



ESCUELA DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS, ANIMALES Y AMBIENTALES
INGENIERÍA AGRONÓMICA

Rol de la hormona de la muda (20 Hidroxicdisona) en la capacidad reproductiva de hembras adultas de la tijereta de patas anilladas *Euborellia annulipes* (Dermaptera: Anisolabididae)

Nombre de la Estudiante: Jeraldly Peñaloza Reyes

Profesora guía: Paula Irles

Profesor colaborador: Andrés Sarrazin

Proyecto de Título para optar al título profesional de Ingeniera Agrónoma

San Fernando, Chile

AGOSTO 2025

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	3-7
1.1 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	8
2. MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.1 Mantenición de la colonia de insectos	9
2.2 Obtención de especímenes	9
2.3 Diseño experimental	10
2.4 Tratamientos	10
2.4.1 Tratamientos <i>in vivo</i> de 20E	10
2.4.1.1. Inyección de 20E	11
2.4.1.2 Caracterización del fenotipo	12
2.5 Tratamientos <i>ex vivo</i>	13
2.5.1 Cultivo de tejido ovárico	14
2.5.1.2 Incubación de tejido ovárico con 20E	15
2.5.1.3 Tinción con DAPI	15
2.6 Análisis estadístico	16
3. RESULTADOS	17
3.1 OE1: Evaluar el rol de la 20E en la maduración ovárica de hembras de tijeretas de patas anilladas <i>Euborellia annulipes</i> , mediante técnicas <i>in vivo</i>	17
3.1.1 Efecto de la 20E en el tiempo de maduración ovárica, oviposición y número de huevo	17
3.1.2 Tamaño de los folículos ováricos	18
3.2 OE2: Evaluar el rol de la 20E en la maduración ovárica de hembras de tijeretas de patas anilladas <i>Euborellia annulipes</i> , mediante técnicas <i>in vitro</i>	18
3.2.1 Puesta a punto de la técnica de cultivo de tejido ovárico en medios Grace y M3	18-20
3.2.2 Cultivo de tejido ovárico en Grace medium y 20E	20-22
3.2.3 Efecto de la 20E en el epitelio folicular	22
4. DISCUSIÓN	24-26
5. CONCLUSIONES	27
6. REFERENCIAS	28-33

1. INTRODUCCIÓN

El éxito evolutivo de los insectos se debe a su abundancia, diversidad y una amplia distribución en los ecosistemas (*Guzmán-Mendoza et al., 2016*). Los insectos mantienen complejas interacciones entre ellos y el ambiente (*Guzmán- Mendoza, 2010*). Sus proporciones en relación con el tamaño, capacidad reproductiva y esperanza de vida, están otorgadas por la ingesta de nutrientes tales como carbohidratos y proteínas y sobre todo por el control hormonal (*Otero-Moreno et al., 2016*). La reproducción sexual de los insectos, es un proceso complejo que requiere de una serie de interacciones entre machos y hembras, comportamentales, físicas y moleculares, las cuales son integrales para una futura generación exitosa. La interrupción de cualquiera de estas interacciones puede tener consecuencias importantes en la fertilidad (*García et al., 2022*).

La madurez reproductiva en insectos implica una serie de procesos biológicos, que involucran respuestas fisiológicas, a nivel celular y molecular. La ovogénesis que es el proceso que involucra la formación y desarrollo de los gametos femeninos presenta tres etapas claramente definidas: previtelogénesis, vitelogénesis y coriogénesis (postvitelogénesis). La previtelogénesis se caracteriza por ser una etapa previa a la acumulación de vitelo por parte del oocito, en donde ocurre un aumento de organelos celulares. La vitelogénesis en donde ocurre un crecimiento acelerado del oocito y se caracteriza por generar una alta acumulación de proteínas y lípidos de reserva para el futuro desarrollo del embrión. La coriogénesis que da como resultado un oocito rodeado de cubiertas protectoras, listo para ser fecundado (*Ramírez-Cruz, 2014*). Tanto la formación como la maduración del oocito consta de procesos altamente controlados, que deben ocurrir en el momento adecuado y en la secuencia correcta para que la embriogénesis se realice de manera exitosa (*Piulachs, 2016*).

El principal órgano que compone el sistema reproductor femenino y produce el gameto femenino es el ovario. En los insectos se distinguen dos tipos de ovarios; los que tienen ovariolos de tipo panoístico y los que tienen de tipo meroístico. El ovario panoístico, es el

más común, debido a que no solo está presente en los insectos, sino también en la mayoría de invertebrados y vertebrados (*Piulachs,2016*). Se diferencia del ovario meroístico debido a que este último, posee células trofocitarias (células nodrizas), las cuales proveen de nutrientes y citoplasma al oocito hasta que este alcanza la madurez. Dentro del tipo de ovario meroístico se diferencian los subtipos politróficos que acompañan al oocito en desarrollo en cada folículo ovárico y los telotróficos que se presentan células nodrizas al extremo de cada ovario (*Punta,2022*).

Los insectos poseen un complejo sistema endocrino, el cual conduce a diversos procesos como el crecimiento y el desarrollo, se trate para realizar sus procesos de muda o ecdisis o bien para completar el ciclo de metamorfosis, para su posterior reproducción (*Vladusic,1995*). La gran mayoría de los insectos se reproduce de forma sexual y con oviparidad; es decir, la hembra produce huevos, los que son fertilizados por el macho y ovipositados al medio externo. Las hormonas son los mensajeros químicos de los insectos, que son sintetizadas en las glándulas endocrinas clásicas y transportadas por la hemolinfa, actuando sobre los tejidos diana portadores de receptores en otras partes del cuerpo. Aquello permite que las células se comuniquen y participen en respuestas coordinadas, además participan en una amplia variedad de procesos fisiológicos que incluyen la embriogénesis, el desarrollo post-embrionario, el comportamiento, el metabolismo, la cópula, la diapausa, así como también la reproducción (*Klowden, 2008*).

Según Klein-Koch, en 1977 clasificó en tres grupos a las hormonas de insectos que cumplen con actividades significativas para el desarrollo; las primeras están formadas por las hormonas cerebrales, que son neuropéptidos, el segundo está compuesto por el grupo de las hormonas juveniles (JH), y el tercer grupo determinado como las hormonas esteroideas (*Otero-Moreno et al., 2016*). En relación al rol de estas hormonas en reproducción, la hormona juvenil (JH) es una hormona lipídica que aporta un importante papel en el desarrollo y la reproducción de insectos, y es secretada por las glándulas corpora allata, (*Castillo Gracia, 1996*). En la mayoría de los insectos la hormona juvenil tiene un rol principal en la maduración reproductiva y el comportamiento de apareo están

controlados por la alta concentración de esta hormona en la hemolinfa, así como también la disposición para la fecundación (Vladusic,1995).

