

**PROTEÍNAS DE SHOCK TÉRMICO EN *ANDIPERLA* (PLECOPTERA,
GRYPOPTERYGIDAE)**



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

Pergamino, 11 de Junio del 2025

PROTEÍNAS DE SHOCK TÉRMICO EN *ANDIPERLA* (PLECOPTERA, GRYPOPTERYGIDAE)

Trabajo Final de Grado del alumno

Enzo San Martín

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Dr. Andrés Lavore
Evaluador

Dr. Tácio Duarte Simões
Evaluador

Dr. Greco Hernández Ramírez
Evaluador

Mg. Agustín Baricalla

Co-Director

Dra. Carla Layana

Co-Directora

Dr. Rolando Rivera Pomar

Director

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

Pergamino, 11 de Junio del 2025

"Somos agua de lo mismo". Cuentos Borgeanos

Agradecimientos

Este trabajo es sólo una pequeña parte de todo el proceso, y si lo analizo con las personas que formaron parte sólo me queda decir que los resultados son meras superficialidades de algo más grande, como los vínculos humanos y el arduo trabajo.

Ya pasó bastante tiempo de aquel 2018 en dónde decidí aventurarme a la Ciudad de Pergamino, a 1200 km de mi natal Salta la linda. ¿El motivo? La pasión por la ciencia, por la genética y por aprender. Recuerdo el día que lo comenté a mi familia, y sin dudarlo me apoyaron en todo. Por ese motivo:

A mi papá Julio San Martín, quién con sus pocas palabras solo escuchó y llegado el día de partir, preparó mis cosas teniendo en cuenta hasta el más mínimo detalle para que pudiera pasar una mudanza más amena. No me olvido viejo que, con tu delicado estado de salud, manejaste la camioneta ayudado de mi hermano mayor José. Gracias, papá por tu crianza, porque cada vez que me equivoco en la vida, pienso que haría mi papá y la única respuesta que tengo es la de ser buena persona.

A mis hermanos: José que me acompañó en la mudanza, quién siempre me recibió en las visitas a Salta y me dio su apoyo en cada llamado que hice. Al gringo, por ser el más amigo de mis hermanos. Luciana, la más chiquita y mimada, con la que aprendí a ser más responsable. Gabiota, mi hermana la más bohemia y libre de todas, la que nos saca de lo estructurado y terrible que pueden ser las rutinas.

A mi mamá Mery Chavarría, la que me enseñó la importancia del orden y la resiliencia para perdurar en el tiempo. Cada vez que un hijo se iba de casa, le dabas todo lo que tenías y volvías a empezar.

A mí tía abuela Martha Gutiérrez, gracias por tu apoyo incondicional, por creer en mí hasta en los momentos más turbulentos, siempre apostando por los tuyos y dando todo sin pedir nada a cambio, a pesar de que no era tu responsabilidad.

A mi tío Carlos San Martín, el tío más cómplice y macanudo que se puede tener. Gracias por tus bancadas y complicidades. Siempre te la ingeniateste para que estemos bien dándonos una mano en lo que sea, brindando tu buen humor y tus sabios consejos.

También quiero destacar a las personas que fueron parte de mi formación tanto humana como académica:

A mis amigos de Villa Mitre. Nos conocemos desde la infancia y hasta el día de hoy seguimos celebrando cada juntada, cada fecha especial. El día que me recibí de profesor de biología hicimos un lfo por la Ciudad, están locos y por eso son mis amigos.

A mis colegas del trabajo, profesores, directivos que siempre me cubrieron cuándo se me complicaba cumplir con la facultad y la escuela. En especial un agradecimiento a Leo Lanzillota, el mejor director de escuela que puede haber, gracias por ser tan humano y comprensivo con tus pares, por comprender cada vez que debía faltar y desearme éxitos, por permitirme usar herramientas de la escuela cuándo me quedé sin nada, gracias a eso pude continuar con este trabajo.

A mis compañeros de la facultad: Lula, Anto, Cande y Nico. Gracias por todas las risas, charlas, nervios que pasamos. Gracias Anto por las confidencias, los consejos y por el apoyo en todo momento. A Nico por ser no solamente el mejor en genética sino por ser un amigo de fierro, por haber enseñado temas complicados, por haber compartido sus conocimientos y resúmenes prohibidos, por dar de forma inocente y desinteresada, y por ser un tipazo con el que se puede hablar de cualquier tema, no cambies nunca porque sos lo que este campo necesita.

A los amigos pergaminenses que hice en el camino: A Alicia y Hugo, quiénes fueron como una familia para mí con la que pude compartir muy buenos momentos, largas charlas y siempre tuvieron al pendiente de lo que pasase conmigo. A Leo y Bernarda, quienes conocí como locadores y luego descubrí su calidad humana, siendo el único contrato dar una mano a quién la pelea. A Gustavo, que conocí comprándole vinos y luego me incluyó en las peñas de todos los meses, en la cuáles hice buenos amigos y me sigo divirtiendo un montón. Gracias Gustavo por todos los favores y por tu amistad.

Y por supuesto, gracias a los docentes y directivos de la UNNOBA. A Mariana Bracco por haberme orientado en la carrera y resolver los inconvenientes que se me presentaron con respecto a cursadas, finales y superposiciones horarias con mi trabajo. A Agostina Arias por haber confiado en mis capacidades y elegirme para ser ayudante de cátedra dos años consecutivos en Biología de los Microorganismos, Genética de los Microorganismos, y un año en Citogenética. A la UNNOBA por haber sido mi segunda casa de estudio después del profesorado de Salta N° 6005, y por haberme brindado no solo el conocimiento disciplinar sino también haberme adentrado en el mundo de la investigación básica.

A mis directores de tesis, a Agustín por enseñarme lo básico en bioinformática y por haber intentado el uso de diferentes herramientas con su paciencia ante mi desconocimiento y práctica

en este campo. A Carla por su apoyo en las distintas postulaciones a becas y por orientarme en los pasos de la investigación. A Rolando por aceptarme de entrada como su tesinista, y comprender mis tiempos y espacios disponibles, algo que en este campo es difícil conseguir. También agradecerle por su tenacidad en el largo proceso, gracias por acompañarme hasta lo último y haberme transmitido el entusiasmo y la curiosidad por aprender.

A Pablo Pessacq (CIEMEP) por su gran aporte a este trabajo, su interés y su apoyo constante. Gracias por atender mis dudas sobre la ecología de los glaciares y la biología de los plecópteros patagónicos, gracias por haber sido otro “director” en este trabajo. También agradecerle a Luciana Grimolizzi (CIEMEP) que junto a Pablo me facilitaron los ensayos del Máximo Térmico Crítico y me explicaron hasta los más precisos detalles del protocolo.

Este trabajo no hubiese sido posible sin: el financiamiento de la Academia de Ciencias de Göttingen a través de la Cátedra Gauss; los datos de secuenciación del Instituto Max Plank de Ciencias Multidisciplinarias (Göttingen); las campañas de recolección logradas por Ramiro Tintorelli, Rolando Rivera Pomar, Daniel Bea y Pablo Pessacq; el apoyo de UNNOBA y UNSAdA, Hielo y Aventura y Administración de Parques Nacionales. Gracias a las becas de pre-grado que permitieron que tenga menos carga horaria laboral para poder dedicarle a la carrera: Beca Manuel Belgrano y Beca de entrenamiento BENTRE23 CIC.

Por último, quiero agradecer a la Gran Educación Pública Argentina, que me formó profesionalmente y me permite enseñar en el nivel secundario. Sin el apoyo del Estado no hubiese podido trascender las barreras económicas y sociales impuestas por un modelo económico que deja de lado a los que menos tienen. Gracias a los que defienden la igualdad de oportunidades, siendo la educación un derecho y no cuestiones de privilegios. Gracias a los que creen en una ciencia más igualitaria, accesible y comprometida con el desarrollo del país.

Resumen

Andiperla (Familia: Gripopterygidae) es un género de plecópteros patagónicos que pasan toda su ciclo de vida en los glaciares patagónicos: las larvas viven en agua helada, a una temperatura cercana a los 0°C y los adultos caminan sobre el hielo.

En este trabajo se analiza la respuesta genética de larvas de *Andiperla* en el Máximo Térmico Crítico (MTC). El MTC es la temperatura a la cuál los organismos pierden la coordinación de sus movimientos. Este valor se determinó con ensayos de aumento progresivo de la temperatura del agua hasta que las larvas alcanzaron su MTC (alrededor de 22° C). De los individuos en el MTC se extrajo ARN y se procedió a analizar la expresión génica diferencial (DEG, del inglés *Differentially Expressed Gen(s)*) a partir de datos de RNAseq respecto a un control, obtenido de un pool de larvas en su condición natural de 4°C.

Las proteínas de shock térmico, *heat shock protein* (Hsp) y *cold shock protein* (Csp) son encargadas de proteger a la célula en el estrés térmico. Como el MTC implica un estrés térmico, en primer lugar identificamos las HSP y CSP codificadas en un transcriptoma de *Andiperla morenensis* (11 Hsp y 2 Csp). Los experimentos de DEG en el MTC permitieron identificar transcritos que se expresan al alza (Hsp 83, Hsp 60 A, Hsp 70 cognate 5 y Hsp 68) y a la baja (Hsp 75 mitocondrial (TRAP1), Hsp 70-4L, Csp E1 (CSDE1) y Csp CG9705). Eso indica que algunos genes de shock térmico se activan con el incremento de la temperatura mientras que otros, en particular las Csp, ya se encuentran expresados en los organismos en su ambiente natural.

Por otro lado, se analizó la expresión diferencial de genes involucrados en otras respuestas metabólicas. Se encontró que en el MTC se activa la transcripción de genes de procesos degradativos de la JH III: JH esterasa y JH epóxido hidrolasa I, y la del neuropéptido F corto (sNPF), un inhibidor de la biosíntesis de JH III y de la farnesol deshidrogenasa, relacionada con la biosíntesis de JH III. Sin embargo, el gen codificante de la enzima clave en la biosíntesis, la epoxidasa de metil farnesoato, se encuentra expresado a la baja. Esto sugiere que *Andiperla* disminuiría la biosíntesis de JH III al alcanzar su MTC.

ÍNDICE

Glosario y abreviaturas.....	10
Introducción.....	14
Glaciares y su diversidad ambiental	14
Artrópodos y respuestas a bajas temperaturas.....	15
Plecópteros y <i>Andiperla</i>	21
Límite de tolerancia a la temperatura: Máximo Térmico Crítico	24
Proteínas de shock térmico	28
Transcriptómica y Expresión Génica Diferencial.....	30
Hipótesis	32
Objetivo General	32
Objetivos específicos.....	32
Palabras claves:	32
Materiales y Métodos	33
Búsqueda de transcritos codificantes de proteínas de shock térmico (Hsp) en el transcriptoma de referencia	33
Comparación de secuencias y filogenia.....	34
Análisis de todas las proteínas en conjunto	36
Medición del MTC.....	36
RNA-seq.....	36
Pipeline Bioinformático	37
i. Control de Calidad: FastQC y MultiQC	37
ii. Remoción de Adaptadores con Trim Galore!	37
iii. Control de Calidad: FastQC y MultiQC.....	38
iv. Cuantificación de reads: <i>Align reads and estimate abundance</i>	38
v. Expresión Génica Diferencial: EdgeR con genes codificantes de proteínas..	38
vi. Visualización con heatmap2	39
Búsqueda de transcritos codificantes de enzimas del metabolismo de la hormona juvenil (JH)	39
Resultados	40
Identificación de Hsp y Csp	40
Transcriptos identificados.....	40
Comparación de secuencias y relaciones filogenéticas	41
Descripción de proteínas de shock térmico: Hsp y Csp	51
Máximo Térmico Crítico (MTC).....	63

Expresión Génica Diferencial (DEG) con EdgeR	66
DEG de proteínas de shock térmico: <i>Hsp</i> y <i>Csp</i>	67
Búsqueda y DEG de transcritos que contengan términos GO relacionados a la Hormona Juvenil	69
Vía biosintética y degradativa de la JH III en insectos	71
Conclusión y discusión	76
Perspectivas futuras	80
Bibliografía	81
ANEXO.....	106
Anexo I: Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las hsp y csp.....	106
Anexo II: Datos de los genomas de plecópteros.....	114
Anexo III: Códigos de acceso de las hsp y csp utilizadas para los alineamientos múltiples.....	114

Glosario y abreviaturas

3-UTR: (*3'-Untranslated Region*), región no traducida del extremo 3' del ARNm.

aa: Aminoácidos.

AaSDR-1: Sinónimo de farnesol deshidrogenasa.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Andiperla: Hace referencia al género que actualmente abarca dos especies *Andiperla morenensis* y *Andiperla willinki*.

Apterismo: Pérdida de las alas.

ARN: Ácido Ribonucleico.

BD: Base de Datos.

BLAST: (*Basic Local Alignment Search Tool*), algoritmos utilizados para comparar secuencias biológicas, como secuencias de nucleótidos o proteínas, con secuencias existentes en grandes bases de datos.

Braquipterismo: Reducción de las alas.

CA: *Corpora allata*, glándulas que forman parte del sistema neuroendocrino de los insectos.

Canalización: Tendencia de un organismo a producir un fenotipo “normal” a pesar de las variaciones genéticas, también se lo menciona como robustez del desarrollo.

CC: *Corpora cardiaca*, glándulas endócrinas que se conectan y trabajan con la *corpora allata*.

Cladograma: Diagrama ramificado que agrupa taxones según su parecido, como por ejemplo, según secuencias de aminoácidos o nucleótidos.

Crioconitas: Pozones de agua que se forman en los glaciares producto de la deposición de sedimentos y restos orgánicos.

CSDE1: Cold shock domain-containing protein E1 {ECO:0000305}.

Csp CG9705: Cold shock domain-containing protein CG9705.

CYP15A1: Sinónimo de MFE.

DEG: (*Differentialy Expressed Gen's*), Genes Diferencialmente Expresados. Se comparan los niveles de expresión de los transcritos ante dos o más condiciones.

Duplicaciones en tándem: copia de una secuencia de ADN que se encuentra próxima o cercana a la original.

EdgeR: (*Empirical analysis of Digital Gene Expression in R*), Software utilizado para realizar la DEG.

Farnesol deshidrogenasa: Enzima partícipe de la biosíntesis de la JH.

Gen ID: Marcador del gen usado para identificar las secuencias ensambladas.

GO: (*Gene Ontology*), refiérase a una jerarquía sistemática de las funciones de genes según su secuencia y/o dominios.

Heatmap: Representación esquemática, por medio de colores, de transcritos o proteínas expresadas diferencialmente.

Hsp 60 A: Heat shock protein 60 A.

Hsp 68: Heat shock protein 68.

Hsp 70 cognate 5: Heat shock 70 kDa protein cognate 5.

Hsp 70-4L: Heat shock 70 kDa protein.

Hsp 75 mitochondrial: Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial.

Hsp 83: Heat shock protein 83.

INAs: (*Ice nucleating agents*), agentes nucleadores de hielo, moléculas que facilitan la formación de hielo a temperaturas más altas que la normal.

input: Datos de entrada para el análisis bioinformático.

Isoforma: Transcritos que difieren en longitud y secuencia, producto del empalme alternativo.

JH: (*Juvenile hormone*), Hormona juvenil. Permite mantener las formas juveniles de los insectos, evitando el avance a la adultez.

JHE: JH esterasa, enzima degradativa de la JH.

JHEH: JH epóxido hidroxilasa, enzima degradativa de la JH.

MFE: (*Methyl farnesoate epoxidase*), la epoxidasa de metil farnesoato es una enzima clave en la última reacción biosintética de la JH III.

MSA: (*Multiple Sequence Alignment*). Alineamiento de secuencias múltiples, métodos bioinformáticos que se utilizan para comparar varias secuencias de aminoácidos o nucleótidos.

MTC: Máximo Térmico Crítico, también es conocido como *CT_{máx}*. Es la temperatura máxima en la cuál un insecto pierde la coordinación de sus movimientos.

MVAP: Vía del mevalonato, primera rama de la biosíntesis de la JH.

NCBI: (*National Center for Biotechnology Information*), Base de datos con amplia información sobre genes, proteínas y *softwares* bioinformáticos.

nt: nucleótidos

ORF finder: Buscador de *open reading frame* o “marcos de lectura abiertos”, permite reconocer secuencias codificantes a partir de *reads* largos.

Ortólogos: Mismo gen pero en diferentes especies.

output: Resultados o datos obtenidos de un *software* bioinformático.

Parálogos: Genes producidos por duplicación génica.

Plecópteros: Insectos del Orden Plecoptera, dónde se incluye el género *Andiperla*.

Proteínas de shock térmico: Proteínas que muestran una expresión diferencial ante el estrés por temperatura.

QuickGO: Buscador de términos GO.

RBP: (*RNA binding proteins*), son proteínas de unión a ARN.

reads: Fragmentos de ADN o ARN que se obtienen producto de la secuenciación.

RNA-seq: Secuenciación de ARN.

ROS: (*Reactive oxygen species*), especies reactivas de oxígeno.

SCP: (*Supercooling point*), punto de superenfriamiento, se refiere a la disminución de la temperatura de congelación.

sNPF: (*Short neuropeptide F*), inhibidor de la biosíntesis de la JH.

Transcripto: Secuencia de ARN sintetizado a partir de una plantilla de ADN por el proceso de transcripción.

Transcriptoma: Conjunto completo de todas las secuencias de ARN obtenidas por un método informático de ensamblaje utilizando datos de RNA-seq.

TRAP1: Sinónimo de Hsp 75 mitocondrial.

UPR: (*Unfolded protein response*) respuesta a proteínas mal plegadas.

Introducción

Glaciares y su diversidad ambiental

Un glaciar es un cuerpo permanente de hielo y nieve, que se ha formado por la acumulación, compactación y recristalización de la nieve acumulada en el invierno y que no logra derretirse en el verano siguiente (Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable). Los glaciares cubren alrededor del 10% de la superficie terrestre, pero retroceden rápidamente y muchos desaparecerán en pocas décadas (Cauvy-Fraunié & Dangles, 2019). En Argentina se ha realizado un inventario exhaustivo de glaciares, habiéndose inventariado al año 2017 un total de 15.482 glaciares representando 5.743 km² (Zalazar et al., 2017) . Dentro de estos, la región Patagonia Sur tiene el 59,6% de la superficie con hielo del país y el 15.6% del total de glaciares. Dentro de esta zona se encuentran los glaciares de mayor superficie del país: Upsala (786 km²), Viedma (737 km²) y Perito Moreno (244 km²).

En la superficie de los glaciares abundan los agujeros de crioconita que se forman a partir de una matriz de partículas minerales y material biológico depositada por el viento y el agua de deshielo, muy probablemente de origen local (Porazinska et al., 2004). La estructura de los agujeros de crioconita asegura que los organismos que los habitan tengan acceso a agua líquida durante toda la temporada de ablación (Fountain & Walder, 1998; Hodson et al., 2008) y asegura una densidad relativamente alta de diferentes formas de vida en comparación con otras formas de hábitats supraglaciales (Edwards et al., 2011). Las crioconitas, a pesar de su pequeño tamaño, podrían ser focos de biodiversidad para los invertebrados que habitan los ecosistemas glaciares (Dastych, 2004; De Smet & Van Rompu, 1994; Mueller, 2001, n.d.; Porazinska et al., 2004). Actualmente, los agujeros de crioconita se consideran microecosistemas extremos, en los que la producción primaria podría ser similar a la del suelo, y microorganismos como bacterias, ciliados o algas habitan estos entornos (Anesio et al., 2009; Cameron et al., 2012; Hodson et al., 2008; Mieczan et al., 2013; Mueller, 2001, n.d.; Tranter et al., 2004; Vincent et al., 2000).



Figura 1. Las crioconitas del glaciar Perito Moreno. En la corriente de agua sobre el glaciar se observan los depósitos de detritos en los que se encuentran las larvas de *Andiperla*. Los adultos suelen encontrarse en las inmediaciones de la corriente de agua. En estos depósitos, que permanecen fluidos durante el invierno, es donde viven la mayor parte del ciclo de vida. Asimismo, se han encontrado exuvias que indican que las mudas ocurren en el mismo lugar hasta el estadio adulto. Fotos tomadas durante la expedición 2018.

Es en esos detritos de los pozones (Figura 1) dónde se han encontrado larvas de *Andiperla*, junto con larvas de un quironómido desconocido y al menos un colémbolo. Estos son hasta el momento los únicos animales de vida permanente en el glaciar. Estudios preliminares indicarían que los quironómidos y los colémbolos constituirían parte de la dieta de las larvas de *Andiperla* (Grimolizzi, Pérez, Rivera & Pessacq, resultados no publicados).

Artrópodos y respuestas a bajas temperaturas

Dentro de las especies extremófilas, aquellas que presentan adaptaciones a ambientes fríos son denominadas psicrofilas. Al respecto, se han descrito algunos insectos que pueden desarrollarse a bajas temperaturas e incluso estar asociados a matrices de hielo donde completan todos los estados de su ciclo vital (Kohshima et al., 2002).

La temperatura es uno de los factores abióticos más importantes para la actividad y distribución geográfica de los organismos. Afecta procesos biológicos en todos los niveles de organización: interacciones moleculares y cinética bioquímica (Somero, 1995), morfología (Arrighi et al., 2013), comportamiento, ecología (Huey & Berrigan, 2001), distribución (Bale et al., 2002) y evolución (Rolandi, 2016). Las bajas temperaturas determinan la historia de la vida de

los animales ectotérmicos, como los insectos (Doucet et al., 2009). Los insectos sobreviven a la baja temperatura adoptando una de dos estrategias (Tabla 1): tolerancia a la congelación o evitación de la congelación (Bale et al., 2002).

Evitación de la congelación	Tolerancia a la congelación
• Alta capacidad para el sobreenfriamiento. • La temperatura de sobreenfriamiento suele ser menor que la temperatura letal. • Ausencia o enmascaramiento de nucleadores de hielo. • Los polioles tienen función anticongelante. • Las proteínas de histéresis térmica permiten estabilizar el punto de sobreenfriamiento. • La formación de hielo es letal	• Poca capacidad para el sobreenfriamiento. • La temperatura de sobreenfriamiento es mayor que la temperatura letal. • Nucleadores de hielo presentes y activos. • Los polioles tienen función de crioprotección. • Las proteínas de histéresis térmica cumplen función anticongelante. • Sobreviven a la formación de hielo extracelular.
Tabla 1. Tabla comparativa de las estrategias adaptativas al frío en Artrópodos (Tomado y traducido de Block, 1990).	

Para evitar la congelación, los organismos utilizan mecanismos de comportamiento, fisiológicos y bioquímicos: la selección de un lugar de hibernación seco o tener una barrera física, como una cutícula recubierta de cera, que proporcione protección contra el hielo externo (Duman, 2001). Los insectos que evitan la congelación no pueden tolerar la formación de hielo en sus fluidos corporales. Por ello necesitan implementar estrategias para reducir la temperatura a la que se congelan. El agua necesita agentes nucleadores de hielo (INAs) para solidificarse. En el sobreenfriamiento el agua se enfría por debajo de su punto de congelación sin pasar a estado sólido debido a la falta de una fuente de nucleación. (Angell, 1982). En la fase inicial del endurecimiento estacional por el frío, los INAs, como las partículas de comida, las partículas de polvo y las bacterias del intestino o de los compartimentos intracelulares, tienen que ser eliminados o inactivados. Además, los insectos acumulan y sintetizan crioprotectores como polioles y azúcares, que reducen la temperatura de congelación del cuerpo (Sheikh et al., 2017). El segundo mecanismo, la tolerancia a la congelación, se refiere a la capacidad de

algunas especies de insectos para sobrevivir cuando se forma hielo en sus tejidos: consiguen evitar el daño tisular controlando la extensión de la formación de hielo (Ramløv, 2000; Toxopeus & Sinclair, 2018). A diferencia de los insectos que evitan la congelación y que son capaces de existir en condiciones de frío mediante el sobreenfriamiento, los organismos tolerantes a la congelación limitan el sobreenfriamiento e inician la congelación de sus fluidos corporales a temperaturas relativamente altas. Fisiológicamente se consigue mediante la congelación inoculativa, la producción de INAs, compuestos cristaloides o microorganismos (R. E. Lee & Costanzo, 1998; Toxopeus & Sinclair, 2018). Los insectos tolerantes a la congelación regulan la producción de INAs, lo que les permite controlar la formación de cristales de hielo dentro de sus cuerpos (R. E. Lee & Costanzo, 1998). Las proteínas nucleantes pueden ser producidas por el insecto o por microorganismos que se han asociado a los tejidos. Una vez iniciada la congelación, el hielo se extenderá por todo el cuerpo (R. E. Lee & Costanzo, 1998).

Las especies tolerantes a la congelación suelen tener temperaturas de cristalización bajo cero elevadas (sólo unos pocos grados por debajo de 0°C), y pueden resistir la formación de hielo en sus cuerpos. El hielo suele restringirse a los compartimentos extracelulares, y la concentración de hielo y la deshidratación osmótica garantizan que el agua no se congele dentro de las células (Ramløv, 2000). Aunque muchos de los componentes bioquímicos que permiten la tolerancia a la congelación se comparten con la evitación de la congelación, sus funciones fisiológicas difieren considerablemente entre las estrategias. Entre las especies tolerantes a la congelación, la congelación se inicia mediante nucleadores de hielo en la hemolinfa o el intestino, mientras que los polioles y azúcares protegen las membranas y las proteínas contra las transiciones de fase y controlan el tamaño de la fracción de hielo y el volumen celular mínimo resultante de la concentración de congelación y la deshidratación osmótica que acompañan a la congelación (Ramløv, 2000; Zachariassen, 1985). Las proteínas anticongelantes suelen estar presentes y actúan como inhibidores de la recristalización, impidiendo el crecimiento y la redistribución de los cristales de hielo una vez que se han formado (Duman, 2001). La tolerancia a la congelación es poco común en artrópodos y otros invertebrados, y generalmente ocurre en una sola etapa de vida de una especie (Block, 1990).

En muchos sistemas biológicos, y especialmente en los insectos, la norma es evitar la congelación por sobreenfriamiento, más que tolerar una formación limitada de hielo. Éste es el caso de los artrópodos y otros invertebrados que han sido investigados (Sømme et al., 1982).

Se describe también una tercera estrategia adaptativa al frío (Figura 2), en la que los insectos reducen su punto de fusión manteniendo sus fluidos corporales en equilibrio de presión

de vapor con el hielo circundante (crioprotección) (Sinclair et al., 2003). Cuando los artrópodos con cutículas permeables al agua están rodeados de hielo ambiental, un gradiente de presión de vapor extrae agua del cuerpo hacia el hielo circundante, permitiendo así que el punto de fusión del fluido corporal siga las temperaturas ambientales (Holmstrup et al., 2002). Los requisitos previos para la deshidratación crioprotectora son una cutícula permeable, una tolerancia extrema a la deshidratación y la capacidad de resistir la congelación inoculativa. Entre las especies antárticas, la deshidratación crioprotectora se ha demostrado en el colémbolo *Cryptopygus antarcticus* (Elnitsky, Benoit, et al., 2008; Elnitsky, Hayward, et al., 2008; Worland & Block, 2003) y el jején *Belgica antarctica* (Elnitsky, Hayward, et al., 2008).

Algunos autores consideran que la deshidratación crioprotectora es una tercera estrategia para pasar el invierno (junto con la tolerancia a la congelación y la evitación de la congelación), ya que durante la deshidratación crioprotectora los artrópodos no se congelan ni se sobreenfrían, ya que su punto de fusión coincide con la temperatura ambiental (Teets & Denlinger, 2014).

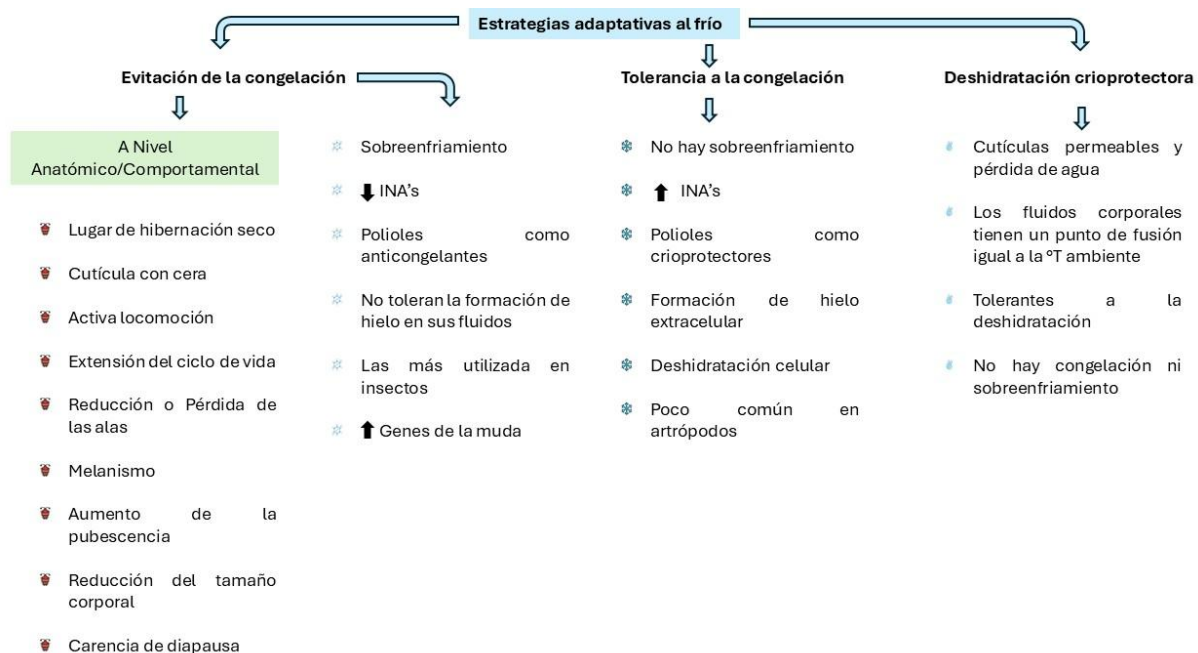


Figura 2. Resumen de las estrategias adaptativas al frío en artrópodos.

El acotado rango de temperaturas en el que se desarrollan las especies de *Andiperla*, 0 a 4°C, no coincide con las estrategias usuales de tolerancia y evitación al congelamiento, lo que las hacen, nuevamente, un organismo particularmente atractivo para estudiar.

En el año 2000, se publicó el borrador del genoma de *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000) y desde entonces ha sido el genoma del insecto de referencia. Debido a su larga trayectoria en la investigación genética, *Drosophila* siempre se ha utilizado como “insecto modelo”. En cuanto a su utilidad en estudios ambientales, particularmente en lo que respecta a la tolerancia al frío: es limitada ya que esta especie no es resistente al frío. El coma por frío ocurre a 7°C y la lesión por frío y detención del desarrollo ocurren sólo 2°C más arriba, de 9 a 10°C (Cohet et al., 1980; Hosler et al., 2000). A temperaturas inferiores a 5°C se produce una mortalidad extensa (Czajka & Lee, 1990).

Recientemente, se ha estudiado el efecto de la muda sobre la capacidad de superenfriamiento, o punto de superenfriamiento (SCP) en Collembola (Worland, 2005; Worland et al., 2006). Se podría esperar que la muda descienda el SCP, porque en Collembola el intestino medio y todo su contenido se eliminan durante este proceso (Thibaud, 1968) resultando en la expulsión de potenciales nucleadores de hielo. Aunque esto todavía es tema de debate, estudios de *microarrays* indican de manera similar una correlación entre SCP bajos y muda. Los genes que codifican las proteínas de la cutícula están regulados positivamente en animales con bajo SCP, lo que se interpreta como indicativo de que una proporción significativa de la población con bajo SCP estaba experimentando muda (Purać et al., 2008).

Los artrópodos poiquilotermos, se adaptan a ambientes fríos de diversas maneras que incluyen la extensión de la actividad locomotora a bajas temperaturas, la mejora de la tasa metabólica y el mantenimiento de un equilibrio energético positivo siempre que sea posible. Las implicaciones ecológicas para muchos de estos animales son la extensión del ciclo de vida y la necesidad de que un individuo pase el invierno varias veces (Block, 1990).

La mera supervivencia en un ambiente frío no es suficiente, ya que los insectos tienen que crecer, desarrollarse a través de varias etapas de la vida y reproducirse durante períodos de verano, a menudo cortos. Por lo tanto, los efectos de las bajas temperaturas pueden ser nocivos y perjudiciales para los artrópodos (Block, 1990).

Los efectos de las bajas temperaturas sobre los insectos y otros artrópodos terrestres son variados. Cuando la temperatura ambiente desciende hacia el extremo frío del rango térmico de la especie, el metabolismo general individual se reduce y la actividad locomotora se restringe cada vez más hasta la aparición del coma frío cuando cesa todo movimiento (Block, 1990).

En los insectos, las adaptaciones morfológicas al frío incluyen reducción del tamaño corporal, melanismo, aumento de la pubescencia y reducción de las alas (braquipterismo) o

pérdida (apterismo). Las adaptaciones de comportamiento consisten en evitar condiciones ambientales extremas mediante la selección de hábitat, la termorregulación y los patrones de actividad, mientras que las adaptaciones ecológicas incluyen la extensión del ciclo de vida y el univoltinismo en casos especiales. Las adaptaciones fisiológicas son la elevación de la tasa metabólica, la resistencia a la desecación, la tolerancia al frío y el metabolismo anaeróbico en algunas especies (Block, 1990).

La mayoría de las especies polares probablemente utilizan pequeñas mejoras en su movilidad para mejorar significativamente sus actividades de búsqueda y alimentación a temperaturas tan bajas, y así obtener una ventaja considerable en términos biológicos.

La elevación del metabolismo en reposo es necesaria en especies que viven en ambientes fríos para evitar que descienda por debajo del nivel de mantenimiento, sin embargo, su elevación por parte de tales poiquilotermos no ocurre, ya que desviaría energía del crecimiento y la reproducción y podría ser selectivamente desventajoso. El consumo de energía para el metabolismo basal será similar tanto en especies templadas como polares, en comparación con sus temperaturas ambientales normales. Por lo tanto, el desperdicio de energía no surgiría, siempre que la ingesta de energía y el metabolismo sean similares en sus respectivas temperaturas de hábitat (Block, 1990).

En muchas especies de artrópodos árticos se observa una extensión de la duración del ciclo de vida en muchas especies de artrópodos árticos. Se encuentran ejemplos extremos de esto en un quironómido que vive en charcas de la tundra del norte de Alaska, que tiene un ciclo de vida de siete años (Butler, 1982), y en la polilla del ártico, *Gynaephora groenlandica*, que requiere hasta 14 años para completar su ciclo de vida (Kukal & Kevan, 1987).

Junto con ciclos de vida largos, los artrópodos árticos y antárticos normalmente carecen de diapausa y, en cambio, dependen de la quietud para soportar períodos desfavorables. Esto permite a las especies aprovechar las estaciones de crecimiento extremadamente cortas e impredecibles (Convey, 1996).

Aparte de los prolongados estilos de vida, hay un par de otras características notables de los artrópodos polares. Si bien las especies más representativas provienen de taxones ápteros (es decir, ácaros y colémbolos), de las tres especies de quironómidos del continente, dos (*B. antarctica* y *E. murphyi*) son secundariamente braquípteros (Convey & Block, 1996). El braquipterismo es una adaptación común en regiones aisladas y azotadas por el viento, y sirve para evitar la dispersión accidental en ambientes desfavorables y para conservar el calor al

reducir la relación superficie-volumen. Dado que los factores estresantes ambientales se consideran la principal presión selectiva en la Antártida, se cree que existe poca competencia inter e intraespecífica por los recursos (Hogg et al., 2006). La mayoría de los artrópodos antárticos son herbívoros y detritívoros generalistas (Davis, 1981) y prosperan con fuentes de nutrientes esporádicas e inconsistentes. (Teets & Denlinger, 2014).

Las temperaturas extremas también pueden proporcionar una protección natural contra las invasiones de competidores o depredadores (Isaak et al., 2015). Por lo tanto, es probable que la temperatura dé forma tanto a la evolución de la fisiología de los insectos acuáticos como a las redes locales de interacciones bióticas (Shah et al., 2020).

Para comprender la relación entre la temperatura y la tolerancia ectotérmica, los enfoques basados en rasgos (p. ej., medir la tolerancia térmica superior) pueden resultar informativos. Sin embargo, centrarse en los rasgos fisiológicos a nivel de todo el organismo puede pasar por alto otros aspectos clave del potencial de respuesta de una especie, lo que quizás limite las predicciones de si las especies pueden evolucionar en respuesta a regímenes térmicos cambiantes (Chown et al., 2010) o tolerarlos *in situ* a través de la plasticidad. Por lo tanto, existe la necesidad de conectar rasgos desde el nivel celular al organismo y considerar los hallazgos de manera integral (Hotelling et al., 2019).

Plecópteros y *Andiperla*

Los plecópteros son insectos acuáticos, que siguen un modelo generalizado y poseen distribución cosmopolita (Zwick, 2000). El orden es monofilético de acuerdo con análisis filogenéticos morfológicos y moleculares (McCulloch et al., 2016; Zwick, 2000). Las larvas viven en ambientes lóticos libres de polución y unas pocas son terrestres o semiterrestres. Aunque son frecuentemente herbívoras, pueden alimentarse de otros insectos. Los adultos se alimentan de polen, líquenes y otros ítems de reducido tamaño, o no se alimentan en lo absoluto (Tierno de Figueroa & Fochetti, 2001). En América del Sur, estos aspectos de la biología de Plecóptera casi no han sido estudiados, y nuestro conocimiento se restringe a pocos taxones (e.g. *Klapopteryx kuscheli* (Illies J. , 1960), *Notoperla* (Enderlein, 1909), *Diamphipnopsis virescentipennis* (Blanchard & Gay, 1851) y algunos aspectos de su biología alimentaria, ecología y reproducción (Albariño, 2001; Albarino & Balseiro, 1998; Albariño & Villanueva, 2006; De Figueroa et al., 2006; Epele & Miserendino, 2011; Omad et al., 2015).

La lista de especies de plecópteros para la región neotropical, incluyendo sur de Argentina y Chile (Pessacq et al., 2019) incluye 596 nombres válidos; en nuestro país se conocen 73

especies en 36 géneros y seis familias, siendo la más diversa Gripopterygidae, con 28 géneros y 31 especies, de las cuales 28 son endémicas de la Patagonia (Pessacq et al., 2019, 2020). Dentro de la familia Gripopterygidae se encuentra el género *Andiperla*, descrito en 1956 por J. Aubert, en base a ejemplares aparentemente coleccionados por Emiliano Huerta en el glaciar Upsala durante las primeras expediciones del Instituto Nacional del Hielo Patagónico. Durante décadas, nuestro conocimiento de la única especie conocida, *Andiperla willinki* (Aubert, 1956), se limitó a la descripción original, inclusión en claves (Illies J. , 1964), listas de especies (Pessacq & Miserendino, 2008) y revisiones sobre su distribución (Lanfranco, 1982; Vera, Zúñiga-Reinoso, & Muñoz-Escobar, 2012), sin información taxonómica o biológica. En 2019 se describe a *Andiperla morenensis*, sobre la base de material obtenido en el glaciar Perito Moreno entre 2015 y 2018 (Pessacq & Rivera-Pomar, 2019). Asimismo, se documentaron datos de su biología y comportamiento desconocidos hasta el momento (Pessacq & Grimmelizzi, resultados no publicados), que incluyen insectos en la dieta tanto de larvas como de adultos, algo inédito para Gripopterygidae. La disponibilidad de alimento en los glaciares es baja: restos vegetales (hojas de *Nothofagus*) e insectos voladores que caen al glaciar. *Andiperla* es un insecto crioílico estenotérmico y sus procesos fisiológicos ocurren en agua líquida cerca del punto de congelación, lo que lo hace un atractivo sistema de estudio.

