



**Universidad Nacional Autónoma
de México**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ENDOSIMBIONTES BACTERIANOS DE
TRIATOMINOS: CARACTERIZACIÓN Y
FILOGENIA MOLECULAR”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIOL. LUCIA HUERTA NÚÑEZ

**TUTOR
DRA. ESPERANZA MARTÍNEZ RÓMERO**

MEXICO, D.F.

MARZO/2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo a **CONACYT, DGEP, DGAPA y PAPIIT IN201106**, para realizar este trabajo de Maestría. Se agradece el tiempo y comentarios de los miembros del comité tutorial; Dra. Esperanza Martínez Romero, Dra. Janine Ramsey Willoquet, Dr. José Luis Puente, Dr. Antonio Lazcano.

Dedicatorias

A mis padres María Núñez e Ignacio Huerta con todo el agradecimiento y con todo mi amor.

Con cariño para mis hermanos Carmen, Rosy, Gaby y Mario por su apoyo incondicional.

Con amor a mis sobrinos Denise, Josué, Larissa, Dafne y Christoph Johann

A mis amigos Javier Pérez, Vanesa Hurtado, Alfredo Cuevas, Denisse Rosales, Grisela Ballesteros, Vero Gordillo, Maritza Zavaleta, Jorge Chávez y Juvenal Rueda, espero conservarlos siempre.

Con especial agradecimiento a mis compañeros del laboratorio de Ecología Molecular del Centro de Ciencias Genómicas: Julio Martínez, M. Antonio Rogel, Lulú Lloret, Ernesto Ormeño, Lucy Lulo, Don. Jorge y Martín.

*A mis compañeros del laboratorio del Instituto Nacional de Salud Pública:
M. en C. Rosalinda Alcocer, Dr. Ángel Tello, Dr. Javier Mota.*

Índice General

Resumen	1
Summary	3
1. Introducción.....	5
1.1 Insectos Triatominos.....	5
1.2 Obtención de nutrientes por los insectos.....	8
1.3 Endosimbiontes de Insectos.....	9
1.3.1 Endosimbiontes de Áfidos y Psílicos.....	9
1.3.2 Endosimbiontes de Moscas y Avispas.....	11
1.4 Tipos de endosimbiontes.....	12
1.5 Genomas de endosimbiontes.....	19
1.6 Presencia y ausencia de genes de los endosimbiontes.....	20
1.7 Métodos de estudio de los endosimbiontes.....	21
1.8 Vectores de las tripanosomiasis: africana y americana.....	22
1.9 Importancia de los endosimbiontes para su hospedero insecto.....	24
2. Justificación	27
3. Objetivo General	28
3.1 Objetivos particulares.....	28
4. Materiales y Métodos	29
4.1 Esquema general de la estrategia experimental.....	29
4.2 Disección de insectos Triatominos y purificación de DNA.....	30
4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	31
4.4 Clonación de los productos de PCR en el plásmido vector pCR-4-TOPO.....	31

4.5 Identificación de diferentes patrones de digestión de las transformaciones en el vector pCR-4-TOPO.....	32
4.6 Análisis de las secuencias intergénicas del gen 16S-23S DNAr.....	33
4.7 Amplificación de DNA total.....	33
4.8 Hibridización DNA-DNA.....	34
4.9 Microscopía electrónica.....	34
4.1.1 Microarreglos.....	35
4.1.2 Gradientes de Percoll.....	35
4.1.3 Análisis de la presencia de los endosimbiontes a través de generaciones.....	37
5. Resultados.....	38
5.1 Purificación de DNA total de glándulas salivales y de ovarios de los Triatominos.....	38
5.2 Amplificación del gen 16S DNAr mediante PCR y clonación en el plásmido vector pCR 4-TOPO.....	38
5.3 Análisis de patrones digestión y análisis filogenéticos.....	40
5.4 Análisis de las secuencias intergénicas del gen 16S-23S DNAr.....	43
5.5 Hibridización DNA-DNA.....	46
5.6 Microscopía electrónica.....	47
5.7 Microarreglos.....	48
5.8 Gradientes de Percoll.....	55
5.9 Análisis de las cruas.....	56
6. Discusión.....	61
7. Conclusiones.....	65
8. Perspectivas.....	66

9. Referencias.....	67
10. Anexos.....	79

Resumen

La mayoría de los insectos tienen relaciones benéficas con bacterias para su adecuado desarrollo y crecimiento. Llevamos a cabo la caracterización de los endosimbiontes bacterianos de las especies de triatominos de México: *Triatoma pallidipennis* y *Triatoma longipennis*. Estas especies de insectos son de importancia epidemiológica, ya que son los transmisores del protozoario *Trypanosoma cruzi*, el cual es el agente etiológico causante de la enfermedad de Chagas. Los resultados obtenidos a partir de los análisis de las secuencias del gen 16S DNAr y con las secuencias intergénicas del gen 16S-23S DNAr, nos señalaron la existencia de un endosimbionte del género *Arsenophonus* el cual está emparentado filogenéticamente con *Escherichia coli*. Encontramos la presencia de *Arsenophonus* en los ovarios y en las glándulas salivales del insecto. Se observó, que los linajes de *Arsenophonus* de los triatominos no se mezclan con los *Arsenophonus* de otros insectos. También se observó que se encuentran cercanamente relacionados con *Triatoma infestans*, el cual es el vector de transmisión de la enfermedad de Chagas en regiones de América del Sur. Sin embargo, no son idénticos. Con el uso de microarreglos heterólogos de *E. coli* K-12, encontramos que alrededor de 3000 genes de las muestras de DNA de los tejidos que contienen *Arsenophonus* hibridan con *E. coli*. Esto concuerda con el tamaño del genoma de *Arsenophonus* de mosca que es de 3.5 Mega-pares de bases (Mpb), estimado en base a estudios de electroforesis de campo pulsado. El tamaño del genoma pudiera indicar que la relación *Arsenophonus*-insecto, no es una relación tan antigua. Además puede indicar que la bacteria no ha tenido una larga adaptación en el insecto y por lo tanto no tiene como consecuencia una pérdida importante del tamaño de su genoma. Sin embargo, el que *Arsenophonus* no crezca en medios donde crecen bacterias de vida

libre, indica que estas bacterias van en camino de especializarse. *Arsenophonus* se encuentra presente en triatomíneos tanto de México como de Sudamérica. Sin embargo, son diferentes lo cual sugiere que ésta bacteria ha estado presente desde el ancestro común de estos insectos.

Summary

Most of the insects have beneficial relations with bacteria for its development and growth. We carried out the characterization of bacterial endosymbionts of those of species of triatominae of Mexico: *Triatoma pallidipennis* and *Triatoma longipennis*. These species of insects have epidemiological importance; they are the transmitters of the protozoary *Trypanosoma cruzi*, who is the etiological agent of Chagas disease. The results obtained on the basis of the analyses of the sequences of 16S DNAr gene and the intergenic sequences of the 16S-23S DNAr gene, indicated the existence of an endosymbiont of the genus *Arsenophonus* which is phylogenetically related to *Escherichia coli*. We found the presence of *Arsenophonus* in the ovaries and the salivary glands of the insect. The lineages of *Arsenophonus* of the triatominae are not mixed with the *Arsenophonus* of other insects. It also was observed that they are nearly related to *Triatoma infestans*, which is the vector of transmission of the Chagas disease in regions of South America, nevertheless they are not identical. With the use of microarrays of *E. coli* K-12, we found that around 3000 genes of the samples of DNA of the tissues that contain *Arsenophonus* match whit *E. coli*. These results are in agreement with the size of the *Arsenophonus* genome from fly, which is of 3,5 Mega-pairs of bases (Mpb), considered on the basis of studies whit pulse field gel electrophoresis. The size of the genome could indicate that the relation *Arsenophonus*-insect, is not a too ancient, and that the bacterium has not had a long adaptation period in the insect. Thus we do not observe an important loss of the genome, keeping only the information that the bacterium needs in the insect. Nevertheless, *Arsenophonus* does not grow in laboratory media where grows bacteria of free life. All these evidences could indicate that these bacteria are

in the process to specialize. *Arsenophonus* is present in triatominae of Mexico as in triatominae of South America but as they are different. It could suggest that these bacteria have been from the common ancestor of these insects.

1. Introducción

La gran mayoría o si no es que todos los organismos vivos están habitados por una comunidad compleja de microorganismos benéficos que son esenciales para su desarrollo, buena salud y sus interacciones con el entorno. A menudo, estos microorganismos son esenciales para los organismos en que viven, porque les ayudan a digerir sus alimentos o les proporcionan éstos directamente. A cambio, el organismo hospedero ofrece a su comunidad bacteriana un lugar estable y seguro para vivir. Estas asociaciones mutuamente benéficas se denominan simbiosis (1). Un ejemplo acerca de esto es el que nos muestran los insectos, los cuales pertenecen al grupo de organismos más abundante en la Tierra. Se ha sugerido que parte de su éxito en poblar diferentes hábitats, se debe a la capacidad de asociación con microorganismos intracelulares denominados endosimbiontes. Dentro de las especies de insectos existentes se encuentran algunos de importancia epidemiológica, tales como los insectos triatominos.

1.1 Insectos Triatominos

Los triatominos constituyen un grupo de insectos hematófagos, los cuales presentan hábitos alimenticios nocturnos y su picadura en algunos casos es indolora. Las características morfológicas que presentan son: la inserción lateral de sus antenas, que normalmente tienen cuatro segmentos y son filiformes, un rostro o probóscide con tres segmentos que no se extiende más allá del prosterno, la presencia casi constante del canal estridulatorio, un cuello bien diferenciado y la presencia de glándulas de Brindley (2). Los triatominos son insectos ápteros (dependiendo del estadio en el que se encuentren), aplanados dorsoventralmente, tienen un aparato bucal suctopizador y patas caminadoras, son ovíparos y su

metamorfosis es incompleta o gradual. Presentan una cabeza pequeña que posee ojos compuestos y ocelos, una trompa y antenas. Las antenas se presentan por delante de los ojos y su forma de implantación permite la caracterización de los géneros de triatominos (3). Tienen un ciclo de vida en el que pasan desde la fase de huevo por cinco estadios ninfales hasta llegar al estado adulto como hembra o macho (figura 1). Los huevos suelen ser blancos o rosados, tornándose más oscuros a medida que el embrión se desarrolla. Los huevos por lo general eclosionan al cabo de 10-40 días, según la especie y la temperatura (3).



Figura 1.- Estadios ninfales de los insectos triatominos hasta llegar al estado adulto como hembra o macho.

Existen reportes a partir de 1999, sobre el estudio de los insectos triatominos a nivel genético para complementar la clasificación basada casi exclusivamente en caracteres morfológicos lo cual no necesariamente refleja su parentesco evolutivo (4, 5). Como consecuencia, a fin de establecer los grupos de especies filogenéticamente relacionadas y comprender la evolución de este grupo de insectos, es necesario realizar análisis citogenéticos conjuntamente con estudios

morfológicos, biogeográficos, ecológicos y moleculares. Los estudios citogenéticos han aportado nuevos elementos para la comprensión de la taxonomía y sistemática de estos insectos. El análisis global de las características citogenéticas en los triatominos, apoya la hipótesis de la existencia de distintos linajes cromosómicos dentro de la subfamilia *Triatominae*. Por ejemplo, las características cromosómicas similares entre las especies de la tribu *Rhodniini* (la cual incluye dos géneros distintos: *Psammolestes* y *Rhodnius*) sugieren un origen monofilético de esta tribu. Por el contrario, en el género *Triatoma*, la extensa variación observada en distintos caracteres cromosómicos, apoya la existencia de diferentes líneas de evolución, con grados muy variables de diferenciación cromosómica según el grupo de especies. Los análisis citogenéticos indican que diferentes grupos de triatominos pueden mostrar tasas de evolución cromosómica muy variables, las cuales podrían ser debidas a diferentes tiempos de divergencia, a distintas presiones y/o adaptaciones ecológicas sobre sus poblaciones o incluso a propiedades intrínsecas de sus propios cariotipos (6). Dentro de los estudios ecológicos, podemos destacar la existencia de *Telenomus remus*, la cual es una avispa que parásita los huevos de varios insectos, incluyendo triatominos. Actualmente esta avispa es usada como control biológico de plagas que afectan a las cosechas (7).

En México se ha reportado que existen veintinueve especies nativas de triatominos distribuidas en todo el país. De éstas, veinte se han encontrado infectadas de manera natural con *Trypanosoma cruzi* (8, 9, 10, 11). Los principales vectores que son responsables de la transmisión de *T. cruzi* en México, pertenecen a los complejos protracta (del grupo protracta), al complejo phyllosoma (del grupo rubrofasciata) y al complejo dimidiata. El grupo protracta incluye a *Triatoma barberi*, *Triatoma neotomae*, *Triatoma protracta*, *Triatoma nítida*, *Triatoma peninsularis* y

Triatoma sinaloenses. Entre las especies del complejo phyllsoma existen seis que son de importancia médica para el país por su distribución y grado de infectividad que poseen, dichas especies son: *T. longipennis*, *T. mazzottii*, *T. pallidipennis*, *T. phyllosoma*, *T. picturata*, y *T. mexicana*. *T. dimidiata* es un complejo de por lo menos dos especies y potencialmente dos subespecies. La prevalencia de infección por *T. cruzi* en estas especies va desde 16 -18% para *T. dimidiata* domiciliaria en Yucatán (12); 33% para *T. barberi*, 50% para *T. mazzottii* y 18% para *T. longipennis* en Jalisco (13); de 70-92% para *T. barberi* y del 50-90% para *T. pallidipennis* en Morelos (11,14,15); 33.9% para *T. mazzottii*, 24.4% para *T. barberi*, 27.2% para *T. phyllosoma* y 3.7% para *T. dimidiata* en Oaxaca (15).

1.2 Obtención de nutrientes por los insectos

Los insectos presentan una dieta altamente restringida ya que se alimentan de algunas sustancias específicas tales como, la savia de las plantas, la sangre de vertebrados, etc.; es por ello que necesitan algunos nutrientes como aminoácidos y vitaminas que no obtienen a través de la dieta. Su estrategia para obtener una mayor posibilidad de éxito, consiste en asociarse con microorganismos endosimbiontes. Actualmente, se ha reportado que estos microorganismos endosimbiontes juegan un papel importante en la nutrición de sus hospederos insectos (16) ya que son capaces de elaborar aminoácidos como triptófano, leucina, cisteína y algunas vitaminas necesarias para el adecuado crecimiento y desarrollo de su hospedero insecto, el cual carece de estas vías biosintéticas. Se ha propuesto que los endosimbiontes han sido una innovación altamente benéfica en la evolución, debido a que han ayudado a la diversificación de algunos grupos de organismos permitiéndoles explotar nuevos nichos ecológicos.

1.3 Endosimbiontes de Insectos

1.3.1 Endosimbiontes de Áfidos y Psilidos

Sobre las asociaciones de endosimbiontes con insectos reportadas a la fecha, el estudio mejor documentado, es el que presentan los áfidos con su endosimbionte primario *Buchnera aphidicola*. La contribución de *Buchnera* a la fisiología de los áfidos ha sido ampliamente estudiada, usando principalmente dietas químicamente definidas, además de insectos libres de endosimbiontes (aposimbióticos); los cuales son generados mediante tratamiento con antibióticos específicos (17). Los áfidos se alimentan de la savia de las plantas, la cual es rica en carbohidratos. Estos carbohidratos son utilizados por *Buchnera* y a cambio producen aminoácidos esenciales y vitaminas que el insecto no obtiene a través de la dieta (figura 2).

Los análisis genómicos de *Buchnera* indican que su genoma es altamente reducido y esto se observa en las diferentes cepas analizadas hasta el momento. El tamaño de los diferentes genomas de *Buchnera* oscila entre 450 y 680 Kilo-pares de bases (Kb), siendo el más pequeño el que pertenece a *B. aphidicola* Cce, endosimbionte de *Cinara cedri*. Casi la totalidad de los genes de *Buchnera* están presentes en el genoma de *E. coli* (la cual contiene unos 4,000 genes), así que, se puede decir que el genoma de estos endosimbiontes son un subconjunto del genoma de *E. coli* (18). Estos datos indican que han sufrido un drástico proceso de reducción del tamaño de su genoma desde el inicio de la endosimbiosis, que data de hace aproximadamente entre 150 y 250 millones de años (19).

Al igual que los áfidos los psilidos se alimentan de la savia de las plantas y presentan asociaciones con endosimbiontes para poder sobrevivir debido a su dieta

altamente específica. Estos insectos presentan asociaciones con el endosimbionte *Candidatus Carsonella ruddii* el cual también pertenece al grupo de las Gamma Proteobacteria (figura 3) (28).

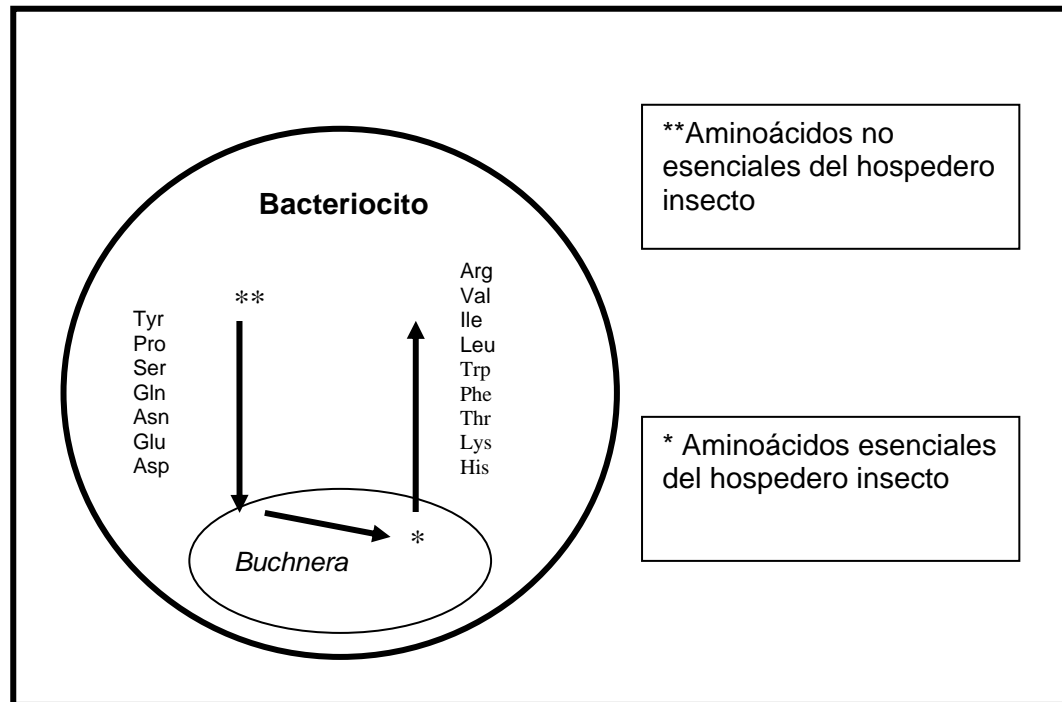


Figura 2.- Modelo de la dependencia de *Buchnera* y la célula hospedera (bacteriocito). Se observa la capacidad de *Buchnera* de sintetizar aminoácidos esenciales para su hospedero; por otro lado se observa que *Buchnera* requiere de compuestos no esenciales, los cuales son proporcionados por el insecto (20).

1.3.2 Endosimbiontes de Moscas y Avispas

Algunas especies del género *Wolbachia* se encuentran en muchos insectos, pero en estos casos no se trata de relaciones mutualistas. *Wolbachia pipientis* en *Drosophila melanogaster* ocasiona un fenómeno conocido como incompatibilidad citoplasmática. La cual tiene que ver con que los machos infectados producen descendencias normales, únicamente cuando se aparean con hembras infectadas.

La ausencia de descendencia en las cruzas incompatibles (portador versus no portador), se asocia a la ausencia de fecundación o a la muerte de los embriones. En el caso de *Nasonia vitripennis*, la cual es una pequeña avispa que normalmente deposita sus huevos en pupas de varias especies de insectos, la infección por *Wolbachia* provoca una variación de la expresión de la incompatibilidad citoplasmática. En este caso, el apareamiento de machos infectados con hembras no infectadas sí producen descendencia, pero la progenie está compuesta exclusivamente por machos (21).

Los análisis moleculares han confirmado que la mosca tsetse alberga tres endosimbiontes, siendo este un ejemplo de la coexistencia de endosimbiontes primarios y secundarios dentro de un mismo insecto. Presenta asociaciones con endosimbiontes secundarios como *Sodalis glossinidius* (los cuales se encuentran en las células del intestino medio), y con endosimbiontes primarios *Wigglesworthia glossinidia* (los cuales se encuentran confinados en bacteriocitos en la parte anterior del intestino) y el tercer endosimbionte pertenece al género *Wolbachia* (22, 23, 24, 25). Los análisis filogenéticos de la mosca tsetse han demostrado que sus endosimbiontes son transmitidos verticalmente a la progenie. En este caso, *Wigglesworthia* es heredada por vía materna cuando la larva recibe alimento de la madre, a través de las secreciones de la glándula de la "leche" (26,27). Al igual que otros insectos hematófagos, la dieta de la mosca tsetse es escasa en vitaminas del complejo B, ya que ésta se alimenta de la sangre de vertebrados, entonces sus endosimbiontes son los encargados de proporcionarle las vitaminas que no obtiene a través de la dieta tan específica (28).