Las hormonas esteroideas desempeñan funciones indispensables en todos los procesos biológicos de los insectos, son sintetizadas a partir de esteroides, como el colesterol o bien enzimas esteroidogénicas especializadas. Una vez producidas, las hormonas esteroides circulan en la hemolinfa y se transportan respectivamente a las células diana. Los complejos hormona/receptor nuclear afectan la expresión genética en las células diana, desencadenando una respuesta hormonal dependiente. Los ecdisteroides, especialmente la forma biológicamente más activa, la *20-hidroxiecdisona (20E)*, desempeñan funciones esenciales en la coordinación de las transiciones del desarrollo, como la muda de las larvas y la metamorfosis (Uryu *et al.*,2015). La 20E es una de las hormonas más importantes de los insectos, participa tanto en sus funciones vitales, así como también en la reproducción, y en algunas especies controla la oogénesis de insecto, lo cual es importante en las hembras para su posterior y correcta oviposición (Maestro-Garriga,2008). Uryu en 2015, describe a la 20E como un complejo heterodímero de proteína y presupone que una baja concentración de ecdisteroides es esencial para la oogénesis, pero que una alta concentración llegaría a causar la apoptosis de las células nodrizas en los óvulos de *Drosophila melanogaster*. Dado que en insectos adultos no se muestran cambios ni de morfología, así como tampoco de fisiología, no se había estudiado en profundidad las funciones de los ecdisteroides en la etapa reproductiva, ya que, una vez, que los insectos presentan ovarios adultos, son las células foliculares, así como también el corion que sintetizan 20E.

En el caso de mosquitos *Aedes aegypti*, cuyas hembras necesitan sangre de vertebrados para el desarrollo de sus huevos, y son causante de numerosas enfermedades, se sabe que el ciclo reproductivo de las hembras de los mosquitos, así como la pre vitelogénesis y la vitelogénesis están regulados por focos alternantes de hormonas de JH y 20E, por lo que necesitan de esta última para controlar la vitelogénesis y finalmente desarrollar el ovulo y posterior oviposición (Roy *et al.*, 2016).

Sin embargo, en la mayoría de los insectos, la hormona JH sigue siendo la principal hormona gonadotrófica que desencadena la expresión de genes de vitelogenina en el cuerpo graso, siendo primordial para la reproducción, como, por ejemplo, en lepidópteros e insectos hemimetábolos. No obstante, la 20E también cumple un rol en el control y regulación del nicho de células madres en el germanio durante la previtelogénesis (*Bellés et al., 2015*). Experimentos con relación a la ecdisona, han demostrado que en condiciones *in vitro* en la cucaracha alemana *Blattella germanica* tiene el efecto de inducir el depósito precoz de las capas que forman el corion y aumenta la maduración de los oocitos justo antes de su correspondiente oviposición (*Bellés et al., 1993*). Bellés y Piulachs en 2015 describieron el papel de la 20E en la oogénesis de insectos, desde el establecimiento y mantenimiento del nicho de las células madre hasta la formación de folículos ováricos, demostrando que la hormona interviene en estos procesos.

No obstante, los datos disponibles sobre el rol que desempeñan los ecdisteroides en la oogénesis no se ha descrito en insectos del orden Dermaptera, donde se conoce el rol de la hormona juvenil en la vitelogénesis (*Rankin et al., 1997*). Se sabe que la JH posee importantes funciones en el cortejo, apareamiento y comportamiento materno, además, en el ciclo ovárico, asociando a altos niveles de JH en el crecimiento de los ovocitos, apareamiento y termino del cuidado materno, mientras que los niveles bajos de JH están vinculados con el período de comportamiento materno y el lento desarrollo ovárico (*Rankin et al., 1997*). Las tijeretas pertenecen al orden Dermaptera y corresponden a insectos que viven en ambientes cálidos y húmedos, como, por ejemplo, debajo de madera podrida, dentro de grietas, entre rocas y en medio de hojarasca y follaje. Se distinguen fácilmente por sus cercos con su particular forma de fórceps (*Wang et al., 2022*). La mayoría de las especies de tijeretas se caracterizan por ser nocturnas, omnívoras y las hembras presentan un cuidado maternal prolongado de los huevos (*Peng et al., 2022*).

La preferencia trófica en los dermápteros incide en que las tijeretas pueden comportarse como insecto plaga al dañar plantas hortícolas, pero que, a su vez, es un depredador en los agroecosistemas que favorecen la producción (*Gonzales, 2017*). Dado que, poseen una

alta capacidad para atacar y alimentarse de diferentes presas, particularmente de huevos y estados inmaduros de insectos de diferentes ordenes, como Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera y Diptera (Silva et al., 2014).

El orden Dermaptera es un orden pequeño representado por 11 familias. La tijereta de patas anilladas *Euborellia annulipes* pertenece a la familia Anisolabididae, una familia basal dentro del orden. Es una especie cosmopolita y se reconoce por su particular característica morfológica de tener las patas con un diseño de anillos más oscuros. Aunque comparte las generalidades que poseen todos los dermápteros; es decir, posee un cuerpo aplanado, tiene cercos distintivos, su reproducción es ovípara y también presenta un comportamiento de cuidado maternal de sus huevos posterior a su oviposición (Núñez-Pascual et al., 2023). En relación con la estructura ovárica de las tijeretas, estas poseen un ovario de tipo meroístico politrófico, pero con la característica y particularidad de que el oocito está acompañado por una única célula nodriza, generando que este atributo, sea sujeto de estudio para conocer más aspectos en cuanto a su reproducción ovípara, como la mayoría de las especies del orden (Núñez-Pascual et al., 2023).

En esta investigación se estudiará el rol que posee la 20 hidroxiecdisona en la capacidad reproductiva de las tijeretas adultas de *E. annulipes*, así como también verificar el efecto que tiene la hormona en la oviposición. Para ello se determinará el rol de la hormona tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* para obtener resultados prácticos y observables con la finalidad de responder si afectan la capacidad reproductiva. Dado que la aplicación de insecticidas sintéticos es una de las prácticas más habituales para el control de plagas, existe la búsqueda constante de alternativas como lo son insecticidas biorracionales; donde se encuentran el uso de reguladores de crecimiento como son las hormonas que interfieren en los procesos fundamentales de desarrollo, crecimiento y reproducción (Murillo-Cuevas et al., 2020). De esta forma, a través de esta investigación se generará información de base con el fin de descifrar posibles herramientas biorracionales de control de plagas, con énfasis en taxones menos estudiados como Dermaptera.

1.1 Hipótesis

H: La 20-hidroxiecdisona interfiere en la capacidad reproductiva de la tijereta de patas anilladas al afectar la oviposición en hembras adultas.

1.1 Objetivo general

Determinar el rol de la hormona de la muda (20-hidroxiecdisona) en la capacidad reproductiva de hembras adultas de la tijereta de patas anilladas *Euborellia annulipes*.

1.1 Objetivos específicos

OE1: Evaluar el rol de la 20E en la maduración ovárica de hembras de tijeretas de patas anilladas *Euborellia annulipes*, mediante técnicas *in vivo*.

OE2: Evaluar el rol de la 20E en la maduración ovárica de hembras de tijeretas de patas anilladas *Euborellia annulipes*, mediante técnicas *ex vivo*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Entomología ubicado en el Campus Rancagua de la Universidad de O'Higgins, en la comuna de Rancagua.

2.1 Mantención de la colonia de insectos

Los especímenes de tijeretas *Euborellia annulipes* fueron obtenidos de una colonia establecida previamente, desde una cámara de crecimiento en el laboratorio de entomología, bajo condiciones controladas de temperatura de 28°C y humedad relativa entre 60 y 70 %, así como fotoperiodo 12D:12N. La alimentación de las tijeretas constó de alimento seco en pellets para gatos de la marca Purina *CatChows*, la cual fue cambiada constantemente y suprimida mientras la hembra está en cuidados maternos. Adicionalmente, se les proveyó de agua *ad libitum*.

