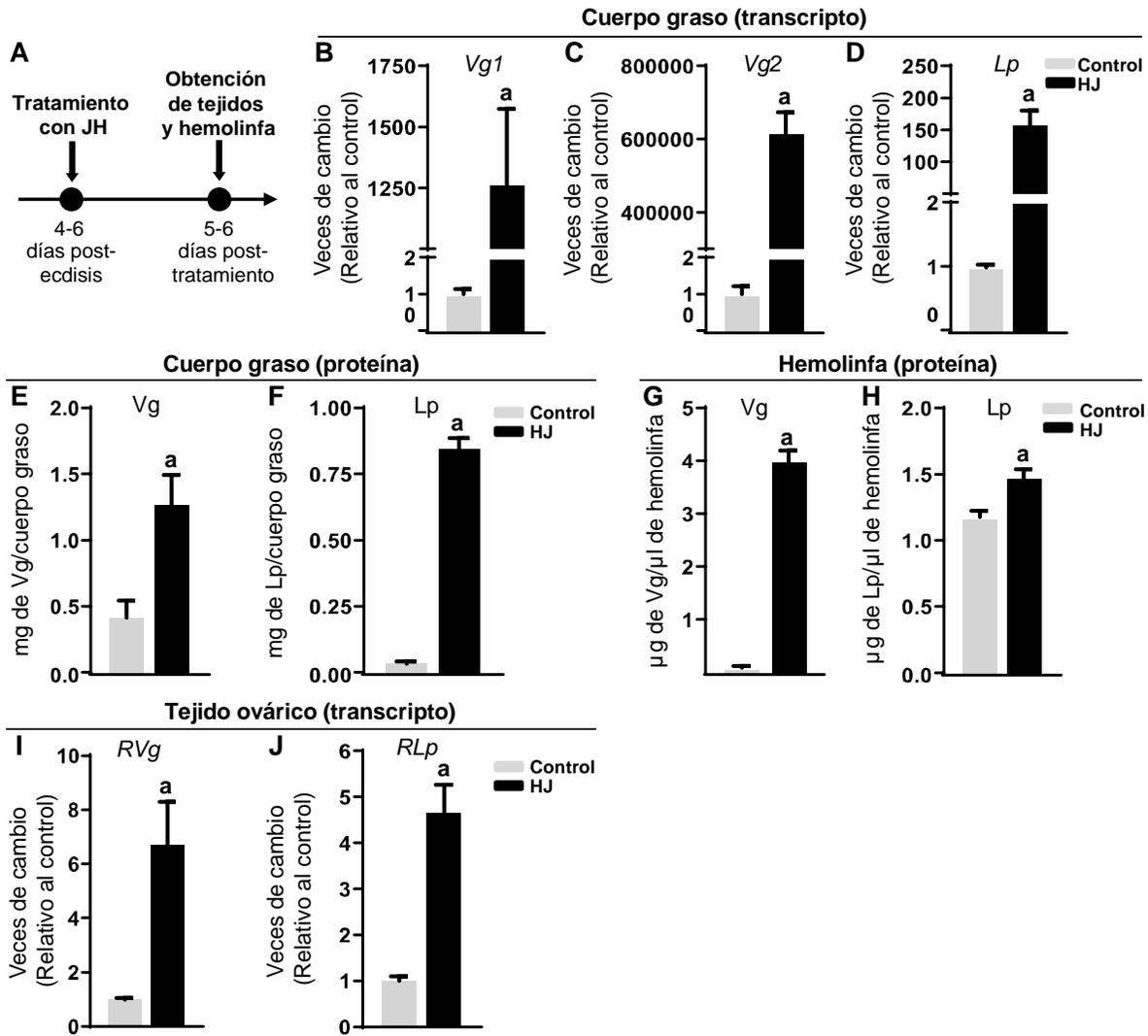


Fig. 12: Efecto del tratamiento del HJ III sobre las proteínas precursoras del vitelo (PPV) y sus receptores. (A) Esquema experimental. Hembras a los 4-6 días post-ecdysis fueron tratadas con HJ III o acetona (control). A los 10-12 días post-ecdysis se tomaron muestras individuales de tejido ovárico, cuerpo graso y hemolinfa. Los niveles de ARNm fueron evaluados por qPCR y expresados como las veces de cambio respecto al control (~ 1). Vg y Lp en la hemolinfa y cuerpo graso fueron cuantificados por ELISA y expresados como mg de Vg o Lp por cuerpo graso o como Vg o Lp (μg) por μl de hemolinfa, respectivamente. (B) ARNm de *Vg1* en cuerpo graso: $^aP < 0,01$ vs. control; (C) ARNm de *Vg2* en cuerpo graso: $^aP < 0,01$ vs. control. (D) ARNm de *Lp* en cuerpo graso: $^aP < 0,01$ vs. control. (E) Vg en cuerpo graso: $^aP < 0,05$ vs. control. (F) Lp en cuerpo graso: $^aP < 0,0001$ vs. control. (G) Vg en hemolinfa: $^aP < 0,0001$ vs. control. (H) Lp en hemolinfa: $^aP < 0,05$ vs. control. (I) ARNm de *RVg* en tejido ovárico: $^aP < 0,05$ vs. control; (J) ARNm de *RLp* en ovario: $^aP < 0,05$ vs. control. Los resultados son mostrados como media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

En trabajos previos de nuestro grupo empleamos inyecciones *in vivo* de trazadores fluorescentes para seguir el destino de Vg y Lp (Vg-FITC y LpDil, respectivamente) o el de la fracción de lípidos intercambiables de Lp (Lp-Bodipy-FA) ^(19, 101). En este trabajo de tesis se observó que la administración de HJ III en hembras en la fase pre-vitelogénica de *D. maxima* promovió la endocitosis de Vg y Lp, observándose en los ovocitos de folículos terminales de las hembras tratadas con HJ III un aumento en la señal fluorescente para Vg-FITC y Lp-Dil en los gránulos de vitelo respecto a los individuos controles (Fig. 13).

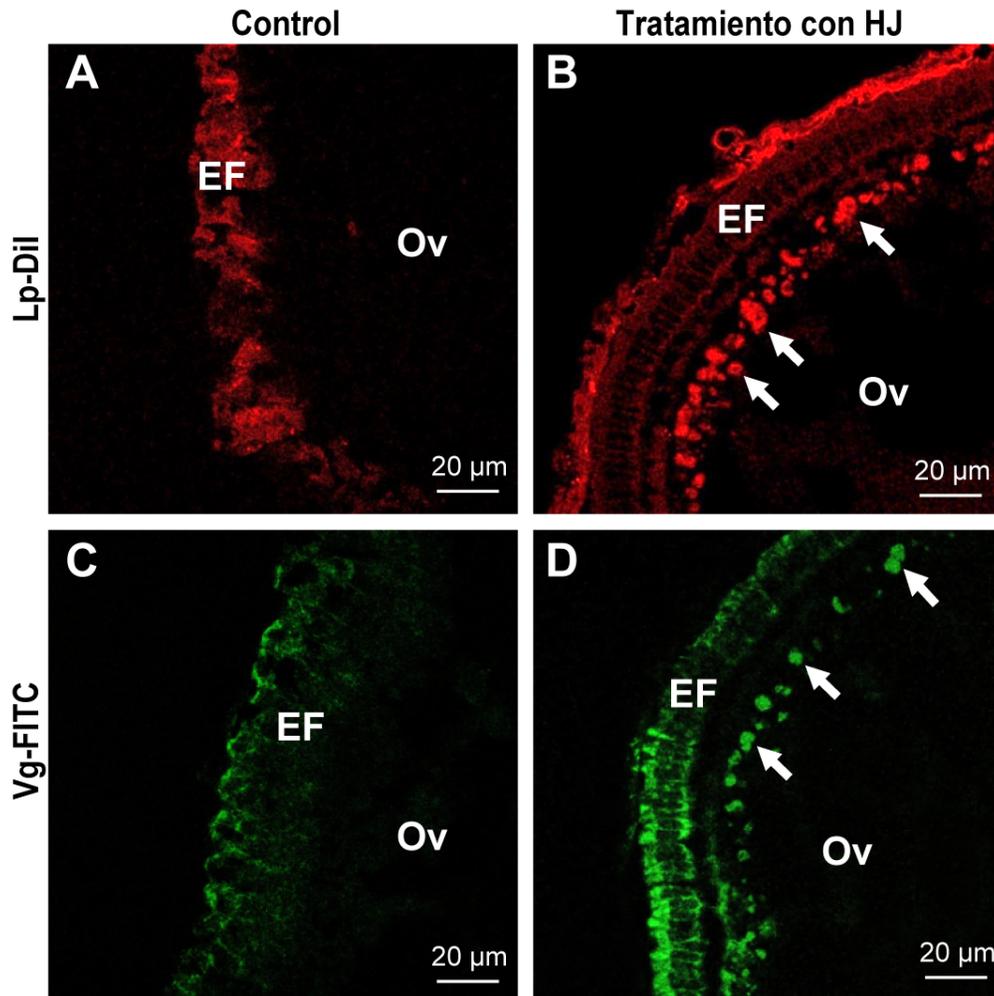


Fig. 13: Efecto del tratamiento del HJ III sobre la endocitosis de las proteínas precursoras del vitelo por los ovocitos. Hembras de *D. maxima* a los 4 a 6 días post-ecdisis fueron tratadas con HJ III o acetona (control). A los 5 o 6 días del tratamiento fueron co-inyectadas con Lp-Dil y Vg-FITC y disecados 3 h después. Los ovarios obtenidos fueron procesados para microscopía de fluorescencia. **(A-B)** Secciones de folículos terminales en tejido ovárico. La señal de fluorescencia para Lp (flechas) fue detectada principalmente en los gránulos de vitelo luego del tratamiento con HJ III (B). **(C-D)** Secciones de folículos terminales en tejido ovárico. La señal de fluorescencia para Vg (flechas) se muestra en los gránulos de vitelo sólo después del tratamiento con HJ III (D). Resultados similares fueron obtenidos en al menos tres experimentos independientes. EF, epitelio folicular; Ov, ovocito.

4.3. Efecto del tratamiento con Precocene II.

Como estrategia experimental para profundizar en el estudio del rol de la HJ durante la ovogénesis, hembras de *D. maxima* al día 10-12 post-ecdisis fueron tratadas con Precocene II, un conocido inhibidor de la síntesis de HJ por destrucción de células del parénquima de la CA mediante alquilación nucleofílica ⁽¹⁰²⁾. A las 24 h post-tratamiento, las hembras fueron alimentadas para estimular el inicio a la vitelogénesis (Fig. 14 A), evaluándose en primera instancia el impacto de Precocene II sobre los niveles de HJSB₃ (Fig. 14 B). Los resultados mostraron que los niveles de HJSB₃ en la hemolinfa disminuyeron aproximadamente un 65% luego del tratamiento con Precocene II, demostrándose de esta manera su efecto inhibitorio sobre la síntesis de HJ (Fig. 14 B).

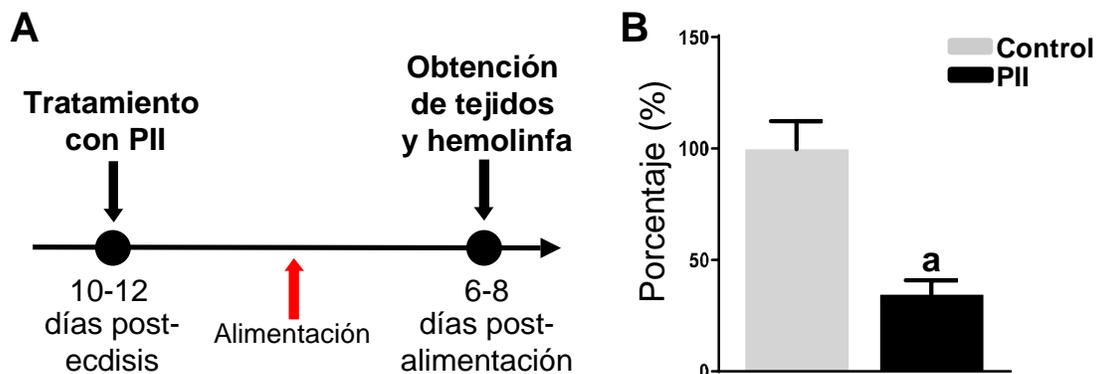


Fig. 14: Efecto del tratamiento con Precocene II (PII) sobre los niveles de HJSB₃. (A) Esquema experimental. Hembras de *D. maxima* a los 10-12 días post-ecdisis fueron tratadas con PII o acetona (control). (B) Niveles de HJSB₃ en la hemolinfa cuantificada mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Los resultados se muestran como el porcentaje de HJSB₃ en circulación, considerando al control como el 100%. ^a $P < 0,05$ vs. control. Los niveles de HJSB₃ son la media \pm EEM de tres experimentos independientes. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

En el cuerpo graso Precocene II indujo una disminución significativa en la transcripción de los genes *Vg1* y *Vg2* (Fig. 15 A y E) y consecuentemente, en los niveles de Vg en el cuerpo graso y en la hemolinfa (Fig. 15 B y C). Por el contrario, Precocene II no modificó los niveles del transcripto *Lp* (Fig. 15 I), así como el contenido de *Lp* en cuerpo graso y sus niveles en la hemolinfa (Fig. 15 F y G, respectivamente). Asimismo, en el tejido ovárico, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de ARNm para *RVg* y *RLp* entre las hembras tratadas con Precocene II y controles (Fig. 15 D y H).

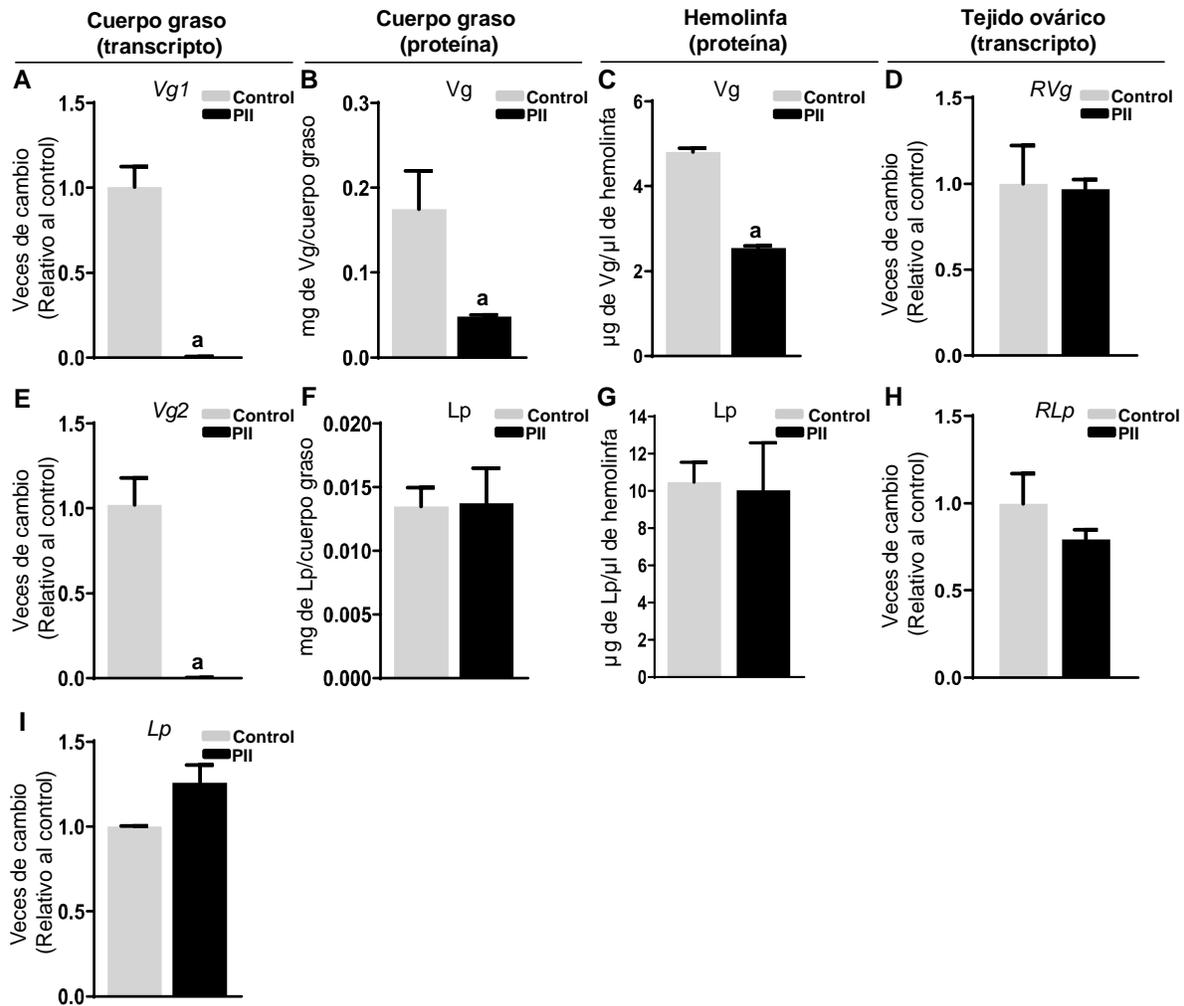


Fig. 15: Efecto del tratamiento con Precocene II (PII) sobre PPV y sus receptores. Hembras de *D. maxima* a los 10-12 días post-ecdisis fueron tratadas con PII o acetona (control). A las 24 h post-tratamiento las hembras fueron alimentadas con sangre y 6-8 días post-alimentación, diseccionadas para la obtención de hemolinfa, cuerpo graso y tejido ovárico. Los niveles de ARNm fueron evaluados por qPCR y expresados como las veces de cambio respecto al control (~ 1). Vg y Lp en la hemolinfa y cuerpo graso fueron cuantificados por ELISA y expresados como mg de Vg o Lp por cuerpo graso o como Vg o Lp (μg) por μl de hemolinfa, respectivamente. **(A)** ARNm de *Vg1* en cuerpo graso: $^aP < 0,001$ vs. control. **(B)** Vg en cuerpo graso: $^aP < 0,05$ vs. control. **(C)** niveles de Vg en la hemolinfa: $^aP < 0,01$ vs. control niveles del transcripto *Lp* en cuerpo graso. **(D)** ARNm de *RVg* en ovario. **(E)** ARNm de *Vg2* en cuerpo graso: $^aP < 0,05$ vs. control *Lp* en cuerpo graso. **(F)** Niveles de *Lp* en cuerpo graso. **(G)** niveles de *Lp* en la hemolinfa. **(H)** ARNm de *RLp* en ovario **(I)** ARNm de *Lp* en cuerpo graso. Los resultados son mostrados como la media \pm EEM de al menos 3 experimentos independientes. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Finalmente, los ensayos funcionales *in vivo* realizados mediante la inyección de trazadores fluorescentes mostraron que, al menos en nuestras condiciones experimentales, la disminución de los niveles de HJSB₃ en la hemolinfa de las hembras tratadas con Precocene II no afectó la vía endocítica de Lp en los ovocitos, observándose una señal de fluorescencia para Lp-Dil similar en los gránulos de vitelo para ambas condiciones experimentales (Fig. 16 A y B). Los resultados también permitieron inferir que la inhibición en la síntesis de HJSB₃ por destrucción de las células de la CA con Precocene II no comprometió el proceso de transferencia de lípidos, mediado por Lp, a nivel de la membrana ya que no se observaron diferencias en el patrón de fluorescencia correspondiente a Bodipy-FA en los ovocitos de las hembras controles y tratadas (Fig. 16 C y D).

