

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Caracterización de la motilidad de ninfas y la proteína Rhodnius Heme-Binding Protein (RHBP) en la hemolinfa de hembras de *Rhodnius prolixus* Stahl 1859, alimentadas con bacterias productoras de ARN doble hebra del gen de RHBP.

Trabajo de graduación presentado por

Hugo Diego Perdomo Contreras

para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2013



Caracterización de la motilidad en ninfas y de la proteína Rhodnius Heme-Binding Protein (RHBP) en la hemolinfa de hembras de *Rhodnius prolixus* Stahl 1859, alimentadas con bacterias productoras de ARN doble hebra del gen de RHBP.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Caracterización de la motilidad de ninfas y la proteína Rhodnius Heme-Binding Protein (RHBP) en la hemolinfa de hembras de *Rhodnius prolixus* Stahl 1859, alimentadas con bacterias productoras de ARN doble hebra del gen de RHBP.

Trabajo de graduación presentado por

Hugo Diego Perdomo Contreras

para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2013


Vo. Bo.


(f)   
Pamela Marie Pennington, Ph.D.

Asesora

Tribunal Examinador:

(f)   
Pamela Marie Pennington, Ph.D.

(f)   
Mónica Stein, Ph.D.

(f)   
Lic. Claudia Paiz

Fecha de aprobación: Guatemala 1 de marzo 2013

# CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. Antecedentes.....	4
III. Justificación.....	18
IV. Objetivos.....	19
1. General.....	19
2. Específicos.....	19
V. Hipótesis.....	20
VI. MÉTODOS.....	21
A. Procedimiento.....	21
1. Insectos.....	21
2. Diseño experimental.....	21
3. Flebotomía.....	21
4. Alimentación con bacteria.....	22
5. Cuantificación ARNdh.....	22
6. Ensayo de motilidad.....	23
7. Extracción de hemolinfa.....	23
8. Análisis espectrofotométrico de la hemolinfa.....	24
9. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizadas.....	24
10. Análisis de datos.....	25
VII. RESULTADOS.....	26

A.	Resultados sobre cuantificación ARNdh .....	26
B.	Resultados sobre ninfas de segundo estadio .....	27
C.	Caracterización de RHBP-apo y RHBP-hemo circulante en la hemolinfa de hembras alimentadas con bacteria productora de ARNdh .....	29
VIII.	DISCUSIÓN .....	34
IX.	CONCLUSIONES .....	38
X.	RECOMENDACIONES .....	39
XI.	LITERATURA CITADA .....	40
XII.	ANEXOS .....	43

## LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1: Estadística descriptiva de los valores de las áreas mAU de los tratamientos para d3 y d7 del ensayo de ingesta.....	15
Cuadro 2: Concentración y pureza del ARNdh extraído de las tres bacterias diferentes con y sin IPTG tratado y no tratado con ARNsa.....	26
Cuadro 3: ANOVA de un factor para determinar diferencia entre producción de ARNdh Plant y RHBP.....	26
Cuadro 4: Estadísticas descriptivas de el tiempo que le tomó a cada individuo moverse de un punto a otro. ....	27
Cuadro 5: Prueba de ranking logarítmicos realizada para determinar si la cantidad de hemina agregada a cada grupo es significativamente diferente. ....	32
Cuadro 6: Estadísticas descriptivas de el tiempo que le tomó a cada individuo moverse de un punto a otro. ....	43

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribución de <i>Rhodnius prolixus</i> (iOWH 2007).....	7
Figura 2: Diferentes etapas ninfales de <i>Rhodnius Prolixus</i> . ....	8
Figura 3: Cambio en el pico de sores luego de agregar hemina a RHPB producida in vitro por cuerpo gordo (●) y por hemolinfa (○).....	10
Figura 4: Forma en la que funcionan las proteínas más importantes para el ARNi.....	12
Figura 5: Plásmido generado para producción de RHPB de doble hebra.....	13
Figura 6: Acumulación de la proteína RHPB en la hemolinfa de <i>R. prolixus</i> N3 en dos diferentes días luego de la alimentación.....	14
Figura 7: Efecto del tratamiento oral con ARNdH de RHPB en el desarrollo de <i>R. prolixus</i> de primer estadio.....	15
Figura 8: Expresión relativa (ER) del gen RHPB, en relación al gen de referencia para actina, en hembras tratadas con diferentes dosis de <i>E. coli</i> expresando ARNdH del gen de RHPB comparadas con hembras alimentadas con sangre estéril.....	16
Figura 9: Número de huevos corionados por hembra cinco días después del tratamiento con bacterias expresando ARNdH para RHPB, comparado con hembras alimentadas con sangre estéril (control -).....	17
Figura 10: Caja de petri para ensayo de movimiento. ....	23
Figura 11: Tiempo que le tomó a cada individuo llegar del punto A al punto B diariamente hasta su muda o final del experimento.....	28
Figura 12: Cambio del punto de máxima absorbancia luego de agregar hemina a la muestra de hemolinfa. ....	29
Figura 13: cantidad de proteína RHPB total y unida a hemina presente en la hemolinfa de <i>R. prolixus</i> hembras. ....	30
Figura 14: Funciones de sobrevivencia tomando nmol de hemina agregado como tiempo y saturación como suceso. ....	31
Figura 15: Gel de poliacrilamida desnaturalizado teñido con azul de Coomassie.....	33

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una enfermedad parasitaria zoonótica que afecta a 9 millones de personas en todo el continente americano. El agente etiológico, *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), es transmitido en la naturaleza por insectos hematófagos de la familia Reduviidae. Algunos de estos insectos colonizan casas de construcción rústica y transmiten la enfermedad al humano. Existen diferentes formas de controlar la enfermedad, siendo la más utilizada el control de los insectos hematófagos que lo transmiten, mediante insecticidas químicos aplicados intradomiciliariamente. Se han propuesto otras estrategias biológicas para controlar al vector, entre las cuales se incluyen, hongos entomopatógenos y la generación de bacterias simbióticas genéticamente modificadas para producir moléculas antiparasíticas que bloqueen el desarrollo del parásito en el vector. Últimamente se plantea la idea de un insecticida microbiano transgénico basado en el silenciamiento de genes del vector mediante la expresión de ARNdh específico para dichos genes por las bacterias simbióticas que se encuentran en el intestino.

El objetivo de este estudio fue caracterizar el efecto de alimentar ninfas y hembras con bacterias productoras de ARNdh contra la proteína RHBP, comparado con bacterias control que no expresan ARNdh o que expresan ARNdh para un gen derivado de *Arabidopsis thaliana*. Para esto, el estudio se dividió en dos fases: la primera evaluó si ninfas de segundo estadio alimentadas con bacterias expresando el ARNdh sufren algún cambio en la motilidad y la segunda caracterizó la proteína RHBP en la hemolinfa de hembras para determinar si existe alguna diferencia en la relación RHBP undia al grupo hemo (RHBP-hemo) y proteína sin el grupo hemo (RHBP-apo) en respuesta al silenciamiento del RHBP.

Se encontró que no hay diferencia significativa en la motilidad de las ninfas de segundo estadio. Tampoco se encontró una diferencia significativa en la relación de las formas apo y hemo de la proteína RHBP ni en la proteína total con el tamaño de muestra utilizado. Se concluye que en las ninfas es necesario evaluar otros métodos para estudiar los efectos fenotípicos del silenciamiento. En el caso de la proteína en las hembras, será necesario repetir el experimento para obtener resultados estadísticamente válidos.

## I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de chagas es provocada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad tiene dos etapas diferentes. A la primera etapa se le llama fase aguda en la que la persona infectada puede presentar síntomas como fiebres e inflamación en el sitio donde ingresó el parásito o puede no presentar síntomas. En esta etapa se puede encontrar el parásito circulando en el torrente sanguíneo. Luego existe un tiempo asintomático en el que no se encuentra parásito en la sangre y esta etapa puede durar de 8 años a toda la vida. Entre el 20-30% de las personas infectadas con *T. cruzi* desarrolla la fase crónica. En esta fase existen varios síntomas como un ritmo cardíaco irregular que puede llevar a la muerte, dilatación del corazón lo que hace que la sangre no circule bien y dilatación del esófago o el colon causando problemas digestivos (iOWH, 2007). La prevalencia de dicha enfermedad en Guatemala en el 2002 era de 2.8% – 6.1%. Dicha prevalencia implica que entre 337,008 y 734,196 guatemaltecos tienen la enfermedad. En la actualidad se están tomando medidas interdisciplinarias para el control de la enfermedad por medio del vector (iOWH, 2007).

El parásito es transmitido por triatomíneos entre los cuales se encuentra el *Rhodnius prolixus*. Este insecto se alimenta de sangre de diferentes animales, una vez completa la ingesta, defeca para eliminar el exceso de agua y, si está infectado con *T. cruzi*, el parásito puede ingresar al cuerpo por abrasiones cerca del sitio de la picadura o por vía mucosal (WHO, 2010).

Una de las formas planteadas para controlar la enfermedad fue la transformación de bacterias simbiotas del vector para producir péptidos antiparasitarios y poder eliminar el *Trypanosoma*. (Durvasula 1999) Esta estrategia fue rediseñada por el grupo de investigación en Guatemala para eliminar al vector utilizando las bacterias simbióticas para producir ARNdh específico para genes del vector, produciendo silenciamiento de proteínas importantes en el desarrollo y la reproducción.

Todos los estadios de *R. prolixus* expresan la proteína *Rhodnius* Heme-Binding Protein, la cual es producida de novo por el cuerpo graso en su forma saturada con el grupo hemo, en respuesta a la ingesta sanguínea (Paiva-Silva *et al* 2002). Esta es secretada a la hemolinfa 3-10 días post-alimentación, circulando en su forma apo y hemo, posiblemente funcionando en la transferencia del grupo hemo a otros tejidos y en la protección contra el proceso de oxidación causado por la liberación del grupo hemo durante la alimentación con sangre (Dansa-Petreski *et al* 1995). La RHBP-apo se une al grupo hemo e impide que éste peroxide proteínas como la lipoporina, lipoproteína principal en la hemolinfa del insecto. La peroxidación de la lipoporina hace que no pueda transportar fosfolípidos a los oocitos y que estos no puedan desarrollarse con normalidad (Dansa-Petreski 1995). La RHBP-hemo también es una proteína principal del huevo con función en embriogénesis, siendo importada por el oocito mediante endocitosis mediada por receptores, dando su color rojo característico (Braz *et al* 2002).