1.4 Tipos de endosimbiontes

La complejidad de las asociaciones entre los insectos y bacterias aumenta debido a que los insectos presentan asociaciones con diferentes tipos de endosimbiontes: han sido clasificados como primarios y secundarios. Los endosimbiontes primarios son los que habitan en células especializadas llamadas bacteriocitos (figura 2), las cuales pueden formar una estructura parecida a un órgano conocido como bacterioma y los endosimbiontes secundarios, pueden ser encontrados intracelularmente e intercelularmente (algunos de los endosimbiontes secundarios pueden ser cultivados *in vitro*) y su transmisión puede ocurrir horizontalmente, de un hospedero a otro o también por transmisión materna (26, 29).

Los estudios filogenéticos basados en la secuencias del gen 16S DNA ribosomal (DNAr) y de genes nucleares revelan una congruencia de los endosimbiontes primarios con su hospedero insecto. Se propone que estas asociaciones surgieron como una simple infección bacteriana del ancestro insecto y posteriormente coevolucionaron a través de millones de años (figura 3) (28, 30,31).

Los endosimbiontes secundarios aparentemente no comparten una historia evolutiva con su hospedero insecto, son más esporádicos y su asociación no es obligatoria como es el caso de los endosimbiontes primarios (32). Los endosimbiontes secundarios pueden ser el resultado de múltiples infecciones independientes (33). Los endosimbiontes primarios que presentan asociaciones antiguas con su insecto hospedero por lo general presentan un genoma muy reducido y un alto contenido de A+T; mientras que los endosimbiontes primarios y los endosimbiontes secundarios adquiridos más recientemente, presentan un tamaño de genoma y un contenido de A+T en un rango intermedio entre los

endosimbiontes adquiridos más antiguamente y sus parientes de vida libre (28, 32). Los efectos de los endosimbiontes secundarios en la adecuación del hospedero aún no está definida, son esporádicos en número y presencia entre las especies y aún en su distribución entre individuos de la misma especie. Esto ha sido demostrado en los áfidos, en los cuales han encontrado que sus endosimbiontes secundarios están presentes en sólo algunas cepas de áfidos del arroz (*Acyrtosiphon pisum*). Estos endosimbiontes son idénticos en la secuencia del 16S DNAr a la de los endosimbiontes secundarios de los áfidos de las rosas (*Macrosiphum rosae*) (3, 33, 34, 35). En algunos casos, se ha observado que los endosimbiontes secundarios pueden compensar la falta o la pérdida de endosimbiontes primarios que son esenciales para el hospedero insecto (36).

La secuencia de identidad del gen 16S DNAr de los endosimbiontes secundarios en diferentes hospederos, implica que ha ocurrido transferencia horizontal de los endosimbiontes, entre especies de insectos o que han sido adquiridos recientemente a través de múltiples infecciones, por una bacteria ampliamente distribuida en el medio ambiente. También se ha observado transferencia materna de estos endosimbiontes (3) y se propone que esta es la ruta usual de infección (26,29). La distribución esporádica de endosimbiontes secundarios entre especies de hospederos implica que a diferencia de la mayoría de los endosimbiontes primarios, generalmente no son requeridos para el desarrollo y/o reproducción de los hospederos. No existe evidencia clara para distinguir si los endosimbiontes secundarios, tienen que ver directamente con el desarrollo adecuado del hospedero o si tienen en realidad algún efecto negativo o positivo en el insecto (35).

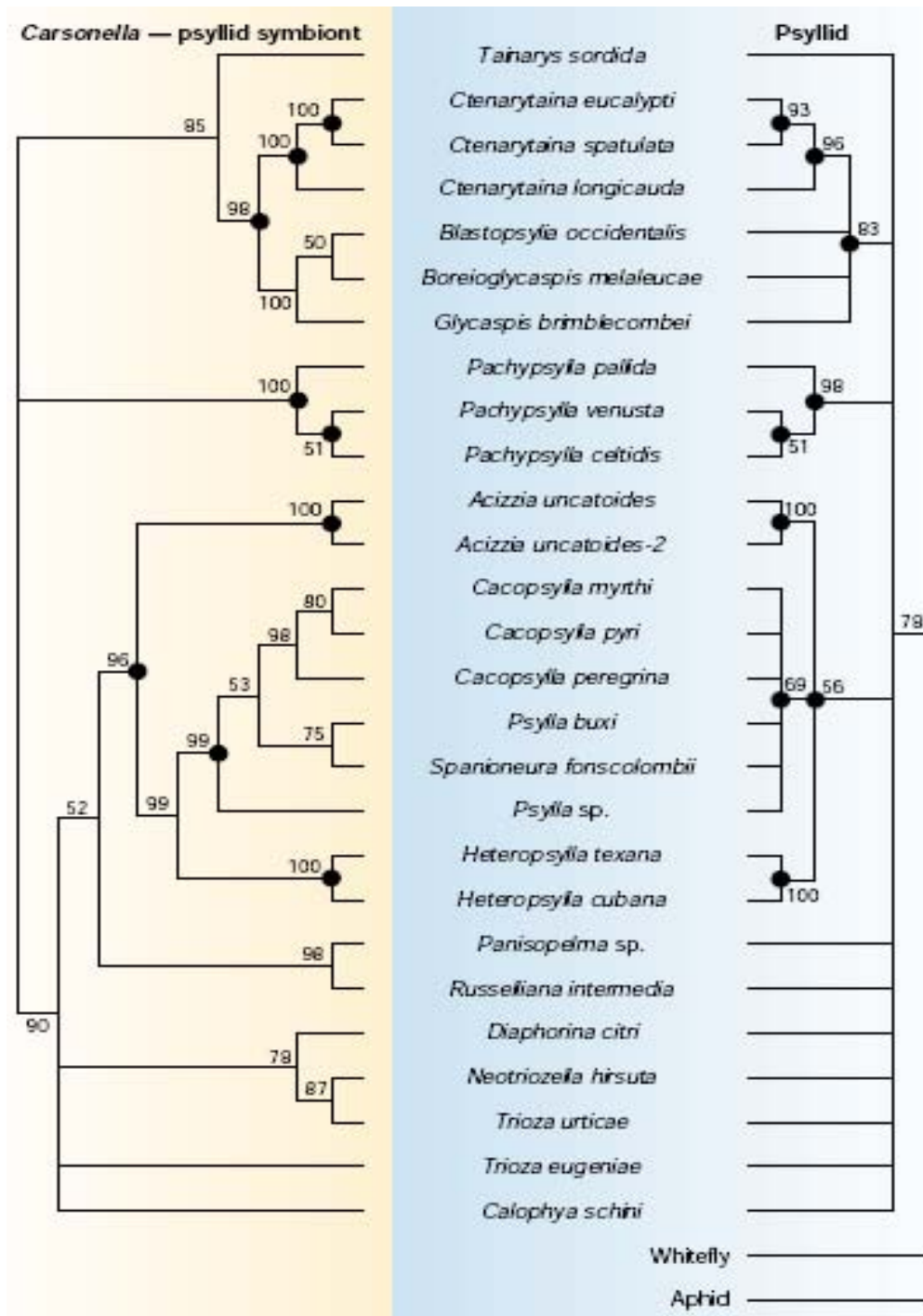


Figura 3.- **Coespeciación entre psilidos y sus endosimbiontes primarios.** Los análisis filogenéticos basados en la secuencia de genes tales como 16S-23S DNAr de los endosimbiontes y de genes nucleares de los hospederos, muestran una coespeciación entre ambos grupos de organismos (28).

Los análisis filogenéticos, han revelado que la mayoría de los endosimbiontes de los insectos examinados hasta ahora, se localizan dentro del grupo de las Proteobacteria dentro de la Subdivisión Gamma y Beta. Un gran número de endosimbiontes de insectos caen dentro de la subdivisión Gamma-3-Proteobacteria (figura 4). Este es un grupo que incluye a *E. coli* como su pariente de vida libre más cercano (37), además de muchos patógenos intracelulares de mamíferos, incluyendo al ser humano, tales como *Salmonella spp* (38, 39, 40,41). Los endosimbiontes secundarios caracterizados hasta ahora, también pertenecen a la familia de las enterobacterias (26, 29, 32). Sin embargo, no muestran una coespeciación con su hospedero insecto, indicando la existencia de un intercambio horizontal o la adquisición reciente de estas bacterias. Por otra parte, las consecuencias evolutivas de su asociación con su hospedero insecto, parecen no ser tan estrechas como con la de los endosimbiontes primarios (23). Se han encontrado también en la Subdivisión Gamma-3, pero fuera de las enterobacterias, la existencia de un clado que consiste principalmente de endosimbiontes primarios de áfidos, hormigas carpinteras y de la mosca tsetsé. Con estas evidencias filogenéticas, surge la posibilidad de que los endosimbiontes de estos insectos compartan un ancestro común el cual probablemente también presentaba características simbióticas. Sin embargo, esta posibilidad aún no está fuertemente establecida (19, 70). Las secuencias del gen 16S DNAr de estos endosimbiontes contienen un bajo contenido de G+C, comparado con los miembros de la Subdivisión Gamma-3-Proteobacteria de vida libre, lo cual sugiere la posibilidad de que su relación filogenética cercana, resulta en parte de una evolución convergente (18).

Los análisis de las secuencias del gen 16S DNAr muestran que *B. aphidicola* pertenece también a la Subdivisión Gamma-3-Proteobacteria (42) y se observa que son completamente concordantes con los análisis de áfidos; lo cual quiere decir, que inicialmente ocurrió como una infección antigua en el ancestro de las especies de áfidos y posteriormente, se llevó a cabo una coespeciación (42). Los áfidos y muchos otros insectos se aseguran de transmitir los endosimbiontes a su progenie. En el caso de los áfidos, la hembra infecta cada huevo o embrión antes de expulsarlo, asegurando así que cada insecto joven nazca infectado. Hasta cierto punto, la bacteria ya forma parte del áfido, porque ninguno de los dos puede vivir separado del otro (19). *Buchnera* tiene un metabolismo aerobio y contiene todos los genes que codifican para las enzimas glucolíticas, la vía de las pentosas y la respiración aerobia; pero carece casi de todas las funciones requeridas para el ciclo de los ácidos tricarbónicos; *Buchnera* parece producir ATP, pero carece de todos los genes implicados en la fermentación y la respiración anaerobia. Hay una reducción notable de los componentes de la membrana celular y de los ácidos grasos. *Buchnera* no puede sintetizar lipopolisacáridos o fosfolípidos, por lo que tiene que importarlos junto con las enzimas requeridas para la biosíntesis de los fosfolípidos de la célula huésped (46). *Buchnera* proporciona a su áfido triptofano, cisteína y metionina (19, 43). Otro ejemplo de endosimbiontes primarios, es la asociación que presenta *Blochmannia floridanus* con las hormigas carpinteras. En éste caso, *B. floridanus* es capaz de suplementar nitrógeno y compuestos sulfurados a su hospedero mientras este toma ventaja de su maquinaria biosintética. Los estudios han demostrado que este endosimbionte se encuentra filogenéticamente relacionado con *B. aphidicola* y *Wigglesworthia glossinidia* (40).

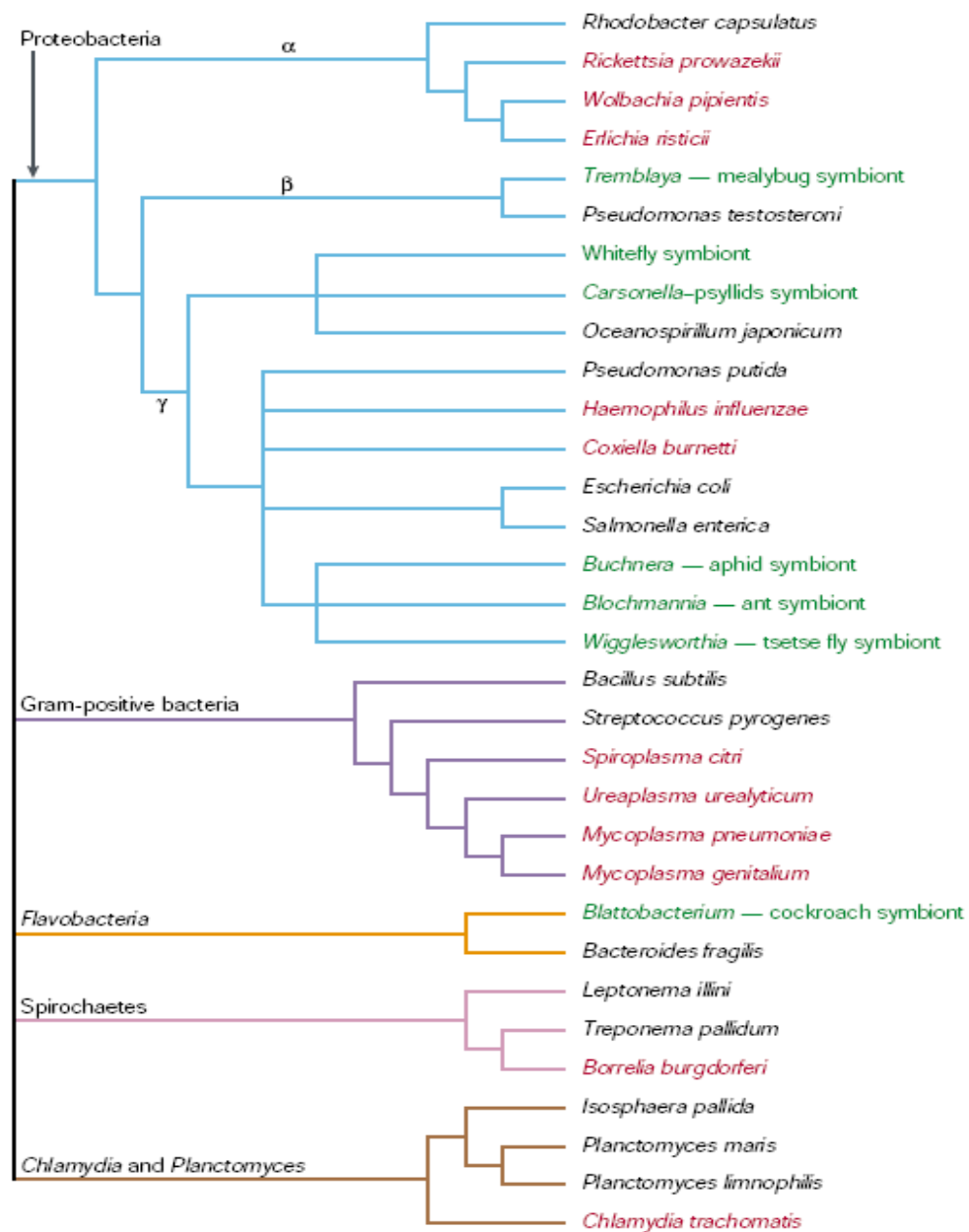


Figura 4.- **Relaciones filogenéticas entre bacterias simbióticas.** El árbol se basa en los datos de las secuencias del gen 16S DNAr (incluye patógenos y endosimbiontes primarios de insectos). La diversidad de los patógenos obligados y mutualistas y muchos de los grupos de endosimbiontes primarios se agrupan junto a la Subdivisión Gamma-3-Proteobacteria (28).

1.5 Genomas de endosimbiontes

En la actualidad se cuenta con la secuencia nucleotídica de varios genomas de endosimbiontes primarios dentro de los cuales se encuentran: tres cepas de *B. aphidicola* (endosimbionte de áfidos), el genoma de *W. glossinidia* (endosimbionte de la mosca tsetsé) y el genoma de *B. floridanus* (endosimbionte de hormigas carpinteras) (69, 70). También se cuenta con datos de las secuencias de un endosimbionte secundario, *Sodalis glossinidius* (endosimbionte secundario de la mosca tsetsé). El análisis de comparación de las secuencias genómicas de los endosimbiontes proporcionan una evidencia interesante en la evolución de la simbiosis; además de proporcionar indicios sobre las diversas estrategias de la adaptación de las bacterias a sus hospederos insectos. Para obtener información sobre el contenido de genes de los simbiosis se han usado como referencia los genes de *E. coli* K12, debido a la cercanía filogenética que presentan muchos simbiosis primarios y secundarios de insectos con esta bacteria. El uso de estos datos en la interpretación de la biología de estos organismos se debe tomar con cierta precaución, ya que un problema es que los pseudogenes recientemente desarrollados, pueden llegar a cruzarse por hibridación tan fuertemente como los genes funcionales y pueden conducir a interpretaciones incorrectas de las capacidades del organismo. Este problema es de importancia particular en el caso de los microorganismos con genomas en vías de reducción, ya que presentan una tasa de mutación más alta que las bacterias de vida libre y por ello, resultan en un índice más alto de sustituciones no sinónimas (44,45, 67).

1.6 Presencia y ausencia de genes de los endosimbiontes

La dependencia de los insectos con sus endosimbiontes tiene algunas consecuencias evolutivas como la tasa de mutación. En los estudios hechos en *Buchnera*, la cual tiene muy pocas proteínas implicadas en la reparación y la recombinación del DNA, se encuentra que el gen *recA*, no está presente en su genoma, sin embargo conserva los genes *recBCD*. Los sistemas importantes de reparación *uvr* y el sistema SOS están incompletos, indicando que *Buchnera* es muy susceptible a la mutación (46, 47). Este dato puede indicar que el aislamiento genético de estas bacterias las imposibilita a volver a una forma de vida libre y finalmente pudieran estar en proceso de convertirse en nuevos tipos de organelos celulares (48). En algunos casos, la endosimbiosis es considerada como el paso inicial para la evolución hacia los organelos como lo fue para el caso de las mitocondrias y los cloroplastos. Se ha argumentado que la simbiosis es una ruta de evolución que ha sido básica para el origen y diversificación de muchos grupos de organismos. En la mayoría de los endosimbiontes se observa una reducción en el tamaño de sus genomas, lo cual ha ocasionado la pérdida de muchas de sus capacidades biológicas (49). Por un lado, se argumenta que este proceso fue continuo, con genes que se fueron perdiendo individualmente a través de un elevado número de pequeñas deleciones. Por otro lado, se sugiere que muchos de estos genes se perdieron de forma simultánea y que a través de unos pocos eventos de deleción, se pudieron perder múltiples genes (50).

1.7 Métodos de estudio de los endosimbiontes

Anteriormente se había definido la existencia de endosimbiontes a través de estudios microscópicos y solamente de una manera descriptiva; ahora, se ha llevado a cabo la caracterización molecular de algunos de estos endosimbiontes y se han establecido las relaciones filogenéticas con sus parientes procariontes de vida libre más cercanos. Sin embargo, a pesar de estos avances, todavía existe una gran cantidad de endosimbiontes que aún no han sido estudiados. Esto se debe a que existen grandes limitaciones para poder estudiarlos; una de ellas, es el hecho de que su forma de vida es intracelular lo cual hace difícil su cultivo fuera del su hospedero insecto (71).

Desde la década de los noventas, los estudios moleculares en el manejo de los endosimbiontes han ofrecido señales considerables de sus historias evolutivas y de sus adaptaciones específicas a la simbiosis. Uno de los enfoques utilizados es el estudio basado en las secuencias de DNA, el cual trae como ventaja adicional el poder estudiar las secuencias de bacterias no cultivables. En particular las secuencias del gen 16S DNAr han sido usadas para clasificar muchas bacterias, incluyendo endosimbiontes que no habían podido clasificarse (51). Se eligió el gen 16S DNAr como marcador evolutivo molecular ya que se encuentra muy conservado en todas las especies y a que cambia lentamente durante la evolución. Los estudios de los endosimbiontes se realizan en base a la secuencia total de este gen utilizando para su obtención oligonucleótidos universales. Las secuencias nucleotídicas así obtenidas, permiten observar claramente las diferencias entre los distintos microorganismos y se pueden realizar árboles filogenéticos y esquemas evolutivos. El gen 16S DNAr de *E. coli* consiste de 1500 nucleótidos y el fragmento de DNA que

lo contiene es fácilmente observable mediante electroforesis en geles de agarosa. La secuenciación del gen 16S DNAr es el método de elección para determinar relaciones taxonómicas arriba del nivel de género (52).

