

**NEUROPEPTIDOS EN EL OVARIO DE *RHODNIUS PROLIXUS*:
ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO Y FUNCIONAL**

Trabajo Final de Grado
de la alumna



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 2 de mayo de 2022

**NEUROPEPTIDOS EN EL OVARIO DE *RHODNIUS PROLIXUS*:
ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO Y FUNCIONAL**

Trabajo Final de Grado

de la alumna

JAZMÍN PUNTA

Aprobada por el Tribunal Evaluador

CARLOS FIGUEROA
Evaluador/a

JOSÉ MANUEL LATORRE
ESTIVALIS
Evaluador/a

MARÍA INÉS
CATALANO
Evaluador/a

SHEILA ONS
Co-Director/a

AGUSTINA PASCUAL
Director/a

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 2 de mayo de 2022

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a la UNNOBA como institución pública, por brindar el mejor conocimiento y la mejor educación a través de todo el personal docente.

A cada persona que integra el CeBio, por recibirme tan cálidamente y hacerme sentir parte en tan poco tiempo.

A mis directoras de tesis, Agus y Sheila, por la dedicación y el compromiso que tomaron para conmigo, formándome no solo como profesional, sino también como persona. Por la paciencia y por transmitirme que, aunque las cosas no siempre salgan como uno desee, nunca hay que bajar los brazos, y que de eso se trata la ciencia.

A mis papás, Marcia y Marcelo, por escucharme y apoyarme en cada decisión. Por confiar en mí y en que esta instancia tarde o temprano iba a llegar, y sobre todo, por haberme dado la oportunidad de estudiar una carrera universitaria lejos de casa.

A mis hermanas, Flor y Luisi, mis pilares fundamentales, que supieron escucharme y entenderme siempre, esperándome con un abrazo cada vez que volvía a casa, brindándome lo mejor de ellas en esta etapa.

A mis compañeras y compañeros de estudio, por hacer el día a día más ameno en cada cursada, por esas tardes y noches interminables de estudio, que hacerlo sola hubiera sido mucho más difícil.

A Sofi y Anto, grandes amigas que me regaló esta carrera, ellas me demostraron que no importa con qué frecuencia nos encontremos personalmente, siempre vamos a estar para la otra, por eso y más, hoy puedo decir que se convirtieron en mis hermanas.

A mis amigas y amigos de Los Toldos, incondicionales desde hace años, los que siempre me escucharon y estuvieron presente en cada momento difícil de mi vida, sin dudarlos jamás.

A mis compañeras y compañeros de laboratorio, por todos los consejos y buenos momentos que me hicieron pasar, por regalarme un hermoso ambiente de trabajo cada día, lo valoro muchísimo.

Nada de esto estaría sucediendo sin el apoyo de cada una de estas personas; por eso y por mucho más, ¡¡¡GRACIAS!!!

ÍNDICE

ÍNDICE	5
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	9
<i>Rhodnius prolixus</i> como organismo modelo.....	10
Ovogénesis en insectos.....	13
Neuropéptidos en insectos	18
Neuropéptidos en el proceso de ovogénesis	18
Hormona Adipocinética (AKH)	20
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
Hipótesis	24
Objetivo.....	24
Objetivos específicos	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
1. Mantenimiento de la colonia de <i>R. prolixus</i>	26
2. Búsqueda por similitud de secuencia	26
3. Análisis de dominios y alineamientos múltiples.....	26
4. Disección de tejidos	27
5. Extracción de ARN y generación de ADN copia (ADNc).....	28
6. Diseño de oligonucleótidos específicos	29
7. Validación de la expresión génica por RT-PCR.....	29
8. Evaluación de la expresión génica por PCR cuantitativa (qRT-PCR).....	30
9. Silenciamiento génico por ARNi.....	31
10. Evaluación de fenotipo a nivel del ovario.....	31
Inmunohistoquímica con fluorescencia	32
RESULTADOS	33
1. Identificación de neuropéptidos en el ovario de <i>R. prolixus</i>	34
2. Análisis de expresión de <i>AKH</i>	36
2.1. Validación de expresión génica por RT-PCR.....	36
2.2. Dinámica de expresión por qRT-PCR.....	36
3. Silenciamiento génico	37

4. Morfología del ovario y toma de vitelo	38
4.1. Descripción de la estructura del ovario de <i>R. prolixus</i>	39
4.2. Acumulación de vitelogenina/vitelina durante la ovogénesis	40
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	49
MATERIAL SUPLEMENTARIO	62

RESUMEN

Los neuropéptidos son fundamentales en la coordinación de todos los procesos fisiológicos que suceden en un insecto. Sucesos tan diversos como, muda, osmorregulación, desarrollo embrionario y post embrionario, metabolismo y reproducción son sincronizados por estas moléculas mensajeras. El insecto hematófago *Rhodnius prolixus* es capaz de transmitir el protozooario *Tripanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Debido a la ausencia de vacunas y tratamientos efectivos contra la enfermedad, el medio elegido para reducir la transmisión de la enfermedad es a través del control vectorial. Dentro de este marco, se ha implementado el uso de insecticidas. El diseño de este tipo de sustancias hace que actúen indiscriminadamente sobre todas las especies de insectos, conduciendo a la disminución indeseada en el número de poblaciones de otros insectos inocuos o benéficos, al surgimiento de resistencia en los vectores y provocando impactos negativos en la salud humana. Esta situación expone la necesidad de diseñar métodos de control alternativos. Sumado a su relevancia sanitaria, *R. prolixus* es considerado organismo modelo para el estudio de procesos fisiológicos y genéticos. Debido a la centralidad de los neuropéptidos en la regulación de procesos fisiológicos, el sistema endocrino se presenta como una fuente de potenciales blancos para el diseño de nuevos insecticidas. Por lo tanto, en este trabajo se propuso identificar neuropéptidos con expresión activa en un transcriptoma de ovario de *R. prolixus*, ensamblado mediante dos enfoques: guiado por la referencia y *de novo*. Como resultado, se infirió un total de 18 neuropéptidos, siete identificados en el guiado por la referencia y 11 en el ensamble *de novo*. De los previamente identificados, se decidió validar experimentalmente uno de ellos, la *hormona adipocinética (AKH)*. Se determinó la modulación de su expresión durante la ovogénesis y el desarrollo embrionario temprano, evidenciando una marcada expresión durante en el ovario vitelogénico del triatomino. Por otro lado, se analizó su función en la ovogénesis mediante su silenciamiento génico, mediado por ARN de interferencia (ARNi). Como resultado se observó que el silenciamiento de *AKH* no afecta la oviposición ni en el desarrollo embrionario de *R. prolixus*, pero sí que cumple un rol durante el proceso de vitelogénesis, ya que afecta la expresión de *vitelogenina (Vg)* ovárica, proteína principal que presenta el vitelo de los ovocitos en desarrollo.

INTRODUCCIÓN

***Rhodnius prolixus* como organismo modelo**

Hemiptera es un orden numeroso de insectos que comprende cerca de 80.000 especies conocidas. La sinapomorfía de este grupo es la forma del aparato bucal suctopizador, con las particulares modificaciones de la mandíbula y maxila, dando lugar a la formación de dos canales abiertos: uno permite el traspaso de la saliva y el otro es utilizado para succionar savia o fluidos animales (Berenbaum, 1996). Dentro de este orden se encuentra *Rhodnius prolixus*, insecto hematófago perteneciente a la familia *Reduviidae* que es, dentro de los heterópteros, la familia que aporta mayor diversidad de especies (Schuh y Slater, 1995). Es un insecto hemimetábolo, es decir, con metamorfosis incompleta, donde su desarrollo ocurre secuencialmente de huevo a ninfa y de ninfa a adulto (Anderson, 1972). La ninfa tiene el mismo plan corporal básico que el adulto, pero se diferencian por la madurez sexual y la presencia de un par de alas más desarrolladas que caracterizan a este último. En la **Figura 1**, adaptada de Guarneri y Lorenzo, 2021, se ilustran los cinco estadios ninfales y adulto del triatomino.

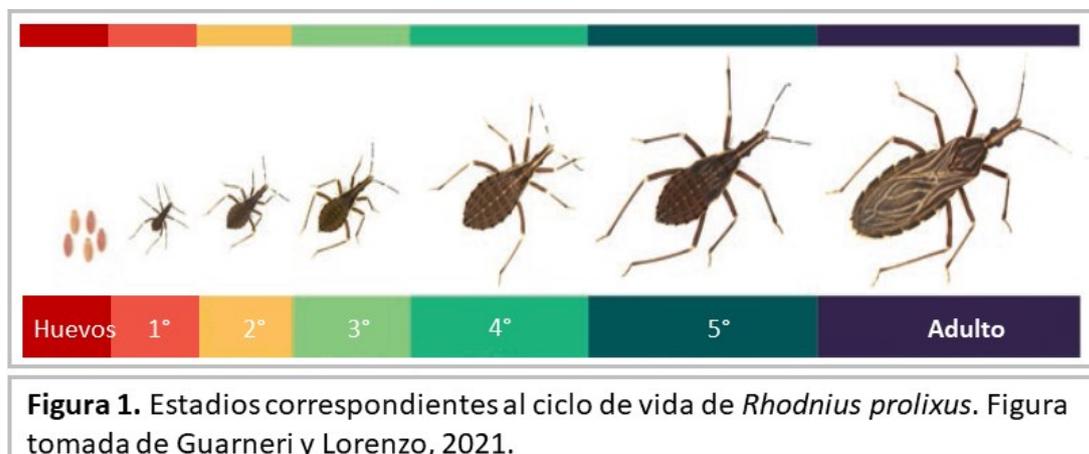


Figura 1. Estadios correspondientes al ciclo de vida de *Rhodnius prolixus*. Figura tomada de Guarneri y Lorenzo, 2021.

R. prolixus es capaz de transmitir el protozoario *Tripanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, una de las enfermedades infecciosas más importantes de las Américas, que afecta entre 6 y 7 millones de personas a nivel mundial (Chagas, 1909; Coura y Borges-Pereira, 2012). Actualmente no existen vacunas o tratamientos preventivos para la enfermedad, y las drogas disponibles solo son eficaces en la etapa aguda de la misma (Rassi *et al.*, 2010); por lo que el medio elegido para reducir el riesgo de la transmisión de la enfermedad es a través del control del vector.

Debido a su relevancia sanitaria y a su interés biológico, se considera a *R. prolixus* un organismo modelo, tanto para estudios fisiológicos como genéticos de insectos (Ons, 2017; Lange *et al.*, 2022; Pascual *et al.*, 2022). Es elegido como tal, en comparación con otros triatominos, porque es fácil de mantener y reproducir en un entorno de laboratorio, y presenta un ciclo de vida más corto. Además, el hecho de presentar un gran tamaño lo hace un sistema ideal para estudios bioquímicos, los cuales generalmente requieren una cantidad considerable de tejidos biológicos (Nunes-da-Fonseca *et al.*, 2017). A su vez, las disecciones y manipulaciones quirúrgicas se pueden realizar con relativa facilidad. Es por esto que en 1930 se estableció la primera colonia en laboratorio, lo cual fue fundamental para determinar el ciclo de vida de la especie (Buxton, 1930; Wigglesworth, 1934). Las ninfas crecen y se reproducen en condiciones controladas con un ciclo de vida de aproximadamente tres meses desde la eclosión del huevo hasta la etapa adulta.

Se han llevado a cabo investigaciones acerca de la fisiología de *R. prolixus*; las primeras fueron realizadas por Sir V.B Wigglesworth, quién reportó la existencia de un control hormonal durante la ovogénesis (Wigglesworth, 1936), así como la acumulación de proteínas extra ováricas en ovocitos (Wigglesworth, 1943), lo cual abrió paso al estudio del transporte y deposición de vitelo en los ovocitos en desarrollo en otras especies de insectos. Además, se llevaron a cabo estudios sobre el crecimiento, la producción de huevos, reproducción, ecdisis y muda, donde se evidenció que la ingesta de sangre es esencial para estos procesos fisiológicos (Valle *et al.*, 1987; Wigglesworth, 1934, 1939, 1953, 1954, 1959, 1964). Por otro lado, se llevaron a cabo estudios sobre excreción y osmorregulación, dado que la alimentación de sangre provoca rápidamente una diuresis profusa con posterioridad a la ingesta. Entre cada ingesta de sangre, el insecto debe conservar agua y por lo tanto no orina (Quinlan *et al.*, 1997). Por otra parte, se describieron las etapas que integran el desarrollo embrionario de *R. prolixus* (Kelly y Huebner, 1989; Mellanby, 1935, 1936) y se identificaron hitos clave dentro de la embriogénesis, tales como la formación de la banda germinal y los movimientos morfogénicos de la anatrepsis, cuando el embrión completamente segmentado es sumergido en el vitelo; y katatrepsis, cuando el embrión gira para adoptar su orientación final con la cabeza dirigida hacia la región anterior del huevo. Dada la relevancia de los

procesos reproductivos en insectos plaga como posible blanco para agentes de control, surgieron numerosos reportes en los cuales se describió el proceso de ovogénesis. Se estudió en profundidad la ovariola, unidad fundamental del ovario, lo cual permitió conocer en detalle la arquitectura y morfología del sistema reproductor femenino en *R. prolixus* (Huebner y Anderson, 1972a, 1972b; Lutz y Huebner, 1980; Lutz y Huebner, 1981). La estructura y tamaño del huevo obtenido tras la puesta también fueron caracterizados en esta especie (Wigglesworth, 1942).

Con el surgimiento de las nuevas tecnologías de secuenciación, fue posible redireccionar el enfoque de investigación de triatomíneos, gracias a lo cual el genoma de *R. prolixus* ha sido secuenciado (Mesquita *et al.*, 2015); y se cuenta con un número creciente de secuencias curadas y accesibles (<https://www.vectorbase.org/>), así como con el reporte de algunos análisis a nivel transcriptómico de diferentes tejidos (Medeiros *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2014; Brito *et al.*, 2018; Cardoso *et al.*, 2020; Leyria *et al.*, 2020b; Pascual y Rivera-Pomar, 2022). Esto proporciona un marco firme tanto para la identificación y anotación génica como para estudios genómicos comparativos (Lavore *et al.*, 2015; Nunes-da-Fonseca *et al.*, 2017; Traverso *et al.*, 2017). Por otro lado, el hecho de contar con su genoma secuenciado ha facilitado la identificación y caracterización de genes precursores de neuropéptidos y sus receptores (Ons *et al.*, 2009, 2011, Sterkel *et al.*, 2011, 2012, Ons *et al.*, 2016; Ons, 2017).