En síntesis, las estrategias experimentales tendientes a modificar los niveles de HJSB₃ en distintos momentos del ciclo reproductivo de *D. maxima* mediante el tratamiento con HJ III o Precocene II permitieron profundizar en el abordaje del rol de HJ en la expresión de las PPV y sus receptores, y evaluar su impacto en el reclutamiento de lípidos en los ovocitos.

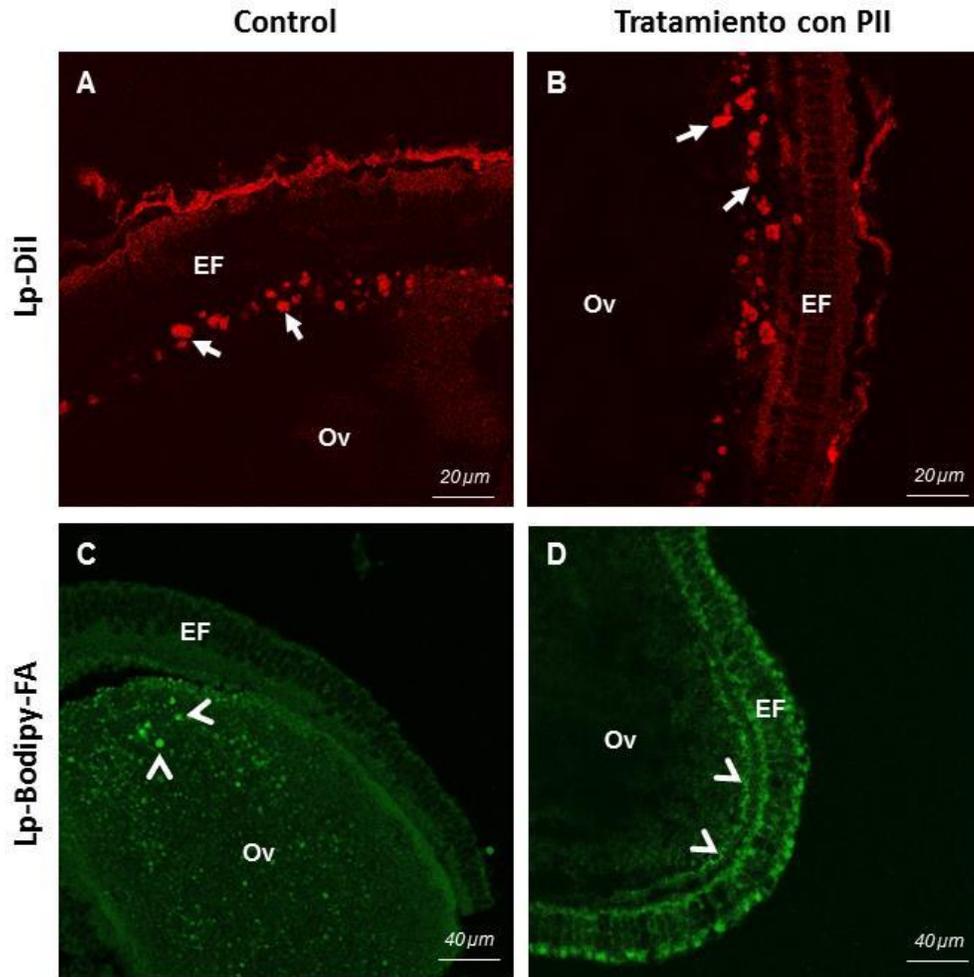


Fig. 16: Efecto del tratamiento con Precocene II (PII) sobre la endocitosis de las proteínas precursoras del vitelo (PPV) por los ovocitos. Hembras a los 10-12 días post-ecdisis fueron tratadas con PII o acetona (control). A las 24 h se les ofreció una comida de sangre y al día 6-8 fueron co-inyectadas con Lp-Dil y Lp-Bodipy-FA. A las 3 h post-inyección los ovarios fueron diseccionados y procesados para microscopía de fluorescencia. **(A-B):** secciones de criostato de tejido ovárico mostrando folículos terminales. La señal de fluorescencia para Lp-Dil (flechas) se muestra en los gránulos de vitelo luego del tratamiento con PII o acetona (control). **(C-D):** Secciones de tejido ovárico mostrando folículos terminales. La señal para Lp-Bodipy-FA (cabeza de flecha) se muestra en las gotas de lípidos de los ovocitos de insectos tratados con PII o acetona (control). Resultados similares fueron obtenidos en al menos tres experimentos independientes. EF, epitelio folicular; Ov, ovocito.

4.4. Efecto del silenciamiento del gen *RLp* sobre la captación de lipoforina y la transferencia de lípidos a los ovocitos.

Con el objetivo de profundizar el conocimiento sobre la relevancia fisiológica de *RLp* en el proceso de transferencia de lípidos mediada por *Lp* a los ovocitos en desarrollo, se llevaron a cabo experimentos para silenciar el gen *RLp* mediante ensayos de ARN de interferencia (ARNi) con ARN doble cadena (ARNdc) en hembras de *D. maxima* en la fase vitelogénica (Fig. 17 A). En una primera instancia se analizó el efecto del tratamiento con *RLp* doble cadena (*RLpdc*) en la supervivencia e ingesta de sangre, sin observarse diferencias significativas entre los insectos tratados con *RLpdc* y tratados con el ARNdc del Gen de Resistencia a Ampicilina (*ARGdc*, control) (resultados no mostrados).

La eficiencia del silenciamiento evaluada mediante qPCR mostró que los niveles del transcripto *RLp* en ovario disminuyeron aproximadamente un 79% en las hembras tratadas con *RLpdc* vs. controles (Fig. 17 B). En tanto, los resultados mostrados en las Fig. 17 E-H revelaron que el silenciamiento del gen *RLp* no afectó la transferencia de lípidos a los ovocitos en desarrollo, ya que no se observaron diferencias significativas en la intensidad de la señal fluorescente para Bodipy-FA en las gotas de lípidos de las hembras inyectadas con *RLpdc* y *ARGdc*. Más aún, la cuantificación de la fluorescencia mostrada en la Fig. 17 D no mostró diferencias significativas en la transferencia de lípidos mediada por *Lp*. No obstante, la señal correspondiente a Bodipy-FA en los gránulos de vitelo fue menos evidente en los insectos tratados con *RLpdc* en comparación con los controles (Fig. 17 G y H). Estos resultados fueron en gran medida predecibles ya que el silenciamiento de *RLp* afectó la

endocitosis de Lp mediada por RLp,(Fig. 17 I – L). En este punto, es importante destacar que el desarrollo de los folículos terminales, evaluados mediante su tamaño, fue comparable en los insectos tratados con RLpdc y los controles (Fig. 17 C). De acuerdo con estos resultados, la endocitosis de Lp por los ovocitos analizada mediante la inyección de Lp-Dil, un fluoróforo no intercambiable, disminuyó notablemente en las hembras silenciadas (Fig. 17 I-L).

El conjunto de experimentos permitió evidenciar que el silenciamiento del gen *RLp* mediante ensayos de ARNi en hembras de *D. maxima* alimentadas interfirió con la endocitosis de Lp en los ovocitos pero no con el reclutamiento de lípidos mediante mecanismos no endocíticos, demostrando que la adquisición de estas reservas se realiza privilegiando la transferencia de lípidos por sobre la vía Lp/RLp.

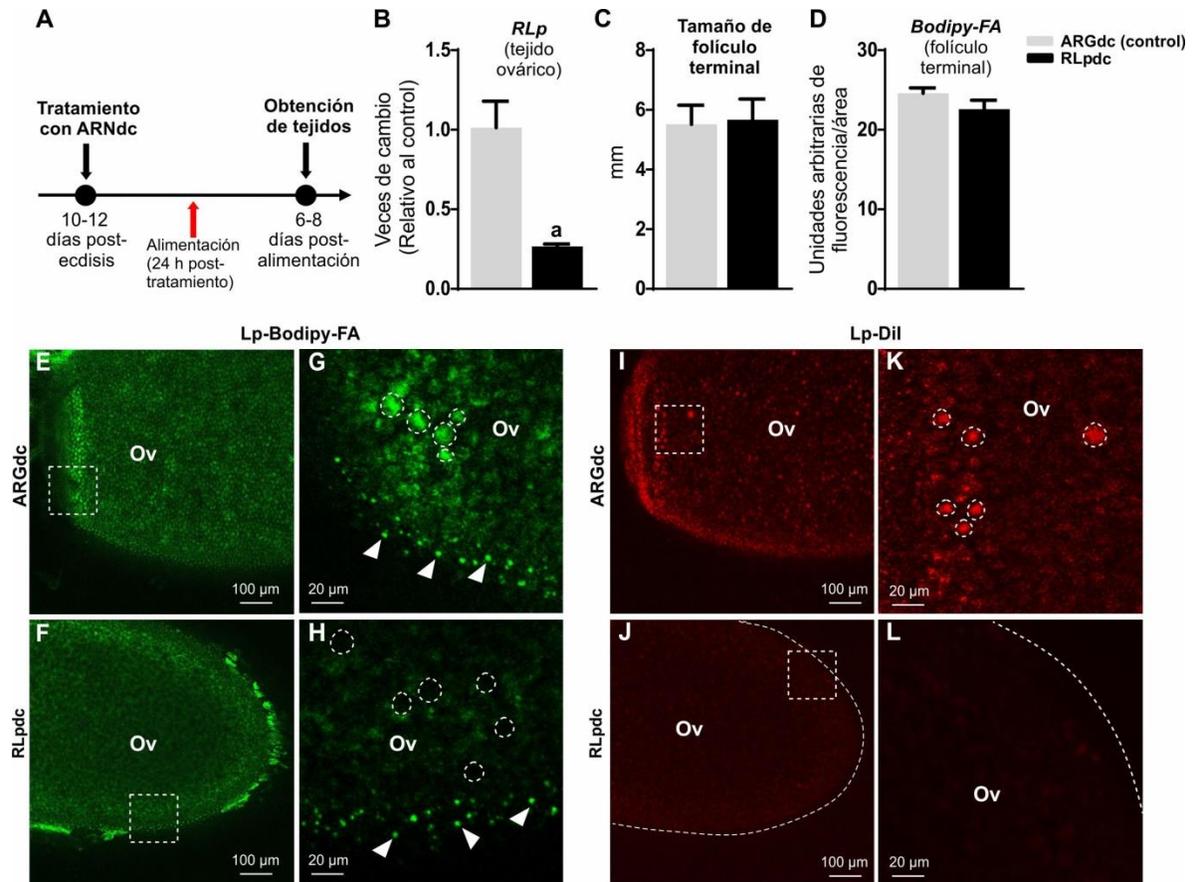


Fig. 17. Efecto del silenciamiento de RLP en la transferencia de lípidos a los ovocitos mediante estrategias de ARNi. (A) Esquema experimental. A las 24 h post-inyección con RLPdc o con ARGdc (controles) las hembras fueron alimentadas y al día 6-8 post-alimentación, fueron diseccionadas para evaluar la transcripción del gen *RLp* en tejido ovárico mediante qPCR. Otro grupo de hembras tratadas con RLPdc o ARGdc y alimentadas con sangre en condiciones similares a las descritas anteriormente fueron co-inyectadas con Lp-Bodipy-FA y Lp-Dil. A las 3 h post-inyección con los trazadores fluorescente los ovarios fueron diseccionados y procesados para microscopía de fluorescencia. (B) qPCR mostrando la eficiencia del tratamiento con RLPdc para el silenciamiento del gen *RLp* en ovario. (C) Tamaño de los folículos terminales de insectos tratados con RLPdc o ARGdc. Los resultados son mostrados como la media \pm EEM de 3-4 experimentos independientes. ^a $P < 0,05$ vs. ARGdc (control). Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. (D) Cuantificación de la fluorescencia para Bodipy-FA en folículos terminales. (E) Tejido ovárico mostrando folículos terminales de hembras tratadas con ARGdc. (F) Tejido ovárico mostrando folículos terminales de insectos tratados con RLPdc. (G) Magnificación correspondiente al inserto indicado en (E), mostrando señal de fluorescencia positiva en los gránulos de vileo (indicadas con líneas discontinuas) y en las gotas de lípidos (flechas). (H) Magnificación correspondiente al inserto indicado en (F),

mostrando señal de fluorescencia positiva en las gotas de lípidos (flechas). La ausencia de señal en los gránulos de vitelo se destaca con líneas discontinuas. Ov, ovocito. **(I)** Imagen correspondiente a (E) mostrando la señal de fluorescencia para Lp-Dil en los gránulos de vitelo. **(J)** Imagen correspondiente a (F). **(K)** Magnificación de la imagen correspondiente al inserto en (I), mostrando señal positiva de fluorescencia en los gránulos de vitelo (destacado con líneas discontinuas). **(L)** Magnificación de la imagen correspondiente al inserto en (J). Las líneas discontinuas delimitan el ovocito. Ov, ovocito. Resultados similares fueron obtenidos en 3 experimentos independientes.

4.5. Participación de Met en la fisiología del tejido ovárico.

4.5.1. Expresión de Met en cuerpo graso y tejido ovárico durante el ciclo reproductivo.

Para evaluar la participación de Met en la fisiología del tejido ovárico se analizaron los cambios del transcripto *Met* en el cuerpo graso y tejido ovárico en días representativos del ciclo reproductivo de *D. maxima* (Fig. 18 A). Los resultados mostraron que en ambos tejidos, los niveles de ARNm para *Met* aumentaron con el inicio de la vitelogénesis siendo máximos al día 4 post-alimentación (Fig. 18 B y C). Posteriormente se registró la disminución significativa del transcripto *Met* en días avanzados de la fase vitelogénica (día 12 post-alimentación) y en la post-vitelogénesis, comparables a los niveles registrados en la pre-vitelogénesis (Fig. 18 B y C).

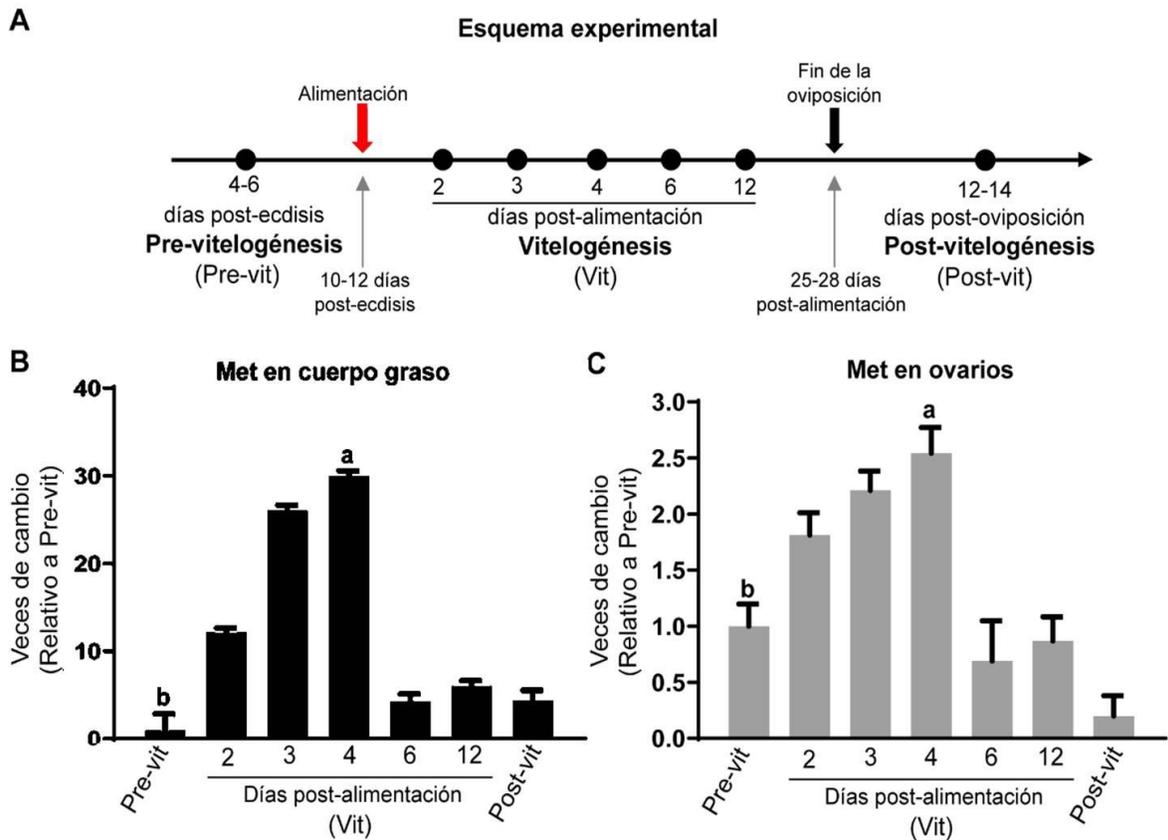


Fig. 18: Expresión temporal del gen *Met* en cuerpo grasso y tejido ovárico. (A) Cronograma del Esquema Experimental. **(B)** ARNm de *Met* en cuerpo grasso: ^a $P < 0,001$ vs. 2, 6 y 12 días Vit y Post-vit; ^b $P < 0,001$ vs. 3 y 4 días Vit. **(C)** ARNm de *Met* tejido ovarico: ^a $P < 0,001$ vs. 6 y 12 días Vit y Post-vit; ^b $P < 0,001$ vs. 3 y 4 días post-alimentación. Post-vitelogénesis (Post-vit), de 12 a 14 días después del final de la oviposición. Los resultados son mostrados como la media \pm EEM de al menos 3 experimentos independientes. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

4.5.2 Secuencia de *Met* y análisis bioinformático.

Mediante el diseño de primers específicos (Tabla S1) y utilizando la técnica de RACE (por sus siglas en inglés: Rapid Amplification CDNA Ends) se secuenció completamente el gen que codifica para *Met* en *D. maxima*, denominado *DmaxMet*. Esta secuencia de nucleótidos fue depositada en la base de datos del NCBI (ID MT361686). *DmaxMet* se encuentra

conformado por 2142 nucleótidos que codifican para una proteína de 713 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 81167 Da y punto isoelectrico teórico de 6,68 (Fig. 19).