1.8 Vectores de las tripanosomiasis: africana y americana

Tanto en África, como en el continente Americano se presenta una enfermedad causada por un protozoario. En el caso de África el protozoario es transmitido por la mosca tsetse ocasionando la enfermedad del sueño. Existen dos tipos de enfermedad, denominados según las áreas de África donde se encuentran. La tripanosomiasis de África Occidental, que causa una infección crónica causada por el parásito *Trypanosoma brucei gambiense*. La tripanosomiasis de África Oriental, es causada por el parásito *Trypanosoma brucei rhodesiense* (73). En el caso del continente Americano, el protozoario es transmitido por insectos triatominos (Hemiptera: Reduviidae) y la enfermedad es conocida como enfermedad de Chagas. El agente etiológico de esta enfermedad es el protozoario *Trypanosoma cruzi* La enfermedad es una zoonosis y ha pasado a afectar al hombre por domiciliación de sus insectos vectores. La infección humana está ligada a las condiciones socioculturales de las poblaciones que se encuentran en estrecho contacto con el vector y parásito. Para la enfermedad de Chagas se reconocen dos etapas, una aguda de corta duración y otra crónica con una duración más larga, usualmente asociadas a lesiones cardíacas o del tracto digestivo, separadas por un período clínico asintomático o fase indeterminada. La vía de transmisión más importante de *T. cruzi* es la vectorial, la cual ocurre en áreas rurales y urbanas donde la precariedad de la vivienda, el hacinamiento y las condiciones de higiene además de la cercanía a lugares silvestres, facilitan la proliferación de los insectos y el

establecimiento de un ciclo doméstico. Aunado a la domesticación de los vectores, la afluencia de contingentes poblacionales de las zonas rurales a las ciudades y la falta de control de la sangre al ser transfundida, ha conferido a áreas urbanas una creciente transmisión en los últimos años (72). Se calcula que de 16 a 18 millones de personas están infectadas y que unos 90 millones están en riesgo de contraer la enfermedad (39). No existe una vacuna para prevenir la infección. Los triatominos se distribuyen en América, desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina. En México, la distribución de la enfermedad de Chagas está relacionada directamente con el conocimiento de las zonas de dispersión de los triatominos y sus factores ecológicos sobre todo sus hábitos domiciliarios (57,58). En el caso del estado de Morelos, la especie que prevalece es *T. pallidipennis* (figura 5).



Figura 5.- *Triatoma pallidipennis*. Vector de el protozooario *Trypanosoma cruzi*.

1.9 Importancia de los endosimbiontes para su hospedero insecto

Para comprobar la importancia de los endosimbiontes se han realizado estudios en diferentes vectores como la mosca tsetsé. En este estudio, se generaron

insectos aposimbióticos y se observó el retardo en el crecimiento del insecto, además de una disminución en la producción de huevos, lo cual resulta en la pérdida de la habilidad del hospedero aposimbionte para reproducirse. Esta pérdida fue parcialmente restaurada cuando el alimento de la mosca tsetse fue suplementado con vitaminas del complejo B en este caso tiamina, ácido pantoténico, piridoxina, ácido fólico y biotina, sugiriendo que los endosimbiontes desempeñan un papel en el metabolismo que implican estos compuestos (53). Además se ha determinado el tamaño y composición del genoma de uno de sus endosimbiontes, *Wigglesworthia*, el cual presenta un tamaño de 770 Kb. En base a los análisis de comparación con microarreglos de *E. coli.*, se identificaron 650 genes ortólogos en *Wigglesworthia* los cuales corresponden hasta el 85% de su genoma. También se realizaron análisis de expresión usando el cDNA de *Wigglesworthia* y detectaron, algunos genes conservados en su genoma, los cuales están implicados en procesos de replicación, transcripción y traducción; además de genes que codifican para proteínas de transporte, chaperonas y aminoácidos (54).

Otros estudios realizados para comprobar la importancia de los endosimbiontes de insectos se han realizado en *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans* los cuales son los principales vectores de la enfermedad de Chagas en ciertas regiones del continente americano. Estos insectos triatomíneos albergan los endosimbiontes *Rhodococcus rhodnii* y *Arsenophonus triatominarum*, respectivamente. En el caso de *R. prolixus* se ha establecido que su endosimbionte *R. rhodnii* también juega un papel importante en su desarrollo y crecimiento (71, 68). Esto se ha demostrado bajo condiciones de laboratorio, generando insectos aposimbióticos. Las ninfas aposimbióticas de *R. prolixus* no alcanzan la etapa de

madurez sexual, ya que la mayoría de los insectos mueren después de la segunda muda durante su desarrollo (55). Se ha manipulado genéticamente a algunos de los endosimbiontes, usando antibióticos como marcadores de selección. Los insectos se infectan alimentándolos con estos endosimbiontes manipulados genéticamente (figura 6), con la finalidad de lograr que los insectos ya no sean tan susceptibles a la infección con *T. cruzi* (55). En los estudios realizados en *T. infestans* se observa que la eliminación de sus endosimbiontes ocasionan diversos efectos como son: el retardo en el desarrollo de las larvas, el incremento en la mortalidad de las mismas, además de desordenes en la digestión y excreción (56).

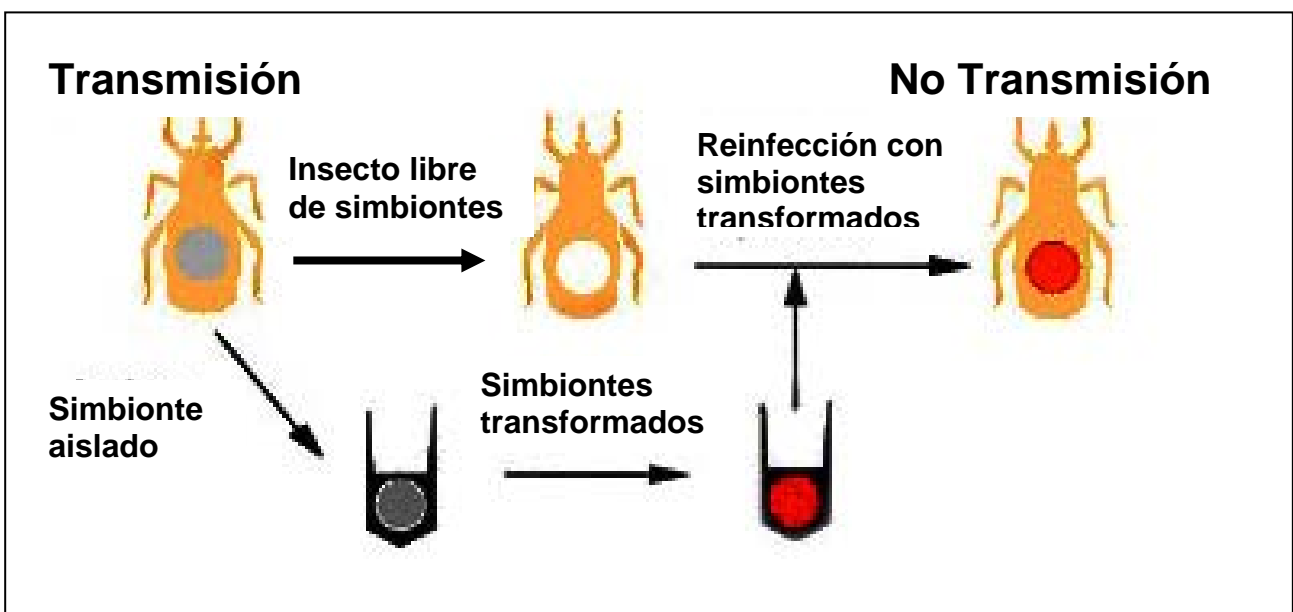


Figura 6.- **Manipulación genética de los endosimbiontes.** Los endosimbiontes pueden ser alterados genéticamente y usados para reemplazar los endosimbiontes originales, lo que produce insectos que no pueden transmitir la enfermedad (55).

2. Justificación

En vista de la importancia epidemiológica y la amplia distribución que presentan los Triatomíneos en la República Mexicana, consideramos de interés estudiar sus endosimbiontes. Con nuestra investigación pretendemos proporcionar nueva información al campo de la ciencia y con ello poder contribuir en un futuro al diseño de estrategias alternas de control de la enfermedad, ya que el estado actual de la investigación en éste aspecto se encuentra en la posición de manipular los endosimbiontes de los diferentes insectos vectores causantes de enfermedades, con la finalidad de generar insectos refractarios a la infección que transmiten.

3. Objetivo General

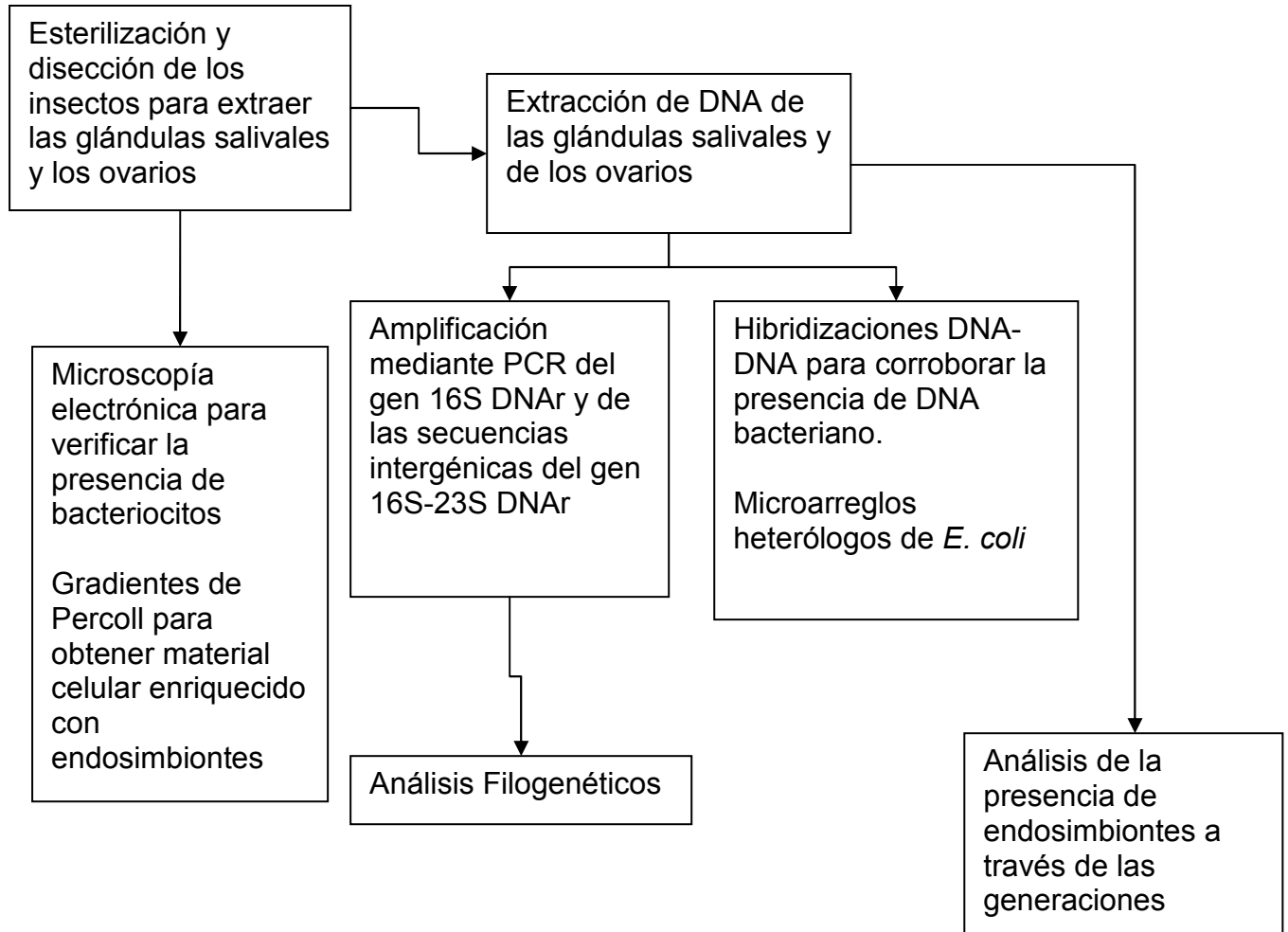
Caracterizar los endosimbiontes bacterianos de distintas especies de *Triatoma* de México, *T. pallidipennis* y *T. longipennis*.

3.1 Objetivos particulares

1. Análisis de PCR del gen 16S DNAr y de las secuencias intergénicas del gen 16S-23S DNAr mediante PCR.
2. Clonación de los productos de PCR en el sistema TOPO-TA clonng.
3. Identificación de las clonas positivas por análisis de patrones de restricción.
4. Comparaciones filogenéticas de los endosimbiontes encontrados.
5. Corroboración de la presencia de endosimbiontes en los diferentes tejidos a través de hibridaciones de DNA-DNA usando diferentes sondas marcadas con ³²P.
6. Análisis por microscopía electrónica para verificar la presencia de bacteriocitos.
7. Determinación del tamaño del genoma del endosimbionte mediante el uso microarreglos heterólogos.
8. Enriquecimiento del material celular del endosimbionte mediante gradientes de Percoll.
9. Análisis de la presencia de los endosimbiontes a través del establecimiento de colonias y de la búsqueda de organismos en las generaciones sucesivas de insectos.

4. Materiales y Métodos

4.1 Esquema general de la estrategia experimental



4.2 Disección de insectos Triatominos y purificación de DNA

Los triatominos fueron proporcionados por el insectario del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) en Cuernavaca, Morelos. Previo a la disección, los insectos son esterilizados con una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% durante un min, continuando con un lavado de agua milli-Q estéril durante un min. Posteriormente se disectan la glándula salival y los ovarios de los insectos. Estos tejidos son sometidos a un proceso de lavado con agua milli-Q estéril, el sobrenadante es sembrado en cajas con medio Luria-Bertani (LB) sólido y se dejan a 25°C durante toda la noche. Para la extracción del DNA total, los tejidos son finamente macerados en 50 μ l de medio LB líquido y estéril. Las muestras son procesadas con el "Kit de Amersham Biosciences; Genomic prep. cells and tissue DNA isolation kit". Los tejidos macerados se resuspenden en 600 μ l de solución de lisis y se incuban durante 60 min a 65°C, posteriormente se dejan enfriar las muestras a temperatura ambiente para poder agregar 3 μ l de proteinasa K (20 mg/ml), a continuación se incuban a 55°C durante 4 h. Después de transcurrido el tiempo se añaden 3 μ l de RNAsa (20 mg/ml) y se incuban durante 60 min a 37°C. A continuación se enfrían las muestras a temperatura ambiente y se agregan 200 μ l de solución de precipitación de proteína, se mezclan vigorosamente y se centrifugan a 13,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante es transferido a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se agregan 600 μ l de isopropanol, se centrifugan a 13,000 rpm durante 5 min. Se elimina el sobrenadante y se añaden 600 μ l de etanol al 70%, nuevamente se centrifugan a 13,000 rpm durante 5 min. Por último se elimina el sobrenadante y se seca el tubo que contiene la muestra para agregar 50 μ l de solución de hidratación. Una vez aislado el DNA total de las muestras se evalúa la cantidad y la calidad del mismo mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, estos son teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml) para su

observación bajo luz ultravioleta. También se lleva a cabo la extracción de DNA de las colonias obtenidas de los sobrenadantes del proceso de lavado de los tejidos sembrados en LB.

4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El DNA obtenido de la glándula salival y de los ovarios es usado como molde en un ensayo de PCR para amplificar el gen 16S DNAr. Para éste ensayo se usan los siguientes oligonucleótidos universales rD1 5´AAG-GAG-GTG-ATC-CAG-CC 3´ y fD1 5´ AGA-GTT-TGA-TCC-TGC-CTC-AG 3´ bajo condiciones de reacción estándar. La mezcla de reacción esta compuesta por: H₂O 40.1µl, dNTPs 0.2 mM, fD1 1 mM, rD1 1mM, Buffer 1X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), MgCl₂ 2.5 mM, *Taq* DNA polimerasa 0.5 U, el volumen final es de 50µl. Las condiciones de amplificación se realizan con un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 min, seguido por 30 ciclos con un paso de desnaturalización a 94°C durante 1 min, un paso de alineamiento a 57°C durante 1 min, un paso de extensión a 72°C durante 2 min y un ciclo de extensión final a 72°C durante 3 min. Los productos de PCR se analizan mediante electroforesis en geles de agarosa.

4.4 Clonación de los productos de PCR en el plásmido vector pCR-4-TOPO

Los productos de PCR de alrededor de 1500 pb son clonados en el plásmido vector “pCR-4-TOPO; Invitrogen”, para este ensayo se mezclan 4 µl del producto de PCR con 1 µl de solución SALT y 1 µl del vector, la mezcla se incuba durante 1 hr a temperatura ambiente. Posteriormente, se lleva a cabo la transformación en las células competentes DH5-alfa. Para esto la mezcla de reacción se deja en hielo durante 30 min y posteriormente se incuba durante 2 min a 42°C, una vez transcurrido

éste tiempo se añaden 300 ml de LB. La transformación se incuba durante 1 hr a 37°C con agitación. Por último las transformaciones se siembran en cajas con medio selectivo (LB, Kanamicina 50 µg/ml, Carbenicilina 100 µg/ml, IPTG 250 µg/ml, Xgal 20 µg/ml) y se dejan incubar a 37°C toda la noche.

De las transformaciones se aíslan colonias al azar para realizar ensayos de PCR de DNA de colonia. Para ésto, las células son transferidas a una solución de lisis (MgSO₄ · 7 H₂O 10 mM y 5 µl de Tween 20) y los lisados son usados como molde. Este mismo procedimiento se realiza para las colonias crecidas en LB obtenidas de los lavados de los tejidos.

4.5 Identificación de diferentes patrones de digestión de las transformaciones en el vector pCR-4-TOPO

Los productos de PCR de alrededor de 1500 pb son digeridos con las enzimas de restricción *Sau3AI* y *MspI*. Se verifican los diferentes patrones de restricción mediante electroforesis en geles de agarosa. Las muestras que presentan distintos patrones de restricción se mandan secuenciar a la compañía “Macrogen” en Korea. Las secuencias obtenidas se alinean usando Clustal W, una vez alienadas se analizan con el paquete Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) versión 3.1 para obtener árboles por Neighbor-Joining con el modelo Jukes-Cantor, Kimura 2-parámetros. La matriz de distancia se obtuvo a partir de la función Similarity Matrix (Identity) de BioEdit 7.0.5.3 para hacer comparaciones filogenéticas.

4.6 Análisis de las secuencias intergénicas del gen 16S-23S DNAr

Para el análisis inicial de las secuencias intergénicas del gen 16S-23S DNAr, se usaron oligonucleótidos degenerados, con las siguientes secuencias: FGPS-1490f 5'TGC-GGC-TGG-ATC-ACC-TCC-TT 3' y FGPL-132r 5'CCG-GGT-TTC-CCC-ATT-CGG 3'. Posteriormente se diseñaron dos grupos de oligonucleótidos y las secuencias obtenidas fueron las siguientes; secuencia para el oligonucleótido del grupo If: 5'TGT-CGC-GGT-GAA-TAC-GTT 3', secuencia para el oligonucleótido del grupo IIf: 5'GCG-CGT-AAA-GCC-AAT-CTA 3'. Para ambos grupos se usa como reverso el oligonucleótido utilizado inicialmente; FGPL 132r 5'CCG-GGT-TTC-CCC-ATT-CGG 3'. Las concentraciones de reactivos y las condiciones de reacción fueron similares a los ya descritos en párrafos anteriores. Los oligonucleótidos diseñados fueron probados con muestras de DNA de otros microorganismos, tales como la cepa W3110 de *E. coli* y con la cepa 899 de *Rizhobium etli*.

4.7 Amplificación de DNA total

Para poder obtener una mayor cantidad de material genético se amplifica al azar, el DNA total obtenido tanto de las muestras de tejido de las glándulas salivales como de tejido de los ovarios. La amplificación se lleva a cabo con el "Kit-GenomiPhi de Amersham Biosciences". Primero se mezcla 1 µl de la muestra de DNA total que se va a usar como templado con 9 µl del buffer, ésta mezcla se calienta a 95°C durante 3 min y se enfría en hielo. Posteriormente se preparan 9 µl de buffer de reacción con 1 µl de enzima mix y se agrega la mezcla a la muestra que contiene el templado y se incuba a 30°C durante toda la noche. Por último se inactiva la enzima a 65°C durante 10 min.

4.8 Hibridización DNA-DNA

El DNA total amplificado al azar, tanto de las muestras de tejido de las glándulas salivales como de los tejidos de los ovarios, se corren en geles de agarosa para realizar el proceso de desnaturalización. Posteriormente se fijan en membranas de nylon para realizar una prehibridización durante una hora a 65°C con 10 ml de solución de hibridización. A continuación se añade directamente sobre la solución de hibridización la [sonda marcada](#) con ^{32}P (RediPrime-Amersham). En este caso las sondas utilizadas fueron la cepa W3110 de *E. coli* y el gen 16S DNAr de *Arsenophonus*. La hibridización se deja durante toda la noche a 65°C. La membrana se lava bajo condiciones astringentes (ver anexos).

4.9 Microscopía electrónica

Se utilizó microscopía electrónica para confirmar la presencia de bacteriocitos en los tejidos del triatomino. Este experimento se realizó en la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (www.ifc.unam.mx). Las muestras biológicas se fijan en glutaraldehído. Una vez fijadas, se incluyen en resinas de tipo Araldita y Epoxy (Spurr). Estas resinas presentan como característica que no son miscibles con el agua, por lo cual la muestra biológica sufre una deshidratación para sustituir el agua por un disolvente orgánico que sí es miscible con la resina. Los disolventes más utilizados son el etanol y la acetona. Por último, la muestra puede continuar el proceso de inclusión en una resina en estado líquido que polimerizará a temperaturas de 60°C. Posteriormente se embebieron en resinas para realizar los cortes y tinción con “Giemsa” para su observación en el microscopio.

