

ESTUDIO DEL CANAL DE SODIO DEPENDIENTE DE VOLTAJE EN *ANDIPERLA MORENENSIS*



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

Pergamino, 28 de Diciembre de 2023

ESTUDIO DEL CANAL DE SODIO DEPENDIENTE DE VOLTAJE DE *ANDIPERLA MORENENSIS*

Trabajo Final de Grado
de la alumna

MAILEN FERREYROS

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Evaluadora

Evaluadora

Evaluadora

Mg. Agustín Baricalla
Co-Director

Dr. Rolando Rivera Pomar
Director

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

Pergamino, 28 de Diciembre de 2023

"La variación es la norma"

AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo Final de Grado está dedicado a:

Cristina y Gustavo quienes con su infinita paciencia, amor y esfuerzo me permitieron lograr una de mis grandes metas.

Macarena y Daiana quienes me apoyaron en cada año transcurrido. Por enseñarme el ejemplo de perseverancia y valentía, de no tenerle miedo a las dificultades.

Todos mis amigos y colegas por su compañerismo, compromiso, cariño y consejos de cada año que me impulsaron a ser una mejor persona.

Rolando y Agustín, por abrirme las puertas al mundo de la investigación, por su enorme empatía y compromiso. Fueron quienes con la gran enseñanza de sus conocimientos, juicios y perspectivas hicieron que pueda crecer en este proyecto como profesional.

Finalmente agradecer a toda mi familia y a todas las personas que estuvieron cerca y a la distancia alentándome en cada momento, siempre deseándome lo mejor, dándome buenas energías.

Fueron pilares fundamentales en esta etapa, de verdad... gracias a todos.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	7
2. RESUMEN	8
3. INTRODUCCIÓN	9
2.1. Clase Insecta	9
2.2. Orden Plecoptera	9
2.3. <i>Andiperla morenensis</i>	9
2.4. Sistema nervioso en insectos	11
2.5. Canales iónicos dependientes de voltaje	12
2.5.1. Motivos estructurales y funcionales	13
2.5.2. Canales de sodio dependientes de voltaje en insectos	14
2.6. Adaptación de insectos a bajas temperaturas	14
2.7. Genómica y transcriptómica en insectos	15
2.8. Bioinformática	16
2.9. Filogenia	17
2.10. La importancia de los insectos como objeto de estudio.....	18
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	20
4.1. Objetivo general	20
4.2. Objetivos específicos	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1. Recolección de ejemplares	21
5.2. Datos de Secuencia	21
5.3. Análisis <i>in silico</i> del transcriptoma de <i>Andiperla morenensis</i>	21
5.3.1. Búsqueda y selección de transcritos	22
5.3.2. Identificación del canal de sodio activado por voltaje.....	22

5.3.3. Identificación del gen canal de sodio en el genoma de <i>A. morenensis</i> y otros plecopteros	22
5.3.4. Análisis de dominios proteicos	23
5.3.5. Análisis de similitud de secuencia de las proteínas	23
5.3.6. Análisis filogenético	24
5.4. Expresión del transcripto	24
5.4.1.Extracción de ARN	24
5.4.2. Síntesis de ADN copia (ADNc)	25
5.4.3. Diseño de <i>primers</i>	26
5.4.4. Amplificación por PCR	26
6. RESULTADOS	28
6.1. Identificación de canales iónicos en <i>A. morenensis</i>	28
6.2. Análisis filogenético del VGSC en <i>Andiperla morenensis</i>	34
6.3. Estructura genómica del gen codificante del VGSC	35
6.4. Análisis comparativo del VGSC de <i>A. morenensis</i>	37
6.5. Expresión del VGSC de <i>A. morenensis</i>	42
7. CONCLUSION.....	48
8. BIBLIOGRAFÍA.....	50
9. ANEXOS.....	59

ABREVIATURAS

aa/AA: aminoácidos

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BD: Base de datos (Data Base)

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

Cav: canal de calcio dependiente de voltaje

Clvs: canal de cloro dependiente de voltaje

GO: Ontología Genética (*Gene Ontology*)

Kvs: canal de potasio dependiente de voltaje

Nav: canal de sodio dependiente de voltaje

pb: pares de bases

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SA: splicing alternativo

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

VGSC: Canal de sodio dependiente de voltaje

1. RESUMEN

Los insectos son uno de los grupos más diversos dentro de los metazoos, con una gran variedad de formas, patrones de desarrollo y hábitats. Estos organismos invertebrados se caracterizan por vivir dentro de un rango de temperaturas óptimas relativamente acotadas (20-30 °C). Por debajo y por encima de estas temperaturas suelen entrar en letargo e inclusive morir. *Andiperla morenensis* es una especie del orden Plecoptera que desarrolla todo su ciclo de vida en el Glaciar Perito Moreno a temperaturas que rondan los 0°C. Para la mayoría de los insectos esta temperatura es incompatible con su supervivencia, es por esto por lo que la biología de este insecto despierta interés. A fin de comprender la adaptación a bajas temperaturas de este insecto criofilico y ectotermo, estudiamos el canal de sodio dependiente de voltaje (VGSC). Los VGSC se encuentran conservados en los insectos, presentando gran potencial como método de estudio de adaptación. En este trabajo utilizamos un conjunto de datos genómicos y transcriptómicos para desarrollar estrategias que abordan cuestiones moleculares y evolutivas, con foco en la adaptación de *Andiperla morenensis* a bajas temperaturas. Este análisis es imprescindible para reconstruir la historia evolutiva de *A. morenensis* e inferir la naturaleza y el alcance de las fuerzas selectivas que modelaron su adaptación al ambiente glaciar.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Clase Insecta

Los artrópodos (del griego ἄρθρον, arteros, articulación, y podos, pie) pertenecen al filo más diverso del reino metazoa. Son animales segmentados, caracterizados por poseer un esqueleto externo articulado compuesto de quitina, con apéndices en posición ventrolateral en cada uno de sus segmentos (Ribera et al., 2015).

Dentro de los artrópodos, la clase de mayor biodiversidad son los insectos. Se desconoce el número exacto de especies de insectos descritas, al momento de escritura de este TFG se registran [781,187](#) especies en NCBI taxonomy (Schoch et al., 2020), pero se estima que sobrepasa el millón (Zhang, 2013). Presentan diversas adaptaciones, y a través de tal diversidad han poblado casi todos los nichos ambientales del planeta desempeñando un papel importante en los ecosistemas (Gibert, 2020).

2.2. Orden Plecoptera

El orden Plecoptera constituye un grupo de insectos con más de 3.000 especies descritas, agrupadas en 16 familias y 286 géneros a nivel mundial (Fochetti & Tierno de Figueroa, 2008). Son insectos neópteros y paurometábolos, de distribución cosmopolita, mayormente pequeños y de coloración poco llamativa. Los estados inmaduros (larvas) son fundamentalmente acuáticos, siendo unas pocas especies terrestres (Pessacq, 2009). A nivel mundial, la región Paleártica es la más rica en especies, seguida por la Neártica, Neotropical, Oriental, Australiana y, por último, Afrotropical (Fochetti & Tierno de Figueroa, 2008). En general, los plecopteros están relacionados a ambientes de agua dulce, con varios taxones oligotérmicos (Zwick 1973, 2000). Se conocen para la Argentina 47 especies reunidas en 28 géneros (Pessacq, 2009). Sus restringidos rangos de tolerancia a las variaciones ambientales (y particularmente a la temperatura) los hacen organismos muy interesantes desde el punto de vista fisiológico y ecológico (Tierno de Figueroa & López-Rodríguez, 1996).

2.3. *Andiperla morenensis*

Durante décadas, la única especie del orden Plecoptera conocida y descrita en los glaciares del sur de la Patagonia fue *Andiperla willinki* (Aubert, 1956). *A. willinki* pertenece a la familia Gripopterygidae y su conocimiento se limitó por largo tiempo a la descripción original y revisiones sobre su distribución, sin mayor información sobre su biología Kohshima et al.,

2002). En el año 2019 se describió una nueva especie en el glaciar Perito Moreno (Provincia de Santa Cruz, Argentina), *Andiperla morenensis*, basándose en evidencias tanto morfológicas como moleculares a partir de material recolectado en dicho lugar (Pessacq y Rivera Pomar, 2019; **Figura 2.1**). *A. willinki* y *A. morenensis* desarrollan todo su ciclo de vida en agua de los glaciares, lo que significa una adaptación a bajas temperaturas. Estos insectos ectotermos y criofílicos, viven en condiciones de temperatura comprendidas entre límites muy estrechos. No sobrevive a la congelación ni a temperaturas mayores a 17°C con su óptimo en la temperatura del agua-hielo, cercana a los 0°C (Pessacq y Rivera Pomar, resultados no publicados).

Observaciones en el terreno indican que los adultos se desplazan activamente sobre pequeños canales dentro del hielo, mientras que las larvas permanecen sumergidas en el agua de sumideros o pozones. En general, prefieren sectores planos, en la zona de ablación de los glaciares, donde la red hidrológica es más estable (Kohshima, 1985), siendo su distribución tan fragmentada como lo esté su hábitat (Lencioni, 2004; **Figura 2.1**). De esta forma *Andiperla morenensis* impone su propia presión de selección, estableciendo limitaciones evolutivas a las estrategias del ciclo de vida a bajas temperaturas, siendo un atrayente organismo de estudio.



Figura 2.1. Panel izquierdo, ejemplar de *Andiperla morenensis*, macho (Pessacq & Rivera-Pomar, 2019). Panel derecho, el típico ambiente glaciar en donde se encuentran los insectos (Glaciar Perito Moreno)

2.4. Sistema nervioso en insectos

El sistema nervioso de los insectos se divide en tres regiones principales: la región cefálica (donde se encuentra el ganglio dorsal y el subesofágico), una región torácica (compuesta de tres segmentos cada uno con su propio ganglio, que puede estar formado por uno o por la fusión de dos o más neurómeros) y finalmente un número variable de ganglios ventrales (Fernández-Villalobos, 2019; **Figura 2.2**).

El sistema nervioso de los insectos se divide en Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Periférico (SNP). El SNC consta de un ganglio cefálico dorsal, seguido de una cadena de ganglios ventrales, el cordón ventral. En cada segmento metamérico, los ganglios bilaterales se fusionan en la línea media y sus nervios laterales se extienden hacia el segmento corporal y los apéndices. Los ganglios segmentarios están conectados entre sí a través de haces de axones o conectores, en función de asimilar la información sensorial, procesar los estímulos y enviar una respuesta al resto del sistema nervioso (Smarandache-Wellmann, 2016) relacionada causalmente con el comportamiento (Büschges et al., 2011). Por su parte, el SNP consiste en una extensa red de neuronas distribuidas por todo el cuerpo que comunican los estímulos del exterior con el SNC (De la Cruz Lozano, 2006). La propagación y comunicación entre las neuronas se denomina sinapsis y está asociado con su capacidad de generar potenciales de acción (Spong et al., 2016) con la finalidad de transmitir información y emitir una respuesta motora. Este potencial de acción se produce cuando las neuronas pasan de un potencial de membrana negativo a uno positivo. Dicho cambio ocurre por un aumento rápido en la permeabilidad de iones de sodio (Na^+) llamado despolarización, seguido de un incremento lento y prolongado en la permeabilidad de iones de potasio (K^+) denominado repolarización. Después de dicho proceso, la neurona restablece su potencial de membrana negativo y permanece en la fase de reposo. El aumento en la concentración de estos iones es regulado por múltiples proteínas transmembrana, incluyendo: la bomba de Na^+ y K^+ , los canales iónicos y los canales iónicos dependientes del voltaje (Purves, 2004).

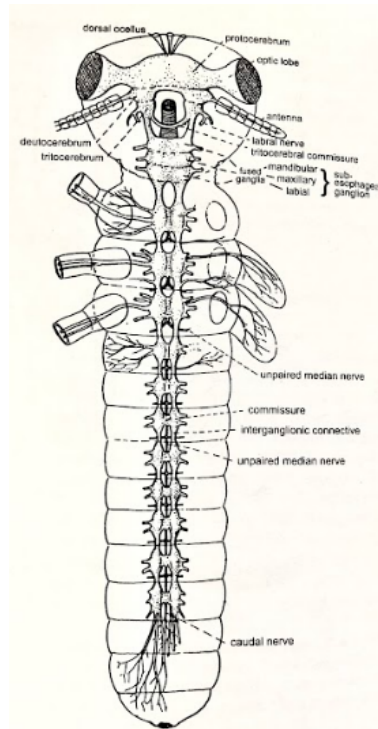


Figura 2.2. Esquema del sistema nervioso de un insecto. Tomada de (Weber,1966).

2.5. Canales iónicos dependientes de voltaje

Los canales iónicos dependientes de voltaje son proteínas transmembrana que regulan la entrada y salida de iones en la membrana celular (King & Hardy, 2013). Por ello son uno de los componentes clave de la maquinaria molecular que subyace a las propiedades biofísicas de las neuronas (Smarandache-Wellmann, 2016), involucrados en procesos celulares como la señalización neuronal y la contracción muscular. Además se cree que juegan un papel fundamental en la evolución de los animales, ya que responden rápido a los cambios en el potencial de acción de la membrana celular (Moran et al., 2015).

La superfamilia de canales iónicos dependientes de voltaje es una de las familias más grandes de proteínas de señalización (Yu & Catterall, 2004) que incluye: canales de sodio dependientes de voltaje (Navs), canales de potasio dependientes de voltaje (Kvs), canales de calcio dependientes de voltaje (Cavs) y canales de cloro dependientes de voltaje (Clvs) (Smarandache-Wellmann, 2016).

Los canales de sodio están especializados en la señalización eléctrica y son responsables del influjo rápido y transitorio de iones de Na^+ que subyace a la fase ascendente del potencial de acción en las células nerviosas, musculares y endocrinas (Yu & Catterall, 2004). Los canales de potasio dependientes de voltaje son necesarios para la repolarización de los potenciales de membrana en todos los fillos y son la clase más grande y diversa de

proteínas de canal. Todos ellos dejan que sólo los iones K^+ atraviesen el poro, pero su sensibilidad al voltaje y la duración de la apertura varían entre los diferentes tipos (Brueggemann et al., 2013).

Los canales de cloruro también son omnipresentes en todos los tipos de neuronas, su función no se comprende completamente, pero parece que complementan la corriente de fuga de potasio para ayudar a mantener el potencial de reposo y juegan un papel importante en las sinapsis inhibitorias (Alvarez-Leefmans et al., 2009).

Los canales de calcio muestran también una gran diversidad y están codificados por varios genes diferentes. Las corrientes de calcio tienen la función de despolarizar la neurona. La entrada de calcio a través de los canales iónicos dependientes de voltaje también tiene efectos hiperpolarizantes indirectos al abrir los canales de potasio dependientes del calcio o desencadenar un conjunto completo de procesos de segundos mensajeros (Dronkers & Baldo, 2009). El refinamiento de estos mecanismos de señalización a nivel evolutivo es uno de los acontecimientos históricos que permitieron el desarrollo de organismos multicelulares complejos (Yu & Catterall, 2004).

2.5.1. Motivos estructurales y funcionales

Los canales iónicos dependientes de voltaje se caracterizan por presentar cuatro dominios (I-IV). Cada dominio cuenta con seis segmentos transmembrana α -helicoidales (S1-S6) unidos por loops extra e intracelulares (Moignot et al., 2009). (**Figura 2.3**). Estos canales se activan mediados por una secuencia, altamente conservada, de aminoácidos de la tercera posición del segmento S4 de los cuatro dominios que forman el sensor del voltaje (Moran et al., 2015). Los aminoácidos del segmento S4 están cargados positivamente y durante la fase de reposo, forman enlaces iónicos con los aminoácidos negativos de los segmentos S1, S2 y S3 para neutralizar su carga. Sin embargo, cuando inicia el potencial de acción, se produce un cambio conformacional que permite un movimiento rotacional en el segmento S4 que causa la activación del canal (Silva & Scott, 2020).

La selectividad de los iones en estos canales está regulada por un filtro de selectividad que está compuesto por aminoácidos altamente conservados en cada canal. Estos aminoácidos están situados en los loops que conectan los segmentos S5 y S6 de los cuatro dominios (Moran et al., 2015). El loop de inactivación, puede variar dependiendo del canal, ya que pueden presentar subunidades α auxiliares que modifican la eficiencia del plegamiento de las proteínas, los niveles de expresión y las propiedades funcionales de los canales (Frank et al., 2005).

2.5.2. Canales de sodio dependientes de voltaje en insectos

Los canales de sodio dependientes de voltaje (VGSC) son responsables de la producción y propagación de potenciales de acción en células excitables (Shen et al., 2017). En respuesta a la despolarización de la membrana, estos canales se activan y permiten la entrada de iones de sodio al interior de la célula. Esto contribuye a incrementar la despolarización de la membrana y a iniciar la señalización eléctrica. Milisegundos después, los canales se inactivan e inicia el proceso de repolarización de membrana para luego regresar a la fase de reposo (Dong, 2007).

A nivel estructural, el filtro de selectividad de estos canales está compuesto por un anillo interno (DEKA) que juega un papel crítico en la selectividad de iones de Na^+ y un anillo externo (EEQD) que se cree que regula la tasa de permeabilidad de la membrana (Lipkind & Fozzard, 2005). El loop de inactivación está localizado en la unión intracelular de los dominios III y IV. Este se dobla hacia el poro para bloquear el flujo de iones de sodio durante la despolarización (Silva & Scott, 2020).