Debido a su importancia en la fecundidad del vector y su expresión en todos los estadios del vector, se desarrolló como prueba de concepto de un insecticida microbiano el sistema de silenciamiento con bacterias *Escherichia coli* productoras de ARNd<sub>h</sub> de RHBP en ninfas y hembras (Taracena 2011). Este sistema demostró que la presencia de estas bacterias afecta la expresión del gen de RHBP, reduciendo la producción de ARNm en 99%. Así mismo, se observó un retraso en la muda de ninfas de tercer estadio y una reducción en la fecundidad de las hembras en 40% (Taracena 2011). Se ha observado que la proteína total en la hemolinfa de hembras y ninfas no varía al introducir ARNd<sub>h</sub> específico para RHBP (Juárez 2010 y Taracena 2011). Sin embargo, la cantidad de ARNm sí es reducida en 99%, sugiriendo que proteína previamente producida y almacenada en otros tejidos podría salir a la hemolinfa al momento de no haber síntesis de novo (Taracena 2011).

En el presente estudio se evaluó el efecto de las bacterias en la motilidad de ninfas de segundo estadio y se estandarizó una metodología para el estudio de la relación apo/hemo de la proteína RHBP en la hemolinfa de hembras de *R. prolixus* alimentadas con dichas bacterias. Los resultados sugieren que la alimentación con bacterias productoras de ARNd<sub>h</sub> para RHBP no afecta la motilidad de las ninfas. Los datos sugieren que en el caso de las

hembras, la alimentación no produce un cambio en la razón de RHBP-apo/RHBP-hemo el día 3 post-alimentación.

## II Antecedentes

### 1. Enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas era una enfermedad endémica de América Latina, pero debido a la migración de personas latinoamericanas a todo el mundo ahora se han reportado casos de ella en Estados Unidos y en Europa. Actualmente la prevalencia de la enfermedad en los países latinoamericanos varía desde 0.1% hasta 24%. Para el continente, la prevalencia es de 2.8% lo que representa 14 millones de personas enfermas. Se estima una incidencia de aproximadamente 200 000 nuevos casos anualmente (iOWH, 2007).

La enfermedad de Chagas es la cuarta enfermedad infecciosa o parasitaria más abundante en Latino América. Una de las formas más eficientes del control de la enfermedad es por medio del control de sus vectores triatomíneos (iOWH, 2007).

La prevalencia de la enfermedad en Guatemala calculada para 2002 oscila entre una tasa conservadora de 2.8% a una alta de 6.1%. Esto representa una cantidad máxima de 734,196 personas enfermas con Chagas (iOWH 2007). La infección de la mayoría de personas en Guatemala se cree que es debido al vector *Triatoma dimidiata*, ya que *Rhodnius prolixus* está en proceso de eliminación en Guatemala desde 2002 (Nakagawa, 2005).

La enfermedad tiene dos fases, una aguda y una crónica. En la fase aguda los pacientes no siempre presentan síntomas, pero la frecuencia de estos es mayor en niños menores de 15 años. Algunos de los síntomas pueden ser una reacción local conocida como chagoma, fiebre, dolores de cabeza e inflamación de los ganglios linfoides. Estos síntomas duran hasta dos meses, seguido de la fase crónica de la enfermedad. En casos raros se puede presentar miocarditis aguda ó meningoencefalitis que puede llegar a ser mortal (WHO, 2010).

“Después de desaparecer los síntomas de la fase aguda de la enfermedad, da comienzo la fase crónica. En esta fase los niveles de parásitos en la sangre disminuyen a niveles detectables únicamente por ensayos parasitológicos o de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) muy sensibles. En todos los pacientes de Chagas la fase crónica inicia con una etapa asintomática conocida como la fase indeterminada. El 50%-70% de los

individuos que presentan la fase indeterminada de la enfermedad se mantienen asintomáticos toda la vida y solo el resto de los infectados desarrollan síntomas que pueden afectar el corazón, el sistema digestivo o el sistema nervioso periférico” (Traducido de Moncayo *et al*, 2006 por Hugo Perdomo).

La sintomatología cardíaca de la enfermedad es la consecuencia más importante de la enfermedad. De 10%-30% de los pacientes la desarrollan y puede llevar a la muerte. Esta etapa se observa de 10 a 20 años después de la fase aguda y las principales manifestaciones son paro cardíaco, arritmias y trombo embolismo. Las lesiones miocárdicas afectan el ventrículo derecho y los casos avanzados de la enfermedad presentan insuficiencia es este ventrículo (Moncayo *et al* 2006).

Aproximadamente el 10% de los pacientes en la fase crónica desarrollan alteraciones en el sistema nervioso central periférico. Esto se puede observar con reflejos disminuidos en los tendones. La destrucción del sistema autonómico entérico nervioso puede llevar a alteraciones anatómicas y funcionales en el sistema digestivo. La fase crónica digestiva de Chagas se observa principalmente en pacientes al sur del Ecuador y la sintomatología es esófago y colon inflamado (Moncayo *et al*, 2006).

Para el tratamiento de la enfermedad se utilizan dos drogas diferentes: nitrofurano nifurtimox (Nfx) y nitriimidazol bensnidazol (Bz) que se enfocan en atacar al parásito causante de la enfermedad *Trypanosoma cruzi*. Ambas son nitroheterocíclicas y el uso de estas es más efectivo cuando el parásito se encuentra fuera de la célula. Por esto se recomienda utilizarlas en la fase aguda de la enfermedad, el uso en la fase crónica temprana también es aceptado, pero en la etapa tardía no es recomendable. Ambas drogas tienen el mismo mecanismo de acción por lo que si el parásito es resistente a una también lo será a la otra. Las drogas son muy tóxicas por lo que la decisión de cual utilizar está basada en la tolerancia del paciente a estas y la interrupción del tratamiento debido a su toxicidad es frecuente (Castro *et al*, 2006).

Entre los efectos secundarios de las drogas se encuentra pérdida de peso, náusea, excitación nerviosa, insomnio, depresión, convulsiones, vértigo, y desorientación entre otras. Actualmente existen diferentes formas de abordar el problema para el desarrollo de

nuevas drogas que no sean tan tóxicas para los pacientes y que eliminen efectivamente al parásito. Una de ellas se enfoca en inhibir procesos esenciales en *T. cruzi* pero que no estén presentes en humanos. Esta técnica tiene diferentes blancos y cada uno interviene en diferentes procesos como la inhibición de síntesis de esteroides o la inhibición de una proteasa (McKerrow *et al*, 2009 y Castro *et al*, 2006).

## 2. *Trypanosoma cruzi*.

El *T. cruzi* es un protozoo del orden Kinetoplastida. Éste es un parásito que causa la enfermedad de Chagas en humanos. La fase infectiva de este organismo se desarrolla en el tracto intestinal de los vectores que infectan a sus hospederos por medio de las heces. Este parásito infecta a más de 100 especies distintas de mamíferos y diferentes tipos de células, sin embargo el mecanismo por el cual entra a la célula es el mismo (WHO, 2002 y Tyler, 2001).

La interacción entre el protozoo y la célula se divide en tres diferentes etapas: el primero donde se adhiere y reconoce la célula, la segunda es cuando manda la señalización a la célula y por último cuando se da la invasión. Para la adherencia y el reconocimiento del parásito se utilizan diferentes receptores dependiendo del estado de este. Las principales moléculas que llevan a la unión de ambas células son las musinas y lectinas, proteínas de membrana del parásito (de Souza, 2010).

*T. cruzi* tiene la característica de cambiar su forma durante su ciclo de vida. Las etapas de vida de este son amastigotes, tripomastigotes metacíclicos y epimastigotes. En la sangre de los mamíferos se encuentran presentes los tripomastigotes que son aquellos que tienen una mayor facilidad de infectar células. Una vez dentro de la célula del mamífero, cambian a amastigotes, los cuales se dividen y crecen para convertirse en tripomastigotes que son liberados de nuevo al torrente sanguíneo. Cuando el vector ingiere tripomastigotes estos llegan al estómago, donde se diferencian en epimastigotes que se dividen y se transforman en tripomastigotes que migran al recto en donde luego se convierten en tripomastigotes metacíclicos infectivos (Tyler, 2001).

### 3. *Rhodnius prolixus*.

El parásito puede tener diferentes tipos de vectores pero todos son triatomíneos. Entre los vectores se encuentran varios géneros de insectos hematófagos como *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongilus*. Estos triatomíneos pueden ser encontrados en altitudes menores a 1500m. *R. prolixus* se ha reportado en Guatemala, Colombia, Venezuela, México, El Salvador y Honduras. Este vector es principalmente doméstico en Centroamérica silvestre en Colombia y Venezuela (iOWH, 2007).

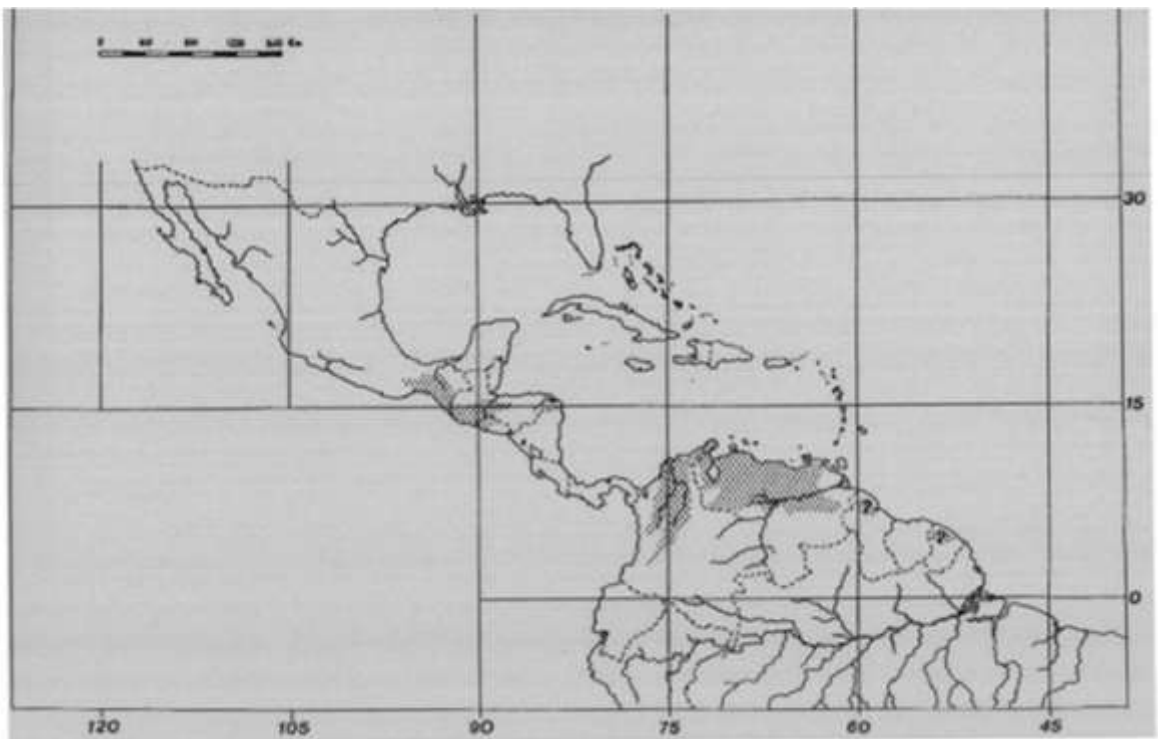


Figura 1: Distribución de *Rhodnius prolixus*

(iOWH 2007)