4.1.1 Microarreglos

Otro de los experimentos realizados con el DNA total amplificado al azar fue el de microarreglos heterólogos de *E. coli* K-12. Estos se realizaron en la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (www.ifc.unam.mx). Se elaboraron dos laminillas de microarreglos usando el genoma completo de *E. coli* K-12 por duplicado. Una de las laminillas se hibrida con DNA total de glándula salival y DNA total de ovario marcados con diferentes fluoróforos “Cy3” y “Cy5” respectivamente. En la otra laminilla se hibrida con muestras de DNA total de ovario marcadas con “Cy3” y “Cy5”. Para la evaluación de los microarreglos se utilizó un umbral de intensidad de señalización con un valor de 70.

4.1.2 Gradientes de Percoll

Para llevar a cabo la separación diferencial del material celular directamente de los tejidos del insecto y con ello obtener material enriquecido con DNA bacteriano. Para este experimento se disectaron 60 insectos para extraer las glándulas salivales y los ovarios; los tejidos obtenidos se maceran finamente en un mortero y se tamizan para eliminar los detritos. Las muestras son transferidas a tubos de 50 ml y se centrifugan durante 2 horas a 14500 rpm para llevar a cabo la separación por gradiente (ver anexos). Se usaron como controles una cepa bacteriana de *R. etli* la cual tiene el gen reportero GFP (mediante luz ultravioleta permite una fácil visualización para identificar en qué densidad se encuentra las células de interés, además de los marcadores de densidad). De cada uno de los tubos se toman muestras de 1 ml hasta terminar los 40 ml de cada uno. De cada una las muestras colectadas se reservan 50 μ l, los 950 μ l restantes se centrifugan a 13000 rpm durante 3 minutos, se separa el sobrenadante de la pastilla celular obtenida. Posteriormente

se analizan por PCR con los oligonucleótidos específicos grupo If: 5`TGT-CGC-GGT-GAA-TAC-GTT 3`, grupo IIf: 5`GCG-CGT-AAA-GCC-AAT-CTA 3`y FGPL 132r 5`CCG-GGT-TTC-CCC-ATT-CGG 3`, cada una de las fracciones obtenidas tanto de las glándulas salivales como de las muestras obtenidas de los ovarios (figura 7).

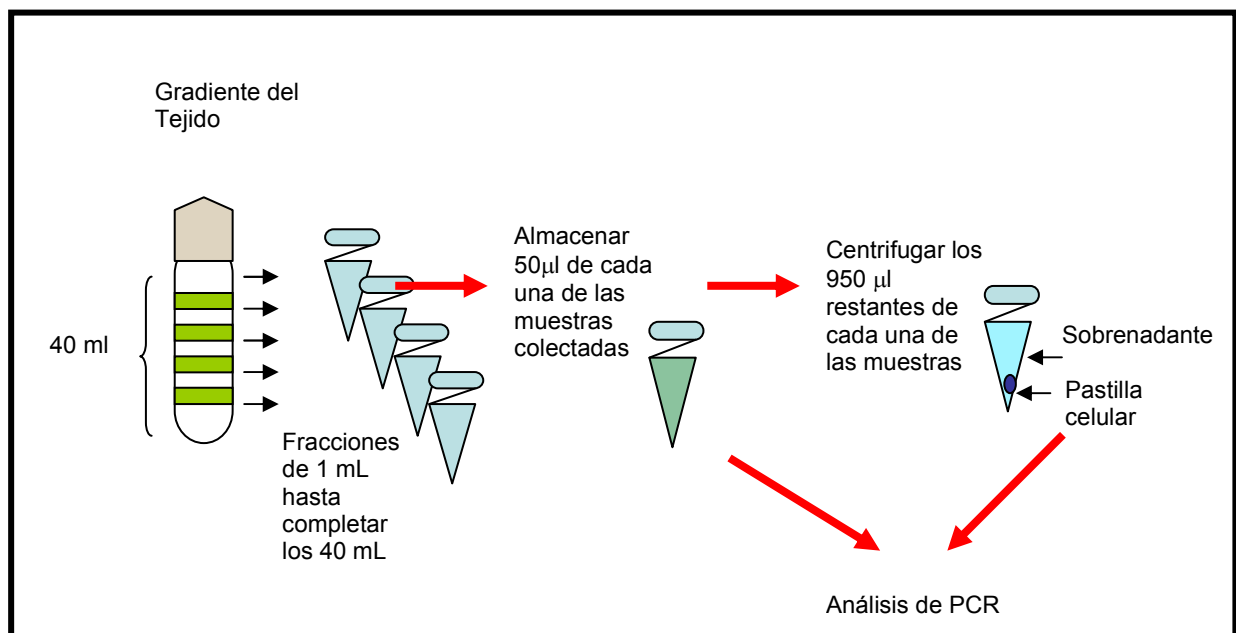


Figura 7.- **Gradientes de Percoll.** De cada uno de los tubos se toman muestras de 1 ml hasta terminar los 40 ml de cada uno de los diferentes tubos. De cada una las muestras colectadas se almacenan 50 µl. Los 950 µl restantes se centrifugan a 13000 rpm durante 3 minutos, se separa el sobrenadante de la pastilla celular obtenida para posteriormente realizar la amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos que revelan *Arsenophonus*.

4.1.3 Análisis de la presencia de los endosimbiontes a través de generaciones

Con la finalidad de analizar la presencia de los endosimbiontes bacterianos a través de las generaciones, se realizaron los análisis de dos familias de insectos de diferentes cruza; *T. longipennis* (macho) - *T. pallidipennis* (hembra) con un total de 39 insectos (cruza 1) y *T. longipennis* (hembra) - *T. pallidipennis* (macho) con un total de 29 insectos (cruza 2). Se procedió a extraer el DNA de los ovarios y de las glándulas salivales de cada uno de estos insectos y se llevo a cabo el análisis mediante PCR con los oligonucleótidos específicos grupo If: 5`TGT-CGC-GGT-GAA-TAC-GTT 3`, grupo IIf: 5`GCG-CGT-AAA-GCC-AAT-CTA 3`y FGPL 132r 5`CCG-GGT-TTC-CCC-ATT-CGG 3`.

5. Resultados

5.1 Purificación de DNA total de glándulas salivales y de ovarios de los Triatominos

El DNA total de los tejidos de las glándulas salivales y de los ovarios, se aisló con el “Kit de Amersham Biosciences; Genomic prep. cells and tissue DNA isolation kit”, con la finalidad de llevar a cabo diversos experimentos tales como, la amplificación del gen 16S DNAr. Sin embargo durante el proceso de extracción del material genético, observamos mediante electroforesis en geles de agarosa que se pierde una cantidad considerable de muestra, tanto de los ovarios como de las glándulas salivales. Para poder llevar a cabo otros experimentos en los cuales las cantidades requeridas de DNA son de alrededor de 0.5 microgramos amplificamos al azar el DNA total de las muestras obtenidas.

5.2 Amplificación del gen 16S DNAr mediante PCR y clonación en el plásmido vector pCR 4-TOPO

El DNA total obtenido de los tejidos fue usado como molde para realizar la amplificación del gen 16S DNAr mediante PCR. En la figura 8 se observan bandas de alrededor de 1500 pb, las cuales concuerdan con el tamaño del gen 16S DNAr. Para corroborar que las bandas correspondan a dicho gen, los productos de PCR obtenidos se clonaron en el vector de expresión pCR 4-TOPO y se transformaron en las células competentes DH5-alfa, las transformaciones se crecieron en medio selectivo (LB, Kanamicina 50µg/ml, Carbenicilina 100µg/ml, IPTG 250µg/ml, Xgal 20µg/ml). A las colonias obtenidas a partir de las transformaciones se les realizó PCR de colonia (figura 9). Esto mismo se llevó a cabo para las colonias obtenidas de los lavados de los tejidos sembrados en cajas con LB.

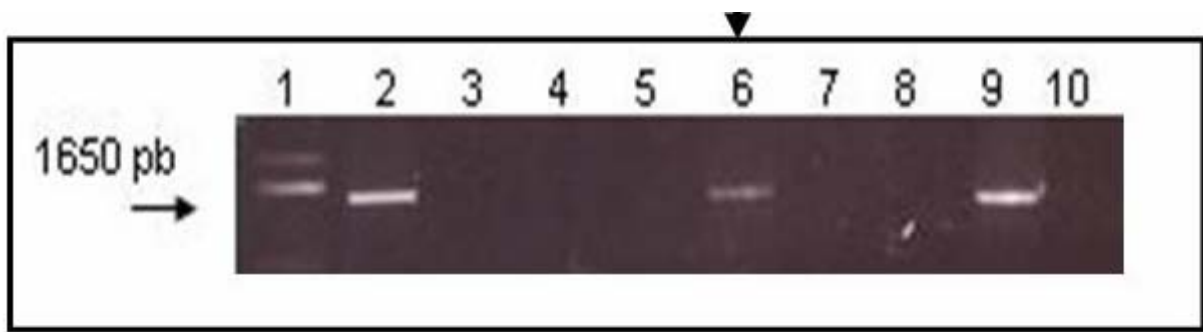


Figura 8.- **Amplificación por PCR del gen 16S DNAr de las muestras de DNA de glándula salival.** El DNA total fue usado como molde para llevar a cabo la amplificación del gen 16S DNAr. Los carriles que van del número 3 al número 8, son productos de PCR de las muestras de DNA total de las glándulas salivales de *T. pallidipennis*, solo se observa amplificación en el carril número 6. En el caso del carril número 2 el PCR se realizó directamente del DNA de las colonias obtenidas de los lavados de los tejidos crecidas en medio LB. En el carril número 1 observamos el marcador de peso molecular 1 Kb plus. El carril número 9 corresponde al control positivo, en éste caso se uso la cepa 899 de *R. etli*. Por último en el carril número 10 tenemos el control negativo el cual solo contiene la mezcla de reacción. La flecha nos muestra el producto de PCR que fue clonado en el vector pCR 4-TOPO y transformado en las células competentes DH5-alfa.

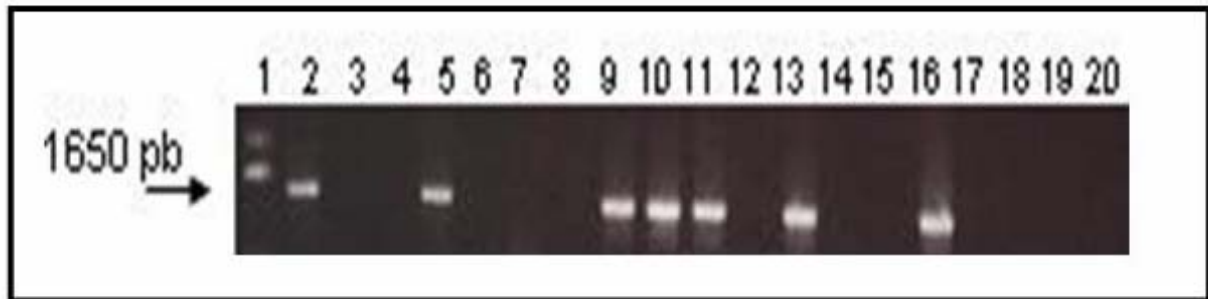


Figura 9.- **Amplificación por PCR de DNA colonia del gen 16S DNAr de las transformaciones en el plásmido vector pCR 4-TOPO.** Carril 1, marcador de peso molecular 1 Kb Plus. En los carriles que van del número 2 al número 18 corresponden a las transformaciones del producto de PCR clonado en el vector pCR 4-TOPO y transformado en las células competentes DH5-alfa, dicho producto está señalado en la figura anterior.

5.3 Análisis de patrones digestión y análisis filogenéticos

A los productos de PCR que concuerdan en tamaño con el gen 16S DNAr, se llevó a cabo el análisis de patrones de restricción con las enzimas *Sau3AI* y *MspI* (figura 10). Las muestras con patrones de restricción distintos se mandaron secuenciar a "Macrogen" en Korea. Las secuencias obtenidas fueron alineadas usando Clustal W, una vez alienadas se analizaron con el paquete Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) versión 3.1 para obtener árboles por Neighbour-Joining con el modelo Jukes-Cantor, Kimura 2-parámetros. La matriz de distancia se obtuvo a partir de la función Similarity Matrix (Identity) de BioEdit 7.0.5.3. En la figura 11 observamos la existencia de diferentes endosimbiontes bacterianos, incluyendo uno reportado para *T. infestans* pero no para algún triatomino existente en la República Mexicana. El endosimbionte encontrado

pertenece al grupo de *Arsenophonus* relacionado con diferentes insectos y al igual que la mayoría de los endosimbiontes bacterianos se encuentran dentro de la subdivisión gamma-3-Proteobacteria teniendo a *E. coli* como su pariente de vida libre más cercano. Este mismo procedimiento se realizó para los microorganismos obtenidos en los controles de esterilidad y los datos nos revelan que pertenecen a diferentes grupos de bacterias dentro de los cuales se encuentran, *Enterococcus*, *Staphylococcus sp.* y una beta-Proteobacteria parecida a *Variovorax*.

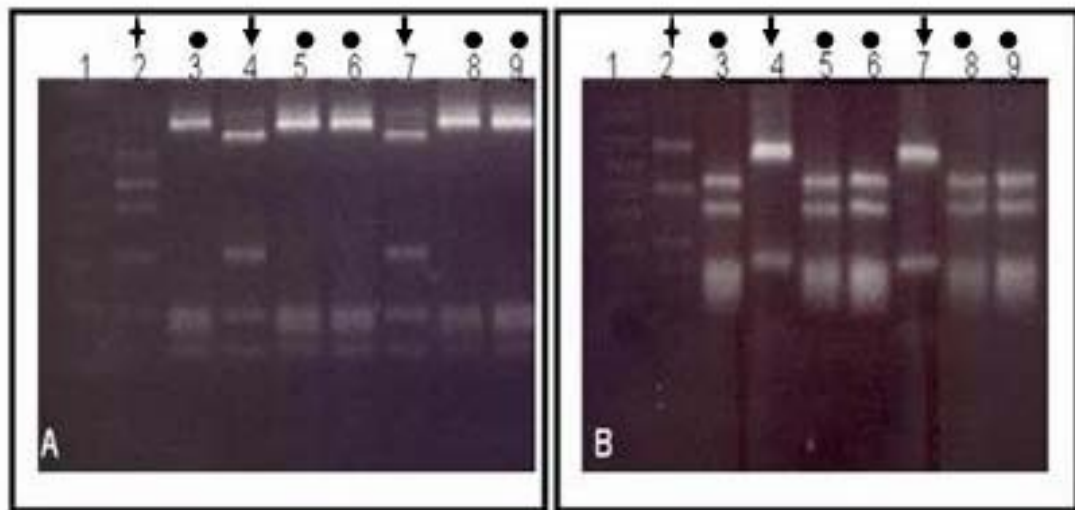


Figura 10.- **Patrones de Digestión.** En (A) observamos los patrones de digestión con la enzima *Sau3AI* y en (B) con la enzima de restricción *MspI*. Para ambos casos los DNA's se obtuvieron de las clonas de las transformaciones en la cepa DH5-alfa. Carril número 1, Marcador de peso molecular 1 Kb Plus. Carriles del número 2 al número 9 DNA's digeridos. Los símbolos (+,•,↓) muestran los tres diferentes patrones de restricción obtenidos con ambas enzimas.

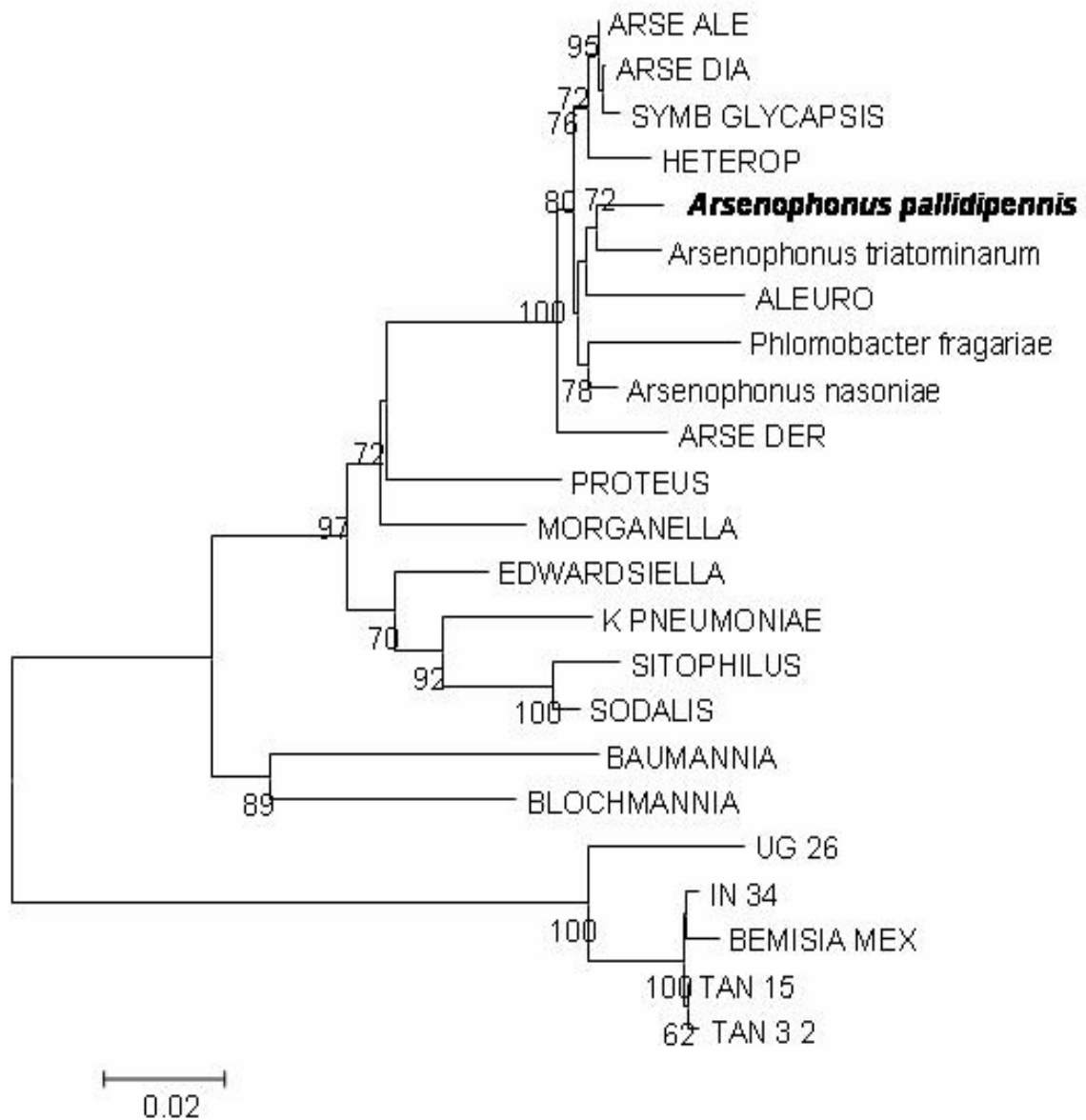


Figura 11.- **Árbol filogenético de los endosimbiontes de *T. pallidipennis* obtenido por Neighbor-Joining.** Los datos basados en las secuencias del gen 16S DNAr nos revela la existencia de diferentes endosimbiontes bacterianos incluyendo uno reportado para *T. infestans* pero no para triatominos de la República Mexicana. El endosimbionte encontrado pertenece al grupo de *Arsenophonus* relacionado con diferentes insectos.

5.4 Análisis de las secuencias intergénicas del gen 16S-23S DNAr

Las secuencias intergénicas del gen 16S-23S DNA ribosomal contienen diferentes RNA's de transferencia (RNAt) (figura 12). Lo cual permite diferenciar de una manera más precisa entre individuos aún de la misma especie. Es por ello que se diseñaron oligonucleótidos específicos para revelar *Arsenophonus*, basados en las secuencias intergénicas. Las bandas obtenidas mediante PCR mostraron variedad en los tamaños dependiendo del grupo de oligonucleótidos. Los tamaños van de 800 a 860 pb para los oligonucleótidos del grupo If y de 650 pb para los oligonucleótidos del grupo Iff. Esto pudiera estar en relación a los diferentes RNAt presentes o ausentes dentro de la región intergénica. Por otro lado existe la posibilidad de que a lo largo de todo el genoma exista la presencia de más de un gen 16S-23S DNAr. Las muestras se mandaron secuenciar a "Macrogen" en Korea y una vez obtenidas las secuencias se alineran usando Clustal W, una vez alienadas se analizaron con el paquete Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) versión 3.1 para obtener árboles por Neighbour-Joining con el modelo Jukes-Cantor, Kimura 2-parámetros. La matriz de distancia se obtuvo a partir de la función Similarity Matrix (Identity) de BioEdit 7.0.5. En la figura 13 observamos el árbol filogenético en el cual nos muestra que los linajes de *Arsenophonus* de triatominos no se mezclan con los de otros insectos tales como los de mosquita blanca, la garrapata de perro, ni de avispas parasitoides. Además distinguimos distintos linajes de *Arsenophonus* existentes en México de acuerdo a éstas secuencias.