2.2 Obtención de especímenes

Hembras y machos de *E. annulipes* fueron obtenidos desde la colonia y colocados para el apareamiento en placas Petri, en relación 1:2, esto aseguró el correcto apareamiento de la hembra, los machos fueron separados de las hembras, una vez que se observó la primera puesta de huevos. Las hembras se mantuvieron con los huevos, teniendo las condiciones de incubación mencionadas anteriormente. Posterior a ello, se aisló la tijereta madre y solo se separó de sus crías hasta el segundo estadio de muda, donde las ninfas comienzan a realizar vida independiente. Consecutivo a ese proceso, se clasificaron las tijeretas por estadios y se separaron por sexo antes de llegar al último estadio de adulto para mantener controlada la reproducción.

Los especímenes que se utilizaron en esta investigación fueron hembras recién emergidas en su etapa adulta, las cuales se dejaron en puestas con machos para asegurar que sean fértiles y se seleccionarán en diferentes edades, en función del desarrollo ovárico y los objetivos de la investigación.

2.3 Diseño experimental

Para todos los objetivos, se presentó un diseño experimental completamente al azar y se definieron diferentes ensayos con sus respectivos tratamientos de acuerdo a las actividades asociadas a los objetivos.

2.4 Tratamientos

Objetivo 1: este objetivo buscó evaluar el rol de la 20E en la maduración ovárica de hembras de tijeretas de patas anilladas *Euborellia annulipes*, mediante técnicas *in vivo* para su cumplimiento se diseñaron los siguientes tratamientos.

2.4.1 Tratamientos in vivo de 20E

Los tratamientos fueron denominados como T0: tratamiento control, T1: tratamiento con etanol al 100% grado molecular como solvente de la ecdisona, seguidos por T2 y T3 con 5 y 10 micro molar (μM) de 20-hidroxiectdisona marca Sigma Merck 20-Hydroxyecdysone, $\geq 93\%$ (HPLC), powder código H5142 respectivamente. Para cada tratamiento, se realizaron 4 repeticiones.

En este objetivo se seleccionaron 16 tijeretas hembras adultas recién mudadas y se dividieron en 4 grupos para cada tratamiento. Se realizaron 4 repeticiones, contando con un tamaño muestral final de 64 tijeretas.

La variable medida fue el tamaño de los folículos ováricos, basal, sub basal y tercero de tres ovariolos. Cuando se midió el tamaño del ovario (ovariolo) se añadió el largo de la tibia izquierda del primer par de patas, como covariable, para correlacionar con el tamaño de la hembra.

2.4.1.1. Inyección de 20E

Para evaluar el rol de la 20E en la maduración ovárica, las hembras adultas de *Euborellia annulipes* fueron inyectadas en el abdomen con la ayuda de una microjeringa Hamilton (Hamilton Company, Reno, NV, EE. UU.). Para los tratamientos con 20E se utilizó la

hormona comercial 20E. Para la inyección de las tijeretas, éstas se colocaron bajo un flujo leve de CO₂ por un minuto, para obtener un adormecimiento eficaz e inyectar sin que el movimiento sea un factor de inhibición o impedimento. Una vez que se aseguró el correcto adormecimiento de la tijereta de forma visual y no mostrar ningún tipo de movimiento, se procedió a inyectar la solución de cada tratamiento en el abdomen, por la parte ventral, procurando no afectar al insecto. Se coloca bajo una lupa binocular (Meiji) y con la ayuda de pinzas entomológicas se asegura su correcta posición y firmeza. Una vez que ya se tiene visualizado donde será la inyección, que puede ser en el segundo o tercer esternito después de sus fórceps se toma la jeringa y se introduce levemente a la tijereta para evitar daño a algún órgano, una vez que se introduce el líquido, se sacó la jeringa con cuidado y se esperó a que despierte la tijera, para asegurar su viabilidad para la experimentación.



Figura 1. Modelo de tijereta para inyección. Hembra recién emergida adulta, en posición ventral, dormida con CO₂, lista para ser inyectada. Imagen propia.

Las soluciones fueron inyectadas en un volumen de 1 µl para asegurar que el contenido es incorporado dentro del insecto de acuerdo a las condiciones fisiológicas del insecto. Adicionalmente, fueron implementados dos controles, uno inyectado con etanol al 100% grado molecular y otro sin inyectar, este último para tener certeza de la influencia de la hormona, así como también si influye el etanol. A los ocho días después de la inyección (Add8), fueron seleccionadas dos tijeretas de cada grupo al azar para realizar la disección

de los ovarios. El resto de las tijeretas fueron evaluadas, hasta la observación de la oviposición por cada tratamiento experimental.

2.4.1.2 Caracterización del fenotipo

Si bien el ciclo gonadotrófico de las tijeretas en las condiciones de crianza es de 12 días, se procedió a realizar la disección de ovarios de las hembras a los 8 días después de la inyección (AdD8), dado que es la fase final de la vitelogénesis. Se seleccionaron al azar 2 tijeretas de cada tratamiento para realizar una disección de sus ovarios, la que se llevó a cabo bajo anestesia de CO₂, pinzas y alfileres entomológicos, para observar y caracterizar el tejido.

La variable a medir fue el tamaño de los folículos, acompañado del largo de la tibia izquierda del primer par de patas. Además del tiempo de desarrollo embrionario y número de huevos. Esto se realizó observando los días que tardó la tijereta en ovipositar.

Para cada tijereta se extrajeron ambos ovarios, en donde, en cada uno de los ovarios se escogió 3 ovariolos y de cada ovario se obtuvo la medida de la longitud del folículo ovárico basal, sub basal y tercero. Esto fue realizado con un microscopio lupa binocular (Modelo Meiji, Japón) en aumento 4.5X.

Para la transformación a mm se utilizó la siguiente fórmula:

$$=X / 4,5 * 22,5 / 1000$$

Así mismo, para medir el tamaño de la tibia, se utilizó el mismo procedimiento, pero en un aumento de 0,7, por lo que la transformación a mm fue la siguiente:

$$= X / 7 * 22,5 / 1000$$

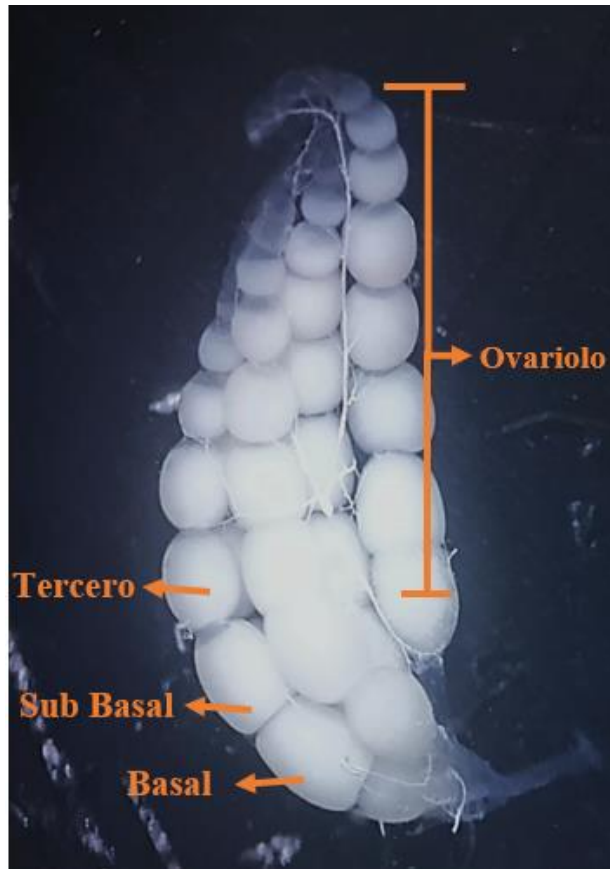


Figura 2. Ovario de tijereta *E. annulipes*. En la imagen se aprecia un ovario, el cual, está formado por 5 ovariolos, los cuales a su vez están formados por los folículos ováricos identificados como basales, subbasales y el tercero, y otros en diferente grado de crecimiento. Imagen propia.