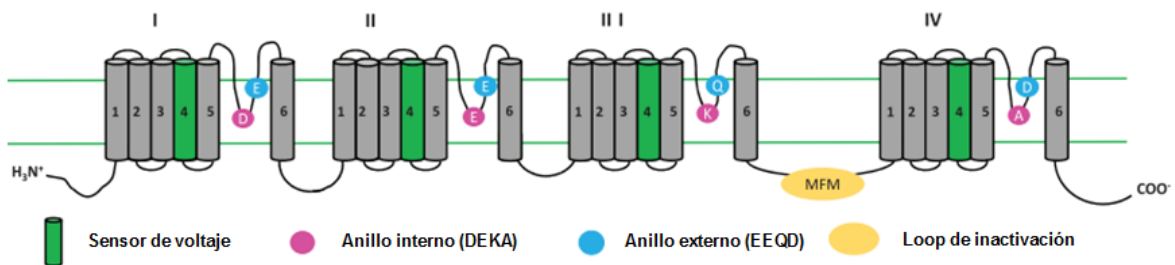


Figura 2.3. Estructura del canal de sodio sensible al voltaje. El anillo interno (rosa) y el anillo externo (azul) de los sensores de voltaje, el sensor de voltaje (verde) y el loop de inactivación (amarillo) (tomado de Silva & Scott, 2020).

2.6. Adaptación de insectos a bajas temperaturas

Los organismos están constantemente expuestos a una amplia gama de cambios ambientales durante generaciones (López-Maury et al., 2008). Algunos de ellos, como las especies extremófilas, han desarrollado adaptaciones morfológicas, ecológicas y fisiológicas que les permiten sobrevivir y desarrollarse en condiciones ambientales extremas (temperatura, radiación, presión hidrostática, pH, salinidad, desecación, etc.) (Rothschild y Mancinelli, 2001).

En los insectos su metabolismo y actividad están muy influenciados por la temperatura de sus cuerpos, temperatura que depende casi por completo de la del medio ambiente que los

rodea (Mellanby, 1939). Por lo que dentro de las condiciones físicas mencionadas anteriormente, las respuestas de adaptación y aclimatación que permiten a algunos insectos tolerar las bajas temperaturas son multifactoriales e involucran varios sistemas fisiológicos y bioquímicos, ya que deben tolerar o evitar la congelación para sobrevivir (Bale, 2002).

Cuando los insectos se enfrentan a condiciones que involucran la disminución de la temperatura, sufren una pérdida inicial de la función neuromuscular causada por una disminución del potencial de membrana y una excitabilidad reducida del sistema neuromuscular (Overgaard & MacMillan, 2017). Considerando a la “temperatura de coma frío” (Belehradek 1935) como la temperatura a la que el insecto queda inmovilizado por el frío sin lograr responder a los estímulos externos y el “punto de muerte por frío” a la temperatura por debajo de la cual la exposición es letal (Mellanby, 1939). Ambas difieren, como era de esperar, entre especies. Esta exposición al frío puede afectar la distribución de iones y reducir los gradientes iónicos fisiológicamente importantes generando una incapacidad de mantener la homeostasis de los mismos a bajas temperaturas, cuyos efectos se extienden en cascada a través de los tejidos y niveles de organización biológica para generar los fenotipos de tolerancia al frío que se observan (Overgaard & MacMillan, 2017). La homeostasis iónica surge de un equilibrio regulado entre la deriva pasiva de los iones a lo largo de sus gradientes electroquímicos y la actividad de transportadores de iones. Al menos una de estas dos razones hacen que los insectos pierdan el equilibrio iónico durante su exposición al frío. Tanto los organismos que evitan la congelación, como los tolerantes han desarrollado mecanismos para manejar este estrés (Zachariassen et al., 2004).

La adaptación de insectos a bajas temperaturas nos proporciona un marco para estudios fisiológicos, basados en la importancia de su predicción de respuesta frente a escenarios climáticos futuros y como el genoma evolucionó en ese contexto. Por ello, siendo *A. morenensis* un insecto completamente adaptado a la vida a bajas temperaturas, es de especial interés el estudio de cómo funciona el sistema nervioso y cómo actúan los canales iónicos en estas condiciones. La adaptación necesaria de estos insectos implica un modo normal de vida que es estresante para la mayoría de los insectos estudiados hasta el momento.

2.7. Genómica y transcriptómica en insectos

La genómica involucra el estudio de la información total contenida en el ADN de un organismo (Wolf, 2013), permitiéndonos llegar a preguntas complejas e informativas sobre las asociaciones genotipo-fenotipo (Diniz & Canduri, 2017). El estudio de la información genómica nos permite inferir, basados en el dogma central de la biología molecular

postulado por Francis Crick (1958), el flujo unidireccional de información desde el ADN, inferir los ARN mensajeros (ARNm) y las proteínas codificadas por ellos (Crick 1958; Crick 1970).

Principalmente la síntesis y maduración del ARN, se encuentra involucrada en la expresión de genes que regulan diferentes procesos biológicos, tal como el desarrollo de adaptaciones a condiciones de estrés o cambios en el medio ambiente (Marguerat & Bähler, 2010) esenciales para interpretar y comprender los elementos funcionales del genoma (Kukurba & Montgomery, 2015). Cabe destacar que a diferencia del genoma, que es en esencia una entidad estática, el transcriptoma puede ser modulado por factores tanto externos como internos (Velculescu et al., 1997).

Dentro de la transcriptómica, la utilización de tecnologías de secuenciación como RNA-seq, permite lecturas de mapeo, cuantificación de alto rendimiento y una mayor precisión, en relación a otras tecnologías utilizadas (Wang et al., 2009). Además, permite el análisis de expresión diferencial y la identificación de isoformas resultantes del empalme alternativo (Marguerat & Bähler, 2010). Este método consiste en: extracción de ARN (ARNm), transcripción del ARNm a ADN complementario (ADNc), amplificación y secuenciación (Haas & Zody, 2010). La accesibilidad a toda esta información nos permite responder preguntas basadas en la adaptación y especiación local, así como también en la evolución de los perfiles de expresión genética que adquieren los insectos en diversas condiciones ambientales a las que se encuentran expuestos diariamente.

2.8. Bioinformática

La Bioinformática se ha convertido en una ciencia esencial para la genómica y la biología molecular, que tienen como finalidad responder a preguntas de origen biológico. La organización de los genomas, el “descubrimiento” de genes, la relación entre diversas mutaciones y la alteración en la función biológica o en la evolución de diferentes organismos, entre muchas otras, facilitaron el desarrollo de disciplinas derivadas como la proteómica y la filogenómica (Hernández, 2008). La bioinformática y la genómica que han evolucionado de forma interdependiente, promueven un impacto notable en el conocimiento biológico disponible hasta el momento, transformando la información pura en conocimiento (Diniz & Canduri, 2017).

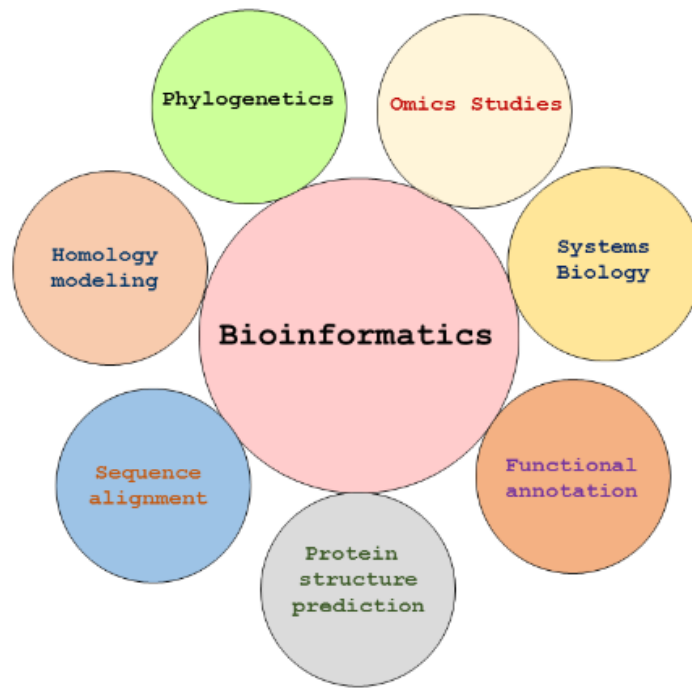


Figura 2.4. Algunas de las aplicaciones de la bioinformática (Diniz & Canduri, 2017).

Ante la explosión de miles de datos disponibles, la bioinformática provee un nodo entre disciplinas aparentemente dispares para comprender y explicar con hipótesis plausibles la adaptación de *A.morenensis* a las bajas temperaturas (**Figura 2.4**).

2.9. Filogenia

Plecoptera, es un pequeño orden de insectos neópteros y paurometábolos (Pessacq, 2009), con desarrollo hemimetábola que incluye aproximadamente 3700 especies existentes en todo el mundo (**Figura 2.5**) (DeWalt & Ower, 2019), siendo su diversidad más alta en regiones templadas (Fochetti & De Figueroa, 2008). La adaptación a una amplia gama de condiciones hace que los Plecópteros sean un orden de interés biológico (Kondratieff et al., 2019).

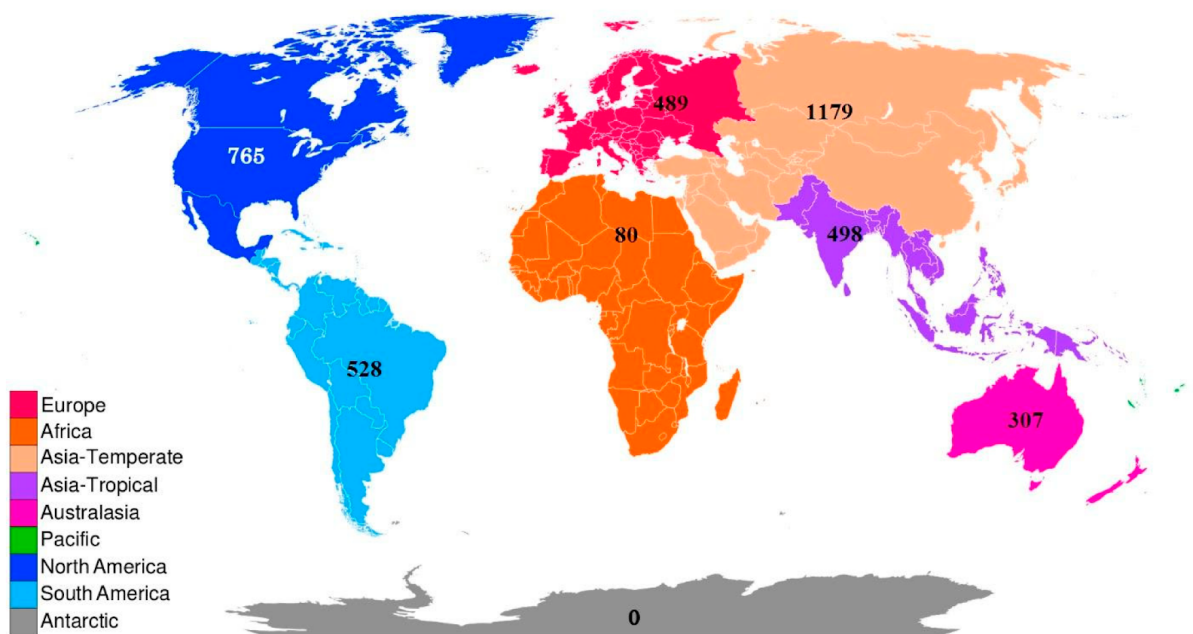


Figura 2.5. Esquema Geográfico Mundial de Plecópteros. Los números indican la riqueza de especies conocidas hasta el año 2018. (DeWalt & Ower, 2019).

Pese a que la monofilia del orden Plecoptera se encuentra apoyada por caracteres apomorfos compartidos (Kukalová-Peck, 1991), su relación con el resto de los insectos continúa sin esclarecer.

Zwick (2000, 2009), considera que la posición de este orden es problemática y que los estudios moleculares no han aportado una solución definitiva, no obstante, habría evidencia a favor de la relación de Plecoptera como grupo hermano de los Polyneoptera o de los Neoptera (Lanteri & Del Río, 2011). Actualmente su esquema clasificatorio y zoogeográfico más aceptado contempla dos subórdenes: Antartopterlaria (cuatro familias endémicas del hemisferio sur) y Arctopterlaria (12 familias presentes fundamentalmente en el hemisferio Norte). Este esquema de clasificación encuentra apoyo parcial en los análisis de Terry & Whiting (2004), que incluyen información morfológica y molecular de un amplio muestreo de taxones.

2.10. La importancia de los insectos como objeto de estudio

Los insectos son el grupo con mayor éxito evolutivo (Purvis y Hector, 2000) siendo claves para diversos proyectos de investigación, por su función en los ecosistemas, por su competencia, por su capacidad de transmitir enfermedades, entre otros.

Haciendo hincapié en este último y en relación a este TFG, es importante destacar que el sitio de acción de los insecticidas piretroides es el canal de sodio dependiente de voltaje, en

donde mutaciones (kdr) han sido implicadas en la resistencia a insecticidas de varias especies de insectos (Fabro et al., 2012; Capriotti et al., 2014).

Esta característica y muchas otras más han llevado a los insectos a ocupar y explotar un incalculable número de nichos en los diferentes ecosistemas, así como a establecer relaciones con otros organismos. Esta relación de las diferentes especies de insectos y su ambiente los ha convertido en excelentes indicadores de las condiciones de los ecosistemas, ya que algunos presentan estrechos límites de tolerancia a algunos factores ambientales que en ausencia de estos la presencia de las especies de insectos no se puede dar. Mientras que otros son capaces de tolerar y ocupar ambientes fuertemente alterados encontrando estas condiciones como las ideales para su supervivencia.

A nivel científico, los investigadores tenemos el reto de describir y comprender la biología de la mayoría de especies de insectos, que aún no han sido descritas en los diferentes ecosistemas del planeta. Es por ello que es importante estudiar insectos que no sean modelos convencionales, investigando sus mecanismos genéticos para el aporte de nuevos conocimientos a la comunidad científica.

3. HIPÓTESIS

Los canales de sodio dependientes de voltaje en *Andiperla morenensis* presentan cambios de secuencia aminoacídica que reflejan adaptaciones a bajas temperaturas.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar el canal de sodio dependiente del voltaje de *Andiperla morenensis* a fin de comprender su funcionalidad a bajas temperaturas.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar y caracterizar *in silico* el transcriptoma de *A. morenensis* para identificar canales iónicos con foco en los canales de sodio regulados por voltaje (VGSC).
2. Analizar las relaciones filogenéticas del VGSC de *A. morenensis*.
3. Evaluar la expresión del transcripto identificado de VGSC en *A. morenensis*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Recolección de ejemplares

Los ejemplares de *Andiperla morenensis* fueron recolectados en diversas campañas durante los años 2021, 2022 y 2023, bajo la autorización de Investigación de la Administración de Parques Nacionales (DRPA 116). A lo largo de las mismas se recorrieron diversas áreas protegidas como: los glaciares Perito Moreno, Upsala (Parque Nacional Los Glaciares), y Castaño Overa (Parque Nacional Nahuel Huapi). Fueron permitidos como máximo la recolección de 20 ejemplares de *A. morenensis*, dípteros y colémbolos (estos últimos fueron recolectados con finalidades ajenas al presente trabajo de investigación) por campaña en cada glaciar. Se recorrió el hielo superficial de manera aleatoria para la recolección de adultos y se obtuvieron larvas de pozones.

5.2. Datos de Secuencia

El transcriptoma y el genoma de *Andiperla morenensis* utilizado en este trabajo, pertenece al grupo de investigación del laboratorio del Centro de Bioinvestigación (Pergamino, Buenos Aires). El transcriptoma, proveniente de ejemplares adultos y larvas y el genoma obtenido de individuos adultos fue obtenido a partir de ARN de larvas y adultos (Baricalla, Timmermann, Jäckle y Rivera Pomar, resultados no publicados) y de hembras adultas individuales (Baricalla, Timmermann, Jäckle y Rivera Pomar, resultados no publicados)..

5.3. Análisis *in silico* del transcriptoma de *Andiperla morenensis*

El análisis *in silico* consiste en analizar mediante la implementación de diferentes software y programas bioinformáticos, el transcriptoma de *A. morenensis* recopilando información de nuestro interés, con el objetivo de identificar y comprender a nivel evolutivo los canales de sodio dependiente de voltaje tal como se detalla en los incisos siguientes.

5.3.1. Búsqueda y selección de transcriptos

Se llevó a cabo una revisión de los transcriptos ensamblados, a través de la búsqueda y clasificación manual de aquellos que poseían ontología génica (GO) relacionada con los diversos canales iónicos. En base a ello, hicimos hincapié principalmente en las tres ontologías básicas que describen los procesos biológicos, las funciones moleculares y los componentes celulares en los que se encuentra involucrado el canal de sodio dependiente de voltaje (VGSC).