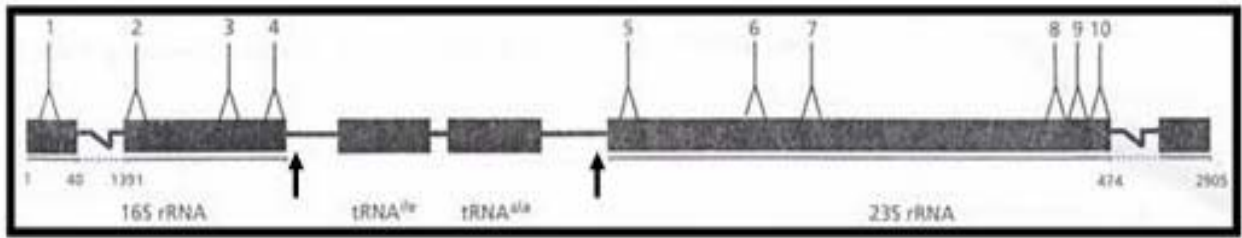


Figura 12.- **Gen 16S-23S DNA ribosomal.** Las flechas delimitan las secuencias intergénicas de los genes ribosomales. Dentro de las secuencias intergénicas observamos la presencia de diferentes RNAt. Los diferentes RNAt's pueden estar presentes o ausentes, con los cual se puede diferenciar de una manera más precisa entre individuos aún de la misma especie. Es por ello que el diseño de los oligonucleótidos específicos se llevó acabo anclándose en los límites de las secuencias intergénicas con los ribosomales.

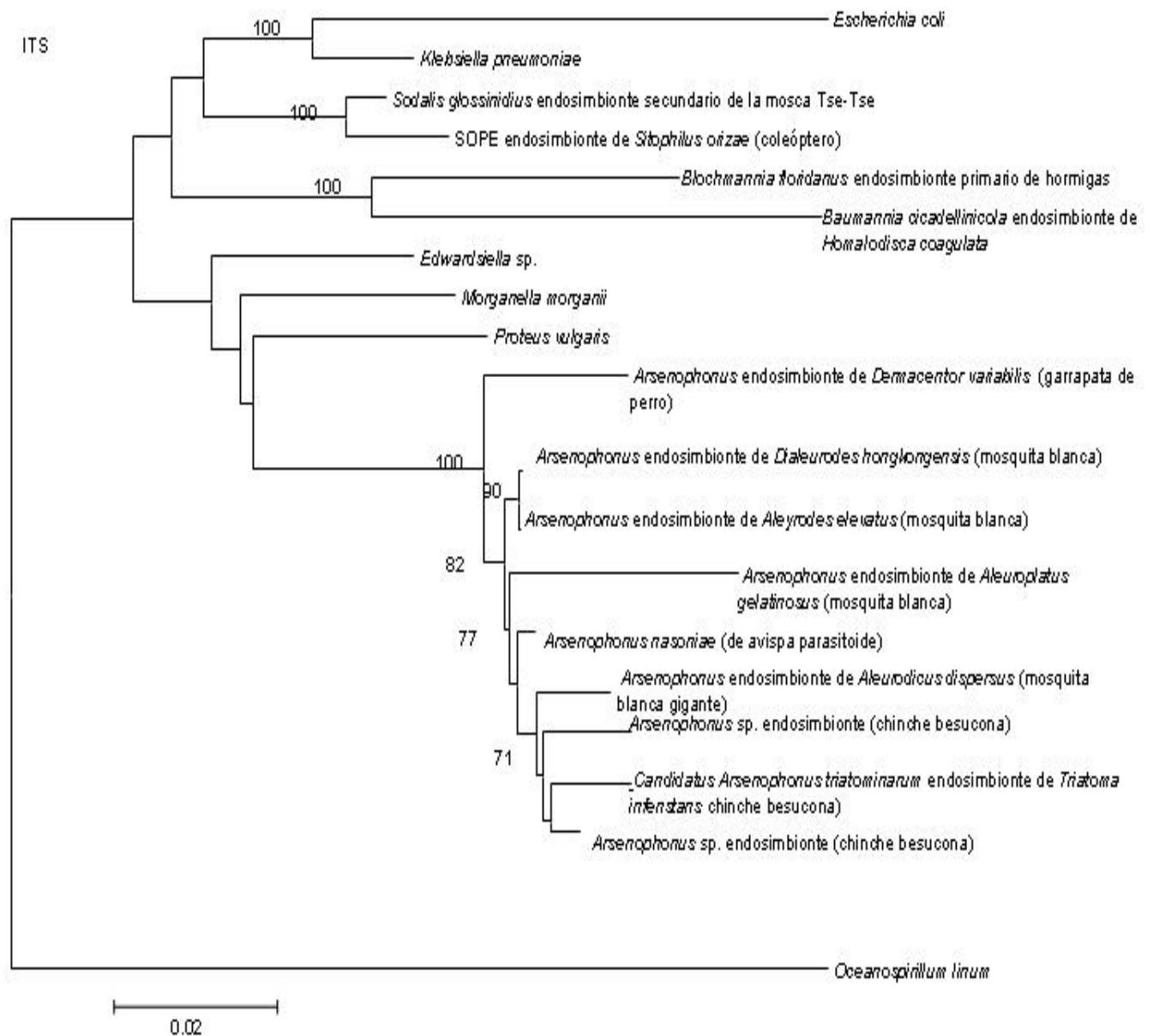


Figura 13.- **Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S-23S DNAr, obtenido por Neighbor-Joining.** Los datos obtenidos muestran que los linajes de *Arsenophonus* de triatominos no se mezclan con los de otros insectos tales como los de mosquita blanca, la garrapata de perro, ni de avispas parasitoides.

5.5 Hibridización DNA-DNA

Para confirmar la presencia de DNA bacteriano, se hibridó el DNA total de las muestras de glándula salival y de ovario amplificadas al azar contra el genoma completo de la cepa W3110 de *E. coli* y el gen 16S DNAr de *Arsenophonus*, tanto la cepa como el gen se marcaron con ^{32}P . En la figura 14 se muestra el gel de transferencia y la autorradiografía, ésta nos confirma la presencia de DNA bacteriano, sin embargo esta prueba no nos asegura que sea exclusivamente *Arsenophonus* debido a que dentro de los diferentes tejidos puede estar albergado más de un microorganismo.

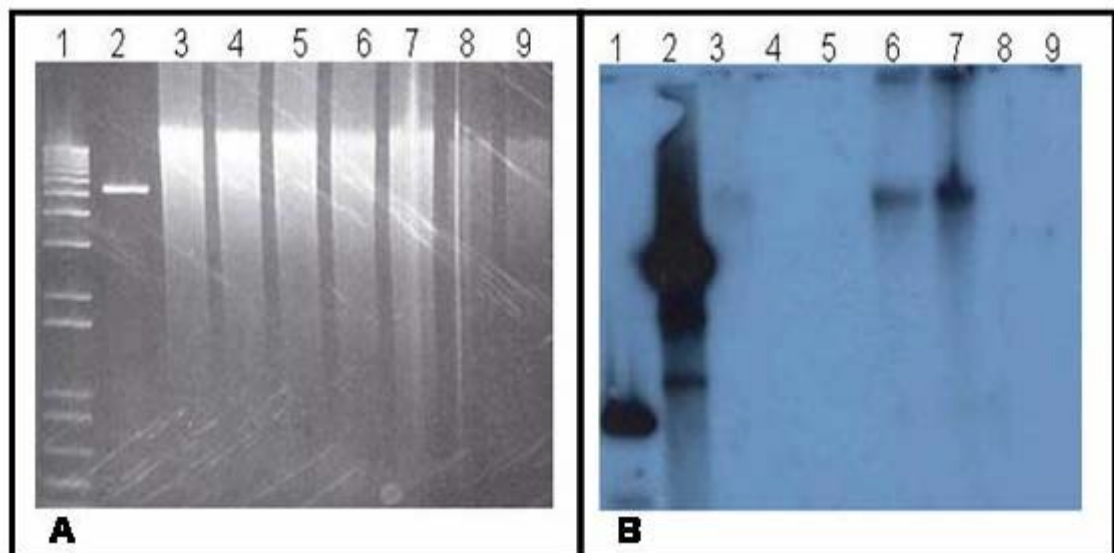


Figura 14.- **Hibridización DNA-DNA.** En (A) Gel de transferencia con las de muestras DNA amplificadas al azar con el kit genomiphi; Carril 1, Marcador de peso molecular 1 Kb Plus. Carril 2, Gen 16S DNAr de *Arsenophonus* amplificado por PCR. Carril 3, cepa W3110 de *E. coli*. Carriles 4, 6 y 8 DNA total de glándula salival. Carriles 5, 7 y 9 DNA total de ovario. En (B) Autorradiografía, en la cual se observa una señal positiva en los carriles 6 y 7, los cuales contienen muestras de DNA total de glándula salival y de DNA de ovario respectivamente. En el carril 3 se observa una señal tenue con el control de la cepa W3110 de *E. coli*.

5.6 Microscopía electrónica

Se realizó microscopía electrónica para confirmar la presencia de endosimbiontes en los diferentes tejidos. En la figura 15 se pueden observar conglomerados de bacterias intracelulares en los tejidos de las glándulas salivales de *T. pallidipennis*, lo que permitió confirmar la presencia de bacteriocitos. Estos microorganismos pudieran corresponder a los *Arsenophonus*. Sin embargo, para poder asegurar esto, se necesita de marcadores más específicos.

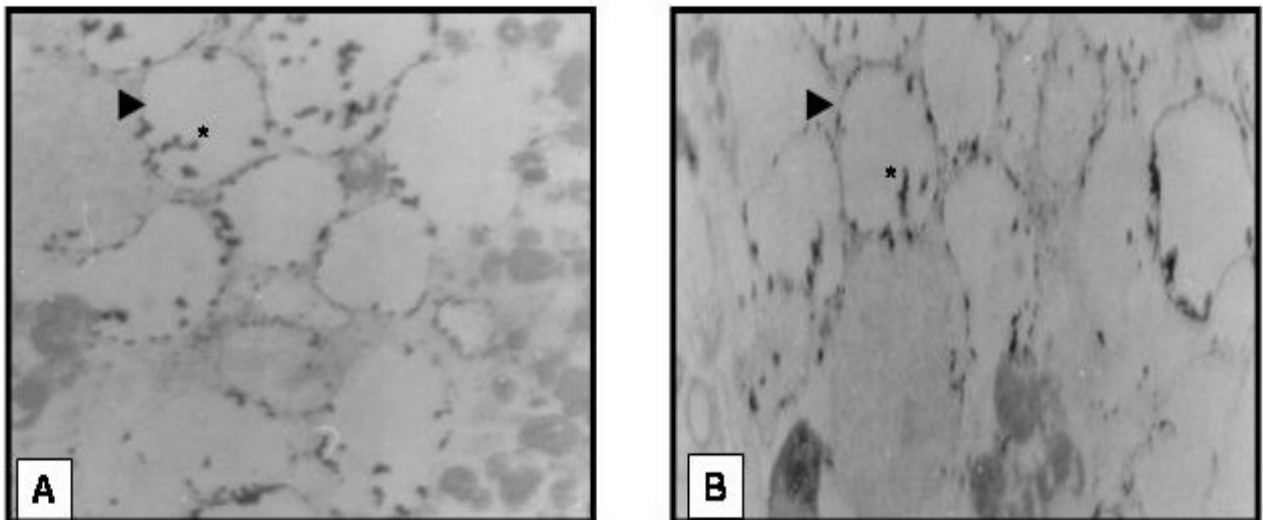
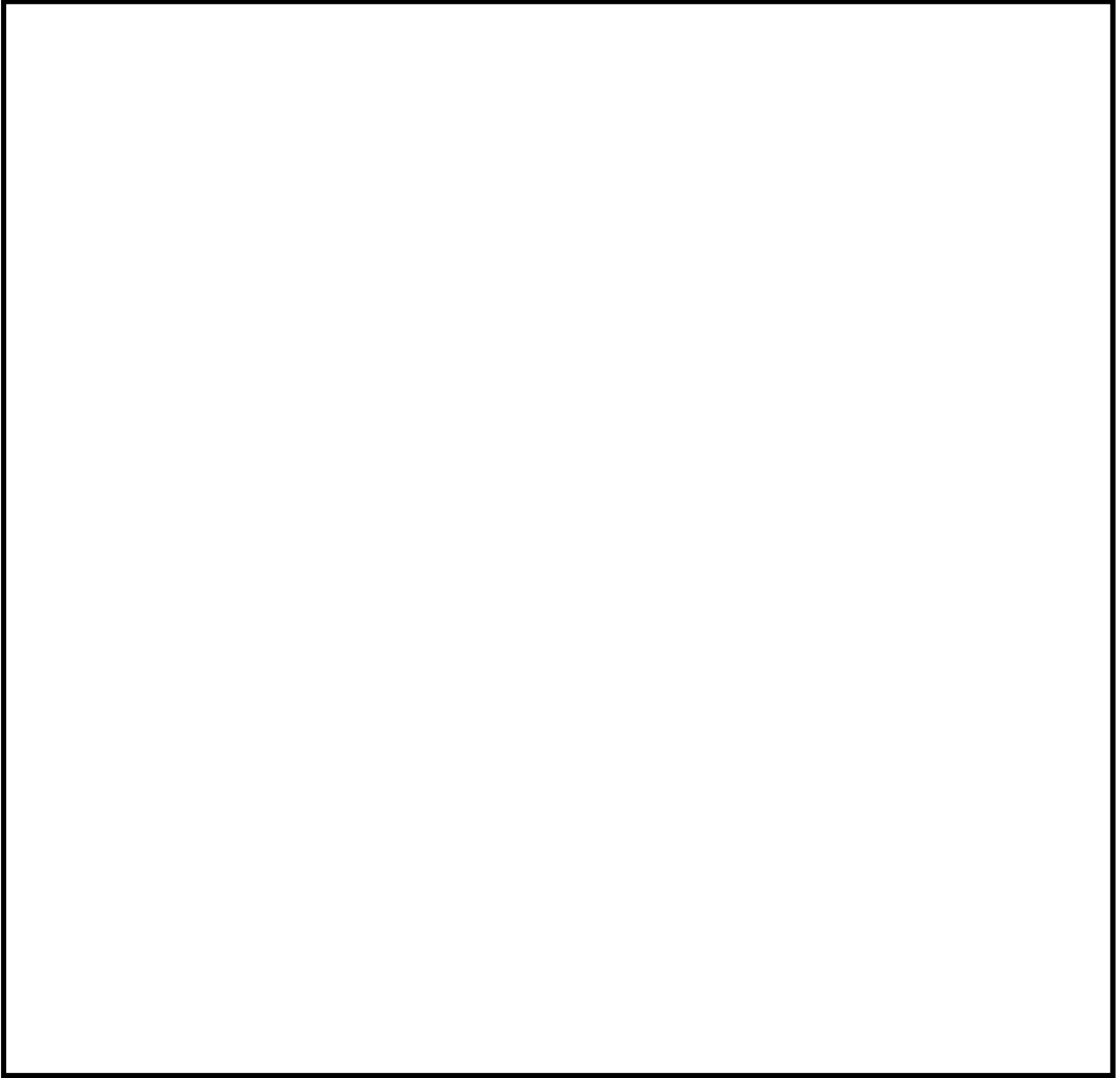
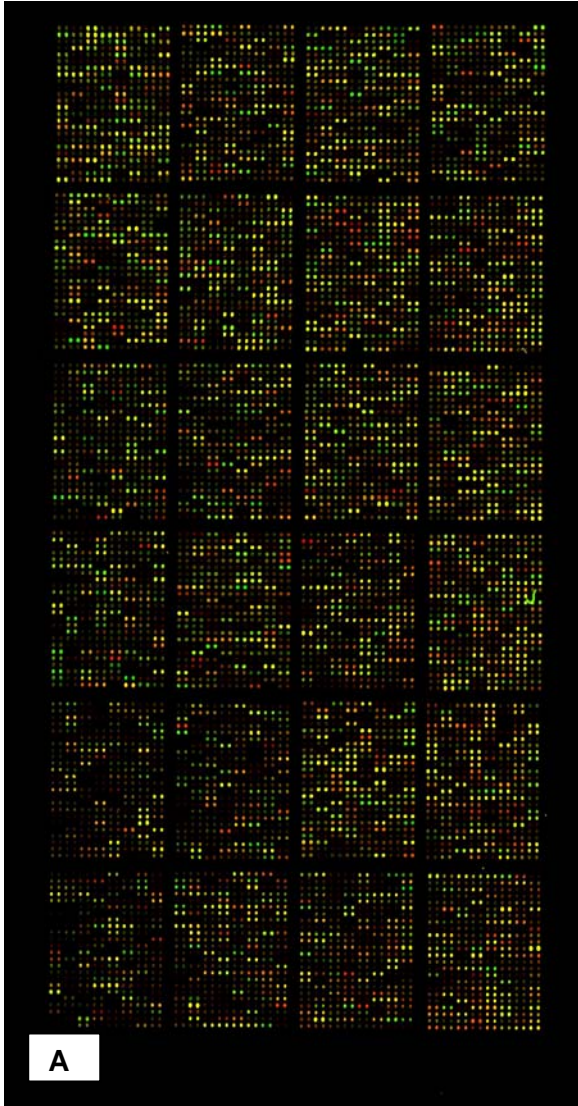


Figura 15.- **Microscopía electrónica de tejido de glándula salival.** En A y B se observa la presencia de bacteriocitos (▶) y dentro de estos una pequeña cantidad de endosimbiontes (*). Cortes de 1.5 micras a 400x y 800x respectivamente.

5.7 Microarreglos

Los resultados nos indican que un total de 3254 genes de *Arsenophonus* nos dan una señal positiva, lo cual nos indica que el tamaño del genoma de *Arsenophonus* es similar al tamaño del genoma de *E. coli*. Logramos observar que un total de 1294 genes de *E. coli* con una hibridización muy fuerte con respecto a los valores del umbral de intensidad de señalización utilizados. Esta intensidad de señal nos indica que estos genes se encuentran presentes en los *Arsenophonus* de ambos tejidos. Por otro lado encontramos que 210 genes no hibridaron con el ADN de ninguno de los tejidos en las laminillas de los microarreglos (figura 16). En las figuras 17 y 18 se muestran los análisis gráficos comparativos del número de genes en cada categoría funcional.





A

B

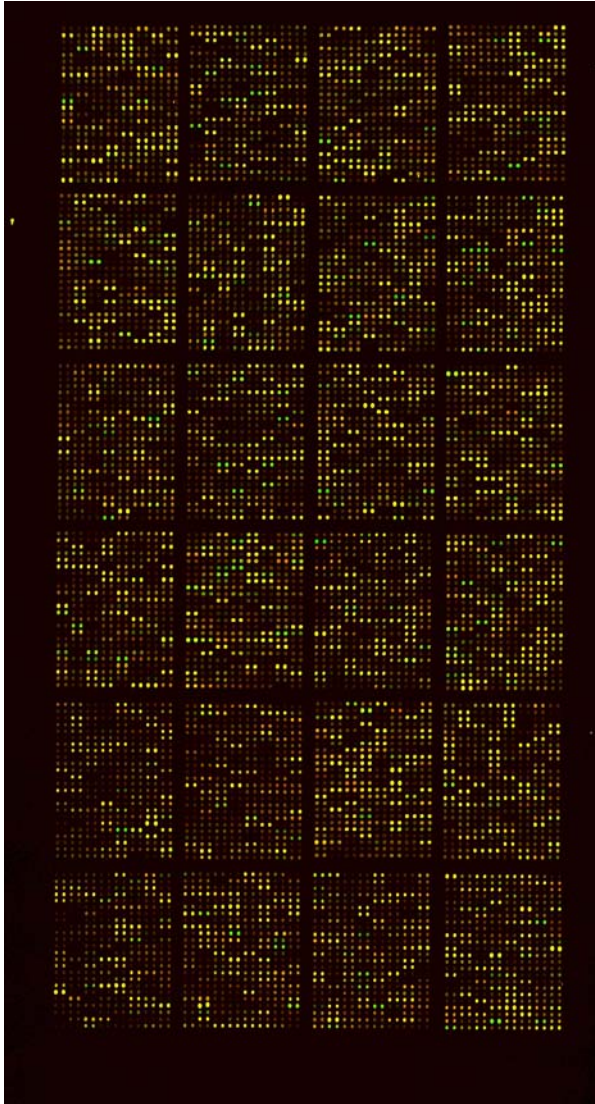


Figura 16.- **Análisis de microarreglos heterólogos de *E. coli*.** En (A) observamos la hibridación de las muestras de DNA total de glándula salival marcado con el fluoróforo “Cy3” (rojo) y de muestras de DNA total de ovario marcado con el fluoróforo “Cy5” (verde). En (B) observamos la hibridación de las muestras de DNA total de ovarios marcados con los fluoróforos “Cy3” y “Cy5”. En ambas imágenes existe un patrón similar de señalización.