Las larvas de plecópteros del hemisferio Norte, del suborden *Arctoperlaria*, viven en aguas frías mientras que los adultos, que viven fuera del agua, soportan naturalmente durante el verano temperaturas del aire mayores. Eso es algo esperable también con especies del suborden *Antarctoperlaria*, con la excepción de adultos y larvas de las especies del género *Andiperla*, que permanecen en el agua sobre los glaciares o sobre el hielo durante toda su vida.

Hasta la fecha, el género *Andiperla* tiene dos especies: *Andiperla willinki* y *Andiperla morenensis* (Figura 3) ambas endémicas de los glaciares patagónicos. Se pueden distinguir fácilmente de otros gripopterídeos patagónicos por su tamaño relativamente grande, condición áptera, grandes ojos compuestos (cabeza más ancha que el protórax) y falta de ocelos. *A. morenensis* se puede distinguir de *A. willinki* por el margen posterior del tergo X extendido en un lóbulo agudo dirigido posteriormente (Tabla 2) (Pessacq & Rivera-Pomar, 2019).

<i>Andiperla morenensis</i> Dorsal del segmento X con un lóbulo agudo dirigido posteriormente (dorsalmente).	<i>Andiperla willinki</i> El tergum X posee un lóbulo agudo dirigido ventralmente.
	
Tabla 2. Comparación entre especímenes machos de <i>A. morenensis</i> y <i>A. willinki</i> en el segmento abdominal X (Tomado de Pessacq & Rivera-Pomar, 2019).	



Figura 3. Especimen adulto macho de *A. morenensis* (Pessacq & Rivera-Pomar, 2019).

Andiperla tiene un rango de tolerancia a la temperatura entre los -0,5 a 17 °C, con un óptimo posible entre 0,2 y 2°C, extrapolado de las temperaturas a las cuales han sido coleccionadas las larvas (Pessacq & Rivera-Pomar, resultados no publicados).

Por otra parte, no existen antecedentes sobre su fisiología, pero el hecho de mantener una actividad metabólica regular en hielo supone la capacidad de sintetizar enzimas adaptadas al frío (Siddiqui & Cavicchioli, 2006).

Durante mucho tiempo se ha supuesto que los insectos acuáticos que viven en hábitats crónicamente fríos están adaptados al frío y, por tanto, no toleran el calentamiento (Giersch et al., 2017) . Esta suposición rara vez, o nunca, se ha visto respaldada por mediciones directas (Hotaling et al., 2020).

Para insectos que viven a bajas temperaturas el mecanismo de supervivencia a mayores temperaturas es crucial dado el calentamiento global que sufre el planeta Tierra. El trabajo más reciente de Hotaling y col. (2020) demuestra que varias especies de plecópteros del hemisferio norte (géneros *Lednia* y *Zapada*, suborden *Arctoperla*, Familia *Nemouridae*) tienen la capacidad de tolerar a corto plazo temperaturas más altas que las normales en sus hábitats y concluyen que los insectos que viven en regiones elevadas y frías son capaces de sobrellevar aumentos de temperatura breves sin inconvenientes y que las distribuciones en regiones de ambientes más extremos es un mecanismo ventajoso contra competidores y predadores.

Límite de tolerancia a la temperatura: Máximo Térmico Crítico

La temperatura del agua es un importante impulsor abiótico de los ecosistemas acuáticos. Influye en muchos aspectos de la existencia de un organismo, incluido su crecimiento, alimentación y tasas metabólicas; apareamiento; fecundidad; comportamiento y, en última instancia, la supervivencia. Todos los organismos tienen un rango de temperatura óptimo dentro del cual sobreviven y pueden prosperar. La determinación de los límites térmicos superiores proporciona información sobre la sensibilidad relativa de los organismos a las temperaturas elevadas (H. F. Dallas & Rivers-Moore, 2012).

Las especies ectotérmicas tienden a exhibir respuestas estereotipadas de rendimiento a la temperatura, donde el rendimiento aumenta desde un umbral de temperatura inferior hasta un óptimo térmico, en el que el rendimiento es mayor, antes de disminuir bruscamente hasta que se alcanza el umbral superior (Angilletta, 2009). La diferencia entre medidas de tolerancia al calor (como el límite térmico letal o el máximo térmico crítico, MTC, que define la pérdida de movimiento coordinado) y la temperatura ambiental se denominan en términos generales "tolerancia al calentamiento" y se han utilizado ampliamente para evaluar la vulnerabilidad de los insectos (y artrópodos estrechamente relacionados) al cambio climático global. (Diamond & Yilmaz, 2018).

El Máximo Térmico Crítico (MTC) es la temperatura a la que se alcanza un punto final de comportamiento no letal predeterminado en el laboratorio después de un aumento experimental de temperatura. Para los invertebrados acuáticos, este criterio de valoración suele implicar una

pérdida de equilibrio o de agarre al sustrato (H. F. Dallas & Rivers-Moore, 2012). Se comprobó que los máximos térmicos de los taxones de corrientes de gran altura pueden exceder las temperaturas máximas del agua (Shah et al., 2017).

Los límites térmicos superiores generalmente se determinan experimentalmente dentro de un ambiente de laboratorio controlado y a menudo se basan en métodos letales dinámicos, no letales o estáticos (Lutterschmidt & Hutchison, 1997). El método dinámico implica cambiar la temperatura a un ritmo constante hasta que se alcanza un punto final subletal predefinido, que se utiliza para estimar la letalidad. Un método dinámico comúnmente utilizado es el método térmico crítico (CTM), que se utiliza para determinar un punto final térmico crítico, expresado como máximos térmicos críticos (CT_{máx} o MTC) o mínimos térmicos críticos (CT_{min}).

Ernst et al. (1984) recomendaron que la velocidad de calentamiento debe ser lo suficientemente lenta como para permitir que la temperatura central del animal de prueba siga de cerca la temperatura ambiente, y al mismo tiempo lo suficientemente rápida como para que el estado de aclimatación del animal no cambie durante el ensayo (Ernst et al., 1984).

El método térmico crítico ha demostrado ser un método eficaz para determinar la tolerancia térmica relativa de los macroinvertebrados acuáticos. Ha facilitado la identificación de posibles bioindicadores de alteración térmica, que son térmicamente sensibles y experimentalmente adecuados. Los grupos más sensibles térmicamente son Amphipoda, Plecoptera, Trichoptera y Ephemeroptera (Figura 4). Por lo tanto, estos taxones deberían constituir el foco de futuros estudios destinados a identificar bioindicadores de alteración térmica (H. F. Dallas & Rivers-Moore, 2012).

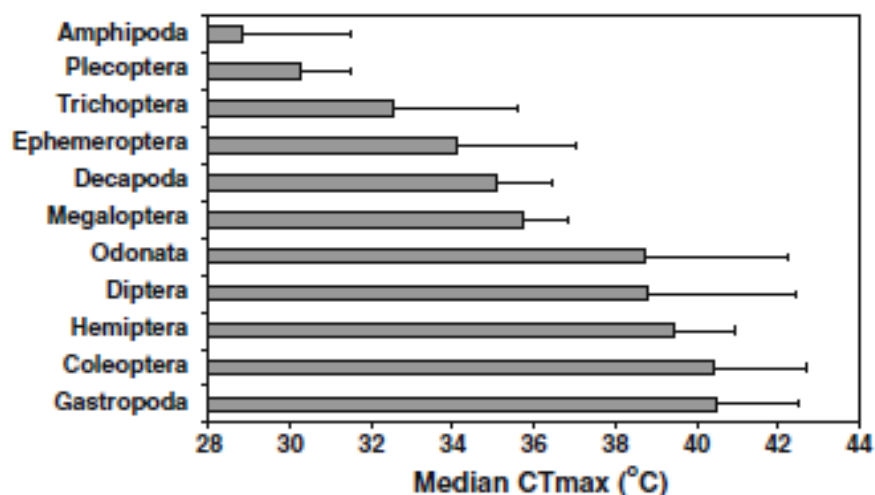


Figura 4. Mediana del MTC para distintos grupos de macroinvertebrados.
(Traducido de H. F. Dallas & Rivers-Moore, 2012).

En el hemisferio norte se han realizado varios estudios relacionados con las tolerancias térmicas de los insectos acuáticos (Brittain, 1991; Elliot, 1987; Hogg et al., 1995; Huryn, 1996; A. V. Nebeker & Lemke, 1968; A. V. Nebeker, 1971; A. V. Nebeker, 1971; Ward & Stanford, 1982; Wellborn & Robinson, 1996), mientras que se han realizado menos estudios en el hemisferio sur (Campbell, 1986; Hotaling et al., 2020; McKie et al., 2004), con escasez de estudios en Sudáfrica (H. Dallas, 2008; H. F. Dallas & Ketley, 2011). Los estudios han incluido efectos letales y subletales, y a partir de cada uno se han generado diferentes criterios de temperatura.

En Plecópteros del hemisferio norte, se observó que las larvas que habitan en sitios más fríos exhibieron MTC más bajos en comparación las de sitios más cálidos (Hotaling et al., 2020).

Un estudio preliminar en Plecópteros de la Patagonia Argentina llevado a cabo en el CIEMEP (Grimolizzi, Rivera-Pomar y Pessacq, no publicado) muestra que las especies de los géneros *Klapopteryx* (*Austroperlidae*) y *Notoperla* (*Gripopterygidae*) tienen un MTC del orden de 25-30°C, mientras que las larvas del género *Andiperla* (*Gripopterygidae*) tienen un rango menor (17-20°C; Tabla 3). Como referencia comparativa, *Klapopteryx kuscheli* es un plecóptero muy ubicuo en los cuerpos de agua patagónicos, desde el nivel del mar a más de 1800 msnm mientras que el género *Notoperla*, si bien posee una amplia distribución, es más raro en los muestreos y tiene preferencia por cuerpos de agua de mayor altitud y menor temperatura, esto se ve reflejado en un MTC menor de éste último. (P. Pessacq, observaciones no publicadas).

		Primer individuo en llegar al MTC	Último individuo en llegar al MTC	MTC
<i>Andiperla spp</i>	Exp 1	11.15	22.31	17.47
	Exp 2	17.24	22.35	20.28
<i>Klapopteryx kuscheli</i>	Exp 1	27.67	31.14	30.35
	Exp 2	29.9	32	30.74
<i>Notoperla magnaspina</i>	Exp 1	19.86	22.65	21.27
	Exp 2	21.41	28.18	25.52
	Exp 3	18.14	27.32	24.79
	Exp 4	20.55	27.11	25.34
	Exp 5	19.6	28.48	24.64
	Exp 6	27.93	29.9	28.84

Tabla 3. Resultados preliminares de máximo térmico crítico (MTC). Los valores se expresan en °C.

Los insectos cuándo alcanzan su MTC no son capaces de reorientarse ni enderezarse por sus propios medios si son puestos con su parte ventral hacia arriba, perdiendo capacidad motora. Al pasarlos a su temperatura óptima, recobran su capacidad motora normal (Hotaling et al., 2020).

El panorama biogeográfico muestra una mayor vulnerabilidad en los insectos tropicales. Este patrón parece estar impulsado por especies de latitudes bajas que exhiben amplitudes estrechas de tolerancia térmica (el rango entre la tolerancia al frío y al calor), lo que las coloca muy cerca de su óptimo térmico y de su tolerancia al calor en relación con el medio ambiente (Hoffmann et al., 2013).

La disminución de la latitud generalmente se asocia con un aumento de la temperatura ambiental media y una menor variabilidad de la temperatura y, como consecuencia, se puede esperar que aumente la tolerancia media al calor mientras que se puede esperar que disminuya la plasticidad en la tolerancia al calor (Diamond & Yilmaz, 2018).

Las especies de latitudes más altas son generalmente menos vulnerables al cambio climático porque tienen rangos más amplios de tolerancia térmica y están mucho más lejos de su óptimo térmico y de su tolerancia térmica superior (Diamond & Yilmaz, 2018).

En las crioconitas de los glaciares tenemos una situación parecida a la de las latitudes bajas en cuánto a rangos estrechos de temperaturas, con la particularidad de ser temperaturas

frías entre los 0 a 4°C. Por lo que es de esperarse que *Andiperla* muestre una mayor tolerancia al frío, y a su vez, una menor adaptación y tolerancia al calor.

Hay diversas demostraciones de que la aclimatación puede alterar tanto la resistencia al calor como la resistencia al frío en una variedad de insectos (Chown & Nicolson, 2008; Chown & Terblanche, 2006; Denlinger & Lee Jr., 1998; Denlinger & Yocum, 2020). La aclimatación del desarrollo que depende de la temperatura a la que se mantuvieron las etapas podría transmitirse al adulto y, por tanto, quedar fijado en el desarrollo (es decir, canalizado) (Maynard Smith, 1957). Krebs y Loeschcke (1995) han informado que el 'condicionamiento' de las pupas de *Drosophila buzzatii* a 38°C causó un arrastre de mayor resistencia en el adulto, presumiblemente debido a que las heat shock proteins (Hsp) producidas persistieron después de retirarlas del tratamiento a alta temperatura (Krebs & Loeschcke, 1995).

Proteínas de shock térmico

Las proteínas de choque térmico (Hsp) se expresan en la mayoría de los organismos en respuesta a una amplia gama de condiciones ambientales estresantes (Feder & Hofmann, 1999) y se consideran un mecanismo celular protector. Estos genes son una familia de proteínas altamente conservadas, que actúan como chaperonas para estabilizar y plegar proteínas desnaturalizadas, previniendo la formación de agregados citotóxicos (Hartl, 1996; Parsell & Lindquist, 1993a; Sømme, 1999). Se comprende bien el papel de las Hsp en la protección de los insectos contra el calor y el estrés por desecación (Goto et al., 1998; Goto & Kimura, 1998).

Se han identificado numerosas familias de Hsp, cuya denominación está relacionada con su peso molecular en Daltons. Por ejemplo, los miembros de la familia más estudiados son las proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70), que comprenden isoformas tanto constitutivas como inducibles por estrés. Su popularidad en los estudios moleculares se debe en gran medida a que estos genes están altamente conservados a nivel molecular y, por lo tanto, son relativamente fáciles de clonar y evaluar en diferentes especies, incluso cuando hay datos limitados o nulos sobre el genoma disponible para esa especie (Clark & Worland, 2008).

La activación clásica de los genes HSP70 inducibles es en respuesta a temperaturas ambientales elevadas y la expresión está estrechamente regulada por el factor de transcripción de choque térmico (HSF1) (Morimoto, 1998). Sin embargo, el calor no es el único activador, ya que la anoxia, el hambre y la desecación también se identifican como inductores (Parsell & Lindquist, 1993; Salvucci et al., 2000). De hecho, se ha sugerido que las temperaturas de inicio (Ton) y de inducción máxima (Tmax) de la expresión génica de las Hsp son indicadores útiles de

la tolerancia térmica (Tomanek & Somero, 1999) y pueden utilizarse para ayudar a definir los límites de distribución geográfica, como se ha demostrado en el caso de dos especies de moscas del género *Liriomyza* (Huang & Kang, 2007).

Las Hsp se inducen en respuesta al shock de frío en la mayoría de los insectos estudiados hasta la fecha, aunque el número de especies en las que existe evidencia experimental documentada es limitado (B. Chen et al., 2005; Nunamaker et al., 1996; Rinehart et al., 2007; Rinehart, Hayward, et al., 2006; Rinehart & Denlinger, 2000; Yocum, 2001). La excepción a esta regla general parece ser *Drosophila*, donde los estudios de HSP70 y su gen regulador asociado, el factor de transcripción de choque térmico (HSF-1), muestran cambios insignificantes en los niveles de expresión, ya sea en la resistencia al estrés por frío o en el endurecimiento rápido en frío (Kelty & Lee, 2001; Muhlig Nielsen et al., 2005). Otros estudios realizados en células S2R+ adaptadas al frío de *Drosophila melanogaster* indican que el estrés ya sea por altas o bajas temperaturas, genera una sobreexpresión de las HSP (Bai et al., 2021) .

La producción constitutiva de HSP70 es una característica conocida de las especies marinas polares como una supuesta adaptación a la vida en el frío y los consiguientes problemas de plegamiento de proteínas a bajas temperaturas (Clark et al., 2008; Place et al., 2004).

El mecanismo celular en el shock por frío lo proporciona el trabajo de Rinehart et al. (2006). Sus estudios sobre el mosquito antártico no volador *Belgica antarctica* muestran una regulación positiva continua de las Hsp (Hsp70, Hsp90 y smHsp) en las larvas, pero no en las etapas adultas, y estas últimas muestran los patrones de activación clásicos en respuesta a temperaturas altas y bajas. Se ha sugerido que la razón detrás de estas diferencias específicas de etapa en la expresión génica está relacionada con la estabilidad térmica de nicho. Las etapas larvarias duran hasta 2 años por debajo de las rocas, el suelo y la vegetación, experimentando un rango de temperatura de no más de 4°C. Por el contrario, los adultos viven sólo un par de semanas en el verano austral y pueden estar expuestos a temperaturas muy fluctuantes entre 0 y 22°C. Por lo tanto, los adultos necesitan protección tanto contra las altas como contra las bajas temperaturas y el mecanismo inducible es claramente la forma más eficiente desde el punto de vista energético de lograrlo. Por el contrario, las larvas, con su régimen de temperatura estable y restringido, se encuentran en una situación similar a la de los organismos marinos antárticos y en este caso, la expresión constitutiva puede verse como una adaptación común al ambiente antártico, con un fuerte requisito para facilitar el plegamiento adecuado de proteínas a bajas temperaturas (Clark et al., 2008; Place et al., 2004; Rinehart, Robich, et al., 2006).

Está claramente demostrado que la expresión de Hsp inducida por la exposición al estrés por calor y frío va acompañada de un aumento en la resistencia al calor o al frío extremos (Feder & Hofmann, 1999; Rinehart, Hayward, et al., 2006; Sejerkilde et al., 2003; Yocum et al., 1991). Esta relación está ahora bien establecida con respecto al estrés por calor, pero se comprende menos en relación con el estrés por frío (Sinclair & Roberts, 2005).

Es necesario recordar que miembros de varias familias de Hsp, que difieren en tamaño molecular (Hsp10s, Hsp20s, Hsp60s, Hsp70s, Hsp90s y Hsp100s), pueden expresarse en diversas células de un insecto. Estas diferentes familias pueden tener diferentes distribuciones subcelulares, celulares y tisulares. Algunos miembros de estas familias no son inducibles por el estrés, otras tienen expresión regulada positivamente mientras se encuentran en condiciones de estrés, mientras que otras sólo son inducidas después de la aplicación de un estrés (Feder, 2010; Hightower, 1991). Como se indicó anteriormente, la regulación positiva de Hsp inducida por el estrés (en insectos, los estudios se han centrado principalmente en Hsp70) se correlaciona con un aumento en la tolerancia al estrés aplicado. Esto fue demostrado por Welte et al. (1993) con *D. melanogaster*, larvas genéticamente modificadas para poseer copias adicionales de los genes Hsp70. Estas larvas expresaron niveles más altos de Hsp70 después del estrés por calor y mostraron una mayor supervivencia a una temperatura letal (Welte et al., 1993).

Lednia, un plecóptero como *Andiperla*, mostró una expresión diferencial positiva en las proteínas HSP70B2 y HSP70A1 durante la exposición a altas temperaturas. Con funciones bien establecidas como protectores celulares, prevención de la desnaturalización de proteínas, unión de proteínas aberrantes y muchas otras medidas inducidas por el estrés (King & Macrae, 2015). La aparición de la expresión constitutiva de muchas otras HSP en *Lednia*, así como la incapacidad de las larvas para sobrevivir a un recinto helado indicaría que el frío puede seguir siendo un factor de estrés en plecópteros (Hotaling et al., 2020). Se han observado patrones similares de expresión constitutiva de Hsp en otras especies tolerantes al frío. Por ejemplo, las larvas de especies del orden Tricoptera (Ebner et al., 2019), peces polares (Buckley et al., 2004) y el pasto antártico (Reyes et al., 2003) expresan constitutivamente diversas Hsp, presumiblemente para acompañar a proteínas a baja temperatura.

Transcriptómica y Expresión Génica Diferencial

Al momento de la escritura de este manuscrito existen muy pocos estudios sobre la expresión génica diferencial (DEG, del inglés *Differentially Expressed Gen(s)*) en respuesta al shock térmico en estenotermos obligados, temperaturas que serían templadas y/o óptimas para

gran parte de los insectos. La mayoría de los estudios de DEG se han realizado en insectos de climas templados en respuesta a altas temperaturas, quizás por su implicancia en la respuesta al cambio climático y al aumento anual de la temperatura (Hotaling et al., 2020; Zhao & Jones, 2012). En otros casos se deben al uso de terapias hipertérmicas para tratar algunos tipos de cánceres (L. Wang et al., 2021).

La secuenciación de ARN (*RNA-Seq*) es un abordaje que utiliza la tecnología de los métodos de secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés *Next generation sequencing*) para estudiar el transcriptoma, además de proveer información sobre los niveles de expresión de los transcriptos analizados (Singh et al., 2012). Algunos de los usos más comunes de esta técnica son el estudio de *splicing* alternativo, la identificación de nuevos genes y/o variantes, detección de microorganismos, y la DEG (Han et al., 2015). El análisis de DEG permite estudiar de manera cuantitativa aquellos genes que tengan niveles de expresión significativamente distintos entre dos o más condiciones (McDermaid et al., 2019). Esta comparación puede estar asignada, por ejemplo, entre tratamientos de larvas de *Andiperla* a distintas temperaturas.

El análisis cuantitativo o comparativo de distintos transcriptomas requiere la generación de un borrador de genoma o bien una línea de base dada por un transcriptoma normalizado, en el que estén representados si no todos, la mayor cantidad posible de transcriptos. En este sentido se encuentra en expansión el número de insectos cuyo genoma o transcriptoma se conoce y se ha avanzado en iniciativas para ampliar nuestro conocimiento del tema. El estudio de transcriptomas, que representan aquellos genes expresados en un determinado momento y condición, ha resultado un método muy eficaz para poder analizar genomas de insectos que aún no han sido completamente secuenciados y reflejan con bastante precisión relaciones filogenéticas y adaptativas (Behura, 2015; Cannon & Kocot, 2016; Gerstein et al., 2014; Johnson, 2019; Misof et al., 2014).

Analizar la DEG en especies del género *Andiperla*, ya sea en respuesta al frío como al aumento de la temperatura, permitirá conocer más acerca de los mecanismos moleculares de adaptación de este insecto.

Hipótesis

Andiperla presenta variación en los niveles de expresión de las proteínas de shock térmico (Hsp) cuándo alcanza su máximo térmico crítico (MTC)

Objetivo General

Examinar de forma cuantitativa y funcional la expresión de transcritos codificantes de proteínas de shock térmico en larvas de *Andiperla*.

Objetivos específicos

- Identificar los transcritos codificantes de proteínas de shock térmico (Hsp) en el transcriptoma de *Andiperla morenensis*.
- Determinar la expresión génica diferencial (*DEG*) de Hsp en *Andiperla* cuándo alcanza su MTC.
- Realizar una descripción de las Hsp que hayan mostrado una expresión diferencial.

Palabras claves: *Andiperla*, Máximo Térmico Crítico, Heat shock proteins, Expresión Génica Diferencial.

Materiales y Métodos

Búsqueda de transcriptos codificantes de proteínas de shock térmico (Hsp) en el transcriptoma de referencia

La búsqueda de Hsp se realizó a partir de un transcriptoma sin normalizar obtenido de una mezcla representativa de los diversos estadíos del desarrollo de *Andiperla* obtenidas a temperatura natural u óptima de $\sim 4^{\circ}\text{C}$. Las lecturas se ensamblaron de *nov*o con el software TRINITY (Grabherr et al., 2011). Este transcriptoma consta de 987.700 transcriptos y 127.498 genes codificantes de proteínas derivados de 65 mil millones de bases secuenciadas (Baricalla et al., 2022, resultados no publicados).

Para las anotaciones de proteínas se utilizó el software Trinotate que realiza una búsqueda por BLAST contra la base de datos curada Swiss-Prot, detectando homología de proteínas con los transcriptos codificantes ensamblados por Trinity, las regiones codificantes de los transcriptos son predichas a través de TransDecoder (Bryant et al., 2017). Adicionalmente Trinotate utiliza la HMMER (Grabherr et al., 2011) para la identificación de dominios proteicos. Finalmente se integran estos datos y se infieren los términos ontológicos asociados a las proteínas identificadas por homología.

Con nuestro *output* obtenido en Trinotate se realizó una búsqueda por similitud de nombre, filtrando por “*heat shock*” en la columna asignada como BLASTX, también se probó con hacer una búsqueda de *Cold shock proteins* (Csp), proteínas menos estudiadas que la Hsp que cumplen una función similar como chaperonas, con la particularidad que son de pequeño tamaño y también pueden cumplir la función de unión a ácidos nucleicos, estas proteínas muestran una expresión incrementada a bajas temperaturas (Giuliodori et al., 2010). Se seleccionaron Hsp y Csp (Tabla 5) teniendo en cuenta la cobertura, el porcentaje de identidad con insectos (>60%), y mejor e-value. Se priorizó cobertura sobre porcentaje de identidad. Con *ORF finder* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), procedimos a buscar el *ORF* más largo para cada transcripto, se verificó la identidad de éstos por BLASTP en Swiss-Prot. De esta manera obtuvimos las secuencias nucleotídicas y las secuencias aminoacídicas de dichas proteínas, de las cuáles seleccionamos aquellas que tengan un alto porcentaje de identidad con insectos (>80%) y un porcentaje de cobertura aproximado del 100% (Anexo I).

Comparación de secuencias y filogenia

El criterio para la selección y comparación con proteínas de otras especies se basó en la filogenia descrita por Misof y colaboradores (2014) en dónde se establecen taxones de insectos cercanos a Plecópteros, y también en trabajos anteriores realizados en *Andiperla* (Coletta, 2022 y Ferreyros, 2023) (Tabla 4, especies seleccionadas), en dónde se describe una relación filogenética más cercana de *Andiperla* con *Zootermopsis nevadensis*, *Cryptotermes secundus* (Infraorden: Isoptera; Orden: Blattodea) y con *Gryllus bimaculatus* (Orden: Orthoptera). La búsqueda de secuencias de aminoácidos se realizó mediante similitud de secuencia en la base de datos (BD) de UniProt, en caso de no encontrar resultados significativos, se procedió a realizar una búsqueda en todas las secuencias de proteínas no redundantes (nr) en NCBI. Para plecópteros, Orden que no se encuentra anotado en la BD de Uniprot, se realizó la búsqueda de las proteínas en los genomas disponibles en NCBI (Anexo II) Para realizar la búsqueda en los genomas se utilizó la herramienta Miniprot align de Galaxy (Afgan et al., 2022), obteniendo como *output* la secuencia traducida de proteínas de las distintas especies de plecópteros que hayan hecho match con las Hsp y Csp de *Andiperla*. Este enfoque es conveniente cuándo se dispone de especies estrechamente relacionadas (H. Li, 2023), como en este caso, especies del Orden Plecóptera.

Orden	Especie
Plecoptera	<i>Andiperla morenensis</i>
	<i>Nemoura dubitans</i>
	<i>Leuctra nigra</i>
	<i>Brachyptera risi</i>
	<i>Brachyptera putata</i>
	<i>Isoperla grammatica</i>
	<i>Nemurella pictetii</i>
	<i>Protonemura montana</i>
Orthoptera	<i>Schistocerca serialis</i>
	<i>Gryllus bimaculatus</i>
Blattodea	<i>Blattella germanica</i>
Diptera	<i>Drosophila melanogaster</i>
	<i>Aedes aegypti</i>
Lepidoptera	<i>Bombyx mori</i>
	<i>Manduca sexta</i>
Coleoptera	<i>Tribolium castaneum</i>
Isoptera	<i>Zootermopsis nevadensis</i>
	<i>Cryptotermes secundus</i>
Hemiptera	<i>Rhodnius prolixus</i>
	<i>Nilaparvata lugens</i>
Himenoptera	<i>Apis mellifera</i>
	<i>Nasonia vitripennis</i>

Tabla 4. Especies de insectos seleccionados para reconstruir la filogenia de *Andiperla*.

Para cada proteína identificada en *Andiperla* con sus respectivos ortólogos de la lista (Anexo III), se realizó un alineamiento múltiple de secuencias (MSA) del tipo progresivo iterativo utilizando el algoritmo MUSCLE con el *software* MEGA 11 v.11.0.13 (Keklik, 2023). Se tuvo en cuenta que las proteínas tengan una misma longitud aproximada.

Una vez realizados los alineamientos múltiples de secuencias (MSA) para cada proteína, se llevó a cabo el análisis filogenético correspondiente. Para ello, se empleó el método

estadístico Neighbor Joining (Keklik, 2023) junto con el método Bootstrap como prueba de soporte filogenético, utilizando mil réplicas.

Análisis de todas las proteínas en conjunto

Por último, se realizó un MSA de todas las proteínas identificadas, es decir tanto HSP y CSP en conjunto, utilizando el algoritmo MUSCLE con el *software* MEGA 11 v.11.0.13 (Keklik, 2023) y se realizó un análisis filogenético de Máxima Verosimilitud con el método *Bootstrap* como test de filogenia, estableciéndose mil replicas.

Medición del MTC

La medida del MTC se realizó siguiendo el protocolo de Hotaling et al. (2020), para ello se emplearon larvas de *Andiperla* recolectadas en el Glaciar Perito Moreno, Provincia de Santa Cruz – Argentina. El ensayo fue realizado por los Drs. Pablo Pessacq, Rolando Rivera-Pomar y la Lic. Luciana Grimalizzi, del Centro de Investigación Esquel de Montaña y Estepa Patagónica (CIEMEP-CONICET-UNPSJB) en una cámara de incubación programable. Las larvas se mantuvieron en tanques de plástico que contenían 2 litros de agua original de la zona de captura, y fueron mantenidas en ayuna durante 15 días a una temperatura entre 4-5° C y con aireación por medio de burbujeadores. Esto con la finalidad de lograr una fisiología homogénea en las larvas. A partir de ese momento y partiendo de 5°C comenzaron los incrementos de temperatura del aire de 5°C cada 15 minutos, registrando la temperatura del agua de manera continua con data loggers Hobo Pendant modelo Mx220 (Tabla 14). Se registró la movilidad de las larvas de manera continua usando una cámara web sostenida sobre el recipiente del experimento y, cada 15 minutos, se verificó la pérdida de capacidad motora y llegada al MTC moviendo las larvas con una pinza y registrando el momento en que los insectos pierden la capacidad de darse vuelta y ponerse “al derecho”. Cuando una larva alcanza su MTC se transfiere a agua helada para recobrar su motilidad o se preserva en RNAlater (Ambion).

RNA-seq

Se extrajo el ARN de 5 larvas que alcanzaron su MTC y que fueron conservadas en RNAlater, tanto la preservación como la extracción se realizó de forma separada, obteniéndose 5 muestras en total. Para la extracción del ARN total se utilizó el reactivo comercial TRIZOL (Chomczynski & Mackey, 1995) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Se diseccionó cada larva para exponer los tejidos blandos y luego se homogeneizó 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 tubo 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 RNasas y se midió la concentración por espectrofotometría. Para asegurar una suficiente profundidad de secuenciación se disminuyó la masa de rRNA por degradación selectiva de rRNA por RNasa H usando oligonucleótidos específicos para los rRNA 28S y 18S (Fauver et al., 2019). Luego se procedió a sintetizar cDNA correspondiente a cantidades equimoleculares de RNA total con ribosomal con el Maxima cDNA Kit (Thermo Scientific). Las genotecas para secuenciación se sintetizaron usando NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit (New England Biolabs, EEUU). Las libraries fueron secuenciadas por un equipo Illumina NovaSeq 6000 (Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlín, Alemania).

Pipeline Bioinformático

El procesamiento y análisis de datos provenientes de *RNA-Seq* se efectuó mediante las herramientas disponibles en el servidor de Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) (Afgan et al., 2022).

i. Control de Calidad: FastQC y MultiQC

Los archivos crudos fueron analizados y revisados utilizando FastQC v0.73 (Andrews, 2010), que permite determinar la cantidad y calidad de secuencias existentes, el porcentaje de contenido CG, secuencias duplicadas, presencia de adaptadores, entre otras funciones. Se obtuvo un informe para cada una de las 5 muestras. Se utilizó MultiQC v1.11 para crear un único informe a partir de los resultados de FastQC de todas las muestras permitiendo así observar de forma rápida las tendencias globales y sesgos (Ewels et al., 2016).

ii. Remoción de Adaptadores con Trim Galore!

Con Trim Galore! V0.6.7 se removieron las *reads* de mala calidad: Q-score de 20, *reads* demasiadas cortas (<25 nucleótidos) y potenciales adaptadores utilizados en la secuenciación por el equipo NovaSeq 6000 de Illumina (Krueger, 2015).

iii. Control de Calidad: FastQC y MultiQC

Se volvió a evaluar la calidad de las *reads* con FastQC v0.73 (Andrews, 2010) y MultiQC v1.11 (Ewels et al., 2016), el procedimiento fue el mismo que el del primer análisis de calidad, pero con datos ya procesados en Trim Galore! (Krueger, 2015).

iv. Cuantificación de reads: *Align reads and estimate abundance*

Se realizó la cuantificación de transcritos en el MTC y en la temperatura control a partir de archivos procesados con Trim Galore! utilizando el transcriptoma obtenido a 4° C como referencia para el mapeo. El control de 4° C se obtuvo a partir del mismo set de datos del cual se originó el transcriptoma de referencia. Se utilizó la herramienta *Align reads and estimate abundance* v2.15.1, esta herramienta se utiliza para estimar la abundancia de transcritos a partir de un transcriptoma ensamblado con Trinity (Grabherr et al., 2011), se utilizó el método Salmon para cuantificar la abundancia de transcritos a partir de *reads* obtenidos por *RNA-seq*, este método permite corregir el sesgo del contenido de GC de fragmentos, lo que mejora sustancialmente la precisión de la estimación de abundancia y la sensibilidad para los posteriores análisis de expresión diferencial (Patro et al., 2017).

v. Expresión Génica Diferencial: EdgeR con genes codificantes de proteínas

A partir de las matrices de transcritos cuantificados para el MTC y para el control, obtenidas de *Align reads and estimate abundance* v2.15.1, se procedió a hacer un filtrado para genes codificantes de proteínas, de esta manera, pudimos contar con set de datos manejables y más fáciles de interpretar para nuestro objetivo de interés. Las matrices quedaron resumidas mediante el marcador del gen (Gen ID) y el número de *reads* cuantificados para cada gen codificante de proteínas que pasaron a ser el *input* a correr en EdgeR v3.36.0 (Liu et al., 2015; Robinson Mark et al., 2010).

Los grupos a comparar para la DEG en EdgeR consistieron en Grupo 1 “Temperatura control (TC)” constituido por datos de *RNA-seq* provenientes de un pool de larvas a temperatura de ~ 4 °C y Grupo 2 “Máximo Térmico (MT)” formado por 3 muestras, cada una formada por una larva que alcanzó su MTC a ~ 22°C. Los valores a comparar fueron MT-TC, es decir, cambios de expresión al alza o la baja en el MTC respecto al control. Se filtraron todos los transcritos con recuentos muy bajos teniendo en cuenta el método del recuento por millón (CPM) que filtra teniendo en cuenta la diferencia de tamaño de las *libraries* entre las muestras, se configuró en

un mínimo CPM de 1 para una muestra mínima de 1. El valor mínimo para el log2 Fold Change fue de 1, siendo de interés aquellos transcriptos que se expresen como mínimo el doble o la mitad de veces comparado con el control. Se usó como valor umbral, un p-value < 0,01 (Benjamini & Hochberg, 1995), indicando que los genes por debajo de este umbral muestran una expresión diferencial estadísticamente significativa. Como método de normalización se escogió la media recortada de valores M (TMM) sugerida por los autores de EdgeR. El método de normalización permite corregir las diferencias en la profundidad de secuenciación entre las muestras, y considera la expresión relativa de genes teniendo en cuenta el ARN total de cada muestra (Robinson & Oshlack, 2010).

vi. Visualización con heatmap2

Los resultados obtenidos en EdgeR se visualizaron con la herramienta heatmap2 (*heatmap.2: Enhanced Heat Map*. <https://cran.r-project.org/web/packages/gplots/>) utilizando como *input* la tabla de transcriptos cuantificados y normalizados de todas las muestras. Se les asignó identidad a los mismos utilizando la fórmula BUSCARV en Excel 2016 y usando como referencia los nombres asignados por BLASTX en el archivo de Trinotate que contiene el transcriptoma con sus respectivas anotaciones. Al obtener una cantidad de 6951 genes expresados diferencialmente se procedió a hacer un filtrado de los mismos para que sea posible visualizarlos en un *heat-map* (Batut et al., 2018, 2022; Hiltmann et al., 2023). Para DEG de Hsp y Csp, genes de interés en este trabajo, se filtró de la tabla aquellos identificados como tales dentro del Phylum Insecta según la anotación de Trinotate.

Búsqueda de transcriptos codificantes de enzimas del metabolismo de la hormona juvenil (JH)

Se realizó una búsqueda de términos GO relacionados al metabolismo de la hormona juvenil (JH, del inglés *juvenile hormone*) a través de la plataforma QuickGO (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/annotations>). Luego se procedió a buscar esos términos (tabla 18) en el *output* de EdgeR que contiene los genes diferencialmente expresados en el MTC comparado con el control y que se obtuvo en el paso anterior. Se seleccionaron aquellas enzimas participes tanto de la biosíntesis como de la degradación de la JH.

Los pasos para la visualización en *heat-map* fueron los mismos que para la visualización de las Hsp y Csp.

Resultados

Identificación de Hsp y Csp

Transcriptos identificados

En el transcriptoma obtenido en condiciones naturales pudimos encontrar por similitud de nombres un total de 11 proteínas *heat shock* (hsp) y 2 proteínas *cold shock* (csp) (Tabla 5). De los mismos se procedió a realizar la búsqueda de la isoforma más larga y que contenga el marco de lectura completo, con los codones de inicio y stop, para ello se utilizó *ORF finder* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>). Se conservaron 6 proteínas hsp y las 2 proteínas csp (Tabla 5, en negrita), dado que de éstas pudimos recuperar la secuencia aminoacídica (Anexo I) completa y con un porcentaje de identidad mayor al 80% con insectos.

Transcript_ID	Protein name	% ID
TRINITY_DN1054_c9_g1_i4	Cold shock domain-containing protein CG9705	65,1% <i>Drosophila</i>
TRINITY_DN969_c18_g2_i1	Cold shock domain-containing protein E1 {ECO:0000305}	66,1% <i>Zootermopsis nevadensis</i>
TRINITY_DN6266_c1_g1_i3	Heat shock 70 kDa protein 12A	54,9% <i>Coptotermes formosanus</i>
TRINITY_DN2192_c0_g5_i1	Heat shock protein 70 B2	88,8% <i>Anopheles</i>
TRINITY_DN20453_c0_g1_i28	Heat shock protein 60A	81,5% <i>Drosophila</i>
TRINITY_DN1104_c0_g1_i1	Heat shock protein 83	86,2% <i>Bombyx</i>
TRINITY_DN2192_c0_g6_i1	Heat shock protein 68	77,6% <i>Drosophila</i>
TRINITY_DN1383_c0_g1_i10	Heat shock 70 kDa protein cognate 5	82,1% <i>Drosophila</i>
TRINITY_DN42412_c0_g1_i1	Heat shock 70 kDa protein cognate 4	92,7% <i>Manduca</i>
TRINITY_DN1372_c0_g1_i4	Heat shock 70 kDa protein 4L	63,4% <i>Cryptotermes secundus</i>
TRINITY_DN142092_c0_g3_i3	Heat shock 70 kDa protein 14	65,8% <i>Zootermopsis nevadensis</i>
TRINITY_DN3789_c0_g1_i2	Heat shock 70 kDa protein cognate 2	88,1% <i>Zootermopsis nevadensis</i>
TRINITY_DN12990_c1_g2_i9	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	73,31% <i>Cryptotermes secundus</i>

Tabla 5. Transcritos anotados con Trinotate e identificados utilizando la BD de Swiss-Prot (En ***negrita*** se indican aquellos que se pudo recuperar la secuencia aminoacídica completa y con alto valor de ID para insectos).

