



**Universidad de Valparaíso**

**Facultad de ciencias**

**Programa de Licenciatura en Ciencias Mención Biología**

**TOXINA RECOMBINANTE  $\alpha$ -NEMERTIDE COMO POTENCIAL INSECTICIDA**

**SEMINARIO DE GRADUACIÓN II, PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADO/A EN CIENCIAS MENCION BIOLOGIA**

**MAXIMILIANO ESPINOZA CABRERA.**

**DR. ALAN NEELY.**

**CO-TUTOR, DR. John Ewer**

**Valparaíso – Chile**

**2025**





**Universidad de Valparaíso**

**Facultad de ciencias**

**Programa de Licenciatura en Ciencias Mención Biología**

**TOXINA RECOMBINANTE  $\alpha$ -NEMERTIDE COMO POTENCIAL INSECTICIDA**

**SEMINARIO DE GRADUACIÓN II, PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADO/A EN CIENCIAS MENCION BIOLOGIA**

**MAXIMILIANO ESPINOZA CABRERA.**

**DR. ALAN NEELY.**

**CO-TUTOR, DR. John Ewer**

**Valparaíso – Chile**

**2025**

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	2
Introducción.....	2
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....	5
Cerezo y su importancia económica en Chile .....	5
<i>Drosophila suzukii</i> .....	5
Insecticidas químicos.....	6
Neonicotinoides .....	6
Piretroides.....	6
Canales de sodio dependientes de voltaje .....	8
Toxinas inhibidores con nudo de cisteína .....	9
$\alpha$ -nemertide .....	10
Proteínas recombinantes.....	11
CAPITULO II: MARCO METODOLÓGICO.....	13
Vectores y constructo .....	13
Cultivo bacteriano .....	16
Lisis .....	17
Purificación con afinidad al níquel.....	17
Digestión .....	18
Bioensayo .....	19
CAPITULO III: RESULTADOS.....	20
Resultados de bioensayo.....	20
Producción y purificación de TEV.....	22
Producción y purificación de $\alpha$ -Nemertide.....	23
CAPITULO IV: DISCUSIÓN .....	26
Bioensayo .....	26

Uso de <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo .....	26
Estabilidad y almacenamiento de TEV .....	27
Inviabilidad de bioensayo con $\alpha$ -nemertide.....	28
Proyecciones y limitaciones .....	28

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Mortalidad de <i>Drosophila melanogaster</i> tras 24 horas de exposición alimenticia a cipermetrina en diferentes concentraciones. Se muestra los valores individuales por quintuplicado de cada concentración, con su promedio y desviación estándar.....	22
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación de los posibles estados de los canales de sodio dependiente de voltaje.....	9
<b>Figura 2.</b> Fragmento de la figura original tomada de King (2019), que representa la estructura general de las toxinas ICK, enumerando las cisteínas (1-6) y marcando con líneas (rojo y azul) los puentes de disulfuro presentes: el puente resaltado en azul muestra el pseudo nudo que forman.....	10
<b>Figura 3.</b> Estructura de $\alpha$ -nemertide 1. Posee tres puentes de disulfuro señalados en amarillo. (PDB: 6ENA).....	11
<b>Figura 4.</b> (A) Vector SNX-482 utilizado para la producción de proteína recombinante SNX-482 (B) Constructo diseñado para producción de $\alpha$ -nemertide.....	14
<b>Figura 5.</b> Vector con la secuencia de $\alpha$ -nemertide inserta para lograr el complejo MBP-TEV- $\alpha$ -nemertide.....	15
<b>Figura 6.</b> Proceso completo de construcción de vector $\alpha$ -nemertide.....	16
<b>Figura 7.</b> Esquema de protocolo de producción de proteínas recombinantes.....	18
<b>Figura 8.</b> Fotografía de los frascos utilizados para los bioensayos de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	21
<b>Figura 9.</b> Gráfico de datos obtenidos de bioensayo de dosis respuesta con cipermetrina en espécimen de <i>Drosophila melanogaster</i> (Tabla 1).....	21
<b>Figura 10.</b> Análisis por SDS-PAGE de TEV.....	23
<b>Figura 11.</b> Análisis por SDS-PAGE de $\alpha$ -nemertide .....	24
<b>Figura 12.</b> Gráfico de cromatograma de afinidad de $\alpha$ -nemertide.....	25
<b>Figura 13.</b> Gráfico de cromatograma de exclusión de $\alpha$ -nemertide.....	25

## RESUMEN

La mosca de alas manchadas, *Drosophila suzukii*, es la principal plaga que enfrenta la producción de cerezas y los insecticidas químicos son dañinos para el medio ambiente y su uso cada vez más restringido e ineficaz. Para combatir esta plaga se propone generar un insecticida biológico utilizando la toxina producida por el gusano marino, *Lineus longissimus*. Se trata de  $\alpha$ -nemertide, un péptido que afecta a la inactivación de los canales de sodio activados por voltaje en invertebrados.  $\alpha$ -nemertide se obtuvo a partir de cultivos de *E. coli* como una proteína de fusión de "Maltose Binding Protein" (MBP) precedida por un motivo de 6 histidina para su purificación por cromatografía afinidad. Luego por endoproteólisis y se separó de MPB de  $\alpha$ -nemertide y se volvió a purificar. Para evaluar su potencial insecticida se desarrolló un bioensayo con *Drosophila melanogaster*

## CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### Introducción

Chile es un país con una dimensión longitudinal de 4.270 km con una amplia variedad de climas, siendo el tropical húmedo el único ausente (Gobierno de Chile, s. f.). Esta característica potencia la exportación de productos vegetales como, por ejemplo, es la cereza cuyos envíos siguen al alza (ODEPA, s. f.; ProChile, 2024). Las exportaciones de esta fruta aumentaron de 23.5% en enero de 2024 vs. enero de 2025 (*Informe Exportaciones No Cobre No Litio Enero 2025*, s. f.). Si bien esto es beneficioso, trae consigo desafíos técnicos importantes para la producción (Furche Guajardo, 2023).

El principal desafío al aumento de la producción es la aparición de nuevas plagas. En el caso de la cereza la *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931), la mosca de las alas manchadas, es una plaga emergente que puede producir pérdidas de entre \$5.000 a \$17.550 USD/hectárea (Buzzetti Morales, 2020). Esta mosca japonesa fue introducida en junio de 2017, encontrada en la región de Los Lagos (*Estados de desarrollo de Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae) y otras especies del género, comunes en el sur de Chile*, s. f.). El año siguiente se expandió a las regiones de Ñuble, Biobío y Maule (Ulibarry, s. f.).

Si bien existen insecticidas químicos para combatir las plagas, estos producen daños colaterales graves al medio ambiente, ya que afectan a todo su entorno. Estos insecticidas pueden afectar a especies no objetivo y producir bioacumulación en la flora y cuerpos de agua (Chagnon et al., 2015; Sánchez-Bayo, 2021). Además, algunos de ellos pueden afectar de forma grave la salud humana tales como: déficit cognitivo, disrupción de neurotransmisores, problemas de concentración, leucemia o tumores cerebrales (Abreu-Villaça & Levin, 2017).

Una de las posibles soluciones a este problema, es la utilización de venenos peptídicos. Existe una gran diversidad de especies que ocupan venenos para depredar o defenderse. Los más conocidos son las serpientes, arañas y escorpiones. Estas especies, tras millones de años de evolución, han logrado adquirir una amplia variedad de venenos. La potencia de estos venenos es tal que les permite depredar especies que más que duplican su tamaño. Dentro de estos venenos peptídicos destaca una familia presente en los venenos de araña como son los inhibidores con nudo de cistina (ICK, por sus siglas en inglés "*inhibitor cystine knot*"). Estos, que poseen un nudo de cistina, lo cual le otorga una gran estabilidad a la desaturación y potencial uso

insecticida (Guo et al., 2023). Ya existe un insecticida peptídico de uso comercial (Spear-T, Vestaron, Kalamazoo, MI, USA), cuyo principal compuesto activo es Gs- $\omega$ / $\kappa$ -Hxtx-Hv1a, una toxina derivada de la araña tela de embudo australiana, *Hadronyche vertusa* (Fletcher et al., 1997). Este insecticida junto a adyuvantes, como Silwet L-77 (Momentive Performance Materials, Niskayuna, NY, USA), en *Drosophila suzukii* logra mortalidades de 90% en 24 horas en concentraciones entre 1 y 2 partes por mil y sus residuos son aproximadamente 90% menos letales que los residuos de la cipermetrina (Fanning et al., 2018), un insecticida ampliamente usado. Esto demuestra un menor efecto colateral a los ecosistemas evitando la toxicidad prolongada del sitio donde se aplica.

Dentro de los blancos moleculares de los insecticidas, los canales de sodio dependiente de voltaje ( $Na_v$ ) son un blanco atractivo, debido a que son cruciales, ya que participan en un rol fundamental al generar el inicio del potencial de acción. Además, se ha observado que la función incorrecta de estos puede afectar de manera grave la salud, causando problemas, como por ejemplo epilepsia o dolor crónico (J. Wang et al., 2017). Debido a que los  $Na_v$  de invertebrados son altamente conservados y divergen estructuralmente de los  $Na_v$  de vertebrados, se han probado diferentes toxinas recombinantes derivadas de venenos de araña con el fin de combatir plagas de insectos y no perjudicar a la salud humana (Klint et al., 2015; Regalado et al., 2023). Sin embargo, también existen otras especies que produce toxinas similares como el gusano cordón de bota, *lineus longissimus*. Este gusano, secreta una neurotoxina capaz de afectar los canales de sodio dependientes de voltaje de varias de especies de artrópodos incluyendo insectos.

Estos antecedentes me llevaron proponer a  $\alpha$ -nemertide como un potencial insecticida peptídico para combatir la plaga de la *Drosophila suzukii*, sin alterar los distintos nichos ecológicos que otros insecticidas químicos podrían dañar.

## **Hipótesis**

El ICK  $\alpha$ -nemertide es una toxina letal por vía oral para *Drosophila melanogaster* con eficacia y potencia comparables a insecticidas sintéticos como la cipermetrina en condiciones de laboratorio.

## **Objetivo general y objetivos específicos**

### Objetivo general

- Sintetizar y probar la toxina recombinante  $\alpha$ -nemertide como insecticida no sintético para *Drosophila melanogaster*.

### Objetivos específicos

1. Implementar un bioensayo en *Drosophila melanogaster*. para establecer la dosis letal (LD 50) por vía oral de insecticidas.
2. Diseñar un método de producción y purificación para  $\alpha$ -nemertide recombinante.
3. Comparar la efectividad de  $\alpha$ -nemertide con la de cipermetrina como insecticida en condiciones de laboratorio en bioensayo de *Drosophila melanogaster*.