Genes Reproduciblemente Positivos

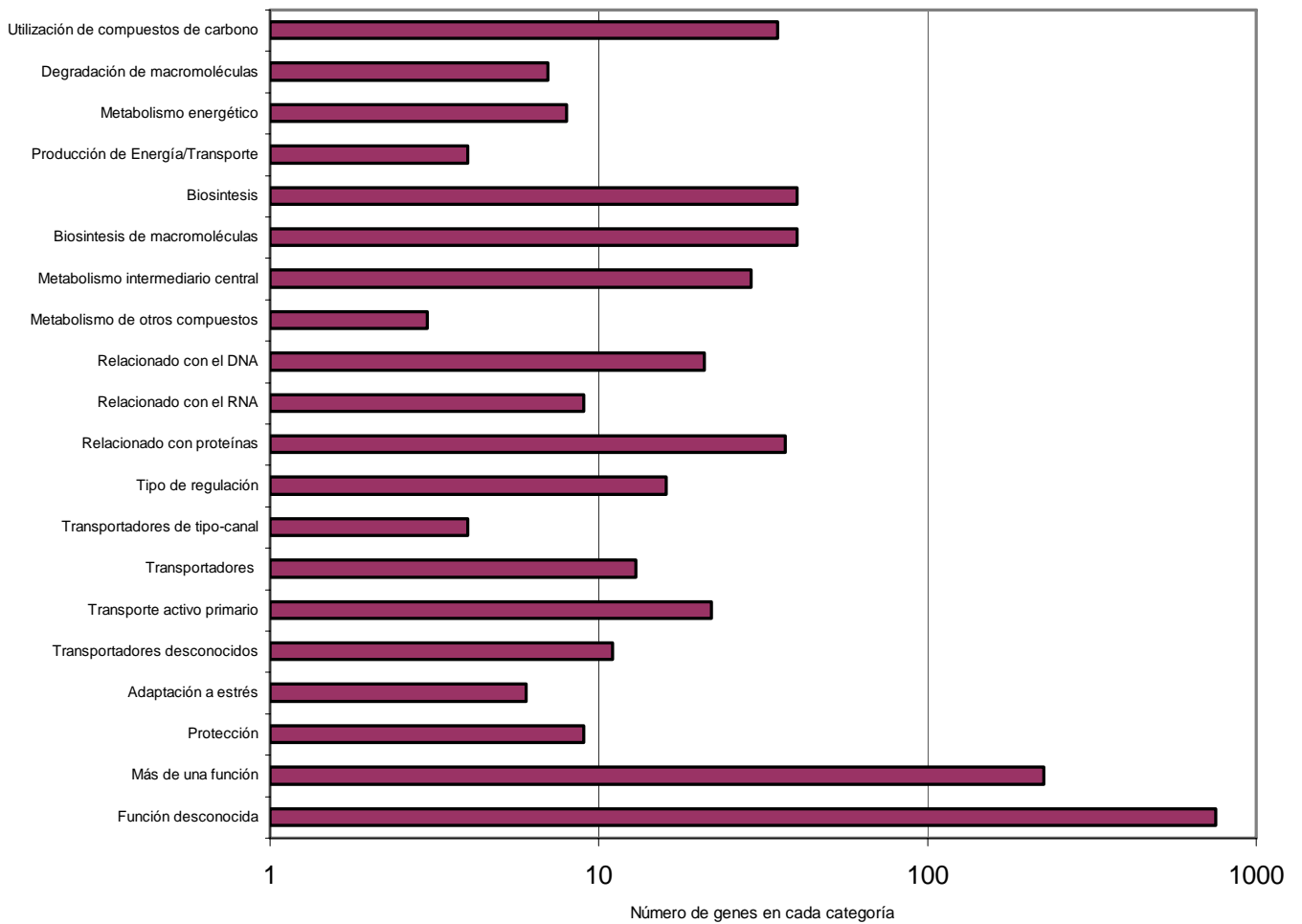


Figura 17.- **Análisis gráfico comparativo del número de genes en cada categoría funcional.** De un total 3254 genes dentro del umbral de intensidad de señalización, se observa un total de 1294 genes reproduciblemente positivos. De estos genes se observa que la función de la mayoría es desconocida.

Genes Reproduciblemente Negativos

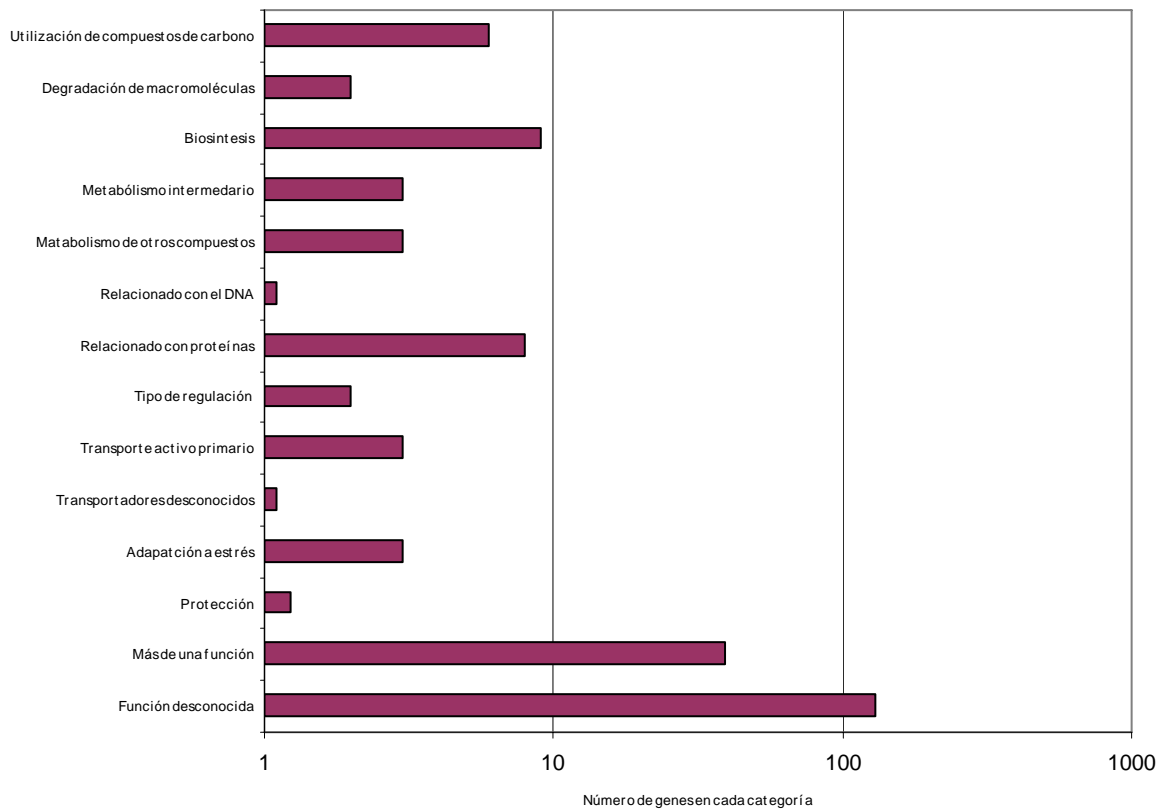


Figura 18.- **Análisis gráfico comparativo del número de genes en cada categoría funcional.** De un total 3254 genes dentro del umbral de intensidad de señalización, se observa un total de 210 genes reproduciblemente negativos. De estos genes se observa que la función de la mayoría es desconocida

Algunos de los genes que dieron una señalización positiva o negativa dentro de los parámetros utilizados para los análisis de los microarreglos tienen que ver con el flagelo. En la figura 19 observamos el esquema general de los genes implicados con el flagelo. De los genes de flagelo presentes en el DNA total de las muestras de glándula salival y de los ovarios observados se muestran en la tabla 1 y en la tabla 2 se muestran los genes de flagelo que no se encuentran presentes.

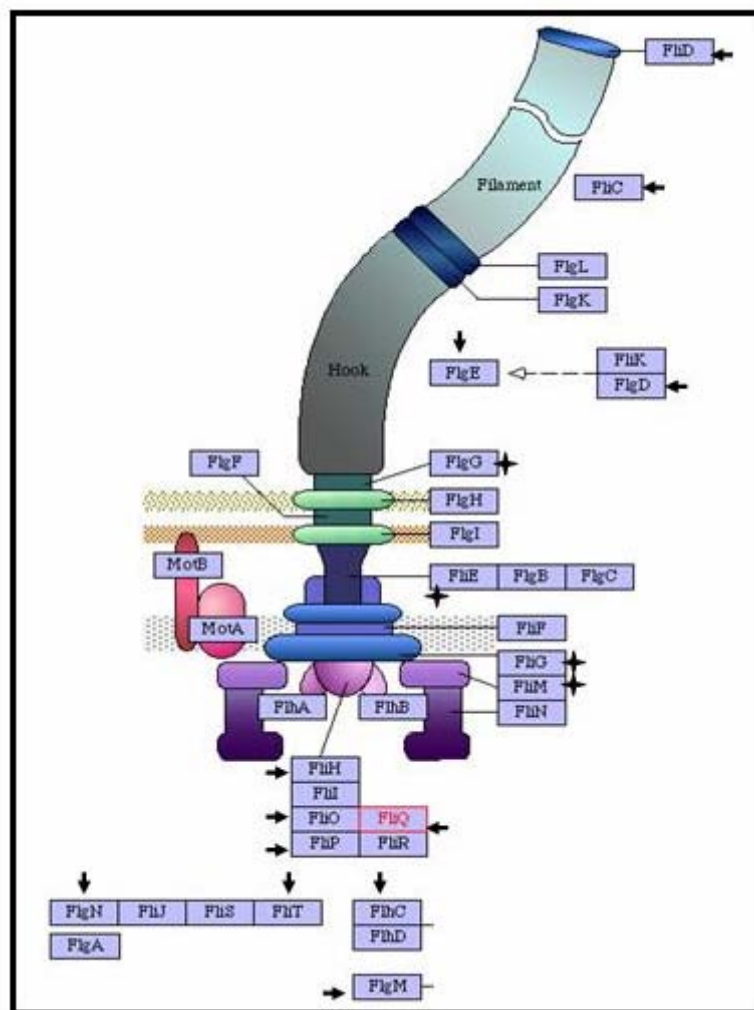


Figura 19.- **Esquema general de los genes de flagelo.** Algunos de los genes de flagelo presentes en las muestras de DNA total de ovario y glándula salival, están señalados con flechas, los ausentes están señalados con cruces.

Tabla 1.- **Genes de flagelo presentes**

Gen	Función
<i>fliH</i>	Codifica para la proteína de ensamblaje flagelar FliH
<i>fliO</i>	Codifica para la proteína de ensamblaje flagelar FliO
<i>fliP</i>	Codifica para la proteína de ensamblaje flagelar FliP
<i>fliQ</i>	Codifica para la proteína biosintética flagelar FliQ
<i>fliE</i>	Codifica para el precursor de proteína flagelar FliE
<i>fliC</i>	Codifica para el activador transcripcional flagelar FliC
<i>flgE</i>	Codifica para la proteína de raíz flagelar FlgE
<i>flgD</i>	Codifica para la proteína de modificación del cuerpo basal FlgD
<i>flgM</i>	Codifica para el regulador negativo de síntesis de flagelina FlgM
<i>flgN</i>	Codifica para la proteína de síntesis flagelar FlgN
<i>fliC</i>	Codifica para la flagelina FliC
<i>fliD</i>	Codifica para la proteína flagelar asociada al gancho FliD
<i>fliT</i>	Codifica para la proteína flagelar FliT

Tabla 2.- **Genes de flagelo ausentes**

Gen	Función
<i>fliM</i>	Codifica para la proteína de motor FliM
<i>fliG</i>	Codifica para la proteína de motor flagelar FliG
<i>fliE</i>	Codifica para el complejo proteico del cuerpo basal FliE
<i>fliJ</i>	Codifica para la proteína flagelar FliJ

Los análisis de los microarreglos también revelan la existencia de muchos genes implicados en el sistema de transportadores ABC. Además de la ausencia de genes implicados en el metabolismo de aminoácidos tales como: *asns*, *gcvh*, *moeb*, *glmu*, *glys*, *livg*, *mog*, *wecb* y *rne*, en la tabla 3 se muestra la función de estos genes. Al igual que en otros endosimbiontes reportados, no existen algunos de los genes implicados en procesos de replicación, reparación, recombinación como son *ruvc*, *uvrb* y *recd* (tabla 4).

Tabla 3.- Genes ausentes implicados en el metabolismo de aminoácidos

Gen	Función
<i>asnss</i>	RNAat asparagina sintasa
<i>gcvh</i>	Proteína H sistema de rompimiento de glicina
<i>moeb</i>	Adenilato transferasa dependiente de ATP
<i>glmu</i>	Uridil transferasa; N-acetil glucosamina
<i>livg</i>	Sistema de transporte de aminoácidos
<i>mog</i>	Homogenisato- 1, 2-dioxigenasa
<i>wecb</i>	UDP-N-acetil glucosamina-2-epimerasa
<i>rne</i>	Receptor colinérgico, nicotínico, epsilon

Tabla 4. Genes implicados en procesos de replicación, reparación y recombinación

Gen	Función
<i>ruvc</i>	probable proteína de unión holliday
<i>uvrb</i>	Enzima de reparación
<i>recd</i>	Helicasa, dependiente de ATP

5.8 Gradientes de Percoll

Con el fin de enriquecer el DNA del insecto se realizaron gradientes de Percoll para separar las células de bacteria del tejido del insecto (figura 20). De la obtención de material enriquecido, se obtuvo tanto de los tejidos de glándulas salivales como de los tejidos de ovarios, que solamente en las tres primeras fracciones de las pastillas celulares generadas por centrifugación, resultaron ser positivas al ser analizadas por PCR con los oligonucleótidos diseñados para revelar *Arsenophonus* (figura 21).

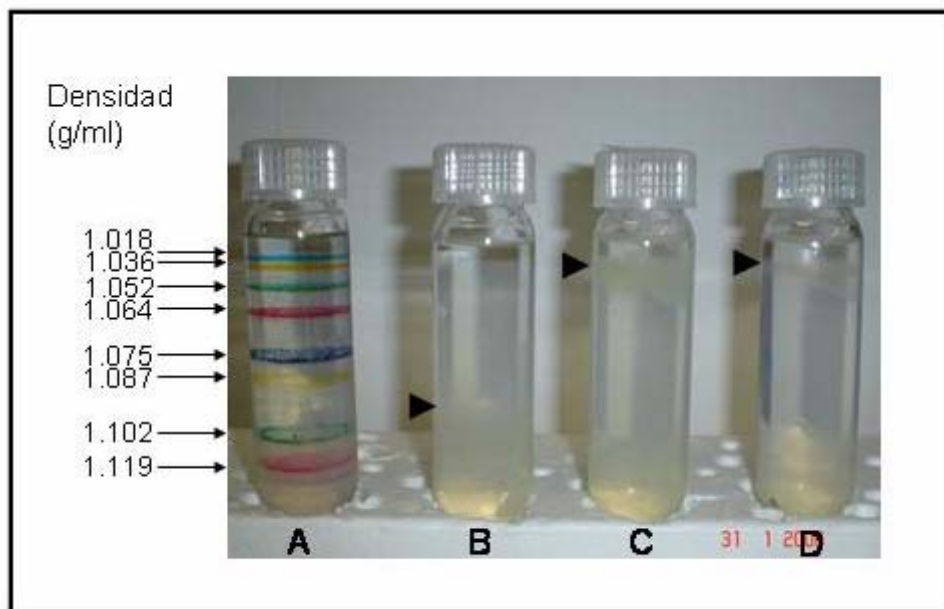


Figura 20.- **Gradientes de Percoll.** Separación por densidad de las muestras de tejido de insecto para la obtención de material enriquecido con células bacterianas. En (A) observamos el marcador de densidad. En (B) se encuentra el control con la cepa *R. etli* 899. En (C) se observa las muestras de tejido de ovarios y en (D) muestras de tejido de glándulas salivales. De las tres primeras fracciones de cada uno de los tubos que contienen las muestras de interés fueron positivas al amplificar

por PCR el gen 16S-23S DNAr con los oligonucleótidos específicos para revelar *Arsenophonus*.

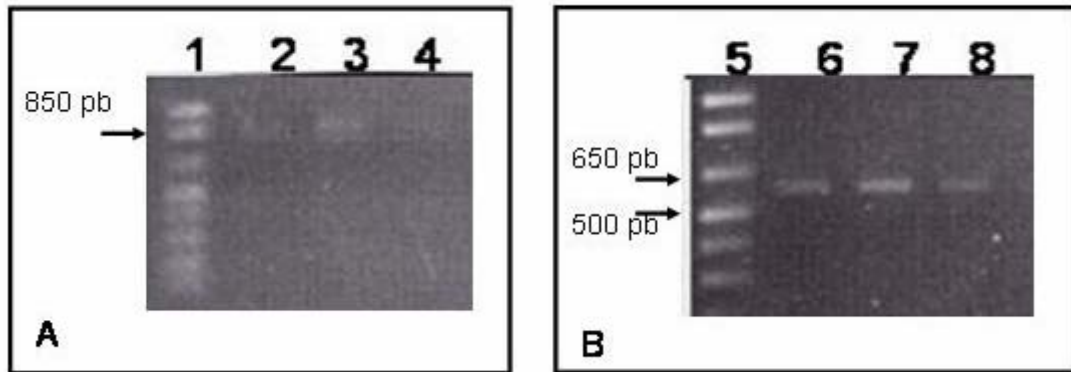


Figura 21.- Amplificación por PCR de las secuencias intergénicas del gen 16S-23S DNAr de las fracciones de los gradientes de Percoll. En (A) son muestras de ovarios y en (B) son muestras de glándulas salivales.

5.9 Análisis de las cruzas

Los estudios de la progenie de las diferentes cruzas de *T. pallidipennis* con *T. longipennis* mediante el análisis de las secuencias intergénicas, revelaron la presencia de *Arsenophonus*. En las figuras 22 y 24 se observan las bandas obtenidas de la amplificación de dichas secuencias mediante PCR. Se usaron los oligonucleótidos específicos diseñados para revelar *Arsenophonus*. Se observó que de aproximadamente un 60% de las muestras que amplificaron, aproximadamente en un 33% de éstas, nos da positivo para la presencia de *Arsenophonus* en los ovarios y un 25% en las glándulas salivales (figuras 23 y 25). El tamaño de las bandas obtenidas de la amplificación por PCR con los diferentes grupos de oligonucleótidos, muestran un tamaño de alrededor de 800 a 860 pb y 650 pb para el grupo If y grupo If respectivamente.

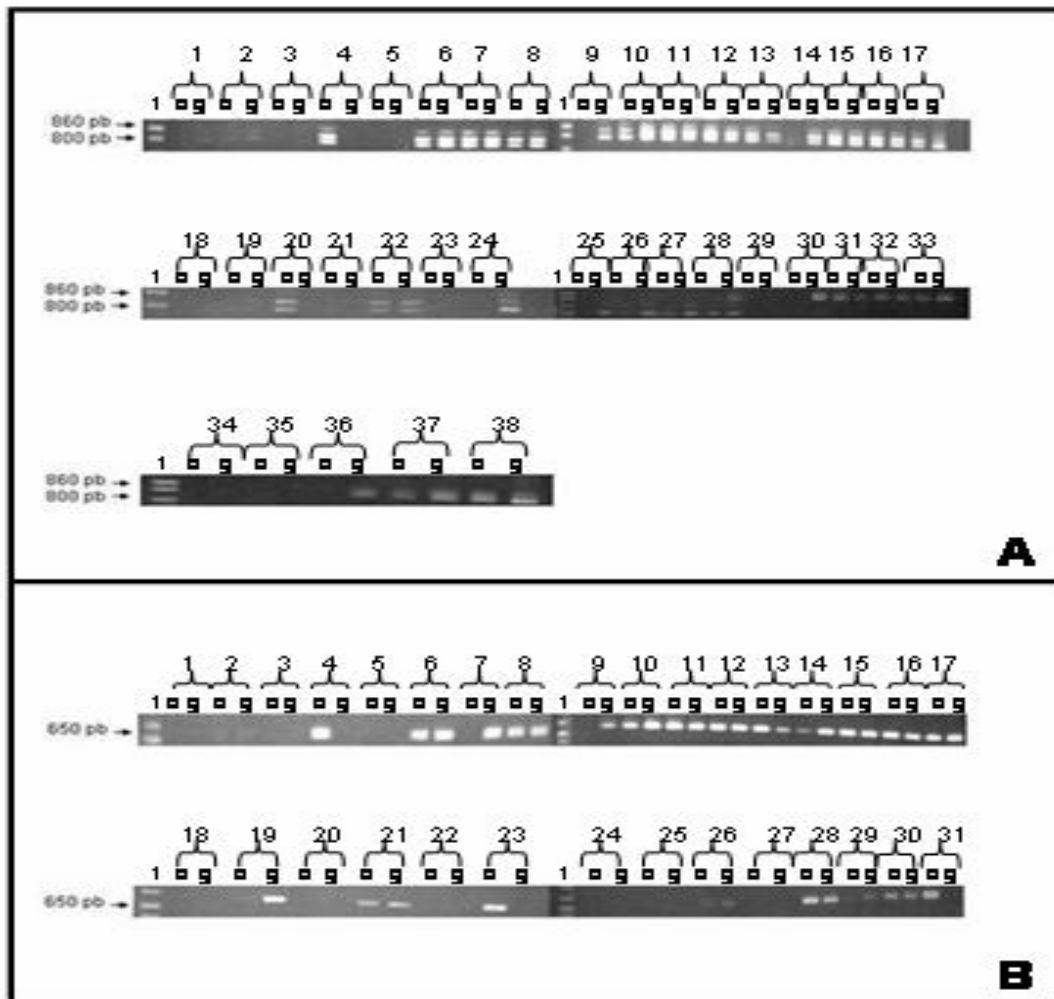


Figura 22.- Amplificación de las secuencias intergénicas del gen 16S-23S DNAr mediante PCR. Cruza 1 (macho *T. longipennis* - hembra *T. pallidipennis*). En (A) se observan las muestras amplificadas con los oligonucleótidos del grupo If (5' TGT-CGC-GGT-GAA-TAC-GTT 3' y 5' CCG-GGT-TTC-CCC-ATT-CGG 3'), se obtuvieron bandas de 800 a 860 pb. En (B) se observan las muestras amplificadas con los oligonucleótidos del grupo IIc (5' GCG-CGT-AAA-GCC-AAT-CTA 3' y 5' CCG-GGT-TTC-CCC-ATT-CGG 3') y se obtuvieron bandas de alrededor de 650 pb. Los

números representan el número de individuos. Las letras denotan a que tejido pertenece, (o) ovario y (g) glándulas salivales.