5.3.2. Identificación del canal de sodio activado por voltaje

Con la finalidad de identificar si efectivamente el transcrito seleccionado correspondía al canal de sodio dependientes de voltaje, se realizó un alineamiento local con la herramienta “BLAST” (Basic Local Alignment Search Tool) que comparó la secuencia nucleotídica del canal con dos bases de datos compuestas por secuencias tanto nucleotídicas (mediante BLASTn) como proteicas (mediante BLASTx) de especies del orden Insecta, y se comparó con aquellas que reportaron hits con un e-value menor a 10^{-10} y un mínimo de cobertura del 90%. Se utilizó como referencia las secuencias disponibles en la base de datos (BD) de NCBI (National Center for Biotechnology Information).

5.3.3. Identificación del gen canal de sodio en el genoma de *A. morenensis* y otros plecopteros.

Con la finalidad de identificar el marco de lectura del gen que codifica el canal de sodio se procedió a utilizar la herramienta miniprot (Li, 2023) la cual alineó la secuencia proteica identificada por BLAST (ver sección 5.3.2) contra el genoma de *A. morenensis* (Baricalla, Timmermann, Jäckle y Rivera Pomar, resultados no publicados) o de los genomas ensamblados a nivel cromosómico de plecopteros disponibles en NCBI (Anexo 1).

Este programa permite obtener en simultáneo el alineamiento de la proteína al genoma y la estructura del gen (marco de lectura completo, intrones y exones) en formato GFF.

Se llevaron a cabo análisis detallados del gen mediante la lectura de las posiciones de cada exón. Estas posiciones fueron posteriormente normalizadas con respecto a la posición 1 del primer nucleótido. Para realizar este proceso de manera eficiente, se utilizó el archivo en formato GFF, el cual fue leído en el entorno de programación R (<https://www.R-project.org/>) mediante el paquete rtracklayer. Finalmente y con el objetivo de visualizar de manera gráfica la estructura génica, se empleó el paquete ggtranscript. Este paquete permitió la

generación de gráficos que representan de forma clara y precisa tanto los exones como los intrones del gen analizado.

Se realizó un análisis exhaustivo de correlación entre el tamaño del gen bajo estudio y el genoma de cada individuo. Para llevar a cabo este estudio, se procedió a la lectura de una tabla de datos utilizando R (<https://www.R-project.org/>). A continuación, se ajustó un modelo lineal utilizando la función `lm` del paquete `stats`, permitiendo así explorar la relación entre las variables de interés.

La visualización de los resultados se llevó a cabo mediante la creación de un gráfico utilizando el paquete `ggplot` (<https://ggplot2.tidyverse.org>). Este gráfico incluye información crucial para interpretar la correlación, tales como el coeficiente de correlación, la significancia estadística y las bandas de confianza.

5.3.4. Análisis de dominios proteicos

Llevamos a cabo el análisis y caracterización de los dominios proteicos que componen el VGSC a partir de métodos de inferencia probabilísticos basados en modelos ocultos de Markov (HMM) con el servidor web HMMer (<http://hmmer.org/>), reforzada con la herramientas de predicción de dominios transmembrana DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM/>) dado su carácter de canal proteico transmembrana.

5.3.5. Análisis de similitud de secuencia de las proteínas

A partir de la secuencia identificada del VGSC, se realizaron varios alineamientos mediante BLASTp en función de comparar secuencias de especies filogenéticamente cercanas a los plecópteros. Para ello, partimos de secuencias presentes en la BD de NCBI y Uniprot de un total de 34 especies filogenéticamente con diferente grado de cercanía evolutiva, como: *Zootermopsis nevadensis*, *Schistocerca americana*, *Diaphorina citri*, *Orchesella cincta*, *Folsomia candida*, *Bemisia tabaci*, *Plutella xylostella*, *Cimex lectularius*, *Bombyx mori*, *Monomorium pharaonis*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda*, *Apis cerana*, *Cryptotermes secundus*, *Spodoptera litura*, *Stomoxys calcitrans*, *Schistocerca gregaria*, *Fopius arisanus*, *Drosophila melanogaster*, *Ceratitis capitata*, *Bactrocera dorsalis*, *Anopheles funestus*, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, *Tribolium castaneum*, *Halyomorpha halys*, y los plecópteros *Isoperla grammatica*, *Leuctra nigra*, *Vespula pensylvanica*, *Brachyptera putata*, *Nemurella pictetii*, *Nemoura dubitans* y *Protonemura montana*. En cada uno de los alineamientos se tuvieron en cuenta los parámetros de longitud del alineamiento, los sitios conservados y los sitios variables.

5.3.6. Análisis filogenético

Utilizando el software MEGA x (v.10.2.6) se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias por medio de ClustalW, optimizado por HMM. Luego se llevó a cabo un análisis de inferencia filogenética bayesiana y la construcción del respectivo árbol mediante el software BEAST2 (v2.7), con 1 millón de generación y un burning del 10%. El mismo se visualizó en iTols (<https://itol.embl.de/>). Esto nos permite determinar las relaciones filogenéticas y contribuir a conocer mejor la posición aún incierta de los Plecópteros dentro de la filogenia de los insectos.

5.4. Expresión del transcripto

Para validar las predicciones bioinformáticas y por tanto, la expresión del transcripto de VGSC, se llevaron a cabo técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), correspondiente a las distintas regiones codificantes de los dominios (I-IV) que conforman el canal. Las muestras corresponden a ejemplares completos, cerebro y cordón nervioso.

5.4.1.Extracción de ARN

El ARN fue purificado de una variedad de muestras biológicas (insectos completos, cerebro, cuerda nerviosa, intestino y cuerpo graso) de *A. morenensis* siguiendo el protocolo optimizado de TRIzol (Invitrogen, EEUU) de acuerdo a lo establecido por los fabricantes. Las disecciones fueron realizadas bajo lupa en solución salina.

Brevemente cada individuo (larva o adulto) se disecó para exponer los tejidos blandos y fue homogeneizado entero en 400 microlitros de TRIZOL en un tubo eppendorf de 1,5 ml usando una mano de mortero de plástico descartable. El homogenato se centrifugó a máxima velocidad en una microcentrífuga tipo eppendorf por 5 minutos para remover los trozos de cutícula (que no se disuelve en trizol) y el sobrenadante se pasó a un nuevo eppendorf. Se agregaron 60 microlitros de cloroformo, se agitó en vortex por 10 segundos y se centrifugó a máxima velocidad en una microfuga tipo eppendorf por 15 minutos a temperatura ambiente. Separadas las fases, se transfirió la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo y se precipitó el ARN con 0,8 volúmenes de isopropanol incubando a temperatura ambiente por 5 minutos y posteriormente por centrifugación a máxima velocidad por 10 minutos. El precipitado (ARN total) se lavó con etanol al 70% y se secó

brevemente al aire. Este precipitado se disolvió en agua libre de RNases y se midió la concentración por espectrofotometría. El ARN se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Este mismo procedimiento pero ajustando los volúmenes a la mitad se usó para aislar ARN de tejidos individuales disecados de individuos adultos.

5.4.2. Síntesis de ADN copia (ADNc)

Se sintetizó ADNc a partir del ARN proveniente de los distintos tejidos (inciso 5.4.1.) usando el kit Maxima (Thermo Scientific). Para cada caso se partió de 1 µg de ARN total (individuos completos) o 0,1 µg (tejidos aislados) obtenido como se describe en la sección 5.4.2. El protocolo incluyó un pretratamiento con dsDNase con el fin de eliminar posibles contaminaciones de ADN genómico que pudieran enmascarar la detección del ARNm.

10X dsDNase Buffer	1 µl
dsDNase	1 µl
ARN	volumen variable (0,1-1,0 µg)
Agua	csp completar 10 µl

Se mezclaron los componentes y se incubó 2 min a 37°C, luego de lo cual se agregó:

5X buffer de reacción	4 µL
Transcriptasa reversa	2 µL
Agua	4 µL

La reacción de transcripción reversa, que usó una mezcla de random primer y oligodT. Se incubó por 10 min a 25°C y por 30 min a 50°C. Para mejorar la eficiencia de producción del cDNA correspondiente al ARNm completo se realizaron cDNAs con incubaciones a distintas temperaturas 52.9 °C , 59.1 °C y 64 °C (ver resultados). Las enzimas se inactivaron por incubación por 5 min a 85 °C.

En caso de individuos adultos, los productos de reacción se normalizaron a un equivalente de concentración de ARN total de partida agregando agua para llegar a un equivalente de 100 ng de RNA total / µL.

5.4.3. Diseño de *primers*

El canal de sodio depende del voltaje tiene un tamaño de 6162 pb (o 6,1 kb): dominio I de 1540 pb, dominio II de 1540 pb, dominio III de 1540 pb y dominio IV de 1542 pb. En base a ello se buscó amplificar al canal en bloques correspondientes a sus respectivos dominios funcionales debido a su gran tamaño. Se diseñaron primers específicos por medio del programa online Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>) con corrección de forma manual, los cuales se muestran en la siguiente tabla:

<i>Primer</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Dominio</i>
5'UTR Fw	<u>ATGTCAGAGATCTCGGACACCATCTCAGAGG</u>	I
5'UTR Rv	<u>ATGAGCATACGAAGCGACGGGGGCGACTCCGTCAGCGAAC</u>	I
5'UTR Fw	<u>GATGAGCATACGAAGCGACGGGGGCGACTCCGTCAGCGAAC</u>	II
5'UTR Rv	<u>GGCTCGTCGAATCTATCGGCGCCGGCCGCCGACAACGACAC</u>	II
5'UTR Fw	<u>GGCTCGTCGAATCTATCGGCGCCGGCCGCCGACAACGACA</u>	III
5'UTR Rv	<u>ATCTTTGGATCTTTCTTCACTCTCAACCTGTTTCATCGGAG</u>	III
5'UTR Fw	<u>CATCTTTGGATCTTTCTTCACTCTCAACCTGTTTCATCGGAG</u>	IV
5'UTR Rv	<u>GCGGTCGCCGAGCGTCACGTCGCGATCCACGGACGTCTGA</u>	IV
5'UTR Fw	CCGGTGCCGCCCCCACTGTTAGC	ARNm
5'UTR Rv	CCCCGGGCGACGCTCGGCCGGTGG	ARNm
AUG Fw	ATGTCAGAGATCTCGGACACCATCTCAGAG	ORF
Stop Rv	GGCTCAGACGTCCGTGGATCGCGACGT	ORF

5.4.4. Amplificación por PCR

Para la amplificación por PCR del transcripto se usó la técnica Hot Start PCR, que inhibe la actividad de la polimerasa o la incorporación de dNTP durante la preparación de la reacción hasta que se produce un paso de activación por calor. Esto permite mayor especificidad, sensibilidad y rendimiento en la reacción de PCR, ya que evita la extensión de productos inespecíficos en las etapas de preparación de la reacción. Para el eventual clonado se

utilizó la enzima Q5 (New England Biolabs), que tiene mayor fidelidad, en tanto para detectar el transcripto se usó la polimerasa Taq que es mucho más procesiva y permite una mayor sensibilidad de detección.

La mezcla de reacción se compuso por: Buffer (1X), Cl_2Mg (3 mM), DNTPs (25 μM), primer Fw (0,5 μl), primer Rv (0,5 μl), polimerasa (Taq o Q5) en un volumen total de entre 10 μl (amplificación analítica) y 50 μl (amplificación preparativa), usando ADNc (0,5 μl) como molde y agua ultrapura. El programa de amplificación fue variable dependiendo de la extensión necesaria o la temperatura de hibridación de los primers.

Los productos de PCR resultantes se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 % y se detectaron usando Sybr Green. La identidad de los productos amplificados se confirmó por secuenciación usando los primers usados para la amplificación. Las reacciones de secuenciación fueron realizadas por Microsynth (Göttingen, Alemania).

6. RESULTADOS

6.1. Identificación de canales iónicos en *A. morenensis*.

A partir de la revisión manual por términos GO de los transcritos ensamblados, se identificaron diferentes canales iónicos (K⁺, Ca²⁺ y Na⁺; **Tabla 6.1**).

Tabla 6.1. Transcritos de *A. morenensis* atribuidos a canales iónicos (K⁺, Ca²⁺ y Na⁺).

Transcript	Uniprot	Description
TRINITY_DN1218_c1_g1	KCNN_DROME	Small conductance calcium-activated potassium channel protein
TRINITY_DN618_c0_g1	SLO_DROME	Calcium-activated potassium channel slowpoke
TRINITY_DN17489_c0_g1	KCNAW_DROME	Potassium voltage-gated channel protein Shaw
TRINITY_DN22647_c0_g1	KCNAB_DROME	Potassium voltage-gated channel protein Shab
TRINITY_DN125984_c1_g1	NCKXH_DROME	Probable sodium/potassium/calcium exchanger CG1090
TRINITY_DN1086_c4_g1	SLO_DROME	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II alpha chain
TRINITY_DN12065_c1_g1	CAPS_DROME	Calcium-dependent secretion activator
TRINITY_DN150368_c1_g1	CAC1A_DROME	Voltage-dependent calcium channel type A subunit alpha-1
TRINITY_DN1570_c1_g1	CAC1D_DROME	Voltage-dependent calcium channel type D subunit alpha-1
TRINITY_DN23816_c0_g1	FLOWR_DROGR	Calcium channel flower
TRINITY_DN18706_c0_g1	UNC80_DROME	Protein unc-80 homolog
TRINITY_DN2763_c5_g1	IR40A_DROME	Ionotropic receptor 40a
TRINITY_DN26439_c0_g1	IR25A_DROME	Ionotropic receptor 25a
TRINITY_DN63474_c0_g1	TIPE_DROME	Protein tipE
TRINITY_DN12528_c0_g1	SCNA_DROME	Sodium channel protein para
TRINITY_DN2070_c1_g1	PAIN_DROME	Transient receptor potential cation channel protein painless
TRINITY_DN72254_c0_g1	PPK28_DROME	Pickpocket protein 28
TRINITY_DN10553_c0_g1	ACH3_DROME	Acetylcholine receptor subunit beta-like 1

TRINITY_DN40581_c0_g1	ACH1_DROME	Acetylcholine receptor subunit alpha-like 1
TRINITY_DN34661_c0_g1	TRPA1_DROME	Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1
TRINITY_DN21782_c1_g1	PYX_DROME	Transient receptor potential channel pyrexia

Entre los distintos canales, este Trabajo Final de Grado se enfoca en el VGSC, del cual se determinaron 24 isoformas en el transcriptoma (**Tabla 6.2**). Estas variantes no necesariamente indican diferentes transcritos o splicing alternativo, sino probablemente formas aún no procesadas de pre-ARNm o ADNc parciales. Confirmar esto, requerirá un estudio más detallado de las distintas variantes.

Tabla 6.2. Isoformas correspondientes al VGSC de *A. morenensis*.

Transcriptos VGSC
TRINITY_DN12528_c3_g1_i1
TRINITY_DN12528_c2_g1_i2
TRINITY_DN12528_c0_g1_i4
TRINITY_DN12528_c0_g1_i6
TRINITY_DN12528_c0_g1_i7
TRINITY_DN12528_c0_g1_i8
TRINITY_DN12528_c0_g1_i9
TRINITY_DN12528_c0_g1_i11
TRINITY_DN12528_c0_g1_i12
TRINITY_DN12528_c0_g1_i13
TRINITY_DN12528_c0_g1_i14
TRINITY_DN12528_c0_g1_i16
TRINITY_DN12528_c0_g1_i17
TRINITY_DN12528_c0_g1_i18
TRINITY_DN12528_c0_g1_i19
TRINITY_DN12528_c0_g1_i21
TRINITY_DN12528_c0_g1_i23

TRINITY_DN12528_c0_g1_i24
TRINITY_DN12528_c0_g1_i27
TRINITY_DN12528_c0_g1_i29
TRINITY_DN12528_c0_g1_i31
TRINITY_DN12528_c0_g1_i32
TRINITY_DN12528_c0_g1_i34
TRINITY_DN12528_c0_g1_i38