Sumado a las herramientas bioinformáticas, se han puesto a punto técnicas moleculares en la especie, tales como la metodología de ARN interferente parental (ARNi) (Lavore *et al.*, 2012), hibridación *in situ* e inmunohistoquímica (Pascual *et al.*, 2021), las cuales han hecho posible el estudio en detalle de los actores genéticos involucrados en procesos fisiológicos como diuresis y antidiuresis, metabolismo de lípidos, desarrollo embrionario (Lavore *et al.*, 2015), y post-embrionario (ecdisis), entre otros (revisado en Ons, 2017); incluido el proceso de ovogénesis (Medeiros *et al.*, 2011; Sedra y Lange, 2016, Lange *et al.*, 2022; Pascual *et al.*, 2021; Pascual y Rivera-Pomar, 2022).

Ovogénesis en insectos

La ovogénesis es el proceso que da lugar al desarrollo del ovocito, el cual incluye el crecimiento y diferenciación celular, la acumulación de vitelo, la formación del corion y el establecimiento de los futuros ejes embrionarios (Pascual *et al.*, 2021).

El desarrollo embrionario en insectos ocurre fuera del cuerpo materno. Por lo tanto, la supervivencia del huevo se basa en la utilización de material previamente almacenado para el crecimiento del embrión. Este material, el vitelo, está compuesto por proteínas, lípidos, azúcares y otros componentes menores, y se almacena de forma organizada en el interior del huevo. La proteína Vitelogenina (Vg), es el componente principal que conforma el vitelo. Al ser endocitada por el ovocito es modificada co- y post-transcripcionalmente, y almacenada en los ovocitos en desarrollo como Vitelina (Vn). Durante el desarrollo, el vitelo sirve como almacén nutricional y se utiliza gradualmente de acuerdo con las necesidades de las células específicas del embrión (Atella *et al.*, 2005). Por lo tanto, el desarrollo de los ovocitos en insectos depende de la acción de factores genéticos específicos, así como del estado nutricional y energético del insecto, y de señales ambientales (Lenaerts *et al.*, 2019).

Los ovarios son órganos internos compuestos de tejido somático que contienen a las células germinales que se desarrollan en ovocitos y finalmente en huevos (de Cuevas, 2005). La estructura de los mismos en los insectos es variable, dado que se trata de un grupo altamente diversificado. En general se observan dos ovarios simétricos respecto del eje longitudinal del cuerpo, cada uno de ellos formado por estructuras tubulares denominadas ovariolas, cuyo número es especie-específico. Están caracterizados por la presencia de distintos tipos celulares que acompañan y nutren al ovocito en desarrollo, y que permiten el traspaso de la información genética a la siguiente generación (Lynch y Roth, 2011).

Existen dos clases de ovarios en insectos: panoístico y meroístico. Los mismos se diferencian por la ausencia o presencia, respectivamente, de células nodrizas, las cuales proveen nutrientes y citoplasma al ovocito hasta que este alcanza la madurez (**Figura 2**) (Lynch y Roth, 2011). Dentro del tipo de ovario meroístico se diferencian los subtipos politróficos y telotróficos. En el subtipo politrófico las células nodrizas acompañan al

ovocito en desarrollo a lo largo de la ovariola; una capa de células foliculares que envuelve por completo a ambos conjuntos celulares. El subtipo telotrófico se caracteriza por la presencia de las células nodrizas en el extremo anterior de cada ovariola, las cuales actúan como fuente de ARN mensajero (ARNm) y de componentes citoplasmáticos para todos los ovocitos. Al igual que el subtipo politrófico, presenta una cubierta de células foliculares somáticas.

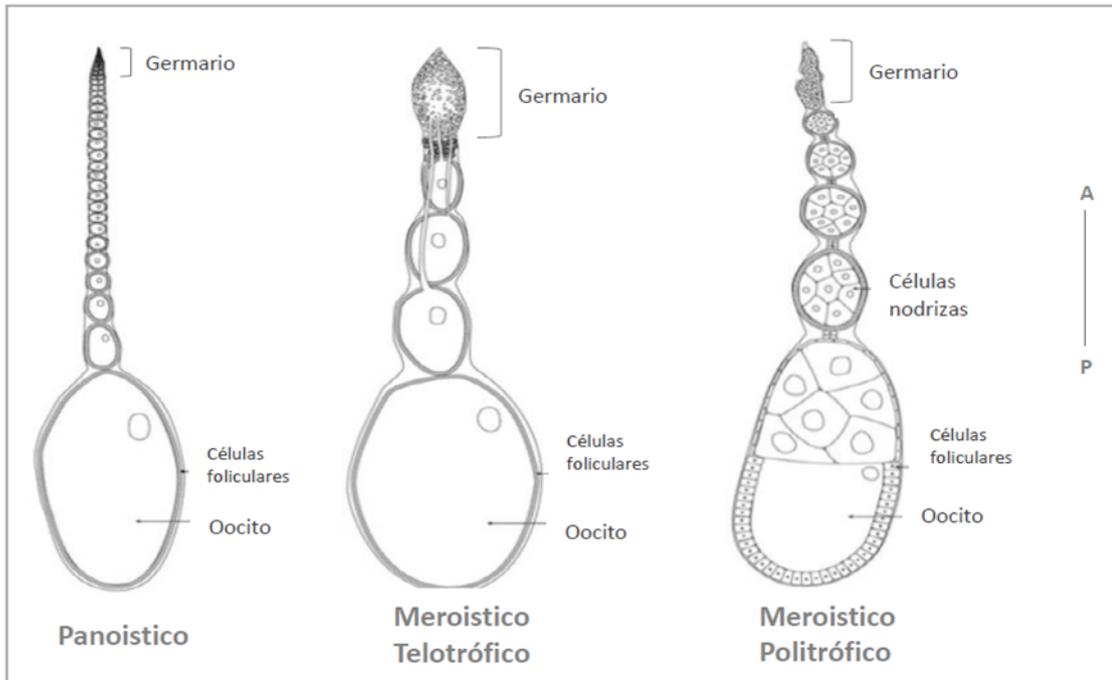


Figura 2: Estructura de las ovariolas correspondientes a tres organizaciones distintas de ovarios de insectos. De izquierda a derecha se esquematizan las ovariolas derivadas de ovarios panoísticos, telotróficos y politróficos, indicando para cada uno las distintas partes que lo componen (germario, células foliculares, células nodrizas, ovocitos en desarrollo). Referencias: A, Polo anterior; P, Polo posterior. Figura tomada de Pascual, 2019.

El tipo de ovogénesis tiene una estrecha relación con la posición evolutiva de la especie, y determina qué tipo de desarrollo embrionario da origen al plan corporal del insecto (Davis y Patel, 2002; Liu y Kaufman, 2005; Lynch *et al.*, 2011; Lynch y Roth, 2011). Los ovarios meroísticos politróficos predominan en los grupos más derivados como los holometábolos y asociados a insectos de banda germinal larga, es decir que todos los segmentos del cuerpo son especificados simultáneamente en el estadio de blastodermo (Liu y Kaufman, 2005). Los ovarios meroísticos telotróficos, por su parte, se encuentran tanto en insectos hemimetábolos como holometábolos, pero asociados con insectos de

banda germinal intermedia/corta. En ellos, sólo los segmentos anteriores son especificados en el blastodermo, mientras que los restantes son formados de manera progresiva durante una segunda fase de crecimiento de la banda germinal (Davis y Patel, 2002; Sander, 1981; Lynch *et al.*, 2011). Los ovarios panoísticos están generalizados en insectos basales, con un desarrollo embrionario mayoritariamente del tipo de banda germinal corta (Lynch *et al.*, 2011).

Las hembras adultas de *R. prolixus*, presentan un par de ovarios del subtipo telotrófico, con siete ovariolas cada uno, donde cada ovariola consta de una región anterior (germario o trofario) y una región posterior (vitelario) (Huebner y Anderson 1972a, 1972b; Lutz y Huebner 1980, 1981).

El proceso de ovogénesis consta de tres etapas principales, conocidas como previtelogénesis, vitelogénesis y coriogénesis (Medeiros *et al.*, 2011). Durante la previtelogénesis, las células foliculares transfieren citoplasma directamente a los ovocitos (Huebner y Anderson, 1972; Huebner y Injeyan, 1981; Büning, 1994). En la vitelogénesis, proceso fundamental para el correcto desarrollo del huevo, los precursores proteicos del vitelo son producidos en grandes cantidades por tejidos extraováricos, principalmente por el cuerpo graso. Dentro de los precursores generados, el primordial en el vitelo es la vitelogenina, secretada a la hemolinfa y captada por los ovocitos en desarrollo a través de endocitosis mediada por receptor (Bellés, 1998; Giorgi *et al.*, 2005; Pascual *et al.*, 2021). Una fuente complementaria de vitelogenina está a cargo de las células foliculares que rodean a los ovocitos en desarrollo (Melo *et al.*, 2000). La vitelogenina es almacenada en los ovocitos en desarrollo en organelas especializadas o cuerpos vitelínicos como vitelina, siendo así el material crudo utilizado por los embriones para completar su desarrollo (Kunkel y Nordin, 1985; Pascual *et al.*, 2021).

En insectos hematófagos se requiere tanto de un control nutricional como hormonal para activar numerosos genes esenciales, para iniciar la producción del huevo embrionado (Valle, 1993; Atella *et al.*, 2005; Raikhel, 2005). A nivel hormonal, la hormona juvenil (HJ) regula positivamente la vitelogénesis (Wigglesworth, 1936; Coles, 1965). Por un lado, activa la expresión de genes para la síntesis de proteínas precursoras

de vitelo en el cuerpo graso (Davey, 1987) y por el otro, favorece el ingreso de precursores del vitelo al ovocito en desarrollo (Davey, 2000, 2007).

Aunque el apareamiento es fundamental para estimular la vitelogénesis, se ha observado tanto para *R. prolixus* como *Triatoma infestans*, la capacidad de dar origen a huevos utilizando la sangre ingerida en el último estadio larval, facultad denominada autogenia (Davey, 1987; Mundall y Engelmann, 1977; Noriega, 1992; Stoka *et al.*, 1978).

Cuando el ovocito alcanzó el tamaño completo se da lugar al estado post-vitelogénico o coriogénico, en el cual las células foliculares producen una segunda capa celular que da origen a la capa más externa del huevo: el corion. Se caracteriza por proteger al huevo de la deshidratación, y regular la toma de oxígeno y fertilización (Beament, 1946; Huebner y Anderson, 1972b; Nunes-da-Fonseca *et al.*, 2017). Cuando el huevo ya está formado penetra en el oviducto para ser ovipuesto (Huebner y Anderson, 1972b). En este punto el huevo es de color rosado, debido a la presencia de una hemoproteína denominada proteína de unión al grupo hemo en *Rhodnius* (RHBP) que es endocitada por el ovocito vitelogénico a través de receptores, en un proceso análogo a la toma de Vg (Braz *et al.*, 2002). Debido a que el corion es transparente, es posible observar los cambios en la apariencia externa del embrión -morfología y pigmentación-, y así, monitorear su desarrollo embrionario. El huevo presenta medidas de 2 mm de largo y 1 mm de diámetro, de forma ovalada con la cara dorsal cóncava y con la presencia del opérculo en la región anterior, el cual permite emerger a la larva durante su eclosión. Esta disposición muestra la constitución de la polaridad del huevo dentro del ovario (**Figura 3**) (Pascual, 2019).

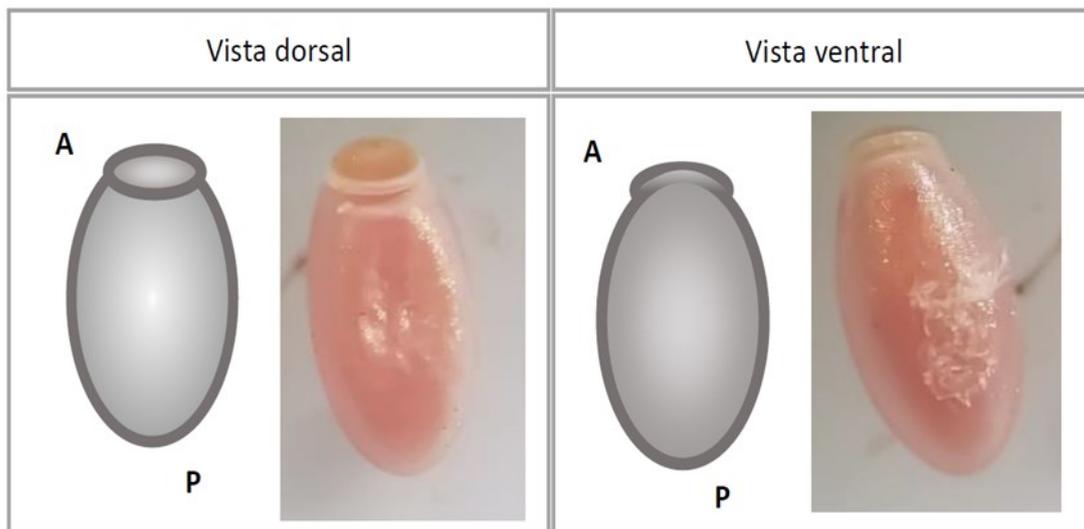


Figura 3: Morfología de la estructura del huevo de *R. prolixus*. En el panel izquierdo se representa una esquematización gráfica del huevo junto a la fotografía tomada bajo lupa estereoscópica de vista dorsal de huevo y en el panel derecho se observa lo mismo correspondiente a la vista ventral. Referencias: A, Polo anterior; P, Polo posterior.

En *R. prolixus*, se han desarrollado estudios sobre la arquitectura del ovario y el proceso de ovogénesis a nivel fisiológico (Huebner y Anderson, 1972a, 1972b; Lutz y Huebner, 1980, 1981; Huebner, 1981). A fin de conocer la regulación génica de la ovogénesis, se han llevado a cabo análisis transcriptómicos recientes que han permitido reportar la presencia de un conjunto de genes previamente no anotados en el genoma de *R. prolixus* (Coelho *et al.*, 2021). También se ha detectado la expresión de genes en el epitelio folicular de los ovocitos, y la caracterización y participación de diferentes vías regulatorias, tanto en las etapas vitelogénicas como previtelogénicas, dependiendo del estado nutricional del insecto (Leyria *et al.*, 2020b; Medeiros *et al.*, 2011). Una de las vías regulatorias más estudiadas fue la de la insulina, en la cual se identificaron diversos actores genéticos, tales como las proteínas serine/threonine-protein kinase (Akt), glycogen synthase kinase (GSK) y el factor de transcripción FoxO (Leyria *et al.*, 2020a). En relación a la genética que participa en el desarrollo del ovocito fue posible identificar un amplio repertorio génico conservado (Pascual *et al.*, 2022). Existen algunos reportes respecto a su rol durante el desarrollo del ovocito y embrionario, entre los cuales se identificó a *giant* (*gt*), *Toll* (*TI*) (Berni *et al.*, 2014; Lavore *et al.*, 2012), *Bicaudal C* (*BicC*)

(Pascual *et al.*, 2021), *cornichon (cni)* (Pascual, 2019) y *Bicaudal D (BicD)* (Pascual *et al.*, 2022).