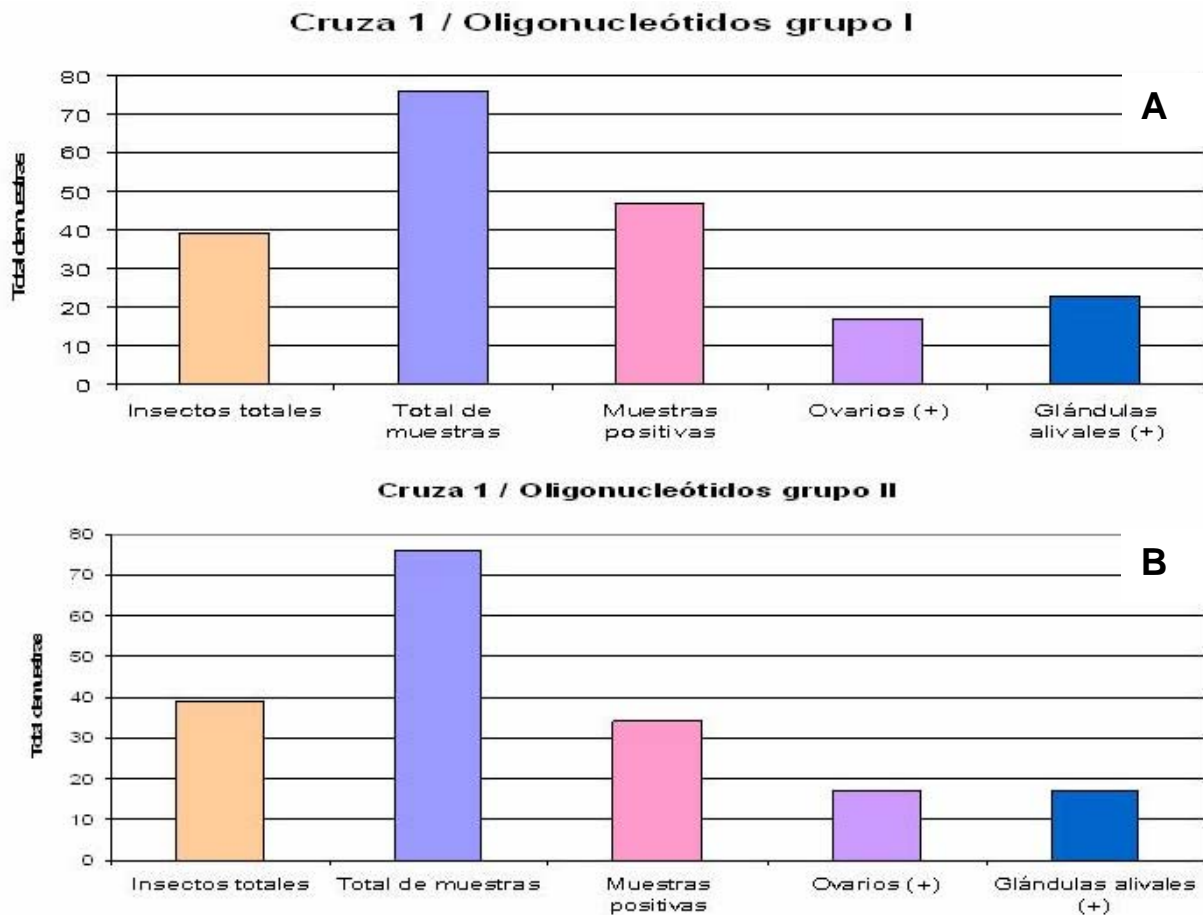


Figura 23.- Análisis gráfico de la cruce 1 (macho *T. longipennis* - hembra *T. pallidipennis*). En (A) se observa que de los 39 insectos se obtuvieron 76 muestras de DNA total, tanto de ovarios como de glándulas salivales. Las muestras se amplificaron con los oligonucleótidos de grupo I. Se obtuvo que 17 muestras de DNA total de ovarios amplificaron exitosamente. De las muestras de DNA total de glándulas salivales 23 amplificaron exitosamente. En (B) se observa que del total de las muestras obtenidas de los 39 insectos, amplificadas con los oligonucleótidos del

grupo If. Se obtuvo que 17 muestras de DNA total de ovarios amplificaron exitosamente al igual que 17 de muestras de DNA total de glándulas salivales.

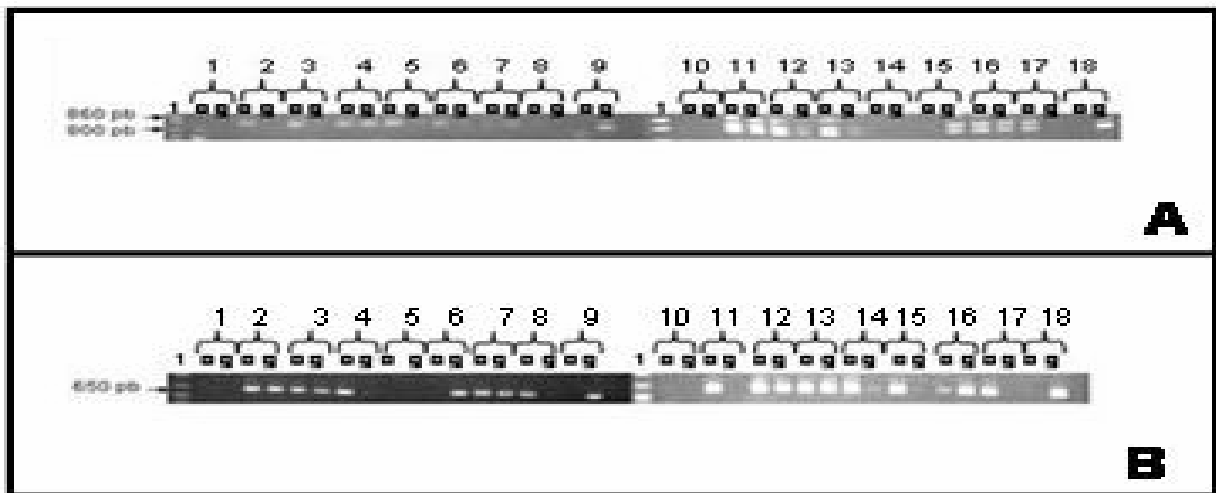


Figura 24.- **Amplificación de las secuencias intergénicas del gen 16S-23S DNAr mediante PCR. Cruza 2 (hembra *T. longipennis* - macho *T. pallidipennis*).** En (A) se observan las muestras amplificadas con los oligonucleótidos del If (5`TGT-CGC-GGT-GAA-TAC-GTT 3` y 5`CCG-GGT-TTC-CCC-ATT-CGG 3`), se obtuvieron bandas de 800 a 860 pb. En (B) se observan las muestras amplificadas con los oligonucleótidos del grupo IIf (5`GCG-CGT-AAA-GCC-AAT-CTA 3` y 5`CCG-GGT-TTC-CCC-ATT-CGG 3`) y se obtuvieron bandas de alrededor de 650 pb. Los números representan el número de individuos. Las letras denotan a que tejido pertenece, (o) ovario y (g) glándulas salivales.

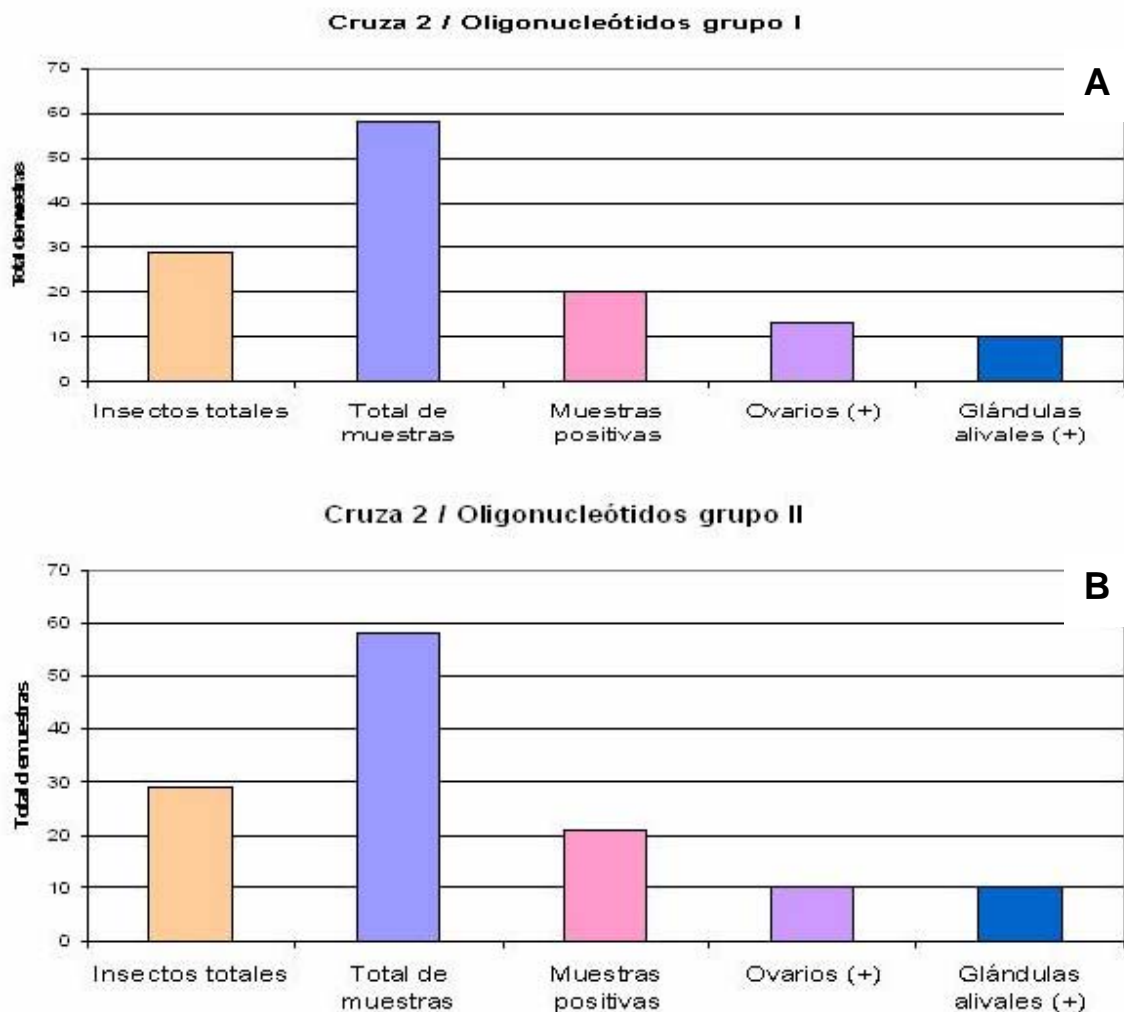


Figura 25.- **Análisis gráfico de la craza 2 (hembra *T. longipennis* - macho *T. pallidipennis*).** En (A) se observa que de los 29 insectos se obtuvieron 58 muestras de DNA total, tanto de ovarios como de glándulas salivales. Las muestras se amplificaron con los oligonucleótidos de grupo I. Se obtuvo que 13 muestras de DNA total de ovarios amplificaron exitosamente. De las muestras de DNA total de glándulas salivales 10 amplificaron exitosamente. En (B) se observa que del total de

las muestras obtenidas de los 29 insectos amplificadas con los oligonucleótidos del grupo If. Se obtuvo que 10 muestras de DNA total de ovarios amplificaron exitosamente al igual que 10 de las muestras de DNA total de glándulas salivales.

6. Discusión

Los resultados obtenidos del análisis de las secuencias del gen 16S DNAr revelaron la existencia de un endosimbionte presente en diversos tejidos del insecto triatómino; se encontró la presencia de *Arsenophonus* en los ovarios y en las glándulas salivales. Sin embargo el alto grado de conservación de los genes ribosomales, no permiten revelar diferencias entre bacterias cercanamente relacionadas; por esto, que una vez delimitado el grupo bacteriano en cuestión, se realizaron análisis más finos, usando secuencias que cambian rápidamente y que permiten distinguir poblaciones. En este tipo de enfoque se utilizan genes que codifiquen para proteínas o regiones intergénicas. Los oligonucleótidos específicos diseñados para establecer filogenias para *Arsenophonus* fueron las secuencias intergénicas del gen 16S-23S DNAr. Para llevar a cabo su diseño se basó en las secuencias de los bancos de datos reportados para otros *Arsenophonus*. Los nuevos oligonucleótidos se probaron con diferentes microorganismos para asegurar su especificidad y se observó que no revelaron productos en cepas de *E. coli* (en este caso la cepa W3110), ni en bacterias de los géneros *Rhizobium*. Con los nuevos oligonucleótidos, se observó que los linajes de *Arsenophonus* de los triatóminos, no se mezclan; con los de mosquita blanca, garrapata de perro, ni con los de la avispa parasitoide. Los análisis filogenéticos muestran que existe una diferencia entre los *Arsenophonus* encontrados en *T. pallidipennis* y *T. longipennis* tanto en las glándulas salivales como en los ovarios del insecto; aún de la misma

especie. Sin embargo, este juego de oligonucleótidos específicos no está diseñado para ver la diferencia entre los *Arsenophonus* de cada uno de los tejidos. Los oligonucleótidos en este caso fueron diseñados para demostrar la presencia de diferentes *Arsenophonus*. Se observa que *Arsenophonus*, se encuentra presente en otros insectos, es decir presenta un amplio rango de distribución de hospedero. Sin embargo y a pesar de la amplia distribución de los miembros del grupo de *Arsenophonus*, poco se sabe sobre su verdadero papel en el contexto de la simbiosis; pero es muy probable, que jueguen un papel importante dentro del insecto. A la fecha, no se cuenta con evidencia suficiente que indique, si estos endosimbiontes realmente afectan directamente la fisiología o la capacidad de los insectos triatominos para realizar un adecuado desarrollo y crecimiento.

De acuerdo a los datos reportados se esperaba que el tamaño del genoma de *Arsenophonus* fuera altamente reducido, en comparación con los genomas de sus parientes de vida libre y que fuera similar al tamaño de genomas tales como el de los genomas de *Buchnera* o *Wigglesworthia*. Con el uso de microarreglos heterólogos de *E. coli* K-12, se pudo obtener información sobre los genes presentes y/o ausentes en el genoma del endosimbionte. Si embargo, estos datos tienen que ser tomados con precaución, ya que puede existir alguna homología en las secuencias con pseudogenes y estos pueden dar lugar falsos negativos o positivos. La ventaja del uso de los microarreglos es que proporciona un acercamiento para conocer rápidamente acerca de la posible biología de los endosimbiontes. De la hibridización realizada con las muestras de DNA total, proveniente tanto de las glándulas salivales como de los ovarios que revelan *Arsenophonus*, se encontró que alrededor de 3000 genes hibridan con los genes de *E. coli*. Esto concuerda con el

tamaño del genoma de *Arsenophonus* de mosca 3.5 Mega-pares de bases (Mpb), estimado en base a estudios de electroforesis de campos pulsados (61). Es sorprendente el tamaño tan grande de los genomas de *Arsenophonus* de los triatomíneos y de los *Arsenophonus* de la mosca; ya que estos son semejantes en tamaño a los de bacterias de vida libre.

El tamaño del genoma pudiera indicar que la relación *Arsenophonus*-insecto, no es una relación tan antigua como la de los endosimbiontes primarios. La bacteria no ha tenido una larga adaptación en el insecto y por lo tanto no tiene como consecuencia una pérdida importante del genoma, para mantener sólo la información que la bacteria necesita en el insecto.

El que *Arsenophonus* no crezca en medios donde crecen bacterias de vida libre, indica que estas bacterias van en camino de especializarse. Es probable que este endosimbionte se encuentre en las primeras etapas de una evolución reductiva de su genoma, en la cual se está llevando a cabo la pérdida substancial de genes; cabe resaltar que en los genomas reducidos, la tasa de mutación es mucho más elevada que en las bacterias de vida libre y es probable que en un cierto plazo, la acumulación de mutaciones pueda afectar la habilidad del endosimbionte y esto pudiera tener implicaciones fenotípicas importantes, trayendo como consecuencia la irreversibilidad de regresar a su estado de vida libre. Esto puede explicar la razón de encontrarse obligados a vivir en células eucariontes y por lo tanto, su cultivo en medios de laboratorio sea tan difícil de llevar a cabo (62, 63). A pesar de la pérdida severa de genes en la mayoría de los genomas de los endosimbiontes existe un proceso de selección y conservación de genes, con funciones específicas que son importantes para la supervivencia y la reproducción del insecto (65).

El que *Arsenophonus* se encuentre presente tanto en triatominos de Sudamérica como en México sugiere que esta bacteria ha estado desde el ancestro de estos triatominos, sin embargo, los análisis de las secuencias del gen 16S DNAr, muestran que las bacterias de *Arsenophonus* de los triatominos de América del Sur y de los triatominos de México no son idénticas, por lo que es posible que los triatominos sean susceptibles a la infección con cierto tipo de *Arsenophonus* y por tanto sea muy frecuente encontrarlo en ellos como encontramos *E. coli* y *Bacteroides* en el intestino de humanos.

Este estudio acerca de los endosimbiontes bacterianos de triatominos, puede ser un pieza clave para llevar a cabo la generación de insectos diseñados para que limiten el desarrollo de parásitos como *T. cruzi*. Es factible que si se altera genéticamente al endosimbionte, de manera que lleven un producto genético que sea letal para el patógeno, entonces el insecto en algún momento podría eliminarlo y con ello contribuir al control de la enfermedad de Chagas.

7. Conclusiones

Se presentó evidencia de la presencia en especies de triatomíneos de México de un endosimbionte, el cual pertenece al género *Arsenophonus*. De acuerdo a los análisis de las secuencias intergénicas del gen 16S-23S DNAr, se observaron diferentes linajes de *Arsenophonus*. Además de que los *Arsenophonus* de los triatomíneos de México, no son idénticos a los *Arsenophonus* de los triatomíneos de América del Sur.

Los estudios realizados, muestran que el tamaño del genoma de *Arsenophonus* es muy cercano al tamaño de *E. coli*. Sin embargo a pesar de la gran similitud en tamaño, *Arsenophonus* es difícil de cultivarse en medios de laboratorio definidos, lo cual pudiera indicar que ya ha perdido genes esenciales para poder vivir fuera de su hospedero insecto.

Con éste estudio se proporcionó nuevo conocimiento científico, ya que con la disponibilidad del mismo estamos generando una plataforma para explorar las asociaciones entre *Arsenophonus* y los insectos, con lo cuál, en un futuro pueda ser usado para el control de la enfermedad de Chagas, además de que se puede extrapolar este tipo de enfoques para llevar a cabo el control de otros insectos portadores de patógenos.

8. Perspectivas

Será de interés continuar este estudio con técnicas de hibridación “*in situ*” con sondas específicas fluorescentes (FISH) para determinar si las bacterias observadas en los tejidos de las glándulas salivales son *Arsenophonus*.

Se ha discutido que los endosimbiontes pudieran participar en la diferenciación en los estados larvarios y que pudieran tener diferentes patrones de expresión en el tiempo por tanto, sería deseable estudiar la expresión de *Arsenophonus*, no sólo en el insecto adulto sino también en las pupas.

9. Referencias

1. Woyke T, Teeling H, Ivanova N N, Huntemann M, Richter M, Boffelli D, Anderson I J, Barry K W, Shapiro H J, Szeto E, Kyrpides N C, Mussmann M, Amann R, Bergin C, Ruehland C, Rubin E M, Dubilier N. Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium *Nature* 2006, 443(7114):950-955.
2. Carcavallo R U, Jurberg J, Lent H, Noireau F, Galvao C. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera :Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomol Vectores*, 2000, 7 (1) :1-99.
3. Chen D Q, Purcell A H. Occurrence and transmission of facultative endosymbionts in aphids. *Curr Microbiol* 1997, 34: 220-225
4. Dujardin J P, Steindel M, Chávez T, Martínez E, Schofield C J. Changes in the sexual dimorphism of Triatominae in the transition from natural to artificial habitats. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* , 1999, 94: 565-569.
5. Dujardin J P, Panzera F, Schofield C J. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 94(1): 223-228.
6. Crossa R P, Hernández M, Caraccio M N, Rose V, Valente S A S. Chromosomal evolution trends of the genus *Panstrongylus* (Hemiptera:

- Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Infect Genet Evol* 2002, 2 (1): 47-56.
7. Cave R D. Biology, ecology and use in pest management of *Telenomus remus*. *Biocontrol* 2000, 21 (1): 21N-26N.
 8. Zarate L G, Zarate R A. Checklist of the triatominae (Hemiptera: Reduviidae) of Mexico. *Int J Entomol* 1985, 27:102-27.
 9. Velasco-Castrejón O, Guzmán-Bracho C. Importancia de la Enfermedad de Chagas en México. *Rev Lat Amer Microbiol* 1986, 28:275-83.
 10. Gloss G, Barrera M R, Reyes P A. American trypanosomiasis and chronic Chagas cardiopathy at the "Ignacio Chávez" National Institute of Cardiology. *Arch Inst Cardiol Mex.* 1990, 60(3): 261-266.
 11. Ramsey J, Ordóñez R, Cruz-Celis A, Alvear AL, Chávez V, López R, Pintor JR, Gama F Carrillo S. Distribution of domestic Triatominae and stratification of Chagas disease transmission in Oaxaca, México. *Med Vet Entomol* 2000,14:19-30.
 12. Guzmán-Marín E. Los transmisores de la enfermedad de Chagas. *Rev. Biomed I.* 1990, 144-153.
 13. Magallón-Gastélum E, Magdaleno-Peñaloza N C, Katthain-Duchateau G, Trujillo-Contreras F, Lozano-Kasten F J, Hernández-Gutiérrez R J.