Con el fin de avanzar en el estudio del VGSC, Se enfocó el análisis en una única variante, la isoforma 13 (TRINITY_DN12528_c0_g1_i13.p1) de 6229 nucleótidos ensamblados codificando un marco de lectura abierto de 2013 aminoácidos, el cual presenta un consenso con identidad del 70% y e-value=0 para canales de sodio dependiente de voltaje,. La secuencia ensamblada y traducida sigue a continuación.

```

ccg ccc ccg gtg ccg ccc ccc act gtt agc acc ggc ccc cga cca cga gcg gcc taa tca
cga cga cga gga gtc atg tca gag atc tcg gac acc atc tca gag gaa gaa cgt agc ttg
      M   S   E   I   S   D   T   I   S   E   E   E   R   S   L
ttc cgt ccg ttc acg aga gag tcg gcc gcc atc gag act cgc atc gcc gaa gaa aat
F   R   P   F   T   R   E   S   L   A   A   I   E   T   R   I   A   E   E   N
gct aaa cag aag gag ctc gaa aag aaa aga gct gaa gga gag gtt cgg tat gag gac gag
A   K   Q   K   E   L   E   K   K   R   A   E   G   E   V   R   Y   E   D   E
gac gaa gat gaa ggg ccc caa ccg gac gcg gcg ttt gaa cag ggg gcc ccc att ccc gtc
D   E   D   E   G   P   Q   P   D   A   A   F   E   Q   G   A   P   I   P   V
cga atg cac agc agt ttt ccc gct gag ctt gcc tca acg ccc ctg gaa gac atc gat ggc
R   M   H   S   S   F   P   A   E   L   A   S   T   P   L   E   D   I   D   G
ttc tac cac aat cga agg acg ttt gta gtg gtg agc cgc gga aag gac atc ttc cgc ttc
F   Y   H   N   R   R   T   F   V   V   V   S   R   G   K   D   I   F   R   F
agc gcc acg gac gcc atg tgg att cta gat ccg ttc aat ccg ttg cga cgc acg gcc atc
S   A   T   D   A   M   W   I   L   D   P   F   N   P   L   R   R   T   A   I
tat ata ctc gtt cat ccg ctg ttt tct gtg ttc atc atc acc acc atc ttg acc aac tgc
Y   I   L   V   H   P   L   F   S   V   F   I   I   T   T   I   L   T   T   N   C
atc ttc atg att atg cct ccc acg cct aca gta gag tcg acc gaa gta ata ttt act ggc
I   F   M   I   M   P   P   T   P   T   V   E   S   T   E   V   I   F   T   G
atc tac acg ttt gaa tca gct gta aaa gtg atg gcg agg ggc ttc ata ctt cag cca ttc
I   Y   T   F   E   S   A   V   K   V   M   A   R   G   F   I   L   Q   P   F
acg tac ctt aga gat gca tgg aac tgg ctg gac ttc gta gtg ata gct tta gct tat gtt
T   Y   L   R   D   A   W   N   W   L   D   F   V   V   I   A   L   A   Y   V
aca atg ggg ata gat cta gga aat ttg gca gcc ctg aga acg ttc agg gta ctc cga gcg
T   M   G   I   D   L   G   N   L   A   A   L   R   T   F   R   V   L   R   A
ctc aag act gtg gcg att gtg cca ggg ttg aaa acc atc gtg ggc gct gtc atc gag tcc
L   K   T   V   A   I   V   P   G   L   K   T   I   V   G   A   V   I   E   S
gtg aag aat ctg cgt gat gtg atc atc ctc acc atg ttt tcg cta tcg gtg ttc gcc ctg
V   K   N   L   R   D   V   I   I   L   T   M   F   S   L   S   V   F   A   L
atg ggc ctt cag atc tac atg ggc gtc ctc acg cag aag tgc gtg ctc aag ttt ccc atg
M   G   L   Q   I   Y   M   G   V   L   T   Q   K   C   V   L   K   F   P   M
gac ggc tcg tgg ggc aac ttg tcg cac gag aac tgg ctg gcc ttc aac agc aac tgc agt
D   G   S   W   G   N   L   S   H   E   N   W   L   A   F   N   S   N   C   S
cac tgg tac agg ccg gcg gac gcg ttt gaa tat ccg gtg tgt gga aac tcg tct gga gcg
H   W   Y   R   P   A   D   A   F   E   Y   P   V   C   G   N   S   S   G   A
ggg aca tgc gaa gaa gag tac atc tgt ctg caa ggc ttc ggt gac aat ccc aac tat ggc
G   T   C   E   E   E   Y   I   C   L   Q   G   F   G   D   N   P   N   Y   G

```

tac acg agc ttc gac tcg ttc ggc tgg gcg ttc ctg tcg gcg ttc cgc ctg atg acg caa
 Y T S F D S F G W A F L S A F R L M T Q
 gac tac tgg gag aac ctc tac cag ctg gtg ctg cgc tcg gcc ggg cca tgg cac atg ctc
 D Y W E N L Y Q L V L R S A G P W H M L
 ttc ttc atc gtc atc atc ttc ctc ggc tcg ttc tac ctg gtc aac ttg atc ctg gcc att
 F F I V I I F L G S F Y L V N L I L A I
 gtc gcc atg tcg tac gac gag ctg caa aag aaa gcg gaa gag gaa gag gcg gcg gaa gag
 V A M S Y D E L Q K K A E E E E A A E E
 gag gcg atc cgg gaa gcc gat gag gct gcc cgg gcg aag gag gct cga act gct gcg cgc
 E A I R E A D E A A R A K E A R T A A R
 acg gct gcg agg gaa gca cgc gcc ctc gca gcc gag caa cac agc gtt gtc aag tct cct
 T A A R E A R A L A A E Q H S V V K S P
 tcg gac ttc tct tgc cac agc tac gag ctg ttt gtt ggc cag gag aaa ggc aac gac gac
 S D F S C H S Y E L F V G Q E K G N D D
 aac aac aag gag aag atg agc ata cga agc gac ggg ggc gac tcc gtc agc gaa cac aag
 N N K E K M S I R S D G G D S V S E H K
 tct cgg ctg gcg aac aag acg agg aag tcg agt gcg gca agt ttg agt ctg ccc gga tcc
 S R L A N K T R K S S A A S L S L P G S
 cca ttc aac atg cgc cgg ggc tca agg ggc agc cat cag ttc acc ctg aga aac gcc cga
 P F N M R R G S R G S H Q F T L R N A R
 ggg cgc ttg gcc ggc cca ccc gga ggc gac cgg aaa cct ctg gtg cta tcc acg tac ctc
 G R L A G P P G G D R K P L V L S T Y L
 gat gct cag gag cac ctg ccg tac gcg gac gac tcg aac gcc gtg acg ccc atg tcc gag
 D A Q E H L P Y A D D S N A V T P M S E
 gag aac ggt gcc atg gtc gtg ccg atc tac tac gcg tcg ctc ggc tca cgc cac tcg tcg
 E N G A M V V P I Y Y A S L G S R H S S
 tac acg tcg cat cag tcg cgc gtg tcg tac acg tcc cac ggt gat ctg ctg ggc gcc ggc
 Y T S H Q S R V S Y T S H G D L L G A G
 aag ggc atg acc aag gag gat cga ctg cgg tcg agg tcg gcg agg aac aac gtg ccg aac
 K G M T K E D R L R S R S A R N N V P N
 tcg acg ccg tac atg gcg gac tcg aat cac aaa cag acg agg gac tat gac gca tcg tgt
 S T P Y M A D S N H K Q T R D Y D A S C
 gaa agc gac gat gga gct acg aaa atg aaa cac caa gat aat ccg ttt atc gag ccc aca
 E S D D G A T K M K H Q D N P F I E P T
 caa cac cag acg gtg gtc gac atg aga gat gtg atg gtg ttg aac gac ata att gaa cag
 Q H Q T V V D M R D V M V L N D I I E Q
 gcg gcg ggt ccg caa agt agg gca agc gaa cat ggt gcc gac gag gaa gcc ggc cca
 A A G R Q S R A S E H G A D E D E D G P
 acg gtc aag gaa cag atc gtg gcc gtg tgc atg aag ggc ctc gac acg ttc tgc gtg tgg
 T V K E Q I V A V C M K G L D T F C V W
 gac tgc tgc tgg ttg tgg ctc aag ttt caa gag tat gtc gcg ctg atc gtg ttc gac ccg
 D C C W L W L K F Q E Y V A L I V F D P
 ttc gtc gag ctg ttc atc acg ctc tgc atc gtc gtc aac acg ctg ttc atg gcg ctc gac
 F V E L F I T L C I V V N T L F M A L D
 cac tac gac atg gac aag gag atg gag aag gtg ctc aag agc ggc aac tac ttt ttt acg
 H Y D M D K D M E K V L K S G N Y F F T
 gca aca ttc gct ata gaa gca acc atg aag ctg atg gcc atg agt ccc aag ttt tac ttc
 A T F A I E A T M K L M A M S P K F Y F
 caa gaa ggg tgg aac att ttc gac ttc atc atc gtc gca ctc tct cta gtc gaa ctg ttg
 Q E G W N I F D F I I V A L S L V E L L
 ctc gag ggg gtg cag gga ctg tcg gtg tta cga tcg ttc cga ttg ttg cga gtg ttc aag
 L E G V Q G L S V L R S F R L L R V F K
 ctg gcc aag tcg tgg ccc act ctg aac ctg ctg atc tcc atc atg ggt cgc aca gtt ggc
 L A K S W P T L N L L I S I M G R T V G
 gcg ctc ggc aac ttg acc ttc gtc ttg tgc atc atc ata ttc atc ttc gcc gtc atg ggc
 A L G N L T F V L C I I I F I F A V M G
 atg caa ctg ttc ggc aag tac aca gac cac tac cac cgc ttc tac gat cac tcg atg
 M Q L F G K N Y T D H Y H R F Y D H S M
 cct cga tgg aac ttc acc gac ttc atg cac tcg ttc atg atc gtg ttc cgc gtg ctg tgc
 P R W N F T D F M H S F M I V F R V L C
 ggg gag tgg atc gag tcc atg tgg gac tgc atg ctc gtg ggc gac tgg tcg tgc gtg cct
 G E W I E S M W D C M L V G D W S V P
 ttc ttc ctg gcc acc gtc gtc atc ggc aac ttg gtc gta ctg aac ctc ttc tta gcc ttg
 F F L A T V V I G N L V V L N L F L A L
 ctg ctc agc aac ttc ggc tcg tcg aat cta tcg gcg ccg gcc gcc gac aac gac aca aac
 L L S N F G S S N L S A P A A D N D T N
 aag atc acc gag gcg ttc aat cgc atc tcg cga ttc aac gcc tgg gtc aag cga agt ctg
 K I T E A F N R I S R F N A W V K R S L

ttg aac ttg gcc aaa atg ttg cgc gcc aaa ctg acc aat cag att tca gac cag acg cca
 L N L A K M L R A K L T N Q I S D Q T P
 gct gtc gac ggg gat ggg atc gcg ggc gac gag atc ctg gcc gac ggc ctg gtg tac cgg
 A V D G D G I A G D E I L A D G L V Y R
 gac aag aag agc ccc aag gac cag aac cag ctg gag gtg gca ata gga gac ggc atg gag
 D K K S P K D Q N Q L E V A I G D G M E
 ttc acg ata cat gga gat ttg aaa aac aaa ttg aaa aag gga aag cta cta ctg aac aac
 F T I H G D L K N K L K K G K L L L N N
 aca aag tct atc ggc aat cac aca gac aat cga atc gag aat gat tat atg ata aac cat
 T K S I G N H T D N R I E N D Y M I N H
 atg gac gaa gac acc cta agt ata aaa tcc tac ggc agc cat aaa aac cgt cca ttc aag
 M D E D T L S I K S Y G S H K N R P F K
 gat gaa agt cac aag ggt agt tta aat aca atg gat ggg gag gaa aag aaa gac gca agt
 D E S H K G S L N T M D G E E K K D A S
 aag gaa gat ctt gac caa gat ggc gac ctg gaa gac gac ggc gag ggt gac gag gag ccg
 K E D L D Q D G D L E D D G E G D E E P
 ctg gaa gag gac atc atc gtg gac gcg ggc acc gag gac gta ctg ctg caa gac tat ccg
 L E E D I I V D A G T E D V L L Q D Y P
 gcc gac tgc ttc tcg gaa aac tgc tac aag cgg ttc ccc ttc ctc gcc ggc gac gac gac
 A D C F S E N C Y K R F P F L A G D D D
 gcg ccg ttc tgg caa gga tgg gcc aat ctg cga ctc aag acg ttc cag ctg atc gag aac
 A P F W Q G W A N L R L K T F Q L I E N
 aag tac ttc gag acg gcc gtc atc acc atg atc ctg ctc agc agt ctc gca ttg gct ttg
 K Y F E T A V I T M I L L S S L A L A L
 gag gac gtt cag ctg caa tac cgg ccg atc ctg caa gac gtg ctg tac tac atg gac aga
 E D V Q L Q Y R P I L Q D V L Y Y M D R
 atc ttc acc gtc atc ttc ttc atc gag atg ttg gtg aaa ttc ctc gcg ctg ggg ttc cag
 I F T V I F F I E M L V K F L A L G F Q
 aag tac ttc acc aac gcg tgg tgc tgg ctc gac ttc gtc atc gtc atg gtg tcg ttg ata
 K Y F T N A W C W L D F V I V M V S L I
 aac ttc atc gct tct ttg tgt ggg gct gga ggg att cag gct ttc aaa act atg ccg acg
 N F I A S L C G A G I Q A F K T M R T
 ttg cgt gcg ctc aga cct ctg agg gct atg tct agg atg cag ggc atg agg gtg gtg gtg
 L R A L R P L R A M S R M Q G M R V V V
 aac gcg ctg gtc cag gcc atc ccc agc atc ttc aac gtg ttg ctc gtg tgc ctc atc ttc
 N A L V Q A I P S I F N V L L V C L I F
 tgg ctg atc ttc gcc atc atg ggc gtg caa ctg ttc gcc gga aaa tac cac aag tgc gaa
 W L I F A I M G V Q L F A G K Y H K C E
 gat cag aat ggc acg gcg ctg agc cag gag atc att ccg gac gtg aac gtc tgc aag gcc
 D Q N G T A L S Q E I I P D V N V C K A
 gaa aac tac acg tgg aaa aac tcc gag atg aac ttt gac cac gtg ggg aaa gcc tac ttg
 E N Y T W K N S E M N F D H V G K A Y L
 tgc ctg ttc caa gtg gcc acc ttc aaa ggc tgg att caa atc atg aac gac gcg atc gac
 C L F Q V A T F K G W I Q I M N D A I D
 tcg aga gac aag ctg gga aag cag ccg att cga gag acg aac atc tac atg tat ctc tac
 S R D K L G K Q P I R E T N I Y M Y L Y
 ttt gtg ttc ttc atc atc ttt gga tct ttc ttc act ctc aac ctg ttc atc gga gtc atc
 F V F F I I F G S F F T L N L F I G V I
 att gac aac ttc aat gaa cag aaa aag aag gca gga gga tcg cta gaa atg ttc atg acg
 I D N F N E Q K K K A G G S L E M F M T
 gac gac cag aag aaa tac aac aac gcg atg aag aaa atg gga tct aaa aag cct ctg aaa
 D D Q K K Y Y N A M K K M G S K K P L K
 gcc aca cca cga cca agg tgg agg cca caa gcc atc gtg ttc gaa ata gtg acc gac aag
 A T P R P R W R P Q A I V F E I V T D K
 aaa ttc gac atg atc atc atg ttg ttc atc ggc ttc aac atg gtg acg atg aca atg gac
 K F D M I I M L F I G F N M V T M T D
 cac tac aag cag tcg gcc acg ttc acg gcg atc ctg gac aac ctc aat cag atc ttc atc
 H Y K Q S A T F T A I L D N L N Q I F I
 gtc atc ttc tcg tca gag tgc ctg ctc aaa gtg ttc gcg ctg cgc tac cac tac ttc aag
 V I F S S E C L L K V F A L R Y H Y F K
 gaa cca tgg aac ctt ttt gat ttc gtt gta gtc atc ttg tcc ata ttg ggg ttg gtg ttg
 E P W N L F D F V V V I L S I L G L V L
 agc gac ctg atc gaa aag tac ttc gtg tcg cca acg ctg ctg cga gtg gtg aga gtg gcg
 S D L I E K Y F V S P T L L R V V R V A
 aaa gtg ggt cgc gta ctc aga ctg gtc aag ggc gcg aag ggc ata cga acg ttg ctg ttt
 K V G R V L R L V K G A K G I R T L L F
 gct ctg gcc atg tcg ttg ccg gca ctc ttc aac atc tgc ttg ctg ctc ttc ctt gtc atg
 A L A M S L P A L F N I C L L L F L V M

```

ttt atc ttt gcc att ttc ggc atg tcg ttc ttc atg aat gtc aag gac aag ggc gga ctg
F I F A I F G M S F F M N V K D K G G L
gac gac gtg tac aac ttc aag tcg ttc gga cag tcc atg att cta ctc ttt caa atg tcg
D D V Y N F K S F G Q S M I L L F Q M S
acg tcc gcg ggt tgg gac ggc gtg ctc gac ggc atc att aac gaa gac gac tgc gtt ctg
T S A G W D G V L D G I I N E D D C V L
ccg aac ccg gag atc ggg gtg gcc ggc gac tgc ggg aac gcc acc atc ggc atc act ttt
P N P E I G V A G D C G N A T I G I T F
ttg ttg tcg tac ctc gtc atc agc ttc ctg att gtc atc aac atg tac atc gcc gtc atc
L L S Y L V I S F L I V I N M Y I A V I
ttg gag aac tac tcg cag gcg acg gaa gac gtg caa gag ggc ctt acg gac gac gat tac
L E N Y S Q A T E D V Q E G L T D D D Y
gac atg tac tac gag atc tgg cag aac ttt gac ccg gac ggc acg cag tac atc cgc tac
D M Y Y E I W Q N F D P D G T Q Y I R Y
gac cag ctg tcc gac ttc ctc gac gtg ctg gag gcg ccg ttg cag att cac aag ccc aac
D Q L S D F L D V L E A P L Q I H K P N
aag tac aag atc gtc tcc atg gac att cct atc tgc aag ggc gac ctc atg ttc tgc gtg
K Y K I V S M D I P I C K G D L M F C V
gac att ctc gac gcg ctc acg aaa gac ttc ttc gcg cga aag ggc agc ccc atc gag gag
D I L D A L T K D F F A R K G S P I E E
acc gcc gaa ctg ggc gag gtg cag gcc ccg ccc gac gag gtg ggc tac gcg ccc gtc tcg
T A E L G E V Q A R P D E V G Y A P V S
tca acc ctg tgg cgt cag cgc gag gag tac tgc gcg cgc ctc atc cag aac gcg tgg cgc
S T L W R Q R E E Y C A R L I Q N A W R
aag cac aaa cag cag cgc ctc ggt gac tcg gac gac gcc ggc gac gac acc gac ccg tcc
K H K Q Q R L G D S D D A G D D T D P S
gac gcg cac cag acg gcc gtg ctc gtc gag agc gac ggc ttc gtc acg aag aac ggc cac
D A H Q T A V L V E S D G F V T K N G H
cgc gtc gtc atc cac tcg ccg tcg ccg agc gtc acg tcg cga tcc acg gac gtc tga gcc
R V V I H S R S P S V T S R S T D V
ggg cca cgc ccc ctc ctc ccc cag caa ccg tca caa cca ccg cag cag ctt tcg aca
cgt cac aag tga gga gcc gtc tcg cca ccg gcc gag cgt cgc ccg ggc

```

La caracterización de los dominios proteicos que componen el VGSC conciden con lo esperado, ya que los mismos se encuentran altamente conservados en *A. morenensis* (Figura 6.3). Estos resultados confirman la presencia del VGSC en *A. morenensis* no solo por identidad de secuencia, sino también por su caracterización mediante Modelos ocultos de Markov (HMM, del inglés *Hidden Markov Model*) Interpro.

