



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

Treball Final de Màster

Màster de Nutrició i Metabolisme (UB – URV)

Curs 2022-2023

**Funció del receptor d'insulina 2 a la  
regulació hormonal de la muda  
imaginal de *Blattella germanica***

Xènia Maya Figuerola

Tutor: José Luis Maestro Garriga

Laboratori senyals nutricionals en insectes

Institut de Biologia Evolutiva (IBE)

## ABSTRACT

The insulin receptor (InR) pathway is a highly conserved evolutionary mechanism in metazoans which plays a crucial role in responding to nutritional status and regulating essential biological processes. In insects, it has been reported two distinct genes encoding for InR. However, some insects such as the German cockroach, *B. germanica*, has acquired a third InR gene by a posterior duplication, bringing the number of InRs to 3 (Inr1, InR2 and InR3). It has been observed the involvement of InR2 in the molting process but it's no clear its specific role. The objective of this study is to understand the mechanism by which InR2 regulates the imaginal molt in the prothoracic gland (GP), the tissue responsible for synthesizing ecdysone, the primary hormone involved in molting that apply its effects through its active form 20-hydroxyecdysone (20E).

To achieve this aim, we studied the expression of some ecdysteroidogenic genes necessary for the 20E synthesis. Subsequently, to gain insights on the InR2 role in the molting process, nymphs were treated with RNA interference (RNAi) targeting InR2 to knockdown *InR* mRNA levels. Additionally, a second study was conducted on tracheas, where the expression of *ecdysone triggering hormone (ETH)*, a gene related with molt and ecdysone signalling, was also interfered with RNAi. In both treatments, the expression of different genes and phenotypic alterations were analysed.

The findings suggest a relationship between InR2 and the 20E pathway in the molting process.

Keywords: Insulin receptor, RNA interference, 20-hydroxyecdysone, *Blattella germanica*, molt.

## ABREVIATURES

20E	20-hidroxiecdisona	ILP	Pèptids similars a la insulina
CA	Corpora allata	InR	Receptor d'insulina
CCAP	Pèptid cardioactiu de crustacis	MAPK	Mitogen activated protein kinases
cDNA	DNA complementari	Met	Methoprene-tolerant
CT	Cicle lliardar	mRNA	RNA missatger
DEPC	Dietilpirocarbonat	Nvd	Neverland
Dib	Disembodied	Phm	Phantom
dsETH	RNA de doble cadena d'ETH	PolyH	Polihedrina de Polihedrovirus
dsInR2	RNA de doble cadena d'InR2	Ras	Rat sarcoma
dsPolyH	RNA de doble cadena de PolyH	RNAi	RNA d'interferència
dsRNA	RNA de doble cadena	RXR	Receptor X de retinoides
EcR	Receptor d'ecdisona	Sad	Shadow
EH	Eclosion Hormone	SEM	Error estàndard de la mitjana
ERK	Extracelular-signal regulated kinase	SNC	Sistema nerviós central
ETH	Ecdysis-triggering Hormone	Spot	Spookiest
FoxO	Forkhead-box class O	TOR	Target of rapamycin
GP	Glàndula protoràica	USP	Ultraespiracle
HJ	Hormona juvenil		

# ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ .....	1
1.1. Via de senyalització de la insulina.....	1
1.2. <i>Blattella germanica</i> com a model experimental.....	2
1.3. Senyalització de la muda .....	3
1.4. Antecedents del treball.....	6
2. OBJECTIUS .....	6
3. MATERIALS I MÈTODES.....	6
3.1. Insectes.....	6
3.2. RNA interferència (RNAi) .....	7
3.3. Injecció dsRNA.....	7
3.4. Disseccions dels teixits .....	7
3.5. Extracció de RNA, síntesi cDNA i qRT-PCR .....	7
3.6. Anàlisi estadístic.....	7
4. RESULTATS .....	8
4.1. Quantificació dels nivells de mRNA dels gens ecdisteroidogènics a la GP.....	8
4.2. Identificació de la funció del InR2 a la GP.....	8
4.3. Estudi de la funció del InR2 en el creixement .....	8
4.4. Identificació de la funció d'ETH a la muda .....	8
4.5. Identificació de la funció del InR2 a les tràquees .....	8
5. DISCUSSIÓ .....	8
5.1. Quantificació dels nivells de mRNA dels gens ecdisteroidogènics a la GP.....	8
5.2. Identificació de la funció del InR2 a la GP.....	8
5.3. Identificació de la funció d'ETH a la muda .....	8
6. CONCLUSIÓ .....	8
7. BIBLIOGRAFIA.....	8
8. ANNEX .....	13

# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. Via de senyalització de la insulina

La via de senyalització de la insulina és una via molt conservada evolutivament en tots els metazous que depèn de l'estat nutricional de l'organisme, i que es troba involucrada en la regulació del metabolisme i altres processos fisiològics relacionats, com és el cas del creixement, la reproducció, l'envelliment, la resistència a l'estrès, i l'activitat immunològica (1,2).

Tot i que hi ha vàries famílies de pèptids similars a la insulina, el principal lligand del receptor d'insulina en mamífers és la insulina, una petita hormona peptídica amb acció anabòlica sintetitzada per les cèl·lules  $\beta$  del pàncrees (1,3). En insectes, els ortòlegs de la insulina es diuen habitualment Insulin-like Peptides (ILPs). L'expressió, la síntesi i l'alliberació dels ILPs per part de teixits com el sistema nerviós, cos gras, ovaris, testicles, intestí, entre d'altres, responen a l'estat nutricional de l'insecte. Podem trobar un nombre variat de ILPs, ja que depèn de l'espècie a la qual pertanyin. Per exemple, trobem 8 ILPs en el cas de la *Drosophila melanogaster*, 4 en el *Tribolium castaneum*, 38 en el *Bombyx mori*, i 8 en *Blattella germanica* (1,4,5).

Com s'ha indicat més amunt, la insulina o ILPs s'uneixen i activen a uns receptors de membrana amb activitat tirosina quinasa anomenats receptors d'insulina (InR). Aquests desencadenen principalment una cascada de fosforilacions de diferents molècules que finalitzaran amb la fosforilació de FoxO (*Forkhead-box class O*), el principal factor transcripcional d'aquesta via. La fosforilació de FoxO fa que es mantingui al citoplasma i no pugui i no sigui capaç d'entrar al nucli, disminuint el seu efecte transcripcional sobre diversos gens (6,7). Aquesta via regula processos relacionats amb el metabolisme, el desenvolupament i la reproducció, juntament amb altres cascades de senyalització que inclouen la presència de molècules com Ras, ERK, MAPK, i mTOR (1,8).

### 1.1.2. Receptors d'insulina

Els insectes tenen en general dos gen que codifiquen per a InR degut a una duplicació gènica anterior a l'aparició dels insectes alats (9). Alguns llinatges van perdre un gen d'InR, i per això, només tenen un sol tipus. Succeeix en la *Drosophila melanogaster* i *Bombyx mori*. En canvi, altres espècies com *Apis mellifera* i *Nilaparvata lugens* van mantenir la duplicació, i actualment presenten dos tipus de receptors. En el cas d'un

l·linatge de Polyneoptera que va donar lloc a insectes pal, tèrmits i paneroles, una segona duplicació va incrementar el nombre de InR fins a tres (9,10). En aquest grup es poden trobar la panerola *Blattella germanica*, a on es troben 3 receptors d'insulina, InR1, InR2 i InR3.

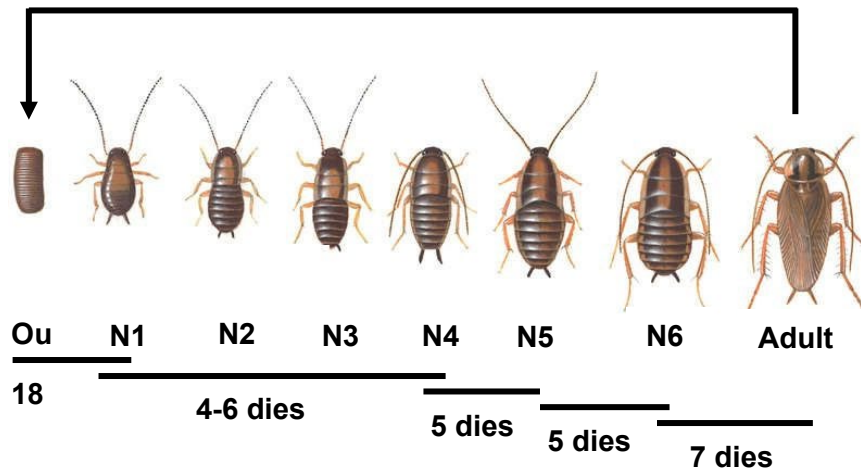
## **1.2. *Blattella germanica* com a model experimental**