Neuropéptidos en insectos

Los animales han desarrollado un sistema de comunicación entre sus células, que permite la coordinación de procesos fisiológicos, y de respuestas frente a estímulos internos y/o externos (Husak, 2015). Entre estas moléculas de señalización se encuentran los neuropéptidos, los cuales son liberados por exocitosis para ejercer su acción fisiológica sobre células blanco que poseen receptores específicos (Klowden, 2013). Los neuropéptidos se sintetizan como precursores, principalmente en las células endocrinas o neuronas del sistema nervioso central (SNC), aunque también lo hacen en las células neurosecretoras del tracto intestinal y otros tejidos periféricos (Nässel, 2002, Nässel y Homberg, 2006; Ewer y Reynolds, 2002). Luego, son clivados y modificados post-traduccionalmente para originar los péptidos biológicamente activos. Cada precursor puede codificar uno o varios péptidos con actividad biológica (Altstein y Nässel, 2010). Son almacenados en vesículas ubicadas en terminaciones axonales de neuronas y células endocrinas, desde donde son liberados al medio extracelular (Bendena, 2010).

Los neuropéptidos son fundamentales en la coordinación de todos los procesos fisiológicos en insectos, tales como el desarrollo, crecimiento, reproducción, metabolismo y comportamiento (Bendena 2010; Ons, 2016; Nässel y Zandawala, 2019). Por lo tanto, se ha propuesto que los neuropéptidos son objetivos interesantes como potenciales blancos para el desarrollo de nuevas estrategias de control de insectos plaga (Ons, 2017).

Neuropéptidos en el proceso de ovogénesis

Los triatomíneos presentan un control integrado del sistema reproductivo, mediante el cual diferentes tejidos trabajan con extrema precisión y coordinación para lograr una producción exitosa de descendencia. Hay tres tejidos que trabajan conjuntamente para promover la reproducción: el SNC, el cuerpo gordo y los ovarios (Leyria *et al.*, 2020b). El SNC contiene células neuroendocrinas que sintetizan los neuropéptidos. Estos actúan a

través de receptores específicos, los cuales se localizan en el cuerpo graso y en los ovarios. El cuerpo graso es un órgano multifuncional análogo al tejido adiposo y al hígado de los vertebrados. Se lo considera un centro de intercambio, que se integra con el SNC para regular el estado fisiológico del insecto, detectando las señales hormonales y nutricionales (Arrese y Soulages, 2010; Li *et al.*, 2019). Los ovarios son los responsables del desarrollo del ovocito y la formación del huevo (de Cuevas, 2005). Diferentes péptidos están implicados en la regulación de la ovogénesis de los insectos, y algunos de ellos son expresados en células ubicadas en el propio ovario (Ons, 2017, Leyria *et al.*, 2020b). En la **Figura 4**, obtenida de Lenaerts *et al.*, 2019, se ofrece una visión general de las redes peptídicas involucradas en la ovogénesis de insectos descritas hasta el momento.

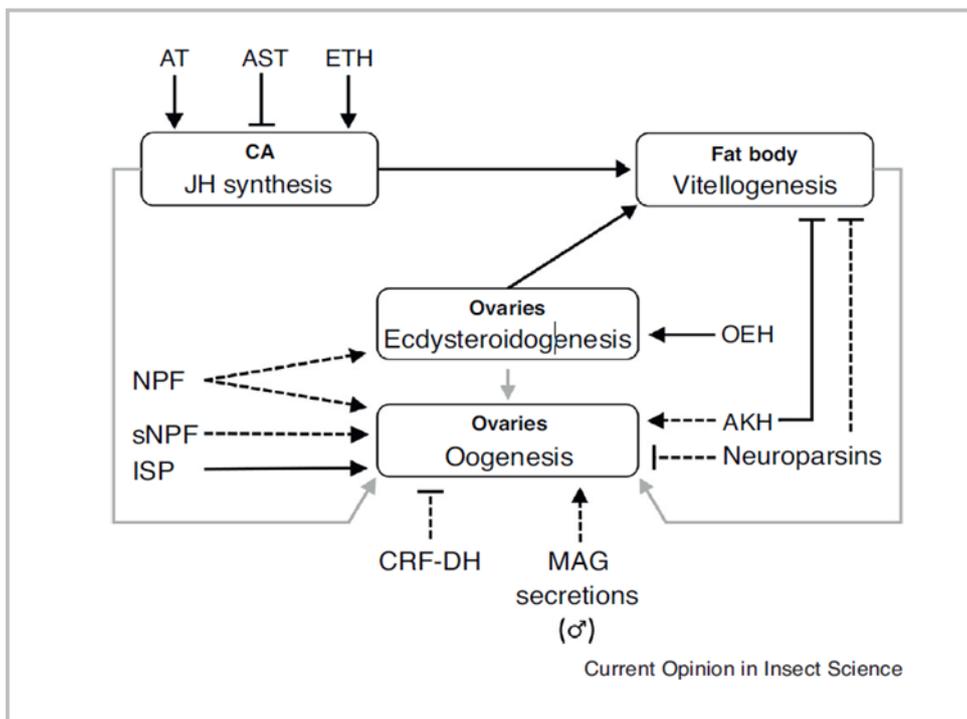


Figura 4. Visión general de la regulación peptídica de la ovogénesis (Tomado de Lenaerts *et al.*, 2019). La línea discontinua significa que no se conoce el modo de acción exacto. Las flechas grises indican la acción de las hormonas juveniles, los ecdisteroides y las vitelogeninas. Abreviaturas: AT, alatotropina; AST, alatoestatina; ETH, hormona desencadenante de la ecdisis; JH, hormona juvenil; NPF, neuropéptido F; sNPF, neuropéptido F corto; ISP, vía de señalización de la insulina; CRF-DH, hormona diurética similar al factor liberador de corticotropina; MAG, glándula accesoria masculina; OEH, hormona ovárica; AKH, hormona adipocinética.

Una de las vías más estudiadas en el proceso de ovogénesis es la red de señalización de la insulina (IPS, por su sigla en inglés). Esta vía regula diferentes etapas y proporciona una conexión entre los estados nutricionales y la reproducción (Lenaerts *et al.*, 2019). Además, se identificó un repertorio de péptidos que regulan la producción de ecdisteroides, ecdisiotropinas y ecdisioestatinas, como *ecdysiotropin* o *prothoracicotropic hormone* (PTTH) y la biosíntesis de HJ, como *allatotropin* y *allatostatin* (Gäde y Hoffmann, 2005).

En el ovario de *R. prolixus*, se logró identificar la presencia de neuropéptidos, tales como la *hormona adipocinética*, *bursicon*, *glycoprotein hormone* (GPA y GPB), *Calcitonin-like diuretic hormones* (CT/DHs), *capability* (CAPA) *peptides*, *crustacean cardioactive peptide* (CCAP), *long neuropeptide F* (LNPF), *Neuropeptide-like precursor 1* (NPLP1), *NVP-like* (NVPL), *myosuppressin*, *corticotropin-releasing factor-like peptide* (CRF/DH) y *ryamide*. Algunos de ellos fueron validados funcionalmente; por ejemplo se reportó tanto a LNPF como CRF/DH, con un rol preponderante en la dinámica de oviposición del triatomino (Sedra y Lange, 2016; Mollayeva *et al.*, 2018).

Hormona Adipocinética (AKH)

La hormona adipocinética (AKH, por su sigla en inglés *adipokinetic hormone*) es un neuropéptido producido por las células neurosecretoras (NSCs, por su sigla en inglés) del glóbulo glandular de la *corpora cardiaca* (CC) (Bendena, 2010). Se la ha asociado con el control del metabolismo energético en un gran número de especies de artrópodos debido a su papel en la estimulación de la movilización y liberación de lípidos, carbohidratos y aminoácidos (Alves-Bezerra *et al.*, 2016). Este neuropéptido ejerce sus funciones al interactuar con sus receptores específicos (AKHRs), ubicados en la membrana plasmática de las células del cuerpo graso, lo que regula la movilización de energía al estimular la lipólisis de triacilgliceroles (TAG) a diacilgliceroles (DAG) y la conversión de glucógeno en trehalosa (Lu *et al.*, 2019).

La familia de los péptidos AKH (AKHs) es un objetivo potencial para el control de insectos, ya que su principal función es regular el metabolismo de las reservas de energía. Esta intervención es útil para reducir o eliminar las actividades básicas de los insectos, como el vuelo, escape o búsqueda de alimento. En respuesta al vuelo u otras

actividades costosas en energía, las AKHs movilizan las reservas de energía desde los órganos de almacenamiento, como el cuerpo graso, a la hemolinfa (Van der Horst *et al.*, 2001; Gade y Auerswald, 2003).

En *R. prolixus*, el gen precursor de AKH, *Rp-AKH*, codifica un péptido central y un péptido espaciador (Ons *et al.*, 2011); se expresa principalmente en células neurosecretoras de la CC, aunque también se detectó su expresión en el transcriptoma de ovario (Alves-Bezerra *et al.*, 2016; Patel *et al.*, 2014; Zandawala *et al.*, 2015b; Pedro L. Oliveira *et al.*, http://rhodnius.iq.ufrj.br/index.php?option=com_content&view=article&id=22&Itemid=34; identifier rp_asb-50392). Estudios *in vivo* con la administración del péptido sintético (Patel *et al.*, 2014) y silenciamiento génico (Alves-Bezerra *et al.*, 2016; Zandawala *et al.*, 2015b) indicaron un rol de *Rp-AKH* en la movilización de lípidos del cuerpo graso hacia la hemolinfa.

El receptor de AKH fue identificado en el genoma de *R. prolixus* mediante enfoques bioinformáticos y moleculares (Ons *et al.*, 2016; Alves-Bezerra *et al.*, 2016); perteneciente a la familia A de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Se reportó su expresión en distintos tejidos, tales como el cuerpo graso, vaso dorsal, SNC y ovario (Zandawala *et al.*, 2015b). Si bien se desconoce en detalle el papel de AKH en la fisiología reproductiva de *R. prolixus*, se determinó el papel de este neuropéptido en el transporte de trehalosa desde y hacia los ovarios, dependiente del estado nutricional del insecto (Leyria *et al.*, 2021b).

En el presente trabajo se propuso realizar la identificación génica de los precursores de neuropéptidos que se expresan en los ovarios vitelogénicos de hembras adultas de *R. prolixus* mediante el análisis de una base de datos transcriptómica. Consideramos que la expresión de neuropéptidos en el ovario es un indicio de su probable papel en la regulación de la ovogénesis.

Entre los genes identificados en ovario se seleccionó AKH a fin de estudiar su nivel de expresión durante las distintas etapas de la ovogénesis y el desarrollo embrionario temprano. En suma, se realizó el silenciamiento transcripcional del gen mediante la técnica de ARN interferente (ARNi), y se evaluó la incorporación de vitelo y estructura

del ovario en hembras adultas. Los resultados pudieron permitir una mejor comprensión de la regulación del proceso reproductivo en una especie de relevancia vectorial en la enfermedad de Chagas y modelo de estudio en fisiología de insectos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los neuropéptidos que se expresan en ovarios presentan un papel central en la regulación endocrina de la ovogénesis en *R. prolixus*.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el rol de los neuropéptidos involucrados en el proceso de ovogénesis y desarrollo temprano en *R. prolixus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar neuropéptidos en un transcriptoma de ovario vitelogénico de *R. prolixus*.
- 2) Estudiar la dinámica de expresión de la hormona adipocinética (*AKH*), durante la ovogénesis y subsecuente desarrollo embrionario.
- 3) Estudiar la función de *AKH* en la ovogénesis y desarrollo temprano en *R. prolixus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Mantenimiento de la colonia de *R. prolixus*.

Los ejemplares utilizados durante este trabajo se obtuvieron de una colonia establecida en el Centro de Bioinvestigaciones (CeBio)(UNNOBA-CICBA). Se mantuvieron en condiciones controladas, a una temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, una humedad relativa de 70%, y con fotoperiodo regulado (luz/oscuridad de 12:12 horas (h)). Los ejemplares fueron alimentados *ad libitum*, con aves de corral, de manera regular cada 15 días. Para la oviposición es requerimiento *sine qua non* la alimentación. Una vez alimentados los ejemplares demoran aproximadamente una semana para iniciar la puesta; en estas condiciones controladas, la duración de la embriogénesis es de 14 ± 1 días.

2. Búsqueda por similitud de secuencia

Se llevó a cabo una búsqueda *in silico* de genes precursores de neuropéptidos utilizando el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990), específicamente BLASTx, en un transcriptoma de ovario en estado vitelogénico del insecto triatomino *R. prolixus*, ensamblado en el laboratorio, mediante dos enfoques diferentes: guiado por la referencia (Pascual y Rivera-Pomar, 2022) y *de novo* (Pascual y Rivera-Pomar; datos no publicados). Para efectuar dicha búsqueda se generó una base de datos conformada por 65 secuencias aminoacídicas, reportadas en el triatomino en estudio, y en otras especies como *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster* y *Tribolium castaneum*. El parámetro establecido como punto de corte para la obtención de los mejores *hits* en el BLAST fue un *e-value* $\geq 10\text{E-}5$. Las identidades inferidas a partir del ensamble *de novo*, fueron corroboradas tras una búsqueda puntual manual. Las predicciones proteicas de cada uno de los transcriptos inferidos (Translate Tool (ExPASy)), fueron consultadas de manera individual mediante una nueva búsqueda por similitud de secuencia, contra la base de datos no redundante de proteínas (Versión 2018) disponible *online* en NCBI.

3. Análisis de dominios y alineamientos múltiples

Se realizó un análisis de dominios y sitios conservados de las predicciones proteicas provenientes del ensamble *de novo* utilizando la plataforma *InterProScan* (Jones *et al.*, 2014); y el algoritmo Clustal Ω (Sievers y Higgins, 2014). Para este último se incluyeron

en el alineamiento múltiple secuencias de otras especies como dípteros y coleópteros (Suplementario 1).