2.5 Tratamientos *ex vivo*

Para cumplir con el objetivo 2, que es evaluar el efecto de la 20-hidroxiecdisona (20E) en la maduración ovárica, se llevaron a cabo experimentos *ex vivo*. Estos experimentos involucraron la exposición de los ovarios a la hormona en un entorno controlado de laboratorio, permitiendo una evaluación precisa de su influencia en el proceso de maduración. Esta técnica no se ha desarrollado en laboratorio antes, por lo que en esta tesis se propuso realizar y establecer la técnica de mantención de tejido *ex vivo*, y así, examinar la influencia de la hormona con soluciones de crecimiento.

2.5.1 Cultivo de tejido ovárico

Primero se desarrolló un protocolo específico para la técnica de cultivo de tejido ovárico en medios de crecimiento. Esto implicó recolectar ovarios de hembras adultas de *Euborellia annulipes* en diferentes etapas de desarrollo (previtelogénesis, vitelogénesis y coriogénesis). Estas etapas se conocen en el laboratorio debido a datos previamente obtenidos en experimentaciones realizadas con anterioridad (Núñez-Pascual *et al.*, 2023). Los ovarios diseccionados fueron de hembras emergidas adultas de día 4 para previtelogénesis, días 6 para vitelogénesis y día 9 para coriogénesis. Para evitar la deshidratación de los ovarios al momento de extracción, todas las disecciones se llevaron a cabo bajo solución salina de Ringer para insectos.

Solución salina Ringer

NaCl	9 g/l
KCl	0,2 g/l
NaHCO ₃	0,2 g/l
CaCl ₂	0,2 g/l

Se seleccionaron dos medios de cultivos: Grace's Medium (Sigma- Aldrich) y Shields and Sang M3 insect medium (Sigma s3652), de acuerdo a la literatura existente en cultivos *in vitro* en insectos (Macaya *et al.*, 2016) los cuales fueron llamados medio 1 y medio 2 respectivamente. Ambos fueron preparados con un suplemento al 10% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich) que enriquece los medios de cultivo celular debido a su elevado contenido nutricional promoviendo y mantiene con eficacia el crecimiento de células de mamíferos e insectos. Además de 0,0625 ml de gentamicina, antibiótico que impide el crecimiento de bacteriano.

Fueron utilizados ambos ovarios de cada hembra. El ovario derecho fue medido antes de colocarlo en el medio y posterior a las 48 horas. En donde también fueron medidos todos los ovarios. Se emplearon placas estériles de 24 pocillos para incubar los tejidos, cada pocillo tuvo una concentración de 800 microlitros de solución y se trabajó bajo campana

de flujo laminar, para una mayor esterilización. Finalmente, se obtuvo 3 repeticiones por tratamiento.

2.5.1.2 Incubación de tejido ovárico con 20E

Una vez se desarrolló la metodología de crecimiento ovárico *ex vivo*, se procedió a realizar el ensayo con los tratamientos de ecdisona (20E). Para esto se añadió al medio de cultivo Grace's Medium, 20E en dosis de 5 y 10 micro molar. Cada tratamiento contó con 6 réplicas y se realizaron 3 repeticiones biológicas.

Se extrajeron ovarios de hembras a los días 8 (D8) y 10 (D10) días post emergencia adulto, los cuales fueron sometidos a los tratamientos de 20E y observados al cabo de 24 horas. Al término de la observación se obtuvieron 3 ovarios de cada réplica para cada tratamiento.

Se midió el largo del folículo y fue sometido a una tinción celular con DAPI (tinción de ADN) para determinar viabilidad y crecimiento celular y observación de los núcleos de células foliculares. Además, se observó la apariencia de las muestras luego del periodo de incubación.

2.5.1.3 Tinción con DAPI

1. Fijar los ovarios incubándolos en Paraformaldehído (PF) 4% en PBS durante 2 hrs en agitación suave pero continua.
2. Lavar 3 veces durante 10 min con PBS 0,2M
3. Permeabilizar los tejidos incubándolos en PBT (tween o triton) durante 15 min a temperatura ambiente
4. Incubar durante 10 min con una solución 1 ug DAPI (Sigma código 1616913)/ml PBT
5. Lavar el exceso de marcaje mediante 3 lavados de 5 min con PBS 0,2 M
6. Montar las distintas preparaciones en medio de montaje Mowiol 4-88 (Carbiochem)

PBS 0,2 M = para 1 L

- 100 ml PBS
- 800 ml H₂O
- Ajustar a Ph 7,4 para estándar
- Enrasar a 1L y autoclavar

PBT (0,2 M PBS, 0,2% Tween 20) 4°C = para 50 mL

- 49 mL PBS 0,2 N
- 1 mL Tween 20 10%

Posterior a la tinción los ovarios fueron montados en medio mowiol (marca SIGMA) en portaobjetos, cubiertos con cubreobjetos y observados en un microscopio de fluorescencia (Apotome – Zeiss) Axio observer 7, el cual se ubica en los laboratorios del Instituto de Ciencias de la Salud en Campus Rancagua. Los filtros de fluorescencia mediante lámpara de xenón para DAPI se usaron en un rango de excitación de 335-383 nm y rango de emisión de 420-470 nm. Las fotografías se tomaron con el software del microscopio (ZEN) y observadas posteriormente con software Fiji para edición.

Las variables por observar serán promedio del largo del folículo ovárico, presencia de divisiones celulares y morfología de las células somáticas.

2.6 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico con la comparación de los resultados obtenidos entre objetivos de forma independiente. Se obtuvieron los supuestos de homogeneidad y homocedasticidad y dado aquellos resultados, se determinó que la mejor forma de obtener medias y desviación estándar (DE) fue mediante la prueba de Shapiro-Wilk que permite identificar las variables de los resultados obtenidos y de aquella manera determinar efectos en los datos de interés. y para ello se usó el software estadístico Infostat versión estudiantil.

3. RESULTADOS

3.1 OE1: Evaluar el rol de la 20E en la maduración ovárica de hembras de tijeretas de patas anilladas *Euborellia annulipes*, mediante técnicas *in vivo*

3.1.1 Efecto de la 20E en el tiempo de maduración ovárica, oviposición y número de huevos.

Los tratamientos con la hormona mediante técnicas *in vivo* en la tijereta de patas anilladas *Euborellia annulipes* no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. Como se puede apreciar en la tabla 1, el tratamiento con 5 mM 20E (n=8) demoró en promedio 15,3 días en ovipositar y el número promedio de huevos en su primera ovipostura fue de $43,5 \pm 7,11$ DS. Las tijeretas inyectadas con etanol obtuvieron un promedio de 43,3 huevos y demoraron 14,6 promedio en ovipositar y el control obtuvo un promedio de 13,5 días en lograr su oviposición y un número de huevos promedio de 48,12.