Comparación de secuencias y relaciones filogenéticas

Se observa en los análisis individuales de proteínas Hsp y Csp, que *Andiperla* forma un grupo monofilético con los demás Plecópteros (Figuras 5, 6, 7, 8, 10, 11 y 12), a excepción de Hsp 70-4L, (Figura 9) en dónde se agrupa junto a Plecóptera, Ortóptera (*Schistocerca serialis*

cubense y *Gryllus bimaculatus*), Isoptera (*Cryptotermes secundus* y *Zootermopsis nevadensis*), Hemíptera (*Rhodnius prolixus*) como un único gran Clado.

Para Hsp 68 y Hsp 75 mitocondrial pudimos observar una cierta cercanía taxonómica de *Andiperla* con *Brachyptera risi* y *Brachyptera putata* (Figuras 7 y 8, respectivamente) y también para Hsp 75 mitocondrial y Csp CG9705, una cercanía de *Andiperla* con *Isoperla grammatica* (Figuras 8 y 11, respectivamente), todas especies del Orden Plecóptera.

Con respecto a los demás taxones de insectos analizados, pudimos observar una congruencia filogenética entre los árboles de proteínas con las clasificaciones de especies actualmente reportados (Cranston & Gullan, 2009; Footitt & Adler, 2009; Misof et al., 2014) salvo algunas excepciones como ser Hsp 60A, en dónde *Schistocerca serialis* no se agrupa a *Gryllus bimaculatus*, sino con especies del Orden Hemiptera. En Hsp 75 mitocondrial, *Zootermopsis nevadensis* se agrupa con Hemiptera. Y, por último, *Nilaparvata lugens* no se agrupa con *Rhodnius prolixus*, ambos pertenecientes al mismo Orden, para las proteínas Hsp 70 cognate 5, Hsp 83 y CSDE1. Con estos análisis de filogenia realizados, no se pretende establecer tiempos de divergencia entre las proteínas, ni las relaciones evolutivas que puedan subyacer entre *Andiperla* y los demás organismos, sino que se pretende realizar una aproximación a las relaciones evolutivas y similitud de secuencia entre las proteínas de *Andiperla* y las de sus respectivos ortólogos, siempre teniendo en cuenta que la filogenia de una proteína aislada no representa la filogenia del organismo en estudio.

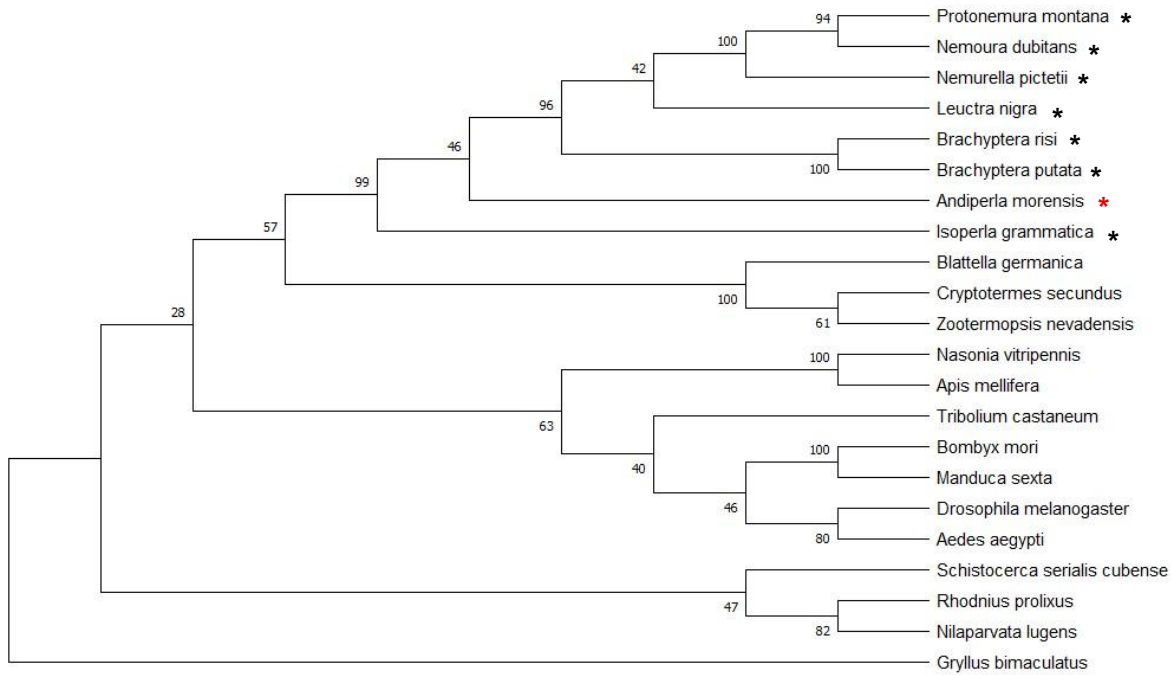


Figura 5. Cladograma de Hsp 60 A (*: Plecópteros).

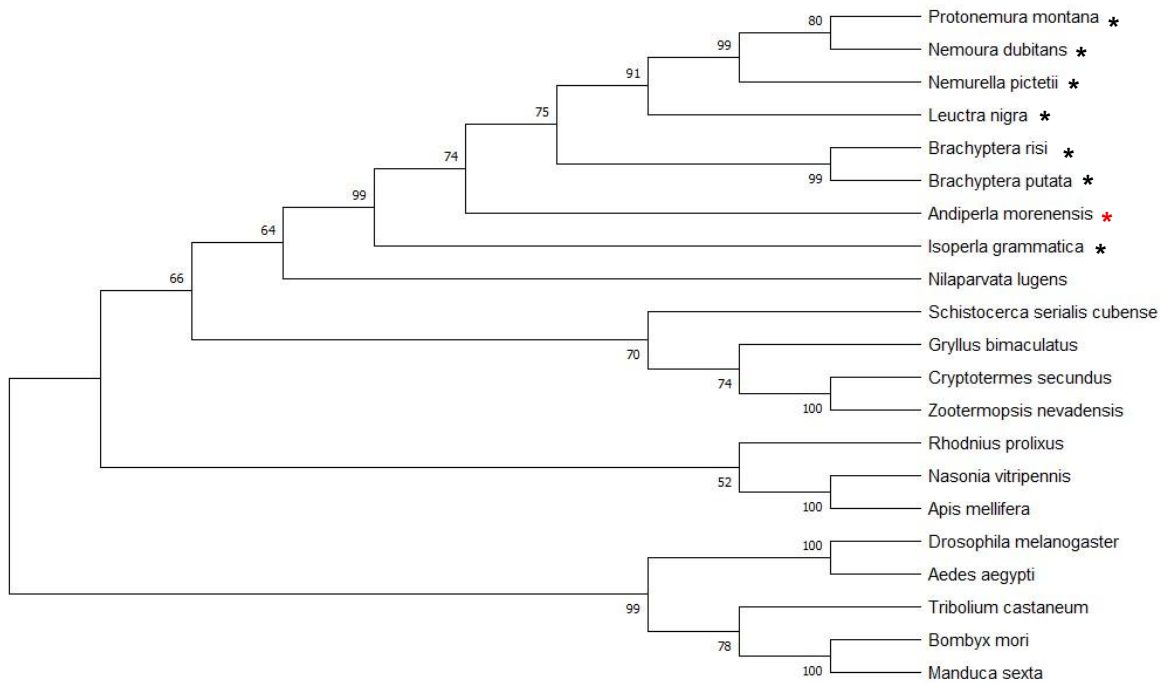


Figura 6. Cladograma de Hsp 83 (*: Plecópteros).

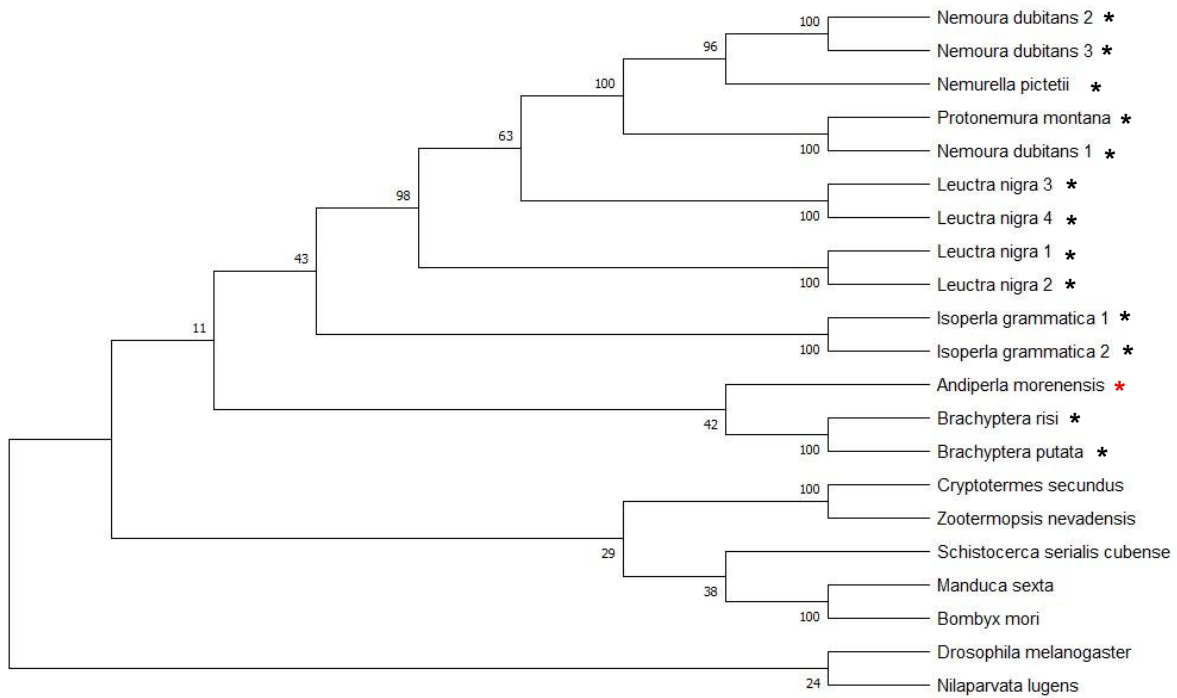


Figura 7. Cladograma de Hsp 68 (*: Plecópteros).

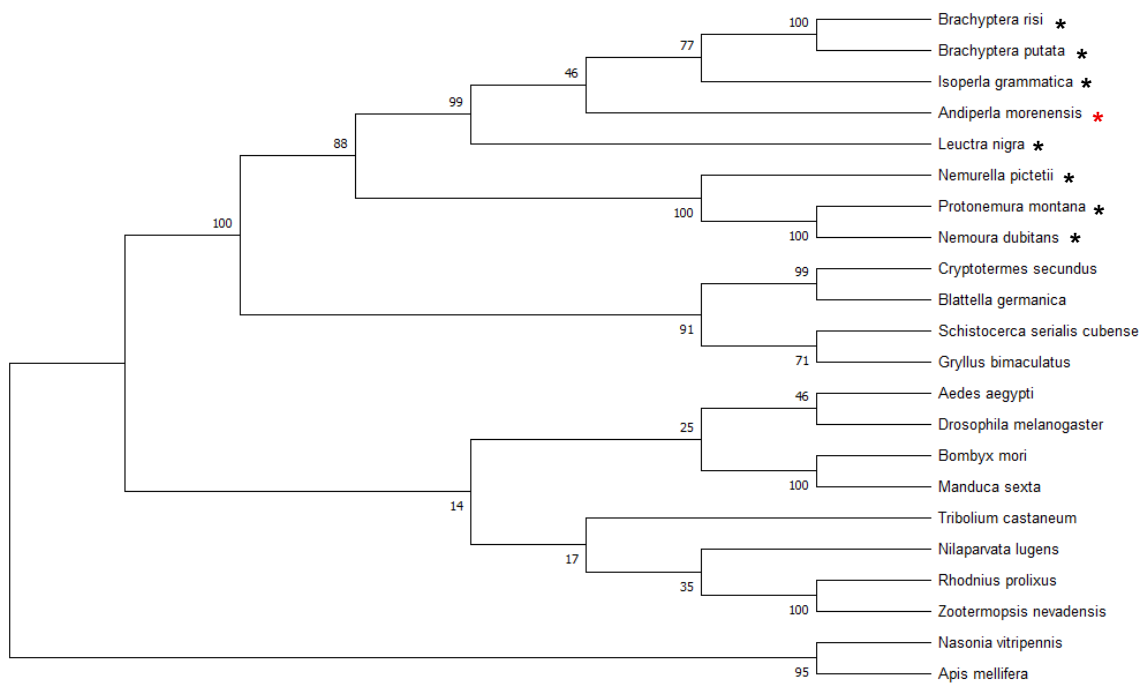


Figura 8. Cladograma de Hsp 75 mitocondrial (*: Plecópteros).

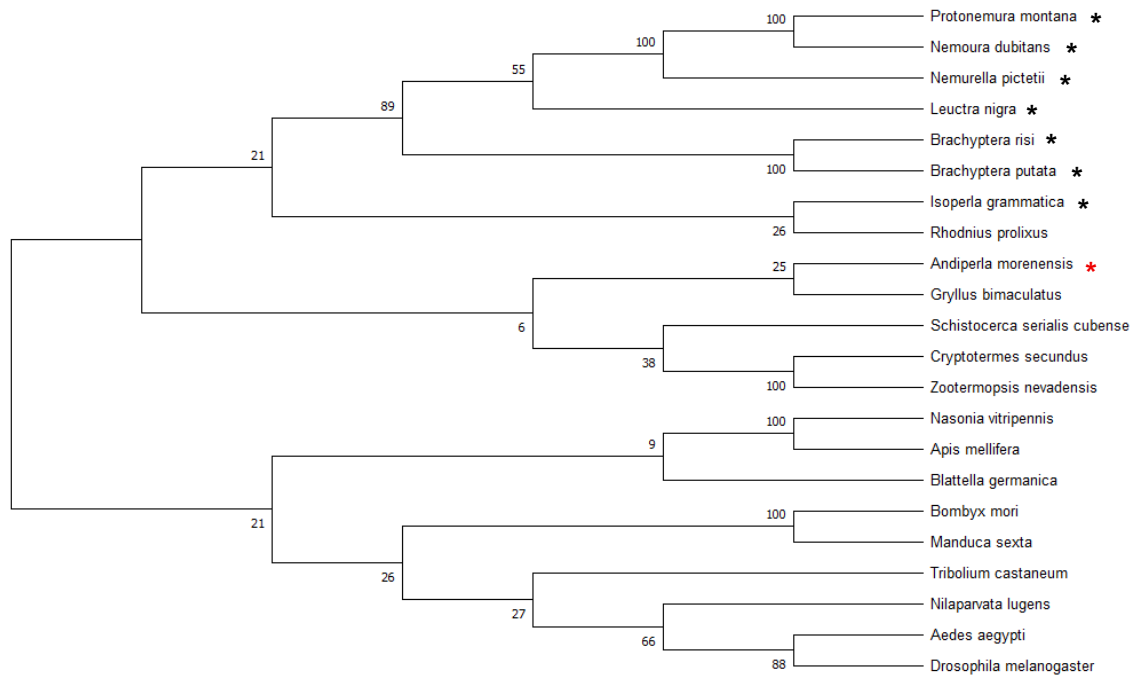


Figura 9. Cladograma de Hsp 70-4L (*: Plecópteros).

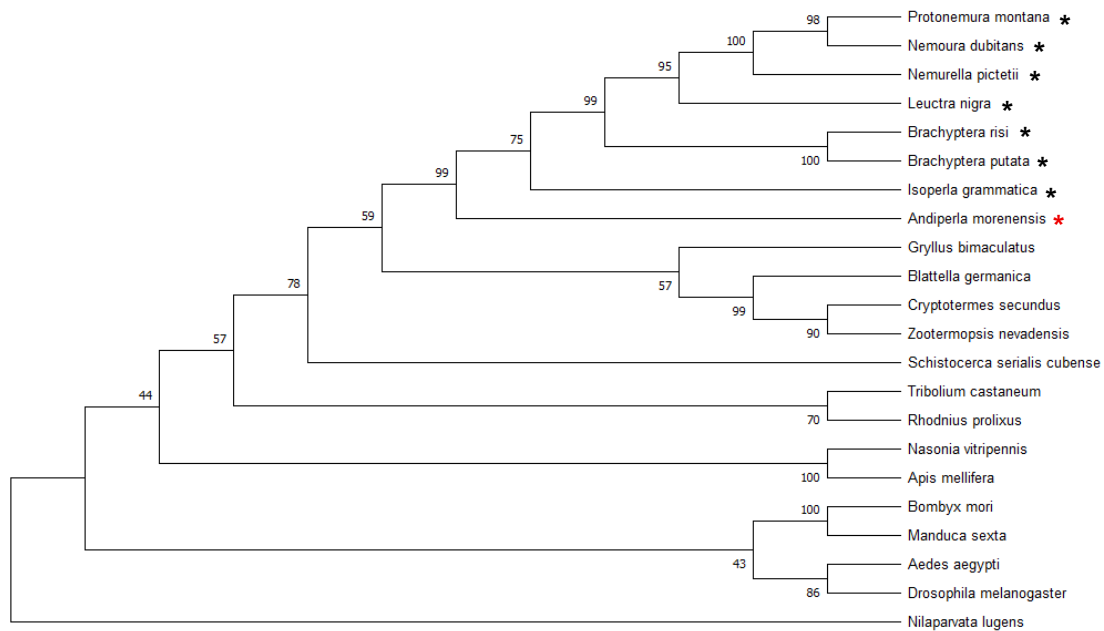


Figura 10. Cladograma de Hsp 70 cognate 5 (*: Plecópteros).

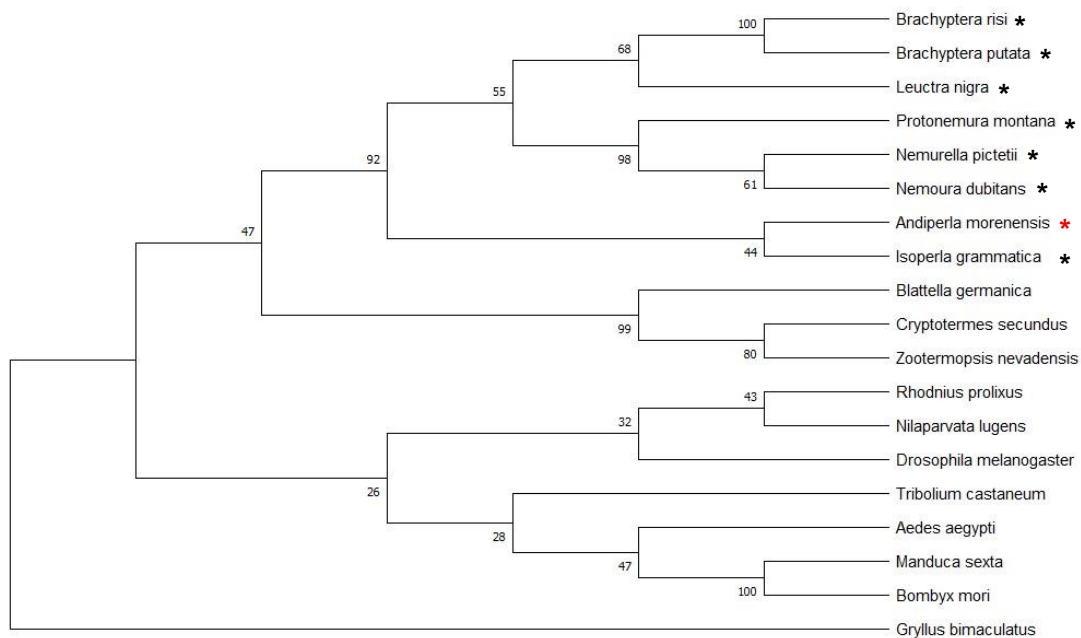


Figura 11. Cladograma de Csp CG9705 (*: Plecópteros).

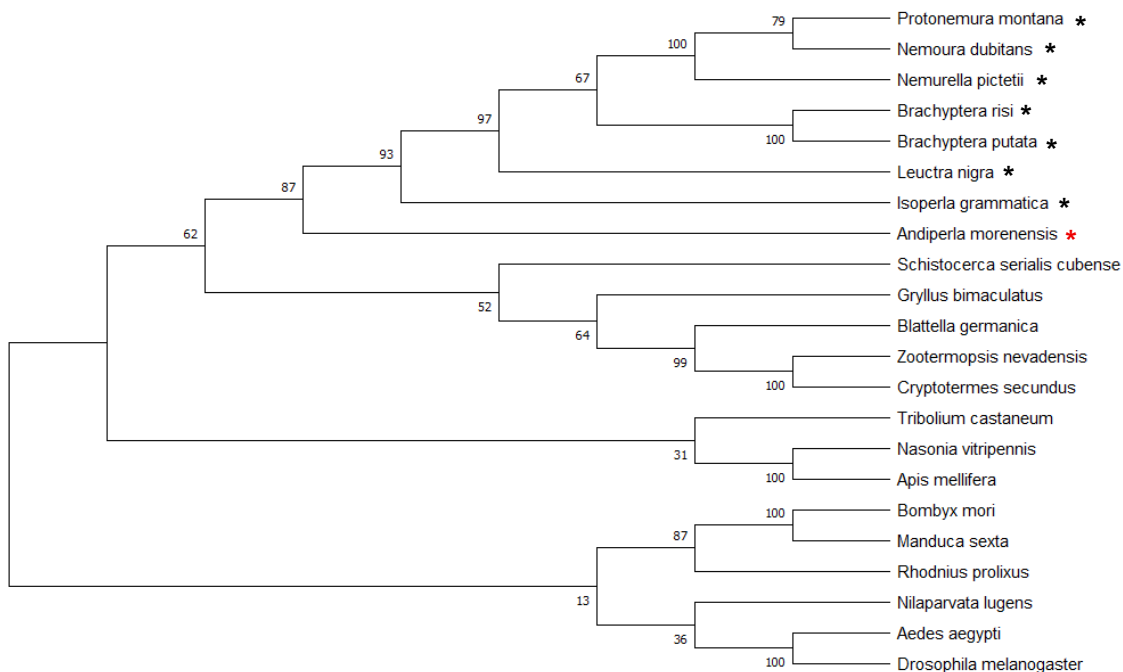


Figura 12. Cladograma de CSDE1 (*: Plecópteros).

En el alineamiento de las Hsp y Csp con el genoma de los plec6pteros estudiados, pudimos detectar algunas duplicaciones para Hsp 68, de tal manera que en la Figura 7, observamos 3 copias para *Nemoura dubitans*, 4 copias para *Leutra nigra* y 2 copias para *Isoperla*

grammatica. Para *N. dubitans* 2 de 3 copias son iguales, en *L. nigra* 2 copias son iguales y se diferencian de las otras 2 copias que constituyen otro grupo de iguales, por último, en el caso de *I. grammatica*, ambas copias son iguales. Podría entonces inferirse una duplicación sostenida que da lugar a parálogos de secuencia proteica idéntica.

En el genoma de *N. dubitans* detectamos que las 3 duplicaciones se encuentran en el mismo cromosoma (Figura 13). En el caso de *L. nigra* también observamos que las 4 duplicaciones se encuentran en el mismo cromosoma, (Figura 14). Por último, para *I. grammatica*, ambas duplicaciones se encuentran en cromosomas diferentes (Figura 15).

Cabe recalcar que las duplicaciones que se observan en las Figuras 13 y 14 fueron nombradas según el orden que se encuentra en su cromosoma, para el caso de *I. grammatica* las copias 1 y 2, son las que figuran en los cromosomas 6 y 1, respectivamente (Figura 15).

Para *N. dubitans* las copias 2 y 3 son similares y se encuentran consecutivas en el cromosoma 1 (Figura 13). Se observa el mismo patrón en *L. nigra*, dónde las copias 1 y 2 son similares y se encuentran de forma consecutiva, mientras que las copias 3 y 4 también arrojaron similitud y se encuentran próximas entre sí, pero alejadas de 1 y 2 en el mismo cromosoma 5 (Figura 14). En el caso de *I. grammatica*, ambas copias son similares, pero se encuentran en cromosomas diferentes (Figura 15).

Nemoura dubitans genome assembly, chromosome: 1

GenBank: OV121074.1

[GenBank](#) [FASTA](#)

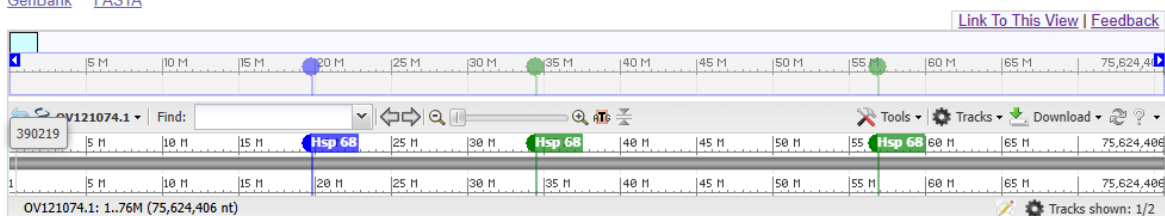
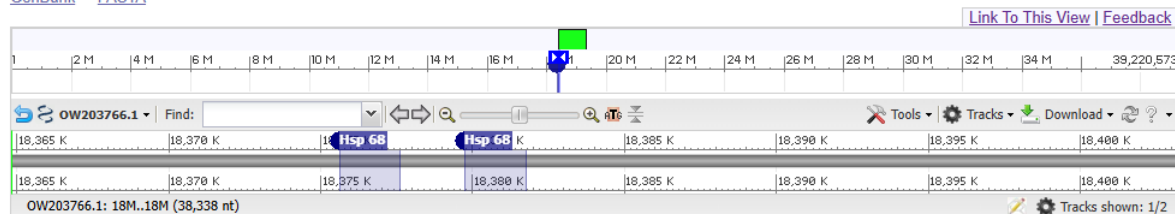


Figura 13. Representación gráfica del cromosoma 1 de *Nemoura dubitans* con la ubicación de las tres duplicaciones (En orden: Copia 1, 2 y 3) de Hsp 68 (Visualización de los resultados de la búsqueda por BLAST mediante NCBI genome viewer).

Leuctra nigra genome assembly, chromosome: 5

GenBank: OW203766.1

[GenBank](#) [FASTA](#)



Leuctra nigra genome assembly, chromosome: 5

GenBank: OW203766.1

[GenBank](#) [FASTA](#)

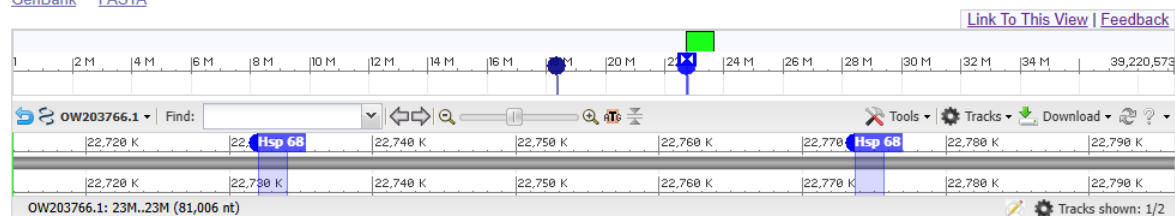
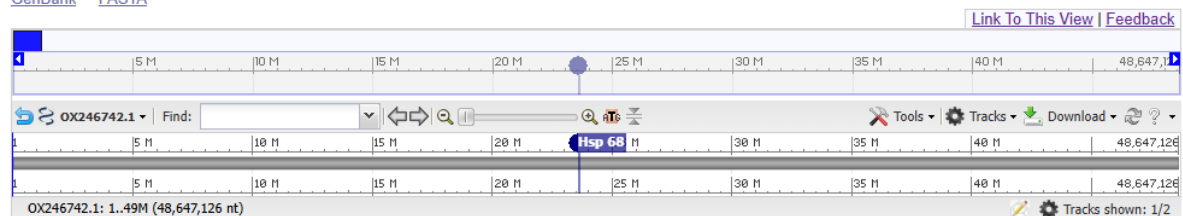


Figura 14. Representación gráfica del cromosoma 5 de *Leuctra nigra*. En la imagen de arriba se observa la ubicación de dos duplicaciones (Copia 1 y 2) que se encuentra próximas y en la imagen de abajo se observan otras dos duplicaciones (Copia 3 y 4) que también se encuentra próximas entre sí (Visualización de los resultados de la búsqueda por BLAST mediante NCBI genome viewer).

Isoperla grammatica genome assembly, chromosome: 6

GenBank: OX246742.1

[GenBank](#) [FASTA](#)



Isoperla grammatica genome assembly, chromosome: 1

GenBank: OX246737.1

[GenBank](#) [FASTA](#)

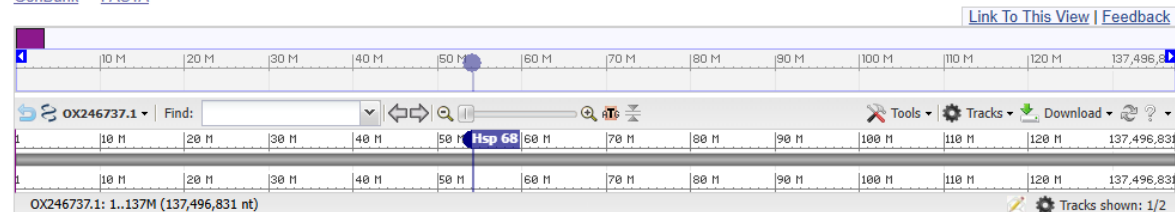


Figura 15. Representación gráfica del cromosoma 6 (arriba) y del cromosoma 1 (abajo) de *Isoperla grammatica*. En la imagen de arriba se observa la copia 1 de Hsp 68, ubicada en el cromosoma 6. En la imagen de abajo se observa la copia 2, ubicada en el cromosoma 1 (Visualización de los resultados de la búsqueda por BLAST mediante NCBI genome viewer).

En el análisis filogenético de todas las proteínas en conjunto, pudimos corroborar la identidad de cada una y verificar que se tratan de proteínas diferentes (Figura 16). Se realizó un análisis de los términos GO anotados en Uniprot para cada proteína y una búsqueda de función de los mismos en la base de datos de QuickGO.

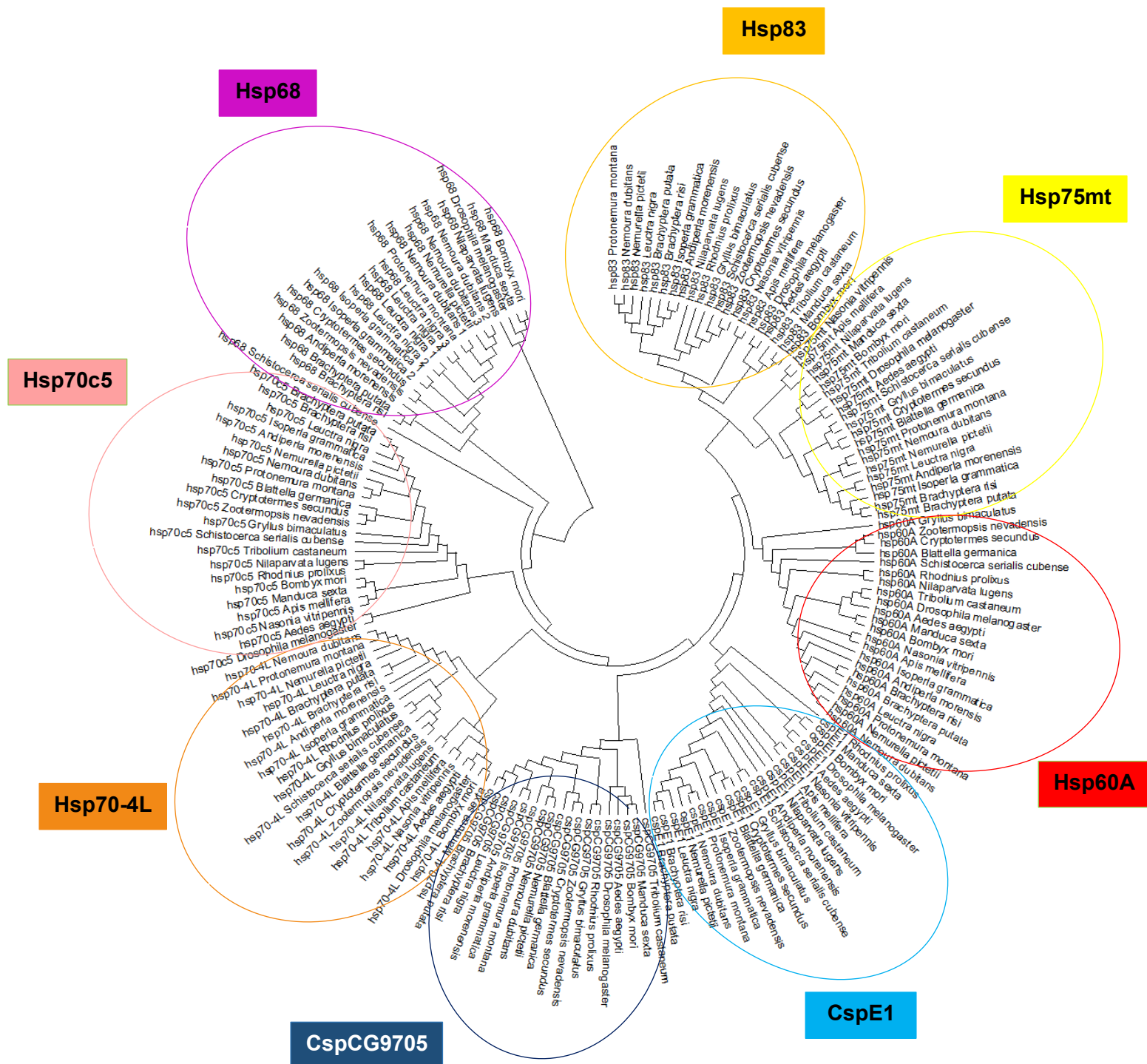


Figura 16. Análisis filogenético completo de proteínas *heat shock* y *cold shock* encontradas en el transcriptoma de *Andiperla*.

Descripción de proteínas de shock térmico: Hsp y Csp

Hsp 68

ID	Término	Categoría	Función
GO:0005737	cytoplasm	CC	Forma parte del contenido de estructuras subcelulares ubicadas en el citoplasma
GO:0005634	nucleus	CC	Forma parte de componentes del núcleo.
GO:0005524	ATP binding	MF	Unión al ATP, adenosina 5'-trifosfato, coenzima y regulador enzimático de importancia universal.
GO:0016887	ATP hydrolysis activity	MF	La hidrólisis del ATP se utiliza en algunas reacciones como fuente de energía
GO:0140662	ATP-dependent protein folding chaperone	MF	Se une a una proteína o a un complejo proteico para contribuir al proceso de plegamiento de la proteína, impulsado por la hidrólisis de ATP.
GO:0031072	heat shock protein binding	MF	Unión a una proteína de choque térmico.
GO:0044183	protein folding chaperone	MF	Se une a una proteína o a un complejo proteico para ayudar al proceso de plegamiento de la proteína.
GO:0051085	chaperone cofactor-dependent protein refolding	BP	Proceso de ayuda al correcto ensamblaje postraduccional no covalente de las proteínas, que depende de cofactores proteicos adicionales.
GO:0008340	determination of adult lifespan	BP	Las vías que regulan la duración de la fase adulta del ciclo vital de un animal.
GO:0042026	protein refolding	BP	Proceso llevado a cabo por una célula que restaura la actividad biológica de una proteína desplegada o mal plegada, utilizando proteínas auxiliares como las chaperonas.
GO:0042594	response to starvation	BP	Cualquier proceso que provoque un cambio de estado o de actividad de una célula o de un organismo como consecuencia de un estímulo de inanición, de privación de alimento.

Tabla 6. Términos GO encontrados para Hsp 68. CC: cellular component, MF: molecular function, BP: biological process.

Hsp 68 es una *heat shock* perteneciente a la familia de Hsp 70 que cumple la función de plegar correctamente las proteínas recién sintetizadas (Colinet et al., 2010; Morrow & Tanguay, 2003). En *Drosophila melanogaster* se observa un incremento hasta de 22 veces de Hsp 68, luego de 2 h de recuperación a 25° C después de un tratamiento de frío a 0° C. Otros estudios confirman que Hsp 68 se induce por estrés térmico (Bettencourt et al., 2008; Palter et al., 1986; Sørensen et al., 2005). También se reportó que algunas especies templadas de *Drosophila*, el ARNm de Hsp70 se acumulaba después de que las moscas volvieran a 23 °C tras un tratamiento de frío (Goto & Kimura, 1998). Tanto Hsp 70 como Hsp 68 son dos miembros de una pequeña familia de genes relacionados, de los cuales sólo algunos son inducidos por el choque térmico, mientras que los otros, los cognados de la Hsp 70, se transcriben a temperaturas normales (Craig et al., 1983). Se considera que Hsp 68 en *D. melanogaster* tiene funciones protectoras similares a las de Hsp70 (L. J. Wang et al., 2014).

Los ARNm de Hsp 68 y 70 están presentes en niveles muy bajos en la mayoría de las etapas y en una concentración ligeramente mayor en las pupas de *D. melanogaster* (Mason et al., 1984).

Hsp 68, es un gen importante para el endurecimiento térmico. En moscas adultas, se observó que la concentración de Hsp 68 aumentaba durante 6 horas después de la recuperación de un choque térmico de 1 hora a 37° C (Palter et al., 1986).

Hsp 83

ID	Término	Categoría	Función
GO:0034663	endoplasmic reticulum chaperone complex	CC	Complejo proteico situado en el retículo endoplásmico y compuesto por proteínas chaperonas, como BiP.
GO:0101031	protein folding chaperone complex	CC	Complejo proteico necesario para el plegamiento o desplegamiento no covalente, la maduración, la estabilización o el ensamblaje o desensamblaje de estructuras macromoleculares. Suele estar activo durante la traducción o inmediatamente después de su finalización. Muchos complejos de chaperonas contienen proteínas de choque térmico.
GO:0140662	ATP-dependent protein folding chaperone	MF	Se une a una proteína o a un complejo proteico para contribuir al proceso de plegamiento de la proteína, impulsado por la hidrólisis de ATP.
GO:0051082	unfolded protein binding	MF	Unión a una proteína desplegada
GO:0034605	cellular response to heat	BP	Cualquier proceso que provoque un cambio de estado o de actividad de una célula (en términos de movimiento, secreción, producción de enzimas, expresión de genes, etc.) como consecuencia de un estímulo térmico, un estímulo de temperatura superior a la temperatura óptima para ese organismo.
GO:0009631	cold acclimation	BP	Cualquier proceso que aumente la tolerancia a la congelación de un organismo en respuesta a temperaturas bajas no congelantes.
GO:0048477	oogenesis	BP	Proceso completo de formación y maduración de un óvulo o gameto femenino a partir de una célula germinal femenina primordial
GO:0019094	pole plasm mRNA localization	BP	Cualquier proceso en el que el ARNm se transporta o se mantiene en el polo plasmático del ovocito
GO:0002052	positive regulation of neuroblast proliferation	BP	Cualquier proceso que active o aumente la tasa de proliferación de neuroblastos
GO:0043248	proteasome assembly	BP	La agregación, organización y unión de un complejo proteasoma maduro y activo
GO:0006457	protein folding	BP	Proceso de contribución al ensamblaje covalente y no covalente de polipéptidos de cadena simple o complejos de multisubunidades en la estructura terciaria correcta
GO:0050821	protein stabilization	BP	Cualquier proceso implicado en el mantenimiento de la estructura e integridad de una proteína y en la prevención de su degradación o agregación
GO:0045187	regulation of circadian sleep/wake cycle, sleep	BP	Cualquier proceso que modula la frecuencia, el ritmo o la extensión del sueño; un estado fácilmente reversible de reducción de la conciencia y la actividad metabólica que se produce periódicamente en muchos animales
GO:0009408	response to heat	BP	Cualquier proceso que provoque un cambio de estado o de actividad de una célula o de un organismo (en términos de movimiento, secreción, producción de enzimas, expresión de genes, etc.) como consecuencia de un estímulo térmico, un estímulo de temperatura superior a la temperatura óptima para ese organismo.
GO:0070922	RISC complex assembly	BP	Proceso en el que un ARN pequeño monocatenario se incorpora al complejo de silenciamiento iniciado por ARN (RISC) formando un complejo complementario de apareamiento de bases que media el silenciamiento génico por ARN pequeño.