El ciclo de vida de *Rhodnius prolixus* tiene cinco etapas ninfales antes de llegar a la etapa de adulto. Como se puede observar en la Figura 2. Los adultos ovipocitan aproximadamente de 30 a 50 oocitos por alimentación (Uribe 1926). *R. prolixus* tiene un ritmo circadiano bastante estudiado. Muchas de sus acciones como ovipostura, muda,

locomoción y eclosión del huevo dependen de éste. Los oocitos tienen un patrón en el que eclosionan en las horas en que la temperatura es menor y la humedad mayor para minimizar la pérdida de agua por transpiración. Además de factores abióticos, para que los oocitos sean viables deben tener cierta cantidad de nutrientes que adquirieron de la madre durante su estancia en los ovarios. Uno de los compuestos que más necesitan los oocitos es el grupo hemo ya que necesitan de este para la síntesis de factores importantes en el organismo (Schilman, 2010 y Paiva-Silva, 2002). Luego de eclosionar, las larvas se alimentan entre el cuarto y el sexto día y luego de una alimentación mudan a la siguiente etapa. Las ninfas de la primera a la cuarta etapa mudaron después de una sola alimentación. El tiempo entre la alimentación y la muda es siempre el mismo, sin importar que la alimentación sea completa o parcial. En la última etapa ninfal se necesitan aproximadamente cuatro alimentaciones para que lleguen a adultas. (Uribe, 1926).



Figura 2: Diferentes etapas ninfales de *Rhodnius Prolixus*. De izquierda a derecha se observa una adulta, estado ninfal 5, estado ninfal 4 estado ninfal 3 estado ninfal 2 estado ninfal 1 y oocitos (OPS)

El control de los vectores puede ser un paso muy importante para el control de la enfermedad. Para esto se han propuesto muchas estrategias diferentes entre las cuales se encuentra: rociamiento de insecticida, hongos entomopatógenos y paratransgénesis entre otros (WHO 2002). El rociamiento de insecticida ha sido útil en poblaciones de vectores domiciliados, pero no tanto para los que se encuentran en condiciones selváticas. Al reducirse el efecto residual del insecticida, los insectos pueden volver a colonizar los domicilios (Nakagawa 2003). Los hongos entomopatógenos han sido utilizados en el campo y se ha reportado 52.4% de mortalidad, lo cual luce prometedor (Pedrini 2009). La estrategia de paratransgénesis se basa en la transformación de bacterias simbióticas del

vector para matar el parásito. La bacteria *Rhodococcus rhodnii* es una bacteria simbiótica de *R. prolixus* que se cree produce vitaminas del complejo B que son requeridas en el desarrollo del vector (Friend *et al* 1977). Esta bacteria crece de forma extracelular en el intestino de *R. prolixus* (Wigglesworth 1984). La bacteria se transformó para que produzca péptidos antiparasíticos y así tener insectos que no pueden transmitir la enfermedad de Chagas (Beard 2001). Se demostró que la bacteria podía producir péptidos dentro del intestino, con el potencial de afectar el desarrollo del parásito (Durvasula 1997). Esta estrategia se pensó utilizar como parte de manejo integrado contra la enfermedad. La idea original fue rediseñada para producir bacterias transgénicas que produzcan ARNi para genes blancos específicos de *Rhodnius prolixus* y así poder realizar un insecticida biológico contra este triatomino (Pennington 2010). Actualmente se están evaluando blancos con resultados muy favorables (Taracena 2011).

#### 4. *Rhodnius* heme-binding protein.

El *R. prolixus*, como todos los demás insectos hematófagos, consume grandes cantidades de sangre y por lo mismo grandes cantidades de grupo hemo. Moléculas como el grupo hemo que tienen hierro dentro de ellas son catalizadoras de especies de oxígeno activadas. Estas especies de oxígeno causan daño a biomoléculas esenciales para la vida. Moléculas de suma importancia para el insecto como ácido lonoléico, liposomas y lipoporinas son algunos de los principales blancos de la peroxidación dependiente del grupo hemo (Dansa-Petreski 1995 y Paiva-Silva 2002).

A lo largo de la evolución se ha desarrollado diferentes maneras de solucionar este problema, como la evolución de moléculas como ferratina, transferrina y haptoglobina entre otras. En *R. prolixus* la proteína llamada *Rhodnius* heme-binding protein (RHBP) está involucrada en este proceso. Esta proteína tiene una masa molecular de 15kDa, se une uno a uno con el grupo hemo y es uno de los blancos pensados para la estrategia de ARNi (Dansa-Petersli, 1995 y Oliveira, 1995). Cuando la hemina no se une a la RHBP el insecto tiene otro mecanismo para la desintoxicación de radicales superóxido ( $O_2^-$ ). El otro mecanismo consiste en la degradación de dichos radicales por medio de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa. La superóxido dismutasa se encarga de transformar el

radical superóxido a peróxido de hidrógeno, luego la catalasa se encarga de degradar el peróxido de hidrógeno (Oliveira, 2010).

Se ha podido detectar si la proteína en la hemolinfa, huevos y cuerpo graso está unida o no al grupo hemo por análisis de espectrofotometría. La RHBP-hemo absorbe a 412 nm (denominado pico Soret) mientras que la RHBP-apo no tiene absorbancia a esa longitud de onda. Estudios de titulación de la RHBP con hemina han demostrado que se puede determinar el punto en el que la proteína -apo se satura con el grupo hemo. El procedimiento consiste en agregar gradualmente hemina en concentraciones conocidas hasta que la longitud de onda a la que se da el máximo de absorbancia se corre de 412 nm a 395 nm (longitud en la que absorbe la hemina). Dado que la proteína unida al grupo hemo tiene un máximo de absorbancia a 412 nm y la hemina libre a 395 nm, esto hace que al saturarse toda la proteína y seguir agregando hemina la absorbancia que aumenta es la de 395 nm. (Paiva-Silva, 2002)

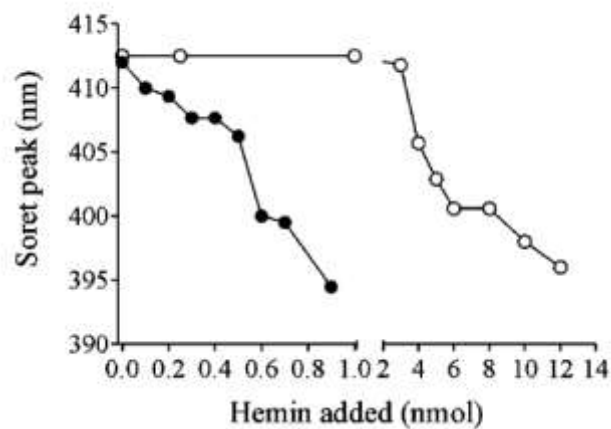


Figura 3: Cambio en el pico de soret luego de agregar hemina a RHBP producida *in vitro* por cuerpo graso (●) y por hemolinfa (○) (Paiva-Silva 2002)

Utilizando este método, se demostró que la RHBP se sintetiza en su forma hemo en el cuerpo graso del *R. prolixus* y circula en la hemolinfa en sus dos formas, como RHBP-apo para reducir la cantidad del grupo hemo que cruza la barrera del sistema digestivo y RHBP-hemo para circular el grupo hemo a otros tejidos (Bráz 2001). La síntesis de la proteína

se ve inducida por la alimentación, ya que luego de las alimentaciones se observan niveles más altos de síntesis a nivel de ARNm (Pavia-Silvia, 2002).

En los oocitos también se puede encontrar la RHBP. A diferencia de la hemolinfa, en los oocitos se encuentra la proteína solamente saturada con grupo hemo. Estos la adquieren de la hemolinfa por medio de endocitosis mediada por receptores (Machado 1998) . Durante la embriogénesis se degrada la proteína y luego los grupos hemo son re-utilizados para producir nuevas moléculas que contengan grupo hemo. Se ha observado que el momento de mayor síntesis de RHBP coincide con el de mayor incorporación en el ovario. Esto indica que la síntesis y la incorporación pueden estar regulados por el mismo mecanismo (Pavia-Silvia, 2002).

5. Silenciamiento. El silenciamiento de genes es un proceso en el que una proteína que es codificada por un gen ya no es sintetizada. La más utilizada en la ingeniería genética es el silenciamiento por medio de ARN de interferencia (ARNi). El ARNi es producido por ARN de doble hebra (ARNdh) dentro de la célula. La presencia del ARNdh puede deberse a un mecanismo interno de la célula para control, la absorción a la célula de ARN antisentido o de ARNdh directamente (Tijsterman, 2002).

Este mecanismo ha sido estudiado ampliamente en organismos modelo como *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*). Los factores involucrados en la interferencia son muy parecidos en diferentes organismos, lo que sugiere que es un mecanismo conservado evolutivamente. Los más importantes en la interferencia del ARN son el complejo silenciador inducido por ARN (RISC por sus siglas en inglés) y Dicer. A pesar de ser conservado, existen pequeñas diferencias que se pueden observar en diferentes organismos (Tijsterman, 2002).

Dicer es una ARNasa de tipo III que corta el ARNdh introducido a la célula en pedazos de 21-23 pares de base (pb). La presencia de Dicer ha sido observada en diferentes organismos como plantas, hongos y distintos tipos de animales. Además, se ha observado que sin este el ARNi no funciona. Gracias a esto se sabe que Dicer es una parte vital de este proceso (Tijsterman, 2002).

Otra de las moléculas vitales para el ARNi es el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Una vez cortado el ARNdH en fragmentos pequeños, RISC toma una de las hebras y la utiliza como molde para cortar otros ARN complementarios presentes en la célula. Estos ARN complementarios por lo general son ARNm, de forma que al cortarlos pierden la funcionalidad biológica y por lo tanto la proteína ya no se puede sintetizar. Este proceso se puede observar en la Figura 4 (Tijsterman 2002).