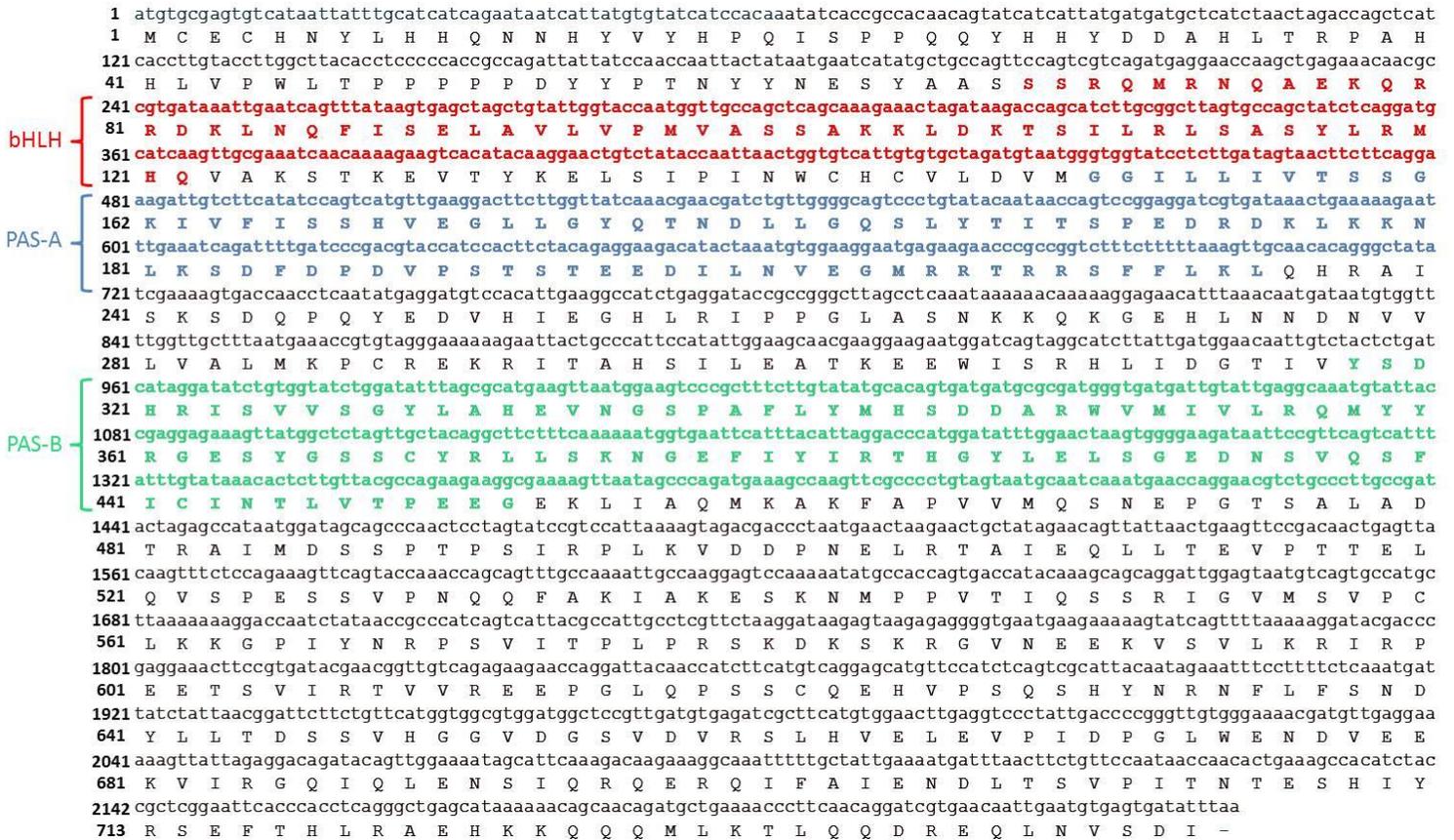


Fig. 19: Secuencia del gen *DmaxMet*: El alineamiento de pares de bases y los respectivos aminoácidos muestran los principales dominios deducidos del análisis bioinformático mediante el algoritmo en línea BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). bHLH: Basic Helix loop hélix o dominio de unión al ADN. PAS-A y PAS-B: Dominios de unión al ligando.

Utilizando los transcritos de *Met* reportados por Villalobos-Sambucaro en 2015 ⁽⁵²⁾ para *R. prolixus*, *Rp-Met1* y *Rp-Met2*, y el algoritmo en línea BLAST se pudo predecir que *DmaxMet* está conformado por 15 exones, de los cuales 13 mostraron homología con los ortólogos *Rp-Met1* y *Rp-Met2* debido al alto porcentaje de identidad de secuencia. En tanto, los exones 1 y 3 fueron los únicos que no presentaron homología con ambos ortólogos de *R. prolixus* (Fig. 20).

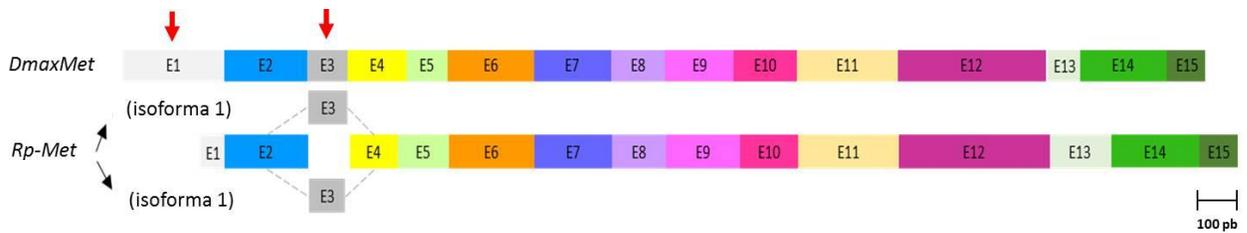


Fig. 20: Predicción de los exones que conforman *DmaxMet*. Alineamiento empleando *Rp-Met1* y *Rp-Met2* de *R. prolixus* reportado por Villalobos-Sambucaro y col., 2015. Las flechas rojas marcan los exones 1 y 3 los cuales no guardan homología con las isoformas de *R. prolixus*. El exón 3 es el que determina las dos isoformas en esta especie.

Los resultados mostraron que la proteína deducida a partir de *DmaxMet* presenta los dominios principales reportados para Met (Fig. 21): el dominio de unión al DNA o “basic Helix-Loop-Helix (bHLH)”, los dominios de unión a HJ, PAS A y PAS B por sus siglas en inglés “Pert-Arnt-Sim”, y “PAS C-terminal motif PAC”, todos ellos altamente conservados con los de su ortólogo en *R. prolixus* ⁽⁵²⁾.

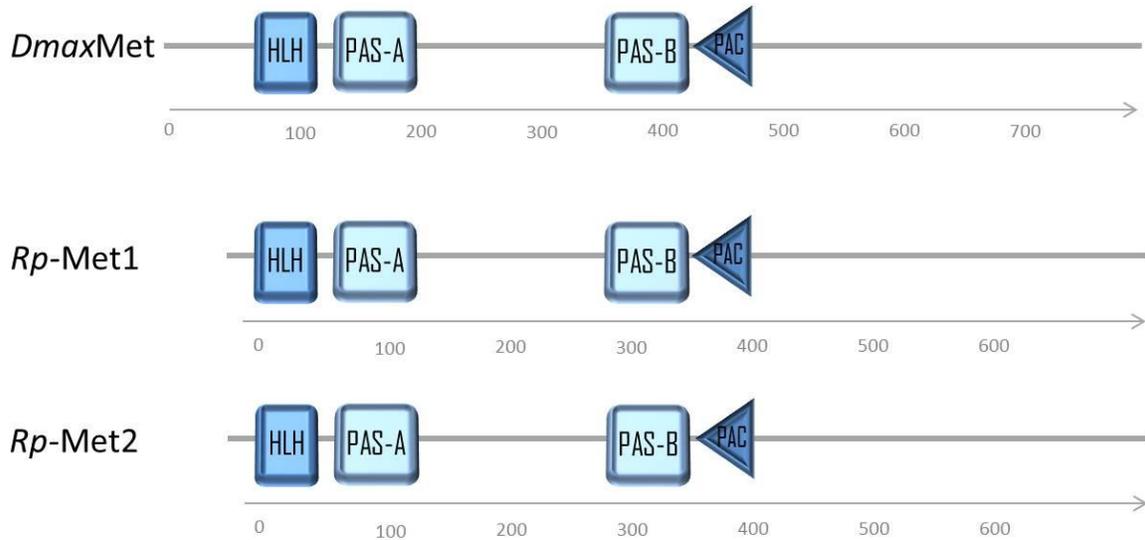


Fig. 21. Dominios de *DmaxMet*. Análisis de los dominios y conservación con las isoformas *Rp-Met1* y *Rp-Met2* reportado por Villalobos-Sambucaro y col., 2015 para *R. prolixus*. Se muestran los dominios principales: dominio de unión al ADN: Helix loop hélix (HLH); Dominios PAS-A y PAS-B.

La Fig. 22 muestra que las secuencias de nucleótidos de Met disponibles para los artrópodos seleccionados, en general no se agruparon siguiendo su historia evolutiva. Si bien las secuencias de *Met* de los triatomíneos *D. maxima* y *R. prolixus* se ubicaron en el mismo “cluster”, otros hemípteros como *Nilaparvata lugens* y *Planococcus kraunhiae* no formaron parte del mismo grupo. Por otro lado, las secuencias de Met de los insectos holometábolos utilizados para inferir sobre la historia evolutiva se agruparon formando un “cluster” para Coleoptera, otro para Lepidoptera y finalmente otro para Diptera. Como era esperable, las especies de crustáceos *Daphnia pulex* y *Daphnia magna* junto a *Portunus trituberculatus*, se ubicaron más alejadas evolutivamente que el resto de las especies de insectos.

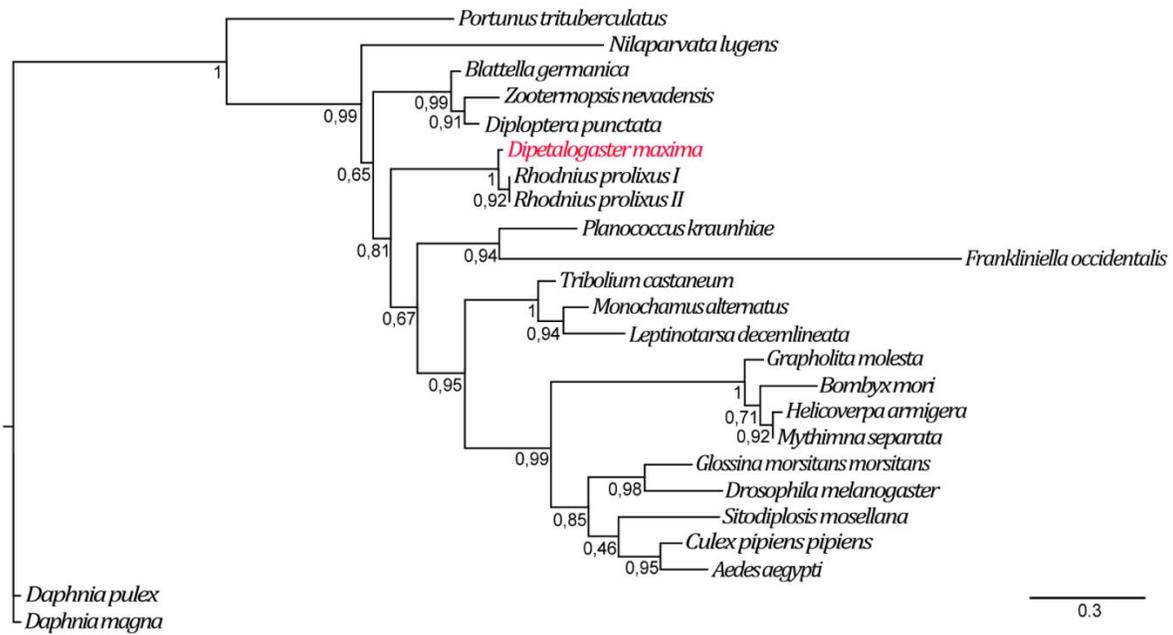


Fig. 22 Análisis filogenético molecular de Met a partir de secuencias seleccionadas. Las secuencias empleadas para el árbol se depositaron en GenBank con las identificaciones: ALT10381 (*Portunus trituberculatus*), ALT45968 (*Nilaparvata lugens*), CDO33887 (*Blattella germanica*), BAR92640 (*Zootermopsis nevadensis*), AIM47235 (*Diploptera punctata*), MT361686 (*Dipetalogaster maxima*) ACPB02032103 (*Rhodnius prolixus I*), ACPB02020961 (*Rhodnius prolixus II*), BAU79435 (*Planococcus kraunhiae*), KAE8748585 (*Frankliniella occidentalis*), NP_001092812 (*Tribolium castaneum*), ANW09588 (*Monochamus alternatus*), AKG92748 (*Leptinotarsa decemlineata*), QDB64433 (*Grapholita molesta*), ACJ04052 (*Bombyx mori*), AJW29006 (*Helicoverpa armigera*), AZL94115 (*Mythimna separata*), AFQ01087 (*Glossina morsitans*), NP_001285132 (*Drosophila melanogaster*), AUO38590 (*Sitodiplosis mosellana*), AAY25027 (*Culex pipiens*), AAX55681 (*Aedes aegypti*), BAM83855 (*Daphnia magna*), BAM83853 (*Daphnia pulex*).

Mediante el programa I-TASSER ⁽¹⁰⁶⁾ se realizó el modelado molecular de Met. Teniendo en cuenta la característica intrínsecamente desordenada de los N- y C- terminales de la proteína, para el modelado se empleó sólo la región estructurada que contiene los dos dominios PAS ya que no hay molde cristalizado para la porción C-terminal de Met. Este modelado sugirió ausencia de estructura terciaria. El modelado alcanzó una puntuación de TM $0,72 \pm 0,11$ (una

puntuación TM > 0,5 indica un modelado de correcta topología) ⁽¹⁰⁶⁾. El mapeo de cargas electrostáticas reveló dos parches con concentraciones de cargas opuestas; mientras que el análisis de hidrofobicidad no reveló ninguna distribución distintiva (Fig. 23).

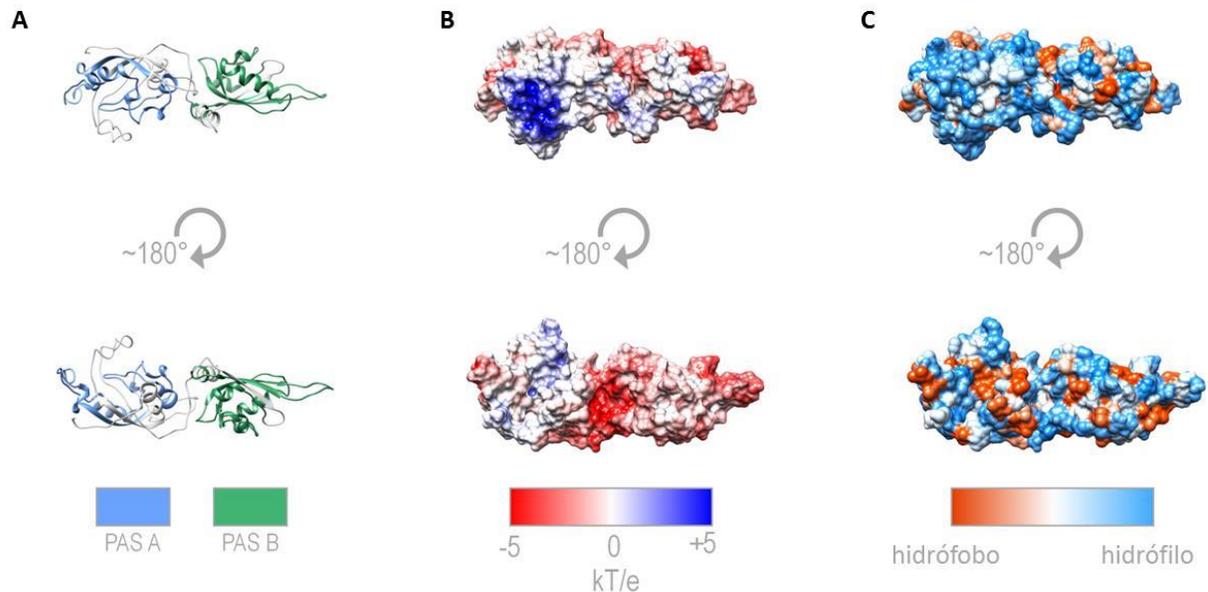


Fig. 23 Modelado molecular y características estructurales de Met. Considerando la característica intrínsecamente desordenada de los N- y C-terminales de la proteína, sólo se modeló la región estructurada, que contiene dos dominios PAS (A). El análisis de la superficie del potencial electrostático reveló dos parches con concentraciones de carga opuestas (B), mientras que la inspección de la hidrofobicidad no reveló ninguna distribución especialmente distintiva (C).