En todos los casos nombrados anteriormente el número de huevos y las eclosiones no tuvieron variación significativa. No obstante, en el tratamiento con 10 mM 20E (n=8) ninguna de las hembras fecundadas logró ovipositar, y, por lo tanto, no se tienen valores ni para el número de huevos ni eclosiones.

Tabla 1: Tiempo promedio a la oviposición, número de huevos y porcentaje de emergencia por tratamiento.

Tratamientos	Nº días de inyección a oviposición	Nº huevos	Emergencia
Control	13,5 $\pm$ 4,21b	48,12 $\pm$ 11,56b	100%
Etanol	14,625 $\pm$ 3,96b	43,5 $\pm$ 7,11b	100%
5 mM 20E	15,375 $\pm$ 3,96b	43,5 $\pm$ 4,59b	100%
10 mM 20E	0 $\pm$ 0a	-	-

De acuerdo a la prueba de Kruskal Wallis, la medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.1.2 Efecto de la 20E en el tamaño de los folículos ováricos

De acuerdo a la tabla 2 en relación al promedio del diámetro de los folículos basales, no existe diferencia significativa, ni en los ovarios sub basales ni terceros. Si existe una pequeña diferencia entre el control y el etanol la cual es de 0,04, pero el valor no logra ser significativo como para determinar una diferencia estadística . Pero sí se puede inferir que

el etanol podría lograr una disminución en el tamaño del diámetro del folículo ovárico basal, cuando no está presente la hormona 20E.

Tabla 2: Diámetro promedio de la medida del diámetro de los folículos basales de los ovarios basales, sub basales y terceros.

Longitud de los folículos basales en mm			
Tratamiento	Basal	Subbasal	Tercero
Control	0,19±0,02b	0,18±0,02a	0,17±0,02a
Etanol	0,15±0,04a	0,15±0,04a	0,14±0,04a
5 mM 20E	0,17±0,02ab	0,17±0,02a	0,16±0,02a
10 mM 20E	0,18±0,01ab	0,18±0,02a	0,17±0,02a

De acuerdo a la prueba de Kruskal Wallis, la medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

3.2 OE2: Evaluar el rol de la 20E en la maduración ovárica de hembras de tijeretas de patas anilladas *Euborellia annulipes*, mediante técnicas *in vitro*

3.2.1 Puesta a punto de la técnica de cultivo de tejido ovárico en medios Grace y M3

Al probar estos dos medios, se buscó encontrar las condiciones para homologar o bien simular, lo máximo posible, las condiciones fisiológicas de los ovarios en 3 momentos diferentes del ciclo gonadotrófico de la hembra adulta. No obstante, como se puede apreciar en la figura 3, los ovarios no crecieron en condiciones *in vitro*, en ninguno de los medios, mostrando una diferencia significativa en relación al grupo control, es decir, ovarios que se desarrollaron dentro de la tijereta.

No se apreció crecimiento del ovario durante la fase de vitelogénesis (día 6 post emergencia adulta) (Figura 4), tampoco se puede apreciar un crecimiento de los ovarios en relación al grupo control, incluso a las 48 horas, se muestra una leve disminución del

tamaño, lo cual puede significar una contracción de los ovarios. Por el contrario, y tal como se muestra en la Figura 5, en los folículos ováricos post vitelogénesis (día 9 post emergencia adulta) los ovarios se mantuvieron en tamaño en relación al grupo control. También se puede distinguir que no existió una gran diferencia entre el crecimiento a las 48 horas en el medio y el grupo control, esto último se puede inferir, haciendo alusión a que, en esta etapa, post vitelogénica, los ovarios ya han utilizado todas sus reservas por lo que ya crecen, si no que comienza otra etapa, la coriogénesis. Esto se evidenció en todas las mediciones de ovarios, es decir, en ovarios basales, subsales y terceros.

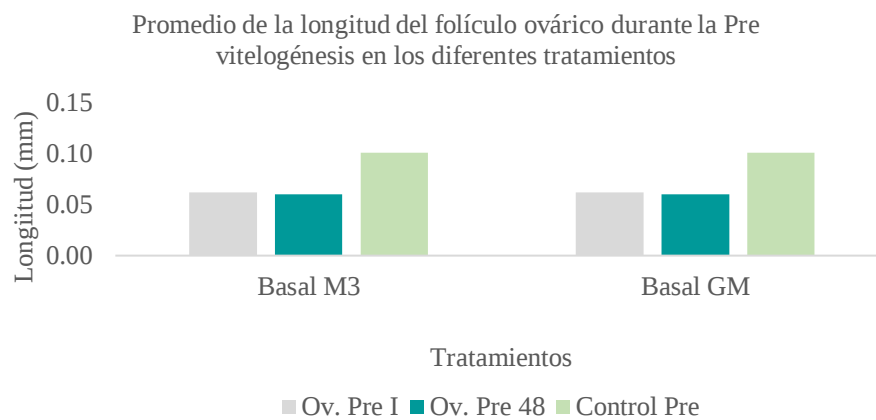


Figura 3. Longitud de los folículos ováricos durante la fase de previtelogénesis (día 4 post emergencia adulta). Pre I: previtelogénesis inicial, Pre 48: a las 48 horas y Control Pre son ovarios que no se dejaron en solución.

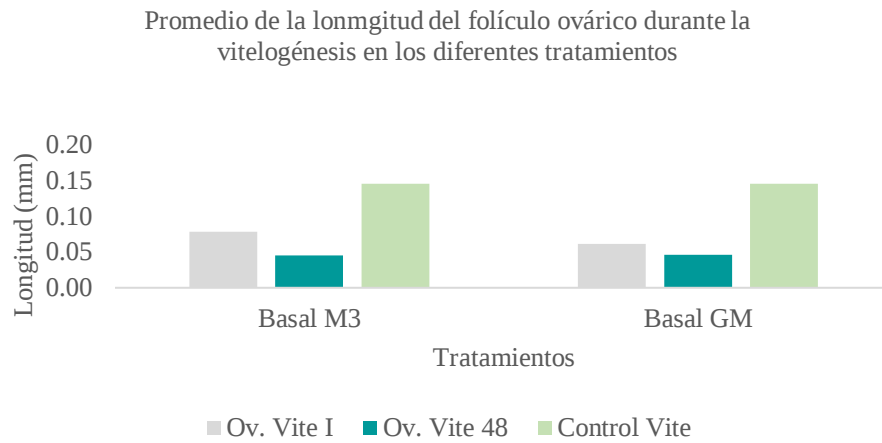


Figura 4. Longitud de los folículos ováricos durante la vitelogénesis (día 6 post emergencia adulta). Vite I es vitelogénesis inicial, Vite 48, son pasadas las 48 horas y Control Vite son ovarios que no se dejaron en solución.

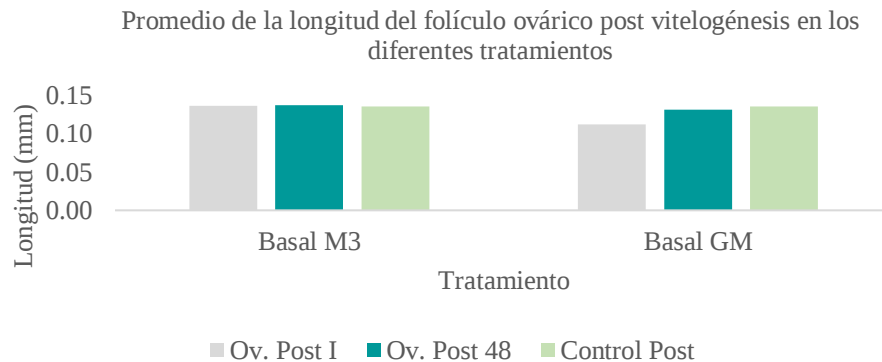


Figura 5. Longitud de los folículos ováricos post vitelogénesis (día 9 post emergencia adulta). Post I es postvitelogénesis inicial, Pre 48, son pasadas las 48 horas y Control Pre son ovarios que no se dejaron en solución.