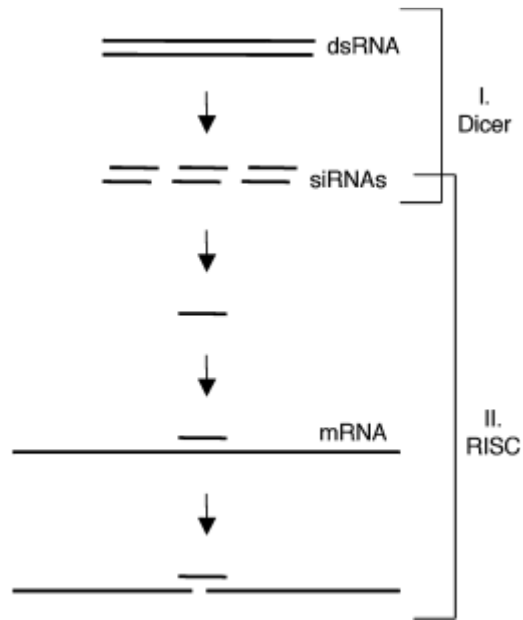


Figura 4: forma en la que funcionan las proteínas más importantes para el ARNi

(Tijsterman, 2002)

Se ha comprobado que la manera más eficiente para que se produzca el ARNi es administrar directamente el ARNdH. Este tiene un efecto más potente y específico que agregar cualquiera de las hebras de ARN por sí sola. Se ha podido observar una eficiencia mayor de hasta dos órdenes de magnitud que las hebras simples (Fire, 1998).

El ARNdH puede ser agregado al medio o inyectado. Al agregar el ARNdH en el medio, este ingresa a la célula por endocitosis mediada por receptores. Este mecanismo se cree que es conservado evolutivamente debido a la presencia del mismo en *Drosophila melanogaster* y *C. elegans*. Los receptores que se utilizan para mediar la endocitosis son clatrininas. Se sabe que una vez entra a la célula hay toda una maquinaria para dirigir las vesículas y transmitir el efecto intercelularmente (Saleh, 2006).

En *R. prolixus* se han realizado estudios y se determinó que se puede inducir ARNi tanto por medio de alimentación o inyección intratorácica de ARNdH. Para la inyección se ha demostrado que el ARNdH puede ser mezclado tanto con agua como con solución salina y no hay diferencia significativa (Araujo, 2006).

6. Transgénesis en *Rhodnius prolixus*. La investigación en transgénesis en *Rhodnius prolixus* inició con la idea de la paratransgénesis, introducir un gen antiparasítico en una bacteria simbiote con el fin de matar al parásito (Beard *et al.* 1992). Dicha idea se modificó para producir un ARNdH en la bacteria simbiote para silenciar un gen de *R. prolixus* y eliminar al vector, puesto que en la paratransgénesis el vector sigue siendo un problema al no ser eliminado. Con el fin de probar esta idea, se desarrolló un plásmido que produzca ARNdH de RHBP (Figura 5). Para la producción del ARNdH se utilizó insertó secuencia del gen RHBP en el vector pGEM-T. Luego se transformó la bacteria *E. coli* HT115 con este plásmido. Con dicha bacteria se empezaron experimentos para observar su efectividad. Esta se comprobó alimentando a *R. prolixus* con la bacteria que produce el ARNdH y con el ARNdH producido *in vitro* (Pennington, 2010, Juárez 2010).

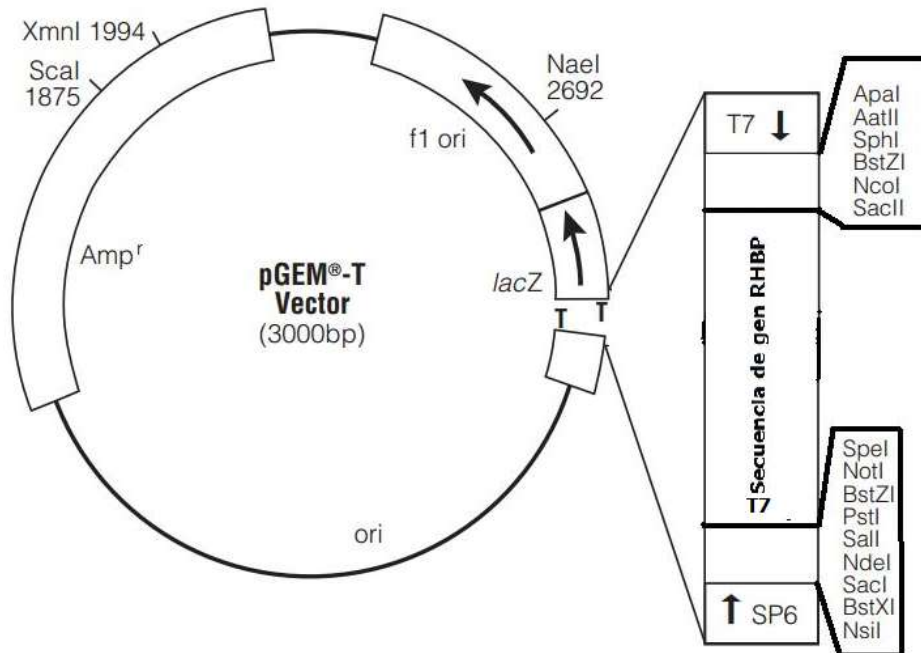


Figura 5: Plásmido generado para producción de RHBP de doble hebra

La alimentación con ARNdH se estudió en diferentes estadios ninfales comprobando que en el tercer estado ninfal no hay diferencia significativa en la cantidad de proteína total que se encuentra circulando en la hemolinfa. Sin embargo, se puede ver alteración en la cinética de la misma según se observa en la Figura 7 (Juárez, 2010). En ninfas de primer estadio se pudo observar un retraso en la ecdisis de dos días esto lo podemos observar en la Figura 6 (Pennington, 2010).

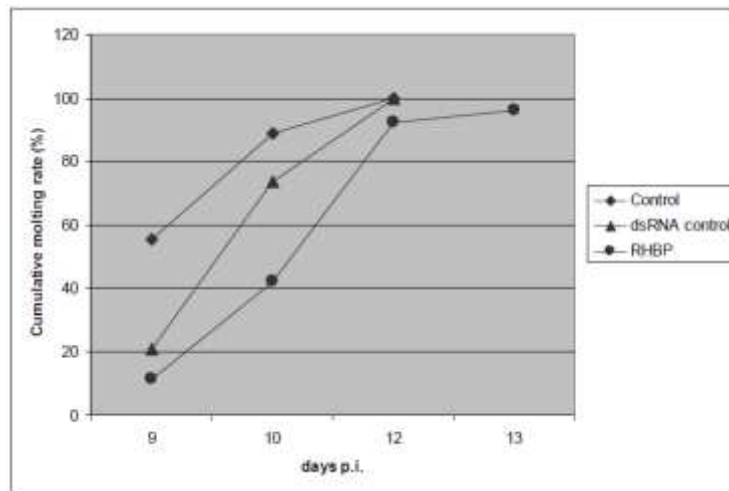


Figura 6: “Efecto del tratamiento oral con ARNdH de RHBP en la muda de *R. prolixus* de primer estadio.”

(Pennington, 2010)

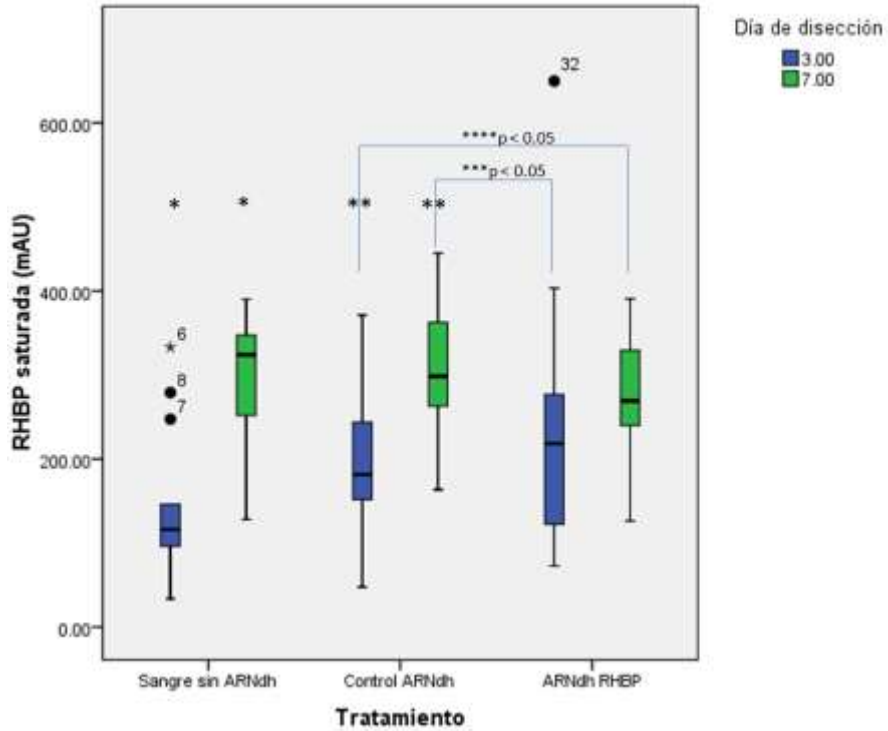


Figura 7: “Acumulación de la proteína RHBp en la hemolinfa de *R. prolixus* N3 en dos diferentes días luego de la alimentación”

(Juárez, 2010)

Cuadro 1: “Estadística descriptiva de los valores de las áreas mAU de los tratamientos para d3 y d7 del ensayo de ingesta”

<i>Intervalo de confianza</i>					
<b>D3</b>	<b>N</b>	<b>Mínimo (mAU)</b>	<b>Máximo (mAU)</b>	<b>Mediana (mAU)</b>	<b>Nivel de confianza %</b>
<i>Sangre sin ARNdH</i>	12	90.0	187.7	117.8	90
<i>Control ARNdH</i>	14	143.2	218.2	180.1	90
<i>ARNdH RHBp</i>	12	152.5	310.4	215.0	91

<b>D7</b>	<b>N</b>	<b>Mínimo (mAU)</b>	<b>Máximo (mAU)</b>	<b>Mediana (mAU)</b>	<b>Nivel de confianza %</b>
<i>Sangre sin ARNdh</i>	14	258.9	336.7	297.4	90
<i>Control ARNdh</i>	12	262.8	357.4	300.5	90
<i>ARNdh RHBP</i>	10	213.4	323.1	270.1	90

(Juárez, 2010)

La alimentación con bacteria productora de ARNdh de RHBP se probó en hembras de *R. prolixus*. Dicha alimentación comprobó que el silenciamiento es dosis-dependiente como se observa en la Figura 8, siendo la dosis más alta ( $5.4 \times 10^7$  UFC/mL) la utilizada en futuros experimentos por ser la que brinda el mayor silenciamiento. También se observó una disminución en un 60% en la producción de huevos (Figura 9) (Pennington 2010). Sin embargo, estudios realizados han comprobado que la proteína RHBP total en la hemolinfa no cambia durante los primeros días del silenciamiento del gen, sugiriendo que al no haber síntesis de novo, entra a la hemolinfa proteína de diferentes tejidos donde se almacena. (Taracena, datos no publicados).