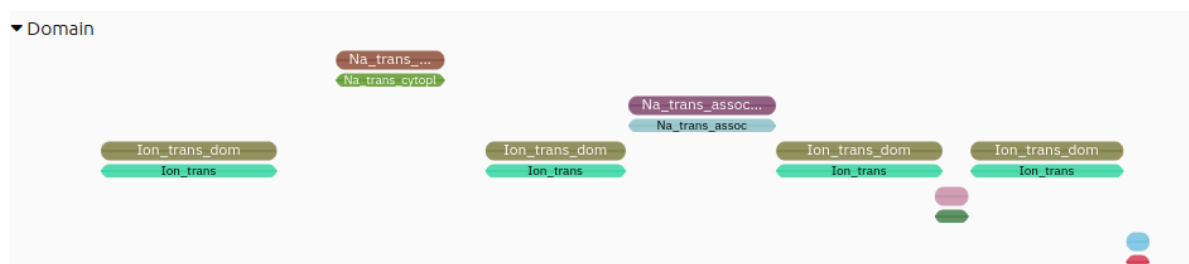


Figura 6.3. Caracterización de los dominios funcionales del canal de sodio dependiente de voltaje en *A. morenensis* mediante Modelos ocultos de Markov (HMM) Interpro.

6.2. Análisis filogenético del VGSC en *Andiperla morenensis*

Se llevó a cabo un análisis de la relación evolutiva del canal de sodio dependiente de voltaje en *A. morenensis* y especies filogenéticamente cercanas. El motivo de este enfoque se debe a que se contempla su adaptación a bajas temperaturas como mecanismo adaptativo y no a nivel de especie.

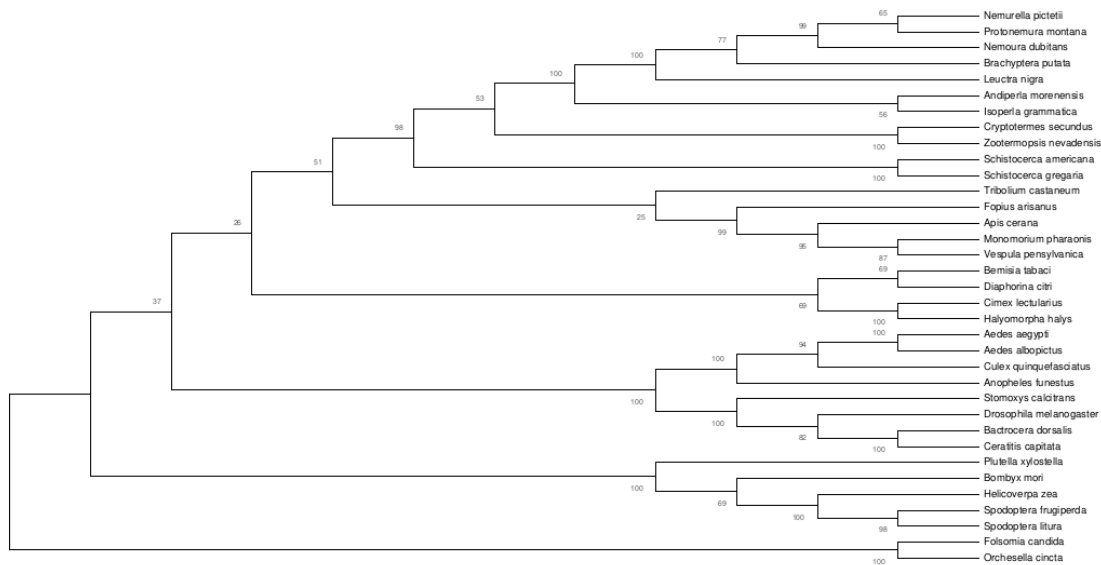


Figura 6.4. Árbol filogenético del VGSC.

De estos resultados se deduce un orden evolutivo de las diferentes secuencias proteicas de las especies dentro de sus categorías taxonómicas correspondientes: *Nemurella pictetii*, *Protonemura montana*, *Nemoura dubitans*, *Brachyptera putata*, *Leuctra nigra*, *Andiperla morenensis* e *Isoperla grammatica* (Plecoptera), *Cryptotermes secundus* y *Zootermopsis nevadensis* (Blattodea), *Schistocerca americana* y *Schistocerca gregaria* (Orthoptera), *Tribolium castaneum* (Coleoptera), *Fopius arisanus*, *Apis cerana*, *Monomorium pharaonis* y *Vespula pensylvanica* (Hymenoptera), *Bemisia tabaci*, *Diaphorina citri*, *Cimex lectularius* y *Halyomorpha halys* (Hemiptera), *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles funestus*, *Stomoxys calcitrans*, *Drosophila melanogaster*, *Bactrocera dorsalis* y *Ceratitis capitata* (Diptera), *Plutella xylostella*, *Bombyx mori*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda* y *Spodoptera litura* (Lepidoptera), *Folsomia candida* y *Orchesella cincta* (Collembola) como outgroup.

A. morenensis muestra una cercanía evolutiva del orden Plecoptera con el orden Isoptera (*Cryptotermes secundus* y *Zootermopsis nevadensis*), y el orden Orthoptera (*Schistocerca*

americana y *Schistocerca gregaria*), demostrando su relación no solo a nivel evolutivo a nivel de secuencia.

6.3. Estructura genómica del gen codificante del VGSC

El estudio de los patrones de variación de los genes de una especie resultan imprescindibles para comprender los mecanismos de evolución a nivel molecular. En este estudio se llevó a cabo el análisis del gen codificante del VGSC en las siguientes especies de Plecópteros cuyos genomas se encuentran totalmente secuenciados y disponibles en bases de datos públicas: *Nemurella pictetii*, *Protonemura montana*, *Nemoura dubitans*, *Leuctra nigra*, *Brachyptera putata*, *Isoperla grammatica* y se compararon con la región genómica correspondiente de *Andiperla morenensis*, del cual el laboratorio cuenta con un ensamble parcial (**Figura 6.5**).

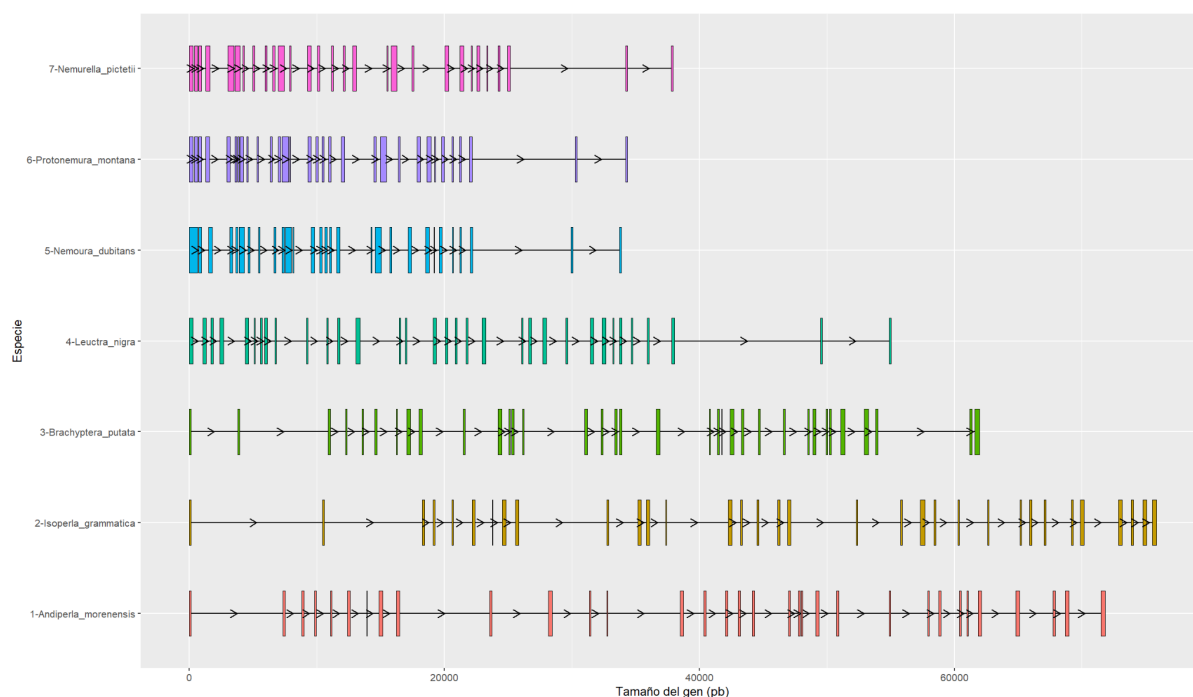


Figura 6.5. Representación de los genes codificantes del VGSC. En el eje vertical se visualizan las especies (orden basado en el árbol mostrado en la Fig. 6.4), en el eje horizontal (medido en pares de bases) se visualiza la organización de los exones (rectángulos coloreados) e intrones (flechas). Cada gen se representa relativizado al tamaño del gen en su respectivo genoma.

Se observó que el número de exones y la longitud total de la región genómica es variable y está relacionado proporcionalmente con el tamaño de los intrones, existiendo un correlato

evolutivo coincidente entre las especies estudiadas. El número de exones presentes en cada especie se muestra en la **Tabla 6.3**.

Tabla 6.3. Número de exones del gen codificante del VGSC en especies de plecópteros.

Especie	Exones
<i>Nemurella pictetii</i>	29
<i>Protonemura montana</i>	31
<i>Nemoura dubitans</i>	29
<i>Leuctra nigra</i>	33
<i>Brachyptera putata</i>	35
<i>Isoperla grammatica</i>	33
<i>Andiperla morenensis</i>	33

Para analizar la variación del tamaño de la región genómica correspondiente a los VGSC se calculó el coeficiente de correlación entre el largo de los genes (en pb) y el tamaño del genoma (millones de pb) de las diferentes especies de Plecópteros (**Figura 6.6**)

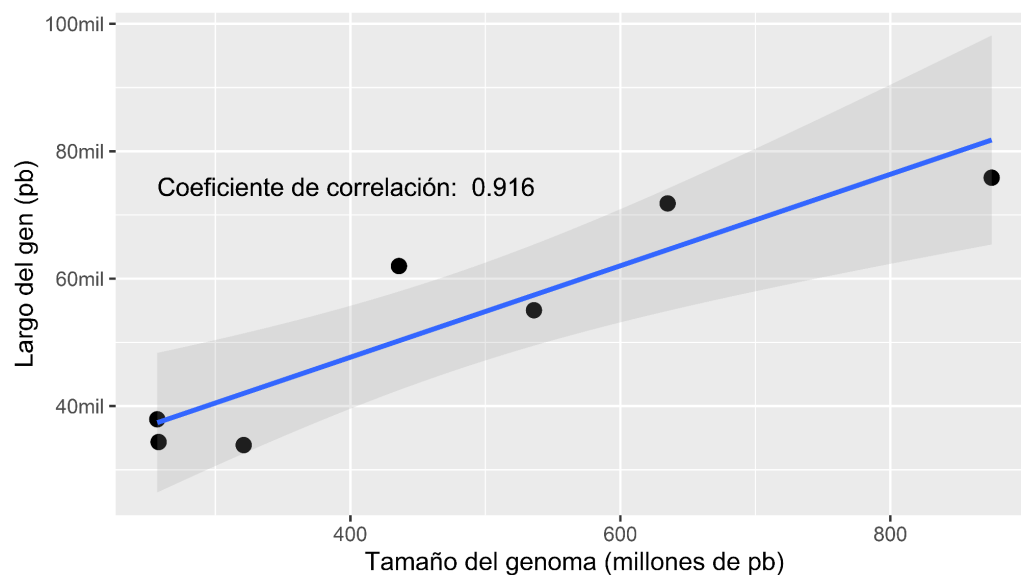


Figura 6.6. Gráfico de correlación: largo del gen (pb) vs. tamaño del genoma (millones de pb). La línea azul corresponde al ajuste lineal del modelo y en gris las bandas de confianza del mismo.

El gráfico muestra un coeficiente de correlación del 92%, permitiendo inferir que el mayor tamaño del gen corresponde a un tamaño del genoma para cada especie. Esto nos permite hipotetizar que, aun sin contar con una secuencia completa, el tamaño del genoma de *A. morenensis* es semejante al de *Isoperla grammatica*.

En base a los resultados obtenidos, este trabajo contribuye a los conocimientos a nivel molecular y evolutivo del gen *para* codificante del canal de sodio dependiente de voltaje, evidenciando las relaciones entre la longitud de los intrones con un mayor tamaño del gen y como consecuencia de su genoma, entre las diferentes especies de plecópteros. Cabe aclarar que se llevó a cabo el análisis de solo siete especies, ya que son las únicas que contienen su genoma completo disponible en BD del NCBI.

Este hallazgo coincide con estudios previos, donde se llevó a cabo el análisis de los canales de sodio dependiente de voltaje de organismos modelo, como *Drosophila melanogaster*, *Aedes Aegypti* y *Rhodnius prolixus*. Teniendo en cuenta lo expuesto se destaca la importancia de los datos obtenidos, ya que evidencian la alta conservación de VGSC en diversas especies de insectos.

6.4. Análisis comparativo del VGSC de *A. morenensis*

El análisis de las 34 especies elegidas para el análisis filogenético (detalladas en la sección 6.2) permite definir las regiones más variables y las más conservadas en estos organismos. Se obtuvieron alineamientos congruentes de la proteína en estudio, sin observar cambios significativos en los motivos funcionales típicos de los canales de sodio.

Con el fin de establecer si existe algún motivo específico de *A. morenensis*, se limitó la comparación a ocho especies de plecópteros e isópteros, de acuerdo a lo que se deduce del análisis filogenético (*Nemoura dubitans*, *Nemurella pictetii*, *Brachyptera putata*, *Leutra nigra*, *Isoperla grammatica*, *Protonemura montana*, *Zootermopsis nevadensis* y *Cryptotermes secundus*). Esto permitió identificar algunas delecciones y secuencias exclusivas de *A. morenensis* (Figura 6.7).

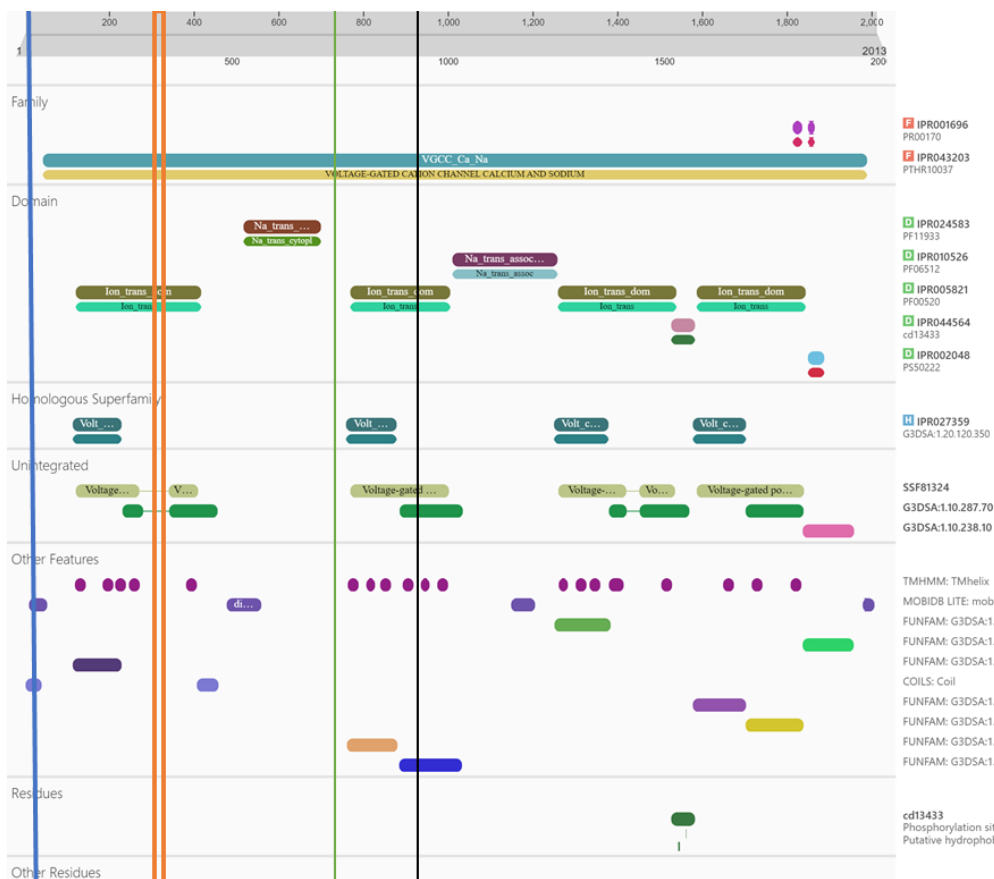


Figura 6.7. Regiones de secuencias variables entre y dentro de los dominios del VGSC de *A. morenensis*. La línea azul y la línea verde representan las deleciones observadas, fuera de dominios determinantes de función y las líneas naranja y negra representan cambios de aminoácidos dentro de dominios conservados.