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### **Cerezo y su importancia económica en Chile**

El cerezo es un árbol de hoja caduca que requiere exponerse a frío durante las temporadas de invierno para producir una cosecha abundante de fruta. En particular el cerezo debe acumular entre 900 a 2000 horas de frío (*Las cerezas más rápidas del país* | Fondef, s. f.). Otro factor crucial para ello es el clima, que debe oscilar entre 7 a 14°C en invierno y 18 a 28°C en verano. Además, se necesita un invierno húmedo y un verano seco, lo cual se logra en climas mediterráneos como lo son la región del Maule y O'Higgins. La cosecha no debe ser durante humedad y temperaturas elevadas (más de 30°C), ya que produce microfracturas que malogran la fruta (*Cultivo de Cerezo: Técnicas y recomendaciones* | BASF Chile, s. f.). Los cerezos se cosechan de octubre a febrero, lo cual coincide con la gran demanda de cerezas por China el día doce de diciembre. Esta fecha es un día de descuentos en compras online, donde en China se compran cerezas debido a que son un símbolo de lujo, ideales para regalos en el año nuevo chino. Esto da un gran potencial económico a la agricultura chilena, aumentando la demanda de cerezas en esta fecha. Chile se sitúa en el primer puesto de exportador de cerezas al mercado chino, exportando 187.8 mil toneladas de cerezas en la temporada 2024 (Villagrán, 2025).

### ***Drosophila suzukii***

La *Drosophila suzukii* es una mosca considerada plaga en agronomía debido a que deposita sus huevos dentro de frutas de piel delgada como lo son moras, frambuesas, cerezas o uvas. Los huevos de *D. suzukii* eclosionan en 1 a 3 días y las larvas crecen dentro del fruto alimentándose de su carne (Devotto M, 2020). La larva tarda entre 13 a 18 días para alcanzar el estadio adulto dependiendo del clima (D. Galland, 2022). Las hembras pueden poner huevos entre 1-3 días después de emerger como adultos. Con temperaturas favorables (22°C) la hembra puede poner hasta 25 huevos por día (Asplen et al., 2015). Sin embargo el rango de temperatura de oviposición es muy amplio, yendo desde los 10 a 32°C (Cini & Ioriatti, 2025). Además, esta mosca en invierno produce un cambio morfológico, en el cual incrementa el tamaño, se oscurecen y se ensancha el exoesqueleto, produciendo una resistencia a temperaturas bajas, logrando sobrevivir en climas de hasta 1°C. En este periodo la tasa reproductiva disminuye considerablemente hasta que las condiciones climáticas mejoren (Shearer et al., 2016). Puesto que *D. suzukii* deposita sus huevos dentro de

los frutos, le producen daños en la pulpa y los contamina con huevos no eclosionados. Además, es altamente adaptable a cambios climáticos por lo cual constituye una plaga difícil de combatir. Por otro lado, las barreras sanitarias son muy estrictas, y embarques completos de cerezas pueden ser rechazados por el Servicio Agrónomo y Ganadero (SAG) por la presencia de huevos de *Drosophila s.* (*Lineamientos para Exportación de Carozos a China, s. f.*).

### **Insecticidas químicos**

Los insecticidas químicos son una herramienta ampliamente utilizada en la agricultura para combatir las plagas y obtener un fruto de mayor calidad. Se pueden agrupar en varias clases dependiendo de su principio activo y blanco, como por ejemplo: Neonicotinoides, piretroides, organofosfatos y carbamatos. En Chile, por ser un país con amplio rubro agropecuario, se ha estado modificando el uso de estos compuestos, restringiendo su uso o prohibiéndolo, como en el caso de algunos organofosfatos y carbamatos (Food and Agriculture Organization of the United Nations, s. f.; Servicio Agrícola y Ganadero, s. f.)

### **Neonicotinoides**

Los insecticidas neonicotinoides, actúan sobre receptores nicotínicos o canales nicotínicos de acetilcolina (nAChR) del sistema nervioso produciendo parálisis. Los canales nAChR poseen un rol fundamental en la plasticidad neuronal, además de participar en memoria, aprendizaje y atención (Dani & Bertrand, 2007; Ma et al., 2023). En vertebrados, nAChR son los receptores postsinápticos de la sinapsis neuromuscular. Los insecticidas neonicotinoides pueden ser absorbidos por la vegetación a través de las raíces, lo cual puede ocasionar un efecto masivo en toda la biodiversidad, afectando la memoria y aprendizaje de abejas, dañando los sistemas reproductivos, genéticos y el hígado en ratas y afectando el desarrollo del embarazo en humanos y produciendo en personas adultas problemas neurológicos (Zhao et al., 2020). También se hipotetiza que están involucrados en enfermedades neurodegenerativas como, por ejemplo, el Alzheimer (Singh et al., 2024).

### **Piretroides**

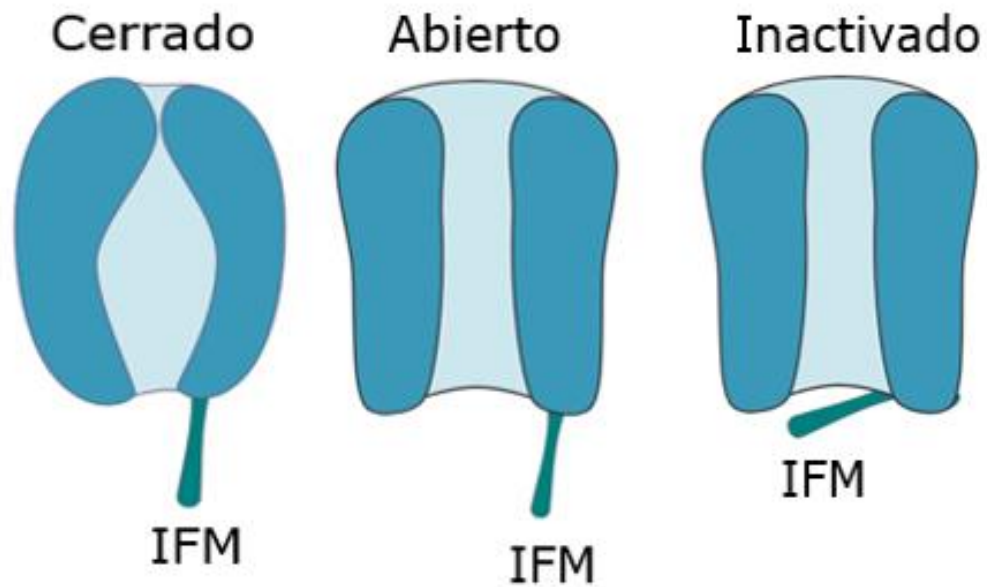
Los insecticidas piretroides, son otro tipo de insecticida utilizado ampliamente por el sector agrícola para control de plagas. Estos son insecticidas sintéticos análogos de las piretrinas, insecticidas naturales extraídos a partir de la planta, *Tanacetum cinerariifolium* (un crisantemo). Este tipo de insecticida actúa sobre los canales de sodio dependiente de voltaje ( $Na_v$ ). Se unen a la subunidad alfa del canal, impidiendo

su cierre y por tanto causando una apertura prolongada del canal de sodio provocando parálisis tetánica, la cual es letal para el insecto (Hołyńska-Iwan & Szewczyk-Golec, 2020). Estos insecticidas no actúan sobre canales de sodio de mamíferos por la divergencia de un aminoácido crítico para la unión de piretroides: donde hay una metionina en invertebrados, hay una isoleucina en vertebrados, lo que disminuye la efectividad de los piretroides hasta en 1000 veces (Narahashi et al., 2007; Vais et al., 2001). Además, en mamíferos los piretroides son rápidamente hidrolizados transformándose en metabolitos no tóxicos. Aun así no se está claro lo que podría causarle a los humanos la exposición a largo plazo (Kumar et al., 2023). Uno de los problemas de estos compuestos naturales es que son muy sensibles a la luz solar lo cual produce su rápida descomposición (Anadón et al., 2009). La mayoría de los piretroides se degradan en el aire entre uno y dos días, pero se han desarrollado nuevos derivados que pueden permanecer en el medio ambiente durante meses (*Resumen de Salud Pública*, 2023). Estos incluyen la bifentrina, cis-deltametrina y trans-deltametrina, que poseen una vida media de 12-16, 3-5 y 2-10 meses respectivamente, en sedimentos a 20°C. Su vida media en ambientes más fríos (4°C) aumenta a 25-65, 5-10 y 16-72 meses respectivamente (Gan et al., 2005).

Debido a su uso en gran escala, los piretroides contaminan aguas fluviales llegando hasta el océano, afectando el ecosistema marino. Un estudio realizado en China observó que existe bioacumulación de estos insecticidas en diferentes tipos de peces, siendo los peces carnívoros los que tienen una mayor concentración de piretroides (Xie et al., 2022). El daño que ocasionan los piretroides a los peces son graves, llegando incluso a provocar daño en el ADN e inducir apoptosis en concentraciones muy bajas (Yang et al., 2020). El efecto en los peces repercute en toda la cadena trófica que existe en estos ecosistemas, con un potencial impacto en la biodiversidad. Esto, también puede afectar la salud de los humanos al consumir pescado que tenga estos insecticidas. La presencia de piretroides en humanos está asociado a problemas del neurodesarrollo en edades tempranas (Ntantu Nkinsa et al., 2023), lo que representa un problema con la salud pública. Además, existe un gran riesgo de resistencia a estos insecticidas. Un estudio con *Drosophila suzukii* demostró que el contacto con deltametrina en concentraciones de LD50 y LD90, causan una resistencia hasta 25 veces mayor en 8 generaciones (Civolani et al., 2021a). En conjunto, estos problemas demandan el desarrollo de control de plaga más amigable con el medio ambiente y la respuesta puede estar en predadores insectívoros productores de toxinas.

## **Canales de sodio dependientes de voltaje**

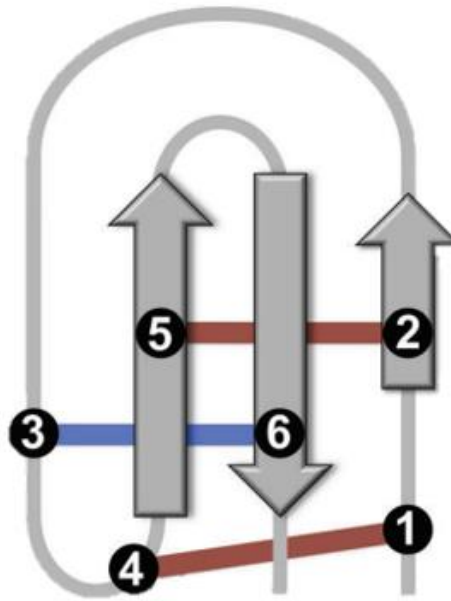
Los canales de sodio dependiente de voltaje ( $Na_v$ ) son proteínas transmembrana que están involucradas en la generación del potencial de acción, desde el inicio hasta la propagación. A medida que cambia el voltaje de la membrana los  $Na_v$  transitan por tres estados conformacionales: cerrado, abierto e inactivado (Figura 1). En el inicio de la despolarización de la neurona, luego de superar un umbral de voltaje, los  $Na_v$  comienzan a abrirse permitiendo el flujo de sodio hacia la neurona provocando una despolarización mayor. Este mecanismo produce un "feedback" positivo (despolarización → apertura de  $Na_v$  → mayor despolarización → más  $Na_v$  abiertos). Por esto el estado de inactivación es sumamente importante, ya que permite la repolarización de la membrana y determina la duración de los impulsos nerviosos (Angsutararux et al., 2021; Armstrong & Hollingworth, 2018). Este proceso depende de un segmento intracelular que contiene las secuencias isoleucina, fenilalanina y metionina (IFM) que una vez activado el canal, se mueve para obstruir el poro del canal impidiendo abruptamente el flujo de sodio (Chen et al., 2024). Existen enfermedades genéticas graves asociadas al mal funcionamiento del mecanismo de inactivación, como encefalopatía epiléptica infantil temprana, síndrome de Dravet, parálisis periódica hipercalemica o paramiotonía congénita (Barbieri et al., 2023; Berecki et al., 2025; Cannon, 2015; Claes et al., 2001). Los canales de sodio están conformados por una subunidad  $\alpha$  y una o más subunidades  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  está constituida por cuatro dominios homólogos y cada uno posee seis segmentos transmembrana (S1-S6), los segmentos transmembrana S1-S4 forman el sensor de voltaje, mientras que los dominios S5 y S6 forman el poro que permite el flujo de sodio a través de la membrana. Las subunidades  $\beta$ , son proteínas transmembrana más pequeñas y la coexpresión de estas modula la expresión y la función de los canales de sodio y sus propiedades de "gating" (Dong et al., 2014).