La utilització de mamífers en la investigació ha contribuït a entendre diferents processos biològics que han servit per detectar i tractar malalties en humans, ja que la majoria comparteixen un 95% dels gens humans. La investigació amb mamífers, però, comporta limitacions econòmiques perquè són cars de mantenir; limitacions ètiques (principi de les 3R: reemplaçar, reduir i refinar); i fisiològiques, a causa de la seva complexitat, que dificulta l'anàlisi de certs processos biològics. Com a alternativa, hi ha models *in vitro* i altres models *in vivo*, com ara els insectes. Aquests últims, són bons per estudis de neurobiologia, metabolisme, genètica, desenvolupament i comportament animal, fet que s'utilitzen per la recerca mèdica perquè s'assemblen genètica i fisiològicament als mamífers. A més, són més econòmics de mantenir, presenten un cicle de vida curt, una taxa de reproducció elevada, i comporten moltes menys restriccions ètiques (11).

El model que s'utilitza en aquest treball és la *Blattella germanica* (*B. germanica*), un insecte de l'ordre *Blattodea* molt comú arreu del món degut a que és una plaga domèstica. Destaquen per la seva supervivència, ja que són insectes petits, molt resistents a diferents hàbitats i pesticides, i tenen una alimentació variada. Coexisteixen amb els humans i poden transmetre patògens, malalties, provocar al·lèrgies i empitjorar l'asma. Per aquests motius és important l'estudi d'aquest insecte (12).

*B. germanica* mesura uns 12-15 mm en l'edat adulta, està segmentat en cap, tòrax i abdomen, té 3 parells de potes, i 2 parells d'ales en els adults. El primer parell d'ales, les ales mesotoràciques, estan endurides i s'anomenen tegmines. El parell d'ales posterior o metotoràciques són ales membranoses. Els adults estan recoberts per una cutícula, exoesquelet de quitina, de color marró amb dues línies paral·leles negres sobre el tòrax molt característiques d'aquesta espècie. Al ser un insecte hemimetàbol, el seu desenvolupament presenta una metamorfosis incompleta, és a dir, experimenten 3 etapes de canvi en el seu cicle vital: ou, nimfa i adult (**fig. 1**). Les

nimfes son les formes immadures de l'organisme que desclouen dels ous i que, posteriorment, pateixen 6 estadis nimfals abans de mudar en adult (muda imaginal). Morfològicament s'assemblen però els adults son més grans, presenten ales i genitals funcionals (13).



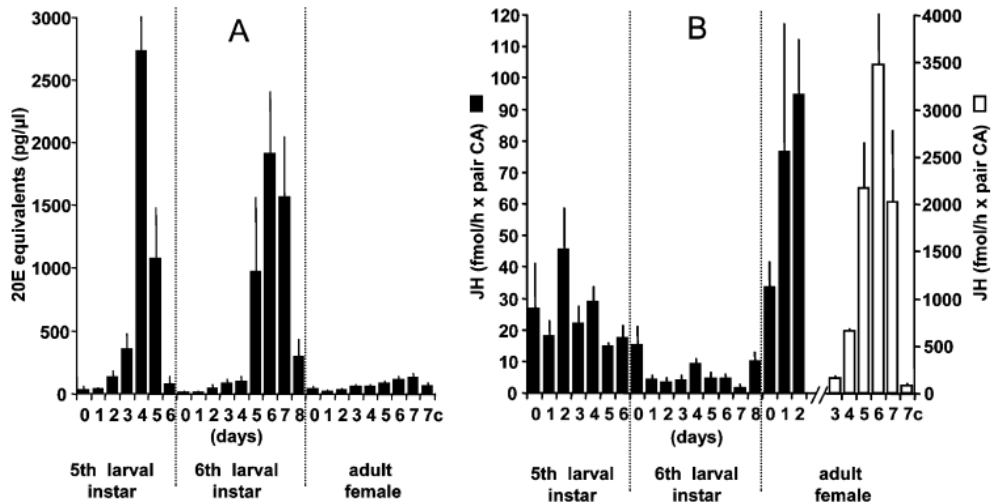
**Figura 1: Cicle de vida de *B. germanica* des de l'ou fins l'adult.** Es pot observar els dies que necessiten per canviar d'estadi.