Tabla 7. Términos GO encontrados para Hsp 83. CC: cellular component, MF: molecular function, BP: biological process.

Hsp 83 es una chaperona molecular que promueve la maduración, el mantenimiento estructural y la regulación adecuada de proteínas dianas específicas implicadas, por ejemplo, en el control del ciclo celular y la transducción de señales. Sufre un ciclo funcional vinculado a su actividad ATPasa. Este ciclo probablemente induce cambios conformacionales en las proteínas dianas, provocando así su activación. Interactúa dinámicamente con varias co-chaperonas que modulan su reconocimiento de sustrato, su ciclo ATPasa y su función chaperona. Junto con Hop y piwi, interviene en la canalización, también conocida como robustez del desarrollo,

probablemente a través del silenciamiento epigenético de variantes genéticas existentes y la supresión de nuevas variaciones genéticas inducidas por transposones (Figura 17). Se requiere para la biogénesis de piARN facilitando la carga de piARN en proteínas PIWI (Gangaraju et al., 2011; Olivieri et al., 2012).

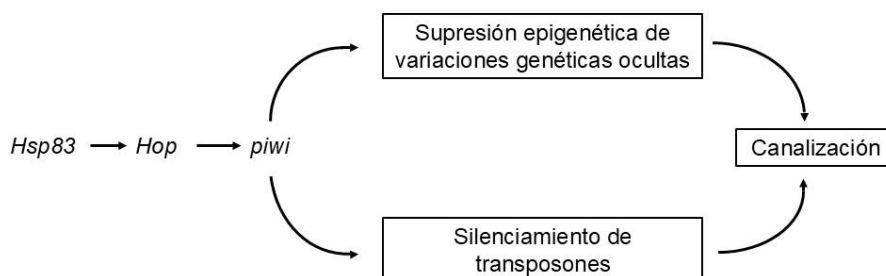


Figura 17. Participación de Hsp 83 en la canalización
(Tomado y traducido de Gangaraju et al., 2011)

Hsp 83 se encuentra casi exclusivamente en el citoplasma (Arrigo et al., 1980; Storti et al., 1980) y está muy conservada a lo largo de la evolución (Kelley & Schlesinger, 1982). Una gran región de aproximadamente 80 pb centrada alrededor del punto de iniciación de la transcripción del gen hsp83 comparte sólo un 31% de homología con la región correspondiente del gen hsp70, mientras que los genes hsp22, hsp23, hsp26 y hsp27 comparten aproximadamente un 54% de homología con hsp70 en esta región. La menor homología del gen hsp83 es coherente con la naturaleza desviada de este gen de choque térmico (Hackett & Lis, 1983).

La exposición de células de *Drosophila* a temperaturas varios grados por encima de la temperatura normal de crecimiento (23°C) induce un cambio rápido y drástico en la expresión génica. La mayoría de los genes activos a 23°C se reprimen, mientras que un conjunto específico de genes de choque térmico se activa tanto a nivel transcripcional como traduccionalmente (Ashburner & Bonner, 1979). Uno de estos genes inducidos, es el que codifica la proteína *heat shock*, Hsp 83. (Hackett & Lis, 1983).

En polillas como *Sesamia nonagrioides*, el gen SnoHsp83 se expresa de forma constitutiva en larvas sin diapausa y se induce 15 veces por el calor. También se encontró que SnoHsp83 podría estar implicado en el proceso de desarrollo que tiene lugar entre dos mudas (Gkouvitsas et al., 2009). El estrés por frío también afecta a la expresión de SnoHsp83. En larvas no diápsicas, no hubo inducción de la expresión del gen SnoHsp83 cuando se aisló el ARN de

las larvas inmediatamente después del estrés por frío. La inducción sólo fue aparente tras la recuperación durante 1 h a 25 °C, cuando las larvas fueron tratadas durante 1 h a -5° C, 0 ° C, 5° C. (Gkouvitsas et al., 2009).

La regulación al alza de Hsp 83 en la diapausa profunda encontrada en *S. nonagrioides* es consistente con los patrones encontrados en el barrenador del tallo del arroz, *Chilo suppressalis*, y en el gusano de la cebolla, *Delia antiqua* (B. Chen et al., 2005; Sonoda et al., 2006).

SnoHsp83 y SnoHsc70 (*Sesamia nonagrioides* Heat shock cognate 70) podrían ser necesarios para la actividad de la ecdisona (Gkouvitsas et al., 2009).

En hormigas del desierto, *Cataglyphis sp.*, adaptadas a temperaturas hasta de 50 °C, la síntesis de Hsp 83 alcanza su máximo a 37° C e incluso continúa sintetizando a temperaturas superiores a 40° C (Gehring & Wehner, 1995).

En *D. melanogaster* se observa un incremento de 3,4 veces de Hsp 83 durante la recuperación a 25 °C luego de la recuperación por estrés de frío (Colinet et al., 2010).

Hsp 60 A

ID	Término	Categoría	Función
GO:0005743	mitochondrial inner membrane	CC	La bicapa lipídica interna de la envoltura mitocondrial
GO:0005759	mitochondrial matrix	CC	Material gelatinoso, de estructura muy fina, que se encuentra en el espacio matriz o lumen de una mitocondria.
GO:0140662	ATP-dependent protein folding chaperone	MF	Se une a una proteína o a un complejo proteico para contribuir al proceso de plegamiento de la proteína, impulsado por la hidrólisis de ATP.
GO:0051087	protein-folding chaperone binding	MF	Unión a una proteína chaperona, una clase de proteínas que se unen a polipéptidos nacientes o desplegados y garantizan su correcto plegamiento o transporte.
GO:0034605	cellular response to heat	BP	Cualquier proceso que provoque un cambio de estado o de actividad de una célula (en términos de movimiento, secreción, producción de enzimas, expresión de genes, etc.) como consecuencia de un estímulo térmico, un estímulo de temperatura superior a la temperatura óptima para ese organismo.
GO:0034514	mitochondrial unfolded protein response	BP	Serie de señales moleculares generadas como consecuencia de la presencia de proteínas no plegadas en la matriz mitocondrial; da lugar a la regulación transcripcional de genes nucleares que codifican proteínas de estrés mitocondrial.
GO:0007005	mitochondrion organization	BP	Proceso que se lleva a cabo a nivel celular y que tiene como resultado el ensamblaje, la disposición de las partes constituyentes o el desensamblaje de una mitocondria; incluye la morfogénesis y distribución mitocondrial y la replicación del genoma mitocondrial, así como la síntesis de nuevos componentes mitocondriales.
GO:0006457	protein folding	BP	Proceso de ayuda al ensamblaje covalente y no covalente de polipéptidos de cadena simple o complejos de multisubunidades en la estructura terciaria correcta.
GO:0045041	protein import into mitochondrial intermembrane space	BP	La importación de proteínas en el espacio entre las membranas mitocondriales interna y externa.
GO:0042026	protein refolding	BP	Proceso llevado a cabo por una célula que restaura la actividad biológica de una proteína desplegada o mal plegada, utilizando proteínas auxiliares como las chaperonas.

Tabla 8. Términos GO encontrados para Hsp 60 A. CC: cellular component, MF: molecular function, BP: biological process.

Hsp 60, que tiene un papel incierto como proteína de estrés en los insectos, se regula positivamente de forma significativa en el caso de la mosca azul australiana, *Lucilia cuprina* por exposición al calor (Sharma et al., 2006). Sin embargo, ni el choque térmico ni el choque por frío inducen la expresión de Hsp 60 en *Drosophila* (Colinet et al., 2010).

Hsp 60 previene el mal plegamiento y favorece el correcto plegamiento y ensamblaje de polipéptidos desplegados generados en condiciones de estrés. La familia de genes hsp 60, chaperonas moleculares, ha sido objeto de estudio en numerosos sistemas debido a su importante papel en el plegamiento de proteínas desnaturalizadas en el desarrollo, cómo también durante el tratamiento de choque térmico. (Kozlova et al., 1997).

Las proteínas Hsp 60 se encuentran en el citosol de las bacterias, en el compartimento de la matriz de las mitocondrias y en el compartimento estromal de los cloroplastos (Cheng et al., 1990; Horwich & Willison, 1993). Estas proteínas son necesarias a temperaturas normales. Se ha propuesto que Hsp 60 cataliza el plegamiento de las proteínas, pero más concretamente modula el plegamiento correcto de las proteínas (Ishii et al., 1994; Martin et al., 1991; Weissman et al., 1994).

La Hsp 60 mitocondrial modula el plegamiento de un gran número de proteínas codificadas en el núcleo tras la translocación mitocondrial. Se han caracterizado varias proteínas cuyas funciones son necesarias para el ensamblaje de complejos proteicos específicos en la membrana interna mitocondrial (Langer & Neupert, 1994). También se ha demostrado que es necesaria para su propio ensamblaje, así como para el ensamblaje de algunas proteínas codificadas por las mitocondrias. Como muchas otras Hsp, la Hsp 60 desempeña un papel en la respuesta al choque térmico al facilitar aparentemente el correcto plegamiento de un gran número de proteínas mitocondriales preexistentes tras ser desnaturalizadas por tratamiento térmico (Mendoza et al., 1991; Parsell & Lindquist, 1993).

En el nematodo *Hidradenitis elegans*, El STP-60a (Hsp 60 A) podría mejorar la función mitocondrial de los nematodos de dieta normal, aumentando la actividad de los complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial, regulando la expresión de los genes de la cadena respiratoria mitocondrial (*mev-1*, *clk-1*, *isp-1*) e induciendo la reacción mitocondrial de proteínas no plegadas. Además, la STP-60a activó el sistema de autofagia de los nematodos en forma de dependencia de la insulina y de la vía mitocondrial, reguló la expresión de genes relacionados con la autofagia (*unc-51*, *lgg-1*, *bec-1*, *vps-34*), aumentó el nivel de autofagia y, en última instancia, prolongó la vida útil de los nematodos de dieta normal (Weihong, 2024).

Hsp 75 mitocondrial

ID	Término	Categoría	Función
GO:0005743	mitochondrial inner membrane	CC	La bicapa lipídica interna de la envoltura mitocondrial, es decir, la que mira hacia el lumen.
GO:0005759	mitochondrial matrix	CC	Material gelatinoso, de estructura muy fina, que se encuentra en la matriz mitocondrial. Contiene las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y, en algunos organismos, las enzimas relacionadas con la oxidación de los ácidos grasos.
GO:0140662	ATP-dependent protein folding chaperone	MF	Se une a una proteína o a un complejo proteico para contribuir al proceso de plegamiento de la proteína, impulsado por la hidrólisis de ATP.
GO:0003723	RNA binding	MF	Unión a una molécula de ARN o a una porción de la misma.
GO:0051082	unfolded protein binding	MF	Unión a una proteína desplegada
GO:0034605	cellular response to heat	BP	Cualquier proceso que provoque un cambio de estado o de actividad de una célula (en términos de movimiento, secreción, producción de enzimas, expresión de genes, etc.) como consecuencia de un estímulo térmico, un estímulo de temperatura superior a la temperatura óptima para ese organismo.
GO:0034514	mitochondrial unfolded protein response	BP	Serie de señales moleculares generadas como consecuencia de la presencia de proteínas no plegadas en la matriz mitocondrial; da lugar a la regulación transcripcional de genes nucleares que codifican proteínas de estrés mitocondrial.
GO:1902884	positive regulation of response to oxidative stress	BP	Cualquier proceso que active o aumente la frecuencia, la tasa o el alcance de la respuesta al estrés oxidativo.
GO:0006457	protein folding	BP	Proceso de ayuda al ensamblaje covalente y no covalente de polipéptidos de cadena simple o complejos de multisubunidades en la estructura terciaria correcta.
GO:0009408	response to heat	BP	Cualquier proceso que provoque un cambio de estado o de actividad de una célula o de un organismo (en términos de movimiento, secreción, producción de enzimas, expresión de genes, etc.) como consecuencia de un estímulo térmico, un estímulo de temperatura superior a la temperatura óptima para ese organismo.

Tabla 9. Términos GO encontrados para Hsp 75 mitocondrial. CC: cellular component, MF: molecular function, BP: biological process.

Se sabe que la chaperona mitocondrial, proteína 1 asociada al receptor del TNF (TRAP1) o también heat shock protein 75 kDa, mitocondrial preserva el potencial de la membrana mitocondrial e impide la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), protegiendo así a las células del estrés del RE y del estrés oxidativo.(Kokott-Vuong et al., 2021a)

En un ensayo con adultos de *D. melanogaster* la producción post-hipoxia de ROS y la activación de la respuesta a proteínas no plegadas (UPR) fue significativamente mayor en las moscas deficientes en Trap1 en comparación con las moscas control, demostrando así que TRAP1 está crucialmente implicada en la regulación post-hipoxia del estrés mitocondrial/ER y en la activación de la UPR. (Kokott-Vuong et al., 2021). Otros trabajos también demostraron que TRAP1 está implicada en la protección de las células frente al estrés del RE (Felts et al., 2000; Sisinni et al., 2014).

Los niveles más bajos de abundancia de expresión de TRAP1 se correlacionaron positivamente con un elevado deterioro mitocondrial y muerte celular (Song et al., 1995) a causa de una elevada producción de ROS y una mayor actividad metabólica, así como una regulación al alza de los marcadores UPR y SOD, Catalasa y Hsp 70. (Kokott-Vuong et al., 2021). También

se observó una menor esperanza de vida de las moscas deficientes en Trap1 y una mayor sensibilidad al estrés térmico, al pesticida paraquat y a los venenos mitocondriales rotenona y antimicina (Costa et al., 2013). TRAP1 transmite sus propiedades antiapoptóticas a través de una disminución de la producción de ROS, tal y como se observó en un modelo de isquemia miocárdica, a través de su capacidad para reducir el estrés del RE (Kang et al., 2007; Y. Wang et al., 2015).

La regulación al alza de TRAP1 en humanos facilita el crecimiento y la progresión de muchos cánceres al promover el metabolismo glucolítico y antagonizar la transición de permeabilidad mitocondrial que precede a múltiples vías de muerte celular. La atenuación de TRAP1 induce la apoptosis en modelos celulares de cáncer, lo que identifica a TRAP1 como una posible diana terapéutica en el cáncer. (Wengert et al., 2022).

Heat shock 70 kDa protein 4L

ID	Término	Categoría	Función
GO:0140662	ATP-dependent protein folding chaperone	MF	Se une a una proteína o a un complejo proteico para contribuir al proceso de plegamiento de la proteína, impulsado por la hidrólisis de ATP.
GO:0031249	denatured protein binding	MF	Las proteínas desnaturalizadas estaban antes en sus conformaciones funcionales correctas, pero se han plegado incorrectamente y a menudo forman agregados.
GO:0034605	cellular response to heat	BP	Cualquier proceso que provoque un cambio de estado o de actividad de una célula (en términos de movimiento, secreción, producción de enzimas, expresión de genes, etc.) como consecuencia de un estímulo térmico, un estímulo de temperatura superior a la temperatura óptima para ese organismo.
GO:0051131	chaperone-mediated protein complex assembly	BP	La agregación, disposición y unión de un conjunto de componentes para formar un complejo proteico, mediada por moléculas chaperonas que no forman parte del complejo acabado.
GO:0006457	protein folding	BP	Proceso de ayuda al ensamblaje covalente y no covalente de polipéptidos de cadena simple o complejos de multisubunidades en la estructura terciaria correcta.

Tabla 10. Términos GO encontrados para Hsp 70-4L. CC: cellular component, MF: molecular function, BP: biological process.

La historia evolutiva de esta familia multigénica no se conoce bien. Sin embargo, en algunos casos (como los genes similares al GRP78-1) las similitudes son mayores entre genes de especies diferentes que entre genes del mismo organismo, lo que indica eventos tempranos de duplicación génica y mantenimiento de la familia multigénica a lo largo del tiempo. Se han identificado varias hsp 70 y proteínas relacionadas presentes en diferentes compartimentos celulares y asociadas a una amplia variedad de procesos celulares. En *D. melanogaster* la familia HSP70 incluye 5-6 copias de HSP70 y una copia del gen HSP68 inducible por calor. (Lindquist, 1988). Todas las hsp 70 y proteínas relacionadas unen ATP con alta afinidad (Chappell et al., 1986). Los análisis genéticos, que sólo se han llevado a cabo en *E. coli* y eucariotas inferiores, muestran que la hsp 70 y los genes relacionados son esenciales para el crecimiento a altas

temperaturas o a todas las temperaturas, lo que indica un papel crítico en la fisiología celular normal para las proteínas codificadas. (Lindquist, 1988)

La Heat shock 70 kDa protein 4L o también HSPA4L es un miembro de la familia de proteínas de choque térmico (HSP110) que desempeña muchas funciones, como chaperonas moleculares que se sintetizan en condiciones de estrés para ayudar en el plegamiento, ensamblaje y transporte de proteínas (Held et al., 2006, 2011; Kalmar & Greensmith, 2009).

En mamíferos se ha demostrado que la HSPA4L es necesaria para la espermatogénesis normal y que se produce en condiciones de estrés ambiental y patológicas o en determinadas condiciones fisiológicas para proteger a las células de los daños (Held et al., 2006, 2011). La proteína HSPA4L está altamente expresada en diferentes células espermatogénicas y parece desempeñar un papel en la osmotolerancia, la fertilidad masculina y la motilidad de los espermatozoides (Held et al., 2006; Urena et al., 2022)

En el riñón, la proteína se limita a los segmentos corticales de los túbulos distales (Held et al., 2006). Los análisis de expresión de Hspa4l en los testículos, la línea celular del conducto colector medular interno (mIMCD3) y los riñones de un ratón con restricción de agua revelaron un aumento de la expresión de Hspa4l por NaCl hiperosmótico o choque térmico (X. Chen et al., 2015; Held et al., 2006). Por lo tanto, Hspa4l es un gen inducido por estrés hiperosmótico y térmico.

La deficiencia de Hspa4l no perjudica el desarrollo hasta la edad adulta, pero causa una mayor incidencia de infertilidad masculina caracterizada por reducciones del número y la motilidad de los espermatozoides (Held et al., 2006).

La HSPA4 también fomenta la capacidad de angiogénesis *in vitro* de las células endoteliales de los vasos, lo que concuerda con el escenario *in vivo* de las complicaciones del espectro de la placenta acreta (PAS) (S. C. Li et al., 2022).

La HSPA4 está asociada a la metástasis tumoral (Wu et al., 2011; Zhong et al., 2011), una actividad biológica para la que suele potenciarse la angiogénesis (S. C. Li et al., 2022).

Heat shock 70 kDa protein cognate 5

ID	Término	Categoría	Función
GO:0005759	mitochondrial matrix	CC	Material gelatinoso, de estructura muy fina, que se encuentra en el espacio matriz o lumen de una mitocondria. Contiene las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y, en algunos organismos, las enzimas relacionadas con la oxidación de los ácidos grasos.
GO:0001405	PAM complex, Tim23 associated import motor	CC	Complejo proteico situado en el lado de la matriz de la membrana interna mitocondrial y asociado al complejo translocasa de membrana interna de importación mitocondrial TIM23 actividad motora ATPasa para impulsar la importación de proteínas a la matriz mitocondrial.
GO:0140662	ATP-dependent protein folding chaperone	MF	Se une a una proteína o a un complejo proteico para contribuir al proceso de plegamiento de la proteína, impulsado por la hidrólisis de ATP.
GO:0031072	heat shock protein binding	MF	Unión a una proteína de choque térmico, una proteína sintetizada o activada en respuesta a un choque térmico.
GO:0008566	mitochondrial protein-transporting ATPase activity	MF	Permite la transferencia de un soluto o solutos de un lado a otro de una membrana según la reacción: $ATP + H_2O = ADP + \text{fosfato}$; impulsa el transporte de proteínas a la mitocondria a través del complejo translocasa de la membrana interna mitocondrial.
GO:0044183	protein folding chaperone	MF	Se une a una proteína o a un complejo proteico para ayudar al proceso de plegamiento de la proteína.
GO:0051082	unfolded protein binding	MF	Unión a una proteína desplegada.
GO:0051085	chaperone cofactor-dependent protein refolding	BP	Proceso de asistencia al correcto ensamblaje postraduccional no covalente de las proteínas, que depende de cofactores proteicos adicionales.
GO:0007005	mitochondrion organization	BP	Proceso que se lleva a cabo a nivel celular y que tiene como resultado el ensamblaje, la ordenación de las partes constituyentes o el desensamblaje de una mitocondria; incluye la morfogénesis y distribución mitocondrial y la replicación del genoma mitocondrial, así como la síntesis de nuevos componentes mitocondriales.
GO:0030150	protein import into mitochondrial matrix	BP	La importación de proteínas a través de las membranas mitocondriales externa e interna hacia la matriz. Las proteínas no plegadas entran en la matriz mitocondrial con una proteína chaperona; la información necesaria para dirigir la proteína precursora del citosol a la matriz mitocondrial está contenida en su secuencia N-terminal de orientación a la matriz. La translocación de los precursores a la matriz se produce en los raros lugares en los que las membranas externa e interna están próximas.
GO:0042026	protein refolding	BP	Proceso llevado a cabo por una célula que restaura la actividad biológica de una proteína desplegada o mal plegada, utilizando proteínas auxiliares como las chaperonas.

Tabla 11. Términos GO encontrados para Heat shock 70 kDa protein cognate 5. CC: cellular component, MF: molecular function, BP: biological process.

Un estudio realizado en el molusco, *Litopenaeus vannamei*, reveló que LvHSC70-5 (Heat shock 70 kDa protein cognate 5) se localiza en la mitocondria y que es fuertemente inducido por el virus de las manchas blancas (WSSV). Aparte de la infección por WSSV, la activación de la respuesta a proteínas no plegadas (UPR) y el estrés térmico también podrían aumentar la regulación de LvHSC70-5. La UPR también se activa en camarones infectados por WSSV, lo que sugiere un papel de LvHSC70-5 en la infección por WSSV. (Yuan et al., 2017). Dado que LvHSC70-5 es una chaperona proteica, podría desempeñar funciones esenciales relacionadas con la UPR durante la infección por WSSV (Y. H. Chen et al., 2012; Xu et al., 2014).

Como miembro de la familia HSP70, HSC70-5 / S70P se localiza en las mitocondrias y confiere tolerancia térmica mediante la prevención de la agregación de proteínas, manteniendo la morfología mitocondrial y la homeostasis celular (Banerjee & Chinthapalli, 2014).

El aumento de la mitofagia se identifica como una característica patológica temprana causada por el *knockdown* de Hsc70-5 antes de la aparición de defectos de locomoción. La pérdida de mitocondrias genera agotamiento del ATP celular (Zhu et al., 2013). También se demostró que Hsc70-5 rescata la letalidad pupal y los defectos de locomoción larvaria (Zhu et al., 2021).

En *Drosophila*, La disfunción mitocondrial por la baja expresión de hsc70-5 conduce a la proteólisis de Opa1-like y por lo tanto induce la fragmentación y degradación mitocondrial (Banerjee & Chinthapalli, 2014). Hsc70-5, al igual que la Mortalina de los mamíferos, actúa en las vías de señalización responsables del mantenimiento de la morfología mitocondrial y de la respuesta al estrés mitocondrial. La regulación de la morfología mitocondrial es un determinante crucial de la homeostasis celular. (Banerjee & Chinthapalli, 2014).

Los invertebrados acuáticos dependen principalmente de las HSP70, como se observa en el genoma de *Crassostrea gigas*, que codifica para más de 88 HSP70 (en comparación con las 17 en los seres humanos), que participan en la protección celular contra el calor u otros estreses (J. Wang et al., 2012).

En el gusano de la seda HSC70-1, HSC70-4 y HSC70-5 mostraron expresiones ligeramente inducidas en el cuerpo graso y/o el intestino medio bajo estrés térmico. En la glándula de la seda, HSC70-5 se expresa al alza bajo condiciones de altas temperaturas (Fang et al., 2021).

Cold shock domain-containing protein CG9705

ID	Término	Categoría	Función
GO:0005737	cytoplasm	CC	El contenido de una célula excluyendo la membrana plasmática y el núcleo, pero incluyendo otras estructuras subcelulares.
GO:0003730	mRNA 3'-UTR binding	MF	Unión a una región no traducida 3' de una molécula de ARNm.
GO:0048813	dendrite morphogenesis	BP	Proceso en el que se generan y organizan las estructuras anatómicas de una dendrita.
GO:0043488	regulation of mRNA stability	BP	Cualquier proceso que modula la propensión de las moléculas de ARNm a la degradación. Incluye procesos que tanto estabilizan como desestabilizan ARNm.

Tabla 12. Términos GO encontrados para Cold shock domain-containing protein CG9705. CC: cellular component, MF: molecular function, BP: biological process.

La función de Csp-CG9705 no está del todo esclarecida en insectos, pero se sabe que tienen rol importante en la formación y la organización de las neuronas en *Drosophila* (Iyer et al., 2013).

El homólogo en humanos, Calcium-regulated heat-stable protein 1 (CARHSP1) se une al ARNm y regula la estabilidad del ARNm diana. Se une al ADN monocatenario *in vitro*. (Wong et

al., 2005). CARHSP1 ha sido identificada como un miembro de la familia de proteínas de dominio *cold shock* (CSD), que participa en la regulación de la traducción ribosomal, la degradación del ARNm y la tasa de terminación de la transcripción (J. A. Lindquist et al., 2014; Jiang, et al., 2025).

Cold shock domain-containing protein E1

ID	Término	Categoría	Función
GO:0005737	cytoplasm	CC	El contenido de una célula excluyendo la membrana plasmática y el núcleo, pero incluyendo otras estructuras subcelulares.
GO:0003723	RNA binding	MF	Unión a una molécula de ARN o a una porción de la misma.

Tabla 13. Términos GO encontrados para Cold shock domain-containing protein E1. CC: cellular component, MF: molecular function, BP: biological process.

Las proteínas que contienen *cold shock domain* (CSD) pertenecen a la familia de proteínas de unión a ARN (RBPs, del inglés *RNA binding proteins*) más evolutivamente conservada que se conoce entre bacterias, plantas y animales. Estas RBPs se localiza principalmente en el citoplasma, donde interactúa con distintos complejos implicados en la regulación de la estabilidad y/o traducción del ARNm (Mihailovich et al., 2010).

La RBP, *cold shock domain-containing protein E1* (CSDE1), regula post-transcripcionalmente numerosos ARNm mediante diferentes mecanismos que dependen de su interacción con otras proteínas, el transcripto diana y la región dentro del transcripto donde CSDE1 se une principalmente en un proceso dinámico asociado con el tipo y estadio celular específico (Ju Lee et al., 2017). Además, CSDE1 puede modular la traducción de sus dianas a diferentes niveles (es decir, iniciación, elongación o terminación) actuando como activador o inhibidor de una fase de traducción específica para distintos ARNm (Mitchell et al., 2001; Wurth et al., 2016). La complejidad de esta regulación subyace en la capacidad de CSDE1 para modular el mismo proceso biológico de forma opuesta dependiendo del tipo y estadio celular (Dormoy-Raclet et al., 2005; Elatmani et al., 2011; Horos et al., 2012).

CSDE1 está altamente expresada en células *stem* embrionarias humanas (hESCs) para mantener su estado indiferenciado y prevenir el destino neuronal por defecto. En particular, la pérdida de CSDE1 acelera la diferenciación neuronal y potencia la neurogénesis. En ratones es esencial para el desarrollo embrionario, ya que la alteración de CSDE1 provoca defectos en la formación del tubo neural y la placenta que conducen a la letalidad a mediados de la gestación. (Saltel et al., 2017).

Se demostró que CSDE1 modula post-transcripcionalmente componentes centrales de múltiples nodos reguladores de la identidad de las células madre embrionarias, el compromiso neuroectodérmico y la neurogénesis. Entre estos factores neuronales claves, CSDE1 se une a

los ARNm de la proteína 7 de unión a ácidos grasos (FABP7) y de la vimentina (VIM), así como a los transcritos implicados en el desarrollo de la proyección neuronal, regulando su estabilidad y traducción. CSDE1 es un regulador post-transcripcional central de la identidad y neurogénesis de las hESC.(Ju Lee et al., 2017).

Máximo Térmico Crítico (MTC)

En la tabla 14 y la Figura 18 se observa un aumento progresivo de la temperatura del agua, alcanzándose la máxima temperatura a las 5 horas de iniciado el experimento. *Andiperla* alcanza su MTC a los ~ 22°C (Tabla 15), en dónde se detectó la pérdida de la capacidad de darse vuelta y ponerse “al derecho”.

Tiempo	Temperatura en ° C
13:30:00	6,05
13:35:00	6,17
13:40:00	5,96
13:45:00	6,52
13:50:00	6,86
13:55:00	7,50
14:00:00	8,32
14:05:00	8,32
14:10:00	8,92
14:15:00	9,05
14:20:00	9,44
14:25:00	9,91
14:30:00	9,95
14:35:00	10,34
14:40:00	10,42
14:45:00	10,64
14:50:00	10,98
14:55:00	11,71
15:00:00	11,71
15:05:00	11,97
15:10:00	12,31
15:15:00	12,31
15:20:00	12,70
15:25:00	12,74
15:30:00	12,91
15:35:00	12,95
15:40:00	13,04
15:45:00	13,25
15:50:00	13,30
15:55:00	12,82
16:00:00	13,17
16:05:00	14,20
16:10:00	14,15
16:15:00	14,33
16:20:00	14,54
16:25:00	14,80
16:30:00	14,84
16:35:00	15,10

Tiempo	Temperatura en ° C
16:40:00	15,48
16:45:00	15,61
16:50:00	15,91
16:55:00	16,26
17:00:00	17,07
17:05:00	17,20
17:10:00	17,59
17:15:00	18,19
17:20:00	18,66
17:25:00	19,09
17:30:00	19,65
17:35:00	19,86
17:40:00	20,16
17:45:00	20,59
17:50:00	20,80
17:55:00	20,85
18:00:00	21,23
18:05:00	21,32
18:10:00	21,96
18:15:00	22,52
18:20:00	23,16
18:25:00	23,59
18:30:00	23,76
18:35:00	23,94
18:40:00	23,98

Tabla 14. Incrementos de temperatura del agua cada 5 minutos.

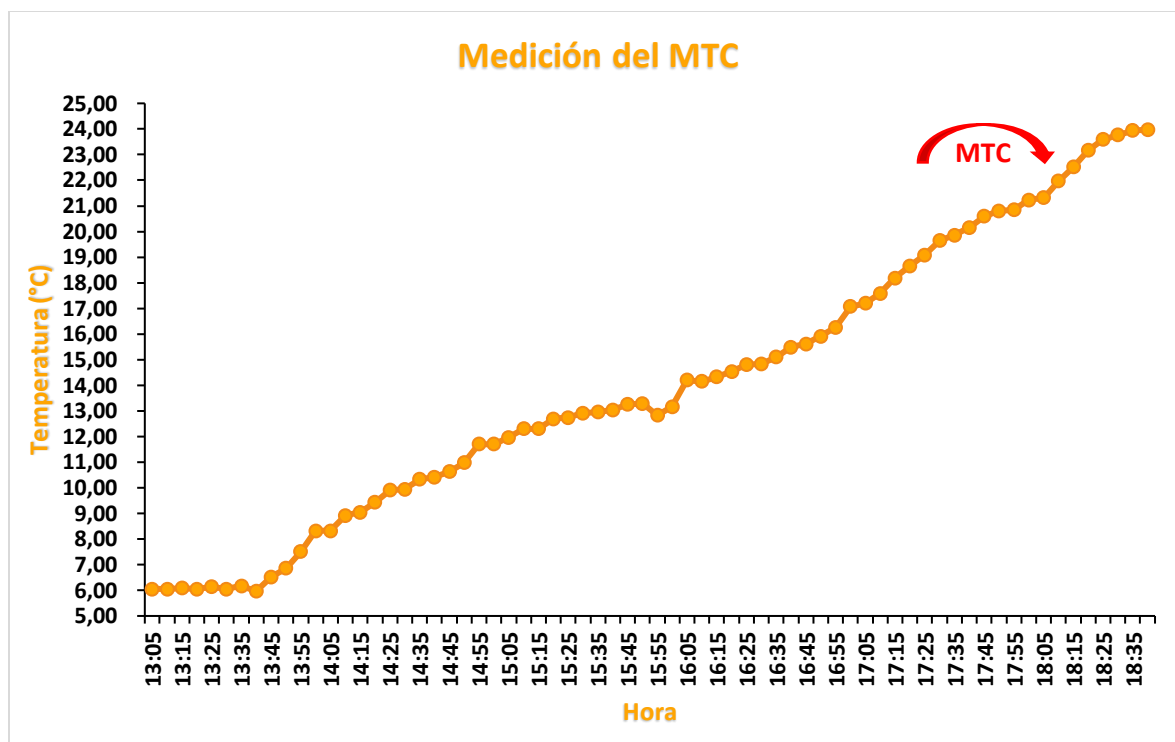


Figura 18. Medición del MTC en *Andiperla*, el mismo se alcanza a partir de los 22° C.

Muestra	°T del Agua
MTC1	20° C
MTC2	21° C
MTC3	22° C
MTC4	22° C
MTC5	22° C



Figura 19. Larvas de *Andiperla* en la cuba programable.

Tabla 15. MTC registrados en larvas de *Andiperla*.

Expresión Génica Diferencial (DEG) con EdgeR

En la Figura 20, se observa que los grupos MT1, 2, y 3 comparten un perfil de expresión génica similar, diferenciándose del tratamiento control (4° C). Con respecto a los transcritos expresados diferencialmente, se encontró que son más los genes expresados a la baja (Figura 21), siendo en total 3979 genes expresados a la baja y 2972 expresados al alza (Tabla 16).

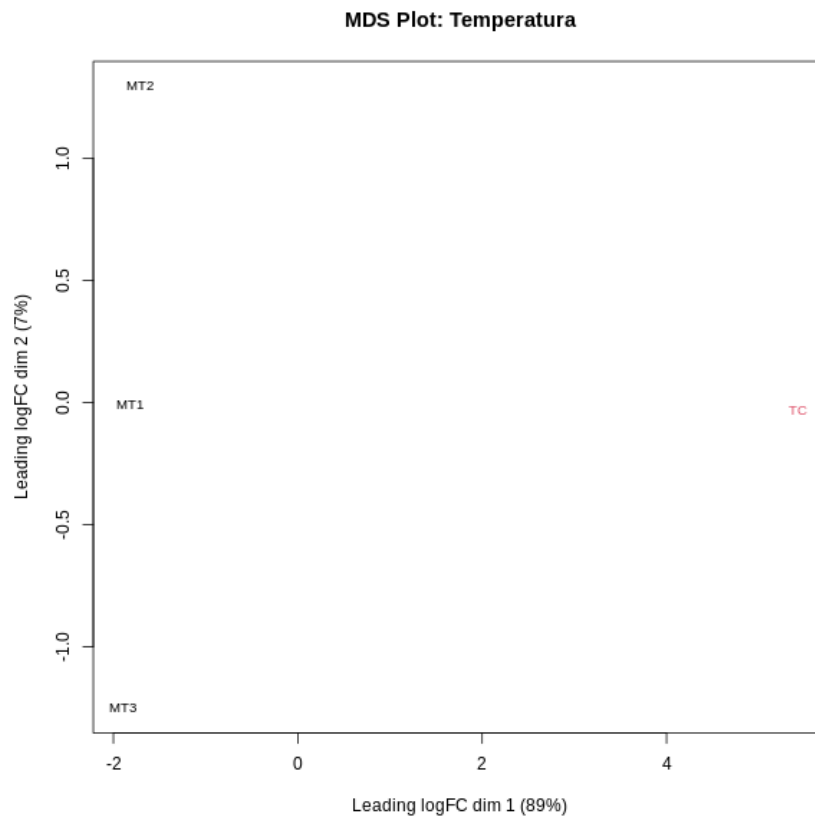


Figura 20. Gráfico de escalado multidimensional para los genes de *Andiperla* evaluados mediante RNAseq con el paquete de R EdgeR.

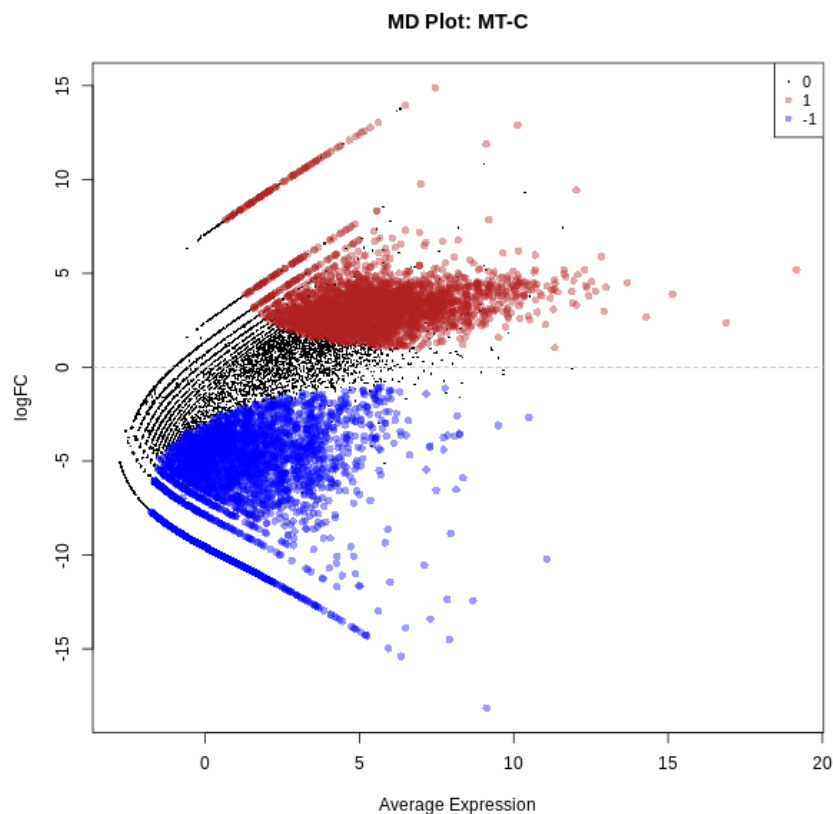


Figura 21. Genes expresados al alza (en rojo) y los genes expresados a la baja (en azul).

	Alza	Sin Cambios	Baja
MT-C	2972	9657	3979

Tabla 16. Resumen arrojado por EdgeR que indica la cantidad de genes expresados diferencialmente.

DEG de proteínas de shock térmico: *Hsp* y *Csp*

En el MTC los transcritos que se expresan al alza son: Hsp 83, Hsp 60 A, Hsp 70 cognate 5 y Hsp 68. Mientras que se expresan a la baja: Hsp 75 mitocondrial (TRAP1), Hsp 70-4L, Csp E1 (CSDE1) y Csp CG9705 (Figura 22).

En el MTC, Hsp 83, Hsp 60 A se expresan 9 veces más, Hsp 70 cognate 5 y Hsp 68 se expresan 7 y 4 veces más, respectivamente, comparado con la temperatura control ($\sim 4^{\circ}\text{C}$) de *Andiperla* (Tabla 17).

Hsp 70-4L, Hsp 75 mitochondrial, CSDE1 y Csp CG9705 se expresan 32, 13, 8 y 4 veces menos, respectivamente, en el MTC comparando con la temperatura control (Tabla 17).