**Figura 1.** Representación de los posibles estados de los canales de sodio dependiente de voltaje.

### **Toxinas inhibidoras con nudo de cisteína**

Gracias a su vital importancia los canales iónicos han sido un blanco popular para toxinas de arácnidos. El gran tiempo evolutivo que han tenido las arañas les ha permitido diseñar venenos altamente eficientes y específicos. Se destacan los ICK, los cuales se caracterizan por formar puentes de disulfuro entre cisteínas. En las ICK con tres puentes, dos de ellos forman un "loop", mientras que el tercero se entrelaza en la cadena polipeptídica formando una especie de nudo. Estos péptidos poseen la característica de ser muy estables a la desaturación, a la proteólisis y una gran habilidad para interactuar con los canales iónicos modificando su funcionamiento (Guo et al., 2023). Uno de los principales blancos para diferentes especies de arañas depredadoras que poseen este tipo de toxina son los  $Na_v$  (Cardoso & Lewis, 2019). Algunos de ellos poseen un blanco específico hacia los  $Na_v$  de invertebrados, siendo no tóxicos para vertebrados (Bende et al., 2015).



**Figura 2.** Fragmento de la figura original tomada de King (2019), que representa la estructura general de las toxinas ICK, enumerando las cisteínas (1-6) y marcando con líneas (rojo y azul) los puentes de disulfuro presentes, el puente resaltado en azul muestra el pseudo nudo que forman.

### **$\alpha$ -nemertide**

Esta toxina denominada  $\alpha$ -nemertide es un péptido ICK proveniente de la especie gusano cordón de bota, *Lineus longissimus*, perteneciente al phylum nemertea. Este gusano es un cazador y carroñero marino. Comúnmente mide de 5 a 15 metros de longitud, pero se han encontrado especímenes de más de 30 metros. Es considerado el animal más largo del mundo. Posee una probóscide evaginable tóxica, cuyas secreciones poseen un coctel de toxinas que incluye la  $\alpha$ -nemertide. Estas toxinas también las secreta como mucosidad a lo largo del cuerpo para defensa (*Nemertea; Ribbon Worms, s. f.*).

La  $\alpha$ -nemertide interfiere con la inactivación del canal de sodio dependiente de voltaje con la consecuente prolongación de los potencial acción, paralizando así a sus presas (Bell et al., 2021; Göransson et al., 2019).  $\alpha$ -nemertide es letal para cangrejos, artemias, cucarachas y otros insectos, siendo letal en minutos con dosis de aproximadamente 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En artemias la  $\alpha$ -nemertide-1 posee una concentración efectiva media (EC50) de 0,3  $\mu\text{M}$ . En  $\text{Na}_v$  de *Blattella germánica* (Bg $\text{Na}_v$ ) posee un EC50 de 8,6 nM, mientras que en  $\text{Na}_v$  1.1-1.8 posee un rango de 76,5-359,6 nM, siendo el  $\text{Na}_v$ 1.7 con menor EC50 (76,5 nM) y el  $\text{Na}_v$ 1.2 con mayor EC50 (359,6 nM), mientras que en el canal  $\text{Na}_v$ 1.8 no es afectado en las concentraciones probadas (Jacobsson et al., 2018).



**Figura 3.** Estructura de  $\alpha$ -nemertide-1. Posee tres puentes de disulfuro señalados en amarillo. (PDB: 6ENA)

### **Proteínas recombinantes**

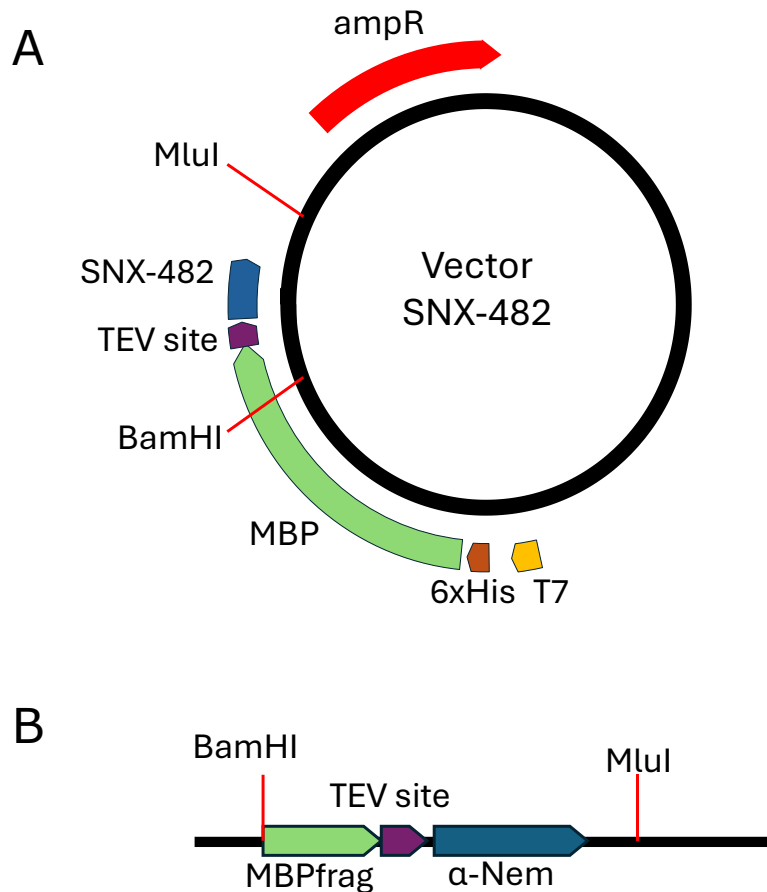
Las proteínas recombinantes son proteínas producidas mediante ingeniería genética. Para este fin se toma la secuencia codificante de la proteína de interés y se inserta en un vector que luego se introduce en un hospedero. Generalmente se utilizan bacterias o levaduras y así ellos producen la proteína deseada. Existen bacterias especialmente diseñadas para este fin, por ejemplo las BL-21, que es una cepa de *Escherichia coli* que tiene una copia de la polimerasa del fago T7, cuya expresión es controlada por el promotor del lacUV5 y que se induce con el análogo no hidrolizable de galactosa, isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) (Rosano et al., 2019). Esto brinda un control preciso para promover la expresión de la proteína recombinante al final de la fase de crecimiento exponencial del cultivo. Una de las dificultades en la obtención de proteínas recombinantes es su purificación, teniendo que pasar por

procesos como cromatografía. Si bien esto es complejo, existen varias soluciones biotecnológicas que ayudan con este proceso. Existe un gran catálogo de "etiquetas" con las cuales la purificación, y otros problemas, se pueden llevar de una manera más amena. Por ejemplo la etiqueta poli-histidina (6xHis) sirve para la cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés "*immobilized metal affinity chromatography*") con afinidad al níquel. También es utilizada la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés "*size exclusion chromatography*") la cual no requiere ninguna etiqueta, sino que separa las proteínas por su tamaño. Por otra parte, existen etiquetas que su fin es añadirle solubilidad a la proteína deseada, por ejemplo, MBP y SUMO (Yadav et al., 2016). Finalmente, para remover estas etiquetas, se utilizan enzimas proteolíticas que posean un blanco estable, por ejemplo la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV, por sus siglas en inglés "*Tobacco Etch Virus*"), añadiéndose esta secuencia entre la de la proteína de interés y las etiquetas con el fin de separarlas luego de su síntesis.

## **CAPITULO II: MARCO METODOLÓGICO**

### **Vectores y constructo**

Para la producción de  $\alpha$ -nemertide recombinante, se aprovechó el plásmido utilizado para la producción de otra toxina (SNX-482) que se desarrolló en laboratorio (figura 4A). Este vector posee un promotor T7 seguido de una etiqueta 6xHis (para facilitar la purificación mediante cromatografía de afinidad al níquel), seguido de una proteína transportadora de maltosa (MBP) (para asegurar una mayor solubilidad) y un sitio de corte para la proteasa del virus del tabaco (TEV) (para posteriormente separar la proteína de interés). Además, este vector posee resistencia a la ampicilina, el cual permite seleccionar las bacterias que portan el vector y los sitios de enzimas de restricción de un solo corte para remplazar la secuencia entre el sitio BamHI y MluI por una similar en la región codificante de SNX-482 por la de  $\alpha$ -nemertide.

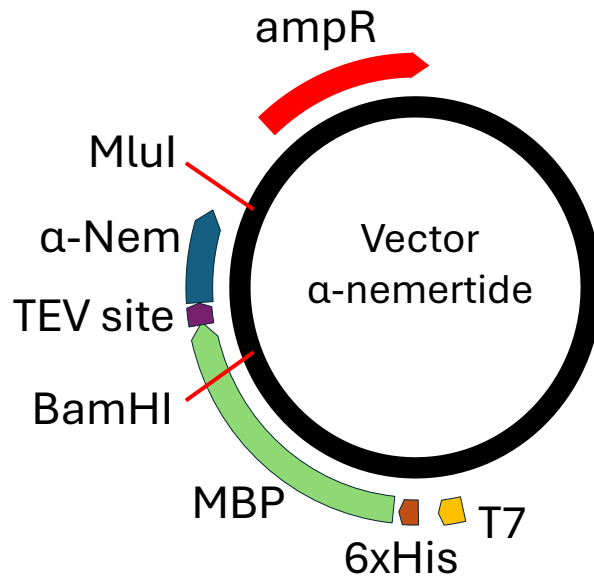


**Figura 4.** (A) Vector SNX-482 utilizado para la producción de proteína recombinante SNX-482 (B) Constructo diseñado para producción de  $\alpha$ -nemertide. Consta de un fragmento de MBP, un sitio reconocido por la proteasa TEV, seguido por la secuencia de  $\alpha$ -nemertide. Posee sitios de enzimas de restricción BamHI y MluI.