4. Disección de tejidos

Según el experimento las muestras se obtuvieron de diferentes tejidos y/o condiciones. Para validar la expresión de *AKH* en el ovario de *R. prolixus* mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Mullis, 1990), específicamente PCR con transcripción reversa (RT-PCR), se utilizó un total de seis hembras adultas apareadas con machos, sometidas a diferentes condiciones nutricionales: tres hembras sin alimentar (referente al estado previtelogénico de la ovogénesis) y tres alimentadas (referente al estado vitelogénico de la ovogénesis), las cuales fueron empleadas para la remoción de sus ovarios al cabo de siete días post ingesta de sangre.

Para el análisis de expresión génica de *AKH* durante la ovogénesis y desarrollo embrionario temprano, se efectuó una PCR cuantitativa con transcripción reversa (qRT-PCR). Se recolectaron huevos a distintos momentos del desarrollo embrionario (0, 12, 24 y 48 horas post oviposición (*hpo*)); y huevos ovipuestos por hembras vírgenes (huevos no fertilizados (NF)), donde en cada tiempo se colectaron un total de 75 huevos. Para su respectiva colecta, se vaciaron de huevos los frascos con insectos y se dejaron durante el tiempo de incubación estipulado. Al cabo de ese tiempo se colectaron los huevos depositados, representado estadísticamente una cohorte que continuó el desarrollo hasta el tiempo indicado en cada caso para permitir una sincronización de los huevos dentro de +/- 3 h. Por otro lado, se identificaron diez hembras adultas, las cuales fueron utilizadas para la remoción de sus ovarios en la etapa vitelogénica.

Para la modulación génica mediante qRT-PCR, un total de 18 hembras adultas vírgenes fueron silenciadas para *AKH* y como contraparte, 18 hembras adultas vírgenes control inyectadas con β -lactamasa (β -*lac*), y alimentadas a los dos días post-inyección. Sus ovarios fueron disectados a distintos tiempos post-alimentación, uno (T0) y siete (T7) días post ingesta de sangre, a fin de abarcar diferentes momentos del proceso de ovogénesis.

Los huevos fueron almacenados inmediatamente en nitrógeno líquido (-198,5 °C), mientras que los ovarios se almacenaron en TRIzol (Thermo Fisher), en tubos *ependorf* a -20°C hasta su utilización.

Para la técnica de inmunohistoquímica con fluorescencia, se disectaron los ovarios de seis hembras silenciadas para *AKH* y seis hembras control a los siete días post ingesta de sangre; los mismos se procesaron y fijaron según el protocolo establecido para la especie (Pascual *et al.*, 2021).

Cabe aclarar que, independiente al experimento planteado, los ovarios fueron removidos manualmente en placas de disección con pinzas de disección *Dumont* N°5, en medio PBS 1X.

5. Extracción de ARN y generación de ADN copia (ADNc)

La extracción de ARN se llevó a cabo de la misma manera para todas las actividades planteadas, utilizando el reactivo TRIzol, siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se tomaron 0.5 µl del ARN total y se evaluó su integridad mediante una corrida electroforética utilizando gel de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio (BrEt) durante 45 min a 90V, dicho ARN se sembró conjuntamente al marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb (Productos Bio-Lógicos (PB-L)). La visualización se realizó mediante la exposición a la luz UV en un transiluminador con cámara acoplada (InGenius, Syngene) y la digitalización de las imágenes se hizo a través del software GeneSys V1.4.6.0 (Syngene). La cuantificación de su concentración fue a partir de la utilización del paquete de procesamiento de imágenes FIJI (Schindelin *et al.*, 2012). Un µg y medio del ARN total fue tratado con ADNasa (TransGen Biotech) por 30 min a 37°C y luego 10 minutos con EDTA a 65°C para inactivar la ADNasa. Un µg de dicho ARN fue empleado para la síntesis de ADN copia (ADNc) mediante la reacción de retrotranscripción, utilizando el *kit TransScript*® Reverse Transcriptase [M-MLV, RNasa H-] (TransGen Biotech) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

6. Diseño de oligonucleótidos específicos

Se diseñaron oligonucleótidos (oligos) específicos para validar la expresión del gen *AKH*. Se utilizó la herramienta *online* Primer3Plus (Rozen y Skaletsky, 2000), teniendo en cuenta parámetros referentes a la temperatura de *melting*, contenido de GC e hibridación inespecífica de bases; además, se evaluó su potencial de amplificación utilizando la herramienta bioinformática PCR Primer Stats (Stothard, 2000). Los oligos específicos para la metodología de ARN interferente (ARNi) contenían en su extremo 5' una secuencia de 23 nucleótidos del promotor de la transcripción dependiente de la polimerasa del fago T7 (TAATACGACTCACTATAGGG), la cual es necesaria para la posterior reacción de transcripción con T7 polimerasa. Los oligos empleados para validar *Vg* fueron tomados de Leyra *et al.*, 2020b. Las secuencias de los oligos diseñados para las reacciones de RT-PCR, qRT-PCR y ARNi se detallan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Oligos específicos utilizados para la obtención de los amplicones. La secuencia de los oligos se encuentra escrita con sentido 5' a 3'.

Transcripto	Oligos		Uso
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	
<i>AKH-1</i>	TTTCATTACACCCTCGCACA	CCTCCGTTTTTCCCACTC	RT-PCR + ARNi
<i>AKH-2</i>	CCGACTGGGGTAAGAGATCA	CCTCCGTTTTTCCCACTC	qRT-PCR
<i>Vg</i>	TTGCTAGTCGCATGAACCTG	TTTAGTGGTGCATCGCTCTG	qRT-PCR

7. Validación de la expresión génica por RT-PCR

Se realizó la amplificación de una región de 204 pares de bases (pb) correspondiente a *AKH* mediante RT-PCR. En dicha reacción se utilizaron como molde los ADNc generados anteriormente, provenientes tanto de ovario en estado vitelogénico como previtelogénico.

La mezcla de reacción se compuso por: *buffer* de reacción (1X), Cl₂Mg (50mM), dNTPs (25 µM), oligo *forward* (10mM), oligo *reverse* (10mM), taq ADN pol 1U, un rango de concentración de 20 a 30 ng del molde generado y agua estéril ultrapura. La enzima

para realizar dicha amplificación corresponde al *kit* TAQ Pegasus (Productos Biológicos®)

Se utilizó como programa de amplificación un ciclo de 1 min a 95°C, 35 ciclos (30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C y 30 seg a 72°C); y 5 min a 72°C, llevado a cabo en un termociclador ESCO modelo Aeris™. Como control negativo se realizaron reacciones sin ADNc. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñidos con BrEt. La visualización de los amplicones, se realizó mediante la exposición a la luz UV en un transiluminador con cámara acoplada y la digitalización de las imágenes se hizo a través del software GeneSys.

Para corroborar su identidad, el amplicón obtenido se envió a secuenciar a MACROGEN (Macrogen Inc., Corea del Sur) (**Suplementario 2**).

8. Evaluación de la expresión génica por PCR cuantitativa (qRT-PCR)

Se llevaron a cabo dos reacciones independientes; en la primera se evaluó la dinámica de expresión de *AKH* en el proceso de ovogénesis y distintos momentos del desarrollo embrionario temprano. La segunda reacción consistió en medir la modulación de *Vg* a partir de dos moldes de ovario (silenciados para *AKH* (2 µg) y control), provenientes de uno (T0) y siete (T7) días post-ingesta de sangre.

Las reacciones se realizaron por triplicado en un volumen final de 10 µl de la siguiente manera: (i) 95°C durante 10 min; (ii) 95°C durante 15 segundos; (iii) 55°C durante 30 segundos; (iv) 72°C durante 45 segundos; (v) etapas (ii) a (iv) durante 35 ciclos. El nivel de expresión génica se cuantificó utilizando SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) en un sistema de PCR en tiempo real CFX96 (BIO-RAD). Como controles negativos se realizaron reacciones sin ADNc, para determinar contaminación o la formación de dímeros. Se llevó a cabo un análisis de curvas de *melting* para confirmar que solo se amplificó un único producto para cada reacción. Se usó la proteína ribosómica 60S L13a (*RPL-13A*) y α -tubulina (*α -tub*) como genes de referencia.

La expresión de los genes de interés en las diferentes condiciones (control vs silenciados) se cuantificó mediante el método comparativo de Cts de Pfaffl,

considerando las eficiencias de amplificación de los distintos pares de oligos (Pfaffl, 2001). El análisis de expresión a lo largo de los diferentes estadios del desarrollo embrionario y ovogénesis se realizó siguiendo el protocolo detallado en Pascual *et al.*, 2021.

9. Silenciamiento génico por ARNi

Se llevó a cabo un estudio funcional de AKH mediante la técnica de silenciamiento génico por ARNi, previamente implementada con éxito en nuestro laboratorio para estudios en la especie (Lavore *et al.*, 2012; Wulff *et al.*, 2017, 2018; Capriotti *et al.*, 2019; Sterkel *et al.*, 2019, Pascual *et al.*, 2021).

El ADN producto de la RT-PCR, fue empleado como molde para una reacción de transcripción con T7 polimerasa (TransGen Biotech), tratada luego con ADNasa libre de ARNasas (TransGen Biotech). El ARN doble cadena (ARNdc) específico resultante fue inyectado a distintas concentraciones en hembras adultas vírgenes de *R. prolixus* (7 ejemplares con 1 µg y 5 con 2 µg), con una jeringa Hamilton a fin de inducir el silenciamiento. El gen β -lac fue amplificado a partir del plásmido pRSETb y se encuentra ausente en el genoma de *R. prolixus* (Araujo *et al.*, 2007). Se realizó el mismo procedimiento para el grupo control con 1.8 µg de ARNdc ^{β -lac}, en un total de 6 ejemplares.

Las hembras fueron alimentadas con sangre para inducir la ovogénesis y luego agrupadas con machos para estimular la cópula; así, al cabo de siete días post ingesta se comenzaron a colectar los huevos ovipuestos cada 48 h para evaluar la puesta de huevos y eclosión. En los casos que fue necesario, los huevos fueron fijados y teñidos con DAPI, según el protocolo establecido en Pascual *et al.*, 2021.

10. Evaluación de fenotipo a nivel del ovario

Se estudió la morfología del ovario mediante la tinción con DAPI y la toma de vitelo por parte de los ovocitos de *R. prolixus* de hembras control y silenciadas con 2 µg de ARNdc^{AKH}, mediante la técnica de qRT-PCR e inmunohistoquímica con fluorescencia, en los tiempos mencionados anteriormente.

Inmunohistoquímica con fluorescencia

La técnica se desarrolló tal como se detalla en Pascual *et al.*, 2021. En resumen, se utilizaron ovarios de *R. prolixus* previamente fijados, los cuales se lavaron con PBX e incubaron con solución de bloqueo. Se incubaron con un anticuerpo primario anti-Vitelina (anti-Vn). Se realizaron lavados extensos y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo del subtipo IgG acoplado al fluoróforo Alexa 568 (Invitrogen, Life Technologies). Se realizaron lavados y se incubó durante 20 min con una solución de glicerol 50% con 0.1 µg/ml DAPI. Para la visualización y captura de imágenes se utilizó el microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Imager.A2.

Análisis estadístico

Para las comparaciones entre más de dos grupos experimentales, se utilizó la prueba de Kruskal-Whallis (ANOVA). En el caso del análisis de la expresión de *Rp-AKH* se realizó una corrección *post-hoc*. Los datos se graficaron como media ± SEM (error estándar de la media). Todos los análisis y representaciones gráficas se llevaron a cabo utilizando el software estadístico GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software, CA, USA, www.graphpad.com). Se consideraron significativos los valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. Identificación de neuropéptidos en el ovario de *R. prolixus*

Como resultado de la búsqueda por similitud de secuencia, se infirió la identidad de un repertorio de neuropéptidos en el ovario de *R. prolixus*, el cual mostró ciertas discrepancias dependiendo de la estrategia de ensamblaje empleada. En comparación al transcriptoma guiado por la referencia donde se identificaron siete transcritos, en el obtenido por ensamblaje *de novo* se logró inferir la identidad de 11 transcritos nuevos, los cuales no presentaban anotación previa en el genoma del triatomino. A su vez, todos los transcritos identificados en el mapeo a la referencia fueron también identificados en el mapeo *de novo*; por lo que este análisis permitió conocer un repertorio de 18 neuropéptidos totales expresados en el ovario (**Tabla 2**).

En el ensamblaje *de novo*, se identificaron 11 nuevos neuropéptidos previamente no reportados en el ovario: *AKH/corazonin*, *Allatostanin-A*, *Allatropin*, *Corticotropin*, *Insuline related peptide 1*, *Long Neuropeptide F*, *Myosupresin*, *Neuroparsin*, *Short Neuropeptide F*, *Sulfakinin* y *Tackykinin*. Todos ellos presentaron altos porcentajes de identidad, entre 89% y 100%. Tres de los neuropéptidos identificados en el mapeo a la referencia, *NVP-like*, *Orcokinin-A* y *RhoprIDLRF*, no pudieron ser ensamblados mediante el enfoque *de novo*.

Tabla 2. Neuropeptidos identificados en el ensamble guiado a la referencia y de novo. Para cada transcripto se detalla la longitud en pares de bases y características del BLASTx. *: Neuropeptido no identificado.