### 1.3. Senyalització de la muda

El desenvolupament post-embrionari dels insectes està regulat pel sistema endocrí, principalment per l'hormona juvenil (HJ) i els ecdisteroides (20-hidroxiecdisona, 20E, és la forma activa). Ambdues regulen la reproducció, el desenvolupament i la metamorfosis (14,15). L'HJ és sintetitzada pels corpora allata (CA), un parell de glàndules retrocerebrals. Per la seva part, els ecdisteroides son sintetitzats a la glàndula protoràcica (GP), situada al protòrax (15). La GP consta de dos eixos musculars envoltats de cèl·lules productores d'ecdisteroides que es degenera un cop es produeix la muda imaginal, ja que els ovaris i testicles s'encarreguen de produir ecdisteroides en l'adult. De fet, a partir del dia 7 de l'últim estadi nimfal (N6D7), és quan la GP deixa de créixer i comença a degenerar-se (16).

L'estat energètic de l'insecte té un paper fonamental en el desenvolupament perquè la insulina o ILPs actuen con a sensors nutricionals activant cascades intracel·lulars quan s'uneixen als InRs. Algunes d'aquestes vies estan involucrades en la biosíntesi de la JH i del 20E. Els diferents nivells d'aquestes hormones al final de cada fase del desenvolupament, determinarà quina muda es produirà (**fig. 2**). La presència elevada de 20E, indueix el procés de muda, mentre que nivells d'HJ determina la naturalesa

d'aquesta. Quan el pic de 20E coincideix amb el de l'HJ, la muda serà entre estadis juvenils. I quan el pic de 20E es produeix amb baixos nivells d'HJ, la muda serà imaginal (17,18). Concretament, a l'últim estadi nimfal de *B. germanica*, el pic de 20E es dona el dia 6 (N6D6), iniciant la metamorfosi cap a l'adult (19).



**Figura 2: Nivells de 20E i HJ al penúltim estadi nimfal (N5D0), últim estadi nimfal (N6D0), i adultes de femelles. (A) Nivells de 20E a l'hemolimfa. (B) Nivells d'HJ sintetitzada per la Corpora allata (CA) (19).**

### 1.3.1. Biosíntesi dels ecdisteroides

La via de síntesi dels ecdisteroides (**fig. 3**) comença amb el colesterol ingerit de la dieta, que pateix una sèrie d'hidroxilacions, a la GP, fins a convertir-se en ecdisona (15). Aquesta és alliberada a l'hemolimfa i anirà a diferents teixits perifèrics a on experimentarà una darrera hidroxilació per convertir-se en 20E (18,20). Tota aquesta conversió es dona gràcies a la participació dels enzims ecdisteridogènics, varis dels quals, formen part de la família del citocrom P450, codificats pels gens de la família "Halloween" (Halloween genes) (21–23).

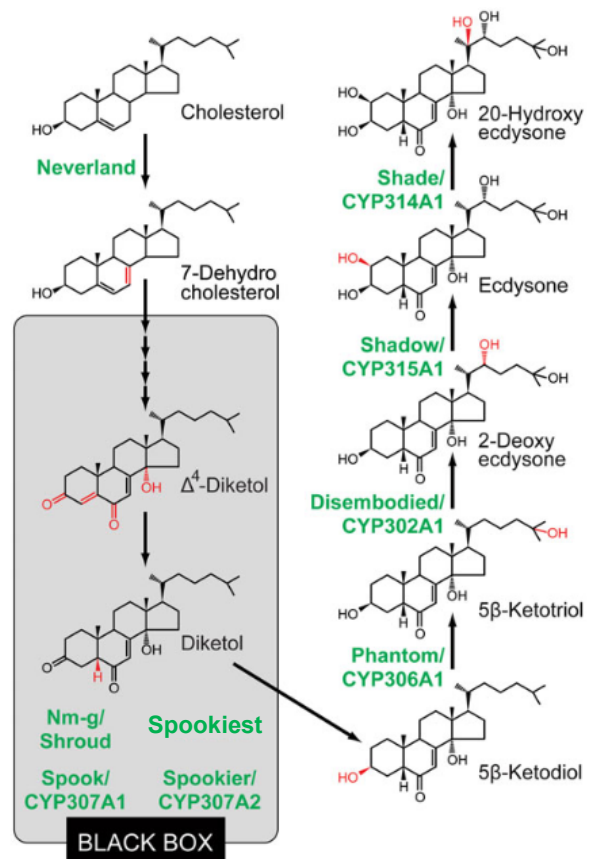
La 20E s'uneix a un receptor heterodímer format per la combinació de dos factors de transcripció: el receptor d'ecdisona (EcR) i ultraespiracle (USP). La seva activació indueix l'expressió de gens primerencs (com *E75A* i *HR3A*), que alhora, s'autoregulen i controlen l'expressió dels gens secundaris o tardans. Aquests últims són els que s'encarreguen del procés de metamorfosis (18,24).