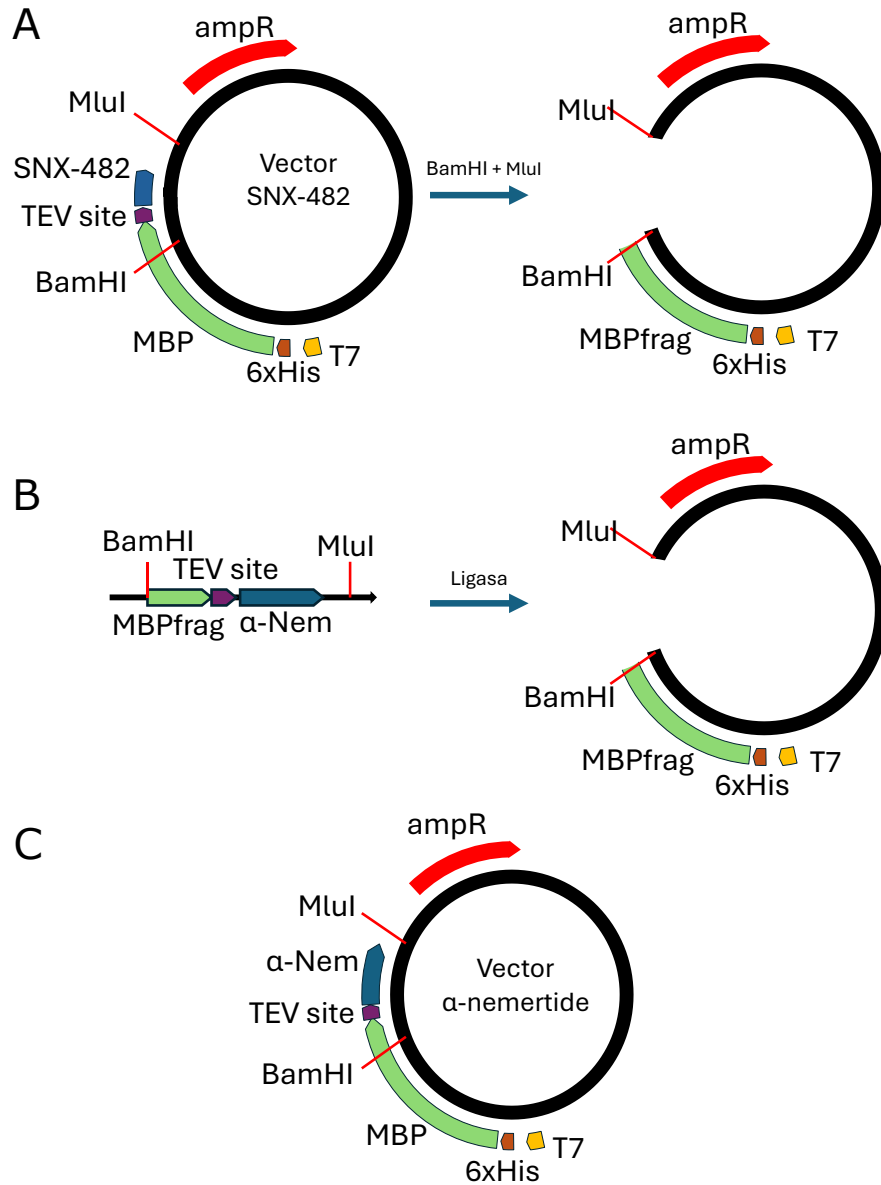
Para obtener el plásmido codificante para  $\alpha$ -nemertide, se envió a sintetizar (Twist Bioscience) un fragmento que contenía una parte de secuencia codificante de MBP, el sitio de clivaje por TEV y  $\alpha$ -nemertide, flanqueados por los sitios para las enzimas de restricción BamHI y MluI (figura 4B).

Una vez ligado, los dominios del vector final tendrían el siguiente orden: promotor T7, Tag 6xHis, MBP, TEV y finalmente el  $\alpha$ -nemertide (Figura 5). Se transformaron bacterias competentes *E. coli* BL-21 (DE3) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) mediante un choque térmico de 30 segundos a 42°C, seguido de 2 minutos en hielo, e incubados durante 1 hora a 37°C con caldo super óptimo con represión de

catabolitos (SOC). Posteriormente fueron sembradas en placas de agar con ampicilina para así seleccionar las bacterias que posean el vector inserto.



**Figura 5.** Vector con la secuencia de  $\alpha$ -nemertide inserta para lograr el complejo MBP-TEV- $\alpha$ -nemertide.



**Figura 6.** Proceso completo de construcción de vector a-nemertide. (A) Se emplean las enzimas de restricción BamHI y MluI para “abrir” el vector en el sector deseado. (B) Se mezcla con el constructo diseñado para la producción de α-nemertide y se añade ligasa. (C) Formación final del vector α-nemertide.

### Cultivo bacteriano

Se cultivaron las bacterias a 30°C para TEV y a 37°C para a-nem, hasta alcanzar una densidad óptica de 0,4-0,5 UA, luego se indujeron con 1mM de IPTG durante 4 horas a 30°C para TEV y a 27°C durante 16 horas para α-nemertide. Todo este proceso se

hizo en un agitador orbital en matraces con muescas y aproximadamente el doble de tamaño del cultivo añadido para favorecer la oxigenación de las bacterias. Una vez transcurrido el tiempo de inducción, se centrifugaron las bacterias a 5000g durante 15 minutos para posteriormente trabajar con el pellet y eliminar el medio líquido.

### **Lisis**

Para la lisis de las bacterias, estas se resuspendieron en un tampón de lisis de la siguiente composición K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 100mM, glicerol 10%, imidazol 15mM, y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM, 200mM NaCl y 25mM imidazol para a-nemertide. A TEV se añadió 0,5 mg/mL de lisozima, 12,5 mg/mL DNAsa y 5mM de Mg<sup>2+</sup> y luego son fueron a una sonicación en hielo con ciclos de 20 segundos ON y 60 segundos OFF, con el fin de no aumentar la temperatura. Ya terminado el proceso se filtró para ser posteriormente cargado en una columna de cromatografía.

### **Purificación con afinidad al níquel**

Para la purificación por afinidad de TEV se utilizó el método de cromatografía por suspensión. Para este fin se cargó la columna con 1 mL de resina por cada gramo de solución. Esta se lavó con agua MiliQ 6 veces el volumen y luego se equilibró con 6 veces el volumen con buffer de lisis a 4°C. Terminado este proceso se cargó la muestra y se lavó la columna con 7 veces el volumen con buffer de lisis. Para la elusión se lavó con 7 veces el volumen con buffer de lisis con concentración de imidazol a 200mM. Finalmente, se concentró (~x2) por ultrafiltración con concentradores de proteínas de PES Pierce™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) con filtros con corte de 10Kda y se cambia el buffer mediante concentraciones y diluciones con buffer PD10 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25mM, NaCl 200mM y glicerol 10%) hasta añadir 4 veces el volumen. La concentración final se mantuvo cercana a 1 mg/ml cuantificada por el método de Qubit™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) de acuerdo de las instrucciones del fabricante.

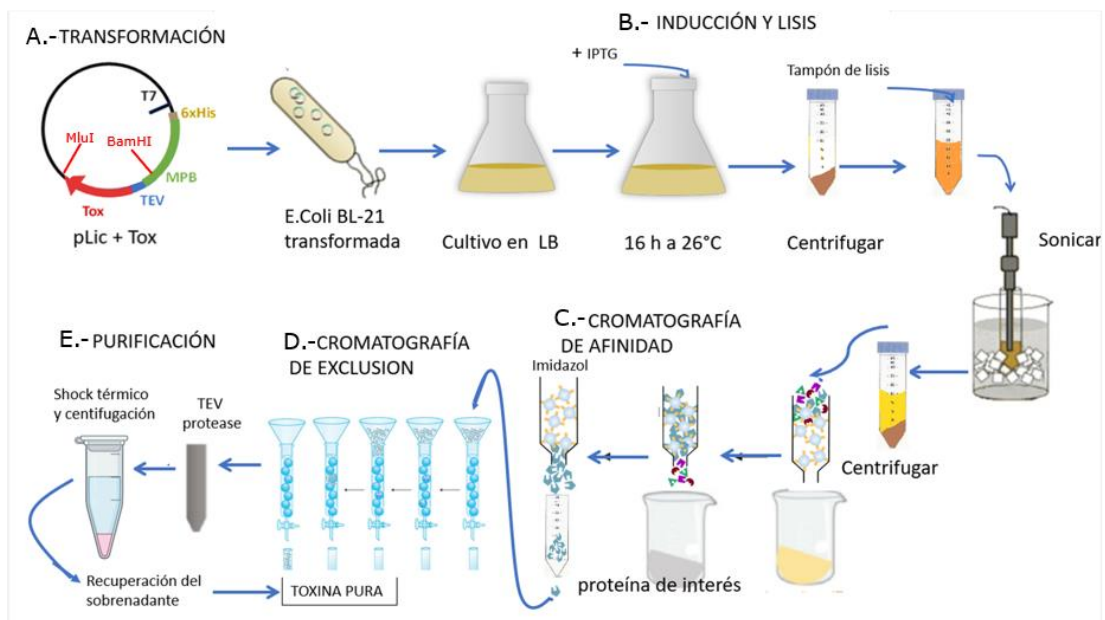
La purificación de MBP-a-nemertide se realizó con un equipo de cromatografía de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) AKTA-Prime (Cytiva, Marlborough, MA, USA), con columnas HisTram™ HP (Cytiva, Marlborough, MA, USA). Se comenzó a equilibrando la columna con el tampón de lisis con un flujo de 4 mL por minuto. Una vez equilibrado se cargó la muestra filtrada (0.45 mμ) y luego se lavó la columna hasta que la absorbancia volvió a la línea base, para que al momento de la colección solo esté la proteína de interés. Para coleccionar la proteína que se encuentra retenida en la columna debido a su afinidad por níquel se eluyó con un gradiente de imidazol

de 25mM a 200mM en 10 volúmenes, de tal manera de llegar al 100% de cambio en 10 minutos. Esto permitió reducir la contaminación por proteínas con menor afinidad al níquel.

## Digestión

La digestión de MBP- $\alpha$ -nemertide se realizó añadiendo el 5% de TEV al total de proteínas obtenidas de la cromatografía, por un total de 16 Horas a 16°C.

El producto de la digestión contiene dos proteínas sensibles a temperatura (MBP y TEV) mientras que la proteína de interés ( $\alpha$ -nemertide), como la mayoría de los ICK mantiene sus estructura a altas temperaturas. Con esto en mente separamos  $\alpha$ -nemertide mediante un choque térmico de 65°C por 15 minutos. Este tratamiento logra que las proteínas con menor resistencia a temperatura se aglomeren, y mediante un centrifugado a 15.000g durante 15 minutos se forme un pellet lográndose así enriquecer la toxina en el sobrenadante (Klint et al., 2015).



**Figura 7.** Esquema de protocolo de producción de proteínas recombinantes. (A) Se transforma E. coli BL-21 con el vector de interés. (B) Se cultiva y se induce con 1mM de IPTG, luego se centrifugan y desecha el sobrenadante. El pellet es resuspendido en el tampón de lisis y se sónica con un protocolo de 20s ON y 60s OFF con la muestra en baño de hielo. (C) El resultado es cargado a la columna de afinidad con resina Ni-NTA. (D) La fracción eluida se carga a una cromatografía de afinidad para quitar el imidazol de la solución. (E) La fracción colectada se digiere añadiendo un 5% de TEV del peso total de la proteína, luego se produce un shock térmico para que las proteínas no resistentes a temperatura se aglomeren y sean separadas mediante una centrifugación a 15.000g, rescatándose la proteína de interés del sobrenadante.