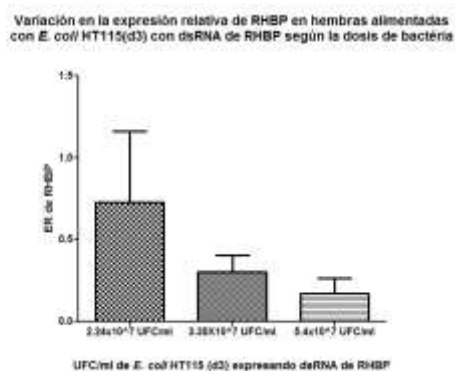


Figura 8: “Expresión relativa (ER) del gen RHBP, en relación al gen de referencia para actina, en hembras tratadas con diferentes dosis de *E. coli* expresando ARNdh del gen de RHBP comparadas con hembras alimentadas con sangre estéril.”

(Pennington 2010)

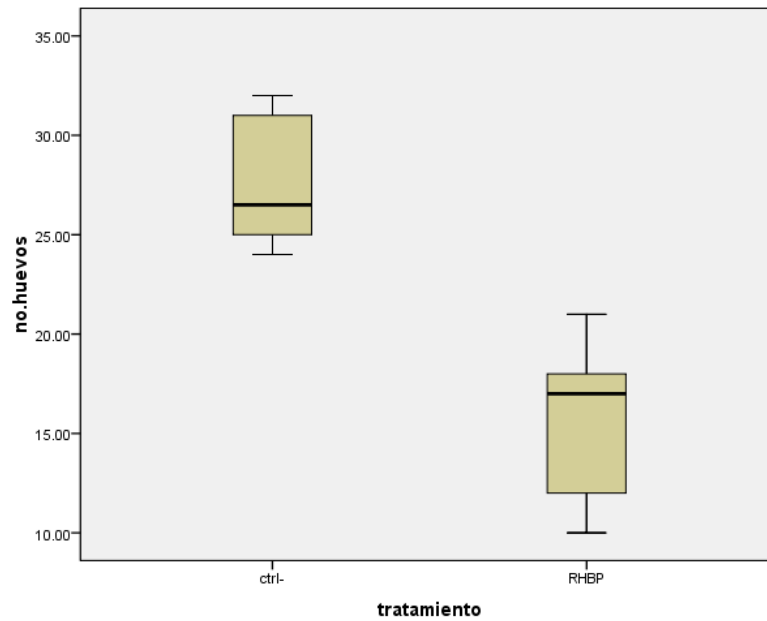


Figura 9: “Número de huevos coronados por hembra cinco días después del tratamiento con bacterias expresando ARNdh para RHBP, comparado con hembras alimentadas con sangre estéril (control -).”

(Pennington 2010)

### III. Justificación

La enfermedad de Chagas es una enfermedad mortal transmitida por insectos hematófagos, que en América Latina afecta aproximadamente a 9 millones de personas. El control de los vectores de esta enfermedad es una prioridad internacional. Los insecticidas químicos han sido efectivos en su control en áreas en donde la especie de vector es domiciliada. En áreas en donde el vector se encuentra en ámbitos silvestres, su control con insecticidas químicos es menos eficiente y sostenible debido a la constante reinfestación de las casas. Esto ha llevado a considerar otras formas de control que sean sostenibles. Entre las formas consideradas existe un insecticida biológico que utiliza bacterias no patógenas para otros organismos para eliminar el vector. Estudios previos han demostrado la posibilidad de desarrollar insecticidas biológicos a partir de microorganismos que habitan el intestino de los insectos. Previamente se propuso un método innovador de control en el vector *Rhodnius prolixus*, el cual mantiene una bacteria simbiótica en el intestino, *Rhodococcus rhodnii*. La bacteria ha sido transformada para expresar péptidos antiparasitarios en el intestino del vector, las cuales pueden afectar el desarrollo del parásito. Más recientemente, se ha desarrollado un sistema para introducir por vía oral al intestino de hembras de *R. prolixus* bacterias que expresan ARNdh específico para genes del insecto. Esto lleva al silenciamiento de dichos genes y reduce la fecundidad de las hembras, sin embargo no se ha observado cambio en la cantidad de proteína total presente en la hemolinfa. En ninfas de tercer estadio se analizó la expresión de RHBP y se encontró una ligera modificación en la cinética de la acumulación de la proteína total en la hemolinfa, aunque el total de la proteína no cambió significativamente. Además, se encontró que la ingesta de ARNdh en ninfas de primer estadio lleva a un retraso de dos días en la ecdisis. Este estudio se ha enfocado en el efecto que pueda tener el silenciamiento mediado por bacterias en el desarrollo de las ninfas y sobre la cinética de la proteína en hembras para entender mejor el proceso de la reducción de fecundidad. El presente estudio analizó la relación de la RHBP-apo:RHBP-hemo luego de alimentar hembras con bacterias productoras de ARNdh para comprender mejor cómo se comporta la proteína en el adulto.

## IV. Objetivos

### A. General

Caracterizar el efecto del silenciamiento mediado por la alimentación con bacterias que expresan ARNdh de la proteína RHBP en ninfas y hembras de *R. prolixus*.

### B. Específicos

- Cuantificar el ARNdh producido por bacterias *Escherichia coli* modificadas para expresar ARNdh.
- Evaluar la motilidad de ninfas de segundo estadio de *Rhodnius prolixus* alimentadas con *E. coli* HT115 con y sin plásmido expresando ARNdh.
- Estandarizar un método para medir la relación de la proteína RHBP-apo:RHBP-hemo.
- Cuantificar la proteína RHBP-apo y -hemo circulante en la hemolinfa de hembras de *R. prolixus* alimentadas con bacterias productoras de ARNdh de RHBP y los controles de ARNdh y de bacteria.

## V. Hipótesis

Ht: Se observará un efecto en motilidad de *Rhodnius prolixus* al alimentarlas con bacteria productora de ARNdh hacia RHBP

H0: No se observará un efecto en motilidad de *Rhodnius prolixus* al alimentarlas con bacteria productora de ARNdh hacia RHBP

Ht: El silenciamiento de la proteína RHBP aumentará el porcentaje de proteína apo circulante en la hemolinfa

H0: El silenciamiento de la proteína RHBP no aumentará el porcentaje de proteína apo circulante en la hemolinfa

## VI. MÉTODOS

### A. Procedimiento

#### 1. Insectos.

Se utilizaron *Rhodnius prolixus* de la colonia del insectario del Centro de estudios en Saludo (CES), dichos insectos se mantuvieron a 27 °C, 70 % de humedad y con 12.5 horas de luz y 11.5 de oscuridad. La colonia fue alimentada cada tres semanas directamente de orejas de conejos durante un máximo de 30 minutos. El conejo se utilizó una vez al mes rotando los conejos cada 2 semanas.

#### 2. Diseño experimental.

Se utilizaron 20 ninfas de segundo estadio para el primer experimento, las ninfas fueron sincronizadas desde su primer estadio ninfal. Se separaron en cuatro grupos de cinco individuos cada uno, a un grupo se le alimentó con sangre sin bacteria, al segundo se le alimentó con sangre y *E. coli* HT115 no productora de ARNdh, al tercer grupo se le alimentó con sangre y *E. coli* HT115 productora de ARNdh de *A. thaliana* y al cuarto grupo se le alimentó con sangre y *E. coli* HT115 productora de ARNdh de la proteína RHBP. Para el segundo experimento se utilizaron 12 hembras no sincronizadas separadas en cuatro grupos de 3 cada uno, siendo los grupos los mismos que para el primer experimento

#### 3. Flebotomía.

La sangre de conejo se obtuvo mediante la flebotomía de la oreja. Esto se realizó sujetando al conejo y limpiando el área con alcohol al 70%. Luego se aplicó xilol en el área y se sangro con agujas de insulina. El procedimiento fue previamente aceptado por el comité de uso y cuidado de animales y se manejó con el mejor cuidado posible a los animales.

#### 4. Alimentación con bacteria.

Para la alimentación con bacteria se cultivaron las tres bacterias a utilizar (*E. coli* HT115 no productora de ARNdh, *E. coli* HT115 productora de ARNdh de *A. thaliana* y *E. coli* HT115 productora de ARNdh de la proteína RHBP), una noche antes de la alimentación, estas se cultivaron a 37 °C y a 220 rpm durante toda la noche en 1 mL de caldo LB con tetraciclina (12 µg/mL) para las 3 y ampicilina (100 µg/mL) para las que contenían el plásmido para producir ARNdh. El día de la alimentación se tomó 400 µL del cultivo y se transfirió a 25 mL de 2xYT con IPTG (0.4 mM) y tetraciclina (12 µg/mL) para las 3 y ampicilina (100 µg/mL) para las que producían ARNdh, se cultivó de 3 a 4 horas hasta llegar a un OD=0.8 y se transfirió 10 mL de dicho cultivo a un tubo cónico de 15 mL. Se centrifugó a 3200 g por 15 minutos (Thermo Centra CLR) y se resuspendió el precipitado en 1 mL de sangre de conejo. Por último la mezcla fue colocada a 34.5 °C en un alimentador Hemotek (Accrington, Inglaterra) previamente esterilizado, utilizando una membrana de látex.