Distribución de los vectores de la enfermedad de Chagas (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), en el estado de Jalisco, México. Rev. Biomed 1998, 9:151-157.

14. Cortés-Jiménez M, Noguera-Torres B, Alejandro-Aguilar R, Isita-Tornell L, Ramírez-Moreno E. Frequency of triatomines infected with *Trypanosoma cruzi* collected in Cuernavaca city, Morelos, México. Rev Latinoam Microbiol 1996, 8:115-119.

15. Ramsey J M, Alvear A L, Ordóñez R, Muñoz G, García A, López R, Leyva R Risk factors associated with house infestation by the Chagas disease vector *Triatoma pallidipennis* in Cuernavaca metropolitan area, Mexico. Med Vet Entomol 2005,19:219-228.

16. Ishikawa H. Insect symbiosis: An introduction. In: Miller TA, editor. Insect symbiosis Boca Raton, Florida 2003, CRC Press. 1–21.

17. Douglas A E. Mycetocyte symbiosis in insects. Biol Rev Camb Philos Soc 1989, 64: 409-434.

18. Moran N A, Baumann P. Bacterial endosymbionts in animals. Curr Opin Microbiol 2000, 3:270-275.

19. Moran N A, Telang A. Bacteriocyte-associated symbionts of insects: a variety of insect groups harbor ancient prokaryotic endosymbionts. BioScience 1998, 48: 295-304.

20. Zientz E, Silva F, Gross R. Minireview. Genome interdependence in insect-bacterium symbioses. *Gen Biol* 2001, 2(12): 1-6.
21. Gherma R L, Werren J H, Weisburg W, Cote R, Woese C R, Mandelco L, Brenner D J. *Arsenophonus nasoniae* gen. nov., sp. nov., the causative agent of the son-killer trait in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 41: 563-565.
22. Aksoy S. Tsetse - a haven for microorganisms. *Parasitol Today* 2000, 16: 114-118.
23. Campell B C, Bragg T S, Turner C E. Phylogeny of symbiotic bacteria of fur weevil species (Coleoptera: Curculionidae) based on analysis of 16S ribosomal RNA. *Insect Biochem Mol Biol* 1992, 22: 415-421.
24. Cheng Q, Aksoy S. Tissue tropism, transmission and expression of foreign genes *in vivo* in midgut symbionts of tsetse flies. *Insect Mol Biol* 1999, 8(1):125-132.
25. Dale C, Maudlin. *Sodalis* gen. nov. and *Sodalis glossinidius* sp. nov., a microaerophilic secondary endosymbiont of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Int J Syst Bacteriol* 1999, 49: 267-275.

26. Aksoy S, Chen X, Hypsa V. Phylogeny and potential transmission routes of midgut-associated endosymbionts of tsetse (Diptera:Glossinidae). *Insect Mol Biol* 1997, 6:183-190.
27. Dale C, Welburn S C. The endosymbionts of tsetse flies: manipulating host-parasite interactions. *Int J Parasitol* 2001, 31: 628-631.
28. Wernegreen J J. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature*, 2002, 3: 850-861.
29. Sandström J P, Rusell J A, White J P, Moran N A. Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. *Mol Ecol* 2001, 10: 217-228.
30. Moran NA, Telang A: Bacteriocyte-associated symbionts of insects: a variety of insect groups harbor ancient prokaryotic endosymbionts. *BioScience* 1998, 48:295-304.
31. Moran N A, Dale C , Dunbar H, Smith W A, Ochman H. Intracellular symbionts of sharpshooters (Insecta: Hemiptera: Cicadellinae) form a distinct clade with a small genome. *Environ Microbiol* 2003, 5:116-126.
32. Moran N A. Bacterial menageries inside insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:1338-1340.

33. Russell J A, Latorre A, Sabater-Muñoz B, Moya A, Moran N A. Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Mol Ecol* 2003, 12: 1061-1075.
34. Fukatsu T, Ishikawa H. Phylogenetic position of yeast-like symbionts of *Hamiltonaphis styrace* (Homoptera, aphidinae) based on 18S rDNA sequence. *Insect Biochem Mol Biol* 1996, 26: 383-388.
35. Munson M A, Baumann P, Kinsey M G. *Buchnera* gen nov and *Buchnera aphidicola* sp nov; a taxon consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of aphids. *Int J Syst Bacteriol* 1991, 41:556-568.
36. Koga R, Tsuchida T, Fukatsu T. Changing patterns in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proc R Soc London B* 2003, 270:2543-2550.
37. Aksoy S. *Wigglesworthia* gen nov and *Wigglesworthia glossinidia* sp nov, Taxa consisting of the mycetocyte associated, primary endosymbionts of tsetse flies. *Int J. Syst Bact.* 1995, 45: 848-851.
38. Baumann P, Baumann L, Lai C Y, Rouhbasksh D, Moran N A, Clark M A. Genetics physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: Intracellular symbionts of aphids. *Annu Rev Microbiol* 1995, 49: 55-94.

39. Spaulding A W, von Dohlen C D. Psyllid endosymbionts exhibit patterns of co-speciation with hosts and destabilizing mutations in ribosomal RNA. *Insect Mol Biol* 2000, 10:57-67.
40. Sauer C, Stackebrandt E, Gadau J, Hölldobler B, Gross R. Systematic relationships and cospeciation of bacterial endosymbionts and their carpenter ant host species: proposal of the new taxon *Candidatus Blochmannia* gen nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000, 50:1877-1886.
41. Chen X, Li S, Aksoy S. Concordant evolution of a symbiont with its host insect species: molecular phylogeny of genus *Glossina* and its bacteriome associated endosymbiont, *Wigglesworthia glossinidia*. *J Mol Evol* 1999, 48:49-58.
42. Moran N A, Munson M A, Baumann P, Ishikawa H. A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect host. *Proc R Soc London B* 1993, 253: 167-173.
43. Douglas A E. Mycetocyte symbiosis in insects. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1989, 64: 409-434.
44. Ochman H, Elwyn S, Moran N A. Calibrating bacterial evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:12638-12643.

45. Buades C, Michelena J M, Latorre A, Moya A. Accelerated evolution in bacterial endosymbionts of aphids. *Int Microbiol* 1999, 2:11-14.
46. Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M, Sakaki Y, Ishikawa H. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera sp* APS. *Nature* 2000, 407:81-86.
47. Tamas I, Klasson L M, Sandström J P, Andersson S G. Mutualists and parasites: how to paint yourself into a (metabolic) corner. *FEBS Lett* 2001, 498:135-139.
48. Andersson J O. Is *Buchnera* a bacterium or an organelle? *Curr Biol* 2000, 10:R866-R868.
49. Silva F, Latorre A, Moya A. Genome size reduction through multiple events of gene disintegration in *Buchnera* APS. *Trends Genet* 2000, 9: 615-618.
50. Klasson L, Siv G, Anderson E. Evolution of minimal-gene-sets in host-dependent bacteria. *Trends Microbiol* 2004, 12: 37-43.
51. Maidak B L, Cole J R, Parker C T, Garrity G M, Larsen N, Li B, Liburn T G, McCaughey M J, Overbeek R, et al: A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucl Acids Res* 1999, 27:171-173.

52. Lane D, Pace B, Olsen G, Stahl D, Sogin M., Pace N. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, 82: 6955-6959.
53. Nogge G. Significance of symbionts for the maintenance of an optimal nutritional state for successful reproduction in hematophagous arthropods. *Parasitology* 1981, 82:101-104.
54. Akman L, Aksoy S. A novel application of gene arrays: *Escherichia coli* array provides insight into the biology of the obligate endosymbiont of tsetse flies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98(13): 7546–7551.
55. Beard C B, Durvasula R V, Richards FF. Bacterial Symbiont Transformation in Chagas Disease Vectors. In: *Insect Transgenesis*. CRC Press, Boca Raton, Florida 289-303, 2000.
56. Eichler S, Schaub A G. Development of symbionts in Triatomine bugs and the effects of infections with Trypanosomatides. *Experimen Parasitol* 2002, 100: 17-27.
57. Acha P N, Szyfres B. Zoonosis y Enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. OPS/OMS Publicación científica N° 503 1986, 763-774.

58. Zeledon R, Rabinovich J E. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annu Rev Entomol.* 1981, 26:101-33.
59. Norichika-Moriwaki N, Matsushita K, Nishina M, Matsuda K, Kono Y. High myo-inositol concentration in the hemolymph of planthoppers. *Appl Entomol Zool* 2003, 38 (3): 359-364.
60. Thompson S N. Trehalose - the insect blood sugar. *Adv Insect Physiol* 2003, 31:205-285.
61. Dale C, Beeton M, Harbison C, Jones T, Pontes M. Isolation, Pure Culture, and Characterization of *Candidatus Arsenophonus arthropodicus*, an intracellular secondary endosymbiont from the hippoboscid louse fly *Pseudolynchia canariensis*. *App Env Microbio*, 2006, 72(4): 2997-3004.
62. Moran N A, Wernegreen J J. Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: insights from genomics. *Trends Ecol Evol* 2000, 15:321-326.
63. Ochman H, Moran N A. Genes lost and genes found: the evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* 2001, 292: 1096-1098.
64. Andersson J O, Andersson S G. Insights into the evolutionary process of genome degradation. *Curr Opin Genet Dev* 1999, 9:664-671.

65. Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M, Sakaki Y, Ishikawa H. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. Nature 2000, 407:81–86.
66. Tamas I, Klasson L, Canbäck B, Naslund A K, Eriksson A S, Wernegreen J, Sandstrom J P, Moran N A, Andersson S G. 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. Science 2002, 296:2376–2379.
67. van Ham R C, Kamerbeek J, Palacios C, Rausell C, Abascal F, Bastolla U, Fernández J M, Jiménez L, Postigo M, Silva F J, Tamames J, Viguera E, Latorre A, Valencia A, Morán N A, Moya A. Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(2):581-586.
68. Hysa V. Endosymbionts of *Triatoma infestans*: distribution and transmission. J Invertebr Phatol 1993, 61:32-38.
69. Gil R, Silva F J, Zientz E, Delmotte F, Gonzalez-Candelas F, Latorre A, Rausell C, Kamerbeek J, Gadau J, Holldobler B, van Ham R C, Gross R, Moya A. The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: comparative analysis of reduced genomes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003, 100(16): 9388-9393.

70. Wernergreen J J, Degnan P H, Lazarus A B, Palacios C, Bordestein S R. Genome Evolution in an Insect Cell: Distinct Features of an Ant-Bacterial Partnership. *Biol Bull* 2003, 204: 221-231.
71. Beard C B, Mason P W, Aksoy S, Tesh R B, Richards F F. Transformation of an insect symbiont and expression of foreign gene in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *Am J Trop Med Hyg* 1992, 46: 195-200.
72. Ramsey J, Tello L A, Pohls J L. Iniciativa para la vigilancia y control de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Instituto Nacional de Salud Pública* 2003, 85-103, 130.
73. Campaña Panafricana de Erradicación de la Mosca tsetse y de la tripanosomiasis. *OMS* 2002, 1-4.

1. Anexos

Extracción de DNA con el “Kit de Amersham Biosciences; Genomic prep. cells and tissue DNA isolation kit”

1. Resuspender los tejidos disectados en 600 μ l de solución de lisis e incubarlos durante 60 min a 65°C.
2. Sacar la muestra de la incubadora y dejar enfriar a temperatura ambiente.
3. Añadir 3 μ l de proteinasa K (20 mg/ml).
4. Incubar a 55°C.
5. Enfriar la muestra a temperatura ambiente y agregar 3 μ l de RNAsa (20 mg/ml).
6. Mezclar la muestra por inversión 25 veces e incubar 60 min a 37°C.
7. Enfriar la muestra a temperatura ambiente, añadir 200 μ l de solución de precipitación de proteína.
8. Mezclar vigorosamente con vórtex para homogenizar la muestra con la solución de precipitación.
9. Centrifugar a 13,000 rpm durante 5 min.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml limpio y añadir 600 μ l de isopropanol.
11. Mezclar la muestra por inversión hasta observar el DNA.
12. Centrifugar a 13,000 rpm durante 5 min.
13. Eliminar el sobrenadante y añadir 600 μ l de etanol al 70%.
14. Centrifugar a 13,000 rpm durante 5 min.
15. Eliminar el sobrenadante y secar el tubo que contiene la muestra.
16. Agregar 50 μ l de solución de hidratación.
17. Incubar durante 60 min a 65°C.

Electroforesis en geles de agarosa

1. Fundir agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X.
2. Colocar el peine y verter la agarosa a la cámara, dejar solidificar.
3. Quitar el peine y cubrir con amortiguador TAE 1X.
4. Agregar a las muestras de DNA colorante y cargar el gel junto con el marcador de peso molecular
5. Colocar los electrodos con el negativo en el mismo lado que las muestras y correr a un voltaje de 2-5 v/cm hasta que el colorante este próximo a salir.
6. Sacar el gel y colocarlo en una solución de bromuro de etidio 10 mg/mL.
7. Lavar el gel dos veces con agua corriente durante 10 min. en cada proceso de lavado.
8. Observar en un transiluminador de luz UV.

Hibridación DNA - DNA (Southern blot)

1. Correr las muestras de interés en geles de agarosa al 1%.
2. Tomar una foto para poder identificar posteriormente las muestras.
3. Adicionar 250 mL de solución de HCl 0.25 N al gel de agarosa y agitar durante 15 min.
4. Desechar la solución y volver a añadir 250 ml de solución de HCl 0.25 N y agitar durante 15 min.
5. Desechar y lavar con H₂O destilada.
6. Desnaturalizar el DNA con 500 ml de NaOH 0.5 N, agitar durante 45 min.
7. Desechar y lavar con agua destilada.
8. Adicionar 300 ml de SSC 6X al gel.
9. Incubar durante 10 min a temperatura ambiente.

10. Transferir el DNA del gel de agarosa desnaturalizado a membranas de nylon.
11. Poner una palangana con 250 ml de SSC + 250 ml de H₂O destilada.
12. Preparar un soporte para el gel de transferencia con papel Whatman, lo suficientemente largo de manera que tenga contacto con la solución.
13. Se pone el gel de agarosa desnaturalizado y se cubre con la membrana de nylon.
14. Poner nuevamente un poco de papel Whatman
15. Cubrir con papel absorbente y apoyarse con un objeto sólido y pesado para que se lleve a cabo la transferencia. Dejar toda la noche
16. Una vez que se ha llevado a cabo la transferencia se pone la membrana en 0.1x SSC (0.1%, SDS/ 50 mM Tris-Cl pH 7.5) durante 5 minutos.
17. Se verifica que en el gel de agarosa no haya quedado una cantidad significativa de DNA y con ello asegurar que la transferencia fue correcta.
18. Secar la membrana de nylon y posteriormente exponerla a luz UV durante 1 min.

Marcaje de la sonda

1. Diluir el DNA que va a ser marcado a una concentración de 2.5-25ng en 45µl de buffer TE.
2. Desnaturalizar la muestra de DNA calentándolo a 95-100°C durante 5 min.
3. Pasar el tubo que contiene la muestra desnaturalizada a hielo durante 5 minutos.
4. Centrifugar 30 segundos.
5. Añadir el DNA desnaturalizado al tubo de reacción.
6. Añadir 5µl de Redivue [³²P] dCTP y mezclar suavemente.

7. Incubar a 37°C durante 10 minutos exactos.

Hibridización

1. Introducir la membrana en una botella de hibridación y realizar una prehibridización durante una hora a 65°C con 10 ml de solución de hibridización.
2. Añadir la [sonda marcada](#) directamente sobre la solución de hibridización.
3. Dejar hibridizar toda la noche a 65 °C.

Lavado de la membrana

1. Pasar la membrana a una bandeja con 200 ml de la primera solución de lavado:
 - 4 gramos de SDS
 - 25 ml de 20xSSC
 - Aforar a 1L con agua destilada.
2. Cubrir la membrana e incubar con agitación a 65°C durante 10 minutos.
3. Repetir el lavado del paso 1 durante 10 minutos más con solución nueva.
4. Pasar la membrana a una bandeja nueva con 200 ml de 2XSSC.
5. Cubrir la membrana e incubar a temperatura ambiente y con agitación durante 5 minutos.
6. Repetir el lavado del paso 4 durante otros 5 minutos con 2xSSC de nuevo.

Detección de la hibridación

1. Mezclar 5 ml de reactivo de revelado con 5 ml de reactivo de detección N°2 (Luminol).
2. Pasar la membrana a una bandeja limpia e incubar durante 1 minuto exacto con la solución de detección (a temperatura ambiente).
3. Pasar la membrana a un cassette de exposición de Rayos X, ponerla entre dos trozos de papel y colocar en oscuridad una película Hyperfilm™ ECL (Amersham) sobre ella.
4. Cerrar el cassette y esperar aproximadamente 4 hrs.
5. Transcurrido este tiempo, en oscuridad, revelar la película con revelador de fotografía (dilución 1/10) y fijar con fijador de fotografía (dilución 1/4).

Amplificación de DNA total con “Kit-Genomiphi, Amersham Biosciences”

1. Mezclar 1µL del templado con 9 µL del buffer de muestra
2. Calentar a 95°C durante 3 min.
3. Enfriar en hielo.
4. Preparar 9µL de buffer de reacción con 1µL de enzima mix.
5. Agregar mezcla a la muestra con el templado.
6. Incubar a 30°C durante toda la noche.
7. Inactivar la enzima a 65°C durante 10 min.
8. Almacenar a 4°C.

Clonación en el Vector “TOPO TA cloning Amersham Bisciencias”

1. Mezclar 4µl del producto de PCR con 1µl de solución SALT y 1µl del vector TOPO
2. Incubar durante 1 hr a temperatura ambiente.
3. Agregar a células competentes la mezcla de reacción.
4. Dejar en hielo durante 30 min.
5. Incubar durante 2 min. a 42°C.
6. Añadir 300 µl de LB.
7. Incubar durante 1 hr a 37°C con agitación.
8. Sembrar en cajas de LB-Km-Cb-IPTG-Xgal.
9. Incubar a 37°C toda la noche.

Gradientes de Percoll

1. Preparar la mezcla del gradiente y poner 35 ml en cada tubo. Perfectamente balanceados y almacenados en hielo.
2. Macerar los tejidos en un mortero.
3. Filtrar en toallas con PBS frío.

-150 mM NaCl

-50 mM KH_2PO_4 ; pH 7 con KOH

Componentes de los gradientes

-3.5 ml de 0.5M de KH_2PO_4

-1.5 M de NaCl

-24.5 ml de Percoll

-7ml de H_2O

Amortiguador TE

-Hidroxi-metil-amino-metano (trizmabase) 10 mM pH 7.6

-Ácido-tilendiaminotetracético (EDTA) 1 mM pH 8.0.

Amortiguador TAE (50X, 1 L)

-Tris base 242 g

-Acético glacial 57.1 ml

-EDTA pH 8 100 ml de 0.5 M

Bromuro de Etidio 10mg/ml

-Disolver en 100 ml de agua 1g de bromuro de etidio.

-Almacenar a 4 grados.

RNAsa

-Ribonucleasa pancreática a 10 mg/ ml.

-Acetato de sodio 100 mM.

-EDTA 0.3 mM. Se lleva a pH 4.8.

-Calentar a 80°C por 10 min.

Medio Luria-Bertani (1L)

-Bacto triptona 10 g

-Extracto de levadura 5 g

-NaCl 5 g

-Esterilizar en autoclave 20 min a 15 lb 7inch.

Carbenicilina (Cb):

-Disolver 500 mg en 5 ml de agua bidestilada (100 mg/ml final).

-Filtrar con millipore de 0.45 μ m.

-Almacenar a -20°C.

Kanamicina (Km):

-Disolver 250 mg en 5 ml de agua bidestilada (50 mg/ml).

-Filtrar con millipore de 0.45 μ m.

-Almacenar a -20°C

IPTG

-Disolver 250 mg por cada ml H₂O destilada.

Xgal

-Disolver 20 mg por cada ml de DMSO.

Digestión con enzimas de restricción

DNA de interés 8 μ l

Buffer 10X enzima de restricción "X" 1 μ l

Enzima de restricción "X" 1 U/ μ g DNA

H₂O 10 μ l

Incubar 2 horas a 37°C.