## **Bioensayo**

El bioensayo se realizó con el stock de *Drosophila melanogaster* adultas de la cepa Canton-S de 5-6 días de edad, obtenidos del bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso. Canton-S es una cepa que asemeja a ejemplares en estado natural, por lo que es ampliamente utilizada para bioensayos. Debido a que  $\alpha$ -nemertide es un inhibidor de la inactivación que afecta a los Nav, se utilizó la cipermetrina como control positivo, ya que posee el mismo mecanismo de acción. La dosis-respuesta fue determinada utilizando concentraciones de 10, 2,5, 0,625, 0,156 y 0 ppm de cipermetrina, que se realizó con codificación ciega de muestras para evitar sesgos al evaluar los resultados. Para la realización del bioensayo, se dispusieron 10 moscas adultas de 5-6 días de edad en frascos de vidrio, previamente tratadas con restricción de alimentos durante 4 horas. La administración de cipermetrina fue por vía oral mezclándolo con su alimento, el cual fue dispuesto al interior del frasco pegado al fondo, mediante un papel filtro humedecido con 25  $\mu$ L de disolución de las diferentes concentraciones de cipermetrina, 5% de sacarosa y 5% de etanol. Los frascos fueron guardados en una caja semicerrada inclinados  $\sim 15^\circ$  a una temperatura de 25°C durante 24 horas. Cinco minutos antes del conteo se dejaron las moscas expuestas a la luz solar para aumentar su movilidad y evitar el conteo erróneo por baja actividad.

## CAPITULO III: RESULTADOS

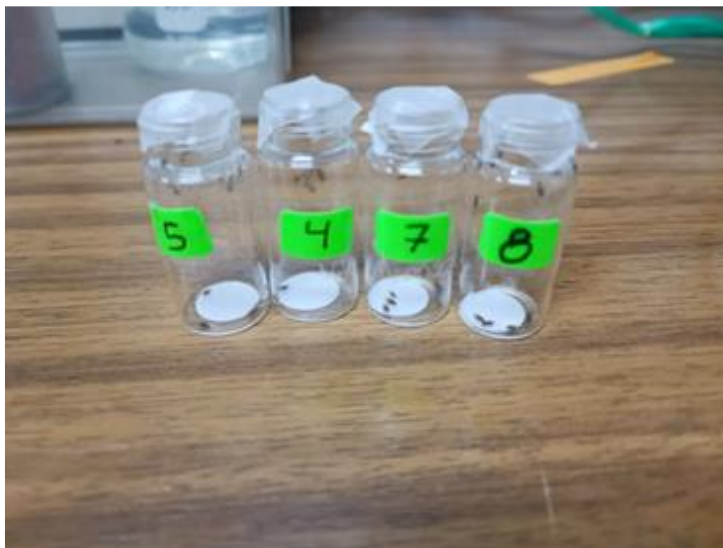
### Resultados de bioensayo

Las concentraciones utilizadas fueron 10, 2,5, 0,625, 0,156 y 0 ppm. La codificación ciega evitó el sesgo en el conteo; solo una vez determinada la mortalidad es que se informó la concentración de cada frasco.

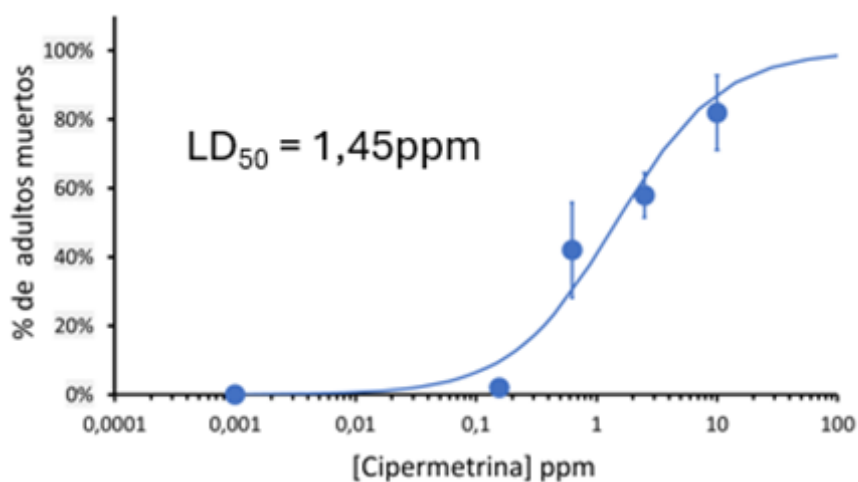
Para estimar la LD 50 se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{Muertos}{Total} = \frac{1}{\left(1 + \frac{LD_{50}}{[Cipermetrina]}\right)}$$

Esta ecuación relaciona la proporción de individuos muertos con la concentración de cipermetrina expresada en ppm. Los resultados de este bioensayo arrojaron una dosis letal 50 (LD50) de 1,45 ppm, resultado que constituye una base para comparar la efectividad del insecticida peptídico,  $\alpha$ -nemertide, en moscas Canton-S.



**Figura 8.** Fotografía de los frascos utilizados para los bioensayos de *Drosophila melanogaster*.



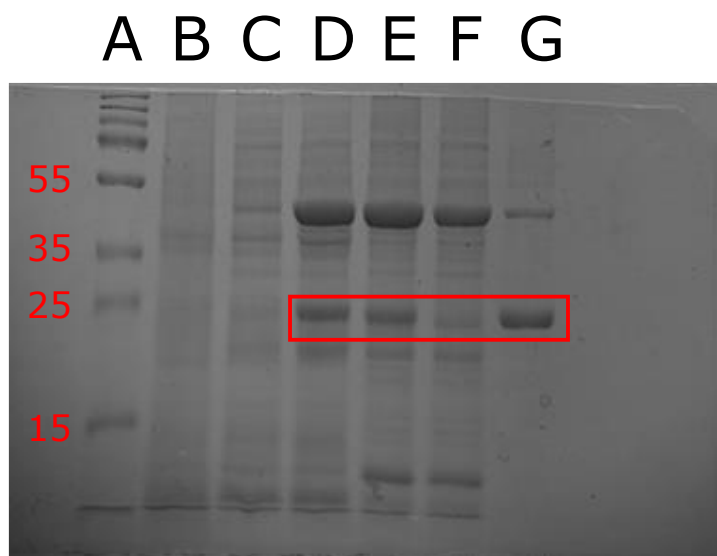
**Figura 9.** Gráfico de datos obtenidos de bioensayo de dosis respuesta con cipermetrina en espécimen de *Drosophila melanogaster* (Tabla 1). El eje X muestra la concentración de cipermetrina en ppm con una escala logarítmica y el eje Y el porcentaje de adultos muertos. La línea continua corresponde al ajuste no lineal de la ecuación, la cual arroja un LD<sub>50</sub> de 1,45 ppm. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar.

**Tabla 1.** Mortalidad de *Drosophila melanogaster* tras 24 horas de exposición alimenticia a cipermetrina en diferentes concentraciones. Se muestra los valores individuales por quintuplicado de cada concentración, con su promedio y desviación estándar.

concentración [ppm]	Conteo de muertos					Promedio	±	De
	réplica 1	réplica 2	réplica 3	réplica 4	réplica 5			
0	0	0	0	0	0	0	±	0
0,156	0	1	0	0	0	0,2	±	0,45
0,625	0	7	5	6	3	4,2	±	2,77
2,5	7	6	7	5	4	5,8	±	1,3
10	10	9	10	5	7	8,2	±	2,17

### **Producción y purificación de TEV**

La purificación de TEV recombinante se realizó mediante cromatografía en suspensión, consiguiéndose un rendimiento de ~22 mg por litro de cultivo, cuantificado mediante Qubit™ Protein Assay (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Debido a la diferencia de tampón para TEV vs.  $\alpha$ -nemertide, se decidió utilizar una diferente técnica de cromatografía (cromatografía en suspensión) para no mezclar los tampones. Se tuvo la precaución de no manipular ni almacenar la proteasa a una concentración de más de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Se recolectó una alícuota de 40  $\mu\text{L}$  durante cada etapa del proceso, la cual fue posteriormente analizada en un gel SDS-PAGE (figura 10) para así determinar el grado de purificación logrado en cada paso. Dado su peso de ~27Kda, se utilizó un gel de 12% de acrilamida.

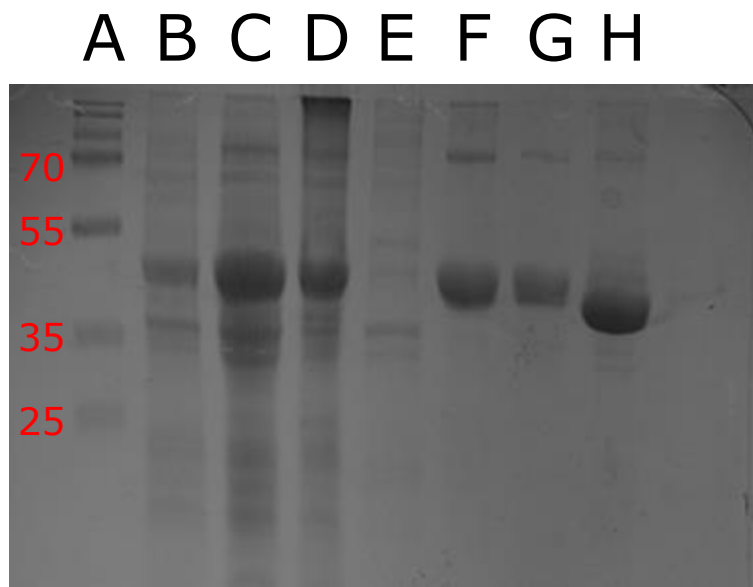


**Figura 10.** Análisis por SDS-PAGE de TEV. Marcado en un recuadro rojo se encuentra la banda que coincide con el peso molecular de TEV. (A) escalera de peso molecular (Kda). (B) *E. coli* BL-21(DE3) sin transformar. (C) *E. coli* BL-21(DE3) con el inserto, sin inducir. (D) Cultivo inducido. (E) Lisis total del cultivo inducido. (F) *Flow Through* de cromatografía por suspensión. (G) Fracción eluida.