#### 5. Cuantificación ARNdh.

La cuantificación del ARNdh se llevó a cabo en triplicado. Para esta se cultivaron las tres bacterias a utilizar durante toda la noche y luego se indujo la transcripción del mismo modo que para la alimentación. Se tomó 1 mL y se precipitó, el pellet fue resuspendido en 50 µL de SDS al 0.1% y se colocó en un baño de agua ebulliendo durante 2 minutos. Luego se les agregó 1 µg de ARNasa A disuelto en una solución tampón de 300 mM acetato de sodio, 10 mM Tris HCl y 5 mM EDTA a un pH de 7.5 y se incubó a 37 °C por 5 minutos. Luego se procedió a realizar la extracción del ARNdh con TRIzol LS (Ambion, USA) como indica el fabricante. Para cuantificar el ARNdh se midió la absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro (Aligent 8453, Alemania) y una cubeta de cuarzo de 5 µL (Aligent, Alemania).

## 6. Ensayo de motilidad.

Las ninfas de segundo estadio fueron colocadas diariamente en una placa Petri como se muestra en la Figura 10 donde se les permitió movilizarse del punto A al punto B tomando el tiempo de movilización. Dicho experimento fue realizado diariamente durante 16 días, iniciando a las 8:30 a.m. y como tiempo máximo se dejó al triatomino 10 minutos en la caja, si al concluir ese tiempo no había llegado al punto B se tomaba como un tiempo de 10 minutos.

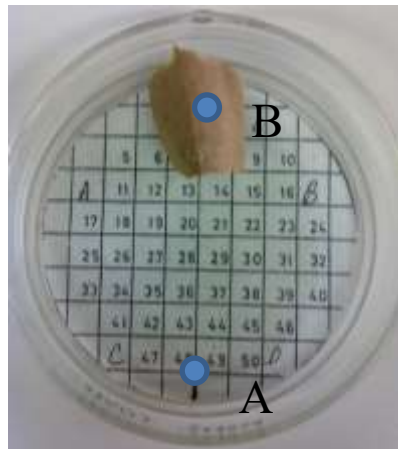


Figura 10: Caja de petri para ensayo de movimiento. El individuo se colocó en el punto A y se cronometró el tiempo que tardaba en llegar al punto B.

## 7. Extracción de hemolinfa.

Al tercer día luego de ser alimentadas las hembras de *R. prolixus*, se amputó la tibia de la pata y se les realizó presión en el área del torax para extraer hemolinfa por la apertura de corte. Si no se lograba recolectar 2  $\mu\text{L}$ , se amputaba otra pata y se realizaba más presión hasta lograr extraer los 2  $\mu\text{L}$ . La hemolinfa recolectada se almacenó en un tubo de 0.2 mL con 1 cristal de feniltiourea (PTU) y se llevó a un volumen final de 8  $\mu\text{L}$  en amortiguador con inhibidores de proteasas a una concentración final de 1.5  $\mu\text{M}$  de fluoruro de fenilmetasulfonilo (PMSF, por sus siglas en inglés) y 0.25 mM de solución amortiguadora de acetato de sodio a pH 3.5. La hemolinfa fue almacenada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta que fue utilizada.

## 8. Análisis espectrofotométrico de la hemolinfa.

Se utilizó una cubeta de cuarzo de 5  $\mu\text{L}$  (Aligent, Alemania) en un espectrofotómetro (Aligent 8453, Alemania). Se realizó una medición del espectro de absorbancia de una dilución 1:3 en la solución amortiguadora de acetato de sodio previamente usada de la hemolinfa almacenada. A la muestra se le agregó 1  $\mu\text{L}$  de una solución de hemina (SIGMA, Steindheim Alemania) disuelta el mismo día del análisis en hidróxido de sodio 0.1 N a una de las siguientes concentraciones 0.1  $\text{nmol}/\mu\text{L}$ , 0.05  $\text{nmol}/\mu\text{L}$ , 0.02  $\text{nmol}/\mu\text{L}$ . La concentración de hemina utilizada se determinó según a la absorbancia inicial que la muestra presentara a 412 nm. Se agregó gradualmente 1  $\mu\text{L}$  de hemina (a una de las tres diferentes concentraciones, dependiendo de la absorbancia original). Con cada adición, el espectro era normalizado restando el espectro anterior y se evaluaba la longitud de onda del punto más alto del espectro, hasta que su absorbancia cambiara de 412 nm a 395 nm.

## 9. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

Para realizar el gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) se utilizaron las muestras de la hemolinfa luego de ser saturadas con hemina. Se preparó un gel que contenía una parte concentradora con poliacrilamida al 4% (3.075 mL de agua, 1.25 mL de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 0.025 mL SDS 20% (Peso/Volumen), 0.67 mL acrilamida/bis-acrilamida 30%/0.8% (P/V), 0.025 mL persulfato de amonio 10% (P/V) y 0.005 mL de TEMED) y otra parte separadora con poliacrilamida al 14% (7.2 mL de agua, 7.5 mL de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 0.15 mL SDS 20% (Peso/Volumen), 15 mL acrilamida/bis-acrilamida 30%/0.8% (P/V), 0.15 mL persulfato de amonio 10% (P/V) y 0.02 mL de TEMED). El SDS-PAGE se realizó en un Mini-PROTEAN 3 Cell (BioRad, Estados Unidos) Se agregó 6  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora para cargar a 2  $\mu\text{L}$  (16 mL ddH<sub>2</sub>O, 5 mL 0.5 M Tris, pH 6.8, 8 mL 50% Glycerol, 8 mL 10% SDS, 2 mL 2- $\beta$ mercaptoethanol) de hemolinfa, se colocó en agua a ebullición por 5 minutos y luego se cargó. Se realizó el SDS-PAGE corrió a 17.5 V/cm hasta que llegara al gel separador y luego a 9 V/cm por 2 horas. Se utilizó una tinción de Coomassie para teñir el gel. Se dejó 30 minutos en solución para fijar (40:10:50 metanol:ácido acético:agua). Luego se colocó en la solución de trabajo Coomassie (500 mL de metanol, 30 mL de por 30 minutos solución de Coomassie concentrada (12 g Azul Brillante R-250, 300 mL metanol, 60 mL ácido acético), 400 mL agua doble destilada, 100 mL ácido acético). Por último se dejó toda la noche decolorando en solución decoloradora (45:10:45 metanol:ácido acético:agua).

## 10. Análisis de datos.

Los resultados de los tiempos se analizaron para comprobar la normalidad de los datos. Al determinar que los datos eran normales se realizó una ANOVA para comprobar si las medias eran diferentes. Basándose en los datos de absorbancia se realizaron cálculos para determinar la cantidad relativa de RHBP unida al grupo hemo y RHBP sin unión al grupo hemo, se determinó con una curva de supervivencia si la cantidad total de hemina agregada a cada grupo fue diferente y se realizó una regresión lineal para determinar si la cantidad de hemina agregada presentaba una relación lineal con la cantidad relativa de RHBP sin unirse al grupo hemo todo el análisis estadístico fue realizado en SPSS.

## VII. RESULTADOS

### A. Resultados sobre cuantificación ARNdh

La cuantificación se llevó a cabo para determinar si la cantidad de ARNdh administrado era el mismo tanto en el grupo control (planta) como en el tratamiento (RHBP). Esta se realizó por medio de espectrofotometría. Los datos obtenidos se observan en el Cuadro 2.

Cuadro 2: Concentración y pureza del ARNdh extraído de las tres bacterias diferentes con y sin IPTG tratado y no tratado con RNAsa. Siendo 260/280 el rango para determinar la calidad del ARN, [ng/ml la concentración del ARNdh en nano gramos por micro litro, y ngARNdh/mL OD=0.8 la cantidad de nano gramos presentes en un mililitro de cultivo con una densidad óptica de 0.8.

Muestra	260/280	[ ] ng/uL	ngARNdh/mL OD=0.8
HT115	1.72 ± 0.00	58.76 ± 26.81	2937.8 ± 1340.6
HT115 RNAsa	1.67 ± 0.01	60.91 ± 40.59	3045.3 ± 2029.5
HT 115 IPTG	1.62 ± 0.01	43.80 ± 27.13	2190.1 ± 1356.4
HT 115 IPTG RNAsa	1.63 ± 0.02	27.64 ± 18.35	1382.2 ± 917.6
Plant	1.68 ± 0.01	41.87 ± 23.70	2093.3 ± 1185.0
Plant RNAsa	1.54 ± 0.02	49.96 ± 21.30	2497.9 ± 1065.1
Plant IPTG	1.69 ± 0.02	49.30 ± 31.20	2465.2 ± 1560.2
Plant IPTG RNAsa	1.66 ± 0.03	41.61 ± 32.56	2080.6 ± 1628.2
RHBP	1.68 ± 0.00	37.11 ± 7.43	1855.5 ± 371.6
RHBP RNAsa	1.61 ± 0.02	26.78 ± 16.73	1339.2 ± 836.3
RHBP IPTG	1.69 ± 0.02	41.29 ± 32.68	2064.7 ± 1634.2
RHBP IPTG RNAsa	6.49 ± 0.02	35.74 ± 16.88	1787.0 ± 844.2

Cuadro 3: ANOVA de un factor para determinar diferencia entre producción de ARNdh Plant y RHBP

Valor P	0.819
---------	-------

## B. Resultados sobre ninfas de segundo estadio

No se observó diferencia en la media del tiempo de movilización de las ninfas de 2° estadio (Figura 11). Los resultados de la ANOVA se observan en el Cuadro 1, donde se puede observar que el valor estadístico  $p > 0.05$  por lo que se concluye que no existe diferencia entre los 4 grupos. Tampoco se pudo observar muda durante 17 días en ninguno de los 4 grupos experimentales.

Cuadro 4: Estadísticas descriptivas del tiempo que le tomó a cada individuo movilizarse de un punto a otro. Todas las medias son estadísticamente iguales según un ANOVA  $p=0.909$ .