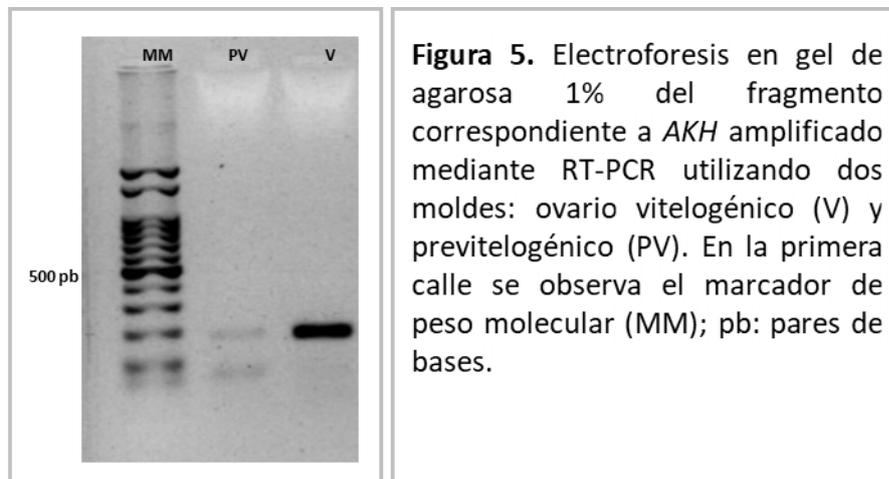
Neuropeptido	Ensamble guiado a la referencia			BLASTx			Ensamble de novo			BLASTx		
	ID	Longitud	% identidad	Longitud hit	e-value	ID	Longitud	% identidad	Longitud hit	e-value		
Adipokinetic_Hormone_Isoform_A-KM283242	RPRC000416-RA.	216	100	71	5.55e-52	TRINITY_DN1492_c0_g1_i1	213	100	71	1.03E-51		
Adipokinetic_hormone/Corazonin_related_Peptide-KM975505	*	*	*	*	*	TRINITY_DN5578_c0_g1_i1	438	100	127	1.61E-83		
Allatostatin_A-GQ856315	*	*	*	*	*	TRINITY_DN37084_c0_g1_i1	633	100	203	2.93E-151		
Allatostatin-CC	RPRC000300-RA.	354	100	118	2.02e-88	TRINITY_DN615_c0_g1_i5	354	100	118	4.25E-87		
Allatropin-GQ162783	*	*	*	*	*	TRINITY_DN68097_c0_g1_i1	354	100	118	4.89E-62		
Corticotropin_releasing_factor-like_protein-ADM26617/HM153808	*	*	*	*	*	TRINITY_DN202769_c0_g1_i1	99	100	33	4.70E-22		
Crustacean_cardioactive_peptide-GQ888668	RPRC000466-RA.	390	98.36	122	1.33e-89	TRINITY_DN1993_c0_g1_i1	204	100	78	9.57E-52		
FaLP	RPRC014988-RA.	822	100	193	1.59e-142	TRINITY_DN236031_c0_g1_i1	552	100	192	5.02E-139		
Insect_Kinin-BK007870	RPRC000022-RA.	1197	100	134	3.92e-77	TRINITY_DN58193_c0_g1_i1	111	89.74	39	2.52E-20		
Insuline_related_peptide_1_GU230850	*	*	*	*	*	TRINITY_DN1177_c0_g1_i1	756	98.70	154	1.38E-103		
Long_Neuropeptide_F	*	*	*	*	*	TRINITY_DN235221_c0_g1_i1	156	100	52	1.47E-34		
Myosupresin	*	*	*	*	*	TRINITY_DN22948_c0_g1_i2	159	96.23	53	1.30E-31		
Neuroparsin-GU207864	*	*	*	*	*	TRINITY_DN103942_c0_g1_i1	45	100	31	5.76E-18		
Neuropeptide_like_precursor_1-GU207865	RPRC011668-RA.	1365	100	436	0	TRINITY_DN8542_c0_g1_i5	1314	100	436	0		
Ryamide	RPRC000461-RA.	369	100	107	7.86e-67	TRINITY_DN3751_c0_g1_i1	369	100	107	1.23E-66		
Short_neuropeptide_F-GQ452380	*	*	*	*	*	TRINITY_DN73641_c0_g1_i2	267	98.85	87	9.48E-64		
Sulfakinin-GQ162784	*	*	*	*	*	TRINITY_DN5394_c0_g1_i9	387	100	92	4.97E-60		
Tackykinin-GQ162785	*	*	*	*	*	TRINITY_DN295866_c0_g1_i1	87	100	23	9.41E-12		

A pesar del amplio repertorio génico identificado, no fue posible identificar en el transcriptoma de ovario, bajo ninguna de las estrategias de ensamblaje empleadas: *AKH-B*, *Bursicon*, *Calcitonin-likediuretic hormone*, *Cardioacceleratory peptide*, *CNMamide*, *GPA2*, *Insuline related peptide*, *Ion transport peptide*, *Proctolin*, *SIF-amide*.

2. Análisis de expresión de *AKH*

2.1. Validación de expresión génica por RT-PCR

Tras la identificación de neuropéptidos, se prosiguió a validar la expresión de uno de ellos, *AKH* (RPRC000416-RA), mediante la técnica de RT-PCR. Se logró amplificar el fragmento correspondiente al gen de interés, el cual presentó el tamaño esperado. La expresión de dicho neuropéptido pudo identificarse tanto en el ovario previtelogénico como vitelogénico; además debido a que se partió de una misma concentración de molde, se puede afirmar una mayor presencia en este último, como consecuencia de la mayor intensidad de la banda observada (**Figura 5**).



2.2. Dinámica de expresión de *AKH*

Tras el análisis mediante qRT-PCR, se logró conocer la dinámica de expresión del neuropéptido *AKH* en los estados de ovario vitelogénico, huevo no fertilizado (NF) y estadios iniciales del desarrollo embrionario, abarcando desde cigoto hasta formación de la banda germinal. La mayor expresión se observó en el ovario vitelogénico. No se detectó expresión de *AKH* en huevos NF y cigoto, por lo que pudimos confirmar que no

es un gen de expresión materna. A medida que tiene lugar el avance del desarrollo embrionario fue posible identificar una leve expresión cigótica en los huevos ovipuestos a las 12, 24 y 48 *hpo* (**Figura 6**). Únicamente la expresión de *AKH* en el ovario vitelogénico es estadísticamente significativa, respecto a NF y *0hpo*.

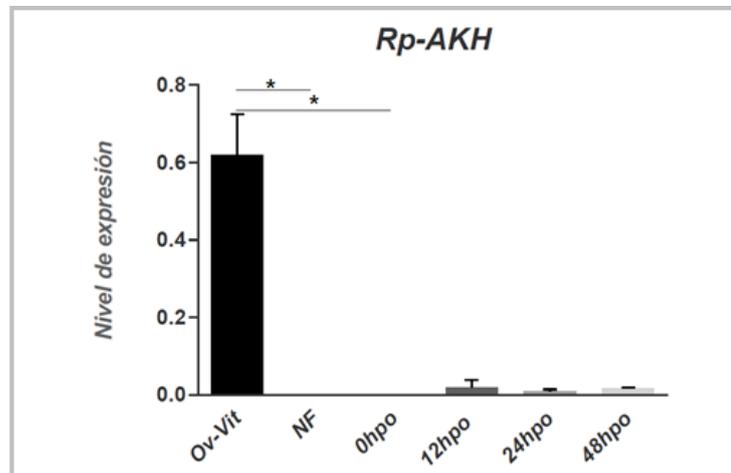


Figura 6. qRT-PCR de la expresión de *AKH*. El eje Y representa la expresión relativa al gen de referencia. El eje X representa los **momentos** de ovario vitelogénico (Ov-Vit), huevo no fertilizado (NF), huevo ovipuesto al tiempo 0 (*0hpo*), 12 (*12hpo*), 24 (*24hpo*) y 48 (*48 hpo*). * $p < 0.05$.

3. Silenciamiento génico

En primer lugar, se buscó descifrar si la oviposición y el subsecuente desarrollo del embrión se encontraban afectados luego de la administración de ARNdc específico.

Las hembras silenciadas tras la administración de ARNdc con la menor dosis (1 μ g) pusieron 218 huevos, mientras que las inyectadas con 2 μ g pusieron 182 y el grupo control un total de 256 huevos. (**Figura 7A-B**). No se encontraron diferencias significativas en el número de huevos ovipuestos entre los grupos silenciados y el grupo control.

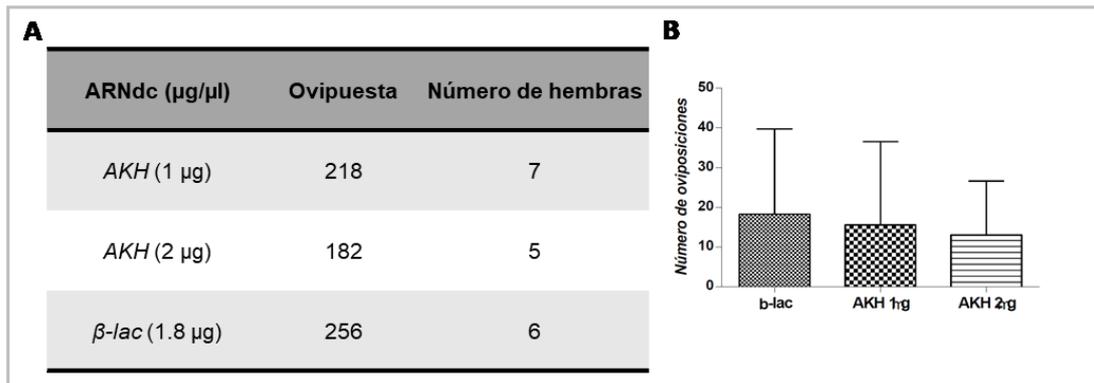


Figura 7. Ovipuesta tras el silenciamiento génico. A. Número de huevos ovipuestos por los tres grupos de hembras (interferidas y control). B. El eje Y representa la media del número de oviposiciones y el eje X representa los grupos control ($\text{ARNdc}^{\beta\text{-lac}}$) y los interferidos con distintas concentraciones de $\text{ARNdc}^{\text{AKH}}$ (1 y 2 μg).

Por otro lado, se evaluó si se completaba la embriogénesis de los huevos ovipuestos por los tres grupos, tanto para evaluar si estaban embrionados como si se producían defectos en el desarrollo embrionario y/o la eclosión. Para ello, y gracias a que el corion de los huevos es translúcido, se pudo monitorear el desarrollo bajo lupa, durante el periodo correspondiente a la embriogénesis (14 días). Como resultado principal, se observó que la mayoría de los huevos alcanzaron su estado ninfal, completando el proceso de embriogénesis correctamente. Un subgrupo no completó dicho proceso debido a fallas en la eclosión o en el desarrollo del embrión, evidenciado por la presencia de células con pigmentación irregular o por la ausencia de pigmentación rosada típica correspondiente a las células embrionarias (**Figura Supl3A**) En estos últimos, se corroboró la ausencia de embrión a partir de un análisis del patrón nuclear (**Figura Supl3B**). Más allá de esos embriones que no alcanzaron el estado ninfal, la viabilidad de los huevos silenciados no se vio alterada, ya que no se encontraron diferencias significativas entre el número de huevos eclosionados de este grupo y el control.

4. Morfología del ovario y toma de vitelo

Se prosiguió a analizar la estructura del ovario y el proceso de vitelogénesis en los diferentes grupos inyectados. Para ello se fotografiaron bajo lupa ovarios de *R. prolixus* y se llevaron a cabo tinciones con DAPI y anticuerpo anti-Vn mediante la técnica de inmunohistoquímica con fluorescencia.

4.1. Descripción de la estructura del ovario de *R. prolixus*.

No se observaron diferencias en la morfología de los ovarios provenientes de hembras silenciadas y control. También, se mantuvo tanto el número como la forma de las ovariolas.

Para evaluar con mayor detalle, se decidió analizar el patrón nuclear de las células que componen a las ovariolas. El silenciamiento de *AKH* no alteró la morfología de las ovariolas (**Figura 8A, B, D y E**). Además, se analizó la distribución regular de los núcleos que componen el epitelio folicular en los ovocitos avanzados y no se evidenciaron diferencias respecto al control (**Figura 8C y F**).

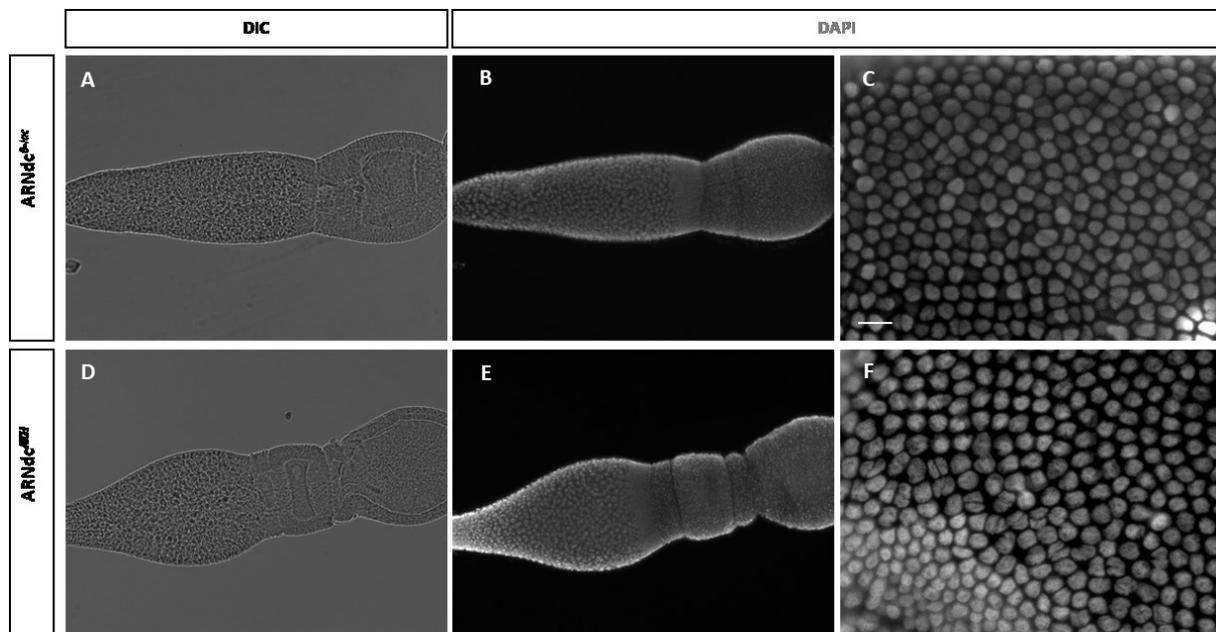


Figura 8. Estructura del ovario de *R. prolixus*. En el panel superior (A-C) se observan ovarios control. En el panel inferior (D-F) se observan los ovarios de hembras silenciadas para *Rp-AKH*. Las figuras A y D muestran la ovariola obtenida utilizando microscopía de contraste diferencial interferencial (DIC). C y F. Estructura del epitelio folicular de ovocitos vitelogénicos. Escala: 100 μ m (A, B, D y E); 20 μ m (C y F).

4.2. Acumulación de vitelogenina/vitelina durante la ovogénesis

Se evaluó la dinámica de expresión de *Rp-Vg* en ovarios en estado vitelogénico de hembras silenciadas ($ARNdc^{AKH}$) y hembras control ($ARNdc^{\beta-lac}$), a diferentes tiempos luego de la ingesta de sangre (**Figura 9**). En el grupo control, el transcripto correspondiente a *Rp-Vg* está aumentado a los 7 días post ingesta, tal como era de esperarse de acuerdo a su rol durante la vitelogénesis. En cambio, en el grupo silenciado para *AKH* (2 μ g) la expresión de vitelogenina al día 7 post ingesta se encontró significativamente disminuida (**Figura 9**).