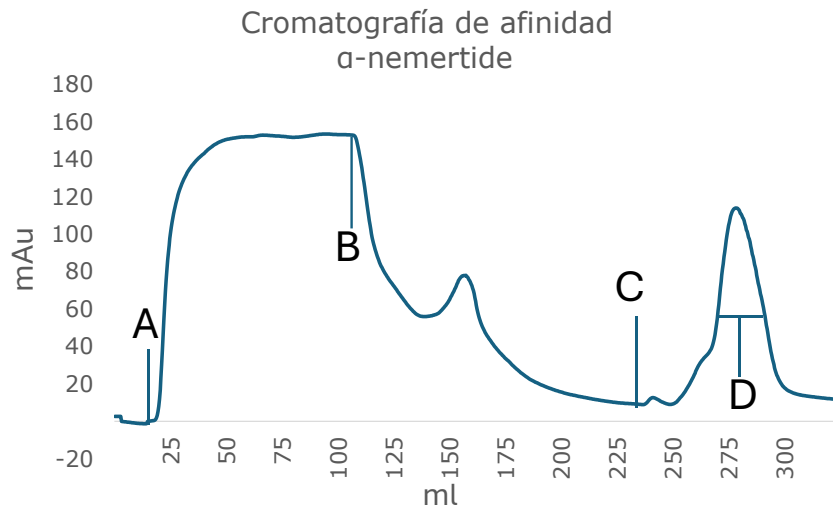
### **Producción y purificación de $\alpha$ -Nemertide**

La producción de MBP- $\alpha$ -nemertide recombinante se realizó en *E. coli* BL-21 (DE3) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) transformada con el vector de  $\alpha$ -nemertide (figura 5) y purificada mediante IMAC aprovechando la etiqueta 6xHis en N-terminal en el complejo MBP- $\alpha$ -nemertide (figura 11). Luego, para la eliminación del imidazol del tampón se utilizó cromatografía de exclusión por tamaño, permitiendo así remover contaminantes y observar la formación de oligómeros (figura 12). La fracción correspondiente a MBP- $\alpha$ -nemertide se concentró mediante ultrafiltración y se sometió a digestión por TEV. Finalmente, para purificar  $\alpha$ -nemertide después de la digestión, en donde se produce una disolución que contenía MBP, TEV y  $\alpha$ -nemertide, se realizó un tratamiento térmico y posterior centrifugado. Para observar el proceso paso a paso de la purificación, se recolectaron alícuotas de 40 $\mu$ L en cada paso (bacteria sin inducir, bacteria inducida, lisis total, Flow through IMAC, SEC y corte proteolítico) para luego ser analizadas por SDS-PAGE (figura 13). Se omitió la  $\alpha$ -nemertide posterior al golpe térmico debido a que, por su peso molecular ( $\sim$ 3kDa),

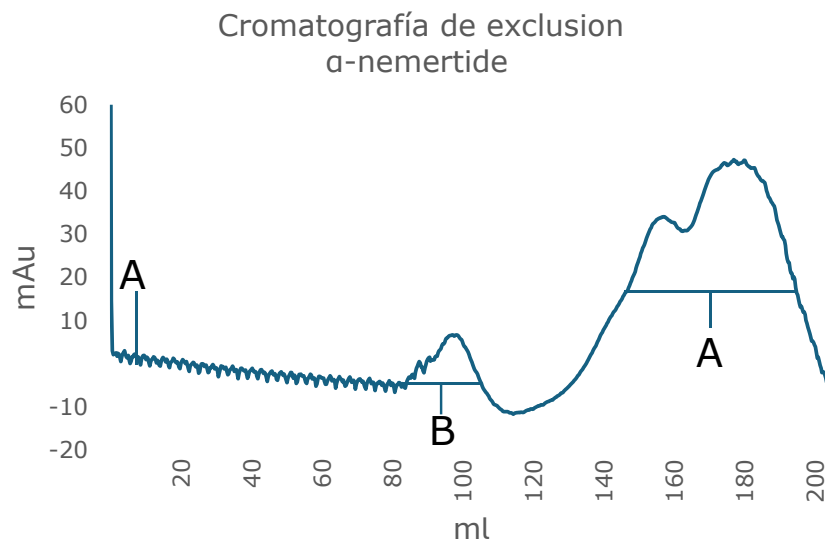
no era posible ser observada mediante esta técnica. Se utilizó una concentración de acrilamida de 18%, con el fin de observar el cambio de peso molecular de MBP- $\alpha$ -nemertide respecto a MBP. El rendimiento por litro de cultivo fue de  $\sim 3\text{mg}$  de  $\alpha$ -nemertide, cuantificado mediante Qubit™ Protein Assay (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).



**Figura 11.** Análisis por SDS-PAGE de  $\alpha$ -nemertide (A) escalera de peso molecular (Kda). (B) *E. coli* BL-21(DE3) transformada sin inducir. (C) *E. coli* BL-21(DE3) transformada inducida. (D) Lisis total del cultivo inducido. (E) *Flow Through* de cromatografía de afinidad. (F) Fracción eluida de cromatografía de afinidad. (G) fracción colectada de cromatografía de exclusión. (H) Muestra post digestión con TEV.



**Figura 12.** Gráfico de cromatograma de afinidad de  $\alpha$ -nemertide. (A) Inicio de la carga del lisado bacteriano a la columna. (B) Comienzo del lavado de la columna para eliminar impurezas. (C) Comienzo del cambio hacia tampón de elusión. (D) Fracción colectada.



**Figura 13.** Gráfico de cromatograma de exclusión de  $\alpha$ -nemertide. (A) Inicio de la carga a la columna. (B) impurezas. (C) Fracción colectada con formación de dímeros.

## CAPITULO IV: DISCUSIÓN

### **Bioensayo**

En este estudio se evaluó la mortalidad producida por cipermetrina administrada por vía oral a *Drosophila melanogaster* de la cepa Canton-S de 5-6 días de edad, dando como resultado un LD50 de 1,45. Como se puede ver en la tabla X, existe una diferencia en la mortalidad a la máxima concentración de cipermetrina, esto puede ser debido al uso de mezclas de moscas macho y hembra, ya que existen reportes los cuales indican una resistencia mayor a este insecticida en hembras (Batiste-Alentorn et al., 1987). Para su uso en el control de la plaga *D. suzukii*, se podría mejorar el ensayo utilizando solo moscas hembra, para determinar de una manera más precisa la concentración apropiada para aplicar el insecticida en condiciones agrícolas reales.

El proceso para diseñar la metodología para determinar toxicidad tuvo varias dificultades. En primer lugar, el experimento se realizaba con 15 individuos por frasco y con reposo horizontal. Esto ocasionaba muertes inesperadas en los controles. Modificando cada una de esas variables se concluyó que cada una de estas afectaba la viabilidad de manera diferente. Al mantener los frascos de manera horizontal, la evaporación causaba que la toxina se concentrara en los bordes, y al poseer un 5% de sacarosa las moscas quedaban pegadas a las paredes del frasco. Cuando se inclinó aproximadamente 15°, la evaporación no quedaba repartida de manera homogénea por todo el frasco, sino que en un área mucho más discreta, dejando de entorpecer la alimentación de las moscas. Sin embargo, al modificar esta variable se seguía observando muerte en los controles, pero esta vez no estaban adheridos a las murallas, por lo que se decidió disminuir la cantidad de especímenes por frasco. Por otro lado, los machos son más susceptibles a la desecación que las hembras (Lin et al., 2023), por lo que también podían secar el papel filtro creando un ambiente desfavorable para la supervivencia. Para evitar la desecación, se realizaron pruebas con diferentes volúmenes, utilizándose finalmente volúmenes de 25 µL con 10 moscas por frasco, condición bajo la cual se logró que las moscas control sobrevivieran el tiempo del bioensayo.

### **Uso de *Drosophila melanogaster* como modelo**

*Drosophila melanogaster* es un modelo animal ampliamente utilizado para medir la toxicidad de insecticidas (Akmoutsou et al., 2011; Batiste-Alentorn et al., 1987; Tasman et al., 2021). Si bien el objetivo real era *Drosophila suzukii*, el uso de *D.*

*melanogaster* puede dar un acercamiento a la acción de diversos insecticidas dado su estrecho parentesco, con un 96.15% de identidad con los canales de sodio de *D. suzukii* (Camacho et al., 2009). Aun así, hay que tener en consideración algunos puntos clave. Existen poblaciones de *D. suzukii* que poseen un aumento en la expresión de genes metabólicos, como citocromo P450 y esterases otorgándole resistencia a los insecticidas comerciales como piretroides (Civolani et al., 2021b; Tabuloc et al., 2024). En paralelo, se han descrito diferentes mutaciones puntuales en los  $Na_v$  de *D. melanogaster* que otorgan resistencia a piretroides (Pittendrigh et al., 1997), mutaciones que también podrían ocurrir en *D. suzukii*. Por esto, el uso de *D. melanogaster* podría dar una buena aproximación del efecto que causaría en *D. suzukii*. Aun cuando el sitio de unión de los ICK es diferente al de insecticidas comerciales, el estudio de estas mutaciones en el uso de ICK es de interés.

### **Estabilidad y almacenamiento de TEV**

TEV es una proteasa comúnmente utilizada en biología molecular gracias a su sitio de corte específico, logrando remover etiquetas sin afectar la secuencia de la proteína deseada. Esta proteasa tiene la característica de cortarse a sí misma produciendo una enzima con actividad reducida, haciendo que su almacenamiento sea complicado (Kapust et al., 2001). Normalmente es almacenada a concentraciones menores a 1 mg/ml y a temperaturas que van desde 4°C a -80°C para evitar que pierda actividad enzimática (Cabrita et al., 2007). Se observó en el laboratorio que a la tercera semana se producía un sedimento lechoso al fondo de los tubos, indicando precipitación. Además, se observó una pérdida total de actividad. Estos cambios coinciden con lo descrito en la literatura, evidenciando la necesidad de optimizar la estabilidad de esta enzima (Davis et al., 2025; Parida et al., 2023). Sin embargo, estas condiciones optimizadas solo se lograron al final de este proyecto lo que entorpeció la producción de  $\alpha$ -nemertide.

Dentro de los primeros intentos, no se observaba actividad en la proteasa TEV. Por lo mismo, se realizaron diferentes condiciones de corte proteolítico optimizar el resultado. Se realizaron pruebas modificando el tiempo de acción y la temperatura: 16 horas 4°C, 4 horas 30°C y 16 horas 16°C, según protocolos estándar (*Typical Reaction Conditions for TEV Protease (NEB #P8112) | NEB, s. f.*). La mejor reacción se observó en 16 horas con 16°C, el cual fue utilizado para el corte proteolítico.

### **Inviabilidad de bioensayo con $\alpha$ -nemertide**

Las principales dificultades de la obtención de  $\alpha$ -nemertide pura es su tamaño ( $\sim 3\text{Kda}$ ) (Jacobsson et al., 2018). Debido a que hubo un inconveniente con el instrumento HPLC, no se pudo verificar la pureza de la toxina obtenida. Además, la dificultad del plegamiento de esta proteína, al tener tres enlaces de disulfuros, provoca plegamientos erróneos (Jacobsson et al., 2021). Sin HPLC, no fue posible de medir tanto la pureza y el correcto plegamiento. Además, el problema ocurrido con la estabilidad funcional de TEV, produjo un retraso en el almacenamiento de toxina de pureza desconocida, teniendo que producir TEV antes de cada producción de  $\alpha$ -nemertide. La resolución óptima de un SDS-PAGE convencional es de  $>30\text{Kda}$ , lo cual dificulta la visualización de  $\alpha$ -nemertide; para este peso molecular es recomendable otros protocolos como tricine-SDS-PAGE (Backman & Persson, 2018). Esto llevó a la imposibilidad de realizar bioensayos dosis-respuesta de manera adecuada, ya que sin saber la pureza lograda no sería posible obtener una curva de  $\alpha$ -nemertide correcta.