#gene_id	Proteína	Tipo	logFC	PValue	FDR
TRINITY_DN12990_c1_g2	TRAP1_Hsp75_mt	Heat shock	-3,67669836	5,26E-05	0,00028892
TRINITY_DN1372_c0_g1	Hspa4l_Hsp70_4L	Heat shock	-5,03898124	5,05E-07	1,33E-05
TRINITY_DN969_c18_g2	CSDE1_CspE1	Cold shock	-3,02531683	4,67E-05	0,00026423
TRINITY_DN1054_c9_g1	Y9705_CspCG9705	Cold shock	-1,84583574	0,00017492	0,00074836
TRINITY_DN1104_c0_g1	HSP83	Heat shock	3,08067779	1,29E-06	2,18E-05
TRINITY_DN20453_c0_g1	CH60A_Hsp60A	Heat shock	3,11948528	2,15E-06	3,01E-05
TRINITY_DN1383_c0_g1	HSP7E_Hsp70_c5	Heat shock	2,7349218	2,45E-05	0,00016304
TRINITY_DN2192_c0_g6	HSP68	Heat shock	2,04540179	0,00686486	0,01482788

Tabla 17. Proteínas *heat shock* y *cold shock* expresadas diferencialmente en el MTC respecto al control.

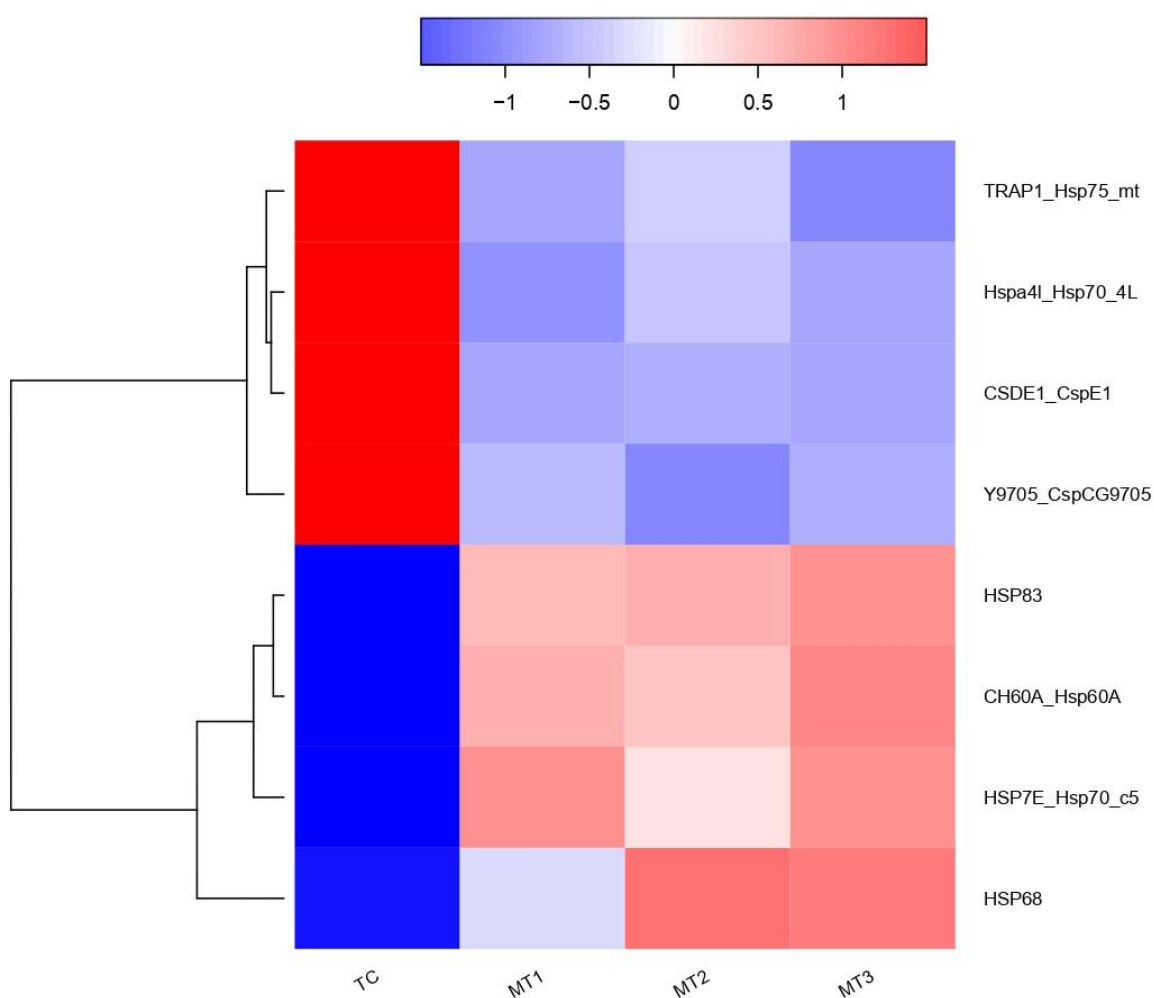


Figura 22. Heatmap en dónde se representan las proteínas *heat shock* y *cold shock* expresadas diferencialmente en el MTC.

Búsqueda y DEG de transcriptos que contengan términos GO relacionados a la Hormona Juvenil

Como vimos en las Hsp una notable respuesta al desarrollo y diferenciación celular, quisimos ver qué pasaba con la hormona juvenil (JH III) y de esta manera verificar si en *Andiperla* realmente hay señales de transición de estadios hacia la adultez.

Las hormonas juveniles (JH, del inglés *Juvenile hormone*), son hormonas sesquiterpenoides únicas que regulan el desarrollo embrionario, reprimen la metamorfosis e inducen la síntesis de vitelogenina y la producción de feromonas en la mayoría de las especies de insectos (Nijhout, 1994). Hasta la fecha, se han caracterizado completamente seis formas de JH desde un punto de vista químico y fisiológico. Las JH I y II se identificaron en lepidópteros por primera vez, y la JH III es la JH más extendida en insectos. (Bellés et al., 2005). Los JHs son moléculas lipofílicas producidas y liberadas comúnmente en la hemolinfa por la *corpora allata* (CA), que son un par de glándulas endocrinas conectadas al cerebro (Tobe & Stay, 1985).

La CA, son glándulas endocrinas situadas en las regiones posteriores de la cabeza del insecto (Gilbert et al., 2000; Tobe & Stay, 1985). La presencia o ausencia de JH en momentos precisos del ciclo vital de los insectos es esencial para su función. Los niveles de JH están regulados en última instancia por dos procesos bioquímicos: La biosíntesis de JH y la degradación de JH (Gilbert et al., 2000).

Cualquier interrupción del valor hormonal o de los mecanismos relacionados con la JH III dará lugar a un desarrollo, crecimiento y reproducción anormales de los insectos (Smagghe et al., 2012). Con la ausencia de JH III en la fase larvaria, se producirá una metamorfosis incontrolada o prematura en los insectos (Konopova & Jindra, 2007) que los incapacitará para reproducirse y morir (Cusson et al., 2013).

Mediante QuickGO se buscaron los términos GO vinculados a la JH III. Luego se realizó una búsqueda de los mismos en los transcriptos diferencialmente expresados, obteniendo como resultado la tabla 18.

ID	Termino	Categoría	Función
GO:0006718	juvenile hormone biosynthetic process	BP	Las reacciones y vías químicas que dan lugar a la formación de hormonas juveniles, los tres derivados sesquiterpenoides que funcionan para mantener el estado larvario de los insectos en el momento de la muda y que pueden ser necesarios para otros procesos, por ejemplo: la ovogénesis.
GO:0006719	juvenile hormone catabolic process	BP	Las reacciones y vías químicas que dan lugar a la descomposición de las hormonas juveniles.
GO:0006716	juvenile hormone metabolic process	BP	Las reacciones químicas y las vías que implican a las hormonas juveniles.
GO:0004453	juvenile-hormone esterase activity	MF	Una carboxilesterasa que hidroliza el enlace éster de la hormona juvenil.
GO:0016087	ecdysiotatic hormone activity	MF	Acción característica de la hormona ecdisiostática, una hormona peptídica que inhibe la secreción de ecdisona.
GO:0018445	prothoracicotrophic hormone activity	MF	Una hormona peptídica que segrega el cerebro y que, al unirse a un receptor, actúa sobre la glándula protorácica para estimular la liberación de ecdisona en los insectos.
GO:0045968	negative regulation of juvenile hormone biosynthetic process	BP	Cualquier proceso que detenga, impida o reduzca la frecuencia, el ritmo o el alcance de las reacciones y vías químicas que dan lugar a la formación de la hormona juvenil.
GO:0045969	positive regulation of juvenile hormone biosynthetic process	BP	Cualquier proceso que active o aumente la frecuencia, el ritmo o el alcance de las reacciones y vías químicas que dan lugar a la formación de la hormona juvenil.
GO:0045970	negative regulation of juvenile hormone catabolic process	BP	Cualquier proceso que detenga, impida o reduzca la frecuencia, el ritmo o el alcance de las reacciones y vías químicas que dan lugar a la degradación de la hormona juvenil.
GO:0045973	positive regulation of juvenile hormone secretion	BP	Cualquier proceso que active o aumente la frecuencia, el ritmo o el alcance de la liberación regulada de la hormona juvenil.
GO:0045971	positive regulation of juvenile hormone catabolic process	BP	Cualquier proceso que active o aumente la frecuencia, el ritmo o el alcance de las reacciones y vías químicas que dan lugar a la degradación de la hormona juvenil.
GO:0045972	negative regulation of juvenile hormone secretion	BP	Cualquier proceso que detenga, impida o reduzca la frecuencia, el ritmo o el alcance de la liberación regulada de la hormona juvenil.
GO:0045443	juvenile hormone secretion	BP	La liberación regulada de hormonas juveniles.
GO:0008096	juvenile hormone epoxide hydrolase activity	MF	Catálisis de la hidrólisis del epóxido de una hormona juvenil al diol correspondiente.
GO:0045952	regulation of juvenile hormone catabolic process	BP	Todo proceso que modula la frecuencia, el ritmo o el alcance de las reacciones y vías químicas que dan lugar a la degradación de la hormona juvenil.
GO:0005500	juvenile hormone binding	MF	Unión a una hormona juvenil.
GO:0007557	regulation of juvenile hormone biosynthetic process	BP	Cualquier proceso que modula la frecuencia, el ritmo o el alcance de las reacciones y vías químicas que dan lugar a la formación de la hormona juvenil.

Tabla 18. Términos GO encontrados para hormona juvenil. BP: biological process, MF: molecular function.

Se detectó la expresión al alza de dos enzimas degradativas de la JH III, como ser JH esterasa y JH epóxido hidrolasa I, que se expresan aproximadamente unas 18 y 14 veces más, respectivamente, en el MTC respecto a la condición normal. También se encontró una expresión al alza, aumentada 12 veces en el MTC, del neuropeptido F corto (sNPF, del inglés *short Neuropeptide F*), clave en la inhibición de la biosíntesis de la JH III (Tabla 19).

Con respecto a la expresión diferencial de enzimas que participan en la biosíntesis de la JH III, se encontró que la *Methyl farnesoate epoxidase*, participe de la última etapa de la síntesis de la JH III, se encuentra expresada a la baja unas 20 en el MTC, en cambio, farnesol

deshidrogenasa se encuentra expresada al alza unas 8 veces más en el MTC (Tabla 19; Figura 23).

#gene_id	Proteína	logFC	PValue	FDR
TRINITY_DN7295_c0_g1	Juvenile hormone esterase	4,21617889	7,51E-08	5,24E-06
TRINITY_DN1797_c0_g1	Juvenile hormone epoxide hydrolase 1	3,78526054	2,30E-07	8,54E-06
TRINITY_DN7259_c0_g1	Short neuropeptide F	3,56770602	0,00775567	0,01649247
TRINITY_DN3243_c0_g2	Farnesol dehydrogenase	2,93605816	0,00013032	0,0005959
TRINITY_DN236_c0_g4	Methyl farnesoate epoxidase	-4,35193279	1,52E-07	7,18E-06

Tabla 19. Proteínas que actúan en el metabolismo de la hormona juvenil y que se encuentran expresadas diferencialmente en el MTC respecto al control.

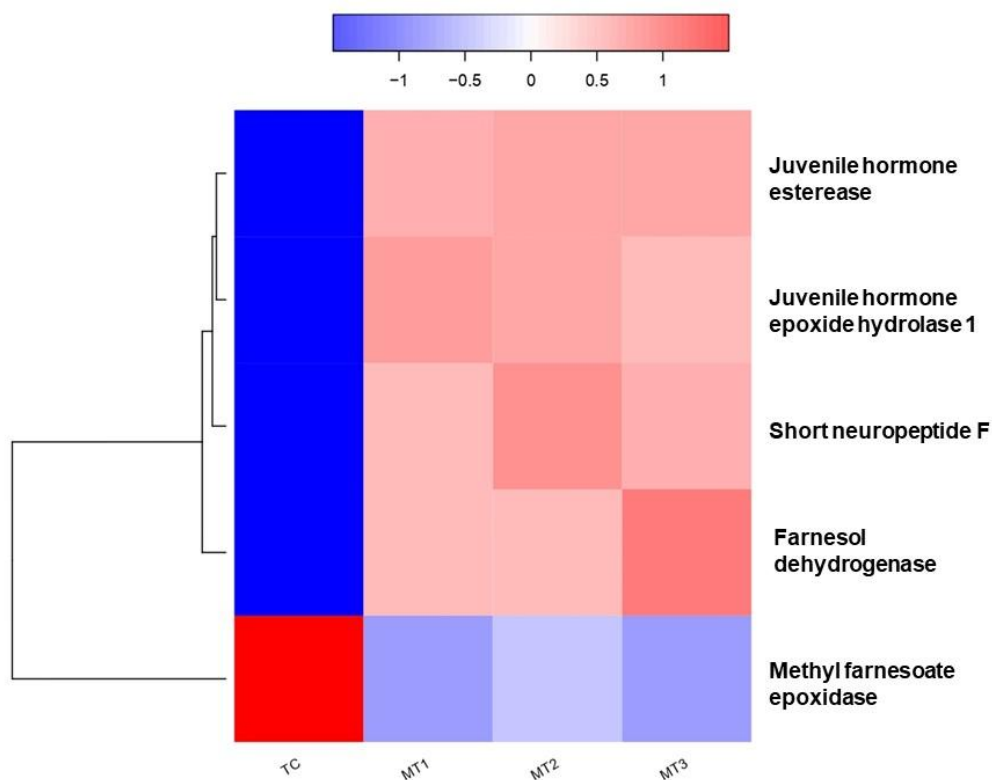


Figura 23. Heatmap en dónde se representan las proteínas que actúan en el metabolismo de la hormona juvenil y que se encuentran expresadas diferencialmente en el MTC respecto a la temperatura control.

Vía biosintética y degradativa de la JH III en insectos

La JH se sintetiza a través de la vía del mevalonato (MVAP) (Lombard & Moreira, 2011). En la CA la MVAP se ramifica en la síntesis de JH (Bellés et al., 2005). La vía biosintética de la

JH III en insectos implica 13 reacciones enzimáticas discretas y se divide convencionalmente en pasos tempranos (MVAP) y tardíos (rama JH) (Noriega, 2014). La vía biosintética de la hormona juvenil III está bien conservada en los insectos (Figura 24) (Bellés et al., 2005; Noriega, 2014).

La MVAP es una ruta metabólica ramificada basada en la polimerización reductora del acetil-CoA, que da lugar a una gran diversidad de compuestos isoprenoides. Entre los productos finales de la vía se encuentran también mensajeros hormonales, como las citoquininas y las fitoalexinas en las plantas, las hormonas esteroideas en los mamíferos (Cane, 1999) y las secreciones defensivas, las feromonas y la JH en los insectos (Seybold & Tittiger, 2003).

En la vía sintética de la JH cada producto representa el sustrato para la siguiente enzima corriente abajo. Las enzimas están conectadas por grupos de metabolitos que les son comunes; por ejemplo, Farnesol (FOL) es el producto de la actividad farnesil pirofosfatasa (FPPasa) y el sustrato de la farnesol deshidrogenasa (Figura 24) (Noriega, 2014).

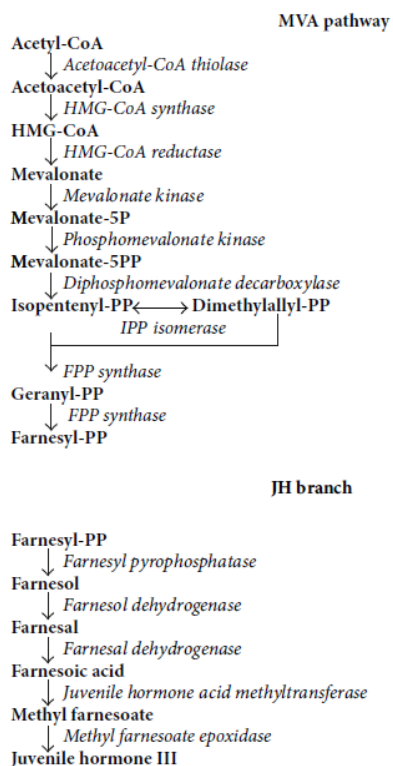


Figura 24. Vía metabólica de la hormona juvenil en insectos (Tomado de Noriega, 2014)

Los primeros pasos en la vía biosintética de la JH III de los insectos incluyen la vía del mevalonato a partir de acetil-CoA hasta farnesil pirofosfato (Farnesyl-PP), una vía conservada tanto en vertebrados como en invertebrados (Marchal et al., 2011). La farnesil pirofosfato sintasa cataliza la síntesis de farnesil pirofosfato (Castillo-Gracia & Couillaud, 1999). En los pasos

tardíos, el farnesol es sintetizado por la farnesil pirofosfatasa, (Nah et al., 2001) y luego oxidado por la farnesol deshidrogenasa para producir farnesal (Inoue et al., 1984; Mayoral et al., 2009). Posteriormente, el farnesal es oxidado muy probablemente por la farnesal deshidrogenasa para formar ácido farnesóico (Bede et al., 1998). Los dos últimos pasos de la vía biosintética del JH III dependen del orden particular del insecto. En los lepidópteros, una P450 monooxigenasa convierte el ácido farnesóico en ácido JH, que posteriormente es metilado por la O-metiltransferasa del ácido JH para formar JH III (Shinoda & Itoyama, 2003). Sin embargo, en los insectos ortópteros y dictiópteros, la reacción de metilación va precedida de una reacción de epoxidación (Marchal et al., 2011).

La desaparición de JH de la hemolinfa es esencial para iniciar la metamorfosis de los insectos (Hiruma, 2003; Riddiford, 1996). La concentración de JH en la hemolinfa está regulada no sólo por su síntesis sino por la degradación, secuestro o secreción. (Goodman & Cusson, 2011).

La degradación de JH es catalizada principalmente por una de dos enzimas: JH esterasa (JHE) o JH epóxido hidrolasa (JHEH) (Gilbert et al., 2000; Kort & Granger, 1981). La JHE se libera del cuerpo graso para actuar en la hemolinfa y otros tejidos, y se considera la vía primaria de inactivación de la JH, mientras que la actividad de la JHEH es secundaria y está ligada exclusivamente a los tejidos (Tobe & Stay, 1985).

En el último estadio larvario, las larvas se preparan para la metamorfosis pupal, que se caracteriza por el compromiso larvario-pupal de varios tejidos, como las células epidérmicas (Muramatsu et al., 2008; Riddiford, 1985, 1996). Este evento es el primer paso para la metamorfosis pupal y la eliminación de la JH en la hemolinfa es indispensable para este proceso. De hecho, el cese de la síntesis de JH por la CA es una de las contribuciones más importantes (Kaneko & Hiruma, 2014).

En *Bombyx*, *short neuropeptide F* (sNPF) inhibe la síntesis de JH. (Noriega, 2014). La sNPF sintetizada por el corpora cardíaca (CC) es uno de los factores clave para generar la supresión específica del estadio de la síntesis de JH durante el desarrollo larvario. Además, sNPF es un factor crítico para apagar la síntesis de JH en el estadio de 5º instar para asegurar el inicio de la metamorfosis pupal. (Kaneko & Hiruma, 2014).

En presencia de sNPF, los niveles de expresión de HMGR y MevK, participantes en la primera etapa de la biosíntesis de la JH, se redujeron significativamente (Kaneko & Hiruma, 2014).

Las moscas hembra y macho deficientes en sNPF muestran una mejora del sueño con un aumento duración de las sesiones de sueño. La pérdida de función de sNPF eleva el sueño. (W. Chen et al., 2013). Se ha descubierto que la sNPF regula la alimentación y aumenta el tamaño corporal (K. S. Lee et al., 2004, 2008) regula el estrés osmótico y metabólico (Kahsai, Kapan, et al., 2010), la locomoción (Kahsai, Martin, et al., 2010) y la búsqueda de alimento (Root et al., 2011). Aparte de *Drosophila*, en otros insectos, como *Schistocerca gregaria* y *Bombyx mori*, se ha informado de que la sNPF participa en la regulación del comportamiento alimentario (Dillen et al., 2013; Nagata et al., 2012).

Cómo se mencionó anteriormente, la inactivación de JH es necesaria para que se complete la metamorfosis. La degradación de la JH es llevada a cabo una enzima específica, la JH esterasa (JHE), capaz de hidrolizar la JH unida o no a la proteína portadora (Sanburg et al., 1975). Así, la JHE desempeña un papel importante en la metamorfosis, permitiendo la reprogramación del genoma larvario y del sistema genético (Rauschenbach et al., 1987). Se demostró que existe correlación en el aumento de la actividad de la JHE con la disminución de los valores de JH, y la capacidad de la JHE para eliminar la JH de los tejidos de los insectos (Hammock, 1985).

La drástica disminución del contenido de JH en las prepupas y pupas tempranas de *Drosophila hydei* (Klages, 1981) concuerda con el considerable aumento de la actividad JHE en la hemolinfa de *D. hydei* en estos estadios (Klages & Emmerich, 1979) en la hemolinfa y tejidos de *Drosophila virilis* (Rauschenbach et al., 1987).

La enzima terpénica JH epóxido hidrolasa (JHEH) regula la maduración de los insectos, la reproducción, el comportamiento, la coloración, la diapausa, entre otras (Goodman & Cusson, 2011). El título de JH está regulado no sólo por su biosíntesis, sino también por su metabolismo y posiblemente por su secuestro. La JHEH parece muy específico para las hormonas juveniles (Morisseau, 2013). La JHEH genera el correspondiente diol JH, que puede conjugarse rápidamente para su excreción y no puede reconvertirse en JH biológicamente activa. (Booth & Boyland, 1949)

La farnesol deshidrogenasa (AaSDR-1) oxida el farnesol en farnesal, un precursor de la JH en la CA. El primer estudio sobre la oxidación del farnesol se realizó utilizando homogeneizados de CA de la hembra adulta de la polilla esfinge, *Manduca sexta*, informando que el farnesol se convertía secuencialmente en farnesal y ácido farnesoico por las deshidrogenasas farnesol y farnesal (Mayoral et al., 2009). Los niveles de ARNm de AaSDR-1

aumentan durante el primer día tras la emergencia del adulto, este aumento inicial en la síntesis de JH es esencial para la maduración reproductiva de la hembra indicando que la ecdisis del adulto ha finalizado y que deben comenzar los procesos reproductivos (Klowden, 1997).

La cucaracha *Diploptera punctata* produce el citocromo P450, CYP15A1, o también *Methyl farnesoate epoxidase*. La CYP15A1 metaboliza farnesoato de metilo a JH III. (Helvig et al., 2004).

Experimentos de RT-PCR muestran que el gen CYP15A1 se expresa selectivamente en la CA de *D. punctata* en el momento de máxima producción de JH por las glándulas. CYP15A1 cataliza el último paso en la biosíntesis de JH, una reacción de epoxidación altamente estereoselectiva (Helvig et al., 2004). Se destaca la correlación de la expresión de *Methyl farnesoate epoxidase* y los niveles de JH en la hemolinfa durante el ciclo vital de la abeja sin aguijón, *Melipona scutellaris* (Cardoso-Júnior et al., 2017).

Conclusión y discusión

En este trabajo realizamos la caracterización de proteínas HSP mediante la identificación por homología de secuencia, 6 de las 11 identificadas inicialmente fueron corroboradas como homologas a HSP de especies de insectos (%ID >90). Las proteínas seleccionadas fueron: Heat shock protein 60A (Hsp 60 A), Heat shock protein 83 (Hsp 83), Heat shock protein 68 (Hsp 68), Heat shock 70 kDa protein cognate 5 (Hsp 70 cognate 5), Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial (Hsp 75 mitochondrial), Heat shock 70 kDa protein 4L (Hsp 70-4L).

Para las Csp pudimos obtener la secuencia aminoacídica completa y un alto porcentaje de identidad con insectos para: Cold shock domain-containing protein CG9705 (Csp CG9705), Cold shock domain-containing protein E1 {ECO:0000305}, (CSDE1).

Tanto para las Hsp y Csp seleccionadas, pudimos corroborar que se tratan de proteínas diferentes y que la asignación de identidad es correcta. Las Hsp tienen dominios muy conservados, pero de longitud y función variable lo que puede llevar a generar confusión en la identificación de las mismas. (Chappell et al., 1986; Clark & Worland, 2008).

Si queremos determinar la estructura intrónica y exónica correcta de los transcritos obtenidos y a su vez verificar la identidad con mayor fiabilidad, debemos realizar el mapeo con el genoma de *Andiperla*, el cual, por el momento se encuentra en proceso de ensamblaje (Baricalla, Timmermann, Jäckle y Rivera-Pomar, resultados no publicados).

Los análisis filogenéticos resultan congruentes con resultados previos de otras familias proteicas como factores de transcripción (Coletta, 2022) o canales de sodio (Ferreiros, 2023) en donde las proteínas analizadas de *Andiperla* muestran relaciones filogenéticas cercanas a termitas como *Zootermopsis nevadensis* y *Cryptotermes secundus* (Isoptera); y también a *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera). Las proteínas HSP y CSP no resultan útiles para establecer filogenia dado que existe variación evolutiva marcada debida a las duplicaciones aquí reportadas (parálogos) y muestran alta similitud de secuencia entre las diversas HSP funcionalmente disimiles (ortólogos) (S. Lindquist & Craig, 1988).

En la búsqueda de ortólogos de Hsp 68 en otros plecópteros mediante mapeo genómico, pudimos encontrar duplicaciones génicas (parálogos) en *Leuctra nigra*, *Nemoura dubitans* e *Isoperla grammatica*, con 4, 3 y 2 copias de Hsp 68, respectivamente. Detectamos que había una coincidencia entre el parecido de las duplicaciones y la cercanía en el cromosoma. Para *L. nigra* las 4 duplicaciones se encuentran en el cromosoma 5, las copias 1 y 2 son similares y

cercanas entre sí, mientras que 3 y 4 son similares y cercanas entre sí, pero diferentes a las copias 1 y 2 que están alejadas por 12 millones de pb. En el caso de *N. dubitans* las 3 duplicaciones se localizan en el cromosoma 1, en dónde las copias 2 y 3 son similares y consecutivas, pero se encuentran alejadas de la copia 1 por unos 15 millones de pb, a su vez la copia 1 es diferente a 2 y 3. Por último en *I. grammatica* las dos copias de Hsp 68 arrojaron similitud pero se encuentran en distintos cromosomas, 6 y 1. Estos resultados indican que Hsp 68 se encuentra en múltiples copias en algunos plecópteros, y algunas de estas pueden haber tenido su origen por duplicaciones en tándem, dada su similitud y cercanía (Audemard et al., 2012). Nos queda por explorar si en *Andiperla* se encuentran estas duplicaciones de Hsp 68, y analizar en mayor profundidad su estructura génica, para ello a futuro se realizará el mapeo genómico con los datos de secuenciación del genoma. Dada la función descrita para Hsp 68, esta podría jugar un rol importante en la tolerancia al calor (Palter et al., 1986) y en la transición a la fase adulta (Mason et al., 1984), pudiendo ser una proteína importante en el desarrollo de plecópteros.

Determinar el máximo térmico crítico (MTC) proporciona información sobre la sensibilidad relativa a las altas temperaturas (H. F. Dallas & Rivers-Moore, 2012) en especies que habitan los glaciares. Con respecto al MTC de *Andiperla*, se encontró que las larvas quedan inmovilizadas cuándo se alcanza una temperatura del agua de $\sim 22^{\circ}\text{C}$, concordante con lo establecido por el grupo de trabajo en numerosas repeticiones (Grimolizzi y Pessacq, no publicado). En plecópteros hay una correlación entre los hábitats con menores temperaturas acompañado de una menor tolerancia al calor o MTC (Hotaling et al., 2020). En el caso de *Andiperla*, posee un MTC más bajo que otros plecópteros Patagónicos como *Klapopteryx kuscheli* y *Notoperla magnaspina*, esto podría deberse a que *Andiperla* pasa todo su ciclo de vida en una matriz de hielo con una temperatura estable que ronda entre 0 y 4°C todo el año, mientras que *K. kuscheli* y *N. magnaspina* habitan distintos cuerpos de agua con mayores temperaturas en ciertas épocas del año (P. Pessacq, observaciones no publicadas).

Nuestros resultados de DEG indican que diversas Hsp y Csp se expresan diferencialmente en el MTC. El transcripto codificante de Hsp 83 se expresa unas 9 veces más, esta proteína tiene una importancia en la proliferación y maduración de los neuroblastos, además está implicada en la transición de fase en el desarrollo, siendo necesaria para la actividad de la Ecdisona (Gkouvitsas et al., 2009). Hsp 83 contribuye a un proceso conocido como robustez del desarrollo, el cual consiste en supresiones epigénéticas de variaciones a nivel genético que

hayan surgido por condiciones de estrés, permitiendo así la continuidad del desarrollo (Gangaraju et al., 2011; Olivieri et al., 2012).

Hsp 68, se expresa 4 veces más en el MTC y podría estar implicada en la transición a la vida adulta. En otro trabajo se demostró que su expresión aumenta en la transición a pupa (Mason et al., 1984). Esta proteína juega un rol importante en el endurecimiento térmico (Palter et al., 1986), indicando una posible respuesta de tolerancia al calor en *Andiperla*.

Otras Hsp expresadas al alza en el MTC, son las proteínas mitocondriales Hsp 60 A y Hsp 70 cognate 5, las cuáles se expresaron unas 9 y 7 veces más, respectivamente. Hsp 60 A, fue descrita como una proteína participe de la importación y translocación de proteínas a la matriz mitocondrial (Langer & Neupert, 1994), siendo importante el aumento de su expresión para mejorar el funcionamiento de la cadena respiratoria, mejorando así, la función mitocondrial (Weihong, 2024). Hsp 70 cognate 5, también permite la translocación mitocondrial y permite mantener la morfología de las mitocondrias garantizando la homeostasis celular (Banerjee & Chinthapalli, 2014). Tanto, Hsp 60 A, Hsp 70 cognate 5, Hsp 83, Hsp 68, son proteínas inducidas por el calor.

Entre las Hsp expresadas a la baja en el MTC, encontramos a Hsp 70-4L y Hsp 75 mitocondrial, las cuáles se expresan 32 y 13 veces menos, respectivamente, en comparación con el control. Hsp 70-4L está poco descrita en insectos, algunos estudios en mamíferos indican que juega un papel importante en la espermatogénesis, la osmotolerancia y también fomentaría la angiogénesis (Held et al., 2006, 2011; Urena et al., 2022). Hsp 75 mitocondrial o TRAP1, es una proteína mitocondrial que responde al estrés oxidativo previniendo la formación de ROS. La baja expresión de TRAP1 está relacionado con el deterioro mitocondrial, una mayor producción de ROS y mayor respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) (Kokott-Vuong et al., 2021; Song et al., 1995).

El mantenimiento de la morfología mitocondrial es importante para la locomoción, por lo tanto, la inmovilidad de *Andiperla* en el MTC podría deberse a varios factores, entre ellos la pérdida de la actividad mitocondrial, ocasionada por el estrés térmico, que generaría una deficiencia energética y de ATP (Zhu et al., 2013).

CSDE1 y Csp CG9705 se expresan 8 y 4 veces menos, respectivamente, en el MTC que en las muestras control. Las Csp se caracterizan por ser proteínas con una activa expresión en el frío (Giuliodori et al., 2010), lo cual, coincide con nuestros resultados, indicando que el shock térmico disminuye su expresión. Entre las funciones descritas para estas Csp, se encontró que

juegan un papel importante en mantener la estabilidad del ARNm y regular su traducción. Por ejemplo, Csp CG9705 se une a los extremos 3-UTR del ARNm permitiendo su estabilización y regulando así la traducción (J. A. Lindquist et al., 2014; Wong et al., 2005). Además, Csp CG9705 regula la formación y organización neuronal (Iyer et al., 2013). CSDE1 permite mantener el estado indiferenciado de las células *stem* embrionarias en mamíferos, cuando la expresión de la misma disminuye se produce la diferenciación neuronal y se potencia la neurogénesis (Ju Lee et al., 2017; Saltel et al., 2017)

Cómo vimos para Hsp 83 y Hsp 68, supusimos que el estrés por temperatura genera señales de avances en el desarrollo de *Andiperla*. Para obtener más sustento de ello, analizamos la expresión de transcritos relacionados con la biosíntesis y la degradación de la hormona juvenil (JH III). La JH III es una hormona que permite mantener a las larvas de insectos en su estado juvenil, evitando así la metamorfosis, desarrollo pupal y avance a la adultez (Nijhout, 1994).

Encontramos que proteínas como JH esterasa (JHE) y JH epóxido hidrolasa I (JHEH) se expresan unas 18 y 14 veces más en el MTC, respectivamente. Ambas proteínas juegan un papel importante en la degradación de la JH III y se demostró en otros trabajos que hay una correlación entre el aumento de las mismas y la disminución de la producción de JH III (Hammock & Roe, 1985; Klages, 1981; Klages & Emmerich, 1979; Morisseau, 2013). También observamos que el neuropéptido corto F (sNPF) se expresa unas 12 veces más en el MTC, este péptido inhibe la síntesis de la JH III, siendo su rol protagónico en las primeras etapas de la biosíntesis de la JH III o ruta del melanovato (Kaneko & Hiruma, 2014).

Con respecto a las enzimas partícipes en la biosíntesis de la JH III, encontramos que la *methyl farnesoato epoxidasa* (MFE) se expresa unas 2 veces menos en el MTC. Esta enzima forma parte del último paso de la formación de la JH III, metabolizando farnesoato de metilo a JH III (Helvig et al., 2004), otros trabajos demostraron la correlación entre los niveles de la MFE y la JH III (Cardoso-Júnior et al., 2017). También detectamos una subida en la expresión de Farnesol deshidrogenasa en el MTC, aumentando su expresión unas 8 veces. Esta enzima oxida el farnesol a farnesal, un precursor de la JH III (Mayoral et al., 2009).

Basándonos en nuestros resultados, *Andiperla* recibe señales de avance en su desarrollo aumentando el metabolismo degradativo (JHE, JHEH y sNPF) de la JH III y disminuyendo su biosíntesis (MFE), esto puede deberse a las condiciones de estrés por calor que funcionarían como un disparador de supervivencia, priorizando la madurez para cumplir con su ciclo vital. Si

bien, la expresión de farnesol deshidrogenasa aumenta, esta enzima no es específica de la biosíntesis de la JH (Klowden, 1997), a su vez, la acumulación de farnesol puede resultar tóxica para las células (Voziyan et al., 1995; Wiseman et al., 2007), por lo que su oxidación sería importante para el mantenimiento de la homeostasis celular (Klowden, 1997).

Para darle mayor sustento a nuestros resultados, proponemos repetir los ensayos de MTC y mediante el método de cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector fluorescente (HPLC-FD, del inglés *high performance liquid chromatography coupled to a fluorescent detector*) medir los niveles proteicos de la JH, sus precursores y enzimas del metabolismo de la JH (Rivera-Perez et al., 2012, 2014) en hemolinfa y *corpora allata* diseccionada de larvas de *Andiperla* a temperatura normal (~ 4 °C) y en el MTC (~ 22 °C).

Las proteínas de shock térmico pueden representar indicadores de estrés por altas temperaturas y sugerir cambios fisiológicos, como ser el desarrollo y la diferenciación celular. La conservación de la biodiversidad presente en los glaciares va a depender de los cambios en las redes tróficas y de cómo los organismos responden a las altas temperaturas.

Nuestros resultados abren un amplio campo de preguntas y curiosidades acerca de la biología de *Andiperla* y cómo estos insectos responden al estrés térmico. La particularidad de este plecóptero es que pasa todo su ciclo de vida hasta llegar al estadio adulto en agua helada, resultando interesante conocer cómo puede verse afectado con el cambio climático y el consecuente retroceso de los glaciares, cuáles son los mecanismos moleculares implicados, y su vez, que diferencias tiene con otros insectos, en especial plecópteros, de climas templados y cálidos.

Perspectivas futuras

Determinar los niveles de la JH y sus precursores en condiciones normales y en el máximo térmico crítico, y explorar los efectos fisiológicos a temperaturas inferiores al MTC.