La estructura tridimensional obtenida del modelado proteico fue empleada para los ensayos de interacción *in silico* (“docking”) entre *DmaxMet* y dos formas moleculares de HJ, HJ III y HJSB₃, (Fig. 24) mostrando ambas una alta afinidad por el dominio PAS B (Fig. 24 B). Del análisis también se infirió que existe una mayor afinidad de *DmaxMet* por HJSB₃, la forma molecular de HJ presente en la hemolinfa de *D. maxima* ⁽⁴⁵⁾. Por otro lado, es de

destacar que la afinidad de *DmaxMet* por HJ III evidenciada *in silico* apoya su empleo en los experimentos de topicación en la pre-vitelogénesis (Fig. 12 y 13).

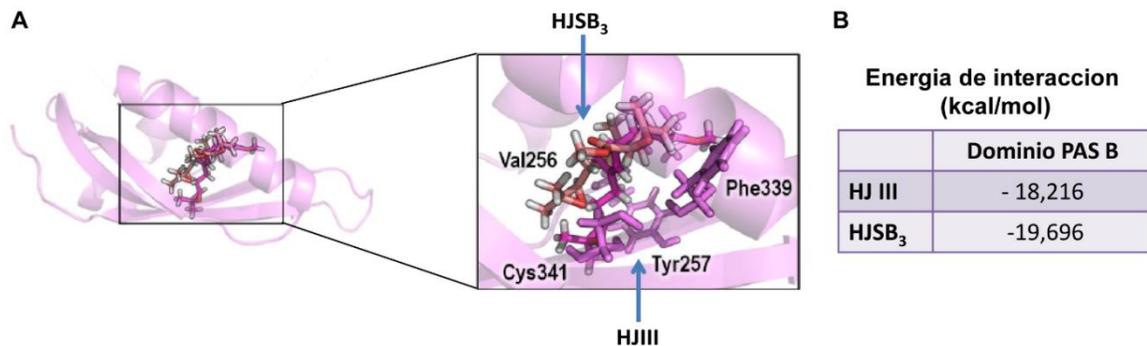


Fig. 24: Ensayo de interacción *in silico* (“docking”) entre PAS-B de *DmaxMet* y dos formas moleculares de Hormona juvenil (HJ III y HJSB₃). Utilizando la región que contiene el dominio PAS-B se predijo un modelado de “*novo*”, con el cual se realizó la interacción *in silico*. **(A)** muestra la posible región donde se unirían las distintas formas moleculares de HJ analizadas, indicadas también en una ampliación donde se observan los aminoácidos del dominio PAS-B implicados en la unión a HJ. **(B)** Energías de interacción entre el dominio PAS-B y las formas moleculares HJ III y HJSB₃.

4.6. Efecto del silenciamiento del gen *Met*.

Cuando se analizó el impacto del silenciamiento del gen *Met* mediante ensayos de ARNi en hembras vitelogénicas de *D. maxima* se observó que la supervivencia y la cantidad de sangre ingerida por las hembras no mostró diferencias significativas entre los insectos tratados con Metdc y los controles (insectos inyectados ARGdc, resultados no mostrados). La eficiencia del silenciamiento evaluada por qPCR mostró que los niveles del transcripto *Met* disminuyeron un 78% en tejido ovárico y un 84% en cuerpo graso al día 2 post-tratamiento con Metdc respecto a las hembras controles (ARGdc) (Fig. 25 B y C, respectivamente).

El silenciamiento de *Met* indujo una disminución significativa en los niveles de los transcriptos *Vg2* y *Lp* en cuerpo graso (Fig. 25 D y F), como así también en los transcriptos de los receptores *RVg* y *RLp* en tejido ovárico (Fig. 25 E y G). También se observó que las hembras con el gen *Met* silenciado presentaron un menor desarrollo del tejido ovárico (Fig. 25 H), probablemente por una menor síntesis y captación de *Vg* y *Lp* por los ovocitos. A diferencia del tratamiento con Precocene II, en el cual la disminución de los niveles de HJSB₃ no inducía cambios a nivel transcripcional de *RVg* y *RLp* en ovario, el silenciamiento del gen *Met* indujo una “down” regulación de estos receptores, sugiriendo que *Met* desempeña un rol fundamental en la regulación del desarrollo del tejido ovárico mediada por HJ.

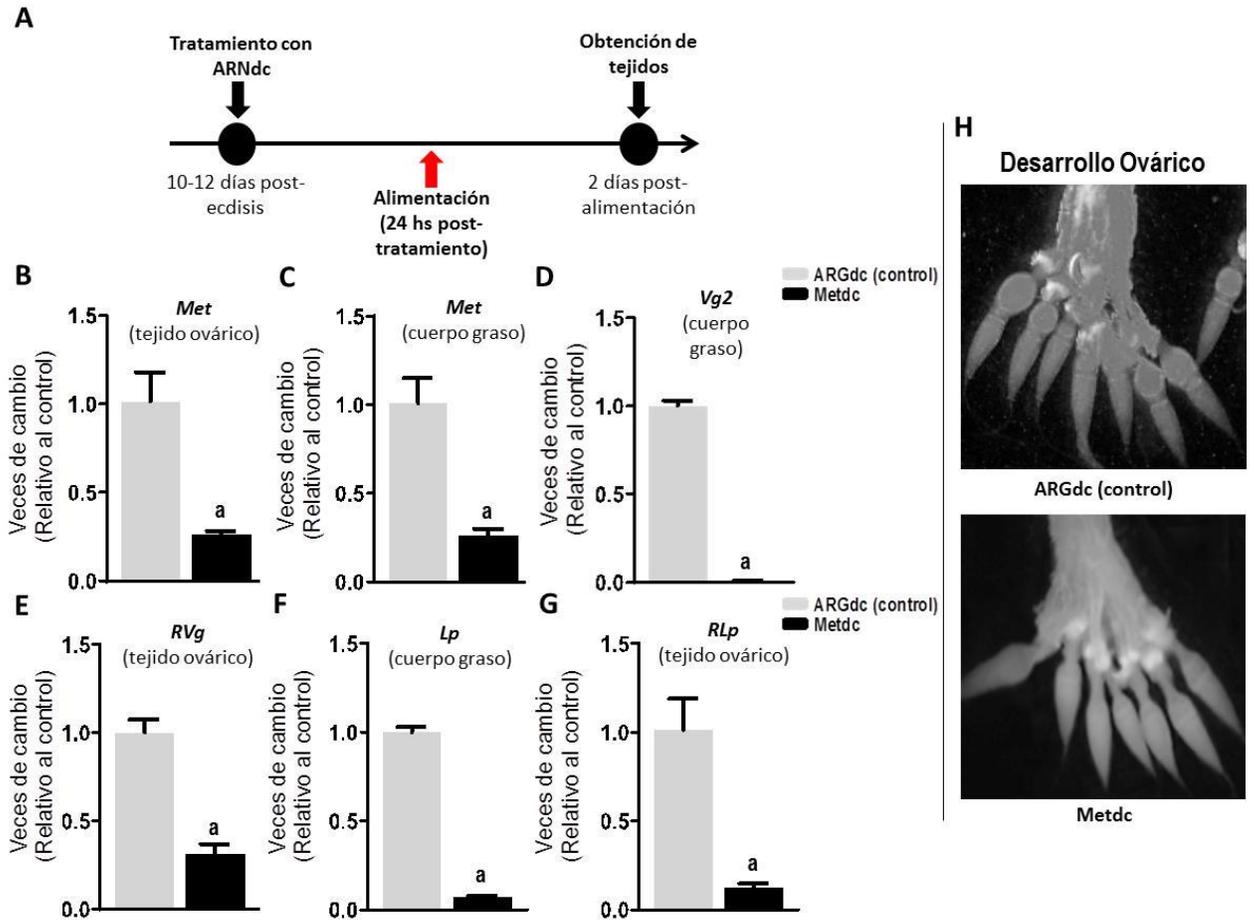


Fig. 25: Efecto del silenciamiento del gen *Met*. (A) Esquema experimental. A las 24 h post-inyección con Metdc o ARGdc (control) las hembras fueron alimentadas y al día 2 post-alimentación, fueron diseccionadas para evaluar la eficiencia del silenciamiento de *Met* mediante qPCR y expresados como las veces de cambio respecto al control (~ 1). (B) ARNm de *Met* en tejido ovárico: ^a $P < 0,05$ vs. ARGdc. (C) ARNm de *Met* en cuerpo graso: ^a $P < 0,05$ vs. ARGdc. (D) ARNm de *Vg2* en cuerpo graso: ^a $P < 0,0001$ vs. ARGdc. (E) ARNm de *RVg* en tejido ovárico: ^a $P < 0,05$ vs. ARGdc. (F) ARNm de *Lp* en cuerpo graso: ^a $P < 0,005$ vs. ARGdc. (G) ARNm de *RLP* en tejido ovárico: ^a $P < 0,05$ vs. ARGdc. Los resultados son mostrados como media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Los cambios del transcritpo *Met* evaluados durante el ciclo reproductivo de *D. maxima* en el cuerpo graso y tejido ovárico permitieron analizar la participación de *Met* en el desarrollo del tejido ovárico. El secuenciamiento del gen *DmaxMet* posibilitó la caracterización genómica

mediante análisis bio-informáticos, inferir sobre su historia evolutiva y evaluar *in silico* la interacción entre Met y las variantes moleculares HJ III y HJSB₃, siendo esta última la forma molecular de HJ presente en la hemolinfa de *D. maxima*. Desde el punto de vista fisiológico y funcional, el silenciamiento de *Met* permitió inferir que en *D. maxima*, la principal PPV es inducida según la vía clásica HJ-Met. El silenciamiento de *Met* también indujo una “down” regulación de *RVg* y *RLp* y un menor desarrollo del tejido ovárico, sugiriendo que Met sería un actor crítico para modular, vía HJ, el desarrollo de este tejido.

Capítulo 5: DISCUSIÓN

En las hembras de la mayoría de los insectos hematófagos, la comida de sangre desencadena una compleja sincronización entre hormonas y vías de señalización nutricional, induciendo cambios fisiológicos que promueven la ovogénesis ⁽³⁴⁾. El cuerpo graso sufre una marcada remodelación tisular,^(25, 83) aumentando la síntesis y secreción de PPV, las que serán captadas por los ovocitos en desarrollo. Este proceso se encuentra finamente regulado temporal y espacialmente por factores endócrinos ⁽¹¹⁸⁾. En hemípteros, incluidos los vectores de la enfermedad de Chagas, la reproducción de la hembra está regulada por HJ ⁽¹¹⁹⁾, como se demostró hace casi un siglo para *R. prolixus* ⁽⁶³⁾. Desde esos hallazgos, los efectos pleiotrópicos de HJ sobre los cambios en el cuerpo graso y la expresión de los genes *Vg* han sido ampliamente reportados ^(31, 34).

Los lípidos tienen un rol fundamental en la reproducción de los insectos ya que son el principal sustento energético para el desarrollo embrionario ^(76, 120). En los insectos, el metabolismo de los lípidos también se encuentra bajo regulación hormonal. La interacción entre los ILP y la hormona adipocinética (AKH) estimula la activación de factores de transcripción los que a su vez promueven la lipogénesis o la lipólisis, respectivamente ^(121, 122). En este contexto, nuestro grupo caracterizó las reservas nutricionales en el tejido ovárico de *D. maxima*, reportando aspectos singulares del metabolismo de los lípidos y las lipoproteínas durante el ciclo reproductivo de esta especie ^(17, 19, 123, 124).

En este trabajo de Tesis se observó durante el ciclo reproductivo de *D. maxima* una correlación entre los cambios en los niveles de ARNm de las PPV en el cuerpo graso, su

concentración en la hemolinfa y los cambios en los niveles de los transcriptos *RVg* y *RLp* en el tejido ovárico. La comida de sangre desencadenó la vitelogénesis, con un aumento de los niveles de transcripción de *Lp* y *Vg* en el cuerpo graso, y de *RLp* y *RVg* en el ovario. Curiosamente, el ARNm de *Lp* en cuerpo graso disminuyó al día 12 post-alimentación hacia valores comparables con la pre-vitelogénesis, a diferencia de lo ocurrido con el ARNm *Vg*, cuyos niveles al día 12 post-alimentación fueron significativamente menores a lo registrado al inicio de la vitelogénesis pero elevados respecto a la pre-vitelogénesis. En concordancia con lo reportado por Downer y Chino en langostas, es posible que este comportamiento se deba a que no es necesario sostener niveles elevados de síntesis de *Lp*, ya que esta lipoproteína posee un tiempo de vida media prolongado ⁽⁷⁸⁾. Además, hay diferencias funcionales entre *Lp* y *Vg* que podrían contribuir a las diferencias en su regulación durante el ciclo reproductivo. En este sentido, *Lp* funciona como un transportador reusable de lípidos a los tejidos blanco durante todo el ciclo de vida ^(77, 80). Por el contrario, la expresión de *Vg* aumenta unas 1000 veces después de la alimentación y su captación es altamente específica del tejido ovárico ⁽⁸⁵⁾. Un aumento significativo en la expresión de *Vg* en cuerpo graso y su captación por los ovocitos durante la vitelogénesis es crítica para la homeostasis nutricional y la capacidad reproductiva ⁽⁸⁵⁾.

Los resultados de este trabajo de tesis demostraron que en la hemolinfa de *D. maxima*, los niveles de *Lp* y *Vg* se mantuvieron elevados en la post-vitelogénesis. Es importante destacar que en esta fase reproductiva, el tejido ovárico de *D. maxima* experimenta profundos cambios bioquímicos, histo-morfológicos y ultraestructurales que promueven la atresia de los folículos ⁽¹⁷⁾. En este período, también denominado “fase de atresia folicular temprana”, algunos

ovocitos son resorbidos en lugar de continuar su desarrollo. Una de las principales causas que promueven la instauración de la atresia folicular es la escasa o nula disponibilidad de nutrientes y consecuentemente, el cese de la vitelogénesis. Así, los nutrientes almacenados en los folículos terminales pueden ser degradados y movilizados hacia la circulación para su reclutamiento y utilización por otros tejidos, contribuyendo a la homeostasis energética (17, 19). En la hemolinfa del hemíptero *Plautia stali* por ejemplo, han sido identificados aminoácidos y péptidos resultantes de la proteólisis de vitelina (125). En *D. maxima*, durante la post-vitelogénesis se activan peptidasas del tipo catepsina D, responsables de la proteólisis temprana de vitelina (20). Por lo tanto, el “reciclado” de las proteínas precursoras del vitelo en esta fase reproductiva de *D. maxima* podrían explicar los niveles relativamente elevados en la hemolinfa de Vg y Lp.

Con respecto a la endocitosis de Lp en triatominos, diferentes estudios han arrojado resultados controversiales. Mientras que los trabajos en *R. prolixus* proponen que Lp no es endocitada (126-129), nuestro grupo demostró que en *P. megistus* y *D. maxima*, la vía endocítica Lp/RLp converge con el proceso de transferencia de lípidos a nivel de membrana a los fines de maximizar el almacenamiento de reservas lipídicas en los ovocitos en desarrollo (19, 101). Durante el progreso de este trabajo de tesis se observó que los niveles de ARNm de *RLp* aumentan en los primeros días de la fase vitelogénica. En concordancia con este hallazgo, en otras especies de insectos también se ha informado un aumento en la transcripción del gen *RLp* durante la vitelogénesis (130-133).

En cuanto a *RVg*, el máximo aumento de los transcriptos se registró al día 6 post-alimentación, en coincidencia con los resultados de nuestro grupo que reportaron, para días

comparables de la vitelogénesis, una activa captación de Vg por los ovocitos ⁽¹⁷⁾. Aunque el ciclo reproductivo de las hembras no autógenas de *D. maxima* presenta cierta variabilidad biológica, en términos generales la primera oviposición ocurre entre los días 8 a 12 post-alimentación. Por lo tanto, es probable que no se requiera de la expresión sostenida del gen *RVg* durante toda la vitelogénesis, debido al reciclado intracelular de *RVg*, tal como fuera informado en otras especies de insectos ⁽¹³⁴⁾. Esto también podría explicar lo observado en días avanzados de la fase vitelogénica (día 12 post-alimentación, Fig. 10 F), registrándose una disminución en los niveles de ARNm de *RVg*.