Se encontraron dos deleciones, una deleción de 11 aminoácidos a partir de la posición 49 de la secuencia de *A. morenensis* y otra de 7 aminoácidos a partir de la posición 690. Ambas deleciones se encuentran en zonas que no corresponden a dominios conservados de función y son compartidas con *Nemurella pictetii*, una especie muy lejana a la familia *Gripopterygidae*.

La deleción de 11 aminoácidos elimina una zona de aminoácidos básicos (RRKKKK). Si bien no podemos correlacionar esto con algún cambio estructural, indica un cambio significativo en la carga de la proteína. (**Figura 6.8**).



Figura 6.9. Región parcial del VGSC de las diferentes especies alineadas en MEGA y su comparación con los datos obtenidos de los dominios que componen el VGSC de *A. morenensis* en Interpro.

Finalmente se determinaron dos regiones de baja similitud, exclusivas de *A. morenensis*. Por otro lado, se identificó una zona de variación significativa de la secuencia de *A. morenensis* en una zona fuera de la membrana entre 2 dominios transportadores de Na, con la incorporación de una cisteína en lugar de un aminoácido cargado, una histidina en reemplazo de asparagina, una fenilalanina en reemplazo de isoleucina/valina y una serie de 3 glutamatos reemplazando una región con solo un glutamato. Todos estos cambios, si bien no son *a priori* atribuibles a la función o a la adaptación al frío, representan cambios que pueden dar lugar a modificaciones estructurales. (**Figura 6.10**).

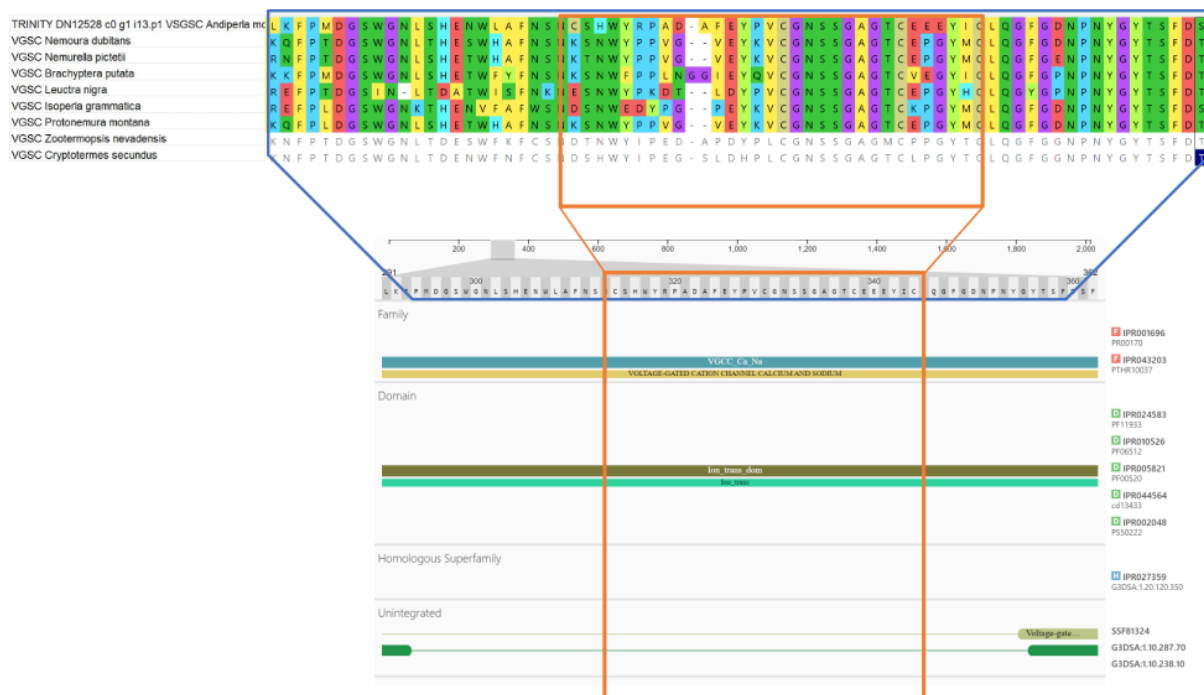


Figura 6.10. Región parcial del VGSC de las diferentes especies alineadas en MEGA y su comparación con los datos obtenidos de los dominios que componen el VGSC de *A. morenensis* en Interpro.

La segunda modificación detectada fue en el segundo dominio transportador de sodio, entre los aminoácidos 925-935 que se encuentra en la zona del regulador del sensor de voltaje entre los segmentos 4 y 5 (ver figura 2.3). En esta zona se ven modificadas tres histidinas, dos tirosinas y una arginina respecto al resto de las especies estudiadas que podrían indicar cambios estructurales significativos. (**Figura 6.11**).



Figura 6.11. Región parcial del VGSC de las diferentes especies alineadas en MEGA y su comparación con los datos obtenidos de los dominios que componen el VGSC de *A. morenensis* en Interpro.

6.5. Expresión del VGSC de *A. morenensis*

Para confirmar la expresión del canal de sodio dependiente de voltaje de *A. morenensis* y corroborar las inferencias bioinformáticas se preparó ARN de larvas individuales y se sintetizó ADNc para la posterior amplificación por PCR. En un primer intento de amplificar el canal completo usando primers desde el extremo 5' y 3' no se consiguió obtener un fragmento del tamaño esperado (~6 kbp). Por esto se reintentó la amplificación usando primers que flanqueaban cuatro segmentos más pequeños (1,5 kbp), que sumados cubrían el marco de lectura completo del transcripto y denominados VGSC block 1 (1540 pb) VGSC block 2 (1540 pb) VGSC block 3 (1540 pb) VGSC block 4 (1542 pb) indicado en la tabla de la **sección 5.4.3**. Para la amplificación se usaron dos polimerasas, una de alta procesividad

(Taq. Quiagen, Alemania) y una variante de menor procesividad pero mayor fidelidad (Q5, New England Biolabs, EEUU). La secuencia de los mismos se encuentra en el **Anexo 3**.

En este caso se obtuvo la amplificación de todos los fragmentos, con distinta eficiencia dependiendo del cDNA utilizado. Con la polimerasa Q5 y el mejor cDNA se obtuvo la amplificación de todos los fragmentos con el tamaño esperado. (Fig 6.5.A).

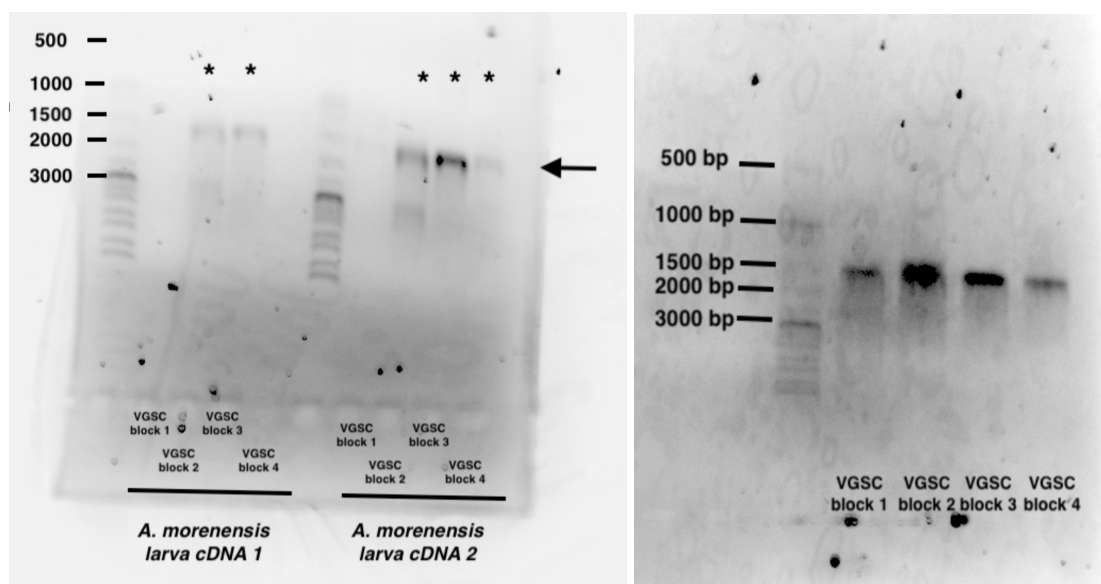


Figura 6.12. Amplificación por PCR del canal de sodio dependiente de voltaje de *A. morenensis*. (panel izquierdo). Amplificación de todos los fragmentos, con distinta eficiencia dependiendo del cDNA utilizado; (panel derecho) Amplificación con la polimerasa Q5 y el mejor cDNA. A la izquierda se indica el tamaño de fragmentos del marcador de peso molecular.

Los fragmentos amplificados se purificaron a partir de la reacción de PCR y se secuenciaron usando los *primers* usados para la amplificación. Se pudo corroborar que la secuencia de cada fragmento amplificado corresponde con la secuencia predicha para el VGSC. Esto permitió concluir que efectivamente el ARNm codificante del canal identificado en el transcriptoma corresponde a un ARNm identificable expresado. Como se observa en la **figura 6.12** se logró amplificar cada uno de los dominios, sin amplificación de fragmentos inespecíficos, ni contaminantes (con la excepción de la amplificación con Taq polimerasa del block 4), sin embargo usando el mismo cDNA se observó una variabilidad en la cantidad de producto amplificado. Estos resultados confirman que el canal de sodio dependiente de voltaje se expresa en *A. morenensis*.

Con el fin de clonar el gen completo para estudios funcionales se procedió a amplificar el canal de sodio completo usando primers específicos para el marco de lectura abierto desde el codón de iniciación hasta el codón de terminación de la traducción y con primers

diseñados para reconocer las regiones 5' y 3' UTR (ver **sección 5.4.3**). Los primeros intentos de amplificación no dieron los resultados esperados, por lo que se asumió que el ARNm al ser tan largo, podría adquirir estructuras secundarias que no permiten la generación de ADNc completo a la temperatura recomendada para la transcriptas reversa (50°C, ver **sección 5.4.2**). Este razonamiento se basó también en la menor eficiencia para conseguir la amplificación de la región más próxima al extremo 5', tal como se ve en la **figura 6.12**. Por lo tanto se sintetizó el ADNc a temperaturas mayores a la recomendada y se probó la capacidad de obtener el transcripto completo. Como se observa en la **figura 6.13** se obtuvo un fragmento amplificado de más de 6 kbp a 53°C y a 59°C, sin amplificación a 65°C, que es la temperatura límite a la que funciona la transcriptas reversa. Asimismo se observa, como es de esperar, que partiendo de la misma cantidad de ADNc la capacidad de amplificación de la polimerasa Taq, que es una enzima altamente procesiva, es mucho mayor que la polimerasa Q5, que es más fiel pero menos procesiva. Se observó que existen productos amplificados de menor tamaño que no se observan a 59°C, lo que sugiere la existencia de posibles estructuras secundarias aún a esa temperatura que disminuyen con el aumento de temperatura.

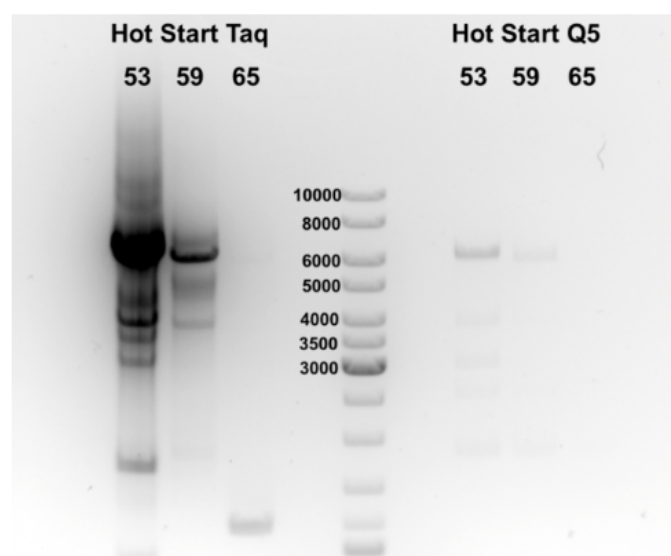


Figura 6.13. Diferencias en la capacidad de amplificación de la polimerasa Taq y Q5 a diferentes temperaturas de obtención de ADNc (53°C, 59°C y 65°C). En el centro se indica el tamaño de fragmentos del marcador de peso molecular.

La identidad del fragmento amplificados se confirmó por secuenciación del producto de PCR usando los primers que se usaron para la amplificaron así como los primers internos correspondientes a los cuatro bloques previamente descritos.

Finalmente se realizó una PCR usando los primers para los cuatro bloques del canal descritos anteriormente (**Figura 6.12**) con el cDNA obtenido a 54°C y, como era de esperar, la cantidad de los 4 fragmentos amplificados fue equivalente, indicando que era plausible la hipótesis de plegamiento de un ARN tan largo (**Figura 6.13**)

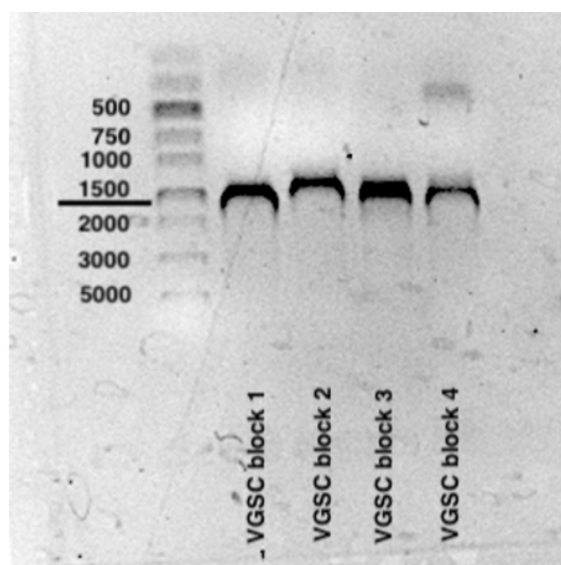


Imagen 6.13. Amplificación por PCR de los cuatro dominios (I-IV) que componen el canal de sodio dependiente de voltaje de *A. morenensis*, con ADNc obtenido a 54°C. A la izquierda se indica el tamaño de fragmentos del marcador de peso molecular.

Todos estos experimentos se realizaron usando ARN total de larvas enteras, por lo que se decidió analizar la expresión del canal de sodio en un tejido específico, el sistema nervioso. Para ello se procedió a disecar la cuerda nerviosa ventral y el cerebro de un macho adulto de *A. morenensis*. Tanto el cerebro como el sistema nervioso fueron aislados casi completamente del tejido circundante (**Figura 6.14**) y con ellos se procedió a extraer ARN total y sintetizar ADNc para PCR.

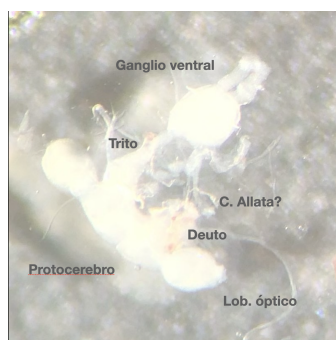
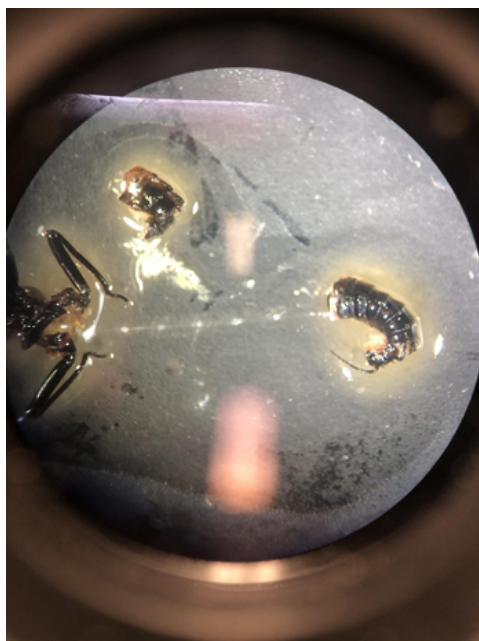


Imagen 6.14. Disección de la cuerda nerviosa ventral de macho adulto de *Andipерla morenensis*. Vista general de la disección (panel superior) y del cerebro (panel inferior izquierdo) y cuerda nerviosa ventral (panel inferior derecho) aislados.