Bibliografía

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., ... Craig Venter, J. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. In *Science* (Vol. 287, Issue 5461). <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>
- Afgan, E., Nekrutenko, A., Grünig, B. A., Blankenberg, D., Goecks, J., Schatz, M. C., Ostrovsky, A. E., Mahmoud, A., Lonie, A. J., Syme, A., Fouilloux, A., Bretaudeau, A., Kumar, A., Eschenlauer, A. C., Desanto, A. D., Guerler, A., Serrano-Solano, B., Batut, B., Grünig, B. A., ... Briggs, P. J. (2022a). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Research*, 50(W1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkac247>
- Afgan, E., Nekrutenko, A., Grünig, B. A., Blankenberg, D., Goecks, J., Schatz, M. C., Ostrovsky, A. E., Mahmoud, A., Lonie, A. J., Syme, A., Fouilloux, A., Bretaudeau, A., Kumar, A., Eschenlauer, A. C., Desanto, A. D., Guerler, A., Serrano-Solano, B., Batut, B., Grünig, B. A., ... Briggs, P. J. (2022b). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Research*, 50(W1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkac247>
- Albariño, R. J. (2001). The food habits and mouthpart morphology of a South Andes population of *Klapopteryx kuscheli* (Plecoptera: Austroperlidae). *Aquatic Insects*, 23(3). <https://doi.org/10.1076/aqin.23.3.171.4894>
- Albarino, R. J., & Balseiro, E. G. (1998). Larval size and leaf conditioning in the breakdown of *Nothofagus pumilio* leaves by *Klapopteryx kuscheli* (Insecta, Plecoptera) in a South Andean stream. *International Review of Hydrobiology*, 83(5–6). <https://doi.org/10.1002/iroh.19980830507>
- Albariño, R. J., & Villanueva, V. D. (2006). Feeding ecology of two plecopterans in low order Andean-Patagonian streams. *International Review of Hydrobiology*, 91(2). <https://doi.org/10.1002/iroh.200510823>
- Andrews, S. (2010). FastQC - A quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. *Babraham Bioinformatics*.
- Anesio, A. M., Hodson, A. J., Fritz, A., Psenner, R., & Sattler, B. (2009). High microbial activity on glaciers: Importance to the global carbon cycle. *Global Change Biology*, 15(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01758.x>
- Anesio, A. M., & Laybourn-Parry, J. (2012). Glaciers and ice sheets as a biome. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 27, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.09.012>
- Angell, C. A. (1982). Supercooled Water. In *Water and Aqueous Solutions at Subzero Temperatures*. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6952-4_1
- Angilletta, M. J. (2009). Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis. In *Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis*. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198570875.001.1>

- Arrighi, J. M., Lencer, E. S., Jukar, A., Park, D., Phillips, P. C., & Kaplan, R. H. (2013). Daily temperature fluctuations unpredictably influence developmental rate and morphology at a critical early larval stage in a frog. *BMC Ecology*, 13. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-13-18>
- Arrigo, A. P., Fakan, S., & Tissières, A. (1980). Localization of the heat shock-induced proteins in *Drosophila melanogaster* tissue culture cells. *Developmental Biology*, 78(1). [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(80\)90320-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(80)90320-6)
- Ashburner, M., & Bonner, J. J. (1979). The induction of gene activity in drosophila by heat shock. In *Cell* (Vol. 17, Issue 2). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90150-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90150-8)
- Audemard, E., Schiex, T., & Faraut, T. (2012). Detecting long tandem duplications in genomic sequences. *BMC Bioinformatics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-83>
- Bai, Y., Caussinus, E., Leo, S., Bosshardt, F., Myachina, F., Rot, G., Robinson, M. D., & Lehner, C. F. (2021). A cis-regulatory element promoting increased transcription at low temperature in cultured ectothermic *Drosophila* cells. *BMC Genomics*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08057-4>
- Bale, J. S., Gerday, C., Parker, A., Marahiel, M. A., Shanks, I. A., Davies, P. L., & Warren, G. (2002a). Insects and low temperatures: From molecular biology to distributions and abundance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357(1423). <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1074>
- Bale, J. S., Gerday, C., Parker, A., Marahiel, M. A., Shanks, I. A., Davies, P. L., & Warren, G. (2002b). Insects and low temperatures: From molecular biology to distributions and abundance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357(1423). <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1074>
- Banerjee, S., & Chinthapalli, B. (2014a). A proteomic screen with *Drosophila* Opa1-like identifies Hsc70-5/Mortalin as a regulator of mitochondrial morphology and cellular homeostasis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 54. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.05.041>
- Banerjee, S., & Chinthapalli, B. (2014b). A proteomic screen with *Drosophila* Opa1-like identifies Hsc70-5/Mortalin as a regulator of mitochondrial morphology and cellular homeostasis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 54. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.05.041>
- Batut, B., Hiltemann, S., Bagnacani, A., Baker, D., Bhardwaj, V., Blank, C., Bretaudeau, A., Brillet-Guéguen, L., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Doppelt-Azeroual, O., Erxleben, A., Freeberg, M. A., Gladman, S., Hoogstrate, Y., Hotz, H. R., Houwaart, T., Jagtap, P., ... Grüning, B. (2018). Community-Driven Data Analysis Training for Biology. *Cell Systems*, 6(6). <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.05.012>
- Batut, B., Hiltemann, S., Bagnacani, A., Baker, D., Bhardwaj, V., Blank, C., Bretaudeau, A., Brillet-Guéguen, L., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Doppelt-Azeroual, O., Erxleben, A., Freeberg, M. A., Gladman, S., Hoogstrate, Y., Hotz, H. R., Houwaart, T., Jagtap, P., ... Grüning, B. (2022). Visualization of RNA-Seq results with Volcano Plot in R. *Cell Systems*, 6(6).

- Bede, J. C., Goodman, W. G., & Tobe, S. S. (1998). Insect juvenile hormone III in the sedge, *Cyperus iria* L.: Distribution and possible biological significance. *Pure Appl Chem*, 70.
- Behura, S. K. (2015). Insect phylogenomics. In *Insect Molecular Biology* (Vol. 24, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/imb.12174>
- Bellés, X., Martín, D., & Piulachs, M. D. (2005a). The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 50, pp. 181–199). <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130356>
- Bellés, X., Martín, D., & Piulachs, M. D. (2005b). The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 50, pp. 181–199). <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130356>
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B: Statistical Methodology*, 57(1). <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Bettencourt, B. R., Hogan, C. C., Nimali, M., & Drohan, B. W. (2008). Inducible and constitutive heat shock gene expression responds to modification of Hsp70 copy number in *Drosophila melanogaster* but does not compensate for loss of thermotolerance in Hsp70 null flies. *BMC Biology*, 6. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-5>
- Block, W. (1990). Cold tolerance of insects and other arthropods. *Philosophical Transactions - Royal Society of London, B*, 326(1237), 613–633. <https://doi.org/10.1098/rstb.1990.0035>
- BOOTH, J., & BOYLAND, E. (1949). Metabolism of polycyclic compounds; formation of 1:2-dihydroxy-1|2-dihydronaphthalenes. *The Biochemical Journal*, 44(3). <https://doi.org/10.1042/bj0440361>
- Brittain, J. E. (1991). Effect of temperature on egg development in the Australian stonefly genus, *Austrocercella lilies* (Plecoptera: Notonemouridae). *Marine and Freshwater Research*, 42(2). <https://doi.org/10.1071/MF9910107>
- Bryant, D. M., Johnson, K., DiTommaso, T., Tickle, T., Couger, M. B., Payzin-Dogru, D., Lee, T. J., Leigh, N. D., Kuo, T. H., Davis, F. G., Bateman, J., Bryant, S., Guzikowski, A. R., Tsai, S. L., Coyne, S., Ye, W. W., Freeman, R. M., Peshkin, L., Tabin, C. J., ... Whited, J. L. (2017). A Tissue-Mapped Axolotl De Novo Transcriptome Enables Identification of Limb Regeneration Factors. *Cell Reports*, 18(3), 762–776. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.063>
- Buckley, B. A., Place, S. P., & Hofmann, G. E. (2004). Regulation of heat shock genes in isolated hepatocytes from an Antarctic fish, *Trematomus bernacchii*. *Journal of Experimental Biology*, 207(21). <https://doi.org/10.1242/jeb.01219>
- Butler, M. G. (1982). A 7-year life cycle for two Chironomus species in arctic Alaskan tundra ponds (Diptera: Chironomidae). *Canadian Journal of Zoology*, 60(1). <https://doi.org/10.1139/z82-008>
- Cameron, K. A., Hodson, A. J., & Osborn, A. M. (2012). Structure and diversity of bacterial, eukaryotic and archaeal communities in glacial cryoconite holes from the Arctic and the

- Antarctic. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(2). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01277.x>
- Campbell, I. C. (1986). Life histories of some australian siphonurid and oligoneuriid mayflies (Insecta: Ephemeroptera). *Marine and Freshwater Research*, 37(2). <https://doi.org/10.1071/MF9860261>
- Cane, D. E. (1999). Isoprenoid Biosynthesis: Overview. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-091283-7.00034-5>
- Cannon, J. T., & Kocot, K. M. (2016). Phylogenomics using transcriptome data. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1452). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3774-5_4
- Cardoso-Júnior, C. A. M., Silva, R. P., Borges, N. A., de Carvalho, W. J., Walter, S. L., Simões, Z. L. P., Bitondi, M. M. G., Ueira Vieira, C., Bonetti, A. M., & Hartfelder, K. (2017). Methyl farnesoate epoxidase (mfe) gene expression and juvenile hormone titers in the life cycle of a highly eusocial stingless bee, *Melipona scutellaris*. *Journal of Insect Physiology*, 101. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.08.001>
- Castillo-Gracia, M., & Couillaud, F. (1999). Molecular cloning and tissue expression of an insect farnesyl diphosphate synthase. *European Journal of Biochemistry*, 262(2). <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00385.x>
- Cauvy-Fraunié, S., & Dangles, O. (2019). A global synthesis of biodiversity responses to glacier retreat. *Nature Ecology and Evolution*, 3(12), 1675–1685. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1042-8>
- Chappell, T. G., Welch, W. J., Schlossman, D. M., Palter, K. B., Schlesinger, M. J., & Rothman, J. E. (1986). Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins. *Cell*, 45(1). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90532-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90532-5)
- Chen, B., Kayukawa, T., Monteiro, A., & Ishikawa, Y. (2005a). The expression of the HSP90 gene in response to winter and summer diapauses and thermal-stress in the onion maggot, *Delia antiqua*. *Insect Molecular Biology*, 14(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2005.00602.x>
- Chen, B., Kayukawa, T., Monteiro, A., & Ishikawa, Y. (2005b). The expression of the HSP90 gene in response to winter and summer diapauses and thermal-stress in the onion maggot, *Delia antiqua*. *Insect Molecular Biology*, 14(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2005.00602.x>
- Chen, W., Shi, W., Li, L., Zheng, Z., Li, T., Bai, W., & Zhao, Z. (2013). Regulation of sleep by the short neuropeptide F (sNPF) in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(9), 809–819. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.06.003>
- Chen, X., Wang, Y., Zhu, H., Hao, H., Zhao, X., Qin, T., & Wang, D. (2015). Comparative transcript profiling of gene expression of fresh and frozen-thawed bull sperm. *Theriogenology*, 83(4). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.015>
- Chen, Y. H., Zhao, L., Pang, L. R., Li, X. Y., Weng, S. P., & He, J. G. (2012). Identification and characterization of Inositol-requiring enzyme-1 and X-box binding protein 1, two proteins

- involved in the unfolded protein response of *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 38(1). <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.04.005>
- Cheng, M. Y., Hartl, F. U., & Norwich, A. L. (1990). The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly. *Nature*, 348(6300). <https://doi.org/10.1038/348455a0>
- Chomczynski, P., & Mackey, K. (1995). Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources - PubMed. *Biotechniques*, 19(6).
- Chown, S. L., Hoffmann, A. A., Kristensen, T. N., Angilletta, M. J., Stenseth, N. C., & Pertoldi, C. (2010). Adapting to climate change: A perspective from evolutionary physiology. *Climate Research*, 43(1–2). <https://doi.org/10.3354/cr00879>
- Chown, S. L., & Nicolson, S. (2008). Insect Physiological Ecology. In *Insect Physiological Ecology*. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198515494.001.0001>
- Chown, S. L., & Terblanche, J. S. (2006). Physiological Diversity in Insects: Ecological and Evolutionary Contexts. In *Advances in Insect Physiology* (Vol. 33). [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(06\)33002-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(06)33002-0)
- Clague, J. J., Barendregt, R. W., Menounos, B., Roberts, N. J., Rabassa, J., Martinez, O., Ercolano, B., Corbella, H., & Hemming, S. R. (2020). Pliocene and Early Pleistocene glaciation and landscape evolution on the Patagonian Steppe, Santa Cruz province, Argentina. *Quaternary Science Reviews*, 227. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2019.105992>
- Clark, M. S., Fraser, K. P. P., & Peck, L. S. (2008). Antarctic marine molluscs do have an HSP70 heat shock response. *Cell Stress and Chaperones*, 13(1). <https://doi.org/10.1007/s12192-008-0014-8>
- Clark, M. S., & Worland, M. R. (2008a). How insects survive the cold: Molecular mechanisms - A review. In *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* (Vol. 178, Issue 8, pp. 917–933). <https://doi.org/10.1007/s00360-008-0286-4>
- Clark, M. S., & Worland, M. R. (2008b). How insects survive the cold: Molecular mechanisms - A review. In *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* (Vol. 178, Issue 8, pp. 917–933). <https://doi.org/10.1007/s00360-008-0286-4>
- Cohet, Y., Voudibio, J., & David, J. R. (1980). Thermal tolerance and geographic distribution: A comparison of cosmopolitan and tropical endemic *Drosophila* species. *Journal of Thermal Biology*, 5(2). [https://doi.org/10.1016/0306-4565\(80\)90002-9](https://doi.org/10.1016/0306-4565(80)90002-9)
- Colinet, H., Lee, S. F., & Hoffmann, A. (2010). Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. *FEBS Journal*, 277(1), 174–185. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07470.x>
- Convey, P. (1996). Overwintering strategies of terrestrial invertebrates in Antarctica - The significance of flexibility in extremely seasonal environments. In *European Journal of Entomology* (Vol. 93, Issue 3).

- Convey, P., & Block, W. (1996). Antarctic diptera: Ecology, physiology and distribution. In *European Journal of Entomology* (Vol. 93, Issue 1).
- Cook, J., Edwards, A., Takeuchi, N., & Irvine-Fynn, T. (2016). Cryoconite: The dark biological secret of the cryosphere. *Progress in Physical Geography*, 40(1).
<https://doi.org/10.1177/0309133315616574>
- Costa, A. C., Loh, S. H., & Martins, L. M. (2013). Drosophila Trap1 protects against mitochondrial dysfunction in a PINK1/parkin model of Parkinson's disease. *Cell Death & Disease*, 4. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.205>
- Coulson, S. J., & Midgley, N. G. (2012). The role of glacier mice in the invertebrate colonisation of glacial surfaces: The moss balls of the Falljökull, Iceland. *Polar Biology*, 35(11).
<https://doi.org/10.1007/s00300-012-1205-4>
- Craig, E. A., Ingolia, T. D., & Manseau, L. J. (1983). Expression of Drosophila heat-shock cognate genes during heat shock and development. *Developmental Biology*, 99(2).
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90291-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90291-9)
- Cranston, P. S., & Gullan, P. J. (2009). Phylogeny of Insects. In *Encyclopedia of Insects*.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00208-3>
- Cusson, M., Sen, S. E., & Shinoda, T. (2013). Juvenile hormone biosynthetic enzymes as targets for insecticide discovery. In *Advanced Technologies for Managing Insect Pests*.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-4497-4_3
- Czajka, M. C., & Lee, R. E. (1990). A rapid cold-hardening response protecting against cold shock injury in Drosophila melanogaster. *Journal of Experimental Biology*, 148.
<https://doi.org/10.1242/jeb.148.1.245>
- Dallas, H. (2008). Water temperature and riverine ecosystems: An overview of knowledge and approaches for assessing biotic responses, with special reference to South Africa. In *Water SA* (Vol. 34, Issue 3). <https://doi.org/10.4314/wsa.v34i3.180634>
- Dallas, H. F., & Ketley, Z. A. (2011). Upper thermal limits of aquatic macroinvertebrates: Comparing critical thermal maxima with 96-LT50 values. *Journal of Thermal Biology*, 36(6).
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2011.06.001>
- Dallas, H. F., & Rivers-Moore, N. A. (2012). Critical Thermal Maxima of aquatic macroinvertebrates: Towards identifying bioindicators of thermal alteration. *Hydrobiologia*, 679(1), 61–76. <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0856-4>
- Dastyh, H. (2004). *Hypsihius thaleri* sp. nov., a new species of a glacier-dwelling tardigrade from the Himalayas, Nepal (Tardigrada). *Mitt. Hamb. Zool. Mus. Inst.*, November.
- Davis, R. C. (1981). Structure and Function of Two Antarctic Terrestrial Moss Communities. *Ecological Monographs*, 51(2). <https://doi.org/10.2307/2937260>
- De Figueroa, J. M. T., Vera, A., & López-Rodríguez, M. J. (2006). Adult and nymphal feeding in the stonefly species *Antarctoperla michaelsoni* and *Limnoperla jaffueli* from Central Chile (Plecoptera: Gripopterygidae). In *Entomologia Generalis* (Vol. 29, Issue 1).
<https://doi.org/10.1127/entom.gen/29/2006/39>

- De Smet, W. H., & Van Rompu, E. A. (1994). Rotifera and Tardigrada from some cryoconite holes on a Spitsbergen (Svalbard) glacier. *BELG.J.ZOOL.*, 124(1).
- Denlinger, D. L., & Lee Jr., R. E. (1998). Physiology of Cold Sensitivity. *Temperature Sensitivity in Insects. Application for Integrated Pest Management*.
- Denlinger, D. L., & Yocum, G. D. (2020). Physiology of Heat Sensitivity. In *Temperature Sensitivity in Insects and Application in Integrated Pest Management*.
<https://doi.org/10.1201/9780429308581-2>
- Diamond, S. E., & Yilmaz, A. R. (2018). The role of tolerance variation in vulnerability forecasting of insects. In *Current Opinion in Insect Science* (Vol. 29, pp. 85–92). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.07.009>
- Dillen, S., Zels, S., Verlinden, H., Spit, J., van Wielendaele, P., & Vanden Broeck, J. (2013). Functional Characterization of the Short Neuropeptide F Receptor in the Desert Locust, *Schistocerca gregaria*. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053604>
- Dormoy-Raclet, V., Markovits, J., Jacquemin-Sablon, A., & Jacquemin-Sablon, H. (2005). Regulation of Unr expression by 5'- and 3'-untranslated regions of its mRNA through modulation of stability and IRES mediated translation. *RNA Biology*, 2(3).
<https://doi.org/10.4161/rna.2.3.2203>
- Doucet, D., Walker, V. K., & Qin, W. (2009). The bugs that came in from the cold: Molecular adaptations to low temperatures in insects. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 66, Issue 8). <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8320-6>
- Duman, J. G. (2001). Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 63). <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.327>
- Ebner, J. N., Ritz, D., & von Fumetti, S. (2019). Comparative proteomics of stenotopic caddisfly *Crunoecia irrorata* identifies acclimation strategies to warming. *Molecular Ecology*, 28(19).
<https://doi.org/10.1111/mec.15225>
- Edwards, A., Anesio, A. M., Rassner, S. M., Sattler, B., Hubbard, B., Perkins, W. T., Young, M., & Griffith, G. W. (2011). Possible interactions between bacterial diversity, microbial activity and supraglacial hydrology of cryoconite holes in Svalbard. *ISME Journal*, 5(1).
<https://doi.org/10.1038/ismej.2010.100>
- Elatmani, H., Dormoy-Raclet, V., Dubus, P., Dautry, F., Chazaud, C., & Jacquemin-Sablon, H. (2011). The RNA-binding protein Unr prevents mouse embryonic stem cells differentiation toward the primitive endoderm lineage. *Stem Cells*, 29(10).
<https://doi.org/10.1002/stem.712>
- ELLIOTT, J. M. (1987). Temperature-induced changes in the life cycle of *Leuctra nigra* (Plecoptera: Leuctridae) from a Lake District stream. *Freshwater Biology*, 18(1).
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1987.tb01305.x>
- Elnitsky, M. A., Benoit, J. B., Denlinger, D. L., & Lee, R. E. (2008). Desiccation tolerance and drought acclimation in the Antarctic collembolan *Cryptopygus antarcticus*. *Journal of Insect Physiology*, 54(10–11). <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.08.004>

- Elnitsky, M. A., Hayward, S. A. L., Rinehart, J. P., Denlinger, D. L., & Lee, R. E. (2008). Cryoprotective dehydration and the resistance to inoculative freezing in the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. *Journal of Experimental Biology*, 211(4). <https://doi.org/10.1242/jeb.011874>
- Epele, L. B., & Miserendino, M. L. (2011). Life cycle, production and habitat selection of *Notoperla fasciata* and *N. magnaspina* (Plecoptera: Gripopterygidae) in a headwater Patagonian stream. *Fundamental and Applied Limnology*, 178(3). <https://doi.org/10.1127/1863-9135/2011/0178-0219>
- Ernst, M. R., Beiting, T. L., & Stewart, K. W. (1984). Critical Thermal Maxima of Nymphs of Three Plecoptera Species from an Ozark Foothill Stream. *Freshwater Invertebrate Biology*, 3(2). <https://doi.org/10.2307/1467096>
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Fang, S. M., Zhang, Q., Zhang, Y. L., Zhang, G. Z., Zhang, Z., & Yu, Q. Y. (2021). Heat shock protein 70 family in response to multiple abiotic stresses in the silkworm. *Insects*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/insects12100928>
- Fauver, J. R., Akter, S., Morales, A. I. O., Black, W. C., Rodriguez, A. D., Stenglein, M. D., Ebel, G. D., & Weger-Lucarelli, J. (2019). A reverse-transcription/RNase H based protocol for depletion of mosquito ribosomal RNA facilitates viral intrahost evolution analysis, transcriptomics and pathogen discovery. *Virology*, 528. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.12.020>
- Feder, M. E. (2010). Ecological and evolutionary physiology of stress proteins and the stress response: the *Drosophila melanogaster* model . In *Animals and Temperature*. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511721854.005>
- Feder, M. E., & Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 61). <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.243>
- Felts, S. J., Owen, B. A. L., Nguyen, P. M., Trepel, J., Donner, D. B., & Toft, D. O. (2000). The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *Journal of Biological Chemistry*, 275(5). <https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3305>
- Fjellberg, A. (2010). Cryophilic isotomidae (Collembola) of the northwestern rocky mountains, U.S.A. *Zootaxa*, 2513. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2513.1.2>
- Footitt, R. G., & Adler, P. H. (2009). Insect Biodiversity: Science and Society. In *Insect Biodiversity: Science and Society*. <https://doi.org/10.1002/9781444308211>
- Fountain, A. G., & Walder, J. S. (1998). Water flow through temperate glaciers. *Reviews of Geophysics*, 36(3), 299–328. <https://doi.org/10.1029/97RG03579>
- GAJDA, R. T. (1958). CRYOCONITE PHENOMENA ON THE GREENLAND ICE CAP IN THE THULE AREA. *Canadian Geographer / Le Géographe Canadien*, 3(12). <https://doi.org/10.1111/j.1541-0064.1958.tb01802.x>

- Gangaraju, V. K., Yin, H., Weiner, M. M., Wang, J., Huang, X. A., & Lin, H. (2011). Drosophila Piwi functions in Hsp90-mediated suppression of phenotypic variation. *Nature Genetics*, 43(2). <https://doi.org/10.1038/ng.743>
- Gehring, W. J., & Wehner, R. (1995). Heat shock protein synthesis and thermotolerance in *Cataglyphis*, an ant from the Sahara desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2994>
- Gerstein, M. B., Rozowsky, J., Yan, K. K., Wang, D., Cheng, C., Brown, J. B., Davis, C. A., Hillier, L., Sisu, C., Li, J. J., Pei, B., Harmanci, A. O., Duff, M. O., Djebali, S., Alexander, R. P., Alver, B. H., Auerbach, R., Bell, K., Bickel, P. J., ... Waterston, R. (2014). Comparative analysis of the transcriptome across distant species. *Nature*, 512(7515). <https://doi.org/10.1038/nature13424>
- Giersch, J. J., Hotaling, S., Kovach, R. P., Jones, L. A., & Muhlfeld, C. C. (2017). Climate-induced glacier and snow loss imperils alpine stream insects. *Global Change Biology*, 23(7). <https://doi.org/10.1111/gcb.13565>
- Gilbert, L. I., A. Granger, N., & Roe, R. M. (2000). The juvenile hormones: Historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(8–9). [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00034-5)
- Giuliodori, A. M., Di Pietro, F., Marzi, S., Masquida, B., Wagner, R., Romby, P., Gualerzi, C. O., & Pon, C. L. (2010a). The cspA mRNA Is a Thermosensor that Modulates Translation of the Cold-Shock Protein CspA. *Molecular Cell*, 37(1), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.11.033>
- Giuliodori, A. M., Di Pietro, F., Marzi, S., Masquida, B., Wagner, R., Romby, P., Gualerzi, C. O., & Pon, C. L. (2010b). The cspA mRNA Is a Thermosensor that Modulates Translation of the Cold-Shock Protein CspA. *Molecular Cell*, 37(1), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.11.033>
- Gkouvitsas, T., Kontogiannatos, D., & Kourti, A. (2009a). Expression of the Hsp83 gene in response to diapause and thermal stress in the moth *Sesamia nonagrioides*. *Insect Molecular Biology*, 18(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00922.x>
- Gkouvitsas, T., Kontogiannatos, D., & Kourti, A. (2009b). Expression of the Hsp83 gene in response to diapause and thermal stress in the moth *Sesamia nonagrioides*. *Insect Molecular Biology*, 18(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00922.x>
- Goodman, W. G., & Cusson, M. (2011). The Juvenile Hormones. In *Insect Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384749-2.10008-1>
- Goto, S. G., & Kimura, M. T. (1998a). Heat- and cold-shock responses and temperature adaptations in subtropical and temperate species of *Drosophila*. *Journal of Insect Physiology*, 44(12). [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(98\)00101-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00101-2)
- Goto, S. G., & Kimura, M. T. (1998b). Heat- and cold-shock responses and temperature adaptations in subtropical and temperate species of *Drosophila*. *Journal of Insect Physiology*, 44(12). [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(98\)00101-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00101-2)

- Goto, S. G., Yoshida, K. M., & Kimura, M. T. (1998). Accumulation of Hsp70 mrna under environmental stresses in diapausing and nondiapausing adults of *Drosophila triauraria*. *Journal of Insect Physiology*, 44(10). [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(97\)00143-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(97)00143-1)
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., ... Regev, A. (2011a). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., ... Regev, A. (2011b). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Hackett, R. W., & Lis, J. T. (1983). Localization of the hsp83 transcript within a 3292 nucleotide sequence from the 63b heat shock locus of *D. melanogaster*. *Nucleic Acids Research*, 11(20). <https://doi.org/10.1093/nar/11.20.7011>
- Hall, M. H. P., & Fagre, D. B. (2003). Modeled climate-induced glacier change in Glacier National Park, 1850-2100. *BioScience*, 53(2). [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0131:MCIGCI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0131:MCIGCI]2.0.CO;2)
- Hammock, B. D., & Roe, R. M. (1985). [32] Analysis of juvenile hormone esterase activity. *Methods in Enzymology*, 111(C). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)11034-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)11034-7)
- Han, Y., Gao, S., Muegge, K., Zhang, W., & Zhou, B. (2015). Advanced applications of RNA sequencing and challenges. *Bioinformatics and Biology Insights*, 9. <https://doi.org/10.4137/BBI.S28991>
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. In *Nature* (Vol. 381, Issue 6583). <https://doi.org/10.1038/381571a0>
- Held, T., Barakat, A. Z., Mohamed, B. A., Paprotta, I., Meinhardt, A., Engel, W., & Adham, I. M. (2011). Heat-shock protein HSPA4 is required for progression of spermatogenesis. *Reproduction*, 142(1). <https://doi.org/10.1530/REP-11-0023>
- Held, T., Paprotta, I., Khulan, J., Hemmerlein, B., Binder, L., Wolf, S., Schubert, S., Meinhardt, A., Engel, W., & Adham, I. M. (2006). Hspa4l-Deficient Mice Display Increased Incidence of Male Infertility and Hydronephrosis Development. *Molecular and Cellular Biology*, 26(21). <https://doi.org/10.1128/mcb.01332-06>
- Helvig, C., Koener, J. F., Unnithan, G. C., & Feyereisen, R. (2004). CYP15A1, the cytochrome P450 that catalyzes epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone III in cockroach *corpura allata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(12). <https://doi.org/10.1073/pnas.0306980101>
- Hightower, L. E. (1991). Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. In *Cell* (Vol. 66, Issue 2). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90611-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90611-2)

- Hiltemann, S., Rasche, H., Gladman, S., Hotz, H. R., Larivière, D., Blankenberg, D., Jagtap, P. D., Wollmann, T., Bretaudeau, A., Goué, N., Griffin, T. J., Royaux, C., Bras, Y. Le, Mehta, S., Syme, A., Coppens, F., Driesbeke, B., Soranzo, N., Bacon, W., ... Batut, B. (2023). Galaxy Training: A powerful framework for teaching! *PLoS Computational Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010752>
- Hiruma, K. (2003). Juvenile Hormone Action in Insect Development. In *Encyclopedia of Hormones*. <https://doi.org/10.1016/b0-12-341103-3/00184-4>
- Hodson, A., Anesio, A. M., Tranter, M., Fountain, A., Osborn, M., Priscu, J., Laybourn-Parry, J., & Sattler, B. (2008). Glacial ecosystems. In *Ecological Monographs* (Vol. 78, Issue 1). <https://doi.org/10.1890/07-0187.1>
- Hoffmann, A. A., Chown, S. L., & Clusella-Trullas, S. (2013). Upper thermal limits in terrestrial ectotherms: How constrained are they? *Functional Ecology*, 27(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.02036.x>
- Hogg, I. D., Craig Cary, S., Convey, P., Newsham, K. K., O'Donnell, A. G., Adams, B. J., Aislabie, J., Frati, F., Stevens, M. I., & Wall, D. H. (2006). Biotic interactions in Antarctic terrestrial ecosystems: Are they a factor? *Soil Biology and Biochemistry*, 38(10). <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.04.026>
- Hogg, I. D., Williams, D. D., Eadie, J. M., & Butt, S. A. (1995). The consequences of global warming for stream invertebrates: A field simulation. *Journal of Thermal Biology*, 20(1–2). [https://doi.org/10.1016/0306-4565\(94\)00057-P](https://doi.org/10.1016/0306-4565(94)00057-P)
- Holmstrup, M., Bayley, M., & Ramløv, H. (2002). Supercool or dehydrate? An experimental analysis of overwintering strategies in small permeable arctic invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8). <https://doi.org/10.1073/pnas.082580699>
- Horos, R., IJspeert, H., Pospisilova, D., Sendtner, R., Andrieu-Soler, C., Taskesen, E., Nieradka, A., Cmejla, R., Sendtner, M., Touw, I. P., & Von Lindern, M. (2012). Ribosomal deficiencies in Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts. *Blood*, 119(1). <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-358200>
- Horwich, A. L., & Willison, K. R. (1993). Protein folding in the cell: functions of two families of molecular chaperone, hsp 60 and TF55-TCP1. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 339(1289). <https://doi.org/10.1098/rstb.1993.0030>
- Hosler, J. S., Burns, J. E., & Esch, H. E. (2000). Flight muscle resting potential and species-specific differences in chill-coma. *Journal of Insect Physiology*, 46(5). [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00148-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00148-1)
- Hotaling, S., Kelley, J. L., & Weisrock, D. W. (2019). Nuclear and mitochondrial genomic resources for the meltwater stonefly (Plecoptera: Nemouridae), *Lednia tumana* (Ricker, 1952). *Aquatic Insects*, 40(4). <https://doi.org/10.1080/01650424.2019.1639764>
- Hotaling, S., Shah, A. A., McGowan, K. L., Tronstad, L. M., Giersch, J. J., Finn, D. S., Woods, H. A., Dillon, M. E., & Kelley, J. L. (2020a). Mountain stoneflies may tolerate warming

- streams: Evidence from organismal physiology and gene expression. *Global Change Biology*, 26(10), 5524–5538. <https://doi.org/10.1111/gcb.15294>
- Hotaling, S., Shah, A. A., McGowan, K. L., Tronstad, L. M., Giersch, J. J., Finn, D. S., Woods, H. A., Dillon, M. E., & Kelley, J. L. (2020b). Mountain stoneflies may tolerate warming streams: Evidence from organismal physiology and gene expression. *Global Change Biology*, 26(10), 5524–5538. <https://doi.org/10.1111/gcb.15294>
- Huang, L. H., & Kang, L. (2007). Cloning and interspecific altered expression of heat shock protein genes in two leafminer species in response to thermal stress. *Insect Molecular Biology*, 16(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00744.x>
- Huey, R. B., & Berrigan, D. (2001). Temperature, demography, and ectotherm fitness. In *American Naturalist* (Vol. 158, Issue 2). <https://doi.org/10.1086/321314>
- Hurn, A. D. (1996). Temperature-dependent growth and life cycle of *Deleatidium* (Ephemeroptera: Leptophlebiidae) in two high-country streams in New Zealand. *Freshwater Biology*, 36(2). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1996.00098.x>
- Inoue, H., Tsuji, H., & Uritani, I. (1984). Characterization and Activity Change of Farnesol Dehydrogenase in Black Rot Fungus-infected Sweet Potato. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48(3). <https://doi.org/10.1271/bbb1961.48.733>
- Isaak, D. J., Young, M. K., Nagel, D. E., Horan, D. L., & Groce, M. C. (2015). The cold-water climate shield: Delineating refugia for preserving salmonid fishes through the 21st century. *Global Change Biology*, 21(7). <https://doi.org/10.1111/gcb.12879>
- Ishii, N., Taguchi, H., Sasabe, H., & Yoshida, M. (1994). Folding intermediate binds to the bottom of bullet-shaped holo-chaperonin and is readily accessible to antibody. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 236, Issue 3). <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1181>
- Iyer, E. P. R., Iyer, S. C., Sullivan, L., Wang, D., Meduri, R., Graybeal, L. L., & Cox, D. N. (2013a). Functional Genomic Analyses of Two Morphologically Distinct Classes of *Drosophila* Sensory Neurons: Post-Mitotic Roles of Transcription Factors in Dendritic Patterning. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072434>
- Iyer, E. P. R., Iyer, S. C., Sullivan, L., Wang, D., Meduri, R., Graybeal, L. L., & Cox, D. N. (2013b). Functional Genomic Analyses of Two Morphologically Distinct Classes of *Drosophila* Sensory Neurons: Post-Mitotic Roles of Transcription Factors in Dendritic Patterning. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072434>
- Johnson, K. P. (2019). Putting the genome in insect phylogenomics. In *Current Opinion in Insect Science* (Vol. 36). <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.08.002>
- Ju Lee, H., Bartsch, D., Xiao, C., Guerrero, S., Ahuja, G., Schindler, C., Moresco, J. J., Yates, J. R., Gebauer, F., Bazzi, H., Dieterich, C., Kurian, L., & Vilchez, D. (2017a). A post-transcriptional program coordinated by CSDE1 prevents intrinsic neural differentiation of human embryonic stem cells. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01744-5>
- Ju Lee, H., Bartsch, D., Xiao, C., Guerrero, S., Ahuja, G., Schindler, C., Moresco, J. J., Yates, J. R., Gebauer, F., Bazzi, H., Dieterich, C., Kurian, L., & Vilchez, D. (2017b). A post-

- transcriptional program coordinated by CSDE1 prevents intrinsic neural differentiation of human embryonic stem cells. *Nature Communications*, 8(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01744-5>
- Kahsai, L., Kapan, N., Dircksen, H., Winther, Å. M. E., & Nässel, D. R. (2010). Metabolic stress responses in *Drosophila* are modulated by brain neurosecretory cells that produce multiple neuropeptides. *PLoS ONE*, 5(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011480>
- Kahsai, L., Martin, J. R., & Winther, Å. M. E. (2010). Neuropeptides in the *Drosophila* central complex in modulation of locomotor behavior. *Journal of Experimental Biology*, 213(13).
<https://doi.org/10.1242/jeb.043190>
- Kalmar, B., & Greensmith, L. (2009). Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 61, Issue 4).
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.02.003>
- Kaneko, Y., & Hiruma, K. (2014). Short neuropeptide F (sNPF) is a stage-specific suppressor for juvenile hormone biosynthesis by corpora allata, and a critical factor for the initiation of insect metamorphosis. *Developmental Biology*, 393(2), 312–319.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.07.014>
- Kang, B. H., Plescia, J., Dohi, T., Rosa, J., Doxsey, S. J., & Altieri, D. C. (2007). Regulation of Tumor Cell Mitochondrial Homeostasis by an Organelle-Specific Hsp90 Chaperone Network. *Cell*, 131(2). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.028>
- Keklik, G. (2023). UNDERSTANDING EVOLUTIONARY RELATIONSHIPS AND ANALYSIS METHODS THROUGH MEGA SOFTWARE. *INTERNATIONAL JOURNAL OF NEW HORIZONS IN THE SCIENCES (JIHSCI)*, 1. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10446714>
- Kelley, P. M., & Schlesinger, M. J. (1982). Antibodies to two major chicken heat shock proteins cross-react with similar proteins in widely divergent species. *Molecular and Cellular Biology*, 2(3). <https://doi.org/10.1128/mcb.2.3.267>
- Kelty, J. D., & Lee, R. E. (2001). Rapid cold-hardening of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) during ecologically based thermoperiodic cycles. *Journal of Experimental Biology*, 204(9). <https://doi.org/10.1242/jeb.204.9.1659>
- King, A. M., & Macrae, T. H. (2015). Insect heat shock proteins during stress and diapause. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 60). <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162107>
- Klages, G., & Emmerich, H. (1979). Juvenile hormone metabolism and juvenile hormone esterase titer in hemolymph and peripheral tissues of *Drosophila hydei*. *Journal of Comparative Physiology* □ B, 132(4). <https://doi.org/10.1007/BF00799045>
- Klowden, M. J. (1997). Endocrine aspects of mosquito reproduction. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 35(4). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6327\(1997\)35:4<491::AID-ARCH10>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(1997)35:4<491::AID-ARCH10>3.0.CO;2-5)
- Kohshima, S. (1984). A novel cold-tolerant insect found in a Himalayan glacier. In *Nature* (Vol. 310, Issue 5974). <https://doi.org/10.1038/310225a0>

- Kohshima, S., Yoshimura, Y., & Takeuchi, N. (2002). *Glacier Ecosystem and Biological ICE-Core Analysis*. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0645-4_1
- Kokott-Vuong, A., Jung, J., Fehr, A. T., Kirschfink, N., Noristani, R., Voigt, A., Reich, A., Schulz, J. B., Huber, M., & Habib, P. (2021a). Increased post-hypoxic oxidative stress and activation of the perk branch of the upr in trap1-deficient drosophila melanogaster is abrogated by metformin. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/ijms222111586>
- Kokott-Vuong, A., Jung, J., Fehr, A. T., Kirschfink, N., Noristani, R., Voigt, A., Reich, A., Schulz, J. B., Huber, M., & Habib, P. (2021b). Increased post-hypoxic oxidative stress and activation of the perk branch of the upr in trap1-deficient drosophila melanogaster is abrogated by metformin. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/ijms222111586>
- Konopova, B., & Jindra, M. (2007). Juvenile hormone resistance gene Methoprene-tolerant controls entry into metamorphosis in the beetle *Tribolium castaneum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(25). <https://doi.org/10.1073/pnas.0703719104>
- Kort, C. A. D., & Granger, N. A. (1981). Regulation of the Juvenile Hormone Titer. *Annual Review of Entomology*, 26(1). <https://doi.org/10.1146/annurev.en.26.010181.000245>
- Kozlova, T., Perezgasga, L., Reynaud, E., & Zurita, M. (1997). The *Drosophila melanogaster* homologue of the hsp60 gene is encoded by the essential locus l(1)10Ac and is differentially expressed during fly development. *Development Genes and Evolution*, 207(4). <https://doi.org/10.1007/s004270050113>
- Krebs, R. A., & Loeschcke, V. (1995). Resistance to thermal stress in adult *Drosophila buzzatii*: acclimation and variation among populations. In *Biological Journal of the Linnean Society* (Vol. 56, Issue 4). [https://doi.org/10.1016/0024-4066\(95\)90001-2](https://doi.org/10.1016/0024-4066(95)90001-2)
- Krueger, F. (2015). Trim Galore!: A wrapper tool around Cutadapt and FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQ files. *Babraham Institute*.
- Kukal, O., & Kevan, P. G. (1987). The influence of parasitism on the life history of a high arctic insect, *Gynaephora groenlandica* (Wocke) (Lepidoptera: Lymantriidae). *Canadian Journal of Zoology*, 65(1). <https://doi.org/10.1139/z87-022>
- Lee, K. S., Kwon, O. Y., Lee, J. H., Kwon, K., Min, K. J., Jung, S. A., Kim, A. K., You, K. H., Tatar, M., & Yu, K. (2008). *Drosophila* short neuropeptide F signalling regulates growth by ERK-mediated insulin signalling. *Nature Cell Biology*, 10(4). <https://doi.org/10.1038/ncb1710>
- Lee, K. S., You, K. H., Choo, J. K., Han, Y. M., & Yu, K. (2004). *Drosophila* short neuropeptide F regulates food intake and body size. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49). <https://doi.org/10.1074/jbc.M407842200>
- Lee, R. E., & Costanzo, J. P. (1998). Biological ice nucleation and ice distribution in cold-hardy ectothermic animals. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 60). <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.55>

- Li, H. (2023). Protein-to-genome alignment with miniprot. *Bioinformatics*, 39(1). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btad014>
- Li, S. C., Lan, K. C., Hung, H. N., Huang, W. T., Lai, Y. J., Cheng, H. H., Tsai, C. C., Huang, K. L., You, H. L., & Hsu, T. Y. (2022a). HSPA4 Is a Biomarker of Placenta Accreta and Enhances the Angiogenesis Ability of Vessel Endothelial Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10). <https://doi.org/10.3390/ijms23105682>
- Li, S. C., Lan, K. C., Hung, H. N., Huang, W. T., Lai, Y. J., Cheng, H. H., Tsai, C. C., Huang, K. L., You, H. L., & Hsu, T. Y. (2022b). HSPA4 Is a Biomarker of Placenta Accreta and Enhances the Angiogenesis Ability of Vessel Endothelial Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10). <https://doi.org/10.3390/ijms23105682>
- Lindquist, J. A., Brandt, S., Bernhardt, A., Zhu, C., & Mertens, P. R. (2014a). The role of cold shock domain proteins in inflammatory diseases. In *Journal of Molecular Medicine* (Vol. 92, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1136-3>
- Lindquist, J. A., Brandt, S., Bernhardt, A., Zhu, C., & Mertens, P. R. (2014b). The role of cold shock domain proteins in inflammatory diseases. In *Journal of Molecular Medicine* (Vol. 92, Issue 3, pp. 207–216). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1136-3>
- Lindquist, S., & Craig, E. A. (1988). THE HEAT-SHOCK PROTEINS. In *Annual Rev. Genet* (Vol. 22). www.annualreviews.org/aronline
- Liu, R., Holik, A. Z., Su, S., Jansz, N., Chen, K., Leong, H. S., Blewitt, M. E., Asselin-Labat, M. L., Smyth, G. K., & Ritchie, M. E. (2015). Why weight? Modelling sample and observational level variability improves power in RNA-seq analyses. *Nucleic Acids Research*, 43(15). <https://doi.org/10.1093/nar/gkv412>
- Lombard, J., & Moreira, D. (2011). Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. *Molecular Biology and Evolution*, 28(1). <https://doi.org/10.1093/molbev/msq177>
- Lutterschmidt, W. I., & Hutchison, V. H. (1997). The critical thermal maximum: History and critique. In *Canadian Journal of Zoology* (Vol. 75, Issue 10). <https://doi.org/10.1139/z97-783>
- Marchal, E., Zhang, J. R., Badisco, L., Verlinden, H., Hult, E. F., Van Wielendaele, P., Yagi, K. J., Tobe, S. S., & Vanden Broeck, J. (2011). Final steps in juvenile hormone biosynthesis in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(4). <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.12.007>
- Martin, J., Langer, T., Boteva, R., Schramel, A., Horwich, A. L., & Hartl, F. U. (1991). Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a 'molten globule'-like intermediate. *Nature*, 352(6330). <https://doi.org/10.1038/352036a0>
- Mason, P., HalP, L., & Gausz, J. (1984). *The expression of heat shock genes during normal development in Drosophila melanogaster (heat shock• abundant transcripts/developmental regulation)* (Vol. 194).
- Maynard Smith, J. (1957). Temperature Tolerance and Acclimatization in *Drosophila Subobscura*. *Journal of Experimental Biology*, 34(1).