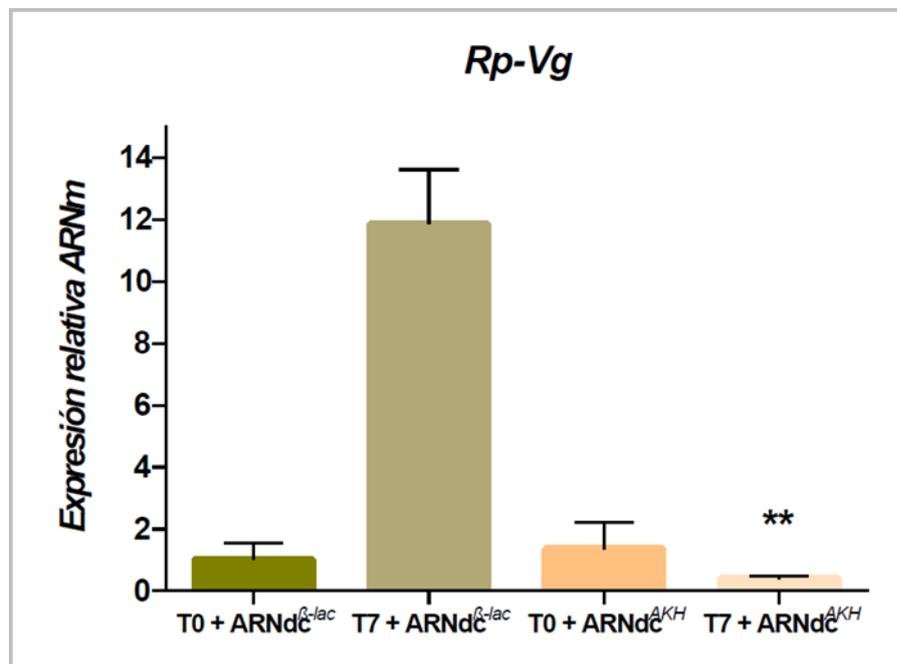


Figura 9. qRT-PCR de la expresión de *Rp-Vg*. El eje Y representa la expresión relativa al gen de referencia. El eje X representa los grupos analizados (silenciados y control), a distintos tiempos post-ingesta de sangre (T0 y T7). ** $p < 0.001$.

Se estudió la toma de vitelo por parte de los ovocitos vitelogénicos, mediante el anticuerpo Anti-Vg. En la **Figura 10**, se visualiza la distribución de la proteína Vg en las ovariolas, provenientes tanto de hembras silenciadas como control.

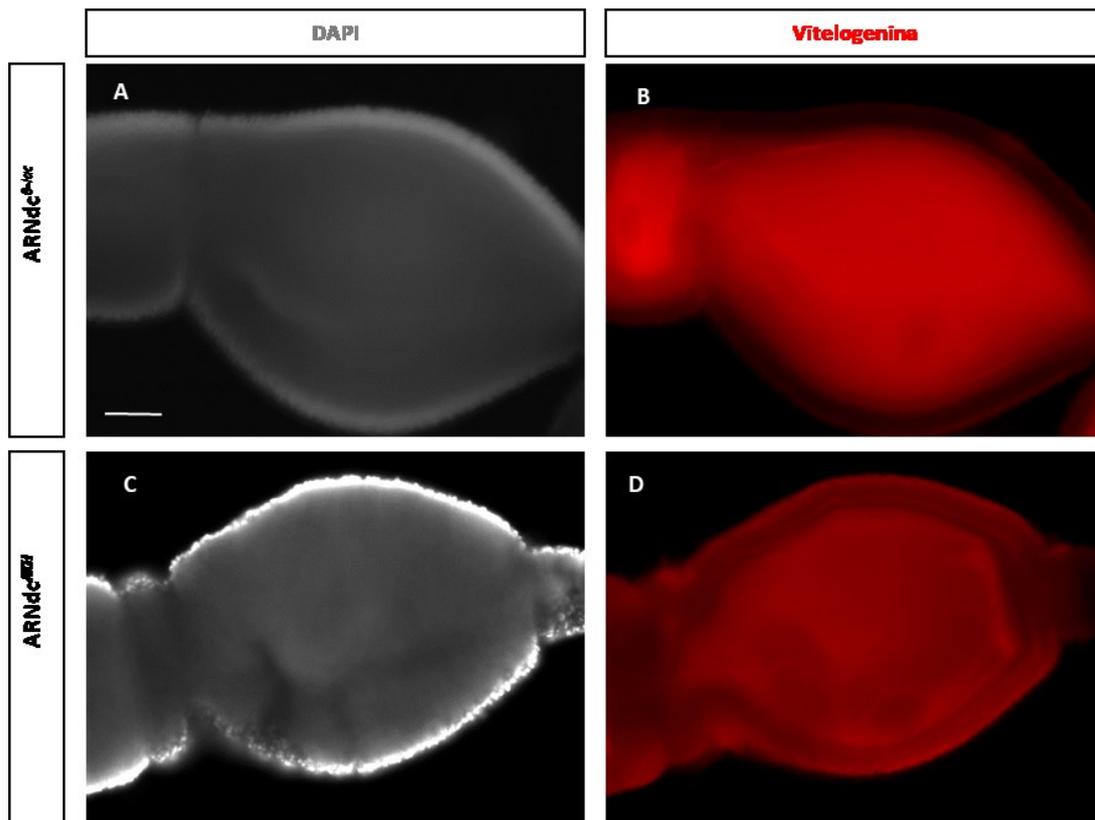


Figura 10. En el panel superior se observan ovocitos correspondientes a las hembras control (A-B) y en el inferior se visualizan los ovocitos de hembras silenciadas para *AKH* (C-D). Ambas imágenes obtenidas utilizando microscopía de fluorescencia. En las imágenes A y C se visualiza el ovocito en estado vitelogénico teñido con DAPI (ADN), mostrando los núcleos correspondientes a las células foliculares que rodean a los ovocitos en el vitelario. En las imágenes B y D se visualiza la localización de la proteína vitelogenina. Escala: 50 μ m.

Se detectó presencia de la proteína en todos los ovocitos vitelogénicos, con una marcada distribución en el lado apical de las células foliculares, y con una distribución homogénea en el interior de los ovocitos. En comparación al control, el lado apical de las células foliculares mostraron una mayor detección de señal, como consecuencia de la localización proteica, proveniente de una fuente extra ovárica.

DISCUSIÓN

Rhodnius prolixus, además de ser un organismo modelo de estudio en fisiología de insectos, posee importancia debido a su capacidad para transmitir el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Los insecticidas se han convertido en una estrategia exitosa para controlar poblaciones de insectos perjudiciales. Sin embargo, su uso en áreas endémicas ha resultado en el incremento de poblaciones resistentes a insecticidas, particularmente para vectores de la enfermedad de Chagas (Mougabure-Cueto y Picollo, 2021). Además de la fuerte presión de selección que llevó al surgimiento de poblaciones resistentes, un grave problema de los insecticidas en uso es su alto impacto ambiental. Por ello, resulta urgente buscar estrategias alternativas para el control de insectos perjudiciales de relevancia tanto sanitaria como económica. El uso de genes blancos con un rol fundamental dentro del sistema neuroendócrino es actualmente el foco para el desarrollo de nuevos insecticidas. Se propone que podría conseguirse mediante peptidomiméticos, o bien mediante insecticidas basados en silenciamiento génico por ARNi. En comparación a los insecticidas neurotóxicos, este tipo de estrategia tendría un impacto ambiental muchísimo menor, y podría ser utilizada dentro del contexto del manejo integrado de plagas propuesto por la Organización Mundial de la Salud (Verlinden *et al.*, 2014; Audsley *et al.*, 2015).

Por todo ello, conocer la estructura y función de neuropéptidos es un requisito necesario para el diseño de peptidomiméticos, pseudopéptidos o pequeñas moléculas capaces de interrumpir los procesos fisiológicos que regulan (Bendena, 2010).

Dada la centralidad del proceso de ovogénesis en la reproducción, es fundamental conocer en detalle los actores que participan en cada una de sus etapas, incluida la vitelogénesis, ya que esta última es controlada por señales hormonales que incluye a los neuropéptidos. El rol de *AKH* se ha reportado en el proceso de ovogénesis en especies como *Locusta migratoria* (Moshitzky y Applebaum, 1990) y *Gryllus bimaculatus* (Lorenz, 2003). Además, existe evidencia de la participación de la vía de señalización *AKH/AKHR* en este proceso en *Nilaparvata lugens*, ya que mediante el silenciamiento del receptor (*AKHR*), se ve retrasada la maduración ovocítica y el periodo de oviposición, así como disminuye el número de huevos ovipuestos y la fecundidad (Lu *et al.*, 2019). Por su parte, en *R. prolixus* se identificó la expresión de *AKHR* tanto en cuerpo graso como en ovarios de hembras alimentadas, sugiriendo que el metabolismo de los nutrientes regulado por

la señalización de AKH podría ser necesario para satisfacer las demandas de la reproducción (Zandawala *et al.*, 2015a, b; Leyria *et al.*, 2020b). Un estudio a nivel transcriptómico reveló que la expresión del transportador de trehalosa (*Rp-TRET*) es regulada en los ovarios y el cuerpo graso post ingesta de sangre, mediante las vías de señalización de AKH e insulina (Leyria *et al.*, 2020b; 2021a; 2021b).

En la primera instancia de este trabajo, se logró inferir la identidad de un conjunto de genes precursores de neuropéptidos expresados en el ovario de *R. prolixus*. La utilización de un transcriptoma reconstruido mediante dos estrategias de ensamblaje diferentes permitió inferir la identidad de los neuropéptidos, pero con ciertas discrepancias. Estas últimas se explican como consecuencia del algoritmo utilizado; el mapeo a la referencia permite la identificación de un repertorio de genes previamente ya reportados, mientras que en el *de novo* pueden identificarse nuevos, lo que presenta una ventaja en este análisis. Más allá del repertorio representado, ciertos neuropéptidos no se lograron inferir. Tal es el caso de *AKH-B*, *bursicon*, *calcitonin-likediuretic hormone*, *cardioacceleratory peptide*, *CNMamide*, *CT/DH-R1B*, *CT/DH-R2*, *GPA2*, *insuline related peptide*, *ion transport peptide*, *proctolin* ni *SIF-amide*; los cuales previamente fueron reportados con expresión en el ovario del triatomino (Leyria *et al.*, 2020b). Ante esto, es probable que la ausencia se deba a una baja cobertura de los transcriptos. Es posible considerar que algunos de dichos genes se expresen en niveles muy bajos evidenciando la necesidad de un análisis de enriquecimiento para su identificación, ventaja que confiere un enfoque transcriptómico cuantitativo.

Dentro del repertorio identificado, se analizó AKH durante la ovogénesis de *R. prolixus*. En primera lugar, fue posible validar los resultados obtenidos *in silico*, dado que se confirmó la expresión de dicho neuropéptido en el ovario, tanto previtelogénico como vitelogénico, evidenciando una mayor expresión en este último, lo cual es coincidente con lo observado en otro estudio transcriptómico de la especie (Leyria *et al.*, 2020b).

La mayor presencia de AKH en el ovario vitelogénico, en comparación con el previtelogénico y diferentes momentos del desarrollo embrionario temprano, podría estar explicado por los requerimientos energéticos de cada proceso; donde probablemente el proceso de ovogénesis sea aquel que exige la mayor movilización de

lípidos, proteínas y carbohidratos, hacia el interior de los ovocitos en desarrollo, función dada por dicho neuropéptido (Marco *et al.*, 2013; Leyria *et al.*, 2020b).

En *R. prolixus*, se ha estudiado la vía AKH/AKHR en el metabolismo energético y movilización de lípidos (Alves-Bezerra *et al.*, 2016; Zandawala *et al.*, 2015b), pero aún no existen reportes acerca del papel de AKH en el proceso de ovogénesis. Como primera aproximación para evaluar esto, se llevó a cabo la validación funcional mediante la técnica de ARNi, la cual permitió descifrar que AKH no afecta la oviposición ni el desarrollo del embrión. El hecho de no afectar la oviposición, también se vio reportado en la mosca de la fruta, *D. melanogaster*, donde no se encontraron cambios la fecundidad en ausencia de AKH (Gáliková *et al.*, 2015), por lo tanto, se sugiere que la ovogénesis estaría bajo control de una vía lipídica alternativa. Por otro lado, la ausencia de AKH provocó una disminución de la expresión de Vg en el ovario del triatomino. Más allá de esta disminución, no se vio afectado ni el transcurso de la ovogénesis ni la puesta de huevos. Estudios previos, reportaron que AKH es capaz de inhibir la síntesis de lípidos y proteínas en el cuerpo graso (Carlisle y Loughton, 1979; Gokuldas *et al.*, 1988; Moshitzky y Applebaum, 1990; Dalibor, 2008). Debido a que existen dos fuentes de producción de Vg, una propia del ovario y otra proveniente del cuerpo graso (Melo *et al.*, 2000), los resultados obtenidos aquí sugieren que la fuente extra ovárica compensaría la necesidad de dicha proteína en el desarrollo del ovocito, y que la Vg ovárica no es imprescindible para el desarrollo del ovocito y embriogénesis durante el proceso de ovogénesis en el triatomino.

En suma, el análisis de la localización de la proteína Vg en los ovocitos de las hembras silenciadas, reveló una mayor deposición de dicha proteína en el lado apical de las células foliculares, coincidente con su puerta de entrada a los ovocitos en desarrollo, captada por los mismos a través de endocitosis mediada por receptor (Bellés, 1998; Giorgi *et al.*, 2005; Pascual *et al.*, 2021). Aunque no es posible cuantificar dicha deposición, la mayor presencia sustenta los resultados obtenidos previamente.

Este trabajo proporciona una aproximación hacia el conocimiento sobre la caracterización funcional de los neuropéptidos presentes en el ovario de *R. prolixus*. Asimismo, permite la generación de nuevo conocimiento acerca de los factores genéticos involucrados en la regulación del proceso de ovogénesis y de la biología

reproductiva del triatomino, dando lugar al desarrollo de nuevas investigaciones futuras.