Se pudo amplificar el transcripto completo usando el set de *primers* que reconocen AUG/Stop para el cerebro y los extremos 5' UTR y 3'UTR en la cuerda nerviosa (**Figura 6.15**). Con estos resultados se confirma la expresión del VGSC de forma específica en el sistema nervioso y cerebro de *A. morenensis*.

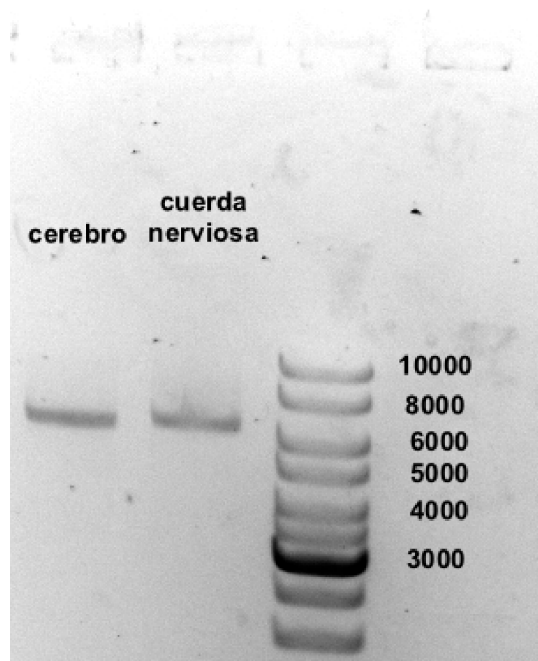


Figura 6.15. Producto de amplificación por PCR del ARNm completo a partir de ADNc de cerebro y cuerda nerviosa ventral de *A. morenensis*. Se indican los tamaños del marcador de peso molecular.

7. CONCLUSIONES

El Glaciar Perito Moreno guarda una riqueza y diversidad de vida única, quedando mucho por descubrir. El análisis genómico es una herramienta importante en el estudio de organismos que no son modelos, ya que nos permiten generar nuevas hipótesis que ayuden a responder muchas de las preguntas que nos hacemos diariamente. Este estudio intenta contribuir a comprender, a nivel genómico y evolutivo, posibles adaptaciones de *A. morenensis* a bajas temperaturas y presenta un avance importante de aspectos biológicos de este insecto desconocidos hasta el momento.

El análisis filogenético y la historia evolutiva del canal de sodio dependiente del voltaje, permite concluir que *A. morenensis* y el orden Plecoptera, del que forma parte, se relaciona principalmente con el orden Isoptera (termitas). Esta relación se observó también al analizar proteínas altamente conservadas involucradas en el metabolismo de ARN (Coletta, 2023). Los resultados que presento aquí confirman dicha cercanía evolutiva entre Isoptera y Plecoptera y provee evidencias de las relaciones filogenéticas para un grupo que permanecía como dificultoso de analizar desde esta perspectiva.

Los umbrales térmicos críticos que afectan la mortalidad y movilidad de los insectos han enfatizado el papel de la temperatura como el factor abiótico más importante, que actúa a través de diversos procesos fisiológicos. Los ensayos funcionales de canales de sodio conocidos de algunos insectos no muestran actividad a bajas temperaturas y, dado su modo de vida, es esperable que el de *A. morenensis* sea funcional en esas condiciones. En este sentido se encontraron algunas diferencias exclusivas en *A. morenensis* diferentes al resto de los canales conocidos de insectos cercanos. Estos cambios podrían estar involucradas en un cambio de respuesta a bajas temperaturas. *A priori* no podemos atribuir la adaptación de este tipo de canal iónico a partir de la estructura primaria de su proteína a las cuatro regiones diferenciales que incluyen deleciones y cambios de aminoácidos con potencial función estructural. Con respecto a la función del canal en sí, todos los dominios están altamente conservados con respecto a otras especies de insectos que no toleran estos rangos de temperaturas. Esto no impide considerar otras opciones de adaptación que podrían incluir cofactores proteicos (Feng et al 1995) o lipídicos. Resultados preliminares de comparación de la composición lipídica entre *D. melanogaster* y *A. morenensis* muestra una distribución más extendida de cadenas cortas y largas de ácidos grasos en *A. morenensis* y una diferencia significativa de insaturación comparado con *D. melanogaster* (R. Kühnlein, resultados no publicados). Esto lleva a pensar que quizás los cambios estructurales podrían

estar asociados a una diferente composición lipídica de las membranas de *A. morenensis* y no solamente a las diferencias en la escritura primaria de la proteína. La demostración de estas hipótesis requiere trabajo experimental. Uno de ellos sería clonar y expresar el VGSC de *A. morenensis* para medir su actividad y compararlo con VGSC de otros insectos conocidos. Esto no fue posible realizarlo durante la ejecución de este TFG ya que se observó que el VGSC de *A. morenensis* recombina muy fácilmente y pierde los últimos 150 aminoácidos cuando es introducido en plásmidos (R. Rivera Pomar, comunicación personal). Otra posibilidad sería modificar VGSC de otros insectos introduciendo cambios (deleciones y modificaciones de secuencia) que los hagan similares a *A. morenensis* y probar su actividad a distintas temperaturas, pero esto excede los objetivos iniciales de este TFG.

Se sabe que todos los procesos biológicos a nivel de especie dependen de factores tanto ambientales como genéticos, por lo que queda mucho por descubrir de *A. morenensis* y su adaptación. Los datos provistos en este trabajo son la puerta a nuevos descubrimientos, generando un sistema de retroalimentación en la investigación de la adaptación de *A. morenensis* a bajas temperaturas.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarez-Leefmans, F. J., & Delpire, E. (Eds.). (2009). *Physiology and pathology of chloride transporters and channels in the nervous system: from molecules to diseases*. Academic Press.

Aubert, J. (1956). *Andiperla willinki* n. Sp., Plecoptere nouveau des Andes de Patagonie. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, 29(2), 229-232.

Bale, J. S. (2002). Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357(1423), 849-862.

Behura, S. K. (2015). Insect phylogenomics. *Insect Molecular Biology*, 24(4), 403-411.

Belehradek, J. (1935). *Temperature and living matter* (Vol. 8). Berlin: Borntraeger.

Bouckaert, R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., ... & Drummond, A. J. (2019). BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, 15(4), e1006650.

Black, D. L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual review of biochemistry*, 72(1), 291-336.

Brittain, J. E. (1990). Life history strategies in Ephemeroptera and Plecoptera. In *Mayflies and stoneflies: life histories and biology: proceedings of the 5th International Ephemeroptera Conference and the 9th International Plecoptera Conference* (pp. 1-12). Springer Netherlands.

Brueggemann, L. I., Gentile, S., & Byron, K. L. (2013). Social networking among voltage-activated potassium channels. *Progress in molecular biology and translational science*, 117, 269-302.

Büschges, A., Scholz, H., & El Manira, A. (2011). New moves in motor control. *Current Biology*, 21(13), R513-R524.

Capriotti, N., Mougabure-Cueto, G., Rivera-Pomar, R., & Ons, S. (2014). L925I mutation in the Para-type sodium channel is associated with pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* from the Gran Chaco region. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(1), e2659.

Catterall, W. A. (2010). Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron*, 67(6), 915-928.

Catterall, W. A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *The Journal of physiology*, 590(11), 2577-2589.

Chatterjee, M., Ballav, S., Maji, A. K., Basu, N., Sarkar, B. C., & Saha, P. (2018). Polymorphisms in voltage-gated sodium channel gene and susceptibility of *Aedes albopictus* to insecticides in three districts of northern West Bengal, India. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(1), e0006192.

Chown, S. L., Hoffmann, A. A., Kristensen, T. N., Angilletta Jr, M. J., Stenseth, N. C., & Pertoldi, C. (2010). Adapting to climate change: a perspective from evolutionary physiology. *Climate research*, 43(1-2), 3-15.

Crick, F. H. (1958, January). On protein synthesis. In *Symp Soc Exp Biol* (Vol. 12, No. 138-63, p. 8).

Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227(5258), 561-563.

De la Cruz Lozano, J. (2006). Entomología: morfología y fisiología de los insectos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*.

DeWalt, R. E., & Ower, G. D. (2019). Ecosystem services, global diversity, and rate of stonefly species descriptions (Insecta: Plecoptera). *Insects*, 10(4), 99.

Digel, I. (2011). Primary thermosensory events in cells. *Transient Receptor Potential Channels*, 451-468.

Dimmer, E. C., Huntley, R. P., Alam-Faruque, Y., Sawford, T., O'Donovan, C., Martin, M. J., ... & Apweiler, R. (2012). The UniProt-GO annotation database in 2011. *Nucleic acids research*, 40(D1), D565-D570.

Diniz, W. J. D. S., & Canduri, F. (2017). Bioinformatics: an overview and its applications. *Genet Mol Res*, 16(1), 17.

Dong, K. (2007). Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebrate Neuroscience* 7(1): 17-30.

Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., ... & Zhorov, B. S. (2014). Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect biochemistry and molecular biology*, 50, 1-17.

Dronkers, N., & Baldo, J. (2009). *Encyclopedia of neuroscience* (Vol. 2). L. R. Squire (Ed.). Amsterdam, The Netherlands:: Elsevier.

Fabro, J., Sterkel, M., Capriotti, N., Mougabure-Cueto, G., Germano, M., Rivera-Pomar, R., & Ons, S. (2012). Identification of a point mutation associated with pyrethroid resistance in the para-type sodium channel of *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 487-491.

Feng G, Deák P, Chopra M, Hall LM. (1995) Cloning and functional analysis of TipE, a novel membrane protein that enhances *Drosophila* para sodium channel function. *Cell*. 82(6):1001-11.

Fernández-Villalobos, G. (2019). Neurobiología del control motor en Insectos. *Archivos de Neurociencias*, 24(1), 17-27.

Fochetti, R., & De Figueroa, J. M. T. (2008). Global diversity of stoneflies (Plecoptera; Insecta) in freshwater. *Freshwater Animal Diversity Assessment*, 365-377.

Frank, H. Y., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G. A., & Catterall, W. A. (2005). Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacological reviews*, 57(4), 387-395.

Gibert, J. M. (2020). Phenotypic plasticity in insects. *Biologie Aujourd'hui*, 214(1-2), 33-44.

Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., ... & Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a

reference genome. *Nature biotechnology*, 29(7), 644-652.

Guzmán-Mendoza, R., Calzontzi-Marín, J., Salas-Araiza, M. D., & Martínez-Yáñez, R. (2016). La riqueza biológica de los insectos: análisis de su importancia multidimensional. *Acta zoológica mexicana*, 32(3), 370-379.

Haas, B. J., & Zody, M. C. (2010). Advancing RNA-seq analysis. *Nature biotechnology*, 28(5), 421-423.

Hernández, E. B. (2008). Bioinformática: una oportunidad y un desafío. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(1), 132-138.

King, G. F., & Hardy, M. C. (2013). Spider-venom peptides: structure, pharmacology, and potential for control of insect pests. *Annual review of entomology*, 58, 475-496.

Kucher, V., Eaton, B. A., Stockand, J. D., & Boiko, N. (2013). Patch-clamping *Drosophila* sensory neurons. *Ion Channels: Methods and Protocols*, 385-397.

KUKALOVÁ-PECK, J. 1991. Fossil history and the evolution of hexapod structures. In: Naumann, I.D. (ed.). *The insects of Australia*. CSIRO, Australia, Melbourne, pp. 141–179.

Kohshima, S. (1985). Patagonian glaciers as insect habitats. *Glaciological Studies in Patagonia Northern Icefield, 1983-1984*.

Kohshima, S., Yoshimura, Y., & Takeuchi, N. (2002). Glacier ecosystem and biological ice-core analysis. *The Patagonian icefields: A unique natural laboratory for environmental and climate change studies*, 1-8.

Kondratieff, B. C., DeWalt, R. E., & Verdone, C. J. (2019). Plecoptera of Canada. *ZooKeys*, (819), 243.

Kukurba, K. R., & Montgomery, S. B. (2015). RNA sequencing and analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(11), pdb-top084970.

Marguerat, S. & J. Bähler. (2010). RNA-seq: from technology to biology. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 569-579.

Mellanby, K. (1939). Low temperature and insect activity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 127(849), 473-487.

Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R. S., Donath, A., Mayer, C., Frandsen, P. B., Ware, J., Flouri, T., & Beutel, R. G. (2014). Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, 346(6210), 763-767.

Moignot, B., Lemaire, C., Quinchar, S., Lapied, B., & Legros, C. (2009). The discovery of a novel sodium channel in the cockroach *Periplaneta americana*: evidence for an early duplication of the para-like gene. *Insect biochemistry and molecular biology*, 39(11), 814-823.

Moran, Y., Barzilai, M. G., Liebeskind, B. J., & Zakon, H. H. (2015). Evolution of voltage-gated ion channels at the emergence of Metazoa. *Journal of Experimental Biology*, 218(4), 515-525.

Lanteri, A. A., & Del Río, M. G. (2011). Filogenia de Hexapoda. In *Biodiversidad de Artrópodos Argentinos/Roig-Juñent, Sergio Alberto; Claps, Lucía Elena; Morrone, Juan José* (Vol. 3).

Lee, R. E. (2010). A primer on insect cold-tolerance. *Low temperature biology of insects*, 3-34.

Lee Jr, R. E. (1989). Insect cold-hardiness: to freeze or not to freeze. *Bioscience*, 39(5), 308-313.

Leff, S. E., Rosenfeld, M. G., & Evans, R. M. (1986). Complex transcriptional units: diversity in gene expression by alternative RNA processing. *Annual review of biochemistry*, 55(1), 1091-1117.

Lencioni, V. (2004). Survival strategies of freshwater insects in cold environments. *Journal of limnology*, 63(1s), 45-55.

Li, H. (2023). Protein-to-genome alignment with miniprot. *Bioinformatics*, 39(1), btad014.

Lipkind, G. M., & Fozzard, H. A. (2005). Molecular modeling of local anesthetic drug binding by voltage-gated sodium channels. *Molecular pharmacology*, 68(6), 1611-1622.

López-Maury, L., Marguerat, S., & Bähler, J. (2008). Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. *Nature Reviews Genetics*, 9(8), 583-593.

Overgaard, J., & MacMillan, H. A. (2017). The integrative physiology of insect chill tolerance. *Annual review of physiology*, 79, 187-208.

Pessacq, P. (2009). A new Gripopterygidae (Plecoptera) species from southern Patagonia. *Zootaxa*, 2264(1), 51-57.

Pessacq, P. (2009). Estado de conocimiento del orden Plecoptera en la Patagonia. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 68(1-2), 169-175.

Pessacq, P., & Rivera-Pomar, R. (2019). A new *Andiperla* Aubert (Plecoptera, Gripopterygidae) species from the Perito Moreno Glacier, Argentina. *Zootaxa*, 4664(2), zootaxa-4664.

Purves, D. (2004). *Neuroscience*. 3rd Ed, Sinauer Associates, Massachusetts, 773 pp.

Purvis, A., & Hector, A. (2000). Getting the measure of biodiversity. *Nature*, 105, 212-219.

Ribera, I., Melic, A., & Torralba, A. (2015). Introducción y guía visual de los artrópodos. *Revista Ide@-SEA*, 2, 1-30.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), pdb-prot5439.

Riveros-Rosas, H., Julián-Sánchez, A., & Carrillo-Campos, J. (2022). Análisis filogenético de Proteínas: Una herramienta básica para la Medicina Evolutiva o Filomedicina.

Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823), 1092-1101.

Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hottton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020, baaa062.

Shen, H., Zhou, Q., Pan, X., Li, Z., Wu, J., & Yan, N. (2017). Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution. *Science*, 355(6328), eaal4326.

Smarandache-Wellmann, C. R. (2016). Arthropod neurons and nervous system. *Current Biology*, 26(20), R960-R965.

Salkoff, L. B., & Tanouye, M. A. (1986). Genetics of ion channels. *Physiological reviews*, 66(2), 301-329.

Sheikh, A. A., Rehman, N. Z., & Kumar, R. (2017). Diverse adaptations in insects: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(2), 343-350.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., ... & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7(1), 539.

Sinclair, B. J., Alvarado, L. E. C., & Ferguson, L. V. (2015). An invitation to measure insect cold tolerance: methods, approaches, and workflow. *Journal of Thermal Biology*, 53, 180-197.

Silva, J. J., & Scott, J. G. (2020). Conservation of the voltage-sensitive sodium channel protein within the Insecta. *Insect molecular biology*, 29(1), 9-18.

Spong, K. E., Andrew, R. D., & Robertson, R. M. (2016). Mechanisms of spreading depolarization in vertebrate and insect central nervous systems. *Journal of Neurophysiology*, 116(3), 1117-1127.

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027.

Teets, N. M., Dalrymple, E. G., Hillis, M. H., Gantz, J. D., Spacht, D. E., Lee Jr, R. E., & Denlinger, D. L. (2019). Changes in energy reserves and gene expression elicited by freezing and supercooling in the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. *Insects*, 11(1), 18.

Theischinger, G. 1991. Plecoptera. En: The insects of Australia (Ed. G. Theischinger), pp. 311-319. Carlton, Melbourne University Press.

Tierno de Figueroa, J. M. T., & López-Rodríguez, M. J. (1996). Orden Plecoptera. *Catalogus de la Entomofauna Aragonesa*, (11), 3-8.