- Mayoral, J. G., Nouzova, M., Navare, A., & Noriega, F. G. (2009). NADP⁺-dependent farnesol dehydrogenase, a corpora allata enzyme involved in juvenile hormone synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50). <https://doi.org/10.1073/pnas.0909938106>
- McCulloch, G. A., Wallis, G. P., & Waters, J. M. (2016). A time-calibrated phylogeny of southern hemisphere stoneflies: Testing for Gondwanan origins. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 96. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.10.028>
- McDermaid, A., Monier, B., Zhao, J., Liu, B., & Ma, Q. (2019). Interpretation of differential gene expression results of RNA-seq data: Review and integration. In *Briefings in Bioinformatics* (Vol. 20, Issue 6). <https://doi.org/10.1093/bib/bby067>
- McIntyre, N. F. (1984). Cryoconite hole thermodynamics. *Canadian Journal of Earth Sciences*, 21(2). <https://doi.org/10.1139/e84-016>
- McKie, B. G., Cranston, P. S., & Pearson, R. G. (2004). Gondwanan mesotherms and cosmopolitan eurytherms: Effects of temperature on the development and survival of Australian Chironomidae (Diptera) from tropical and temperate populations. *Marine and Freshwater Research*, 55(8). <https://doi.org/10.1071/MF04023>
- Meehl, G. A., Washington, W. M., Collins, W. D., Arblaster, J. M., Hu, A., Buja, L. E., Strand, W. G., & Teng, H. (2005). How much more global warming and sea level rise? *Science*, 307(5716). <https://doi.org/10.1126/science.1106663>
- Mendoza, J. A., Rogers, E., Lorimer, G. H., & Horowitz, P. M. (1991). Chaperonins facilitate the in vitro folding of monomeric mitochondrial rhodanese. *Journal of Biological Chemistry*, 266(20). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)98800-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)98800-9)
- Mieczan, T., Górniak, D., Świątecki, A., Zdanowski, M., & Tarkowska-Kukuryk, M. (2013). The distribution of ciliates on Ecology Glacier (King George Island, Antarctica): Relationships between species assemblages and environmental parameters. *Polar Biology*, 36(2). <https://doi.org/10.1007/s00300-012-1256-6>
- Mihailovich, M., Militti, C., Gabaldón, T., & Gebauer, F. (2010). Eukaryotic cold shock domain proteins: Highly versatile regulators of gene expression. In *BioEssays* (Vol. 32, Issue 2). <https://doi.org/10.1002/bies.200900122>
- Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R. S., Donath, A., Mayer, C., Frandsen, P. B., Ware, J., Flouri, T., Beutel, R. G., Niehuis, O., Petersen, M., Izquierdo-Carrasco, F., Wappler, T., Rust, J., Aberer, A. J., Aspöck, U., Aspöck, H., Bartel, D., ... Zhou, X. (2014a). Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, 346(6210). <https://doi.org/10.1126/science.1257570>
- Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R. S., Donath, A., Mayer, C., Frandsen, P. B., Ware, J., Flouri, T., Beutel, R. G., Niehuis, O., Petersen, M., Izquierdo-Carrasco, F., Wappler, T., Rust, J., Aberer, A. J., Aspöck, U., Aspöck, H., Bartel, D., ... Zhou, X. (2014b). Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, 346(6210). <https://doi.org/10.1126/science.1257570>
- Mitchell, S. A., Brown, E. C., Coldwell, M. J., Jackson, R. J., & Willis, A. E. (2001). Protein Factor Requirements of the Apaf-1 Internal Ribosome Entry Segment: Roles of

- Polypyrimidine Tract Binding Protein and upstream of N-ras. *Molecular and Cellular Biology*, 21(10). <https://doi.org/10.1128/mcb.21.10.3364-3374.2001>
- Morimoto, R. I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. In *Genes and Development* (Vol. 12, Issue 24). <https://doi.org/10.1101/gad.12.24.3788>
- Morisseau, C. (2013). Role of epoxide hydrolases in lipid metabolism. In *Biochimie* (Vol. 95, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.06.011>
- Morrow, G., & Tanguay, R. M. (2003). Heat shock proteins and aging in *Drosophila melanogaster*. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 14(5), 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2003.09.023>
- Mueller2001. (n.d.).
- Muhlig Nielsen, M., Overgaard, J., Sørensen, J. G., Holmstrup, M., Justesen, J., & Loeschcke, V. (2005). Role of HSF activation for resistance to heat, cold and high-temperature knock-down. *Journal of Insect Physiology*, 51(12). <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.08.002>
- Muramatsu, D., Kinjoh, T., Shinoda, T., & Hiruma, K. (2008). The role of 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone in pupal commitment of the epidermis of the silkworm, *Bombyx mori*. *Mechanisms of Development*, 125(5–6). <https://doi.org/10.1016/j.mod.2008.02.001>
- Nagata, S., Matsumoto, S., Nakane, T., Ohara, A., Morooka, N., Konuma, T., Nagai, C., & Nagasawa, H. (2012). Effects of starvation on brain short neuropeptide F-1, -2, and -3 levels and short neuropeptide F receptor expression levels of the silkworm, *Bombyx mori*. *Frontiers in Endocrinology*, 3(JAN). <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00003>
- Nah, J., Song, S. J., & Back, K. (2001). Partial characterization of farnesyl and geranylgeranyl diphosphatases induced in rice seedlings by UV-C irradiation. *Plant and Cell Physiology*, 42(8). <https://doi.org/10.1093/pcp/pce102>
- Nebeker, A. V., & Lemke, A. E. (1968). Preliminary Studies on the Tolerance of Aquatic Insects to Heated Waters. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 41(3).
- Nebeker, A. V. (1971). Effect of high winter water temperatures on adult emergence of aquatic insects. *Water Research*, 5(9). [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(71\)90100-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(71)90100-X)
- Nebeker, A. V. (1971). Effect of Water Temperature on Nymphal Feeding Rate , Emergence , and Adult Longevity of the Stonefly *Pteronarcys dorsata*. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 44(1).
- Nobles, L. H. (1960). Glaciological investigations, Nunatarssuaq ice ramp, Northwestern Greenland. *U.S. Army Cold Regions Research and Engineering Laboratory (SIPRE) Technical Report*, 66.
- Noriega, F. G. (2014a). Juvenile Hormone Biosynthesis in Insects: What Is New, What Do We Know, and What Questions Remain? *International Scholarly Research Notices*, 2014, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2014/967361>

- Noriega, F. G. (2014b). Juvenile Hormone Biosynthesis in Insects: What Is New, What Do We Know, and What Questions Remain? *International Scholarly Research Notices*, 2014, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2014/967361>
- Nunamaker, R. A., Dean, V. C., Murphy, K. E., & Lockwood, J. A. (1996). Stress proteins elicited by cold shock in the biting midge, *Culicoides variipennis sonorensis* Wirth and Jones. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 113(1). [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(96\)02001-9](https://doi.org/10.1016/0305-0491(96)02001-9)
- Olivieri, D., Senti, K. A., Subramanian, S., Sachidanandam, R., & Brennecke, J. (2012). The Cochaperone Shutdown Defines a Group of Biogenesis Factors Essential for All piRNA Populations in *Drosophila*. *Molecular Cell*, 47(6). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.021>
- Omad, G. H., Pessacq, P., & Epele, L. B. (2015). Spatial distribution, feeding and length-mass relationships of *Diamphiphnopsis samali* (Plecoptera, Diamphiphnoidae) in a North Patagonia Andean stream, Argentina. *Revista De La Sociedad Entomologica Argentina*, 74(1–2).
- Palter, K. B., Watanabe, M., Stinson, L., Mahowald, A. P., & Craig, E. A. (1986). Expression and localization of *Drosophila melanogaster* hsp70 cognate proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/mcb.6.4.1187>
- Parsell, D. A., & Lindquist, S. (1993a). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. In *Annual Review of Genetics* (Vol. 27). <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.27.120193.002253>
- Parsell, D. A., & Lindquist, S. (1993b). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. In *Annual Review of Genetics* (Vol. 27). <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.27.120193.002253>
- Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., & Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, 14(4). <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>
- Pessacq, P., Duarte, T., & Epele, L. B. (2020). A first cladistic analysis of Antartoperlinae (Plecoptera: Gripopterygidae) and a new micropterous species from Patagonia. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 190(3). <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlaa077>
- Pessacq, P., & Miserendino, M. L. (2008). Ephemeroptera and Plecoptera biodiversity in central Patagonia, Chubut province, Argentina. *Zootaxa*, 1817. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1817.1.3>
- Pessacq, P., & Rivera-Pomar, R. (2019). A new *Andiperla* Aubert (Plecoptera, Gripopterygidae) species from the Perito Moreno Glacier, Argentina. *Zootaxa*, 4664(2), 251–260. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4664.2.7>
- Pessacq, P., Zúñiga, M. C., & Duarte, T. (2019). An updated checklist of Neotropical Plecoptera. *Zoosymposia*, 16(1).
- Place, S. P., Zippay, M. L., & Hofmann, G. E. (2004). Constitutive roles for inducible genes: Evidence for the alteration in expression of the inducible hsp70 gene in Antarctic

- notothenioid fishes. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 287(2 56-2). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00223.2004>
- Porazinska, D. L., Fountain, A. G., Nylen, T. H., Tranter, M., Virginia, R. A., & Wall, D. H. (2004). The biodiversity and biogeochemistry of cryoconite holes from McMurdo Dry Valley glaciers, Antarctica. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 36(1). [https://doi.org/10.1657/1523-0430\(2004\)036\[0084:TBABOC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1657/1523-0430(2004)036[0084:TBABOC]2.0.CO;2)
- Pugh, P. J. A., & McInnes, S. J. (1998). The origin of Arctic terrestrial and freshwater tardigrades. *Polar Biology*, 19(3). <https://doi.org/10.1007/s003000050232>
- Purać, J., Burns, G., Thorne, M. A. S., Grubor-Lajšić, G., Worland, M. R., & Clark, M. S. (2008). Cold hardening processes in the Antarctic springtail, *Cryptopygus antarcticus*: Clues from a microarray. *Journal of Insect Physiology*, 54(9). <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.07.012>
- Rabassa, J., Heusser, C. J., & Rutter, N. (2020). Late-Glacial and Holocene of Argentine Tierra del Fuego. In *Quaternary of South America and Antarctic Peninsula*. <https://doi.org/10.1201/9781003079361-17>
- Ramløv, H. (2000). Aspects of natural cold tolerance in ectothermic animals. *Human Reproduction*, 15(SUPPL. 5). https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_5.26
- Rauschenbach, I. Y., Lukashina, N. S., Budker, V. G., & Korochkin, L. I. (1987). Genetics of esterases in *Drosophila*. IX. Characterization of the JH-esterase in *D. virilis*. *Biochemical Genetics*, 25(9–10). <https://doi.org/10.1007/BF00556212>
- Reyes, M. A., Corcuera, L. J., & Cardemil, L. (2003). Accumulation of HSP70 in *Deschampsia antarctica* Desv. leaves under thermal stress. *Antarctic Science*, 15(3). <https://doi.org/10.1017/S0954102003001366>
- RIDDIFORD, L. M. (1985). Hormone Action at the Cellular Level. In *Endocrinology II*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-030809-8.50008-3>
- Riddiford, L. M. (1996). Juvenile Hormone: The Status of Its “Status Quo” Action. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 32(3–4). [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1520-6327\(1996\)32:3/4<271::aid-arch2>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/(sici)1520-6327(1996)32:3/4<271::aid-arch2>3.0.co;2-w)
- Rinehart, J. P., & Denlinger, D. L. (2000). Heat-shock protein 90 is down-regulated during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, but remains responsive to thermal stress. *Insect Molecular Biology*, 9(6). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2000.00230.x>
- Rinehart, J. P., Hayward, S. A. L., Elnitsky, M. A., Sandro, L. H., Lee, R. E., & Denlinger, D. L. (2006). Continuous up-regulation of heat shock proteins in larvae, but not adults, of a polar insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(38). <https://doi.org/10.1073/pnas.0606840103>
- Rinehart, J. P., Li, A., Yocum, G. D., Robich, R. M., Hayward, S. A. L., & Denlinger, D. L. (2007). Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27). <https://doi.org/10.1073/pnas.0703538104>

- Rinehart, J. P., Robich, R. M., & Denlinger, D. L. (2006). Enhanced cold and desiccation tolerance in diapausing adults of *Culex pipiens*, and a role for Hsp70 in response to cold shock but not as a component of the diapause program. *Journal of Medical Entomology*, 43(4). [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2006\)43\[713:ECADTI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2006)43[713:ECADTI]2.0.CO;2)
- Robinson, M. D., & Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology*, 11(3). <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25>
- Robinson Mark, D., McCarthy Davis, J., & Smyth Gordon, K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26.
- Root, C. M., Ko, K. I., Jafari, A., & Wang, J. W. (2011). Presynaptic facilitation by neuropeptide signaling mediates odor-driven food search. *Cell*, 145(1). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.008>
- Saltel, F., Giese, A., Azzi, L., Elatmani, H., Costet, P., Ezzoukhry, Z., Dugot-Senant, N., Miquerol, L., Boussadia, O., Wodrich, H., Dubus, P., & Jacquemin-Sablon, H. (2017). Unr defines a novel class of nucleoplasmic reticulum involved in mRNA translation. *Journal of Cell Science*, 130(10). <https://doi.org/10.1242/jcs.198697>
- Salvucci, M. E., Stecher, D. S., & Henneberry, T. J. (2000). Heat shock proteins in whiteflies, an insect that accumulates sorbitol in response to heat stress. *Journal of Thermal Biology*, 25(5). [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(99\)00108-4](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(99)00108-4)
- Sanburg, L. L., Kramer, K. J., Kézdy, F. J., & Law, J. H. (1975). Juvenile hormone-specific esterases in the haemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology*, 21(4). [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(75\)90015-3](https://doi.org/10.1016/0022-1910(75)90015-3)
- Schütte, U. M. E., Abdo, Z., Foster, J., Ravel, J., Bunge, J., Solheim, B., & Forney, L. J. (2010). Bacterial diversity in a glacier foreland of the high Arctic. *Molecular Ecology*, 19(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04479.x>
- Sejerkilde, M., Sørensen, J. G., & Loeschcke, V. (2003). Effects of cold- and heat hardening on thermal resistance in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 49(8). [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00095-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00095-7)
- Seybold, S. J., & Tittiger, C. (2003). Biochemistry and Molecular Biology of De Novo Isoprenoid Pheromone Production in the Scolytidae. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 48). <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112645>
- Shah, A. A., Dillon, M. E., Hotaling, S., & Woods, H. A. (2020). High elevation insect communities face shifting ecological and evolutionary landscapes. In *Current Opinion in Insect Science* (Vol. 41). <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.04.002>
- Shah, A. A., Gill, B. A., Encalada, A. C., Flecker, A. S., Funk, W. C., Guayasamin, J. M., Kondratieff, B. C., Poff, N. L. R., Thomas, S. A., Zamudio, K. R., & Ghalambor, C. K. (2017). Climate variability predicts thermal limits of aquatic insects across elevation and latitude. *Functional Ecology*, 31(11). <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12906>

- Shain, D. H., Mason, T. A., Farrell, A. H., & Michalewicz, L. A. (2001). Distribution and behavior of ice worms (*Mesenchytraeus solifugus*) in south-central Alaska. *Canadian Journal of Zoology*, 79(10). <https://doi.org/10.1139/cjz-79-10-1813>
- Sharma, S., Reddy, P. V. J., Rohilla, M. S., & Tiwari, P. K. (2006). Expression of HSP60 homologue in sheep blowfly *Lucilia cuprina* during development and heat stress. *Journal of Thermal Biology*, 31(7). <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2006.05.010>
- Sheikh, A. A., Rehman, N. Z., & Kumar, R. (2017). Diverse Adaptations in Insects: A Review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(2).
- Shinoda, T., & Itoyama, K. (2003). Juvenile hormone acid methyltransferase: A key regulatory enzyme for insect metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21). <https://doi.org/10.1073/pnas.2134232100>
- Siddiqui, K. S., & Cavicchioli, R. (2006). Cold-adapted enzymes. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 75). <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142723>
- Sinclair, B. J., & Roberts, S. P. (2005). Acclimation, shock and hardening in the cold. *Journal of Thermal Biology*, 30(8). <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2005.07.002>
- Sinclair, B. J., Vernon, P., Klok, C. J., & Chown, S. L. (2003). Insects at low temperatures: An ecological perspective. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 18, Issue 5, pp. 257–262). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00014-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00014-4)
- Singh, D., Singh, P. K., Chaudhary, S., Mehla, K., & Kumar, S. (2012). Exome sequencing and advances in crop improvement. In *Advances in Genetics* (Vol. 79). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394395-8.00003-7>
- Sisinni, L., Maddalena, F., Lettini, G., Condelli, V., Matassa, D. S., Esposito, F., & Landriscina, M. (2014). TRAP1 role in endoplasmic reticulum stress protection favors resistance to anthracyclins in breast carcinoma cells. *International Journal of Oncology*, 44(2). <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2199>
- Smagghe, G., Gomez, L. E., & Dhadialla, T. S. (2012). Bisacylhydrazine Insecticides for Selective Pest Control. In *Advances in Insect Physiology* (Vol. 43). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391500-9.00002-4>
- Somero, G. N. (1995). Proteins and temperature. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 57). <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.000355>
- Sømme, L. (1999). The physiology of cold hardiness in terrestrial arthropods. *European Journal of Entomology*, 96(1).
- Sømme, L., Block, W., & Somme, L. (1982). Cold Hardiness of Collembola at Signy Island, Maritime Antarctic. *Oikos*, 38(2). <https://doi.org/10.2307/3544016>
- Song, H. Y., Dunbar, J. D., Zhang, Y. X., Guo, D., & Donner, D. B. (1995). Identification of a protein with homology to hsp90 that binds the type 1 tumor necrosis factor receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 270(8). <https://doi.org/10.1074/jbc.270.8.3574>
- Sonoda, S., Fukumoto, K., Izumi, Y., Yoshida, H., & Tsumuki, H. (2006). Cloning of heat shock protein genes (hsp90 and hsc70) and their expression during larval diapause and cold

- tolerance acquisition in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* walker. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 63(1). <https://doi.org/10.1002/arch.20138>
- Sørensen, J. G., Nielsen, M. M., Kruhøffer, M., Justesen, J., & Loeschcke, V. (2005). Full genome gene expression analysis of the heat stress response in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress and Chaperones*, 10(4). <https://doi.org/10.1379/CSC-128R1.1>
- Storti, R. V., Scott, M. P., Rich, A., & Pardue, M. Lou. (1980). Translational control of protein synthesis in response to heat shock in *D. melanogaster* cells. *Cell*, 22(3). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90559-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90559-0)
- Takeuchi, N., Kohshima, S., & Seko, K. (2001). Structure, formation, and darkening process of albedo-reducing material (cryoconite) on a Himalayan glacier: A granular algal mat growing on the glacier. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 33(2). <https://doi.org/10.2307/1552211>
- Teets, N. M., & Denlinger, D. L. (2014). Surviving in a frozen desert: Environmental stress physiology of terrestrial Antarctic arthropods. In *Journal of Experimental Biology* (Vol. 217, Issue 1, pp. 84–93). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/jeb.089490>
- Tierno de Figueroa, J. M., & Fochetti, R. (2001). On the adult feeding of several European stoneflies (Plecoptera). *Entomological News*, 112(2).
- Tobe, S. S., & Stay, B. (1985). Structure and Regulation of the Corpus Allatum. *Advances in Insect Physiology*, 18(C). [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(08\)60043-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60043-0)
- Tomanek, L., & Somero, G. N. (1999). Evolutionary and acclimation-induced variation in the heat-shock responses of congeneric marine snails (genus *Tegula*) from different thermal habitats: Implications for limits of thermotolerance and biogeography. *Journal of Experimental Biology*, 202(21). <https://doi.org/10.1242/jeb.202.21.2925>
- Toxopeus, J., & Sinclair, B. J. (2018). Mechanisms underlying insect freeze tolerance. *Biological Reviews*, 93(4). <https://doi.org/10.1111/brv.12425>
- Tranter, M., Fountain, A. G., Fritsen, C. H., Lyons, W. B., Priscu, J. C., Statham, P. J., & Welch, K. A. (2004). Extreme hydrochemical conditions in natural microcosms entombed within Antarctic ice. *Hydrological Processes*, 18(2). <https://doi.org/10.1002/hyp.5217>
- Urena, I., Gonzalez, C., Ramon, M., Godia, M., Clop, A., Calvo, J. H., Carabano, M. J., & Serrano, M. (2022). Exploring the ovine sperm transcriptome by RNAseq techniques. I Effect of seasonal conditions on transcripts abundance. *PLoS ONE*, 17(3 March). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264978>
- Vincent, W. F., Gibson, J. A. E., Pienitz, R., Villeneuve, V., Broady, P. A., Hamilton, P. B., & Howard-Williams, C. (2000). Ice shelf microbial ecosystems in the high arctic and implications for life on snowball earth. *Naturwissenschaften*, 87(3). <https://doi.org/10.1007/s001140050692>
- Voziyan, P. A., Haug, J. S., & Melnykovich, G. (1995). Mechanism of farnesol cytotoxicity: Further evidence for the role of PKC-dependent signal transduction in farnesol-induced apoptotic cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 212(2). <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1995>

- Wang, J., Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P. W. H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., ... Wang, J. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490(7418). <https://doi.org/10.1038/nature11413>
- Wang, L. J., Zhou, L. J., Zhu, Z. H., Ma, W. H., & Lei, C. L. (2014). Differential temporal expression profiles of heat shock protein genes in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) under ultraviolet a radiation stress. *Environmental Entomology*, 43(5), 1427–1434. <https://doi.org/10.1603/EN13240>
- Wang, L., Yu, Y., Wei, D., Zhang, L., Zhang, X., Zhang, G., Ding, D., Xiao, H., & Zhang, D. (2021). A Systematic Strategy of Combinational Blow for Overcoming Cascade Drug Resistance via NIR-Light-Triggered Hyperthermia. *Advanced Materials*, 33(20). <https://doi.org/10.1002/adma.202100599>
- Wang, Y., Wang, Y., Lin, J., Chen, Q. Z., Zhu, N., Jiang, D. Q., & Li, M. X. (2015). Overexpression of mitochondrial Hsp75 protects neural stem cells against microglia-derived soluble factor-induced neurotoxicity by regulating mitochondrial permeability transition pore opening in vitro. *International Journal of Molecular Medicine*, 36(6). <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2380>
- Ward, J. V., & Stanford, J. A. (1982). THERMAL RESPONSES IN THE EVOLUTIONARY ECOLOGY OF AQUATIC INSECTS. *Annual Review of Entomology*, 27(1). <https://doi.org/10.1146/annurev.en.27.010182.000525>
- Weissman, J. S., Kashi, Y., Fenton, W. A., & Horwich, A. L. (1994). GroEL-mediated protein folding proceeds by multiple rounds of binding and release of nonnative forms. *Cell*, 78(4). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90533-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90533-9)
- Wellborn, G. A., & Robinson, J. V. (1996). Effects of a thermal effluent on macroinvertebrates in a central Texas reservoir. *American Midland Naturalist*, 136(1). <https://doi.org/10.2307/2426636>
- Welte, M. A., Tetrault, J. M., Dellavalle, R. P., & Lindquist, S. L. (1993). A new method for manipulating transgenes: engineering heat tolerance in a complex, multicellular organism. *Current Biology*, 3(12). [https://doi.org/10.1016/0960-9822\(93\)90218-D](https://doi.org/10.1016/0960-9822(93)90218-D)
- Wengert, L. A., Backe, S. J., Bourboulia, D., Mollapour, M., & Woodford, M. R. (2022). TRAP1 Chaperones the Metabolic Switch in Cancer. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/biom12060786>
- Wharton, R. A., McKay, C. P., Simmons, G. M., & Parker, B. C. (1985). Cryoconite holes on glaciers. *Bioscience*, 35(8). <https://doi.org/10.2307/1309818>
- Wharton, R. A., & Vinyard, W. C. (1983). Distribution of snow and ice algae in western North America. *Madroño*, 30(4).
- Wiseman, D. A., Werner, S. R., & Crowell, P. L. (2007). Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21Cip1 and p27Kip1 in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 320(3). <https://doi.org/10.1124/jpet.106.111666>

- Wong, S. L. A., Chen, Y., Chak, M. C., Chan, C. S. M., Chan, P. K. S., Chui, Y. L., Kwok, P. F., Waye, M. M. Y., Tsui, S. K. W., & Chan, H. Y. E. (2005a). In vivo functional characterization of the SARS-Coronavirus 3a protein in *Drosophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(2). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.098>
- Wong, S. L. A., Chen, Y., Chak, M. C., Chan, C. S. M., Chan, P. K. S., Chui, Y. L., Kwok, P. F., Waye, M. M. Y., Tsui, S. K. W., & Chan, H. Y. E. (2005b). In vivo functional characterization of the SARS-Coronavirus 3a protein in *Drosophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(2). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.098>
- Worland, M. R. (2005). Factors that influence freezing in the sub-Antarctic springtail *Tullbergia antarctica*. *Journal of Insect Physiology*, 51(8). <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.04.004>
- Worland, M. R., & Block, W. (2003). Desiccation stress at sub-zero temperatures in polar terrestrial arthropods. *Journal of Insect Physiology*, 49(3). [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(02\)00264-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(02)00264-0)
- Worland, M. R., Leinaas, H. P., & Chown, S. L. (2006). Supercooling point frequency distributions in *Collembola* are affected by moulting. *Functional Ecology*, 20(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01089.x>
- Wu, C. Y., Lin, C. T., Wu, M. Z., & Wu, K. J. (2011). Induction of HSPA4 and HSPA14 by NBS1 overexpression contributes to NBS1-induced in vitro metastatic and transformation activity. *Journal of Biomedical Science*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/1423-0127-18-1>
- Wurth, L., Papasaikas, P., Olmeda, D., Bley, N., Calvo, G. T., Guerrero, S., Cerezo-Wallis, D., Martinez-Useros, J., García-Fernández, M., Hüttelmaier, S., Soengas, M. S., & Gebauer, F. (2016). UNR/CSDE1 Drives a Post-transcriptional Program to Promote Melanoma Invasion and Metastasis. *Cancer Cell*, 30(5). <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.004>
- Xu, J., Ruan, L., & Shi, H. (2014). EIF2 α of *Litopenaeus vannamei* involved in shrimp immune response to WSSV infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 40(2). <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.016>
- Yocum, G. D. (2001). Differential expression of two HSP70 transcripts in response to cold shock, thermoperiod, and adult diapause in the colorado potato beetle. *Journal of Insect Physiology*, 47(10). [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(01\)00095-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(01)00095-6)
- Yocum, G. D., Joplin, K. H., & Denlinger, D. L. (1991). Expression of heat shock proteins in response to high and low temperature extremes in diapausing pharate larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 18(4). <https://doi.org/10.1002/arch.940180406>
- Yuan, K., Yuan, F. H., He, H. H., Bi, H. T., Weng, S. P., He, J. G., & Chen, Y. H. (2017). Heat shock 70 kDa protein cognate 5 involved in WSSV toleration of *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 72. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.02.003>
- Zachariassen, K. E. (1985). *Physiological Reviews Physiology of Cold Tolerance in Insects*.
- Zalazar, L., Ferri, L., Castro, M., Gargantini, H., Giménez, M., Pitte, P., Ruiz, L., Masiokas, M., & Villalba, R. (2017). Glaciares de Argentina: Resultados Preliminares del Inventario

- Nacional de Glaciares. *Revista de Glaciares y Ecosistemas de Montaña*, 2.
<https://doi.org/10.36580/rgem.i2.13-22>
- Zawierucha, K., Dziemiecki, J., Jakubowska, N., Michalczyk, Ł., & Kaczmarek, Ł. (2014). New tardigrade records for the Baltic states with a description of *Minibiotus formosus* sp. n. (Eutardigrada, Macrobiotidae). *ZooKeys*, 408(1). <https://doi.org/10.3897/zookeys.408.6612>
- Zhao, L., & Jones, W. a. (2012). Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. *Invertebrate Survival Journal*, 9.
- Zhong, M. A., Zhang, H., Qi, X. Y., Lu, A. G., You, T. G., Gao, W., Guo, X. L., Zhou, Z. Q., Yang, Y., & Wang, C. J. (2011). ShRNA-mediated gene silencing of heat shock protein 70 inhibits human colon cancer growth. *Molecular Medicine Reports*, 4(5).
<https://doi.org/10.3892/mmr.2011.528>
- Zhu, J., Wang, K. Z. Q., & Chu, C. T. (2013). After the banquet: Mitochondrial biogenesis, mitophagy, and cell survival. In *Autophagy* (Vol. 9, Issue 11).
<https://doi.org/10.4161/auto.24135>
- Zhu, J. yi, Hannan, S. B., Dräger, N. M., Vereshchagina, N., Krah, A. C., Fu, Y., Elliott, C. J. H., Han, Z., Jahn, T. R., & Rasse, T. M. (2021). Autophagy inhibition rescues structural and functional defects caused by the loss of mitochondrial chaperone Hsc70-5 in *Drosophila*. *Autophagy*, 17(10). <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1871211>
- Zwick, P. (2000). Phylogenetic system and zoogeography of the plecoptera. *Annual Review of Entomology*, 45. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.709>

ANEXO

Anexo I: Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las hsp y csp.

Heat shock protein 60A

ATGCATCGACTTCCAACCGTGTTTAGGTCCAACGCCCTGCGCCAGATCTGCCAACTAGATTCTACGCTAAAGATGTCCGGTTTGG
TCCCGAAGTCCGCGCTCTTATGTTGCAAGGAGTAGACATTTAGCTGATGCCGTTGCAGTTACAATGGGACCCAAGGGTCGCAAC
GTTATACTAGAGCAGTCTTGGGGCAGCCCAAAGATCACAAAAGATGGTGTGACGGTGGCAAAAGGCGTGGAATTGAAGGACCGGT
TCCAGAACATTGGTGCAAGACTTGTGCAAGATGTTGCCAACACACCAACGAAGAAGCTGGAGACGGGACCACTACTGCCACCGT
CTTGGCGCGTGCCATTGCCAAGGAGGGATTTGAAAAATCAGCAAAGGAGCCAATCCAATTGAGATTCGTAGAGGTGTCATGATG
GCTGTGGATTCAATAAAGGCCAACTTGAACTGCAGTCTCGTCCTGTAACGACTCCTGAGGAAATTGCGCAAGTGGCCACAATTTT
TGCCAACGGTGACGCTGGCATCGGCGCGTTGATCTCCGAGGCAATGAAACGAGTCGGCAAAGAGGGCGTCATCACTGTGAAGGA
CGGAAAGACGCTTGTGACGAGTTGGAAGTCATCGAAGGAATGAAGTTTGACCGCGGCTACATTTCTCCGTATTTTATCAACAGTA
CTAAGGGTGCCAAGGTGGAGTACCAGGATGCCTTGGTTCTGCTGAGTGAGAAGAAGATCTCCACGGTGCAGTCCATCATACCCGC
CCTGGAAGTGGCCAACACTCAGCGCAAACCACTCGTGATCATTGCCGAGGACGTCGACAGCGAGGCACTCACTACTCTTGTAGTC
AACAGGTTGAAGATCGGCCTGCAGGTGGTGGCAGTGAAGGCGCCAGGGTTCGGCGACAACCGCAAGGCGACATTGCACGACATG
GCGATTGCGACCGGCGGCATCGTGTTGCGCGATGAGGGCAACCTGGTGAAGATCGAGGATGTGCAAGCGTCCGACTTGGGCCAA
ATCGGCGAAATCATCATCACCAAGGACGACACACTCTTGCTCAAGGGCAAGGGCAAGAAGGCCGACATTGACCGGCGAGCAGAC
CAACTGCGCGACCAGATCCAAGACACCACATCCGAGTACGAGAAGGAGAAGCTGCAGGAGCGACTGGCTCGCCTGGCGTCGGGT
GTCGCTGTGCTCAAAGTGGGCGGATCTAGTGAGGTGGAGGTGAACGAGAAGAAGGACCGCGTGAACGACGCTCTGAACGCGACA
CGCGCCCGCGTGGAGGAGGGCATCGTGCCCGGTGGCGGCACCGCGCTGCTGCGCTGCATCCCGGCGCTCGCCGAAGTGGGG
CGGCCAACTCGGACCAAGAGAACGGCATCTCGATCGTGCGCAAGGCGCTGCGCATGCCGTGCATGCAGATCGCCAAGAACGCCG
GCGTGGACGCGTCCATTGTCGTCTCCAAGGTGAGGAGGGCGAGGCCGACTGGGGGTACGACGCGATGAACAACGAGTTTGTCA
ACATGTTTCGAGAAGGGAATTATTGACCCCAACCAAGGTGGTTCCGACGGCACTGACCGACGCGGCGGGCGTGGCATCTCTCCTGA
CGACAGCCGAGGCGGTGGTGACGGAGATCCCCAAGGAGGAGGGAGGCGGCCACCTGGCATGGGCGGTATGGGTGGAATGGG
CGGTATGGGGGGCATGGGAGGCATGATGTAG

MHRLPTVFRSNALRQICQTRFYAKDVRFGPEVRALMLQGVLDILADAVAVTMGPKGRNVILEQSWGSPKITKDGVTVAKGVELKDRFQNI
GARLVQDVANNTNEEAGDGTATVTLARAIKEGFEKISKGANPIEIRRGVMMAVDSIKANLQSRPVTTPEEIAQVATISANGDAGIGALI
SEAMKRVGKEGVITVKDGKTLVDELEVIEGMKFDRGYISPYFINSTKGAKVEYQDALVLLSEKKISTVQSIIPALELANTQRKPLVIIAEDVDS
EALTTLVNRLKIGLQVVAVKAPGFGDNRKATLHDMAIATGGIVFGDEGNLVKIEDVQASDLGQIGEIITKDDTLLKKGKADIDRRADQ
LRDQIQDTSSEYEKEKLQERLARLASGVAVLKVGSSEVEVNEKKDRVNDALNATRAAVEEGIVAGGGTALLRCIPALAEALRAANSQDEN
GISIVRKALRMPCMQIAKNAGVDASIVVSKVEEGEADWGYDAMNNEFVNMFEKGIIDPTKVVRTALTDAAAGVASLLTTAEAVVTEIPKEEG
GGPPGMGGMGGMGGMGGMGMM

Heat shock protein 83

ATGCCAGAAGAAATGGAGACTGGGAGCTGGAAACCTTCGCCTTCCAGGCTGAAATCGCACAGTTGATGTCCCTGATCATCAACA
CATTCTATTCTGAACAAAGAAATCTTCTTGCGAGAATTGATCTCGAATTCGTCCGATGCTCTGGACAAGATTCGCTACGAGTCCCTGA
CCGACCCGTCGAAGCTGGAGTCTGGGAAGGAGCTGTTCATCAAGATCATCCCGAACAAGAATGACCGCACGCTGACCCATCATCGA
CACCGGCATTGGCATGACCAAGGCCGATCTTGTAACAACCTCGGTACGATTGCCAAGTCCGGCACCAAGGCGTTTCATGGAGGCT
CTGCAGGCCGCGCCGACATCTCCATGATCGGGCAGTTCGGTGTGGGCTTCTACTCCGCGTATCTGGTGGCCGACCGGGTGACC
GTCACGTCCAAGCACAAACGACGATGAGCAGTACGTGTGGGAGTCCTCGGCGGGAGGTTCTGTTACCATCCGCACCGACAACCTCA
GAGCCGATCCACCGAGGCACCAAGATCGTGCTGCACATGAAAGAGGACCAGGCAGAGTTTCTGGAGGAGCGCAAGGTCAAGGAG
GTGGTGAAGAAGCACTCTCAGTTCATTGGCTATCCCATCAAGCTGATGGTGGAGAAGGAGCGCGACAAGGAGCTCAGCGACGAC
GAGGCTGAAGAGGAGAAGAAGGAGGGCGAGGATGAAGAGGATAAGCCCAAGATCGAGGATGTTGGAGAGGATGAGGATGAGGA
CAAGGAAAAGGAGAAGAAGAAAAAGAACCATCAAGGAGAAGTACACCGAAGATGAAGAGCTGAACAAGACCAAGCCCATCTGG
ACGCGCAACCCCGACGACATCAGCCAAGAAGAGTACGGCGAGTTCTACAAGTCGCTGACCAACGACTGGGAGGACCATCTCGCC
GTCAAACACTTCTCTGTTGAGGGACAGCTCGAGTTCGCGCGCTGCTCTTCGTGCCCGTCGCGCGCCCTTCGACCTGTTTGAGA
ACAAGAAGCGGAAGAACAACATCAAGCTGTATGTGCGCCGCGTCTTCATTATGGACAACCTGTGAGGACCTCATCCCAGAGTACCTG
AATTTCGTGAAGGGCGTCGTTGACAGCGAGGACCTGCCGCTGAACATCTCGCGCGAGATGCTCCAGCAGAACAAGATCTTGAAGG
TGATCCGCAAGAACCTGGTCAAGAAGTGCCTGGAGCTGTTCAAGAGCTGGCCGAGGACAATGACAACCTACAAGAAGTACTATGA
GCAGTTCAGCAAGAACCTGAAGCTGGGCATCCATGAGGACAGCGCCAACCGCAAGAAGATTGCCGACCTCCTTCGCTATTCGACG
TCGGTGTCCGGGGACGACATCACGTCTCTCAAGGAGTACCTTGCGCGCATGAAGGAGACCCAGAAGCACATCTACTACATCACTG
GCGAGAGCAAGGACCAGGTGTCAAACCTCGTCTTCGTGGAGCTCGTTAAGAAGCGGGGCTTCGAGGTGATCTACATGACTGAGCC
CATCGATGAGTACGTCTGTCAACAGCTGAAGGAGTATGAAGGCAAGCAGCTGGTGTCTGTACGAAGGAGGGACTTGAGCTGCC
CGAGGAAGAAGATGAGAAGAAGAAGCGCGAGGAGGACAAGGCCAAGTTTGAGAACTTGTCGAAGGTGATGAAGGACATTCTAGAC
AAGAAAGTGAGAAAGGTGGTTGTGAGCAACCGTCTCGTGGAGTCTCCGTGCTGCATCGTAACATCGCAGTACGGCTGGACGGCC
AACATGGAGCGCATCATGAAGGCGCAGGCGTTGCGCGACACCTCCACCATGGGCTACATGGCGGCGAAGAAACACCTCGAGATC
AACCCTGACCACCCCGTGATGGAGACCCTCCGACAGAAGGCCGACGCGGACAAGCACGACAAGGCCGTCAAGGATCTGGTCATG
CTTCTGTTGAGACCGCGCTGCTGTCTCATCAGGCTTTGCGCTCGAGGAGCCGAGGTGCACGCGTCGCGCATCTACCGCATGATCA
AGCTGGGGCTGGGCATCGACGAGGAGGAGCCACCGCGGCGGAAGAGGAGAAGGCTGACGTTGAGATGCCCCCGCTCGAGGG
TGACGGCGAGGACGCGTCGCGCATGGAGGAGGTCGACTAG

MPEEMETGELETFAFQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISNSSDALDKIRYESLTDPSKLESKGELFIKIIPKNDRTLTLIDTGIGMTKADL
VNNLGTIAKSGTKAFMEALQAGADISMIGQFGVGFYSAYLVADRVTVTSKHNDDEQYVWESSAGGSFTIRTNDNSEPIHRGTKIVLHMKED
QAEFLEERKVKEVVKHSQFIGYPIKLMVEKERDKELSDDEAEKEKEGEDEEDKPKIEDVGEDEDEDKEKEKKKKTIKEKYTEDEELNK
TKPIWTRNPDDISQEEYGEFYKSLTNDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFVPRRAPFDLFENKKRKNNIKLYVRRVFIMDNCDLIPEYLN
FVKGVVDSEDLPNISREMLQQNKILKIRKLVKKCLELFEELAEDNDNYKKYYEQFSKNLKLGIHEDSANRKKIADLLRYSTSVSGDDIT
SLKEYLARMKETQKHIYYITGESKDQVSNSSFVVLVKKRGFEVIYMTPEIDEYVQQQLKEYEGKQLVSVTKEGLELPEEEDKKKREEDKA
KFENLCKVMKDILDKKVEKVVVSNRLVESPCCVTSQYGWTANMERIMKAQALRDTSTMGYMAAKKHLEINPDHPVMTLRQKADADKH
DKAVKDLVMLLFETALLSSGFALEEPQVHASRIYRMIKLGIDEEPTAAEEEEKADVEMPPLEGDGEDASRMEEVD

Heat shock protein 68

ATGCCGACAGCTGCAATCGGAATCGACCTCGGCACGACCTACTCGTGTGTGGGCGTGTGGCAGATGGGAAAAGTGGAGATCATC
GCCAACGACCAAGGCAACCGCACGACGCCAGCTATGTCGCCTTCAACGACACGGAGAGGCTCATCGGCGACGCCGCCAAGAAC
CAGGTCGCCATGAACCCGAAGAACACCGTGTTTGACGCCAAGCGCCTCATCGGGCGTCGGTTCGACGACCCCAAGATCCAGCAG
GACATGAAGCACTGGCCGTTACAGTGGTCAACGTGGGCGAGAAGCCGAAAATCCAGGTGGAGTTCAAGGGGGAGACGAAGACG
TTCTCTCCCGAGGAGATCAGCTCGATGGTGTGGTGAAGATGAAGGAGGTGGCCGAGGCGTTCCTCGGAGCCCCCGTGAAAGAC
GCCGTGCTCACGGTGCCGCGTATTTCAACGATCCAGAGGCAAGCTACTAAGGACGCCGGTGCCATCGCTGGGATCAATGTGA
TCCGGATCATCAACGAGCCCACTGCCGACGCCCTGGCGTACGGTCTCGACAAGAACCTCAAGGGCGAGAAGAAGCTGCTGATCTT

TGACCTGGGAGGCGGCACGTTTCGACGTCTCCATCCTGGCCATCGACCAGGGCTCGCTGTTTCGAGGTCAAGTCCACGGCCGGAGA
CACACACCTGGGCGGCGAGGACTTCGACAACCGCCTGGTGAGCCACTTTGTGATGAGTTCAAGCGCAAATACCGCAAGGACCT
GTCCGGCAACCCTCGCTCGCTGCGGCGTCTGCGGACGGCGGCGGAACGCGCAAAGAGGACGCTCTCCTCGAGCACGGAGGCGT
CGCTCGAGATCGACGCCCTCTACGAGGGCGTCGACTTCTACACAAAGATCTCGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTCTGCGCTGACC
TGTTCCGCGGCACTCTGCAGCCCGTCGAGAAGGCGTTGTCCGACGCCAAGATGGACAAAGGCGTGATCGATGACGTGGTCCTCG
TCGGCGGCTCGACGCGTATCCCCAAGATCCAGAGCCTCCTGCAGAACTTCTTCGCCGGCAAGCCGCTGAACCTGTCCATCAATCC
AGACGAGGCGGTGCGGTACGGCGCCGCGGTCCAGGCTGCGATCATCAGCGGCGATACTAGCTCGCAAATCCAGGATGTACTCCT
TGTTGACGTGCCCCACTGTCCCTTGGCATCGAGACTGCAGGCGGAGTCATGTCCAAGATCGTCGAGCGCAACTCCCGCATACCG
TGCAAGCAGTCGCAGACCTTCACCACGTACACCGACAACCAGCCGACCGTCACCATCCAAGTCTACGAGGGCGAGCGCGCCATG
ACCAAAGACAACAACCTCCTCGGCACCTTCGACCTCACGGGAATCCCGCCCGCGCCGCGTGGCGTCCCGAAGGTCGACGTCACG
TTCGACCTCGACGCCAACGGCATCCTCAACGTACAGCGAAAGAGACCGGATCGGGCCACCAGAAGAACATCACGATCCGCAAC
GACAAGGGCCGCTCTCGCAGGCCGAGATCGACCGCATGCTCGCCGAGGCCGAGAAGTACAAGGCCGCGGACGACGCCACGCG
TGAACGCATCGTGTTTCGGAACAAACTCGAGGCGTACACGTTACGCGTCAAACAGGCGGTGGAGGAGGCCGGGACCAAATTGGA
CGATGACCACAAGAAGAGGGCTCGCGAGGCTTGCGACGCCATGCTCAAGTGGCTCGACGCGAACCAGCTAGCCGGCAAGGAGG
AGCTGGAACATCAGCAGAAGGAACTGGAGAGATTGTGCAGCCCCATCATGTGCAAGATGTACCAGGGCCAATACCAAGGCCAATA
CCAAGGCCAAGGGGCCCCAACCGGAGGGACCTCGTGTGGGGGTCAAGCAACTCGGGGCCAGCAGAACGGCGGAGGCCCGGGA
CCCACCATCGAGGAAGTGGATTAG

MPTAAIGIDLGTYSVGVWQMKGVEIANDQGNRTTPSYVAFNDTERLIGDAAKNQVAMNPKNTVFDKRLIGRRFDDPKIQQDMKHW
PFTVVNVGEKPKIQVEFKGETKTFSP EEEISSMVLVKMKEVAEAF LGAPVKDAVVTPPAYFNDSQRQATKDAGAIAGINVIRIINEPTAAALA
YGLDKNLKGEKNVLI FDLGGGTFDVSILAI DQGS LFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRLVSHFVDEFKRKYRKDL SGNPRSLRRLRTAAERAK
RTLSSSTEASLEIDALYEGVDFYTKISRARFEELCADLFRGTLQPVEKALSDAKMDKGVIDDVVLVGGSTRIPKIQSLLQNFFAGKPLNLSIN
PDEAVAYGAAVQAAIISGDTSSQIQDVLLVDVAPLSLGIETAGGVMSKIVERNSRIPCKQSQTFTTYTDNQPTVTIQVYEGERAMTKDNNLL
GTFDLTGIPPAPRGVPKVDVTFDL DANGILNVTAKETGSGHQKNITIRNDKGRLSQA EIDRMLAEAEKYKAADDAQRERIVVRNKLEAYTF
SVKQAVEEAGTKLDDDHKKRAREACDAMLKWLDANQLAGKEELEHQKELERLCSPIMSKMYQGQYQGQYQGQGAPTGGTSCGGQA
TRGQQNGGGPGPTIEEVD

Heat shock 70 kDa protein cognate 5

ATGCTTTCTGCTTCAAGAATATTTGGTCGACGAGCTTGCGAGTGACGTCAGACATAACGCGAAATCAACAGTTCAGCACTTTATTG
AAAAAGACCTTTGCACCATCTTCATCCATTTATGATGGCCACATTAGACACAAATCGGAAGGTGTTAAAGGAGCCGTTATTGGCATT
GATCTTGGCACAACAACTCGTGCGTCGCCGTCATGGAAGGAAAACAAGCCAAGGTCATAGAGAATGCCGAAGGATCGAGGACCA
CACCATCTGTCGTTGCGTTCACAAAAGATGGTGAGAGACTTGTCCGGCATGCCAGCCAAGCGTCAAGCAGTCACAAATTCGGCCAA
CACATTTTATGCGACAAAACGACTCATTGGGAGGAAGTTTGAAGATGCTGAAGTTAAGAAAGACATGAAAACGGTGTCGTACAAGA
TCGTGCGCGCGTCCAACAGCGACGCGTGGGTGGAGAGCACCGACAAGAAGATGTTCTCGCCAAGCCAGATCGGCGCGTTCGTGC
TTATGAAGATGAAGGAGACGGCCGAGGCCTACCTGAACACGCCGGTGAAGAACGCCGTTGTACCCGTGCCGGCGTACTTCAACG
ACTCGCAGCGCCAGGCGACCAAGGACGCGGGTCAGATCGCCGGGCTCAATGTGCTGCGCGTCATCAACGAGCCGACCGCGGCT
GCGCTCGCGTATGGCATGGACAAGACCGAGGATCGAGTAATTGCTGTTTACGATCTGGGAGGTGGAACCTTCGACGTGTCCATTC
TTGAGATCCAGAAGGGAGTGTTTGAAGTGAAATCGACCAACGGCGATACATTCTTGGGTGGAGAGGACTTCGATAATGTTCTTGTC
AACTTCCTCGTGACTGAATTCAGAAAGGAGCAAGGAATCGACATCACCAAGGATCCCATGGCAATGCAGCGGCTGAAGGAGGCCG
CCGAGAAGGCCAAGGTTGAGCTCTCGTCGGCCCAACAGACCGACATCAACCTGCCGTACCTGACCATGGACGCTTCTGGACCCAA
GCATATGAATCTCAAGATGTCTCGCTCGAAGCTGGAGTCGCTGGTGGGCGATCTGATCAAGAAGACGATTGGGCCGTGCAACAAG
GCGCTGCAAGACGCTGAGTGCTCCAAGTCGGACATCGGCGAAGTGCTGCTGGTGGGCGGAATGACGCGCATGCCCAAGGTGCA
GTCTGTGCTCCAAGAGATCTTCGGCCGTCAGCCAAGTCGCGCGGTCAACCCGACGAGGCGGTGGCGGTGGGCGCCGCCGTGC
AGGGAGGCGTGCTGGCTGGCGACGTGACCGACGTGCTCCTGCTGGACGTAACGCCGCTGTGCTCGGCATCGAGACGCTGGGC
GGAGTGTTACGCGCCTCATCACGCGCAACACGACCATCCCCACCAAGAAGTCGCAGGTGTTCTCCACGGCCGCCGACGGCCAG
ACGCAGGTGGAGATCAAGGTGCACCAGGGCGAGCGGAGATGGCCAACGACAACAAGCAGCTGGGTGAGTTCACGCTGGTCGG
CGTCCCTCCTGCGCCGCGCGGCGTGCCGCAGATTGAGGTGACGTTGACATCGACGCCAACGGTATCGTGACGTGTGCGCGCG
CGACAAGGGCACCGGCAAGGAGCAGCAGATTGTGATCCAGTCGTCGGGCGGCCTGAGCAAGGACGAGATCGAGAACATGGTGC
GCAACGCAGAGACGTTTCGCGGCGCAGGACAAGGTGAAGCGAGACCGAGTCGAGGCCATCAACCAGGCCGAGAGCATCGTTCAG
GACACCGAGTCCAAGATGACCGAGTTCAGGAGCAGCTGCCGCAAGAGGAGTGCGACAAGCTGAGGGAGCAGATGGTGCTGGTG
CGAGACGCGCTGGCCAAGAAGGACGACATCGACCCCGAGGAGATCCGCAAGCTGACCAGCACGCTGCAGCAGGCGTCGCTCAA
GCTGTTTCGAGATGGCATAACAAGAAGATGGCTGCCGAGCGGGAGAGCAATTCCGGCAGCAGCAGCAGCAGCTCAGATGCGCC
GCCTTCCGGTGATGCCGAGACGAAGGAGAAAGAGGAGAAGAAGAACTGA

MLSASRIFGRRACECTSDITRNQQFSTLLKKTFFAPSSSIYDGHIRHKSEGVKGAVIGIDLGTNNSCVAVMEGKQAKVIENAEGSRTTPSVV
AFTKDGERLVGMPAKRQAVTNSANTFYATKRLIGRKFEAEVKKDMKTVSYKIVRASNSDAWVESTDKKMFSPSQIGAFVLMKMKETA
AYLNTVPKNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGQIAGLNLVRVINEPTAAALAYGMDKTEDRVIAVYDLGGGTFDVSILEIQKGVFEVKSTNGD
TFLGGEDFDNLVNLVTEFKKEQGIDITKDPAMQRLKEAAEKAKVELSSAQQTIDINLPYLTMDASGPKHMLKMSRSKLESVLGDLIK
KTIGPCNKALQDAECSKSDIGEVLVVGGMTRMPKVQSVVQEIFGRQPSRAVNPDEAVAVGAAVQGGVLAGDVTDVLLLDVTPLSLGIETL
GGVFTRLITRNTTIPTKKSQVFSTAADGQTQVEIKVHQGEREMANDNKQLGQFTLVGVPPAPRGVPQIEVTFDIDANGIVHVSARDKGTG
KEQQIVIQSSGGLSKDEIENMVRNAETFAAQDKVKRDRVEAINQAESIVQDTESKMTEFKEQLPQEECDKLREQMVLVRDALAKKDDIDP
EEIRKLTSTLQQASLKLFEYAKKMAAERESNSGSSSSSSSDAPPSGDAETKEKEEKN

Heat shock 70 kDa protein 4L

ATGTCGATAATGGGGATAGATTTTGGTAACGAGTCTTGCTATATCGGTGTAGCGAGAGCGGGTGGTATTGAGACCATCGCAAATGA
CTACAGTTTGGCGTGCAACTCCGTCTTGTGTGGCGTTCTGCACGAAGAACCGAATCTTAGGTGTTGCTGCCAAGAATCAGATGGTCT
CCAACATGAAGAATACTATTACGGTTTCAAGCGGCTGTTGGGACGCAATTATAGTGACCCATTTGTCCAGAATGAGTTGAAATATT
TACCATATCAAGTTCAGAAAACTGATAAAGGTGGCATTGGAATTAAGGTGAACTATCTAAATGAGGAACACATCTTCTCCCCAGAGC
AAATAACGGGCATGCTTTTCAAAAAGTGAAGGAGATCTCCGAGACTGCTATGAAGACGGTAGTGAATGACTGTGTTATTTCCGGTC
CCTTCGTATTTACCAATAACGAGCGCAAGGCTCTGCTTGATGCAGCTACCATCGCCGGATTAAATGTGTTGCGGCTGTTTAACGA
GACGACGTGACGCGCCCTGTCTTATGGTATCTACAAGCAAGATTTGCCACCACCCGAGGAAAAGCCACGTAATGTAGTGTTTGTGC
ACTGGGGTTCATGCTACTCTGCAGGTGTATGCCTGTGCATTCCACAAAGGGAAGCTCAAGATGTTGGCTAGCGTGACTGACCCGTG
CCTGGGCGGGCGGGACATCGACGCCGAAGTGGCCGAGCACTTTGCCAAGGACTTCTTGGTGCGATATCGCGTGACGCTCGCAA
GAATCCGCGCGCTTGGATACGTCTCATCGCCGAAGTGGAGAAGCTCAAGAGAAACATGTCTGCCAACTCGACAAAGCTGCCATTG
AACATCGAGTGCTTCATGGAAGACAAGGATGTTTCGCGGCGAGATGCAACGCTCCGAGATGGAGGCACTGTGCGAGGCGCTATTCT
CGCCGGGTCGAGGTTACACTCAACCAGTGCTTGGAGGACTCCAAGCTGAAGTTGGACGAGATCTACGCGGTGGAGATGGTGGGC
GGCTCGAGCCGCGTGCCCTCGATCAAAGAGTTGATCCAGGAAGTATTCAAGAAGAGTCCGAGCACGACGCTGAATCAAGACGAG
GCTGTGGCACGCGGCACTGCGCTGCAATGTGCACAGCTGTGCGCCAGCAATCCGAGTGCGCGCACTTTGCCGTACCCGACGTACAG
AACTATGCAGTCAAGTTGGTGTGGGATTCCAGCATGGGGGATGACGGGGAAATGGAGGTGTTTCCACAGAATCAGGCTGTACCGT
TTTCTAAAATGTTGACGTTTTATCGAAAGGAAGCCTTTGTTCATCAAAGCTTATTACCAGGGTAACATTCCATATCCAGATCAGTTCAT
TGGTCAGTTCATGATCAAGGACGTGAAGCCGTCTGTGGAGGGAGAGAGCCAGCGTGTGAAGGTGAAGGTGCGTGTCAATCTGCA
CGGCATTGTGCTCGTTTCGTGCGCAACGCTGGTGGAGAAAGTGGCGGCAGCCGACTTGGAGGACGAGAACGGAGACTCCAACAT
GGACACCGATCAAACGGCCGGACAGAATCAAACCGCGGGGGGAGTCAGGACGAGCAACAAGGGGGCGGCAATGAGGACCAGG
AGGAGGGTGATGCACACCTCGCTGGAGGTGACAAGAAGGACAAAAAGAAGAAGCTCCATGTGAAGAGCACGGATCTGCCTGTGCG
AGTCTGTGCTCGGCGGAAATGATGTGCGCGCAAGTCGACCACTTCCACGAGCTGGAGTGCAAGATGATCTCCGAGGATCGCCAGG
AGAAGGAGAGAATCGACGCACGCAATGCACTTGAGGAGTACGTCTACGAGACGCGCGGCCAGCTCAACTCTGACGATCTGTGCG
CGTTGCTCACAAGCGATGTGCGTCAGACTATCACCTCCGAGCTGGACCAGACCGAGGCTTGGCTCTACGAGGAGGGTGCAGATT
GCGTGCGCAACGTCTACATAGACCGCCTCGCTCGCTTGAGGGCGAGTGCGAGCCAATCAAGGACAGACGCGAGAGAGTTCGAAG
AGCGTCCAAGCTCGCTACTGGAAGTGAAGCGTGGCGTGCAACTGGCAAGGAAGGTGCTGGATCAGTATGCCAACAAGGACGAGC
GCTACTTGCAATTTGACCAAGTGGCGAAGTGGAGAAGGTGGCAACTGCGGTGGACGCTGCCACGCTGTGGCTGGAAGATGCGCGCC
GCGTGCTGGCTGCCACACCCAAGACACACAACGCGCCCGTCATCTGCGTCAAAGTGCGAGAGCAGAAACAGCAACTTGAAAATAC
TATTAATCCTATTATAAAACAAACCGAAGCCTAAGGCAGAGGTCCCTCCGCCACCAAAGGAAGATCCACCTAAGAATGGGAACAGTG
ATGCGCCAAACCAATCGACCACTGCTGATGGACCCACACAAATGGATGTAGAGTGA

MSIMGIDFGNESC YIGVARAGGIETIANDYSLRATPSCVAFCTKNRILGVAANKQMVSNMKNTIHGFKRLLGRNYSDFVQNELKYL PYQV
QKTDKGGIGIKVNYLNEEHIFSPEQITGMLFTKLKEISETAMKTVVND CVISVPSYFTNNERKALLDAATIAGLNLVRLFNETTSTALSYGIYK
QDLPPPEEKPRNVVFDWGHATLQVYACAFHKGKLKMLASVTD PCLGGRDIDAELAEHFAKDFLVRYRVDARKNPRAWIRLIAEVEKLK
RNMSANSTKLPLNIECFMEDKDVRGEMQRSEMEALCEALFRRVEVT LNQCLED SKLKLDEIYAVEMVGGSSRVPSIKELIQEVFKKSPST
TLNQDEAVARGTALQCAQLSPAIRVRDFAVTDVQNYAVKLVWDSSMGDDGEME VFPQNQAVPFSKMLTFYRKEAFVIKAYYQGNIPYP
DQFIGQFMIKDVKPSVEGESQRVKVKVRVNLHGIVLVSSATLVEKVAAADLEDENGDSNM DTDQTAGQNQTGGGSQDEQQGGNEDQ
EEGDAHLAGGDKKDKKKLHV KSTDLPVESVVGNDVAQVDHFHELECKMISED RQEKERIDARNALEEYVYETRGQLNSDDL SAFVTS
DVRQTITSEL DQTEAWLYEEGADCVRNVYIDRLARLQGECEPIKDRRREFEERPSSLLELSAAVQLARKVLDQYANKDERYLH LTSGEVE
KVATAVDAAHVWLEDARRVLAATPKTHNAPVICVKVREQKQQL ENTINPIINKPKPKAEVPPPPKEDPPKNGNSDAPNQSTTADGPTQM
DVE

Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial

ATGGCGCCTCGTTTCGTCTACAACGTGCTCTGAAATTGGGAAATGTATTTTTTCGACGAACAGCTCAATTCTATCATCCAAACTA
AATAATATTAATTTACAGAGAAGAGATCTATCAGCGTGCGGCCGCTGCTGAGCAGCGTCAACTCGCAGAGCGCTGCAGATGCCG
ACTCCGAGTACCACTCTATTATCAAGGATGCAGAGAAAGCCACAGGTGCCAGCCAGAGCCACGAGTTCCAGGCAGAGACTCGGAT
GCTGCTGGATATTGTGGCCAAGTCCCTCTATTTCGGACAAAGAGGTGTTTGTGCGCGAGCTGATCTCGAACGCCAGCGACGCGCTC
GAGAAGCAGCGCTACGTCAGCCTGACGTGAGGCACAGACGCGTCCGAGGCGACACCTGCGGCAGACTCGCCGCTGGAGATCCA
CATCGCCACGGACAAGCAGCACCCGGATACTCACGATACAGGATACTGGAGTTGGGATGACCCAAGAAGAAATGATCTCGAATTTG
GGAACAATTGCACGATCTGGCTCTAAGGCATTCCCTCGACCAGCTGAAAGAGAAGACGGGCGCGCATAGTACTCGTCGTCGATCA
TTGGCCAGTTCGGCGTCGGCTTCTACTCGAGCTTCATGGTCGCGGACAAGGTGGAGGTGTACAGCAAGTCCAGCCAGGCGGCCG
GGCCCGGACACAAGTGGACTTCGGACGGGTCCGGTACCTACGAGATTCAAGAGGCCGAGGGCGTGCAGAACGGAACCAAAATTG
TCCTACATTTGAAACAAGATTGCCGGGAATTCGCTGATGAGGACTCGATTAATGGCATCATCAAGAAGTACAGCAACTTCGTGGGC
AGCCCGATCTTTGTGAACGGGCGGCGCGGAACGTGATCCAGCCGCTGTGGCTGATGGACGCGAAGCAAGTGACCGCGGACAT
GCACAACGAGTTCTACCGCTTCGTCGGCAACTCGTTCGACAAGCCTCGCTTCACGCTGCACTACAACACAGACGCGCCGCTTACC
ATCCGAGCGCTGCTCTACTTCCCCGAGGGAAAGCCAGGTTTGTTGAGATGAGCCGCGAAGTGGACGTGGGCGTGGCTCTGTAC
ACGCGGAAAGTGCTGATCAAGAGCAAGGCTGACAACATCCTGCCCAAGTGGCTGCGATTCTGCAAGGGTGTGTTGACTCGGAAG
ACATACCGCTGAATCTGAGCAGGGAAGTCTCAGAACAGCGTTCTCATCAGGAAGCTGCGCACGGTGTGACGAATCGAGTTCT
CCGTTTCTCCACGACAAATCCACCAAGGACACTGAGGAGTTCGACAAGTGGTACAAGGACTACGGACTCTTTCTGAAAGAGGGA
ATCGTCACGAGTGAAGAGCAGCATGAAAAGGAAGAGATCTCGAAGCTTCTCCGCTTCGAGTCGTCGCGCAGTGCGCCGAACGAAC
GAGTCAGCCTGCCGCTGTACTGCAGCCGACTCAAGGAAGGACAGAAACACATATTTTATCTTGCTTCTCCAAGTCGCGAGCTGGC
CGAGGCGTCGCCCTACTACGAGGCTCTCAAGCAGAAAGATGTGGAGATTCTGTTCTGCTTCGAGCCGTACGACGAGCTCGTGCTG
ATGCAGCTGCGGCAGTTCGACGACCGCCAGCTGATGTCCGTCGAGAAGGAGATGCGCCAAGACAAGGAACCCGAGAACCTGACT
GACCTCGGCAGCGACAGCCTGACGCGCAGCGAGCTGGAGACTCTGCTGCCGTGGGTGAAGCAGACTCTTGCGGGCAAGGCGCA
CACGGTCAGGGTGACCAACCGCCTGGAGACGCACCCGTGTGTGGTGACGATCGAGGAGATGGCCGCGGCGGACACTTCATCC
GCACGCAGTCACACCAGCTGCCCCGAGGAGAGCCGATACTCGCTGCTGCAGCCACAGTTCGAACTCAACCCCAGGCATCCGATTAT
TAAGAACTTAGCAAATTGACCACAGCAAACCCAAAATTGGCTACATTAGTAACACAGCAGTTGTTCTCCAAGTCGATGGTTTCGGC
TGGTTTAGTGGAAGATCCGAGGACTTTGGTGTGAGTATGAACGAGCTCCTCACACTTGCTCTTGAAACGCACTGA

MAASFRLQRALKLGNVFFRRTAQFYHPKLNNINLQRRDLSACGRLLSSVNSQSAADADSEYHSIIKDAEKATGASQSHEFQAETRMILLDI
VAKSLYSDKEVFVRELISNASDALEKQRYVSLTSGTDASEATPAADSPLEIHATDKQHRILTIQDTGVGMTQEEMISNLGTIARSGSKAFL
DQLKEKTGAHSDSSSIIGQFVGIFYSSFMVADKVEVYSKSSQAAGPGHKWTS DGSGTYEIQEAEGVQNGTKIVLHLKQDCREFADEDSI
NGIIKKYSNFVGSPIFVNGRRANVIQPLWLMDAKQVTADMHNEFYRFVGN SFDKPRFTLHYNTDAPLTIRALLYFPEGKPLFEMSREVD
VGVALYTRKVLISKADNLPKWLRFVKGVDSEDIPLNLSRELLQNSVLIRKLRTVL TNRVLRFLHDKSTKDTEEFDKWKDYGLFLKEGI
VTSEEQHEKEEISKLLRFESSRSAPNERVSLPLYCSRLKEGQKHIFYLASPSRELAESPYYEALKQKDVEILFCFEPYDELVLMQLRQFD
DRQLMSVEKEMRQDKEPENLTDLGSDSLTRSELETLLPWVKQLAGKAHTVRVTNRLETHPCVVTIEEMAAARHFIRTQSHQLPEESRY
SLLQPQFELNPRHPIIKLSKLT TANPKLATLV TQQLFSNSMVSAGLVEDPRTLVS SMNELLT LALETH

Cold shock domain-containing protein CG9705

ATTGGTCAAATGAGAGTATGCAGACAAACGAAAGCGTTTTTGTGCAAATGGTTTACACCAAACCTACACCAAGTGGACAAACAAACA
ACGCAAGCGAGACTCGATGCTCCACGCATTGAGCACACAAATTTGCTGTCACTTACTTGCCAATAGGAAGTAAGTTAAGCTACTAG
CACAGGCAAGAGGGCTCGGTCGCTTCTTCAGGCGGAGTGATTTTAAACGATTCCCTGTCTATTGTTTGCAGTTCGAATCGAGATCG
ATTTGAATCCACCAAGTGCTGGGCAATGTCGGCAAACATTTCTTCGACTCCCTGGCCAGTCTTGACAGAGGTCTTGTAGGTGCCAC
TGATCAGATTGTGGCATTGTTACAGAAATTCTCCATGTCACTCTCCGTAACCTTGAGGTGTTTGGCCTTCTAGGTGAGCTTTGTTTC
CGCACAAAGAAAATCTTAGCATTCTCTGCATATGTAACGATATCCAATAAGTGTGCGACAGAACGTGAAATGAAGCTGCGTTATCCA
ACGAGAAGACTAGAATGGCTGCCTCGGCAAACCTTGTAGTAAGTAGATGTCACAGAAGCCACTCGTTCCATCCCACCAGTGTCACAC
AGCTGCAGCCGTAGGTCTCGTCCAGTAACAGAGTACACTTTGTCGTAATGATCTAAACCTAGTGTGCGATTGGCGATCTGTAGCAGT
TACAAAAGTGTCTGCTGTGAATCTTCGAAAGAGGGAGCTTTTACCCACACCAAATTCACCACACAAGATGACTTTTTGCTCCGGAAT
TTTTACGGATGCCATTTTGAAGATGCAACTTCTGTAAAGGTTGATCTTGAGCATTTATTGTAACCACATATTCAAAGAAGAGCGCTA
GCCTACTAGAACTTTGAATTTCAATACATATTTACGTTGTGTTGTGATTACAGTCAACTCTAAAACAGTAAACAACCTTTAGGTTTCTA
ATTCATGGAGTTAGATAGTAAGGTAAGGTTAGGACAATGGTAATGATTTGACAGCCCCAACC GCCCCTGCAAGACTGGACTTCG
GCCGTAGTCTGTGTGTCTTTAGTGTGCTCTCCACACTCAGTGGACCAAAGAGGCTGGTTTAGACCGACTGTACAATAACTCAAGC
TGGCAACGCTGGCGGACGGAACGCCCGAACAAAGTAACAACCCATAAAAAGCGCTGCGTATGCGTATCTATCTGAGTCAGACTGCC
AGGTTACTCCAAGAGAATTAAGGTTAAAA

MTDPLRIAVSNASLLSPDSPSSSGPGSPRLSIPSPIITRRNRTHSVSERALANPLEHGVVKSFCRNRHGHGFITKEGKDIFVHISDIEGEYIPL
PGDEVSFRLCPIPPKYEKSQAVHVRIENFTPVDVHKRWDCPSDENG

Cold shock domain-containing protein E1 {ECO:0000305}

ATGTCGGGGCGCATCCGGTACCGAGCGCCAGACCACTCGGAGGTGGAGGTGCCGTTCCGGCGACAAGGACCAGCTGGGCGACTT
CACGCTCAAGCACGGTGACTGGGTGCAGTTCTGTGTGGCGACGGACCGGCGCGACCAGCTGCGCCGCGCGACGCGCATCACGC
TGCTCGAGGAGTCATTTGCCGTTTCGGGCGAGCGTCGCGAGCAGGGTGCCGTTGCCGCGCTCAAGGACGGCTTCGGCTTCGTGC
GCTGCGCGGAGCGCGATGCGCCTCGACTCTTCTTCCACTGCGCCGAGCTGCTGGACGCCGCCGCGGAGGGGGCCGCGCGTTGAC
GACCACGTCGAGTTTACCGTCGTGCACGACCAGGCCGATTTCGCTGGCAGCCGACAGTCGGCGATACGCATCAAGAGGCTGCCG
CCGGGCACGGTCGTGTTTCGAGACGCTCACCGAGCAGGGCGTGAGCGGCGTGTTGGCCAAGGAGGGTGTGCCCGGCAGCCAGC
GCAGCCCGTCGAAGAGCAGCAACGGAGCGCCGCCCGCCAGACGTCGCCGGACTCATCAACTACCAGGCCTCGGGCGGAGCCAAG
AAGACCGTCTCGTTCTTCCCGAAGGACTGCGACCTCAAGAACATGCCGCGGATCGGCGACAAGGTGGAGTTCAACCTGTGCCAGC
TGCGGCGCAGCAAGGAGCTGATCGCGGTGGCGGTGACAGTTGCTGGCGGTGGCGCCAGCGGCAGTAGCGGCGGAGGGGGCAC
GAAGCCACGTGCCGAGGCTTCATTGCCGCACTCAAGGACGGCTTCGGCTTCATCGAGGCCGACTCACACGACCGCGAGGTGTT
CTTCCACTTCAGCGCCGTCGACCCGAACATAACGCTCGAGCTCGGCTGCGAGGTGAGTACCAGGTGCGCCGCGACGTGGGTGC
AGCCAAGGTGGCGGCTGTGCGTCTGCCGAGACTGTGAAGCTGCTGCCGAAGGGCACGATCACCCAGGCGGAGGCGGGCGGA
GACTCGATGCGCGGGGAGGTGATGCGGCCGTTGCGTGGAGTCAACCCCGACCAGACGCAGTACGCGGGGCTGGTGCGGGCATG
CGTCGACGTGAGGCGGCCCGGTGCCGGGGGCGATGTGGATGATGAGGTGGCGGCGACCGCGGCGATCGCCAAGGGCAAGGAG
TACGAGTTCGGCATCACGGGGCTGGCCAACAAGCGAGAGCTGCTGCAGGTGCGCGACCCGGTCACGTTCCAGGTGGACGCCGA
CGGCCGGGCGGCCAACATCGTGGCCGTGCGGAAGAAGAGGCGCGCCATGGTCGACACCGTCAAAGGGCTGTTTGGGTTCCTGA
CGTACGAGGTGGACGAGGGCAAGAAGCTGTTCTTCCACATGTCGGAGGTGAAGGACGGCTCCGGTCTGCAGCCCGGCGACCAG
GTGGAGTTTGTGCCCGTGACGAACCAGCGCAACGGCAAGTCGTCGGCGTGCAACATACCAAAGTCAGCGACGCGCCGCGCCAG
GAGCGGCCCCGAGCGTCTGATCAGCCGACTGCGTACGATGTCGGTGGACGACGCTGGCCCCAAGCTGACAGTGGTACGTCAGCC
GCGCGGTCCCGACGGAACCTCGAGGCTTCGCGGCCAGCGTACGACTACCGCGGACGCCCCGGCTGCCTGGTTCGAGTAG

MSGRIYRAPDHSEVEVPFGDKDQLGDFTLKHGDWVQFCVATDRRDQLRRATRITLLEESFAVSGERREQGAVAALKDGFVRCAR
DAPRLFFHCAELLDAAEGPRVDDHVEFTVVHDQAGFAGSRQSIRIKRLPPGTVVFETLTEQGVSGVVAKEGVPGSQRSPSKSSNGAP
PPDVAGLINYQASGGAKKTVSFFPKDCDLKNMPRIGDKVEFNLCQLRRSKELIAVAVTVAGGGASGSSGGGKPTCRGFIAALKDGF
FIEADSHDREVFHFSAVDPNYTLELGCEVEYQVGRDVGGAKGGGCASAETVKLLPKGTITQAEAGGDSMRGEVMRPLRGVNPQTQY
AGLVRACVDVEAAGAGGDVDDEVAATAAIAKKEYEFGITGLANKRELLQVGDPVTFQVDADGRAANIVAVRKKRRAMVDTVKGLFGFL
TYEVDEGKKLFFHMSEVKDGSGLQPGDQVEFVPVTNQRNGKSSACNITKVSADPRQERPERLISRLRTMSVDDAGPKLTVVRQPRGPD
GTRGFAASVRLPRTPGCLVE

Anexo II: Datos de los genomas de plec6pteros.

Organismo	Identificador del genoma	Nombre del ensamble	Largo del genoma (pb)	Hemisferio
<i>Brachyptera putata</i>	GCA_907164805.1	iBraPut3m.1	436497185	Norte
<i>Brachyptera risi</i>	GCA_964007535.1	ipBraRisi1.1	680162462	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 grammatica</i>	GCA_945910005.1	iplsoGram3.1	874584190	Norte
<i>Leuctra nigra</i>	GCA_934045905.1	ipLeuNigr2.1	536280668	Norte

Anexo III: C6digos de acceso de las hsp y csp utilizadas para los alineamientos m6ltiples.

	<i>S. serialis</i>	<i>G. bimaculatus</i>	<i>B. germanica</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>A. aegypti</i>	<i>B. mori</i>	<i>M. sexta</i>
TRAP1	XP_049937567	GLH08792	PSN57500	A1Z6L9	Q17PR3	H9U397	A0A921Z9C7
Hsp 70-4L	XP_049959325	GLH02084	PSN34539	M9MSL3	A0A6I8TQ71	A0A8R1WHZ0	A0A921ZK98
Hsp 83	XP_049942374	GLH07833	PSN30086	P02828	A0A1S4FUH2	Q9BLC5	A0A921ZLB6
Hsp 60A	XP_049944976	GLH03684	PSN43817	O02649	Q16PM9	A0A8R2AFV9	A0A921ZTS8
Hsp 70c5	XP_049939669	GLH09424	PSN32841	P29845	A0A6I8U652	I6XKQ0	A0A922CTS6
Hsp 68	XP_049939435	GLG99747	PSN58403	O97125	A0A6I8U8L3	F8UN42	A0A921ZJB4
CSDE1	XP_049960695	GLH03657	PSN48449	M9ND61	A0A6I8TCP1	A0A8R1WPQ7	A0A922CTS1
Csp CG9705	*	GLH12857	PSN43571	Q9VVA0	Q16WE8	A0A8R1WNZ1	A0A921YS82

	<i>T. castenum</i>	<i>Z. nevadensis</i>	<i>C. secundus</i>	<i>R. prolixus</i>	<i>N. lugens</i>	<i>A. mellifera</i>	<i>N. vitripennis</i>
TRAP1	A0A139WAK8	A0A067RL09	A0A2J7PFN7	R4FQH4	XP_039294807	A0A7M7RA97	A0A7M7Q761
Hsp 70-4L	D2A3E8	A0A067R776	A0A2J7QEY4	T1HFC5	XP_039280226	A0A7M7GN12	A0A7M7H156
Hsp 83	D6WMW9	A0A067QP65	A0A2J7PU76	R4FMH8	XP_022202749	C1JYH6	A0A7M7J988
Hsp 60A	D6WKD1	A0A067QVI3	A0A2J7QKN9	T1IAB6	ANJ04669	A0A7M7R753	A0A7M7G1E7
Hsp 70c5	D6WA11	A0A067QIW0	A0A2J7QQY0	T1IAR5	XP_039282108	A0A7M6ULL9	A0A7M7LL53
Hsp 68	A0A139WDJ1	A0A067QTK9	A0A2J7PG88	T1HJT8	XP_022203279	A0A7M6UCT9	A0A7M7G248
CSDE1	D6WHZ1	A0A067RAW6	A0A2J7QNT2	T1HMA0	XP_039286517	A0A7M7IID1	A0A7M7QS03
Csp CG9705	D7EJZ2	A0A067RA16	A0A2J7R7H4	A0A905QWN0	XP_039275209	*	*