3.2.2 Cultivo de tejido ovárico en Grace medium y 20E

A partir de los resultados anteriores, se decidió usar el medio Grace en post vitelogénesis. Ocupando ovarios de tijereta en días 8 y 10 post emergencia adulta, dado que, fue en donde los folículos ováricos mantuvieron su tamaño. Esta vez se le añadió 20E al medio de cultivo en dosis de 5 uM y 10 uM de 20E, las cuales fueron denominadas como solución

1 y solución 2 respectivamente. Además, se añadió un grupo control el cual no tenía ecdisona.

Se midieron tres folículos ováricos y se dejaron por 24 horas en el medio de cultivo. Se midió el tamaño de los folículos ováricos antes y después del tiempo estimado. Como se puede observar en la tabla 3, día 8 post emergencia adultas. El grupo control como la solución 1, tienen un diámetro menor pasadas las 24 horas en solución, mientras que en la solución 2, se mantuvo el tamaño inicial. En relación a la turgencia y el color de los ovarios, no había diferencia en comparación a los ovarios normales. Por otro lado, como se puede observar en la tabla 4, que corresponde al promedio de las tijeretas de 10 días de adultez, tanto en las hembras Control, y soluciones 1 y 2, los valores iniciales del tamaño del diámetro folículo ovárico se mantuvieron y fueron los mismos al cabo de 24 horas. En relación a la turgencia, los ovarios estaban muchísimo más débiles que los ovarios normales, es decir, se desarmaban con facilidad y menos filamentos de unión entre los folículos ováricos, lo que dificultó tomarlos con las pinzas sin que se desarmara el ovario.

Tabla 3:

Tabla del promedio de la medida del diámetro de los folículos basales de las tres repeticiones, con dos soluciones (dosis) diferentes de 20E más el grupo control en tijeretas adultas de día 8

Longitud promedio (mm)			
	Tamaño ovarios día 8	Tamaño 24 hrs en solución	Tamaño tibia
Control	0,13±0,01	0,12±0,00	0,02mm
20E- 5um	0,14±0,01	0,15±0,00	0,03mm
20E-10um	0,12±0,00	0,12±0,00	0,03mm

De acuerdo a la prueba de Kruskal Wallis, la medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 4:

Promedio de la medida del diámetro de los folículos basales de las tres repeticiones, con dos soluciones (dosis) diferentes de 20E más el grupo control en tijeetas adultas de día 10

Longitud promedio (mm)			
	Tamaño ovarios día 8	Tamaño 24 hrs en solución	Tamaño tibia
Control	0,17±0,00	0,17±0,00	0,02
20E- 5um	0,17±0,00	0,17±0,00	0,02
20E-10um	0,17±0,00	0,17±0,00	0,02

De acuerdo a la prueba de Kruskal Wallis, la medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

3.2.3 Efecto de la 20E en el epitelio folicular

En relación al tratamiento y observación a día 10 de adultos, no se consideraron dado que el microscopio enfocaba sólo las células de la periferia. En relación a las fotografías del día 8, las células foliculares correspondientes a los folículos del tratamiento control, el aspecto de estas es uniforme en cuanto a su distribución y tamaño de núcleo (Figura 6A y 6B). Tampoco se observan células en mitosis, pues en ese momento las divisiones celulares ya se han detenido. Si bien al observar los folículos tratados con 5 micromolar de 20E también hay una homogeneidad (Figura 6 C, D), estas células se ven más pequeñas. En relación al tratamiento con 10 micromolar de 20E (Figura E y F), el epitelio folicular se observa heterogéneo en cuanto al tamaño de las células foliculares y se observan algunas células de gran tamaño. Del mismo modo se perciben algunos núcleos picnóticos reflejados en concentración de DAPI como señal de comienzo de la degradación del epitelio por muerte celular (Figura 6E).

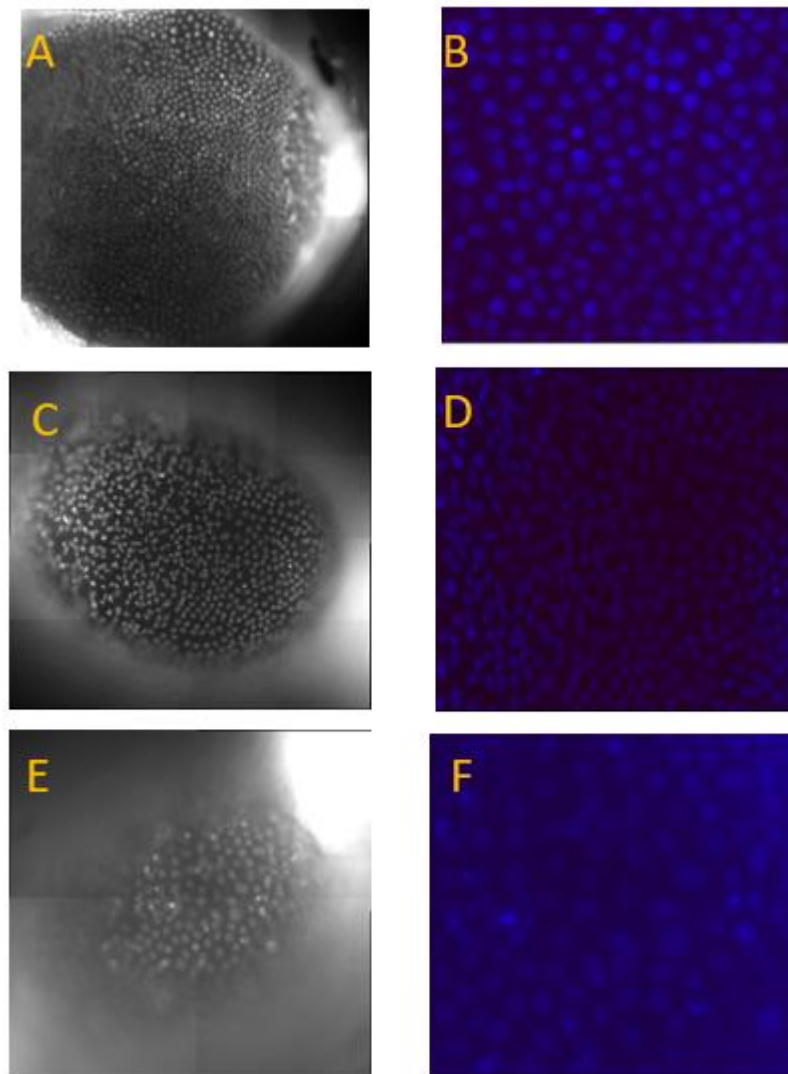


Figura 6. Imágenes de células foliculares a día 8 de adulta. A y B: Folículo ovárico sin tratamiento de día 8 y un zoom de sus células. C y D: Folículo ovárico a día 8 con tratamiento de 5 micromolar de 20E. E y F; Folículo ovárico a día 8 con tratamiento de 10 micromolar de 20E y zoom de sus células. El color Azul (marcaje de DNA). Las imágenes en blanco y negro están a 40X y las imágenes marcadas con Dapi en 60X.