### 1.3.2. Procés de muda

La muda és un procés que es produeix entre els estadis ninfals fins el desenvolupament de l'adult. Consta de 2 etapes: l'apòlisis i l'ecdisis, i es produeix gràcies a la interacció entre dels ecdisteroides (20E) i els neuropèptids secretats pel sistema nerviós central (SNC), que coordinen tot el procés (25).

Quan els nivells de 20E en l'hemolimfa són elevats comença el procés d'apòlisis, és a dir, es produeix la separació de l'epidermis de l'antiga cutícula de la nova cutícula que s'ha sintetitzat a sota (26). Al decaure els nivells de 20E, es determina la fi de l'apòlisis i l'inici de l'ecdisis, el següent pas de la muda. Aquest es pot dividir en 3 fases: pre-ecdisis, ecdisis i post-ecdisis (27).

- Pre-ecdisis: la disminució dels nivells de 20E promou l'activació de les cèl·lules Inka, unes cèl·lules situades al voltant de les tràquees en estadis juvenils que es degeneren quan l'insecte muda a adult. Aquestes produeixen *Ecdysis Triggering Hormone* (ETH), una hormona peptídica que és detectada pel SNC, i desencadena l'ecdisis (25,26). A l'últim estadi ninfal (N6) de *B. germanica*, el pic d'ETH es dona el dia 7 (N6D7) (28).
- Ecdisis: és quan l'insecte produeix una sèrie de moviments musculars ondulatoris en diferents parts del cos l'objectiu de trencar l'antiga cutícula i separar-se'n d'aquesta. A nivell molecular, la presència d'ETH provoca la síntesi de *Ecdysis Triggering Hormone* (ETH) per part del cervell, que indueix l'alliberació de *Crustacean Cardioactive Peptide* (CCAP) i de més ETH. D'aquesta manera, es crea una retroalimentació positiva (26).



**Figura 3: Via de síntesi dels ecdisteroides.** En verd es mostren els gens implicats en aquesta via. Tret de neverland, la resta són *Halloween genes*. A la *Black box* hi ha alguns gens que encara no estan ben caracteritzats, i varien entre insectes.(20).

- Post-ecdysis: s'allibera l'antiga cutícula i augmenten els nivells de CCAP, provocant l'activació de *Bursicon*, un neuropèptid que s'encarrega de d'endurir (esclerotitzar) i pigmentar la cutícula (26,27).

#### 1.4. Antecedents del treball

## 2. OBJECTIUS

Els objectius principals del present treball son dos:

1. **Entendre el procés de la muda i la seva regulació.**
2. **Identificar quin és l'efecte del silenciament amb RNAi del InR2 en la glàndula protoràcica per així establir quin és el paper d'aquest receptor en el procés de la muda imaginal.**

Per aconseguir-ho, es van establir els següents subobjectius:

1. Quantificació dels nivells de mRNA de diferents gens de la via de síntesi de l'ecdisona (gens ecisteroidogènics) a la glàndula protoràcica.
2. Identificació de la funció de InR2 en la glàndula protoràcica. Anàlisi del fenotip produït pel silenciament de InR2 en l'expressió dels gens ecidistroidogènics.
3. Estudi de la funció de InR2 en el creixement. Mesura del creixement del pronot en individus control i interferits per InR2.
4. Identificació de la funció d'ETH en el procés de muda. Observació del fenotip produït pel seu silenciament i comparació d'aquest fenotip amb el reportat pel silenciament de la senyalització de la 20E i de InR2.
5. Anàlisi de la regulació de l'expressió de ETH. Quantificació dels nivells de mRNA d'ETH, *E75A* i *HR3A* en individus control i interferits per InR2 i comparació amb els nivells d'expressió dels enzims ecidisteroidogènics