### **Proyecciones y limitaciones**

Dentro de la agricultura la protección de las plantaciones es crucial, por lo mismo se utilizan insecticidas de manera repetitiva. Esto produce una presión biológica sobre los organismos afectados, causando la aparición de individuos resistentes al compuesto. Una de las posibles soluciones a este problema, es implementar insecticidas que posean otro blanco molecular y que tengan una vía de degradación diferente a los insecticidas mundialmente comercializados, como algunos venenos de araña que poseen un diferente sitio de acción aun no descubierto (Windley et al., 2012).

Un futuro prometedor en el ámbito de los insecticidas es la implementación de insecticidas peptídicos. Considerando el largo tramo evolutivo que han tenido las especies depredadoras utilizadoras de veneno, se podría aprovechar ese curso natural de la evolución para generar bioinsecticidas con una alta afinidad hacia los invertebrados, menor resistencia, menor bioacumulación y con la posibilidad de potenciar su efecto o selectividad con procesos biotecnológicos (Marone Fassolo et al., 2024). Si bien esta idea es prometedora, aún hay barreras metodológicas que limitan su aplicabilidad.

Las toxinas de araña, en su mayoría poseen un motivo ICK, el cual le otorga gran estabilidad a la denaturación. Sus blancos suelen ser canales iónicos de invertebrados y poseen diferentes métodos de acción, incluyendo modificando el *gating* de acción o

inactivación de los canales de sodio, bloqueando canales de calcio o canales de potasio, haciéndolos relativamente seguros para humanos (King, 2019; Windley et al., 2012). El problema de esto es que su producción es altamente compleja debido a que son propensas al plegamiento erróneo, lo cual reduce su toxicidad. Esto compromete su producción en las cantidades necesarias para ser utilizado como insecticida.

Por otro lado, el estudio en particular de estos pépticos ICK podrían generar soluciones medicas a problemas ligados con su blanco molecular, ya que se podrían identificar mutaciones que actúen como reguladores de los canales iónicos, y, gracias a su alta afinidad, se lograría combatir canalopatías con bajos daños colaterales, como por ejemplo corrigiendo la actividad de los  $Na_v$  en personas afectadas con dolor crónico (X. Wang et al., 2024).

## Referencias

- Abreu-Villaça, Y., & Levin, E. D. (2017). Developmental neurotoxicity of succeeding generations of insecticides. *Environment international*, 99, 55-77. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.11.019>
- Akmoutsou, P., Mademtoglou, D., Nakou, I., Onoufriadis, A., Papadopoulou, X., Kounatidis, I., Frantzios, G., Papadakis, G., Vasiliadis, K., Papadopoulos, N. T., & Mavragani-Tsipidou, P. (2011). Evaluation of toxicity and genotoxic effects of spinosad and deltamethrin in *Drosophila melanogaster* and *Bactrocera oleae*. *Pest Management Science*, 67(12), 1534-1540. <https://doi.org/10.1002/ps.2208>
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., & Martínez, M. A. (2009). Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*, 182(1), 7-20. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.04.008>
- Angsutararux, P., Kang, P. W., Zhu, W., & Silva, J. R. (2021). Conformations of voltage-sensing domain III differentially define NaV channel closed- and open-state inactivation. *Journal of General Physiology*, 153(9). <https://doi.org/10.1085/jgp.202112891>
- Armstrong, C. M., & Hollingworth, S. (2018). A perspective on Na and K channel inactivation. *Journal of General Physiology*, 150(1), 7-18. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711835>
- Asplen, M. K., Anfora, G., Biondi, A., Choi, D.-S., Chu, D., Daane, K. M., Gibert, P., Gutierrez, A. P., Hoelmer, K. A., Hutchison, W. D., Isaacs, R., Jiang, Z.-L., Kárpáti, Z., Kimura, M. T., Pascual, M., Philips, C. R., Plantamp, C., Ponti, L., Véték, G., ... Desneux, N. (2015). Invasion biology of spotted wing *Drosophila* (*Drosophila suzukii*): A global perspective and future priorities. *Journal of Pest Science*, 88(3), 469-494. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0681-z>
- Backman, L., & Persson, K. (2018). The No-Nonsens SDS-PAGE. En T. L. Singleton (Ed.), *Schizosaccharomyces pombe: Methods and Protocols* (pp. 89-94). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7546-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7546-4_8)
- Barbieri, R., Nizzari, M., Zanardi, I., Pusch, M., & Gavazzo, P. (2023). Voltage-Gated Sodium Channel Dysfunctions in Neurological Disorders. *Life*, 13(5), 1191. <https://doi.org/10.3390/life13051191>
- Batiste-Alentorn, M., Xamena, N., Velázquez, A., Creus, A., & Marcos, R. (1987). Studies on the toxicity of cypermethrin and fenvalerate in different strains of *Drosophila melanogaster* Meig. (Insecta, Diptera). *Environmental Research*, 43(1), 117-125. [https://doi.org/10.1016/s0013-9351\(87\)80063-4](https://doi.org/10.1016/s0013-9351(87)80063-4)
- Bell, J., Sukiran, N. A., Walsh, S., & Fitches, E. C. (2021). The insecticidal activity of recombinant nemertide toxin  $\alpha$ -1 from *Lineus longissimus* towards pests and beneficial species. *Toxicon*, 197, 79-86. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.04.003>

Bende, N. S., Dziemborowicz, S., Herzig, V., Ramanujam, V., Brown, G. W., Bosmans, F., Nicholson, G. M., King, G. F., & Mobli, M. (2015). The insecticidal spider toxin SFI1 is a knottin peptide that blocks the pore of insect voltage-gated sodium channels via a large  $\beta$ -hairpin loop. *The FEBS Journal*, 282(5), 904-920. <https://doi.org/10.1111/febs.13189>

Berecki, G., Tao, E., Howell, K. B., Coorg, R. K., Andersen, E., Kahlig, K., Wolff, M., Corry, B., & Petrou, S. (2025). Nav1.2 channel mutations preventing fast inactivation lead to SCN2A encephalopathy. *Brain: A Journal of Neurology*, 148(1), 212-226. <https://doi.org/10.1093/brain/awae213>

Buzzetti Morales, K. (2020). The Spotted Wing Drosophila in the South of the World: Chilean Case and Its First Productive Impacts. En H. El-Shafie (Ed.), *Invasive Species—Introduction Pathways, Economic Impact, and Possible Management Options*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91668>

Cabrita, L. D., Gilis, D., Robertson, A. L., Dehouck, Y., Rooman, M., & Bottomley, S. P. (2007). Enhancing the stability and solubility of TEV protease using in silico design. *Protein Science*, 16(11), 2360-2367. <https://doi.org/10.1110/ps.072822507>

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>

Cannon, S. C. (2015). Channelopathies of skeletal muscle excitability. *Comprehensive Physiology*, 5(2), 761-790. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140062>

Cardoso, F. C., & Lewis, R. J. (2019). Structure–Function and Therapeutic Potential of Spider Venom-Derived Cysteine Knot Peptides Targeting Sodium Channels. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00366>

Chagnon, M., Kreutzweiser, D., Mitchell, E. A. D., Morrissey, C. A., Noome, D. A., & Van der Sluijs, J. P. (2015). Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(1), 119-134. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3277-x>

Chen, H., Xia, Z., Dong, J., Huang, B., Zhang, J., Zhou, F., Yan, R., Shi, Y., Gong, J., Jiang, J., Huang, Z., & Jiang, D. (2024). Structural mechanism of voltage-gated sodium channel slow inactivation. *Nature Communications*, 15(1), 3691. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48125-3>

Cini, A., & Ioriatti, C. (2025). A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. *ResearchGate*. [https://www.researchgate.net/publication/229059768\\_A\\_review\\_of\\_the\\_invasion\\_of\\_Drosophila\\_suzukii\\_in\\_Europe\\_and\\_a\\_draft\\_research\\_agenda\\_for\\_integrated\\_pest\\_management](https://www.researchgate.net/publication/229059768_A_review_of_the_invasion_of_Drosophila_suzukii_in_Europe_and_a_draft_research_agenda_for_integrated_pest_management)

Civolani, S., Vaccari, G., Caruso, S., Finetti, L., Bernacchia, G., Chicca, M., & Cassanelli, S. (2021a). *Evaluation of insecticide efficacy and insecticide adaptive response in Italian populations of Drosophila suzukii*. <https://sfera.unife.it/handle/11392/2452745?mode=complete>

Civolani, S., Vaccari, G., Caruso, S., Finetti, L., Bernacchia, G., Chicca, M., & Cassanelli, S. (2021b). *Evaluation of insecticide efficacy and insecticide adaptive response in Italian populations of Drosophila suzukii*. <https://sfera.unife.it/handle/11392/2452745>

Claes, L., Del-Favero, J., Ceulemans, B., Lagae, L., Van Broeckhoven, C., & De Jonghe, P. (2001). De Novo Mutations in the Sodium-Channel Gene SCN1A Cause Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy. *American Journal of Human Genetics*, 68(6), 1327-1332. <https://doi.org/10.1086/320609>

*Cultivo de Cerezo: Técnicas y recomendaciones | BASF Chile*. (s. f.). Recuperado 6 de marzo de 2025, de <https://agriculture.basf.com/cl/es/proteccion-de-cultivos-y-semillas/cultivos/frutales/cerezos>

Dani, J. A., & Bertrand, D. (2007). Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotinic Cholinergic Mechanisms of the Central Nervous System. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 699-729. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105214>

Devotto M, L. (2020). *Importancia de la sanitización de los huertos para enfrentar la mosca de alas manchadas Drosophila suzukii*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias.

D. Galland, C. (2022). Would you harm a fly? An introduction to *Drosophila suzukii* and alternative methods for controlling this invasive pest. *Bulletin de La Société Royale Des Sciences de Liège*. <https://doi.org/10.25518/0037-9565.11012>

Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., Silver, K., & Zhorov, B. S. (2014). Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 50, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.03.012>

*Estados de desarrollo de Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae) y otras especies del género, comunes en el sur de Chile*. (s. f.). Recuperado 6 de marzo de 2025, de [https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/manual\\_reconocimiento\\_drosophila\\_suzukii.pdf](https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/manual_reconocimiento_drosophila_suzukii.pdf)

Fanning, P. D., VanWoerkom, A., Wise, J. C., & Isaacs, R. (2018). Assessment of a commercial spider venom peptide against spotted-wing *Drosophila* and interaction with adjuvants. *Journal of Pest Science*, 91(4), 1279-1290. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-1016-7>

Fletcher, J. I., Smith, R., O'Donoghue, S. I., Nilges, M., Connor, M., Howden, M. E., Christie, M. J., & King, G. F. (1997). The structure of a novel insecticidal neurotoxin, omega-atracotoxin-HV1, from the venom of an Australian funnel web spider. *Nature Structural Biology*, 4(7), 559-566. <https://doi.org/10.1038/nsb0797-559>

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (s. f.). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: Chile actualiza Límites Máximos de Residuos de plaguicidas en alimentos | FAO en Chile | Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Recuperado 30 de abril de 2025, de <https://www.fao.org/chile/noticias/detail-events/en/c/1411505/>

Furche Guajardo, C. (2023). El futuro de la agricultura y la alimentación: Apuntes para una discusión sobre nuevos requerimientos para la formación profesional en ciencias agronómicas. *Idesia (Arica)*, 41(2), 105-113. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292023000200105>