4. DISCUSIÓN

En este estudio se buscó determinar el rol de la hormona de la muda (20-hidroxiecdisona) en la capacidad reproductiva de hembras adultas de la tijereta de patas anilladas *Euborellia annulipes* en cuanto a la maduración ovárica y oviposición de las hembras adultas mediante técnicas *in vivo* como *ex vivo*.

Se observó que la hormona de la muda (20-hidroxiecdisona), tiene un efecto en la capacidad reproductiva de hembras adultas de la tijereta de patas anilladas *Euborellia annulipes*, al inhibir la oviposición inyectando dosis de 10 micromolar de 20E a la tijereta de forma *in vivo*, esto debido al exceso de 20E al momento de ovipositar. Experimentos anteriores sobre el efecto que tiene la ecdisona en el desarrollo ovárico de *Locusta migratoria* (Lagueux *et al.*, 1977), demostraron que los ecdisteroides están presentes en pequeñas cantidades en ovarios jóvenes y que aumentan al final de la maduración de los oocitos, pero que caen bruscamente al momento de completar la vitelogénesis, por lo que al momento de la puesta de huevos, no se encuentra presente, por lo que, si está presente, no existirá oviposición, lo cual explicaría que al inyectar 10 micromolar de ecdisona, esta hormona queda circulando en el metabolismo del insecto, por lo que le impediría la puesta de huevos.

Esto último es diferente, con los resultados obtenidos en el estudio del rol de la 20 E en la coriogénesis de *Blattella germanica* (Bellés *et al.*, 1993), ya que dosis de 2 y 0.2 micromolar de ecdisona, generó que existiera una deposición precoz de materiales del corion y una degeneración celular en el epitelio folicular. Este experimento además consolida el hecho de que los antagonistas de las ecdisonas afectan negativamente la coriogénesis, mientras que los agonistas de ecdisona podrían inducir una coriogénesis precoz. Ambos resultados conducen a un resultado final de esterilidad temporal o permanente en el insecto. Por lo que el efecto que tendrá la ecdisona, dependerá de cada insecto y su interacción con los agonistas y antagonistas (como, por ejemplo, la hormona JH). Esto último también relacionado con lo observado en el día 8 post emergencia

adultas, en donde el epitelio tiene signos de muerte celular lo que quizás impida que se forme apropiadamente el corion y por esto las hembras de tijeretas no ovipositen.

En relación a técnicas *ex vivo* usando dos medios de cultivos: Grace's Medium y Shields and Sang M3 insect medium, estos medios, se seleccionaron de acuerdo a la literatura existente en cultivos *in vitro* en insectos, ya que contienen los ingredientes necesarios y óptimos para el cultivo de tejido celular. En ambos casos, no se agregó ninguna proteína extra más que suero fetal bovino. Con esto se esperaba igualar las condiciones que presenta el ovario de la tijereta para que los folículos ováricos lograran crecer. El objetivo en relación a la técnica de cultivo de tejido *ex vivo* se logró, ya que fue posible mantener los folículos ováricos en condiciones apropiadas, cuando ya se había detenido su crecimiento, por lo que se observa el efecto de la hormona en postvitelogénesis. No obstante, en el caso de los ovarios en fases de previtelogenesis y vitelogenesis no se logró incubar y que el ovario crezca bajo las condiciones probadas, por lo que, esto se debe seguir desarrollando el laboratorio para poder usar como técnica en las diferentes etapas de la ovogénesis.

Es complejo lograr un crecimiento ovárico fuera de la tijereta, no obstante, se tuvo un leve crecimiento al día 9 de adultez, es decir, post vitelogénesis, con el medio Grace's. Experimentos relacionados a la maduración ovárica en *Blattella germanica* (Ciudad, 2009), se determinó que el oocito necesita de un muy preciso control de la maduración para que, una vez fertilizado, el embrión se desarrolle con normalidad, por lo que sus proteínas de reserva proveerán de sustancias nutritivas al término de la ovogénesis, por lo que explicaría el aumento del diámetro del folículo ovárico en esta etapa.

Al incorporar ecdisona al medio Grace's, no solamente se esperaba ver su efecto en el corion y en su epitelio folicular, sino que también un mantenimiento y viabilidad celular, debido a esto último, es que se procedió a realizar tinción DAPI. Además de entender el efecto de la 20E en las células foliculares que son las que sintetizan la ecdisona en post vitelogénesis para la formación del corion, dado que un aumento de la 20E en esta etapa, actúa de manera negativa para el desarrollo de los huevos, dado que, generaría una

reabsorción de la vitelogenina (*Khalid et al., 2021*). En *Drosophila* un estudio que investigó la muerte celular en el ovario (*McCall, 2004*) concluyó que los precursores de 20E pueden transportarse entre las células nodriza y las células foliculares y que la conversión final a 20E por una enzima llamada P450 20-hidroxilasa era suficiente para rescatar la viabilidad celular pero no la fertilidad en las moscas. Por lo tanto, el resultado final de la señalización de ecdisona podría verse influenciado por varios factores, incluidos los niveles de los ligandos, los receptores y sus múltiples isoformas. Aquello concluyente con la investigación, ya que, si bien se sabía y se tenía una idea de la importancia de la ecdisona en oogénesis en otros insectos, no se sabía que podía producir en el insecto de estudio *Euborellia annulipes*, dado que posee la particularidad de poseer solamente una célula nodriza que acompaña a cada folículo ovárico.

5. CONCLUSIONES

Se comprueba la hipótesis de que la 20-hidroxiecdisona interfiere en la capacidad reproductiva de la tijereta de patas anilladas al afectar la oviposición en hembras adultas, dado que se impidió la oviposición. Los resultados obtenidos en esta investigación aseguran que, en dosis altas de hormona, una inyección *in vivo* de 10 micro molar de la hormona 20-hidroxiecdisona en tijeretas hembras recién emergidas a adultas, genera una inhibición en la oviposición.

Además de constatar que fue posible ver el efecto directo de la hormona ecdisona de forma *ex vivo*, al observar la estructura de las células foliculares en etapas de post vitelogénesis.

En consecuencia, si se quiere investigar más a fondo el rol de la ecdisona en etapas tempranas de la oogénesis de la tijereta *Euborellia annulipes*, en condiciones *in vivo* se debería utilizar dosis inferiores de hormona de las utilizadas en este trabajo, para que esta última no interfiera con la fertilidad, ni el objetivo de estudio. De la misma manera, si se quiere trabajar de forma *ex vivo* con ovarios de pre vitelogénesis o vitelogénesis en sí, agregar proteínas adicionales a los medios, para asegurar el crecimiento y viabilidad celular.