## 3. MATERIALS I MÈTODES

### 3.1. Insectes

L'espècie utilitzada en aquest treball va ser la panerola *Blattella germanica*. Pels experiments es van utilitzar principalment femelles del cinquè (penúltim) (N5) i sisè (últim) (N6) períodes nimfals. Les paneroles provenien d'una colònia establerta a l'IBE

i es mantenien a la foscor a  $30 \pm 1$  °C, amb una humitat relativa d'entre 60-70%. S'alimentaven de pinso de gos (PANLAB) i aigua *ad libitum*.

### **3.2. RNA interferència (RNAi)**

#### 3.2.1. Clonació del cDNA

#### 3.2.2. Síntesi de dsRNA

### **3.3. Injecció dsRNA**

### **3.4. Disseccions dels teixits**

### **3.5. Extracció de RNA, síntesi cDNA i qRT-PCR**

#### 3.5.1. Extracció de RNA

#### 3.5.3. Reacció en cadena de la polimerasa a temps real (qPCR)

### **3.6. Anàlisi estadístic**

L'anàlisi estadístic es va realitzar amb el programa IBM SPSS Statistics (v. 29). La comparació de les mitjanes dels valors en el control i els tractats es va realitzar utilitzant el test t de Student. Es va considerar que les diferències eren estadísticament significatives quan  $p < 0.05$ .

## **4. RESULTATS**

### **4.1. Quantificació dels nivells de mRNA dels gens ecdisteroidogènics a la GP**

### **4.2. Identificació de la funció del InR2 a la GP**

### **4.3. Estudi de la funció del InR2 en el creixement**

### **4.4. Identificació de la funció d'ETH a la muda**

### **4.5. Identificació de la funció del InR2 a les tràquees**

## **5. DISCUSSIÓ**

### **5.1. Quantificació dels nivells de mRNA dels gens ecdisteroidogènics a la GP**

### **5.2. Identificació de la funció del InR2 a la GP**

### **5.3. Identificació de la funció d'ETH a la muda**

## **6. CONCLUSIÓ**

## **7. BIBLIOGRAFIA**

1. Chowański S, Walkowiak-Nowicka K, Winkiel M, Marciniak P, Urbański A, Pacholska-Bogalska J. Insulin-Like Peptides and Cross-Talk With Other Factors in the Regulation of Insect Metabolism. Vol. 12, *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
2. Abrisqueta M, Süren-Castillo S, Maestro JL. Insulin receptor-mediated nutritional signalling regulates juvenile hormone biosynthesis and vitellogenin production in the German cockroach. *Insect Biochem Mol Biol*. 2014;49(1):14–23.
3. Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol*. 2018 Jul 1;217(7):2273–89.
4. Castro-Arnau J, Marín A, Castells M, Ferrer I, Maestro JL. The expression of cockroach insulin-like peptides is differentially regulated by physiological conditions and affected by compensatory regulation. *J Insect Physiol*. 2019 Apr 1;114:57–67.
5. Veenstra JA. Arthropod IGF, relaxin and gonadulin, putative orthologs of *Drosophila* insulin-like peptides 6, 7 and 8, likely originated from an ancient gene triplication. *PeerJ*. 2020 Jul 10;2020(7):e9534.
6. Lau HE, Chalasani SH. Divergent and convergent roles for insulin-like peptides in the worm, fly and mammalian nervous systems. *Invertebrate Neuroscience*. 2014 Sep 7;14(2):71–8.
7. Süren-Castillo S, Abrisqueta M, Maestro JL. FoxO inhibits juvenile hormone biosynthesis and vitellogenin production in the German cockroach. *Insect Biochem Mol Biol*. 2012 Jul;42(7):491–8.