Gan, J., Lee, S. J., Liu, W. P., Haver, D. L., & Kabashima, J. N. (2005). Distribution and persistence of pyrethroids in runoff sediments. *Journal of Environmental Quality*, 34(3), 836-841. <https://doi.org/10.2134/jeq2004.0240>

Gobierno de Chile. (s. f.). *Nuestro País—Gob.cl*. Gobierno de Chile. Recuperado 17 de marzo de 2025, de <https://www.gob.cl/nuestro-pais/>

Göransson, U., Jacobsson, E., Strand, M., & Andersson, H. S. (2019). The Toxins of Nemertean Worms. *Toxins*, 11(2), 120. <https://doi.org/10.3390/toxins11020120>

Guo, R., Guo, G., Wang, A., Xu, G., Lai, R., & Jin, H. (2023). Spider-Venom Peptides: Structure, Bioactivity, Strategy, and Research Applications. *Molecules*, 29(1), 35. <https://doi.org/10.3390/molecules29010035>

Hołyńska-Iwan, I., & Szewczyk-Golec, K. (2020). Pyrethroids: How They Affect Human and Animal Health? *Medicina*, 56(11), 582. <https://doi.org/10.3390/medicina56110582>

*Informe Exportaciones No Cobre No Litio Enero 2025*. (s. f.). Recuperado 17 de marzo de 2025, de <https://cdc.prochile.cl/wp-content/uploads/2025/02/Informe-Exportaciones-No-Cobre-No-Litio-Enero-2025.pdf>

Jacobsson, E., Andersson, H. S., Strand, M., Peigneur, S., Eriksson, C., Lodén, H., Shariatgorji, M., Andrén, P. E., Lebbe, E. K. M., Rosengren, K. J., Tytgat, J., & Göransson, U. (2018). Peptide ion channel toxins from the bootlace worm, the longest animal on Earth. *Scientific Reports*, 8(1), 4596. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22305-w>

Jacobsson, E., Peigneur, S., Andersson, H. S., Laborde, Q., Strand, M., Tytgat, J., & Göransson, U. (2021). Functional Characterization of the Nemertide a Family of Peptide Toxins. *Journal of Natural Products*, 84(8), 2121-2128. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00104>

Kapust, R. B., Tözsér, J., Fox, J. D., Anderson, D. E., Cherry, S., Copeland, T. D., & Waugh, D. S. (2001). Tobacco etch virus protease: Mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Engineering*, 14(12), 993-1000. <https://doi.org/10.1093/protein/14.12.993>

King, G. F. (2019). Tying pest insects in knots: The deployment of spider-venom-derived knottins as bioinsecticides. *Pest Management Science*, 75(9), 2437-2445. <https://doi.org/10.1002/ps.5452>

Klint, J. K., Smith, J. J., Vetter, I., Rupasinghe, D. B., Er, S. Y., Senff, S., Herzig, V., Mobli, M., Lewis, R. J., Bosmans, F., & King, G. F. (2015). Seven novel modulators of the analgesic target NaV1.7 uncovered using a high-throughput venom-based discovery approach. *British Journal of Pharmacology*, 172(10), 2445-2458. <https://doi.org/10.1111/bph.13081>

Kumar, A., Jasrotia, S., Dutta, J., & Kyzas, G. Z. (2023). Pyrethroids toxicity in vertebrates and invertebrates and amelioration by bioactive compounds: A review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 196, 105615. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105615>

*Las cerezas más rápidas del país | Fondef.* (s. f.). Recuperado 28 de febrero de 2025, de <https://www.conicyt.cl/fondef/2003/10/27/las-cerezas-mas-rapidas-del-pais/>

Lin, Y.-C., Zhang, M., Chang, Y.-J., & Kuo, T.-H. (2023). Comparisons of lifespan and stress resistance between sexes in *Drosophila melanogaster*. *Heliyon*, 9(8), e18178. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18178>

*Lineamientos para Exportación de Carozos a China.* (s. f.). Recuperado 28 de febrero de 2025, de <https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/Lineamientos%20carozos%20Vf%2007-11-2023.pdf>

Ma, W., Si, T., Wang, Z., Wen, P., Zhu, Z., Liu, Q., Wang, J., Xu, F., & Li, Q. (2023). Astrocytic  $\alpha 4$ -containing nAChR signaling in the hippocampus governs the formation of temporal association memory. *Cell Reports*, 42(7), 112674. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112674>

Marone Fassolo, E., Guo, S., Wang, Y., Rosa, S., & Herzig, V. (2024). Genetically encoded libraries and spider venoms as emerging sources for crop protective peptides. *Journal of Peptide Science*, 30(9), e3600. <https://doi.org/10.1002/psc.3600>

Narahashi, T., Zhao, X., Ikeda, T., Nagata, K., & Yeh, J. Z. (2007). Differential actions of insecticides on target sites: Basis for selective toxicity. *Human & Experimental Toxicology*, 26(4), 361-366. <https://doi.org/10.1177/0960327106078408>

*Nemertea (ribbon worms).* (s. f.). Animal Diversity Web. Recuperado 16 de junio de 2025, de <https://animaldiversity.org/accounts/Nemertea/>

Ntantu Nkinsa, P., Fisher, M., Muckle, G., Guay, M., Arbuckle, T. E., Fraser, W. D., Boylan, K., Booij, L., Walker, M., & Bouchard, M. F. (2023). Childhood exposure to pyrethroids and neurodevelopment in Canadian preschoolers. *NeuroToxicology*, *99*, 120-128. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2023.10.001>

ODEPA. (s. f.). *Panorama de la agricultura chilena—2019 / Chilean agriculture overview*.

Pittendrigh, B., Reenan, R., French-Constant, R. H., & Ganetzky, B. (1997). Point mutations in the Drosophila sodium channel gene para associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Molecular and General Genetics MGG*, *256*(6), 602-610. <https://doi.org/10.1007/s004380050608>

ProChile. (2024). *Cerezas chilenas logran récord de envíos durante enero de 2024, con montos por US\$1.555 millones*. Prochile. <https://www.prochile.gob.cl/noticias/detalle-noticia/2024/02/22/cerezas-chilenas-record-exportaciones-2024-enero>

Regalado, L., Sario, S., Mendes, R. J., Valle, J., Harvey, P. J., Teixeira, C., Gomes, P., Andreu, D., & Santos, C. (2023). Towards a Sustainable Management of the Spotted-Wing Drosophila: Disclosing the Effects of Two Spider Venom Peptides on Drosophila suzukii. *Insects*, *14*(6), 533. <https://doi.org/10.3390/insects14060533>

*Resumen de Salud Pública: Piretrinas y piretroides (Pyrethrins and Pyrethroids) | PHS | ATSDR*. (2023, enero 17). [https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs155.html](https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs155.html)

Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in Escherichia coli: A 5-year update. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, *28*(8), 1412-1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>

Sánchez-Bayo, F. (2021). Indirect Effect of Pesticides on Insects and Other Arthropods. *Toxics*, *9*(8), 177. <https://doi.org/10.3390/toxics9080177>

Servicio Agrícola y Ganadero. (s. f.). *SAG anuncia prohibición de plaguicidas peligrosos y establece nuevas medidas para uso de agroquímicos más sustentables | SAG*. Recuperado 30 de abril de 2025, de <https://www.sag.gob.cl/noticias/sag-anuncia-prohibicion-de-plaguicidas-peligrosos-y-establece-nuevas-medidas-para-uso-de-agroquimicos-mas-sustentables>

Shearer, P. W., West, J. D., Walton, V. M., Brown, P. H., Svetec, N., & Chiu, J. C. (2016). Seasonal cues induce phenotypic plasticity of Drosophila suzukii to enhance winter survival. *BMC Ecology*, *16*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s12898-016-0070-3>

Singh, S., Agrawal, N., & Goyal, A. (2024). Role of Alpha-7-Nicotinic Acetylcholine Receptor in Alzheimer's Disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, *23*(3), 384-394. <https://doi.org/10.2174/1871527322666230627123426>

Tabuloc, C. A., Carlson, C. R., Ganjisaffar, F., Truong, C. C., Chen, C.-H., Lewald, K. M., Hidalgo, S., Nicola, N. L., Jones, C. E., Sial, A. A., Zalom, F. G., & Chiu, J. C. (2024). Transcriptome analysis of *Drosophila suzukii* reveals molecular mechanisms conferring pyrethroid and spinosad resistance. *Scientific Reports*, *14*(1), 19867. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-70037-x>

Tasman, K., Rands, S. A., & Hodge, J. J. L. (2021). The Power of *Drosophila melanogaster* for Modeling Neonicotinoid Effects on Pollinators and Identifying Novel Mechanisms. *Frontiers in Physiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.659440>

*Typical Reaction Conditions for TEV Protease (NEB #P8112) | NEB.* (s. f.). Recuperado 12 de septiembre de 2025, de <https://www.neb.com/en/protocols/2018/07/06/typical-reaction-conditions-for-tev-protease?srsId=AfmBOooW-46i4z3zEmj7I1sqZWKQeN2eotVARsQyjEJiH29t0dV1LfMr>

Ulibarry, P. G. (s. f.). *Drosophila suzukii* (Matsumura).

Vais, H., Williamson, M. S., Devonshire, A. L., & Usherwood, P. N. (2001). The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. *Pest Management Science*, *57*(10), 877-888. <https://doi.org/10.1002/ps.392>

Villagrán, M. M. (2025, enero 20). Boletín de fruta, enero 2025. ODEPA | Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. <https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/boletines/boletin-de-fruta-enero-2025>

Wang, J., Ou, S.-W., & Wang, Y.-J. (2017). Distribution and function of voltage-gated sodium channels in the nervous system. *Channels*, *11*(6), 534-554. <https://doi.org/10.1080/19336950.2017.1380758>

Wang, X., Luo, H., Peng, X., & Chen, J. (2024). Spider and scorpion knottins targeting voltage-gated sodium ion channels in pain signaling. *Biochemical Pharmacology*, *227*, 116465. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2024.116465>

Windley, M. J., Herzig, V., Dziemborowicz, S. A., Hardy, M. C., King, G. F., & Nicholson, G. M. (2012). Spider-venom peptides as bioinsecticides. *Toxins*, *4*(3), 191-227. <https://doi.org/10.3390/toxins4030191>

Xie, W., Zhao, J., Zhu, X., Chen, S., & Yang, X. (2022). Pyrethroid bioaccumulation in wild fish linked to geographic distribution and feeding habit. *Journal of Hazardous Materials*, *430*, 128470. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128470>

Yadav, D. K., Yadav, N., Yadav, S., Haque, S., & Tuteja, N. (2016). An insight into fusion technology aiding efficient recombinant protein production for functional proteomics. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *612*, 57-77. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.10.012>

Yang, C., Lim, W., & Song, G. (2020). Mediation of oxidative stress toxicity induced by pyrethroid pesticides in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 234, 108758. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108758>

Zhao, Y., Yang, J., Ren, J., Hou, Y., Han, Z., Xiao, J., & Li, Y. (2020). Exposure Level of Neonicotinoid Insecticides in the Food Chain and the Evaluation of Their Human Health Impact and Environmental Risk: An Overview. *Sustainability*, 12(18), 7523. <https://doi.org/10.3390/su12187523>