Diferentes formas moleculares de HJ han sido caracterizadas en varias especies de insectos, siendo HJ III la forma más frecuente ⁽³¹⁾. En los triatominos *D. maxima* y *R. prolixus*, la variante molecular de HJ circulante corresponde a HJSB₃ ^(99, 100). En la hemolinfa de *D. máxima*, HJSB₃ mostró los niveles más altos al inicio de la vitelogénesis (día 4 post-alimentación). En hembras vitelogénicas estos niveles (~ 0,7 nM) fueron muy bajos en comparación con lo informado en otros insectos hemimetábolos ^(26, 27, 135). Sin embargo, la concentración de HJSB₃ en *D. maxima* fue comparable a lo reportado por Villalobos-Sambucaro y colaboradores en ninfas de 4º estadio de *R. prolixus* en condiciones de post-alimentación (~0,9 nM) ⁽¹⁰⁰⁾. La afinidad de unión de HJ III en el rango de nM fue descrita para el gen Met de *D. melanogaster* y *T. castaneum* (Kd ~ 5,3 y 2,94 nM, respectivamente) ⁽⁵⁸⁾. En conjunto, los tenores de HJSB₃ así como la expresión de las PPV y sus receptores alcanzaron el máximo durante la vitelogénesis en *D. maxima*, apoyando la hipótesis en la cual HJ desempeña un papel fundamental en la regulación de los niveles de *Lp/RLp* y *Vg/RVg*.

Para profundizar en el abordaje del rol de HJ en la expresión de las PPV y sus receptores, y su impacto en el reclutamiento de lípidos en los ovocitos, se diseñaron estrategias experimentales tendientes a modificar los niveles de HJ en distintos momentos del ciclo reproductivo. En las hembras pre-vitelogénicas HJ indujo un aumento de los transcriptos *Vg* y *Lp* en cuerpo graso y de sus receptores endocíticos *RLp* y *RVg* en tejido ovárico, al tiempo que promovió un incremento en el contenido de *Lp* y *Vg* en el cuerpo graso, concomitantes con la mayor concentración de estas lipoproteínas en la hemolinfa. Actualmente los estudios en especies modelos de insectos indican que el receptor de HJ se encuentra altamente conservado ^(31, 58), habiéndose demostrado además, que diferentes HJ nativas o análogos de HJ tienen la capacidad para unirse al receptor HJ de *Drosophila* y activar la señalización de HJ ⁽¹³⁶⁾. Los resultados del docking *in silico* de dos formas moleculares de HJ (HJ III y HJSB₃) mostraron una alta afinidad por *DmaxMet*, avalando el uso de HJ III en los estudios funcionales. Por lo tanto, no fue sorprendente que el tratamiento con HJ III fuera eficaz en *D. maxima*, aun no siendo la forma molecular de HJ circulante en esta especie.

En la mayoría de las especies de insectos, incluidos los triatominos, ha sido reportado que HJ desempeña un rol fundamental en la regulación de la expresión de *Vg* ^(23, 137-140). Existen además, evidencias parciales que sugieren que HJ participa en la regulación transcripcional de *RVg* en la hormiga roja *Solenopsis invicta* ⁽¹³⁷⁾ y de *RVg* y *RLp* en el mosquito *A. aegypti* ⁽¹³³⁾. Por otra parte, en lo concerniente a *RLp*, ha sido reportado un posible control post-transcripcional en el ciclo reproductivo de la cucaracha *B. germanica* ⁽¹³¹⁾.

En insectos tratados con HJ se observó mayor contenido de *Lp* en el cuerpo graso y niveles más elevados en hemolinfa (Fig. 12 E - H). En las cucarachas *Leucophaea maderae* y

Periplaneta americana fue demostrado que Lp funciona como una proteína de unión a la HJ, y que la administración de un análogo de la HJ indujo un aumento en los niveles de Lp circulante ⁽⁴⁴⁾. Durante el ciclo reproductivo de *B. germanica* los niveles de Lp no mostraron una clara correlación con los cambios de HJ ⁽¹⁴¹⁾. Sin embargo, en esta especie, los insectos tratados con HJ mostraron en términos de proteínas, un mayor contenido de RLp y Lp en cuerpo graso y de Lp en ovarios, sugiriendo un efecto post-transcripcional de HJ sobre Lp/RLp ⁽¹³¹⁾.

Debido a que HJ aumenta significativamente en la hemolinfa de *D. maxima* luego de la ingesta de sangre, se diseñaron experimentos para disminuir la vía de señalización de la hormona mediante la aplicación de Precocene II, un compuesto con demostrado efecto “anti-HJ”. En concordancia con lo reportado por García y col. y por Ronderos ^(142, 143), Precocene II afectó la actividad de la CA induciendo una disminución en los niveles de HJSB₃ (Fig. 14 B) y comprometió la expresión de Vg en el cuerpo graso (a nivel de ARNm y proteína), observándose también una menor concentración de Vg en la hemolinfa (Fig. 12). No obstante, los niveles de Vg en los insectos tratados con acetona (controles) fueron más bajos que los encontrados en hembras vitelogénicas. Esto podría deberse a efectos secundarios del tratamiento, ya que antes de la alimentación con sangre, los insectos fueron manipulados para la administración de acetona o Precocene II. Estas manipulaciones resultaron en una menor ingesta de sangre en los insectos tratados con acetona y Precocene II en comparación con las hembras no perturbadas. Aunque esa diferencia en el tamaño de la comida no fue estadísticamente significativa (resultados no mostrados), esta se reflejaría en los niveles de Vg en la hemolinfa. Sorprendentemente, ni el contenido de Lp en cuerpo graso ni los niveles

de ARNm para los genes *RLp* y *RVg* en tejido ovárico se vieron afectados por el tratamiento con Precocene II. Además, la capacidad de transferencia de lípidos desde la Lp a los ovocitos no se vio afectada con la disminución de HJSB₃. Probablemente, los tenores de HJSB₃ en la hemolinfa de *D. maxima*, después del tratamiento con Precocene II, fueron suficientes para sostener los niveles de Lp/RLp, pero no para promover un aumento de Vg. Apoyando esta hipótesis, lo descrito en *B. germanica* muestra que la activación de gen *Vg* en la vitelogénesis depende estrictamente de la capacidad de la CA para sintetizar niveles adecuados de HJ ⁽¹³⁵⁾.

Actualmente existen evidencias sobre vías de señalización adicionales que, junto con HJ, promueven la captación de lípidos, compensando la reducción en los niveles de HJ inducida por Precocene II. También ha sido propuesto que existe una correlación entre HJ y los ILPs. Los ILPs del cerebro modulan la señalización de HJ, regulando la lipólisis y la lipogénesis durante el ciclo reproductivo de la mosca tsetse ⁽¹⁴⁴⁾. También se propuso que la modulación de los receptores de serotonina por parte de los ILP, es necesaria para el almacenamiento de lípidos y el desarrollo ovárico en *A. aegypti* ⁽¹⁴⁵⁾. Acompañando estas observaciones, Leyria y colaboradores recientemente reportaron la activación de la vía de señalización de los ILP después de una comida de sangre en las hembras de *R. prolixus* ⁽⁶⁰⁾. Sin lugar a dudas, para avanzar en estos interrogantes serán necesarios estudios que permitan evaluar el papel de los ILP y su interacción con la señalización de HJ en la regulación del metabolismo de los lípidos en triatomíneos.

Además de su función en el control de la vitelogénesis, en los folículos ováricos HJ actúa promoviendo el aumento del espacio entre las células del epitelio folicular, facilitando el

acceso de las macromoléculas como Vg desde la hemolinfa al ovocito en crecimiento, proceso conocido como patencia (48, 66, 146, 147). En los ovocitos de dos especies de cucarachas, la vitelogénesis induce cambios en la distribución subcelular de RLp y RVg, trasladando a la zona cortical para facilitar la interacción con los ligandos y la captación de lipoproteínas, sin modificar significativamente la expresión de los receptores (90). Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis mostraron una mayor endocitosis de Lp y Vg por los ovocitos en las hembras tratadas con HJ. Esto sugiere fuertemente que las células foliculares experimentan patencia, ya que resultados de trabajos anteriores del grupo demostraron que en las hembras pre-vitelogénicas, el acceso de las macromoléculas desde la hemolinfa al ovocito es muy limitado (17). Estos hallazgos también concuerdan con el trabajo pionero en *R. prolixus* demostrando que el notable aumento de los espacios interfoliculares durante la patencia está bajo el control de HJ (148). El aumento en la captación de Lp y Vg inducido por HJ también podría ser la expresión del aumento de RLp y RVg en la membrana plasmática del ovocito.

Además de la actividad endocítica de RLp, en *D. melanogaster* ha sido propuesto que RLp también puede mediar el reclutamiento de lípidos en los ovocitos por una ruta independiente de la endocitosis, implicando la asociación de RLp con proteínas transferidoras de lípidos o LTP (por sus siglas en inglés) a nivel de la membrana plasmática (149, 150). En *D. maxima*, el silenciamiento del gen *RLp* en hembras vitelogénicas disminuyó significativamente la captación de Lp, pero no la transferencia de lípidos a los ovocitos (Fig. 17 E - L), demostrando que la endocitosis de Lp contribuye minoritariamente en la conformación de estas reservas.

En síntesis, el conjunto de resultados presentados en este trabajo de Tesis en relación al Objetivo 1, sugieren fuertemente que HJ regula la transferencia y el almacenamiento de lípidos en los ovocitos de *D. maxima*, permitiendo profundizar en la caracterización del papel gonadotrófico de HJ en triatomíneos, descrito hace más de 80 años por Sir Vincent Brian Wigglesworth ⁽¹⁹⁾. Serán necesarios más estudios para comprender plenamente estos procesos a nivel molecular. Adicionalmente, los diseños experimentales implementados tales como el empleo de trazadores fluorescentes lipídicos en ensayos funcionales o de silenciamiento génico podrían aplicarse a futuro en estudios que aborden el control de insectos, ya que los lípidos son esenciales para el éxito de la reproducción y la embriogénesis.

En los insectos, el señalamiento de HJ está principalmente asociado a eventos involucrados con la represión de la metamorfosis y estimulación de la reproducción ⁽¹⁵¹⁾. En la actualidad, los avances en la caracterización de Met han permitido consolidarlo como el receptor de HJ ^(49, 53, 58). Met es un factor de transcripción que pertenece a la gran familia de receptores nucleares que exhiben una estructura de dominios relativamente bien conservada: bHLH, localizado en el N-terminal de la proteína, y los dominios PAS-A y PAS-B. En este sentido, usando HJ III sintética y un análogo de HJ, metopreno, se demostró que la hormona tiene alta afinidad por el dominio PAS-B ⁽⁵⁸⁾. En tanto, otros estudios reportaron que la unión HJ-Met dimeriza con un co-factor, Taiman (Tai), para formar un heterocomplejo que se unirá a los elementos respondedores en el ADN, para finalmente desencadenar una respuesta celular específica, por ejemplo, durante la vitelogénesis estimular la transcripción de *Vg* ⁽³⁴⁾. Si bien los estudios pioneros sobre los efectos de HJ fueron realizados empleando triatomíneos como

modelos ⁽⁶³⁾, no fue sino hasta el 2015 que Villalobos-Sambucaro y col. reportaron información sobre la caracterización genómica y funcional del receptor Met en el triatomo *R. prolixus* ⁽⁵²⁾

Hasta el desarrollo de esta Tesis, había escasos reportes que profundizaran en el rol de Met en la fisiología reproductiva de los triatomos. Así, durante el transcurso de este trabajo, se identificó el gen que codifica Met en *D. maxima*, denominado *DmaxMet*, para su caracterización genómica. Utilizando diferentes técnicas de biología molecular, el gen que codifica para *DmaxMet* fue completamente secuenciado, posibilitando evaluar la funcionalidad “*in silico*” de este receptor. Al compararlo con las secuencias reportadas por Villalobos-Sambucaro y colaboradores en 2015 para *R. prolixus*, encontramos que el transcripto de *DmaxMet* está conformado por 15 exones, 13 de ellos mostrando un alto porcentaje de identidad con *Rp-Met1* y *Rp-Met2*; en tanto, los exones 1 y 3 resultaron no homólogos debido a la escasa identidad de secuencia. Interesantemente, el tercer exón del gen *Met* en *R. prolixus* define las dos isoformas encontradas en esta especie. Se identificaron también los 3 dominios principales de Met en *D. maxima*, bHLH, PAS-A y PAS-B, y de la comparación con sus homólogos en *R. prolixus*, se observó una alta conservación en la secuencia, indicando, que *DmaxMet* no es una excepción en cuanto a la conservación de dominios para este tipo de proteínas. Para los estudios “*in silico*” en una primera instancia se trabajó en la obtención del modelo estructural de la proteína. En particular, el extremo C-terminal no pudo ser incluido ya que hasta la fecha no ha podido ser sido cristalizado, lo que no hace factible determinar su estructura molecular ⁽¹⁵²⁾. Sin embargo, los fragmentos C-terminales de esta familia de proteínas (bHLH/PAS) presentan una significativa variabilidad en sus estructuras primarias que son características de cada proteína y no formarían parte del desempeño funcional. Los

ensayos *in silico* de interacción revelaron que PAS-B posee alta afinidad por el ligando HJ (Fig. 24), similar a lo reportado en *T. castaneum* ⁽⁵⁸⁾. En este sentido, el dominio PAS-B de esta familia de proteínas fue designado como el responsable de la unión al ligando; en tanto, PAS-A fue definido como una región con desempeño clave durante el proceso de dimerización de la proteína, asegurando la especificidad y adecuada activación del señalamiento ⁽¹⁵³⁾. Los resultados del análisis para conocer los vínculos evolutivos de la proteína Met reflejaron la limitación que deviene del escaso número de secuencias de la proteína disponible. En este sentido, el análisis filogenético indicó que el receptor está evolutivamente relacionado con Met de *R. prolixus*, en acuerdo con lo reportado por Villalobos-Sambucaro y col. en 2015 ⁽⁵²⁾, aunque otros hemípteros no formaron parte del mismo grupo. En tanto, las secuencias de Met de los insectos holometábolos mostraron una distribución consistente con la taxonomía establecida para los órdenes Coleoptera, Lepidoptera y Diptera.

Hasta la actualidad, no existían estudios que analizaran el perfil de expresión de *Met* durante el ciclo reproductivo en triatóminos. En este sentido, en esta tesis se demostró una dependencia en la expresión del ARNm de *Met* por la comida de sangre, ya que tanto en el cuerpo graso como en el tejido ovárico los niveles del transcripto aumentaron significativamente dos días post-alimentación (Fig. 18 B y C, respectivamente). Como fue mencionado anteriormente, los niveles hemolinfáticos de HJSB₃ evaluados en *D. maxima* mostraron que la hormona aumenta luego de la alimentación (Fig. 11). Esto es coincidente en primer lugar, con el aumento del transcripto *Met*, principalmente en cuerpo graso (Fig. 18 B), órgano blanco de la acción de HJ para promover la síntesis de PPVs y en segundo lugar, con

el modelo de regulación de la vitelogénesis propuesto por Davey en 1987 ⁽⁶⁵⁾. Este modelo postula que la ingesta de una comida de sangre produce una distensión a nivel intestinal, lo cual estimularía en la CA la síntesis y liberación de HJ a la circulación ^(23, 65). Consistentemente, el silenciamiento del gen *Met* disminuyó los niveles de ARNm de *Vg2* (Fig. 25 D), resultado esperado para un gen de respuesta a HJ, sugiriendo fuertemente que en los triatomíneos, esta hormona actúa según la vía clásica HJ-Met ampliamente descrita en cuerpo graso para numerosas especies de insectos ⁽³⁴⁾. Por otro lado, es importante destacar que los nutrientes almacenados en los ovocitos son mayoritariamente provistos por el cuerpo graso vía hemolinfa. En este escenario, el desarrollo de la patencia en los folículos vitelogénicos tiene un papel clave promoviendo el aumento de los espacios inter-foliculares para facilitar el acceso de los nutrientes y su captación por los ovocitos favoreciendo la ovogénesis. Si bien en los triatomíneos este evento fue asociado al señalamiento de HJ ⁽¹⁴⁸⁾, los trabajos pioneros indicaron que no sería un receptor nuclear el que estaría mediando la patencia sino un receptor de membrana, de la familia de las Proteína kinasas C, promoviendo una cascada de señalización liderada principalmente por la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa ⁽⁶⁵⁾. Sin embargo, estudios actuales en el mosquito *A. aegypti* proponen que la unión de HJ a dicho receptor de membrana culminaría en la fosforilación y activación de Met y Tai ⁽⁶¹⁾.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren por primera vez que en el tejido ovárico de los triatomíneos, Met podría mediar el señalamiento de HJ probablemente por una vía diferente a la reportada en cuerpo graso. Estos hallazgos establecen un marco de conocimiento que permitirá abordar nuevos objetivos tendientes a profundizar sobre el rol de Met en el tejido ovárico y que exceden el desarrollo de esta tesis doctoral.

Capítulo 6: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados presentados en esta Tesis junto a hallazgos previos obtenidos en nuestro laboratorio, permiten postular un modelo para integrar la participación del factor nutricional y hormonal en la regulación de la ovogénesis en los vectores de la enfermedad de Chagas, así como resaltar áreas de potencial interés en investigación (Fig. 26).