8. Shyamal S, Das S, Guruacharya A, Mykles DL, Durica DS. Transcriptomic analysis of crustacean molting gland (Y-organ) regulation via the mTOR signaling pathway. *Scientific Reports* 2018 8:1. 2018 May 9;8(1):1–17.
9. Smykal V, Pivarci M, Provaznik J, Bazalova O, Jedlicka P, Luksan O, et al. Complex Evolution of Insect Insulin Receptors and Homologous Decoy Receptors, and Functional Significance of Their Multiplicity. *Mol Biol Evol.* 2020 Jun 1;37(6):1775–89.
10. Kremer LPM, Korb J, Bornberg-Bauer E. Reconstructed evolution of insulin receptors in insects reveals duplications in early insects and cockroaches. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2018 Jul 1;330(5):305–11.
11. Tonk-Rügen M, Vilcinskas A, Wagner AE. *Insect Models in Nutrition Research*. Vol. 12, Biomolecules. NLM (Medline); 2022.
12. Nasirian H. An overview of German cockroach, *Blattella germanica*, studies conducted in Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 2010;13(22):1077–84.
13. Antani K, Burgeson A. ADW: *Blattella germanica* [Internet]. *Animal Diversity Web.* 2011 [cited 2023 Apr 25]. Available from: [https://animaldiversity.org/accounts/Blattella\\_germanica/](https://animaldiversity.org/accounts/Blattella_germanica/)
14. Nur Aliah NA, Ab-Rahim S, Moore HE, Heo CC. Juvenile hormone: Production, regulation, current application in vector control and its future applications. *Trop Biomed.* 2021;38(3):254–64.
15. Hansen IA, Attardo GM, Rodriguez SD, Drake LL. Four-way regulation of mosquito yolk protein precursor genes by juvenile hormone-, ecdysone-, nutrient-, and insulin-like peptide signaling pathways. Vol. 5 MAR, *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media SA; 2014.
16. Romañá I, Pascual N, Bellés X. The ovary is a source of circulating ecdysteroids in *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Eur J Entomol.* 1995;92(ISSN 1210-5759):93–103.
17. Wu Z, Yang L, He Q, Zhou S. *Regulatory Mechanisms of Vitellogenesis in Insects*. Vol. 8, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
18. Mañé Padrós D. MECANISMES MOLECULARS D'ACCIÓ DELS ECDISTEROIDES EN L'INSECTE HEMIMETÀBOL *BLATTELLA GERMANICA* (L.) (DICTYOPTERA, BLATTELLIDAE). CARACTERITZACIÓ DELS RECEPTORS NUCLEARS BgE75 i BgHR4. Barcelona; 2007. Tesis doctoral de l'Institut de Biologia Evolutiva (IBE).
19. Cruz J, Martín D, Pascual N, Maestro JL, Piulachs MD, Bellés X. Quantity does matter. Juvenile hormone and the onset of vitellogenesis in the German cockroach. *Insect Biochem Mol Biol.* 2003 Dec 1;33(12):1219–25.
20. Niwa R, Niwa YS. Enzymes for ecdysteroid biosynthesis: Their biological functions in insects and beyond. Vol. 78, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry; 2014. p. 1283–92.

21. Gilbert LI. Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Endocrinol*. 2004 Feb 27;215(1–2):1–10.
22. Rewitz KF, Rybczynski R, Warren JT, Gilbert LI. The Halloween genes code for cytochrome P450 enzymes mediating synthesis of the insect moulting hormone. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 6):1256–60.
23. Xie X, Liu Z, Liu M, Tao T, Shen X, Zhu D. Role of Halloween genes in ecdysteroids biosynthesis of the swimming crab (*Portunus trituberculatus*): Implications from RNA interference and eyestalk ablation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2016 Sep;199:105–10.
24. Cruz J, Mané-Padrós D, Bellés X, Martín D. Functions of the ecdysone receptor isoform-A in the hemimetabolous insect *Blattella germanica* revealed by systemic RNAi in vivo. *Dev Biol*. 2006 Sep 1;297(1):158–71.
25. Chan SF, Wen QQ, Ao CM, Wang W, Wang CG, Zhao YF. Transcriptome responses of RNAi-mediated ETH knockdown in *Scylla paramamosain* at different premolt substages. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Jul 28;13.
26. Zitnan D, Adams ME. Neuroendocrine Regulation of Ecdysis. In: *Insect Endocrinology*. Elsevier; 2011. p. 253–309.
27. Žitňan D, Kim YJ, Žitňanová I, Roller L, Adams ME. Complex steroid–peptide–receptor cascade controls insect ecdysis. *Gen Comp Endocrinol*. 2007 Aug;153(1–3):88–96.
28. Rey A, Maestro JL. Estudio funcional de los receptores de insulina de *Blattella germanica* en la regulación de la señalización de la muda imaginal TFM Master in Genetics and Genomics. Barcelona; 2020. Resultats no publicats.
29. Grover S, Jindal V, Banta G, Taning CNT, Smagghe G, Christiaens O. Potential of RNA interference in the study and management of the whitefly, *Bemisia tabaci*. *Arch Insect Biochem Physiol* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2023 May 25];100(2):e21522. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.sire.ub.edu/doi/full/10.1002/arch.21522>
30. Abrisqueta M, Süren-Castillo S, Maestro JL. S6 protein kinase activates Juvenile Hormone and vitellogenin production in the cockroach *Blattella germanica*. *Physiol Entomol*. 2017 Mar 1;42(1):10–6.
31. Maestro JL, Bellés X. Silencing allatostatin expression using double-stranded RNA targeted to preproallatostatin mRNA in the German cockroach. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2006 Jun;62(2):73–9.
32. Krenn HW, Aspöck H. Form, function and evolution of the mouthparts of blood-feeding Arthropoda. *Arthropod Struct Dev*. 2012 Mar;41(2):101–18.
33. Rewitz KF, Rybczynski R, Warren JT, Gilbert LI. Identification, characterization and developmental expression of Halloween genes encoding P450 enzymes mediating ecdysone