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Mínimo (seg)</b>	<b>Máximo (seg)</b>	<b>Rango Intercuartil</b>	<b>Media (seg)</b>
<b>Control</b>	72	3	600	86	116.32
<b>Bacteria</b>	36	2	600	67	130.69
<b>Planta</b>	42	7	600	84	140.86
<b>RHBP</b>	44	6	600	39	107.09
<b>ANOVA</b>	=0.909				

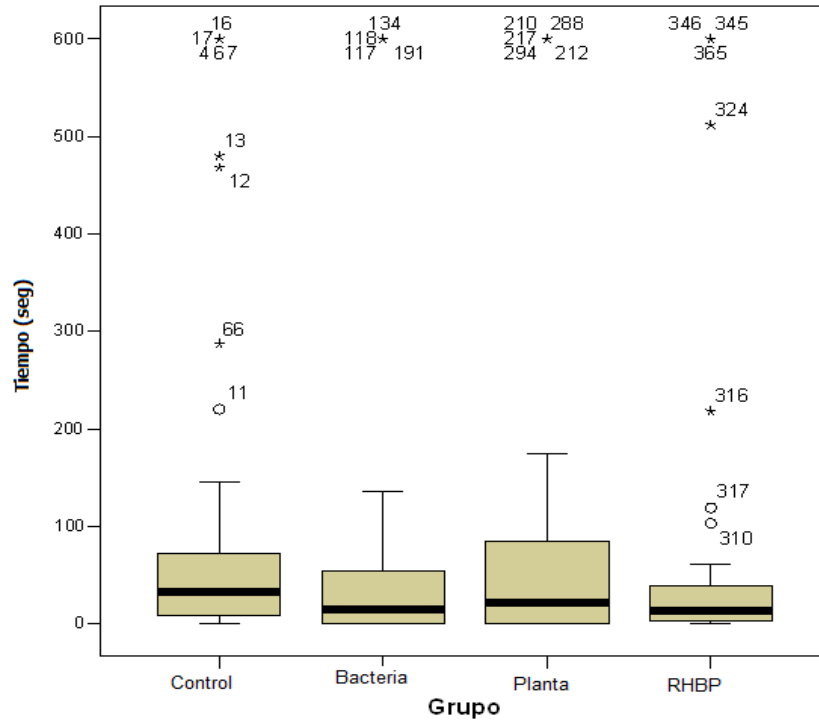


Figura 11: Tiempo que le tomó a cada individuo de *R. prolixus* para movilizarse del punto A al punto B diariamente durante 16 días hasta su muda o final del experimento. Grupo control (individuos alimentados solo con sangre, n=20), Bacteria (individuos alimentados con *E. coli* HT115 que no produce ARNdH, n=20), Planta (individuos alimentados con *E. coli* HT115 produciendo ARNdH de *A. thaliana*, n=20) y RHBP (alimentados con bacteria *E. coli* HT115 produciendo ARNdH del gen RHBP, n=20).

Se realizó una ANOVA para determinar lo que se observa en la Figura 11 y se comprobó que no hay diferencia significativa entre grupos (datos en Anexos)

**C. Caracterización de RHBP-apo y RHBP-hemo circulante en la hemolinfa de hembras alimentadas con bacteria productora de ARNdH.**

Los espectros obtenidos durante el proceso de saturación, con y sin normalización, se encuentran en el Anexo. Los datos recopilados en las lecturas del espectrofotómetro se resumen en la Figura 12, donde se muestra la concentración de hemina agregada hasta el momento en que se observó un cambio de la longitud de onda en la cual se identificaba la absorbancia máxima del espectro. El cambio de dicha longitud de onda representa la saturación de la proteína unida al grupo hemo, la cual absorbe a 412nm, y la presencia de hemina libre, la cual absorbe a 395nm. Se puede observar que algunos de los individuos del grupo experimental presentan una tendencia diferente en cuanto a la forma de saturación respecto a los tres grupos de controles.

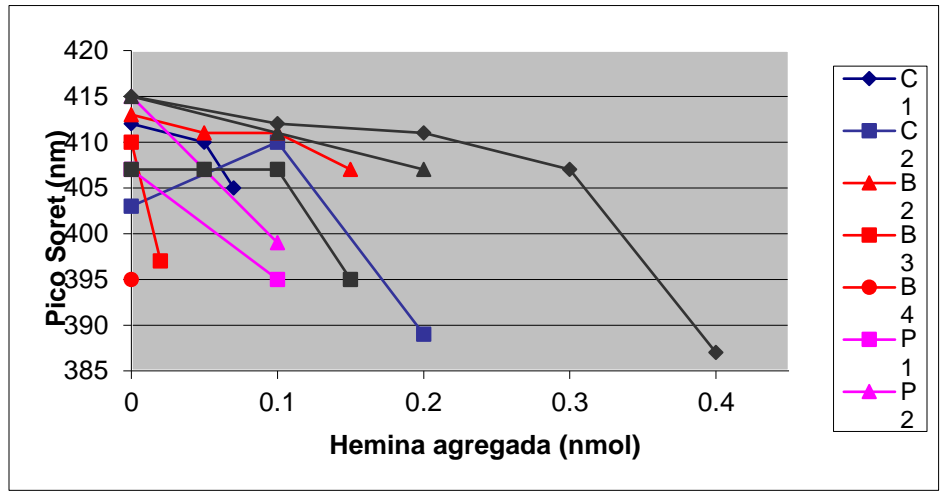


Figura 12: Cambio del punto de máxima absorbancia luego de agregar hemina a la muestra de hemolinfa. En el eje X se encuentra la cantidad de hemina agregada en nmol y en el eje Y la longitud de onda en la que el espectro muestra la máxima absorbancia. En las leyendas se puede encontrar una letra refiriéndose a los diferentes grupos y un número refiriéndose a los diferentes individuos dentro del grupo, siendo C el grupo control solamente alimentado con sangre, B el grupo alimentado con *E. coli* HT115 que no produce ARNdH, P fueron individuos alimentados con *E. coli* HT115 produciendo ARNdH del gen control de *A. thaliana* y R fue el grupo experimental que se alimentó con una bacteria *E. coli* HT115 produciendo ARNdH del gen RHBP.

Basándose en las absorbancias obtenidas se determinó la cantidad relativa de proteína RHBP unida al grupo hemo en relación con la proteína total. Esta diferencia en la relación se puede observar en la Figura 13. En dicha figura se puede confirmar la tendencia observada en la Figura 12 donde los organismos del grupo experimental presentan una menor cantidad de proteína RHBP-hemo en relación al total de proteína RHBP-apo. En general, se observa que existe en las muestras control una tendencia a ver poca proteína en su forma apo, ya que la mayoría muestran absorbancias cercanas antes y después de la saturación.

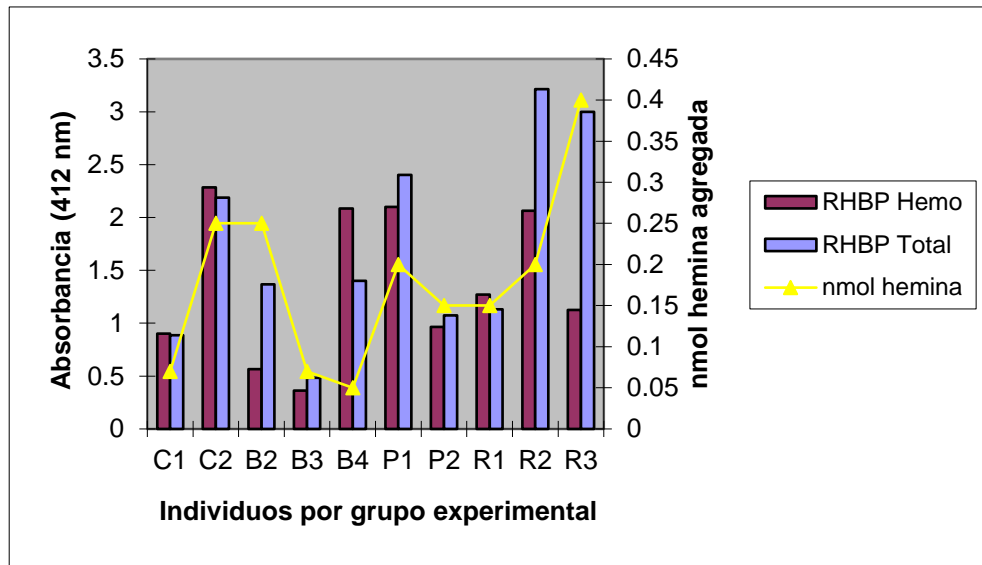


Figura 13: cantidad de proteína RHBP total y unida a hemina presente en la hemolinfa de *R. prolixus* hembras. En el eje X se observa la absorbancia de la proteína a 412 nm en rojo se encuentra la proteína unida a hemo encontrada en la hemolinfa y en azul la proteína total encontrada, en el eje X se observan los diferentes individuos siendo la letra el grupo al que pertenece y el número el individuo. C (grupo control solamente alimentado con sangre), B (grupo alimentado con *E. coli* HT115 que no produce ARNdh), P (grupo alimentado con *E. coli* HT115 produciendo un ARNdh de *A. thaliana*) y R (grupo alimentado con una bacteria *E. coli* HT115 produciendo ARNdh del gen RHBP). Asimismo en el lado derecho del eje Y se observa los nmol de hemina agregados a cada muestra.

Con objetivo de observar si las tendencias se mantenían en las figuras 12 y 13 se realizó una curva de sobrevivencia en la cual se tomó como tiempo la cantidad de hemina observada y como suceso la saturación. Esto se puede observar en la Figura 14. En ella podemos observar que nuevamente el comportamiento del grupo alimentado con bacterias que expresan ARNd<sub>h</sub> de RHBP tiende a requerir mayores cantidades de hemina para su saturación.

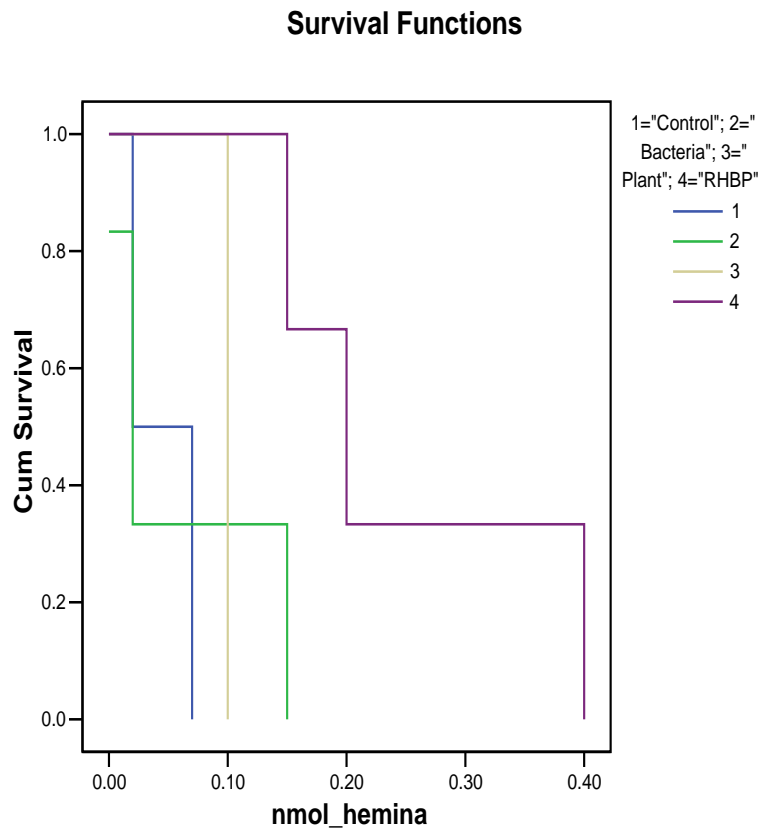


Figura 14: Funciones de sobrevivencia tomando nmol de hemina agregado como tiempo y saturación como suceso. Control representa el grupo control solamente alimentado con sangre, Bacteria el grupo alimentado con *E. coli* HT115 que no produce ARNd<sub>h</sub>, Plant el grupo alimentado con *E. coli* HT115 produciendo ARNd<sub>h</sub> de *A. thaliana* y RHBP el grupo experimental que se alimentó con bacteria *E. coli* HT115 produciendo ARNd<sub>h</sub> del gen RHBP.