La relevancia de esta investigación radica en que permite explorar más en relación a cómo influye la ecdisona en la reproducción de hembras de tijeretas y conocer aspectos relevantes del sistema endocrino, dado que las hormonas no solamente afectan la reproducción en los insectos, sino que también su crecimiento y desarrollo, de la misma manera, conocer más sobre reguladores de crecimiento en diferentes procesos vitales de los insectos y que puedan tener profundidad en manejo integrado de plagas

6. REFERENCIAS

Bellés, X., Cassier, P., Cerdá, X., Pascual, N., André, M., Rósso, Y., & Piulachs, M. (1993). Induction of choriogenesis by 20-hydroxyecdysone in the German cockroach. *Tissue & Cell*, 25(2), 195–204. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(93\)90019-h](https://doi.org/10.1016/0040-8166(93)90019-h)

Bellés, X., & Piulachs, M. (2015). Ecdysone signalling and ovarian development in insects: From stem cells to ovarian follicle formation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1849(2), 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2014.05.025>

Castillo Gracia, M. (1996). Efectos de diversos productos naturales y sintéticos sobre la biosíntesis de hormona juvenil en insectos [Tesis doctoral, Universidad de Valencia]. Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=226434>

Ciudad Garrido, L. (2009). Mecanismos reguladores de la maduración ovárica en *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blatellidae) [Tesis doctoral, Universitat de Barcelona]. Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=254691>

García, J. L., & Pérez, M. A. (2022). Más que óvulos y esperma: factores masculinos, femeninos, y su interacción en la reproducción. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 35(2), 123–135. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-0488202200020001

González Miguéns, R. (2017). Presencia de *Euborellia annulipes* (Lucas, 1847) (Dermaptera, Anisolabididae) en áreas costeras del Atlántico ibérico (Galicia, España). Boletín - Asociación Española de Entomología, 41, 505–507.

Guzmán-Mendoza, R. (2010). El enigma de la biodiversidad y los bichos en el jardín. 75, 64-68.

https://www.academia.edu/10015499/El_enigma_de_la_biodiversidad_y_los_bichos_en_el_jard%C3%ADn

Guzmán-Mendoza, R., Calzontzi-Marín, J., Salas-Araiza, M. D., & Martínez-Yáñez, R.. (2016). La riqueza biológica de los insectos: análisis de su importancia multidimensional. Acta Zoológica Mexicana, 32(3), 370-379. Recuperado en 13 de mayo de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S006517372016000300370&lng=es&tlng=es.

Khalid, M. Z., Ahmad, S., Ngegba, P. M., & Zhong, G. (2021). Role of endocrine system in the regulation of female insect reproduction. Biology, 10(7), 614. <https://doi.org/10.3390/biology10070614>

Klein-Koch, C. (1977). Acción de reguladores del crecimiento e inhibidores del desarrollo en insectos y ácaros. Revista Peruana de Entomología: Homenaje a la Universidad Nacional Agraria, 20, 13–17. <https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/entomologia/v20/pdf/a08v20.pdf>

Klowden, M. J. (2008). Endocrine systems. En Elsevier eBooks (pp. 1–74). <https://doi.org/10.1016/B978-012369493-5.50002-X>

Lagueux, M., Hirn, M., & Hoffmann, J. A. (1977). Ecdysone during ovarian development in *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, 23(1), 109–119. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(77\)90116-0](https://doi.org/10.1016/0022-1910(77)90116-0)

Macaya, C. C., Saavedra, P. E., Cepeda, R. E. (2016). Protocolo de cultivo de embriones completos de *Tribolium castaneum* para el estudio de los mecanismos moleculares y los movimientos morfogenéticos involucrados en el desarrollo de insectos. *Development Genes and Evolution*, 226, 53–61. <https://doi.org/10.1007/s00427-015-0524-1>

McCall, K. (2004). Eggs over easy: Cell death in the *Drosophila* ovary. *Developmental Biology*, 274(1), 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.07.017>

Maestro-Garriga, O. (2008). Estudio del receptor de la 20-hidroxiecdisona en el insecto hemimetábolo *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae): Caracterización del receptor nuclear BGRXR [Tesis doctoral, Universitat de Barcelona]. Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=254797>

Murillo-Cuevas, F. D., Cabrera-Mireles, H., Adame-García, J., Fernández-Viveros, J. A., Villegas Narváez, J., López-Morales, V., Vázquez-Hernández, A., & Meneses-Márquez, I. (2020). Evaluación de insecticidas biorracionales en el control de mosca blanca

(Hemiptera: Aleyrodidae) en la producción de hortalizas. *Biotecnia*, 22(1), 39–47. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i1.1123>

Núñez-Pascual, V., Calleja, F., Pardo, R. V., Sarrazin, A. F., & Irles, P. (2023). The ring-legged earwig *Euborellia annulipes* as a new model for oogenesis and development studies in insects. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 340, 18–33. <https://doi.org/10.1002/jez.b.23121>

Otero-Moreno, D., Peña-Rangel, M. T., & Riesgo-Escovar, J. R. (2016). Crecimiento y metabolismo: la regulación y la vía de la insulina desde la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. *TIP*, 19(2), 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2016.06.005>

Peng, A., Engel, M. S., Zhuang, Y. Z., Wu, Z., Feng, C., & Liu, Y. (2022). A new genus of striped earwigs allied to *Zigrasolabis* in mid-Cretaceous Kachin amber (Dermaptera: Labiduridae). *Cretaceous Research*, 139, Article 105305. <https://doi.org/10.1016/j.cretres.2022.105305>

Ramírez-Cruz, A. (2014). Maduración de la ovariola de la grana cochinilla *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 40(2), 225–229. <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v40n2/v40n2a15.pdf>

Piulachs, M. (2016). La maduración del oocito en insectos. ¿Cómo se regula la ovogénesis en las distintas especies? V Congreso de la Sociedad Española de Biología Evolutiva (Digital, CSIC). <http://hdl.handle.net/10261/153815>

Punta, J. (2022). Neuropéptidos en el ovario de *Rhodnius prolixus*: Análisis transcriptómico y funcional [Requisito para la obtención del título de Licenciada en Genética, Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires]. <https://repositorio.unnoba.edu.ar:8080/xmlui/handle/23601/486>

Rankin, S. M., Chambers, J., & Edwards, J. P. (1997). Juvenile hormone in earwigs: Roles in oogenesis, mating and maternal behaviors. *Bow Bug*, pp. 427–442. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6327\(1997\)35:4<427::AID-ARCH6>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(1997)35:4<427::AID-ARCH6>3.0.CO;2-O)

Roy, S., Smykal, V., Johnson, L., Saha, T., Zou, Z., & Raikhel, A. (2016). Regulation of reproductive processes in female mosquitoes. En *Advances in Insect Physiology* (pp. 115–144). <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2016.05.004>

Silva, A. B., & Moreira de Brito, J. (2014). Bioecología de *Euborellia annulipes* (Dermaptera: Anisolabididae). *Revista Verde de Agroecología e Desenvolvimento Sustentável*, 9(5), 55–61. Recuperado de <http://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS>

Uryu, O., Ameku, T., & Niwa, R. (2015). Recent progress in understanding the role of ecdysteroids in adult insects: Germline development and circadian clock in the fruit fly

Drosophila melanogaster. *Zoological Letters*, 1, Article 32.
<https://doi.org/10.1186/s40851-015-0031-2>

Vladusic, E. A. (1995). Acción de la hormona juvenil sobre la regulación de la esteroidogénesis en células de Leydig (Tesis de licenciatura, Universidad de Buenos Aires). http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2724_Vladusic.pdf

Wang, J., Engel, M. S., Shih, C., & Ren, D. (2022). A new earwig species of *Stonychopygia* from mid-Cretaceous Kachin amber (Dermaptera: Pygidicranidae). *Cretaceous Research*, 142, Article 105382. <https://doi.org/10.1016/j.cretres.2022.105382>