- biosynthesis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2006 Mar;36(3):188–99.
34. Van Ekert E, Wang M, Miao YG, Brent CS, Hull JJ. RNA interference-mediated knockdown of the Halloween gene Spookiest (CYP307B1) impedes adult eclosion in the western tarnished plant bug, *Lygus hesperus*. *Insect Mol Biol*. 2016 Oct 1;25(5):550–65.
  35. Sang M, Li C, Wu W, Li B. Identification and evolution of two insulin receptor genes involved in *Tribolium castaneum* development and reproduction. *Gene*. 2016 Jul 10;585(2):196–204.
  36. Lozano J, Belles X. Role of Methoprene-Tolerant (Met) in Adult Morphogenesis and in Adult Ecdysis of *Blattella germanica*. Palli SR, editor. *PLoS One*. 2014 Jul 29;9(7):e103614.
  37. Cruz J, Mané-Padrós D, Bellés X, Martín D. Functions of the ecdysone receptor isoform-A in the hemimetabolous insect *Blattella germanica* revealed by systemic RNAi in vivo. *Dev Biol*. 2006 Sep 1;297(1):158–71.
  38. Mané-Padrós D, Cruz J, Vilaplana L, Pascual N, Bellés X, Martín D. The nuclear hormone receptor BgE75 links molting and developmental progression in the direct-developing insect *Blattella germanica*. *Dev Biol*. 2008 Mar 1;315(1):147–60.
  39. Cruz J, Martín D, Bellés X. Redundant ecdysis regulatory functions of three nuclear receptor HR3 isoforms in the direct-developing insect *Blattella germanica*. *Mech Dev*. 2007 Mar;124(3):180–9.
  40. Brogiolo W, Stocker H, Ikeya T, Rintelen F, Fernandez R, Hafen E. An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol*. 2001 Feb 20;11(4):213–21.
  41. Lin X, Smagghe G. Roles of the insulin signaling pathway in insect development and organ growth. *Peptides (NY)*. 2019 Dec 1;122.
  42. Hyun S. Body size regulation and insulin-like growth factor signaling. Vol. 70, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013. p. 2351–65.
  43. Murray PG, Clayton PE. Endocrine control of growth. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2013;163(2):76–85.
  44. Maestro JL, Cobo J, Bellés X. Target of rapamycin (TOR) mediates the transduction of nutritional signals into juvenile hormone production. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 Feb 27;284(9):5506–13.
  45. Cruz J, Nieva C, Mané-Padrós D, Martín D, Bellés X. Nuclear receptor BgFTZ-F1 regulates molting and the timing of ecdysteroid production during nymphal development in the hemimetabolous insect *Blattella germanica*. *Developmental Dynamics*. 2008 Nov;237(11):3179–91.

46. Tan A, Palli SR. Edysone receptor isoforms play distinct roles in controlling molting and metamorphosis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Mol Cell Endocrinol*. 2008 Sep 10;291(1-2):42-9.
47. Marti D, Maestro O, Cruz J, Mane D, Belle X. RNAi studies reveal a conserved role for RXR in molting in the cockroach *Blattella germanica*. *J Insect Physiol*. 2006;52:410-6.

**8. ANNEX**