Tierno de Figueroa, J. M., López-Rodríguez, M. J., Lorenz, A., Graf, W., Schmidt-Kloiber, A., & Hering, D. (2010). Vulnerable taxa of European Plecoptera (Insecta) in the context of climate change. *Biodiversity and conservation*, 19, 1269-1277.

Toxopeus, J., & Sinclair, B. J. (2018). Mechanisms underlying insect freeze tolerance. *Biological Reviews*, 93(4), 1891-1914.

UniProt Consortium. (2010). Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. *Nucleic acids research*, 39(suppl_1), D214-D219.

van Baren-Nawrocka, J. (2013). The bioinformatics of genetic origins: how identities become embedded in the tools and practices of bioinformatics. *Life Sciences, Society and Policy*, 9(1), 1-18.

Velculescu, V. E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M. A., Bassett, D. E., Jr., Hieter, P., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1997). "Characterization of the yeast transcriptome." *Cell* 88(2): 243-51.

Yu, F. H., & Catterall, W. A. (2004). The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Science's STKE*, 2004(253), re15.

Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10(1), 57-63.

Wickham H (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.

Wolf, J. B. (2013). Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. *Molecular ecology resources*, 13(4), 559-572.

Zachariassen, K. E., Kristiansen, E., & Pedersen, S. A. (2004). Inorganic ions in cold-hardiness. *Cryobiology*, 48(2), 126-133.

Zhang, ZQ (2013). Filo Artrópodos. En: Zhang, Z.-Q. (Ed.) Biodiversidad animal: un esquema de clasificación de nivel superior y estudio de la riqueza taxonómica (Addenda 2013). *Zootaxa* , 3703 (1), 17-26.

Zwick, P. (1973). Insecta: Plecoptera. Phylogenetisches system und katalog. En Das Tierreich. Eine Zusammenfassung und Kennzeichnung der rezenten Tierformen (pp. 1-465). Walter de Gruyter.

Zwick, P. (2000). Phylogenetic system and zoogeography of the Plecoptera. *Annual review of entomology*, 45(1), 709-746.

Zwick, P. (2009). The Plecoptera—who are they? The problematic placement of stoneflies in the phylogenetic system of insects. *Aquatic insects*, 31(sup1), 181-194.

9. ANEXOS

ANEXO 1

Organismo	Identificador del genoma	Nombre del ensamble	Largo del genoma (pb)	Hemisferio
<i>Andiperla morenensis</i>			635258123	Sur
<i>Brachyptera putata</i>	GCA_907164805.1	iBraPut3m.1	436497185	Norte
<i>Nemurella pictetii</i>	GCA_921293315.2	ipNemPict2.2	257036096	Norte
<i>Protonemura montana</i>	GCA_947568835.1	ipProMont4.1	258525094	Norte
<i>Nemoura dubitans</i>	GCA_921293005.1	ipNemDubi1.1	321001405	Norte
<i>Isoperla grammica</i>	GCA_945910005.1	ipIsoGram3.1	874584190	Norte
<i>Leuctra nigra</i>	GCA_934045905.1	ipLeuNigr2.1	536280668	Norte

ANEXO 2

Organismo	Orden	Suborden	NCBI Taxonomy ID
<i>Andiperla morenensis</i>	Plecoptera	Austroperlidae	2590156
<i>Brachyptera putata</i>	Plecoptera	Austroperlidae	2065413
<i>Nemurella pictetii</i>	Plecoptera	Austroperlidae	143722
<i>Protonemura montana</i>	Plecoptera	Austroperlidae	2884235
<i>Nemoura dubitans</i>	Plecoptera	Austroperlidae	2014036
<i>Isoperla grammatica</i>	Plecoptera	Austroperlidae	552050
<i>Leuctra nigra</i>	Plecoptera	Austroperlidae	143735

ANEXO 3

Fragmentos analizados por PCR. Se indica en **negrita** los primers utilizados

Amo-VGSC-block1

ATGTCAGAGATCTCGGACACCATCTCAGAGGAAGAACGTAGCTTGTTCCGTCCGTTACGAGAGAGTCGCTGGCCG
CCATCGAGACTCGCATCGCCGAAGAAAATGCTAAACAGAAGGAGCTCGAAAAGAAAAGAGCTGAAGGAGAGGTTCCGG
TATGAGGACGAGGACGAAGATGAAGGGCCCCAACCGGACGCGGCGTTTGAACAGGGGGGGCCCCATTCCCGTCCGAAT
GCACAGCAGTTTTCCCGCTGAGCTTGCTCAACGCCCCCTGGAAGACATCGATGGCTTCTACCACAATCGAAGGACGT
TTGTAGTGGTGAGCCGCGGAAAGGACATCTCCGCTTCAGCGCCACGGACGCCATGTGGATTCTAGATCCGTTCAAT
CCGTTGCGACGCACGGCCATCTATATACTCGTTCATCCGCTGTTTTCTGTGTTTCATCATCACCACCATCTTGACCAA
CTGCATCTTCATGATTATGCCTCCACGCCCTACAGTAGAGTCGACCGAAGTAATATTTACTGGCATCTACACGTTTG
AATCAGCTGTAAAAGTGATGGCGAGGGGCTTCATACTTCAGCCATTACGTACCTTAGAGATGCATGGAACCTGGCTG
GACTTCGTAGTGATAGCTTTAGCTTATGTTACAATGGGGATAGATCTAGGAAATTTGGCAGCCCTGAGAACGTTTCAG
GGTACTCCGAGCGCTCAAGACTGTGGCGATTGTGCCAGGGTTGAAAACCATCGTGGGCGCTGTTCATCGAGTCCGTGA
AGAATCTGCGTGATGTGATCATCTCACCATGTTTTCGCTATCGGTGTTCCGCCCTGATGGGCGCTTCAGATCTACATG
GGCGTCTTCACGCAGAAGTGCGTGCTCAAGTTTCCCATGGACGGCTCGTGGGGCAACTTGTGCGACGAGAAGCTGGCT
GGCCTTCAACAGCAACTGCAGTCACTGGTACAGCCGGCGGACGCGTTTGAATATCCGGTGTGTGGAAACTCGTCTG
GAGCGGGGACATGCGAAGAAGAGTACATCTGTCTGCAAGGCTTCGGTGACAATCCCAACTATGGCTACACGAGCTTC
GACTCGTTCGGCTGGGCGTTCTGTGCGCGTTCCGCCCTGATGACGCAAGACTACTGGGAGAACCTCTACCAGCTGGT
GCTGCGCTCGGCCGGGCCATGGCACATGCTCTTCTTCATCGTCATCATCTTCTCGGCTCGTTCTACCTGGTCAACT
TGATCTTGCCATTGTGCGCATGTCTGACGACGAGCTGCAAAAGAAAGCGGAAGAGGAAGAGGCGGCGGAAGAGGAG
GCGATCCGGGAAGCCGATGAGGCTGCCCGGGCGAAGGAGGCTCGAACTGCTGCGCGCACGGCTGCGAGGGAAGCACG
CGCCCTCGCAGCCGAGCAACACAGCGTTGTCAAGTCTCCTTCGGACTTCTCTTGCCACAGCTACGAGCTGTTTGTG
GCCAGGAGAAAGGCAACGACGACAACAACAAGGAGAAG**ATGAGCATACGAAGCGACGGGGGGCGACTCCGTACGCGA**
AC

Amo-VGSC-block2

GATGAGCATACGAAGCGACGGGGGGCGACTCCGTACGCGAACACAAGTCTCGGCTGGCGAACAAAGACGAGGAAGTCG
AGTGCGGCAAGTTTTGAGTCTGCCCGGATCCCCATTCAACATGCGCCGGGGCTCAAGGGGCGAGCCATCAGTTACCCCT
GAGAAACGCCCCGAGGGCGCTTGCGCGGCCACCCGGAGGCGACCGGAAACCTCTGGTGCTATCCACGTACCTCGATG
CTCAGGAGCACCTGCCGTACGCGGACGACTCGAACGCCGTGACGCCCATGTCCGAGGAGAACGGTGCCATGGTCGTG
CCGATCTACTACGCTCGCTCGGCTCACGCCACTCGTCTGACACGTGCGATCAGTCGCGCGTGTCTGACACGTCCCA
CGGTGATCTGCTGGGCGCCGGCAAGGGCATGACCAAGGAGGATCGACTGCGGTGAGGTCGCGGAGGAACAACGTGC
CGAATCGACGCCGTACATGGCGGACTCGAATCACAACAGACGAGGGACTATGACGCATCGTGTGAAAGCGACGAT
GGAGCTACGAAAATGAAACACCAAGATAATCCGTTTATCGAGCCCCACACAACACCAGACGGTGGTCGACATGAGAGA
TGTGATGGTGTGTAACGACATAATTGAACAGGCGCGGGTTCGGCAAGTAGGGCAAGCGAACATGGTGCCGACGAGG
ACGAAGACGGCCCAACGGTCAAGGAACAGATCGTGCCGTGTGTCATGAAGGGCCTCGACACGTTCTGCGTGTGGGAC
TGCTGCTGGTTGTGGCTCAAGTTTCAAGAGTATGTGCGCTGATCGTGTTCGACCCGTTCTGTCGAGCTGTTTCATCAC
GCTCTGCATCGTCTGCAACACGCTGTTTCATGGCGCTCGACCACTACGACATGGACAAGGACATGGAGAAGGTGCTCA
AGAGCGGCAACTACTTTTTTACGGCAACATTCGCTATAGAAGCAACCATGAAGCTGATGGCCATGAGTCCCAAGTTT
TACTTCCAAGAAGGGTGGAAACATTTTCGACTTCATCATCGTCGCACTCTCTCTAGTCGAAGTGTGCTCGAGGGGGT
GCAGGGACTGTGCGTGTACGATCGTTCCGATTGTTGCGAGTGTTCAAGCTGGCCAAGTCGTGGCCCACTCTGAACC
TGCTGATCTCCATCATGGGTGCGACAGTTGGCGCGCTCGGCAACTTGACCTTCGTCTTGTGTCATCATCATATTCATC
TTCGCCGTGATGGGCATGCAACTGTTTCGGCAAGAACTACACAGACCACTACCACCGCTTCTACGATCACTCGATGCC
TCGATGGAACCTTACCAGACTTCATGCACTCGTTCATGATCGTGTTCGCGCTGCTGTGCGGGGAGTGGATCGAGTCCA
TGTGGGACTGCATGCTCGTGGGCGACTGGTCGTGCGTGCTTTCTTCTTGGCCACCGTCGTTCATCGGCAACTTGGTC
GTACTGAACCTCTTCTTAGCCTTGCTGCTCAGCAACTTC**GGCTCGTCAATCTATCGGCGCCGGCCGCCGACAACG**
ACAC

Amo-VGSC-block 3

GGCTCGTCTGAATCTATCGGCGCCGGCCGCCGACAACGACACAAACAAGATCACCGAGGCGTTCAATCGCATCTCGC
GATTCAACGCCTGGGTCAAGCGAAGTCTGTTGAACTTGCCAAAATGTTGCGCGCCAACTGACCAATCAGATTTCA
GACCAGACGCCAGCTGTGACGGGGATGGGATCGCGGGCGACGAGATCCTGGCCGACGGCCTGGTGTACCGGGACAA
GAAGAGCCCCAAGGACCAGAACCAGCTGGAGGTGGCAATAGGAGACGGCATGGAGTTCACGATACATGGAGATTTGA
AAAACAAATTGAAAAAGGGAAAGCTACTACTGAACAACACAAAGTCTATCGGCAATCACACAGACAATCGAATCGAG
AATGATTATATGATAAACCATATGGACGAAGACACCTAAGTATAAAATCCTACGGCAGCCATAAAAAACCGTCCATT
CAAGGATGAAAGTCACAAGGGTAGTTTAAATACAATGGATGGGGAGGAAAAGAAAGACGCAAGTAAGGAAGATCTTG
ACCAAGATGGCGACCTGGAAGACGACGGCGAGGGTGACGAGGAGCCGCTGGAAGAGGACATCATCGTGGACGCGGGC
ACCGAGGACGTACTGCTGCAAGACTATCCGGCCGACTGCTTCTCGGAAAACCTGCTACAAGCGGTTCCCTTCCCTCGC
CGGACGACGACGACGCGCCGTTCTGGCAAGGATGGGCCAATCTGCGACTCAAGACGTTCCAGTGCAGTGCAGAACAACT
ACTTCGAGACGGCCGTATCACCATGATCCTGCTCAGCAGTCTCGCATTGGCTTTGGAGGACGTTTCAGTGCATATAC
CGGCCGATCCTGCAAGACGTGCTGTACTACATGGACAGAATCTTACCGTCATCTTCTTCATCGAGATGTTGGTGAA
ATTCTCGCGCTGGGGTTCCAGAAGTACTTCACCAACGCGTGGTGCTGGCTCGACTTCGTTCATCGTTCATGGTGTCTG
TGATAAACTTCATCGCTTCTTTGTGTGGGGCTGGAGGGATTTCAGGCTTTCAAACTATGCGGACGTTGCGTGCCTC
AGACCTCTGAGGGCTATGTCTAGGATGCAGGCGATGAGGGTGGTGGTGAACGCGCTGGTCCAGGCCATCCCCAGCAT
CTTCAACGTGTTGCTCGTGTGCTTCATCTTCTGGCTGATCTTCGCCATCATGGGCGTGCAACTGTTCCGCCGAAAAT
ACCACAAGTGCGAAGATCAGAATGGCAGGCGCTGAGCCAGGAGATCATTCCGGACGTGAACGTCTGCAAGGCCGAA
AACTACACGTGGAAAACTCCGAGATGAACCTTTGACCACGTGGGGAAAGCCTACTTGTGCCTGTTCCAAGTGGCCAC
CTTCAAAGGCTGGATTCAAATCATGAACGACGCGATCGACTCGAGAGACAAGCTGGGAAAGCAGCCGATTTCGAGAGA
CGAACATCTACATGTATCTCTACTTTGTGTCTTCATCATCTTTGGATCTTT**CTTCACTCTCAACCTGTTTCATCGG**
AG

Amo-VGSC-4

CATCTTTGGATCTTTCTTCACTCTCAACCTGTTTCATCGGAGTCATCATTGACAACCTCAATGAACAGAAAAAGAAG
GCAGGAGGATCGCTAGAAATGTTTCATGACGGACGACCAGAAGAAATACTACAACGCGATGAAGAAAATGGGATCTAA
AAAGCCTCTGAAAGCCACACCACGACCAAGGTGGAGGCCACAAGCCATCGTGTTGAAATAGTGACCGACAAGAAAT
TCGACATGATCATCATGTTGTTTCATCGGCTTCAACATGGTGACGATGACAATGGACCACTACAAGCAGTCGGCCACG
TTCACGGCGATCCTGGACAACCTCAATCAGATCTTCATCGTCATCTTCTCGTCAGAGTGCCTGCTCAAAGTGTTCGC
GCTGCGCTACCACTACTTCAAGGAACCATGGAACCTTTTTGATTTGTTGTTAGTCATCTTGTCCATATTGGGGTTGG
TGTTGAGCGACCTGATCGAAAAGTACTTCGTGTGCGCAACGCTGCTGCGAGTGGTGAGAGTGGCGAAAGTGGGTGCG
GTACTCAGACTGGTCAAGGGCGCGAAGGGCATAACGAACGTTGCTGTTTGTCTGCGCATGTCTGTTGCCGGCACTCTT
CAACATCTGCTTGTGCTCTTCTTGTTCATGTTTATCTTTGCCATTTTCGGCATGTCTGTTCTTCATGAATGTCAAGG
ACAAGGGCGGACTGGACGACGTGTACAACCTCAAGTCGTTTCGGACAGTCCATGATTCTACTCTTTCAAATGTGACG
TCCGCGGGTTGGGACGGGGTGCTCGACGGCATCATTAACGAAGACGACTGCGTTCTGCCGAACCCGGAGATCGGGGT
GGCCGGCGACTGCGGGAACGCCACCATCGGCATCACTTTTTTGTGTGCTACCTCGTCATCAGCTTCTGATTGTCA
TCAACATGTACATCGCCGTATCTTGGAGAACTACTCGCAGGCGACGGAAGACGTGCAAGAGGGCCTTACGGACGAC
GATTACGACATGTACTACGAGATCTGGCAGAACTTTGACCCGGACGGCACGACGATACATCCGCTACGACCAGCTGTC
CGACTTCTCGACGTGCTGGAGGCGCCGTTGCAGATTACAAAGCCCAACAAGTACAAGATCGTCTCCATGGACATTC
CTATCTGCAAGGGCGACCTCATGTTCTGCGTGAGACATTCTCGACGCGCTCACGAAAGACTTCTTCGCGCGAAAGGGC
AGCCCCATCGAGGAGACCGCCGAACCTGGGCGAGGTGCAGGCCCGGCCGACGAGGTGGGCTACGCGCCCGTCTCGTC
AACCCTGTGGCGTCAGCGCGAGGAGTACTGCGCGCGCCTCATCCAGAACGCGTGGCGCAAGCACAAACAGCAGCGCC
TCGGTGACTCGGACGACGCCGGCGACGACACCGACCCGTCCGACGCGCACCAGACGGCCGTGCTCGTCGAGAGCGAC
GGCTTCGTACGAAGAAGCGCCACCGCGTCGTCATCCACTC**GCGGTCGCCGAGCGTCACGTGCGGATCCACGGACG**
TCTGA