En particular, en este trabajo de Tesis se aportaron resultados para comprender la dinámica de expresión de los genes pertenecientes a la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad, RLP y RVg, de particular interés ya que podrían ser utilizados como potenciales “targets” en el desarrollo de nuevos agentes selectivos para el control de insectos vectores o plagas. En este sentido, la correlación entre los niveles de HJSB₃ en la hemolinfa y del transcripto *RVg* en tejido ovárico en la pre-vitelogénesis y en días representativos de la vitelogénesis, junto a evidencias aportadas por otros autores nos permiten sugerir un posible mecanismo regulatorio de HJ en la expresión/función de *RVg* en el triatomino *D. maxima*. Dada su importancia en la fisiología de la reproducción, *RVg* es considerado un blanco para el control racional de plagas. En los hemípteros *Nilaparvata lugens* (saltahojas marrón) y *Bemisia tabaci* (mosca blanca) se describió la organización molecular del gen *RVg* y los efectos deletéreos en las hembras causados por los ensayos de silenciamiento del gen *RVg*, incluyendo el aumento en la mortalidad y disminución en la fertilidad (138, 154). *RVg* no había sido caracterizado en ninguna especie de triatomino pero como parte de la colaboración establecida con el laboratorio del Dr. Fernando Noriega

(Florida State University, EEUU), llevamos a cabo el secuenciamiento completo del gen *RVg* en *D. maxima* y la síntesis de ARNdc específicos. Esto posibilitará en lo inmediato la caracterización genómica de *RVg* mediante análisis bioinformáticos y estudios de silenciamiento génico para establecer las particularidades de la regulación de este receptor en el contexto de la biología reproductiva de *D. maxima*.

En los insectos, la vitelogénesis se caracteriza por una intrincada conjunción de vías metabólicas que permiten a la hembra reclutar, de forma temporal y estructuralmente organizada, cantidades significativas de proteínas y lípidos a los fines de alcanzar una ovogénesis exitosa. Los nutrientes provenientes de la alimentación estimulan la liberación de neurohormonas y péptidos, como los ILP, que conjuntamente con HJ regulan aspectos de la reproducción, conformando un “nutritional check point” para los procesos de vitelogénesis y ovogénesis ⁽³⁴⁾. La confluencia de factores nutricionales y neuroendócrinos en la regulación de la expresión del gen *Vg* fue descrita en el coleóptero *T. castaneum* ⁽¹⁵⁵⁾. En esta especie, la inyección de insulina bovina o ARNdc de FoxO, un represor transcripcional que inhibe “downstream” la activación de la casacada de insulina, indujeron la expresión de *Vg*, demostrando la participación de la señalización de los ILP sobre el proceso vitelogénico. Además, la topicación de las hembras con HJ indujo la expresión de los genes *ILP* y la fosforilación de FoxO. Esto influyó en la localización subcelular de FoxO, el cual es traslocado desde el núcleo al citoplasma inhibiendo su papel de represor, promoviendo así la expresión de *Vg*, evidenciando el “cross-talk” entre las vías de señalización de HJ y ILP. Recientemente fue propuesto que el señalamiento de insulina es activado en *R. prolixus* después de una comida de sangre, probablemente como una vía regulatoria involucrada en

la fisiología reproductiva de esta especie ⁽⁶⁰⁾. Con estos antecedentes, sumado a que en este trabajo se reporta el aumento de HJSB₃ luego de la ingesta de sangre, establecimos como un próximo objetivo estudiar el rol de FoxO en la vía de señalización HJ/ILP en el ciclo gonadotrófico de *D. maxima*.

La participación de HJ en la dinámica del metabolismo de los lípidos durante la vitelogénesis y ovogénesis fue escasamente abordada en insectos en general y en los triatomíneos en particular, representando un área promisorio de estudio. Los lípidos son críticos para la reproducción y constituyen la principal fuente energética para el desarrollo embrionario. Como la capacidad de síntesis *de novo* de los lípidos en los ovocitos es muy limitada, su almacenamiento en estas células durante la vitelogénesis es consecuencia del adecuado balance entre la síntesis en cuerpo graso, su transporte en la hemolinfa mediado por Lp y las vías metabólicas implicadas en la transferencia a los ovocitos. Las líneas de evidencia más actuales vinculan HJ con los ILP y la AKH para promover la lipogénesis y lipólisis, respectivamente ^(121, 122). En el mosquito *A. aegypti*, la mayoría de los genes que codifican para las enzimas involucradas en el metabolismo de los lípidos en el cuerpo graso presentan bajos niveles de transcripción en la post-eclosión, fase controlada por HJ, pero aumentan post-ingesta de sangre, fase regulada principalmente por 20-hidroxiecdisona ⁽¹⁵⁶⁾. En esta Tesis se evidenció que la señalización inducida por HJ es crítica para el almacenamiento de lípidos en los ovocitos, regulando la expresión de los genes *Vg* y *Lp* en cuerpo graso y modulando los genes de sus receptores endocíticos en ovario. Los resultados sugirieron que la adquisición de lípidos por los ovocitos mediada por Lp/RLp impactaría en el desarrollo del tejido ovárico de manera diferencial en la pre-vitelogénesis y vitelogénesis,

influenciada por los niveles de HJSB₃ en estas fases del ciclo reproductivo y por factores nutricionales, intrínsecamente relacionados con la regulación hormonal de la reproducción. Debido a que en los triatominos la reproducción es controlada principalmente por HJ, *D. maxima* representa un valioso modelo para profundizar en el abordaje de los eventos de lipogénesis en el cuerpo graso.

En los triatominos, los estudios que abordan *Met* están limitados a *R. prolixus* ⁽⁵²⁾ y a este trabajo. En este sentido, durante el desarrollo de esta Tesis doctoral, el gen *Met* de *D. maxima* (*DmaxMet*) fue secuenciado completamente y anotado recientemente en el banco de datos del NCBI (ACCESSION MT361686). Esto permitió la caracterización genómica de *Met*, y realizar el modelado para evaluar, mediante ensayos de unión *in silico*, la interacción entre *Met* y las formas moleculares de HJ (HJ III y HJSB₃). También se informa por primera vez, los cambios en los niveles del transcripto *Met* durante las fases del ciclo reproductivo de *D. maxima*. Desde el punto de vista fisiológico y funcional, el silenciamiento de *Met* indujo una disminución significativa en los niveles del transcripto *Vg2*. Este resultado, esperable para un gen que responde a HJ, permitió inferir que en *D. maxima* la principal PPV es inducida según la vía clásica HJ-*Met* descrita en el cuerpo graso de otras especies de insectos. El silenciamiento de *Met* también indujo una “down” regulación de *RVg* y *RLp* y un menor desarrollo del tejido ovárico, sugiriendo que *Met* también sería un actor crítico para modular, vía HJ, el desarrollo de este tejido. En este contexto, los estudios en especies con una reproducción controlada por HJ plantean un intrincado escenario de factores de transcripción como *Tai*, el cual asociado al complejo HJ-*Met*, promueve un adecuado señalamiento para la expresión de *Vg* en cuerpo graso vía activación del gen *Kr-h1* ^(33, 34).

Los avances obtenidos en esta tesis en relación a Met conforman un importante punto de partida para analizar en *D. maxima* los eventos cascada abajo en la acción regulatoria de HJ-Met sobre las PPV y sus receptores en el desarrollo ovárico. En el contexto de la fisiología de los vectores de la enfermedad de Chagas, estos aspectos son de singular relevancia para el ciclo de vida de las hembras y consecuentemente, para la epidemiología de la enfermedad.

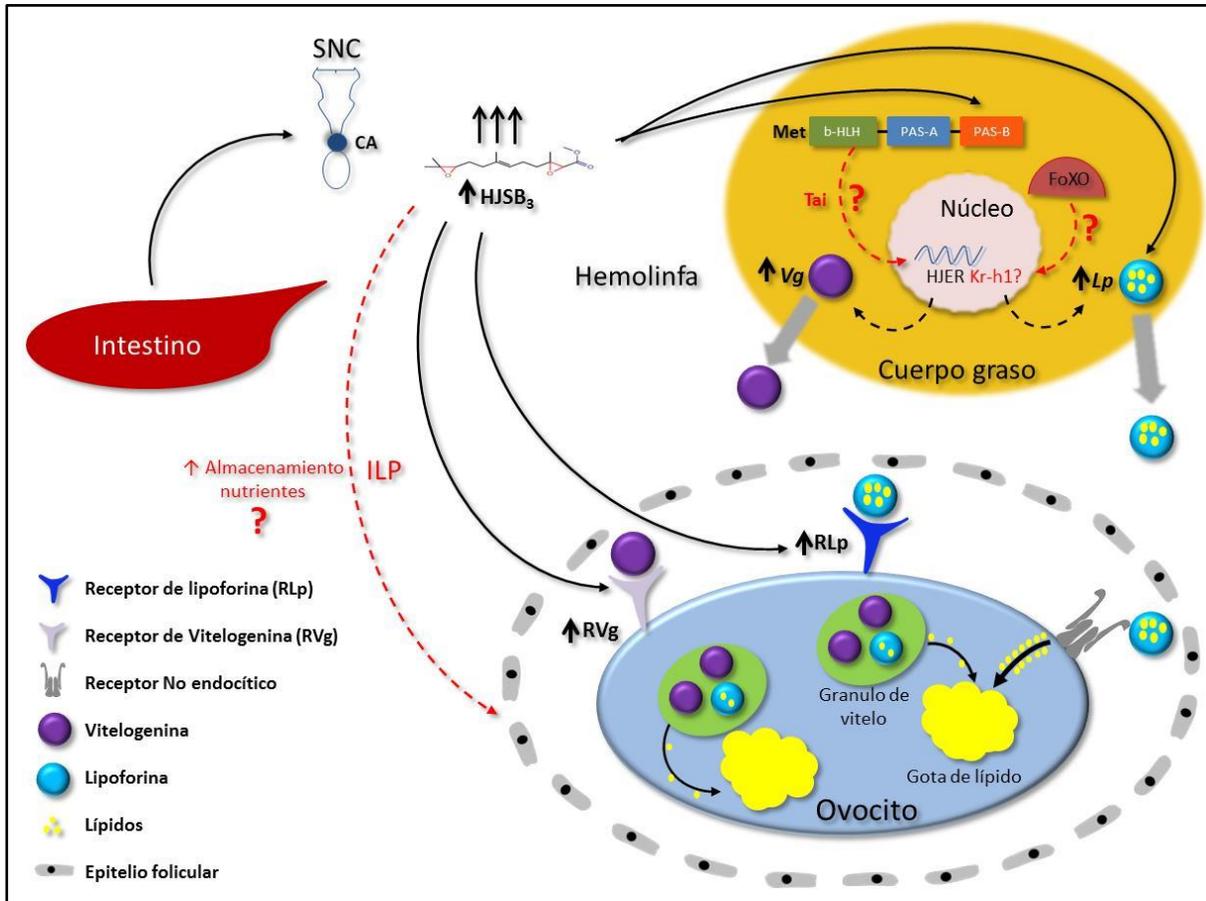


Fig. 26: Modelo de integración nutricional y endócrina en la regulación de la vitelogénesis y ovogénesis. La ingesta de sangre induce la liberación de HJ (en *D. maxima*, HJSB₃) desde la CA. El complejo HJ/Met, junto a otros actores no caracterizados, traslocan al núcleo para unirse a HJER estimulando directa o indirectamente la expresión en el cuerpo graso de las principales PPV, Vg y Lp. La translocación de FoXO al núcleo inhibiría la expresión de los genes conteniendo el motivo HJER. La ingesta de sangre estimula en el SNC la síntesis de ILP, los que inducirían el almacenamiento de nutrientes en el ovocito. Los resultados de esta Tesis demostraron que HJSB₃ estimula la expresión de RVg y RLp, facilitando la captación de Vg y Lp por los ovocitos. La adquisición de lípidos en estas células, mediada por la vía Lp/RLp, impactaría en el desarrollo del tejido ovárico de manera diferencial en la pre-vitelogénesis y vitelogénesis, influenciada por los niveles de HJSB₃ en estas fases del ciclo reproductivo y por factores nutricionales, intrínsecamente relacionados con la regulación hormonal de la reproducción. En el modelo, los signos de interrogación indican áreas de interés en investigación.

Capítulo 7: REFERENCIAS

1. Cucunuba, Z. M., Okuwoga, O., Basanez, M. G., and Nouvellet, P. (2016) Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis, *Parasites & Vectors* 9, 42.
2. WHO, W. H. O. (2020) La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana), [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).
3. Bonney, K. M. (2014) Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat?, *Parasite* 21, 11.
4. Rocha-Gaso, M. I., Villarreal-Gomez, L. J., Beyssen, D., Sarry, F., Reyna, M. A., and Ibarra-Cerdena, C. N. (2017) Biosensors to Diagnose Chagas Disease: A Brief Review, *Sensors* 17.
5. Steverding, D. (2014) The history of Chagas disease, *Parasites & vectors* 7, 317.
6. Coura, J. R., and Vinas, P. A. (2010) Chagas disease: a new worldwide challenge, *Nature* 465, S6-7.
7. Sanchez Alberti, A., Bivona, A. E., Cerny, N., Schulze, K., Weissmann, S., Ebsen, T., Morales, C., Padilla, A. M., Cazorla, S. I., Tarleton, R. L., Guzman, C. A., and Malchiodi, E. L. (2017) Engineered trivalent immunogen adjuvanted with a STING agonist confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection, *NPJ Vaccines* 2, 9.
8. Antonoglou, M. B., Sanchez Alberti, A., Redolfi, D. M., Bivona, A. E., Fernandez Lynch, M. J., Noli Truant, S., Sarratea, M. B., Iannantuono Lopez, L. V., Malchiodi, E. L., and Fernandez, M. M. (2020) Heterologous Chimeric Construct Comprising a Modified Bacterial Superantigen and a Cruzipain Domain Confers Protection Against *Trypanosoma cruzi* Infection, *Frontiers in Immunology* 11, 1279.
9. Latorre-Estivalis, J. M., Robertson, H. M., Walden, K. K., Ruiz, J., Goncalves, L. O., Guarneri, A. A., and Lorenzo, M. G. (2017) The molecular sensory machinery

- of a Chagas disease vector: expression changes through imaginal moult and sexually dimorphic features, *Scientific Reports* 7, 40049.
10. Jurberg, J., and Galvão, C. (2006) Biology, ecology, and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease, and implications for human health, *Biologisches Zentrum Linz/Austria*; 19, 21.
 11. Flores-Ferrer, A., Marcou, O., Waleckx, E., Dumonteil, E., and Gourbiere, S. (2018) Evolutionary ecology of Chagas disease; what do we know and what do we need?, *Evolutionary Applications* 11, 470-487.
 12. Almeida, C. E., Francischetti, C. N., Pacheco, R. S., and Costa, J. (2003) *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) III: patterns of feeding, defecation and resistance to starvation, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 367-371.
 13. Clayton, J. (2010) Chagas disease 101, *Nature* 465, S4-5.
 14. Salazar-Schettino, P. M., Rojas-Wastavino, G. E., Cabrera-Bravo, M., Bucio-Torres, M. I., Martinez-Ibarra, J. A., Monroy-Escobar, M. C., Rodas-Retana, A., Guevara-Gómez, Y., Vences-Blanco, M. O., Ruiz-Hernandez, A. L., and Torres-Gutiérrez, E. (2010) A revision of thirteen species of Triatominae (Hemiptera:Reduviidae) vectors of Chagas disease in Mexico., *J. Selva Andina Res. Soc* 1, 23.
 15. Coura, J. R. (2013) Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible?, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 108, 962-967.
 16. Aguirre, S. A., Frede, S., Rubiolo, E. R., and Canavoso, L. E. (2008) Vitellogenesis in the hematophagous *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of Chagas' disease, *Journal of Insect Physiology* 54, 393-402.
 17. Aguirre, S. A., Fruttero, L. L., Leyria, J., Defferrari, M. S., Pinto, P. M., Settembrini, B. P., Rubiolo, E. R., Carlini, C. R., and Canavoso, L. E. (2011) Biochemical changes in the transition from vitellogenesis to follicular atresia in the hematophagous *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae), *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41, 832-841.
 18. Aguirre, S. A., Pons, P., Settembrini, B. P., Arroyo, D., and Canavoso, L. E. (2013) Cell death mechanisms during follicular atresia in *Dipetalogaster maxima*, a vector

- of Chagas' disease (Hemiptera: Reduviidae), *Journal of Insect Physiology* 59, 532-541.
19. Leyria, J., Fruttero, L. L., Aguirre, S. A., and Canavoso, L. E. (2014) Ovarian nutritional resources during the reproductive cycle of the hematophagous *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae): focus on lipid metabolism, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 87, 148-163.
 20. Leyria, J., Fruttero, L. L., Nazar, M., and Canavoso, L. E. (2015) The Role of DmCatD, a Cathepsin D-Like Peptidase, and Acid Phosphatase in the Process of Follicular Atresia in *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae), a Vector of Chagas' Disease, *PloS One* 10, e0130144.
 21. Huebner, E., and Anderson, E. (1972) A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus*. I. The ontogeny of the follicular epithelium, *Journal of Morphology* 136, 459-493.
 22. Huebner, E., and Anderson, E. (1972) A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus*. Cytoarchitecture and development of the trophic chamber, *Journal of Morphology* 138, 1-40.
 23. Davey, K. (2007) The interaction of feeding and mating in the hormonal control of egg production in *Rhodnius prolixus*, *Journal of Insect Physiology* 53, 208-215.
 24. Noriega, F. G. (1992) Autogeny in three species of Triatominae: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma rubrovaria*, and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), *Journal of Medical Entomology* 29, 273-277.
 25. Giorgi, F., Snigirevskaya, E., and S., R. A. (2005) The cell biology of yolk protein precursor synthesis and secretion, *Reproductive Biology of Invertebrates* 12.
 26. Bellés, X. (2005) Vitellogenesis directed by juvenile hormone, *Reproductive Biology of Invertebrates* 12.
 27. Tobe, S. S., Stay, B. A., Baker, F. C., and Schooley, D. A. (1984) Regulation of juvenile hormone titer in the adult female cockroach *Diploptera punctate*, Hoffmann, J., Porchet, M., (Eds.), *Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones*, Springer-Verlag, Berlin, 397-406.
 28. Insausti, T. C. (1994) Nervous system of *Triatoma infestans*, *Journal of Morphology* 221, 343-359.