CONCLUSIONES

- La secuenciación masiva de transcriptomas es una buena aproximación experimental para la identificación de genes de interés.
- El hallazgo de neuropéptidos expresados en el ovario de *R. prolixus*, en base a búsquedas por similitud de secuencia, evidencia la conservación de los genes estudiados.
- La hormona adipocinética, *AKH*, no afecta la oviposición ni el desarrollo embrionario temprano.
- *AKH* regula la expresión de *vitelogenina* en el ovario del triatomino.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215: 403-10.
- Altstein M., Nässel D.R. 2010. Neuropeptide signaling in insects. *Adv Exp Med Biol.* 692: 155–165.
- Alves-Bezerra, M., De Paula, I.F., Medina, J.M., Silva-Oliveira, G., Medeiros, J.S., Gade, G., Gondim, K.C., 2016. Adipokinetic hormone receptor gene identification and its role in triacylglycerol metabolism in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 69, 51–60.
- Anderson, D.T. 1972. The development of hemimetabolous insects. *Developmental Systems: Insects.* 1: 95–163.
- Araujo, R.N., Santosa, A., Pintoa, F.S., Gontijoa, N.F., Lehaneb, M.J., Pereira, M.H., 2007. RNA Interference of the Salivary Gland Nitrophorin 2 in the Triatomine Bug *Rhodnius Prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by ARNdc Ingestion or Injection. *Insect Biochem.* 36(9), 683–693.
- Arrese, E.L., Soulages, J.L. 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol.* 55: 207–225.
- 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. *An Acad Bras Cienc.* 77, 405-30.
- Audsley, N., Down, R.E. 2015. G protein coupled receptors as targets for next generation pesticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 67: 27–37.
- Beament, J.W., 1946. The formation and structure of the chorion of the egg in an hemipteran, *Rhodnius prolixus*. *Q J Microsc Sci.* 87, 393-439.
- Bellés, X. 1998. Endocrine effectors in insect vitellogenesis. In: Coast, G.M. and Webster, S.G. Eds., *Recent Advances in Arthropod Endocrinology*. Cambridge, Cambridge University Press, pp. 71-90.
- Bendena, W.G. 2010. Neuropeptide physiology in insects. *Adv Exp Med Biol.* 692: 166–191.

- Berenbaum, M.R., 1996. Bugs in the System, in: Wesley., N.Y.A. (Ed.).
- Berni, M., Ribeiro, J.M., Tobias-Santos, V., Caceres-Rodrigues, A., Borges Muty, F., Vionette-Amaral, R.J., Masuda, H., Sorgine, M.H., Nunes da Fonseca, R., Araujo, H. 2014. Toll signals regulate dorsal–ventral patterning and anterior–posterior placement of the embryo in the hemipteran *Rhodnius prolixus*. *EvoDevo*. 5, 38.
- Braz, G.R., Moreira, M.F., Masuda, H. and Oliveira, P.L. 2002. Rhodnius heme-binding protein (RHBP) is a heme source for embryonic development in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). *Insect Biochem Mol Biol*. 32, 361-7.
- Brito, T., Julio, A., Berni, M., de Castro Poncio, L., Bernardes, ES., Araujo, H., et al. 2018. Transcriptomic and functional analyses of the piRNA pathway in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *PLoS Negl Trop Dis* 12(10): e0006760.
- Büning, J. 1994. The Insect Ovary: Ultrastructure, previtellogenic growth and evolution.
- Buxton, P.A., 1930. The biology of a blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Transactions of the Entomological Society London*. 78, 227–236.
- Capriotti, N., Ianowski, J.P., Gioino, P., Ons, S. 2019. The neuropeptide CCHamide 2 regulates diuresis in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol*.
- Cardoso JC., Ribeiro, JMC., dos Santos DV., Pereira MH, Araújo, RN., Gontijo, NF., Pessoa, GCD., Sant'Anna, MRV., Sorgine, MHF., Majerowicz, D., Medeiros, M., Braz, GRC., Mesquita, RD., Oliveira, PL., Koerich, LB. 2020. Analysis of the testicle's transcriptome of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *bioRxiv*: 616193.
- Carlisle, J.A., Loughton, B.G. 1979. Adipokinetic hormone inhibits protein synthesis in *Locusta*. *Nature* 282, 420–421.
- Chagas, C.R.J. 1909. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. esp., agente da nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1, 159–218.
- Coelho, VL., de Brito, TF., de Abreu Brito, IA., Cardoso, MA., Berni, MA., Araujo, HMM., Sammeth, M., Pane, A. 2021. Analysis of ovarian transcriptomes reveals thousands of novel genes in the insect vector *Rhodnius prolixus*. *Scientific Reports* 11: 1–17.

- Coles, G.C. 1965. Hemolymph proteins and yolk formation in *Rhodnius prolixus*. J. Exp. Biol. 43: 425-431.
- Coura, J.R., Borges-Pereira, J. 2012. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. Rev Soc Bras Med Trop. 45, 286-296.
- Dalibor, K. 2008. Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. Physiol. Entomol. 33, 171–180.
- Davey, K.G., 1987. Inputs to the hormonal control of egg development in *Rhodnius prolixus*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 82 Suppl 3, 103-8.
- Davey, K.G., 2000. The modes of action of juvenile hormones: some questions. Insect Biochem. Mol. Biol. 30, 663–670.
- Davey, K., 2007. The interaction of feeding and mating in the hormonal control of egg production in *Rhodnius prolixus*. J Insect Physiol. 53, 208-15.
- Davis, G.K., Patel, N.H. 2002. Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation. Annu Rev Entomol. 47, 669-99.
- de Cuevas, M., 2005. *Drosophila* Oogenesis, ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES.
- Ewer, J., Reynolds, S. 2002. Neuropeptide control of molting in insects. In: Pfaff DW, Arnold AP, Fahrbach SE et al, eds. Hormones, Brain and Behavior. San Diego: Academic Press:1-92.
- Gade, G., Auerswald, L. 2003. Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. Gen Comp Endocrinol; 132:10-20.
- Gáliková M., Diesner M., Klepsatel P., Hehlert P., Xu Y., Bickmeyer I., Predel R., Kühnlein, RP. 2015. Energy homeostasis control in *Drosophila* adipokinetic hormone mutants. Genetics 201: 665–683.
- Giorgi, F., Snigirevskaya, E.S., Raikel, A.S. 2005 Progress in Vitellogenesis. Reproductive Biology of Invertebrates. vol. XII. Part B. . The cell biology of yolk protein precursor synthesis and secretion, in: Raikel, A.S. (Ed.), Science Publishers Inc., Enfield, USA, pp. 33-68.

- Gokuldas, M., Hunt, P.A., Candy, D.J. 1988. The inhibition of lipid synthesis in vitro in the locust, *Schistocerca gregaria*, by factors from the corpora cardiaca. *Physiol. Entomol.* 13, 43–48.
- Guarneri, A., Lorenzo, M. 2021. Triatominae - The Biology of Chagas Disease Vectors.
- Huebner, E.; Anderson, E. 1972a. A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus*. Cytoarchitecture and development of the trophic chamber. *J Morphol.* 138: 1-40.
- Huebner, E.; Anderson, E. 1972b. A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus*. I. The ontogeny of the follicular epithelium. *J Morphol.* 136: 459-93.
- Huebner, E. 1981. Nurse cell-oocyte interaction in the telotrophic ovarioles of an insect, *Rhodnius prolixus*. *Tissue Cell* 13, 105-125.
- Husak, J.F. 2015. Integrative Organismal Biology edited by Lynn B. Martin, Cameron K. Ghalambor and H. Arthur Woods. *Q Rev Biol.* 90(4): 431-432.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H., Frase, M., Li, W., McAnulla, C. 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics.* Vol 30 (9). 1236-1240.
- Kelly, G.M., Huebner, E. 1989. Embryonic development of the hemipteran insect *Rhodnius prolixus*. *J Morphol.* 199, 175-196.
- Klowden, M. 2013. *Physiological Systems in Insects.* Academic Press.
- Kunkel, J.G., Nordin, J.H. 1985. Yolk protein, in: Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I. Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology.* Pergamon Press, Oxford, pp. 83-111.
- Lange, A.B., Leyria, J., Orchard, I. 2022. The hormonal and neural control of egg production in the historically important model insect, *Rhodnius prolixus*: A review, with new insights in this post-genomic era, *General and Comparative Endocrinology.*
- Lavore, A., Pagola, L., Esponda-Behrens, N., Rivera-Pomar, R. 2012. The gap gene giant of *Rhodnius prolixus* is maternally expressed and required for proper head and abdomen formation. *Dev Biol.* 361: 147-55.

- Lavore, A., Pascual, A., Salinas, F.M., Esponda-Behrens, N., Martinez-Barnette, J., Rodriguez, M., Rivera-Pomar, R. 2015. Comparative analysis of zygotic developmental genes in *Rhodnius prolixus* genome shows conserved features on the tracheal developmental pathway. *Insect Biochem Mol Biol.* 64, 32-43.
- Lenaerts, C., Monjon, E., Van Lommel, J., Verbakel, L., Vanden Broeck, J. 2019. Peptides in insect oogenesis. *Current Opinion in Insect Science* 31: 58–64.
- Leyria, J., Orchard, I., Lange, A.B. 2020a. Transcriptomic analysis of regulatory pathways involved in female reproductive physiology of *Rhodnius prolixus* under different nutritional states. *Sci Rep* 10, 11431.
- Leyria, J., Orchard, I., Lange, A.B. 2020b. What happens after a blood meal? A transcriptome analysis of the main tissues involved in egg production in *Rhodnius prolixus*, an insect vector of chagas disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.1–35 pp.
- Leyria, J., Orchard, I., Lange, A.B. 2021a. The involvement of insulin/ToR signaling pathway in reproductive performance of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 130, 103526.
- Leyria, J., El-Mawed, H., Orchard, I., Lange, A.B. 2021b. Regulation of a Trehalose-Specific Facilitated Transporter (TRET) by Insulin and Adipokinetic Hormone in *Rhodnius prolixus*, a Vector of Chagas Disease. *Front. Physiol.* 12:624165.
- Li, S., Yu, X., Feng, Q. 2019. Fat Body Biology in the Last Decade. *Annul Rev Entomol.* 64: 315-333.
- Lynch, J.A., Ozuak, O., Khila, A., Abouheif, E., Desplan, C., Roth, S. 2011. The phylogenetic origin of oskar coincided with the origin of maternally provisioned germ plasm and pole cells at the base of the Holometabola. *PLoS Genet.* 7, e1002029.
- Lynch, J.A., Roth, S. 2011. The evolution of dorsal-ventral patterning mechanisms in insects. *Genes Dev.* 25, 107-18.
- Liu, P.Z., Kaufman, T.C. 2005. Short and long germ segmentation: unanswered questions in the evolution of a developmental mode. *Evol Dev.* 7, 629-46.

- Lorenz, M.W. 2003. Adipokinetic hormone inhibits the formation of energy stores and egg production in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 136(2), 197–206.
- Lu, K., Wang, Y., Chen, X., Zhang, X., Li, W., Cheng, Y., Li, Y., Zhou, J., You, K., Song, Y., Zhou, Q., Zeng, R. 2019. Adipokinetic Hormone Receptor Mediates Trehalose Homeostasis to Promote Vitellogenin Uptake by Oocytes in *Nilaparvata lugens*. *Front. Physiol.* 9:1904.
- Lutz, D.A., Huebner, E. 1980. Development and cellular differentiation of an insect telotrophic ovary (*Rhodnius prolixus*). *Tissue Cell.* 12: 773-94.
- Lutz, DA; Huebner, E. 1981. Development of nurse cell-oocyte interactions in the insect telotrophic ovary (*Rhodnius prolixus*). *Tissue Cell.* 13: 321-35.
- Marco, H.G., Šimek, P., Clark, K.D., Gäde, G. 2013. Novel adipokinetic hormones in the kissing bugs *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, *Dipetalogaster maxima* and *Panstrongylus megistus*. *Peptides*, 41, 21–30.
- Medeiros, M.N., Logullo, R., Ramos, I.B., Sorgine, M.H., Paiva-Silva, G.O., Mesquita, R.D., Machado, E.A., Coutinho, M.A., Masuda, H., Capurro, M.L., Ribeiro, J.M., Cardoso Braz, G.R., Oliveira, P.L. 2011. Transcriptome and gene expression profile of ovarian follicle tissue of the triatomine bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol.* 41, 823-31.
- Medeiros, M.N, Ramos, I.B, Oliveira, DMP., da Silva, RCB., Gomes, F.M, Medeiros, L.N, Kurtenbach, E., Chiarini, L.B, Masuda, H., de Souza, W., Machado, E.A. 2011. Microscopic and molecular characterization of ovarian follicle atresia in *Rhodnius prolixus* Stahl under immune challenge. *J Insect Physiol.* 57: 945–953.
- Mellanby, H. 1935. The early embryonic development of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Heteroptera). *Q J Microsc Sci.*
- Mellanby, H. 1936. The latter embryology of *Rhodnius prolixus*. *Q J Microsc Sci.* 1-40.

- Melo, A.C., Valle, D., Machado, E.A., Salerno, A.P., Paiva-Silva, G.O., Cunha, E.S.N.L., de Souza, W., Masuda, H., 2000. Synthesis of vitellogenin by the follicle cells of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol.* 30, 549-57.
- 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. et al., 2015. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112, 14936-41.
- Mollayeva, S., Orchard, I., Lange, A.B. 2018. The involvement of Rhopr-CRF/DH in feeding and reproduction in the blood-gorging insect *Rhodnius prolixus*. *Gen Comp Endocrinol*; 258: 79–90.
- Mullis, K. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American.* Vol. 262 (4). 56–65. www.jstor.org/stable/24996713.
- Mundall, E., Engelmann, F. 1977. Endocrine control of vitellogenin synthesis and vitellogenesis in *Triatoma protracta*. *J Insect Physiol.* 23, 825-36.

- Moshitzky, P., Applebaum, S.W. 1990. The role of adipokinetic hormone in the control of vitellogenesis in locusts. *Insect Biochemistry*, 20(3), 319–323.
- Mougabure-Cueto, G., Picollo, M.I. 2021. Insecticide Resistance in Triatomines. In: Guarneri A., Lorenzo M. (eds) *Triatominae - The Biology of Chagas Disease Vectors*. Entomology in Focus, vol 5. Springer, Cham.
- Nässel, D.R. 2002. Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Prog Neurobiol*; 68:1-84.
- Nässel, D.R., Homberg, U. 2006. Neuropeptides in interneurons of the insect brain. *Cell Tissue Res*; 326:1-24.
- Nässel, D.R, Zandawala, M. Recent advances in neuropeptide signaling in *Drosophila*, from genes to physiology and behavior. *Prog Neurobiol*. 179:101607.
- Noriega, F.G. 1992. Autogeny in three species of Triatominae: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma rubrovaria*, and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol*. 29, 273-7.
- Nunes-da-Fonseca, R., Berni, M., Tobias dos-Santos, V., Pane, A., Araujo, H.M. *Rhodnius prolixus*: From classical physiology to modern developmental biology. *Genesis*. 2017;00:e23009.
- Ons, S., Richter, F., Urlaub, H., Rivera-Pomar R. 2009. The neuropeptidome of *Rhodnius prolixus* brain. *Proteomics*. 9: 788–792
- Ons, S., Sterkel, M., Diambra, L., Urlaub, H., Rivera-Pomar R. 2011. Neuropeptide precursor gene discovery in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *Insect Mol. Biol*. 20: 29–44.
- Ons, S., Lavore, A., Sterkel, M., Wulff, J.P., Sierra, I., Martinez Barnetche, J., Rodriguez, M.H., Rivera-Pomar, R. 2016. Identification of G protein coupled receptors for opsines and neurohormones in *Rhodnius prolixus*. Genomic and transcriptomic analysis. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 69, 34–50.
- Ons, S. 2017. Neuropeptides in the regulation of *Rhodnius prolixus* physiology. *J Insect Physiol*. 97, 77–92.