29. Hiruma, K., and Kaneko, Y. (2013) Hormonal regulation of insect metamorphosis with special reference to juvenile hormone biosynthesis, *Current Topics in Developmental Biology* 103, 73-100.
30. Burgess, L., and Rempel, J. G. (1966) The stomodaeal nervous system, the neurosecretory system, and the gland complex in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: culicidae), *Canadian Journal of Zoology* 44, 731-765.
31. Rivera-Perez, C., E., C. M., Noriega, F. G., and Jindra, M. (2020) Juvenile Hormone Regulation and Action, *Advances in Invertebrate (Neuro) Endocrinology 2 Arthropoda*, 77.
32. Tobe, S. S., and Bendena, W. G. (1999) The regulation of juvenile hormone production in arthropods. Functional and evolutionary perspectives, *Annals of the New York Academy of Sciences* 897, 300-310.
33. Santos, C. G., Humann, F. C., and Hartfelder, K. (2019) Juvenile hormone signaling in insect oogenesis, *Current Opinion in Insect Science* 31, 43-48.
34. Roy, S., Saha, T. T., Zou, Z., and Raikhel, A. S. (2018) Regulatory Pathways Controlling Female Insect Reproduction, *Annual Review of Entomology* 63, 489-511.
35. De Loof, A., Marchal, E., Rivera-Perez, C., Noriega, F. G., and Schoofs, L. (2014) Farnesol-like endogenous sesquiterpenoids in vertebrates: the probable but overlooked functional "inbrome" anti-aging counterpart of juvenile hormone of insects?, *Frontiers in Endocrinology* 5, 222.
36. Noriega, F. G. (2014) Juvenile Hormone Biosynthesis in Insects: What Is New, What Do We Know, and What Questions Remain?, *International scholarly research notices* 2014, 967361.
37. Rivera-Perez, C., Nouzova, M., Lamboglia, I., and Noriega, F. G. (2014) Metabolic analysis reveals changes in the mevalonate and juvenile hormone synthesis pathways linked to the mosquito reproductive physiology, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 51, 1-9.
38. Borrás-Castells, F., Nieva, C., Maestro, J. L., Maestro, O., Belles, X., and Martín, D. (2017) Juvenile hormone biosynthesis in adult *Blattella germanica* requires nuclear receptors Seven-up and FTZ-F1, *Scientific Reports* 7, 40234.

39. Nouzova, M., Rivera-Perez, C., and Noriega, F. G. (2018) Omics approaches to study juvenile hormone synthesis, *Current opinion in insect science* 29, 49-55.
40. Kramer, S. J., Toschi, A., Miller, C. A., Kataoka, H., Quistad, G. B., Li, J. P., Carney, R. L., and Schooley, D. A. (1991) Identification of an allatostatin from the tobacco hornworm *Manduca sexta*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 9458-9462.
41. Kataoka, H., Toschi, A., Li, J. P., Carney, R. L., Schooley, D. A., and Kramer, S. J. (1989) Identification of an allatotropin from adult *manduca sexta*, *Science* 243, 1481-1483.
42. Areiza, M., Nouzova, M., Rivera-Perez, C., and Noriega, F. G. (2015) 20-Hydroxyecdysone stimulation of juvenile hormone biosynthesis by the mosquito *corpora allata*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 64, 100-105.
43. Goodman, W. G., and Cusson, M. (2012) The juvenile hormones, *Insect Endocrinology*, 310-365.
44. Engelmann, F., and Mala, J. (2000) The interactions between juvenile hormone (JH), lipophorin, vitellogenin, and JH esterases in two cockroach species, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 793-803.
45. Ramirez, C. E., Nouzova, M., Michalkova, V., Fernandez-Lima, F., and Noriega, F. G. (2020) Common structural features facilitate the simultaneous identification and quantification of the five most common juvenile hormones by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 116, 103287.
46. Meyer, A. S., Schneiderman, H. A., Hanzmann, E., and Ko, J. H. (1968) The two juvenile hormones from the cecropia silk moth, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 60, 853-860.
47. Judy, K. J., Schooley, D. A., Dunham, L. L., Hall, M. S., Bergot, B. J., and Siddall, J. B. (1973) Isolation, Structure, and Absolute Configuration of a New Natural Insect Juvenile Hormone from *Manduca sexta*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70, 1509-1513.
48. Wilson, T. G., and Fabian, J. (1986) A *Drosophila melanogaster* mutant resistant to a chemical analog of juvenile hormone, *Developmental Biology* 118, 190-201.

49. Konopova, B., and Jindra, M. (2007) Juvenile hormone resistance gene Methoprene-tolerant controls entry into metamorphosis in the beetle *Tribolium castaneum*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 10488-10493.
50. Lozano, J., and Belles, X. (2014) Role of Methoprene-tolerant (Met) in adult morphogenesis and in adult ecdysis of *Blattella germanica*, *PloS One* 9, e103614.
51. Smykal, V., Bajgar, A., Provaznik, J., Fexova, S., Buricova, M., Takaki, K., Hodkova, M., Jindra, M., and Dolezel, D. (2014) Juvenile hormone signaling during reproduction and development of the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 45, 69-76.
52. Villalobos-Sambucaro, M. J., Riccillo, F. L., Calderon-Fernandez, G. M., Sterkel, M., Diambra, L. A., and Ronderos, J. R. (2015) Genomic and functional characterization of a methoprene-tolerant gene in the kissing-bug *Rhodnius prolixus*, *General and comparative endocrinology* 216, 1-8.
53. Jindra, M., Uhlirova, M., Charles, J. P., Smykal, V., and Hill, R. J. (2015) Genetic Evidence for Function of the bHLH-PAS Protein Gce/Met As a Juvenile Hormone Receptor, *PLoS Genetics* 11, e1005394.
54. Ashok, M., Turner, C., and Wilson, T. G. (1998) Insect juvenile hormone resistance gene homology with the bHLH-PAS family of transcriptional regulators, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 2761-2766.
55. Moglich, A., Ayers, R. A., and Moffat, K. (2009) Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains, *Structure* 17, 1282-1294.
56. Bernardo, T. J., and Dubrovsky, E. B. (2012) Molecular Mechanisms of Transcription Activation by Juvenile Hormone: A Critical Role for bHLH-PAS and Nuclear Receptor Proteins, *Insects* 3, 324-338.
57. Jindra, M., Palli, S. R., and Riddiford, L. M. (2013) The juvenile hormone signaling pathway in insect development, *Annual Review of Entomology* 58, 181-204.
58. Charles, J. P., Iwema, T., Epa, V. C., Takaki, K., Rynes, J., and Jindra, M. (2011) Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant,

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 21128-21133.
59. Godlewski, J., Wang, S., and Wilson, T. G. (2006) Interaction of bHLH-PAS proteins involved in juvenile hormone reception in *Drosophila*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342, 1305-1311.
 60. Leyria, J., Orchard, I., and Lange, A. B. (2020) Transcriptomic analysis of regulatory pathways involved in female reproductive physiology of *Rhodnius prolixus* under different nutritional states, *Scientific Reports* 10, 11431.
 61. Liu, P., Peng, H. J., and Zhu, J. (2015) Juvenile hormone-activated phospholipase C pathway enhances transcriptional activation by the methoprene-tolerant protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, E1871-1879.
 62. Ojani, R., Liu, P., Fu, X., and Zhu, J. (2016) Protein kinase C modulates transcriptional activation by the juvenile hormone receptor methoprene-tolerant, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 70, 44-52.
 63. Wigglesworth, V. B. (1936) The function of corpus allatum in the growth and reproduction of *R. prolixus* (Hemiptera). *Q. J. Microsc. Sci* 79, 91-121.
 64. Coles, G. C. (1965) Haemolymph proteins and yolk formation in *Rhodnius prolixus* Stål. J, *J. Exp. Biol* 43, 425-431.
 65. Davey, K. G. (1987) Inputs to the hormonal control of egg development in *Rhodnius prolixus*, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 82 Suppl 3, 103-108.
 66. Jing, Y. P., An, H., Zhang, S., Wang, N., and Zhou, S. (2018) Protein kinase C mediates juvenile hormone-dependent phosphorylation of Na(+)/K(+)-ATPase to induce ovarian follicular patency for yolk protein uptake, *The Journal of Biological Chemistry* 293, 20112-20122.
 67. Atella, G. C., Gondim, K. C., Machado, E. A., Medeiros, M. N., Silva-Neto, M. A., and Masuda, H. (2005) Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach, *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 77, 405-430.
 68. Tufail, M., and Takeda, M. (2008) Molecular characteristics of insect vitellogenins, *Journal of Insect Physiology* 54, 1447-1458.

69. Tufail, M., Nagaba, Y., Elgendy, A. M., and Takeda, M. (2014) Regulation of vitellogenin genes in insects, *Entomol. Sci.* 17, 269-282.
70. Tufail, M., Raikhel, A. S., and Takeda, M. (2005) Biosynthesis and processing of insect vitellogenins, *Reproductive Biology of Invertebrates vol. XII, Part B.*, 1-32.
71. Raikhel, A. S., Brown, M. R., and Bellés, X. (2005) Hormonal Control of reproductive processes, *Comprehensive Molecular Insect Science* 3, 433-473.
72. Rouillé, Y., Duguay, S. J., Lund, K., Furuta, M., Gong, Q., Lipkind, G., Oliva, A. A. J., Chan, S. J., and Steiner, D. F. (1992) Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases, *Front. Neuroendocrinol* 16, 322-361.
73. Mundall, E., and Engelmann, F. (1977) Endocrine control of vitellogenin synthesis and vitellogenesis in *Triatoma protracta*, *Journal of Insect Physiology* 23, 825-836.
74. Salomon, O., and Stoka, A. (1986) Vitellin and vitellogenin characterization of *Triatoma infestans* and related species, *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam* 36, 419-429.
75. Valle, D. (1993) Vitellogenesis in insects and other groups--a review, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 88 (1), 1-26.
76. Ziegler, R., and Van Antwerpen, R. (2006) Lipid uptake by insect oocytes, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36, 264-272.
77. Fruttero, L. L., Leyria, J., and Canavoso, L. E. (2017) Lipids in Insect Oocytes: From the Storage Pathways to Their Multiple Functions, *Results and problems in cell differentiation* 63, 403-434.
78. Downer, R. G. H., and Chino, H. (1985) Turnover of protein and diacylglycerol components of lipophorin in insect haemolymph, *Insect Biochem* 15, 627-630.
79. Canavoso, L. E., Jouni, Z. E., Karnas, K. J., Pennington, J. E., and Wells, M. A. (2001) Fat metabolism in insects, *Annual Review of Nutrition* 21, 23-46.
80. Van der Horst, D. J., Roosendaal, S. D., and Rodenburg, K. W. (2009) Circulatory lipid transport: lipoprotein assembly and function from an evolutionary perspective, *Molecular and Cellular Biochemistry* 326, 105-119.
81. Fruttero, L. L., Demartini, D. R., Rubiolo, E. R., Carlini, C. R., and Canavoso, L. E. (2014) beta-chain of ATP synthase as a lipophorin binding protein and its role in

- lipid transfer in the midgut of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae), *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 52, 1-12.
82. Fruttero, L. L., Leyria, J., Ramos, F. O., Stariolo, R., Settembrini, B. P., and Canavoso, L. E. (2017) The process of lipid storage in insect oocytes: The involvement of b-chain of ATP synthase in lipophorin-mediated lipid transfer in the chagas' disease vector *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae), *Journal of Insect Physiology* 96, 82-92.
 83. Fruttero, L. L., Leyria, J., Moyetta, N. R., Ramos, F. O., Settembrini, B. P., and Canavoso, L. E. (2019) The Fat Body of the Hematophagous Insect, *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): Histological Features and Participation of the beta-Chain of ATP Synthase in the Lipophorin-Mediated Lipid Transfer, *Journal of insect science* 19.
 84. Roth, T. F., and Porter, K. R. (1964) Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito *Aedes Aegypti*. L, *The Journal of cell biology* 20, 313-332.
 85. Snigirevskaya, E., and Raikhel, A. S. (2005) Receptor-mediated endocytosis of yolk proteins in insect oocytes, in: Raikhel, A.S. (Ed.), Progress in vitellogenesis., *Reproductive biology of invertebrates* 12, 198-227.
 86. Raikhel, A. S., and Dhadialla, T. S. (1992) Accumulation of yolk proteins in insect oocytes, *Annual Review of Entomology* 37, 217-251.
 87. Dantuma, N. P., Potters, M., De Winther, M. P., Tensen, C. P., Kooiman, F. P., Bogerd, J., and Van der Horst, D. J. (1999) An insect homolog of the vertebrate very low density lipoprotein receptor mediates endocytosis of lipophorins, *Journal of lipid research* 40, 973-978.
 88. Dantuma, N. P., Pijnenburg, M. A., Diederens, J. H., and Van der Horst, D. J. (1997) Developmental down-regulation of receptor-mediated endocytosis of an insect lipoprotein, *Journal of Lipid Research* 38, 254-265.
 89. Van Hoof, D., Rodenburg, K. W., and Van der Horst, D. J. (2005) Receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking of lipoproteins and transferrin in insect cells, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 117-128.

90. Tufail, M., and Takeda, M. (2009) Insect vitellogenin/lipophorin receptors: molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms, *Journal of Insect Physiology* 55, 87-103.
91. Canavoso, L. E., Rubiolo, E.R. (1995) Interconversions of lipophorin particles by adipokinetic hormone in hemolymph of *Panstrongylus megistus*, *Dipetalogaster maximus* and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), *Comp. Biochem. Physiol.*
92. Marcato, R, S., and ER, R. (2003) Reservas metabólicas en hembras autógenas y no autógenas de *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae), *Sociedad Argentina de Protozoología. XIX Reunión Científica Anual.*
93. Canavoso, L. E., and Rubiolo, E. R. (1998) Metabolic post-feeding changes in fat body and hemolymph of *Dipetalogaster maximus* (Hemiptera: Reduviidae), *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 93, 225-230.
94. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
95. Fruttero, L. L., Rubiolo, E. R., and Canavoso, L. E. (2009) Biochemical and cellular characterization of lipophorin-midgut interaction in the hematophagous *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae), *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39, 322-331.
96. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods* 25, 402-408.
97. Majerowicz, D., Alves-Bezerra, M., Logullo, R., Fonseca-de-Souza, A. L., Meyer-Fernandes, J. R., Braz, G. R., and Gondim, K. C. (2011) Looking for reference genes for real-time quantitative PCR experiments in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), *Insect molecular biology* 20, 713-722.
98. Mesquita, R. D., Vionette-Amaral, R. J., Lowenberger, C., Rivera-Pomar, R., Monteiro, F. A., Minx, P., Spieth, J., Carvalho, A. B., Panzera, F., Lawson, D., Torres, A. Q., Ribeiro, J. M., Sorgine, M. H., Waterhouse, R. M., Montague, M. J., Abad-Franch, F., Alves-Bezerra, M., Amaral, L. R., Araujo, H. M., Araujo, R. N.,

- Aravind, L., Atella, G. C., Azambuja, P., Berni, M., Bittencourt-Cunha, P. R., Braz, G. R., Calderon-Fernandez, G., Carareto, C. M., Christensen, M. B., Costa, I. R., Costa, S. G., Dansa, M., Daumas-Filho, C. R., De-Paula, I. F., Dias, F. A., Dimopoulos, G., Emrich, S. J., Esponda-Behrens, N., Fampa, P., Fernandez-Medina, R. D., da Fonseca, R. N., Fontenele, M., Fronick, C., Fulton, L. A., Gandara, A. C., Garcia, E. S., Genta, F. A., Giraldo-Calderon, G. I., Gomes, B., Gondim, K. C., Granzotto, A., Guarneri, A. A., Guigo, R., Harry, M., Hughes, D. S., Jablonka, W., Jacquin-Joly, E., Juarez, M. P., Koerich, L. B., Lange, A. B., Latorre-Estivalis, J. M., Lavore, A., Lawrence, G. G., Lazoski, C., Lazzari, C. R., Lopes, R. R., Lorenzo, M. G., Lugon, M. D., Majerowicz, D., Marcet, P. L., Mariotti, M., Masuda, H., Megy, K., Melo, A. C., Missirlis, F., Mota, T., Noriega, F. G., Nouzova, M., Nunes, R. D., Oliveira, R. L., Oliveira-Silveira, G., Ons, S., Orchard, I., Pagola, L., Paiva-Silva, G. O., Pascual, A., Pavan, M. G., Pedrini, N., Peixoto, A. A., Pereira, M. H., Pike, A., Polycarpo, C., Prosdocimi, F., Ribeiro-Rodrigues, R., Robertson, H. M., Salerno, A. P., Salmon, D., Santesmasses, D., Schama, R., Seabra-Junior, E. S., Silva-Cardoso, L., Silva-Neto, M. A., Souza-Gomes, M., Sterkel, M., Taracena, M. L., Tojo, M., Tu, Z. J., Tubio, J. M., Ursic-Bedoya, R., Venancio, T. M., Walter-Nuno, A. B., Wilson, D., Warren, W. C., Wilson, R. K., Huebner, E., Dotson, E. M., and Oliveira, P. L. (2015) 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 of the United States of America* 112, 14936-14941.
99. Ramirez, C. E., Nouzova, M., Benigni, P., Quirke, J. M. E., Noriega, F. G., and Fernandez-Lima, F. (2016) Fast, ultra-trace detection of juvenile hormone III from mosquitoes using mass spectrometry, *Talanta* 159, 371-378.
100. Villalobos-Sambucaro, M. J., Nouzova, M., Ramirez, C. E., Eugenia Alzugaray, M., Fernandez-Lima, F., Ronderos, J. R., and Noriega, F. G. (2020) The juvenile hormone described in *Rhodnius prolixus* by Wigglesworth is juvenile hormone III skipped bisepoxide, *Scientific reports* 10, 3091.
101. Fruttero, L. L., Frede, S., Rubiolo, E. R., and Canavoso, L. E. (2011) The storage of nutritional resources during vitellogenesis of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera:

- Reduviidae): the pathways of lipophorin in lipid delivery to developing oocytes, *Journal of Insect Physiology* 57, 475-486.
102. Amsalem, E., Teal, P., Grozinger, C. M., and Hefetz, A. (2014) Precocene-I inhibits juvenile hormone biosynthesis, ovarian activation, aggression and alters sterility signal production in bumble bee (*Bombus terrestris*) workers, *The Journal of experimental biology* 217, 3178-3185.
 103. Paim, R. M., Araujo, R. N., Lehane, M. J., Gontijo, N. F., and Pereira, M. H. (2013) Application of RNA interference in triatomine (Hemiptera: Reduviidae) studies, *Insect Science* 20, 40-52.
 104. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580.
 105. Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology* 62, 293-300.
 106. Yang, J., and Zhang, Y. (2015) Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER, *Current Protocols in Bioinformatics* 52, 5 8 1-5 8 15.
 107. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis, *Journal of Computational Chemistry* 25, 1605-1612.
 108. Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *Journal of Molecular Biology* 157, 105-132.
 109. Sarkar, S., Witham, S., Zhang, J., Zhenirovskyy, M., Rocchia, W., and Alexov, E. (2013) DelPhi Web Server: A comprehensive online suite for electrostatic calculations of biological macromolecules and their complexes, *Communications in Computational Physics* 13, 269-284.
 110. Jones, D. T., Taylor, W. R., and Thornton, J. M. (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences, *Computer Applications in the Biosciences : CABIOS* 8, 275-282.
 111. Katoh, K., Rozewicki, J., and Yamada, K. D. (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization, *Briefings in Bioinformatics* 20, 1160-1166.

112. Sela, I., Ashkenazy, H., Katoh, K., and Pupko, T. (2015) GUIDANCE2: accurate detection of unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters, *Nucleic Acids Research* 43, W7-14.
113. Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0, *Systematic Biology* 59, 307-321.
114. Le, S. Q., and Gascuel, O. (2008) An improved general amino acid replacement matrix, *Molecular Biology and Evolution* 25, 1307-1320.
115. Lefort, V., Longueville, J. E., and Gascuel, O. (2017) SMS: Smart Model Selection in PhyML, *Molecular Biology and Evolution* 34, 2422-2424.
116. Anisimova, M., and Gascuel, O. (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative, *Systematic Biology* 55, 539-552.
117. Blariza, M. J., Soria, N. W., Torres, A. G., Grosso, C. G., and Garcia, B. A. (2014) cDNA isolation and characterization of two vitellogenin genes in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae), *Gene* 543, 118-124.
118. Li, S., Yu, X., and Feng, Q. (2019) Fat Body Biology in the Last Decade, *Annual review of entomology* 64, 315-333.
119. Wang, Z., and davey, K. (1993) The role of juvenile hormone in vitellogenin production in *Rhodnius prolixus*, *J. Insect Physiol*, 471-476.
120. Gondim, K. C., Atella, G. C., Pontes, E. G., and Majerowicz, D. (2018) Lipid metabolism in insect disease vectors, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 101, 108-123.
121. Toprak, U. (2020) The Role of Peptide Hormones in Insect Lipid Metabolism, *Frontiers in Physiology* 11, 434.
122. Toprak, U., Hegedus, D., Dogan, C., and Guney, G. (2020) A journey into the world of insect lipid metabolism, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 104, e21682.

123. Aguirre, Silvia Frede, Edilberto R. Rubiolo, and Canavoso., L. E. (2008) Vitellogenesis in the hematophagous *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of Chagas' disease, *Journal of Insect Physiology*.
124. Leyria, J., Fruttero, L. L., Ligabue-Braun, R., Defferrari, M. S., Arrese, E. L., Soulages, J. L., Settembrini, B. P., Carlini, C. R., and Canavoso, L. E. (2018) DmCatD, a cathepsin D-like peptidase of the hematophagous insect *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae): Purification, bioinformatic analyses and the significance of its interaction with lipophorin in the internalization by developing oocytes, *Journal of Insect Physiology* 105, 28-39.
125. Kotaki, T. (2003) Oosorption in the stink bug, *Plautia crossota stali*: induction and vitellogenin dynamics, *Journal of Insect Physiology* 49, 105-113.
126. Gondim, K. C., Oliveira, P. L., and Masuda, H. (1989) Lipophorin and oogenesis in *Rhodnius prolixus*: transfer of phospholipids, *Journal of Insect Physiology* 35, 19-27.
127. Machado, E. A., Atella, G. C., Gondim, K. C., de Souza, W., and Masuda, H. (1996) Characterization and immunocytochemical localization of lipophorin binding sites in the oocytes of *Rhodnius prolixus*, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 31, 185-196.
128. Santos, R., Rosas-Oliveira, R., Saraiva, F. B., Majerowicz, D., and Gondim, K. C. (2011) Lipid accumulation and utilization by oocytes and eggs of *Rhodnius prolixus*, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 77, 1-16.
129. Entringer, P. F., Grillo, L. A., Pontes, E. G., Machado, E. A., and Gondim, K. C. (2013) Interaction of lipophorin with *Rhodnius prolixus* oocytes: biochemical properties and the importance of blood feeding, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 108, 836-844.
130. Cheon, H. M., Seo, S. J., Sun, J., Sappington, T. W., and Raikhel, A. S. (2001) Molecular characterization of the VLDL receptor homolog mediating binding of lipophorin in oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 753-760.

131. Ciudad, L., Belles, X., and Piulachs, M. D. (2007) Structural and RNAi characterization of the German cockroach lipophorin receptor, and the evolutionary relationships of lipoprotein receptors, *BMC molecular biology* 8, 53.
132. Tufail, M., Elmogy, M., Ali Fouda, M. M., Elgendy, A. M., Bembenek, J., Trang, L. T., Shao, Q. M., and Takeda, M. (2009) Molecular cloning, characterization, expression pattern and cellular distribution of an ovarian lipophorin receptor in the cockroach, *Leucophaea maderae*, *Insect molecular biology* 18, 281-294.
133. Clifton, M. E., and Noriega, F. G. (2012) The fate of follicles after a blood meal is dependent on previtellogenic nutrition and juvenile hormone in *Aedes aegypti*, *Journal of Insect Physiology* 58, 1007-1019.
134. Snigirevskaya, E. S., Sappington, T. W., and Raikhel, A. S. (1997) Internalization and recycling of vitellogenin receptor in the mosquito oocyte, *Cell and Tissue Research* 290, 175-183.
135. Cruz, J., Martin, D., Pascual, N., Maestro, J. L., Piulachs, M. D., and Belles, X. (2003) Quantity does matter. Juvenile hormone and the onset of vitellogenesis in the German cockroach, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 1219-1225.
136. Bittova, L., Jedlicka, P., Dracinsky, M., Kirubakaran, P., Vondrasek, J., Hanus, R., and Jindra, M. (2019) Exquisite ligand stereoselectivity of a *Drosophila* juvenile hormone receptor contrasts with its broad agonist repertoire, *The Journal of biological chemistry* 294, 410-423.
137. Chen, M. E., Lewis, D. K., Keeley, L. L., and Pietrantonio, P. V. (2004) cDNA cloning and transcriptional regulation of the vitellogenin receptor from the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae), *Insect molecular biology* 13, 195-204.
138. Lu, K., Shu, Y., Zhou, J., Zhang, X., Zhang, X., Chen, M., Yao, Q., Zhou, Q., and Zhang, W. (2015) Molecular characterization and RNA interference analysis of vitellogenin receptor from *Nilaparvata lugens* (Stal), *Journal of Insect Physiology* 73, 20-29.
139. Ma, L., Zhang, W., Liu, C., Chen, L., Xu, Y., Xiao, H., and Liang, G. (2018) Methoprene-Tolerant (Met) Is Indispensable for Larval Metamorphosis and Female

- Reproduction in the Cotton Bollworm *Helicoverpa armigera*, *Frontiers in Physiology* 9, 1601.
140. Liu, W., Guo, S., Sun, D., Zhu, L., Zhu, F., Lei, C. L., Sheng, L., Phelps, B., and Wang, X. P. (2019) Molecular characterization and juvenile hormone-regulated transcription of the vitellogenin receptor in the cabbage beetle *Colaphellus bowringi*, *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 229, 69-75.
 141. Sevala, V., Shu, S., Ramaswamy, S. B., and Schal, C. (1999) Lipophorin of female *Blattella germanica* (L.): characterization and relation to hemolymph titers of juvenile hormone and hydrocarbons, *Journal of Insect Physiology* 45, 431-441.
 142. Garcia, E. S., Feder, D., Gomes, J. E., and de Azambuja, P. (1987) Effects of precocene and azadirachtin in *Rhodnius prolixus*: some data on development and reproduction, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 82 Suppl 3, 67-73.
 143. Ronderos, J. R. (2009) Changes in the corpora allata and epidermal proliferation along the fourth instar of the Chagas disease vector *Triatoma infestans*, *Biocell : official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica ... et. al* 33, 149-154.
 144. Baumann, A. A., Benoit, J. B., Michalkova, V., Mireji, P., Attardo, G. M., Moulton, J. K., Wilson, T. G., and Aksoy, S. (2013) Juvenile hormone and insulin suppress lipolysis between periods of lactation during tsetse fly pregnancy, *Molecular and cellular endocrinology* 372, 30-41.
 145. Ling, L., and Raikhel, A. S. (2018) Serotonin signaling regulates insulin-like peptides for growth, reproduction, and metabolism in the disease vector *Aedes aegypti*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, E9822-E9831.
 146. Sevala, V., and davey, K. (1989) Action of juvenile hormone on the follicle cells of *Rhodnius prolixus*: Evidence for a novel regulatory mechanism involving protein kinase C., *Experientia* 45.
 147. Marchal, E., Hult, E. F., Huang, J., Pang, Z., Stay, B., and Tobe, S. S. (2014) Methoprene-tolerant (Met) knockdown in the adult female cockroach, *Diploptera punctata* completely inhibits ovarian development, *PLoS One* 9, e106737.

148. Davey, K. G., and Huebner, E. (1974) The response of the follicle cells of *Rhodnius prolixus* to juvenile hormone and antigonadotropin in vitro, *Canadian Journal of Zoology* 52, 1407-1412.
149. Parra-Peralbo, E., and Culi, J. (2011) *Drosophila* lipophorin receptors mediate the uptake of neutral lipids in oocytes and imaginal disc cells by an endocytosis-independent mechanism, *PLoS genetics* 7, e1001297.
150. Rodriguez-Vazquez, M., Vaquero, D., Parra-Peralbo, E., Mejia-Morales, J. E., and Culi, J. (2015) *Drosophila* Lipophorin Receptors Recruit the Lipoprotein LTP to the Plasma Membrane to Mediate Lipid Uptake, *PLoS genetics* 11, e1005356.
151. Riddiford, L. M. (2020) *Rhodnius*, Golden Oil, and Met: A History of Juvenile Hormone Research, *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8, 679.
152. Kolonko, M., and Greb-Markiewicz, B. (2019) bHLH-PAS Proteins: Their Structure and Intrinsic Disorder, *International journal of molecular sciences* 20.
153. Kewley, R. J., Whitelaw, M. L., and Chapman-Smith, A. (2004) The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators, *The international journal of biochemistry & cell biology* 36, 189-204.
154. Upadhyay, S. K., Singh, H., Dixit, S., Mendu, V., and Verma, P. C. (2016) Molecular Characterization of Vitellogenin and Vitellogenin Receptor of *Bemisia tabaci*, *PloS One* 11, e0155306.
155. Sheng, Z., Xu, J., Bai, H., Zhu, F., and Palli, S. R. (2011) Juvenile hormone regulates vitellogenin gene expression through insulin-like peptide signaling pathway in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, *The Journal of biological chemistry* 286, 41924-41936.
156. Wang, X., Hou, Y., Saha, T. T., Pei, G., Raikhel, A. S., and Zou, Z. (2017) Hormone and receptor interplay in the regulation of mosquito lipid metabolism, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, E2709-E2718.

Capítulo 8: ANEXO

Producto de PCR	Primers	Secuencia (5'---3')
18s Ribosomal RNA	Sentido	TCGGCCAACAAAAGTACACA
	Anti-sentido	TGTCGGTGTAAGTGGCATGT
RVg	Sentido	CATCTCTTGGTATGTTACT
	Anti-sentido	CCTGACTGCAAGGACGGTTC
Vg1	Sentido	ACTACTGACTACAACCACTG
	Anti-sentido	TAACGGAAGAGCGTGCAAGGA
Vg2	Sentido	GGCAGTCCGGTAGACCTAC
	Anti-sentido	TACAACCACTGTAAACAAAG
RLp	Sentido	GCCACACGATATGTTGATG
	Anti-sentido	GGTCTTCCGTTGTCTTCCTG
Lp	Sentido	CTGTAAGCAAGGAATCTGGAT
	Anti-sentido	TTGATTGAGATGTTCCCTGTA
Met	Sentido	AACTGGTGTGATTGTGTGCTAGA
	Anti-sentido	ATGGTACGTCGGGATCAAAA
ARGdc	Sentido	ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTC
	Anti-sentido	AATAGTTTGCACAACGTTG
T7-ARGdc	Sentido	taatacgactcactatagggaga ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTC
	Anti-sentido	taatacgactcactatagggaga AATAGTTTGCACAACGTTG
RLpdc	Sentido	AGCCATCTTCAAGGCCAATA
	Anti-sentido	GAACACAATCATCGAGGCAA
T7-RLpdc	Sentido	taatacgactcactatagggaga AGCCATCTTCAAGGCCAATA
	Anti-sentido	taatacgactcactatagggaga GAACACAATCATCGAGGCAA
Metdc	Sentido	AACTGGTGTGATTGTGTGCTAGA
	Anti-sentido	ATGGTACGTCGGGATCAAAA
T7-Metdc	Sentido	taatacgactcactatagggaga AACTGGTGTGATTGTGTGCTAGA
	Anti-sentido	taatacgactcactatagggaga ATGGTACGTCGGGATCAAAA
Met 3'RACE	Sentido	gattacgccaagcttGATCTGTTGGGGCAGTCCCTGTAT
Met 5'RACE	Anti-sentido	gattacgccaagcttAGTGGATGGTACGTCGGGATCAAAA

Tabla S1: Tabla conteniendo todos los primers y dobles hebras. Se muestra la secuencia promotora (Promotor T7) de la ARN polimerasa. ***taatacgactcactatagggaga**

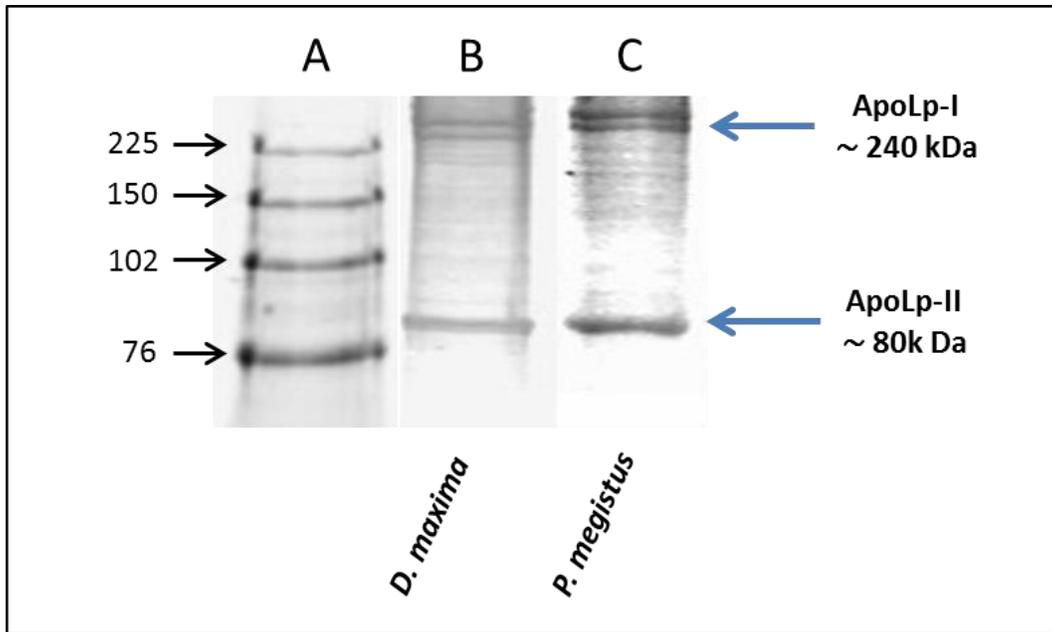


Figura suplementaria 1 (Fig. S1): Reactividad de anti-Lp de *Panstrongylus megistus*. La lipoforina (Lp) fue purificada a partir de la hemolinfa de hembras de *P. megistus* y *D. maxima* mediante ultracentrifugación en un gradiente salino de KBr y sometida a fraccionamiento en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, 7,5%), seguido de Western blot. Para la inmunodetección de Lp se utilizó un anticuerpo policlonal anti-Lp contra Lp de *P. megistus* (1:2000) y como anticuerpo secundario, un anticuerpo anti-IgG comercial marcado (Li-Cor IRDye 800CW polyclonal goat anti-rabbit IgG, 1:15.000). Las bandas correspondientes a las subunidades de Lp (ApoLp-I y II) en ambas especies fueron detectadas con el sistema Western blot cuantitativo cercano al infrarrojo Odyssey (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA), utilizando los ajustes por defecto. Calle **A**: marcador de peso molecular. Calle **B**: 1 µg de Lp de *D. maxima*. Calle **C**: 1 µg de Lp de *P. megistus*.