- Pascual, A. 2019. Genómica del desarrollo embrionario de *Rhodnius prolixus*. Facultad de Ciencias Exactas, Área Ciencias Biológicas UNLP. <https://doi.org/10.35537/10915/90493>
- Pascual, A., Vilardo, E.S., Taibo, C., Sabio y García, J., Rivera-Pomar, R. 2021. Bicaudal C is required for the function of the follicular epithelium during oogenesis in *Rhodnius prolixus*. *Development Genes and Evolution* 231: 33–45.
- Pascual, A., Rivera-Pomar, R. Dynamics of maternal gene expression in *Rhodnius prolixus*. *Sci Rep.* 2022 Apr 20;12(1):6538. doi: 10.1038/s41598-022-09874-7.
- Patel, H., Orchard, I., Veenstra, J.A., Lange, A.B. 2014. The distribution and physiological effects of three evolutionarily and sequence-related neuropeptides in *Rhodnius prolixus*: Adipokinetic hormone, corazonin and adipokinetic hormone/corazonin-related peptide. *Gen. Comp. Endocrinol.* 195, 1–8.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research.* 29(9): 2002-2007.
- Picollo, M.I., Vassena, C., Santo Orihuela, P., Barrios, S., Zaidemberg, M., Zerba, E. 2005. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J Med Entomol* 42: 637–642.
- Quinlan, M.C., Tublitz, N.J., O'Donnell, M.J. 1997. Anti-diuresis in the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus* Stål: the peptide CAP2b and cyclic GMP inhibit Malpighian tubule fluid secretion. *J. Exp. Biol.* 200, 2363–2367.
- Raikhel, A.S. 2005. Vitellogenesis of disease vectors, from physiology to genes, in: Marquardt, W. (Ed.), *Biology of Disease Vectors*. Elsevier Academic Press, London, UK.
- Rassi, A., Jr., Rassi, A., Marin-Neto, J.A. 2010. *Chagas disease*. *Lancet* 375(9723): p. 1388-402.
- Ribeiro, J.M., Genta, F.A., Sorgine, M.H., Logullo, R., Mesquita, R.D., Paiva-Silva, G.O., Majerowicz, D., Medeiros, M., Koerich, L., Terra, W.R., Ferreira, C., Pimentel, A.C.,

- Bisch, P.M., Leite, D.C., Diniz, M.M., da, S.G.V.J.J.L., Da Silva, M.L., Araujo, R.N., Gandara, A.C., Brosson, S., Salmon, D., Bousbata, S., Gonzalez-Caballero, N., Silber, A.M., Alves-Bezerra, M., Gondim, K.C., Silva-Neto, M.A., Atella, G.C., Araujo, H., Dias, F.A., Polycarpo, C., Vionette-Amaral, R.J., Fampa, P., Melo, A.C., Tanaka, A.S., Balczun, C., Oliveira, J.H., Goncalves, R.L., Lazoski, C., Rivera-Pomar, R., Diambra, L., Schaub, G.A., Garcia, E.S., Azambuja, P., Braz, G.R., Oliveira, P.L. 2014. An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. *PLoS Negl Trop Dis.* 8, e2594.
- Rozen, S., Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press. Totowa. NJ. 365-386
- Sander, K. 1981. Pattern generation and pattern conservation in insect ontogenesis—problems, data, and models. *Progress in Developmental Biology.* 101-19.
- Schuh, R.T., Slater, J.A. 1995. *True Bugs of the World*. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Sedra, L., Lange, A.B. 2016. Cloning and expression of long neuropeptide F and the role of FMRFamide-like peptides in regulating egg production in the Chagas vector, *Rhodnius prolixus*. *Peptides* 82: 1–11.
- Sievers, F., Higgins, D. 2014. Clustal Omega, Accurate Alignment of Very Large Numbers of 57 Sequences. In: Russell D. (eds) *Multiple Sequence Alignment Methods. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Vol 1079. Humana Press. Totowa. NJ.
- Sterkel, M., Urlaub, H., Rivera-Pomar, R., Ons, S. 2011. Functional proteomics of neuropeptidome dynamics during the feeding process of *Rhodnius prolixus*. *J. Proteome Res.* 10: 3363–3371.
- Sterkel, M., Oliveira, PL., Urlaub, H., Hernandez-Martinez, S., Rivera-Pomar, R., Ons, S. 2012. OKB, a novel family of brain-gut neuropeptides from insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42: 466–473.

- Sterkel, M., Ons, S., Oliveira, P.L. 2019. DOPA decarboxylase is essential for cuticle tanning in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), affecting ecdysis, survival and reproduction. *Insect Biochem. Mol. Biol.*
- Stoka, A.M., Salomón, O.D., Noriega, F.G. 1978. Physiology of Triatominae's reproduction, in: Brenner, R.R. and Stoka, A.M. (Eds.), *Chagas' Disease Vectors*. CRC Press, Florida, pp. 109-129.
- Stothard, P. 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*. 28, 1102, 1104.
- Traverso, L., Lavore, A., Sierra, I., Palacio, V., Martinez-Barnetche, J., Latorre-Estivalis, J.M., Mougabure-Cueto, G., Francini, F., Lorenzo, M.G., Henry Rodríguez, M., Ons, S., Rivera-Pomar, R. 2017. Comparative and functional triatomino genomics reveals reductions and expansions in insecticide resistance-related gene families. *PLoS Negl Trop Dis* 11(2): e0005313.
- Valle, D., Lima Gomes, J., Goldenberg, S., Garcia, E. 1987. *Rhodnius prolixus* vitellogenesis: Dependence upon a blood source. *J Insect Physiol.*33, 249-254.
- Van der Horst, D.J, Van Marrewijk, W.J, Diederer, J.H. 2001. Adipokinetic hormones of insect: Release, signal transduction and responses. *Int Rev Cytol*; 211:179-240.
- Verlinden, H; Vleugels, R; Zels, S; Dillen, S; Lenaerts, C; Crabbé, K; Spit, J; Vanden Broeck, J. 2014. Receptors for neuronal or endocrine signalling molecules as potential targets for the control of insect pests. *Advances in Insect Physiology*. 46(2014): 167-303.
- Wigglesworth, V.B., 1934. The physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II. Factors controlling moulting and metamorphosis. *Q. J. Microsc. Sci.* 77, 191–222.
- Wigglesworth, V.B., 1939. *The Principles of Insect Physiology*. Methuen, London.
- Wigglesworth, V.B., 1953. The origin of sensory neurons in an insect. *Q. J. Microsc. Sci.* 94, 93–112.
- Wigglesworth, V.B., 1954. *The Physiology of Insect Metamorphosis*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Wigglesworth, V.B., 1959. *The Control of Growth and Form: A study of the epidermal cell in an insect*. Ithaca, New York. Cornell University Press.
- Wigglesworth, V.B., 1964. The hormonal regulation of growth and reproduction in insects. *Adv. Insect Physiol.* 2, 247–336.
- Wulff, J.P., Sierra, I., Sterkel, M., Holtof, M., Van Wielendaele, P., Francini, F., Broeck, J.V., Ons, S. 2017. Orcokinin neuropeptides regulate ecdysis in the hemimetabolous insect *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 81: 91–102.
- Wulff, J.P., Capriotti, N., Ons, S. 2018. Orcokinins regulate the expression of neuropeptide precursor genes related to ecdysis in the hemimetabolous insect *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology.* 108 (2018): 31-39.
- Zandawala, M., Haddad, A.S., Hamoudi, Z., Orchard, I. 2015a. Identification and characterization of the adipokinetic hormone/corazonin-related peptide signaling system in *Rhodnius prolixus*. *The FEBS J.* 28, 3603-3617.
- Zandawala, M., Hamoudi, Z., Lange, A.B., Orchard, I. 2015b. Adipokinetic hormone signalling system in the Chagas disease vector, *Rhodnius prolixus*. *Insect Mol. Biol.* 24, 264–276.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Suplementario 1

Lista ID de los neuropéptidos provenientes de dípteros y coleópteros empleados en los alineamientos múltiples.

Adipokinetic_hormone/Corazonin_related_Peptide-KM975505

D. melanogaster: >sp|Q26377.2|

T. castaneum: >NP_001159497.2 *N. vitripennis*: >NP_001161199.1

Allatostatin_A-GQ856315

D. melanogaster: >NP_524489.2 *N. lugens*: >XP_039294581.1

Calcitonin-likediuretic_hormone_Isoform_A-GQ856316/AEA51300

D. melanogaster: >NP_523514.1

Neuroparsin-GU207864

N. lugens: >BAO00964.1

P. stali: >BAV78817.1

Short_neuropeptide_F-GQ452380

N. lugens: >XP_022184541.1

P. stali: >BAV78827.1

Sulfakinin-GQ162784

N. lugens: >AFW19802.1

P. stali: >BAV78829.1

Suplementario 2

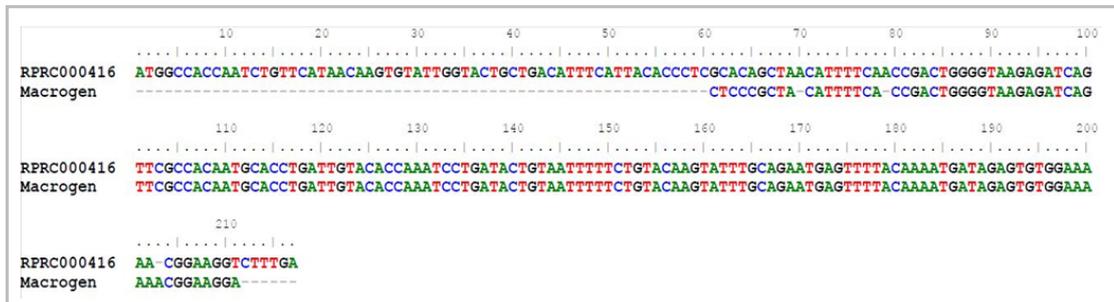


Figura Suplementaria 2. Alineamiento del amplicón de AKH anotado en VectorBase (RPRC000416) y proveniente de la secuenciación (MacroGen).

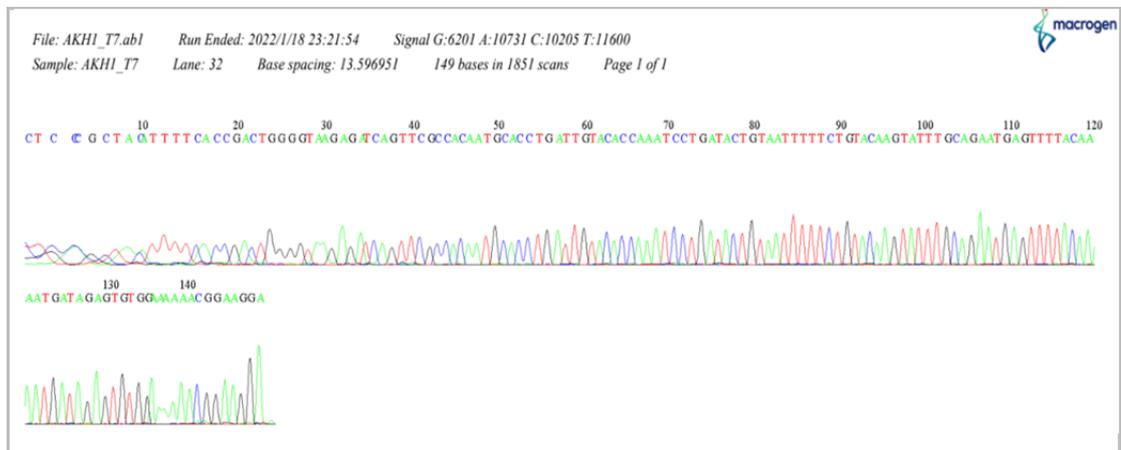


Figura Suplementaria 1. Secuenciación del amplicón de AKH (MacroGen).

Suplementario 3

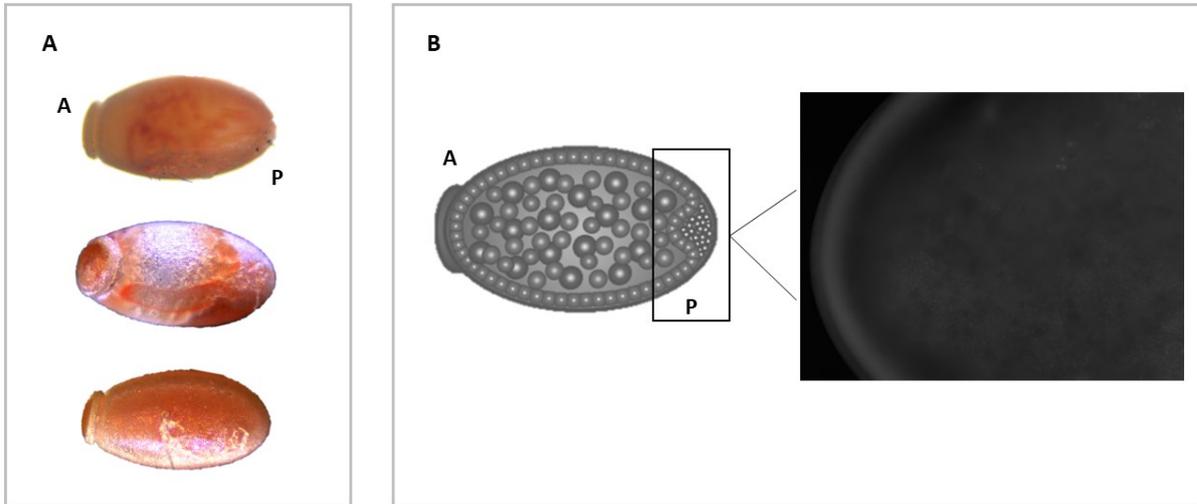


Figura suplementaria 3. Huevos de *R. prolixus*. A. Tipos de embriones silenciados. B. Huevo silenciado no embrionado.