Por último, para determinar si la diferencia en la curva de sobrevivencia era significativa se realizó una prueba de ranking logarítmico los resultados de la misma se observan en el Cuadro 4. Este demuestra que no hay significancia entre el grupo experimental y los controles sin embargo como se observó una tendencia y estos datos no concuerdan con otros reportados se realizó una SDS-PAGE para determinar la presencia de la proteína.

Cuadro 5: Prueba de ranking logarítmicos realizada para determinar si la cantidad de hemina agregada a cada grupo es significativamente diferente.

	Estadístico	df	Valor p
Ranking logarítmico	6.78	3	0.0792

Luego de realizar la saturación de la hemolinfa con hemina se realizó un SDS-PAGE en donde se puede observar la proteína de interés únicamente en la muestra R2 y levemente en C1 (Figura 15). En la muestra B4 observan otras proteínas pero no RHBP.

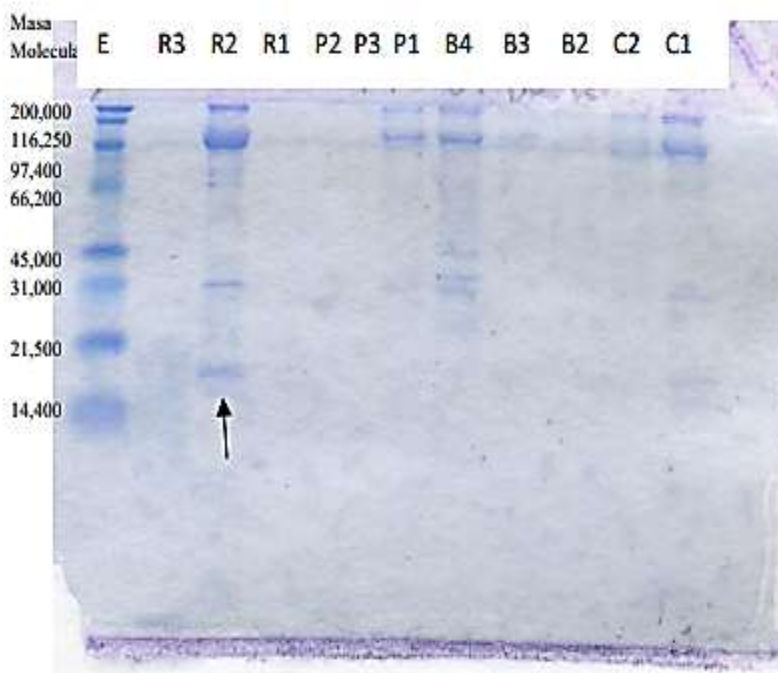


Figura 15: Gel de poliacrilamida desnaturalizado teñido con azul de Comassie. Se cargaron 2  $\mu$ L de hemolinfa en cada pozo y se muestra con una flecha la proteína RHBP. Como marcador de masa se utilizó un estándar de masa molecular de amplio rango (BioRad, Estados Unidos) y Con masas moleculares de 200,000; 116,250; 97,400; 66,200; 45,000; 31,000; 21,500 y 14,400. La letra se refiere a los diferentes grupos y los números se refieren a los diferentes individuos dentro del grupo, siendo C el grupo control solamente alimentado con sangre, B el grupo alimentado con *E. coli* HT115 que no produce ARNdh, P fueron individuos alimentados con *E. coli* HT115 produciendo ARNdh del gen control de *A. thaliana* y R fue el grupo experimental que se alimentó con una bacteria *E. coli* HT115 produciendo ARNdh del gen RHBP.

## VIII. DISCUSIÓN

Este estudio está basado en estudios previos sobre la expresión del gen de RHBP en *R. prolixus* y el silenciamiento del gen utilizando bacterias que expresan ARNdh para dicho gen. Dichos estudios mostraron que el gen de RHBP es expresado en el cuerpo graso de todos los estadios de *R. prolixus* y que esta proteína es secretada a la hemolinfa en su forma saturada con el grupo hemo, transportando este grupo a distintos tejidos de forma que se acumulan en la hemolinfa tanto la forma apo como hemo (Oliveira, 1995). La RHBP es una proteína principal del huevo de *R. prolixus*, proveyendo el grupo hemo necesario en embriogénesis (Braz *eta al*, 2002). Posteriormente se comprobó el silenciamiento temporal de la expresión del gen de RHBP en *R. prolixus* cuando las hembras son inyectadas intratorácicamente con ARNdh del RHBP, resultando en una producción de huevos estériles que no contienen la RHBP (P. Pennington, comunicación personal).

Nuestro grupo ha demostrado un silenciamiento temporal del gen cuando las hembras ingieren altas concentraciones de bacterias modificadas genéticamente para producir ARNdh del gen de RHBP (Taracena 2011, Pennington, 2010). Dicho estudio mostró que un fenotipo derivado del silenciamiento es la reducción de la ovipostura en las hembras, reduciendo la producción del primer grupo de oocitos terminales (Pennington, 2010). Adicionalmente, se ha comprobado que al alimentar ninfas de tercer estadio con ARNdh puro (Juárez, 2010) o con bacterias transformadas se logra silenciar el gen al nivel de ARN (Taracena, 2011) y esto tiene un efecto leve en la cinética de la acumulación de RHBP total en la hemolinfa de ninfas de 3er estadio (Pennington, 2010).

Para continuar caracterizando el efecto del silenciamiento mediado por la alimentación con bacterias que expresan ARNdh, se escogieron dos modelos: evaluación del efecto de las bacterias en la motilidad de ninfas de segundo estadio y la caracterización de la proteína RHBP circulante en la hemolinfa de hembras.

El modelo para evaluar efectos sobre la motilidad de ninfas de segundo estadio se basó en observaciones de estudios anteriores en los cuales se observó que algunas ninfas de tercer estadio mostraban movimientos asincrónicos al ingerir ARNdh de RHBP (Juárez, 2010). El modelo para caracterizar la proteína en hembras pretendía determinar si la relación apo/hemo de la proteína RHBP se veía afectada dado que se ha reportado que la cantidad total de proteína no se ve afectada a pesar de que la ovipostura es reducida (Taracena, 2011).

Se extrajo ARNdh de las bacterias para comprobar la producción de ARNdh y, se encontró que al tratar las bacterias luego de la inducción con IPTG, las bacterias con el plásmido para producción de ARNdh tienen una alta concentración de ARN que no es degradado por RNAsaA.

La identificación de fenotipos como efectos del silenciamiento requiere de observaciones sobre la biología del insecto. Un fenotipo que se ha observado en estudios previos es el tiempo que toma mudar de un estadio al otro (Pennington, 2010). Se ha observado que al alimentar ninfas de primer estadio con ARNdh puro, se retrasa el tiempo que toma mudar a segundo estadio por dos días (Pennington, 2010). La falta de muda en todos los grupos experimentales se puede deber a que los especímenes se mantuvieron en tubos separados y que la muda requiera de agregación (Guillermo Juárez, com. personal). Para observar si el ARNdh causaba efectos en la motilidad, se evaluó el tiempo que tomaba el traslado de las ninfas entre dos puntos definidos, asumiendo que, de tener algún problema de motilidad, el tiempo necesario para realizar este recorrido sería mayor. Las observaciones se realizaban siempre a la misma hora y en el mismo orden para, minimizar los efectos externos, como el ciclo circadiano. Como se presenta en el cuadro 1, no hubo diferencia alguna entre grupos. Esto sugiere que las observaciones realizadas por Juárez 2010 se pueden deber a distintos factores no relacionados con la ingesta del ARNdh o que este efecto no se pudo observar en el modelo de ninfas de segundo estadio.

Estudios anteriores han reportado que los niveles de proteína no se ven afectados al ingerir bacterias productoras de ARNdh, sin embargo los niveles de ARNm sí se ven afectados durante los primeros cinco días post-alimentación con bacterias productoras de ARNdh de RHBP (Taracena, 2011). El efecto en la ovipostura se detecta durante los

primeros cuatro días post-alimentación, inhibiendo la formación de los oocitos terminales de la primera producción de vitelogénesis. Esto sugiere que el efecto del silenciamiento debe inhibir la incorporación de la proteína RHBP al huevo durante esta ventana de tiempo. Dado que la proteína total no parece cambiar en este momento, el presente estudio propuso como hipótesis que el silenciamiento afecta la cantidad de la proteína hemo en relación a la proteína total. La proteína hemo es reclutada al oocito por endocitosis mediada por receptores de forma específica, y una variación en su proporción podría causar la disminución en ovispostura de hasta un 60% en hembras (Pennington, 2010, Taracena 2011). Para comprobar si el estado de la proteína cambia, se realizó un análisis en el que se mide la cantidad de proteína RHBP-hemo presente en la hemolinfa extraída del insecto y luego se satura con hemina hasta llegar a un punto donde toda la proteína este saturada para comparar la relación entre RHBP-hemo y RHBP-apo circulante en la hemolinfa.

Los datos obtenidos en este experimento se muestran en las figuras 12 a 14, en ellas se puede observar que no hay diferencia significativa entre los grupos. En la Figura 13 se observa que algunas absorbancias son mayores al rango de 0.1-1 AU en el que se recomienda trabajar. Esto no presentó problemas con los datos actuales pero es preferible trabajar con muestras más diluidas por lo que en futuros trabajos se deberían utilizar diluciones 1:5 en lugar de 1:3.

Se puede observar en la figura 13 que la proporción de RHBP-hemo en relación a la RHBP-total es más baja que en la mayoría de grupos control. Esta diferencia fue comparada estadísticamente y se observó que no existe diferencia significativa para suponer un efecto. Esto concuerda con datos obtenidos por Taracena en una réplica experimental usando hemolinfa combinada de varias hembras, en los cuales observó que no existía diferencia en la relación apo/hemo al tercer día (Taracena, com. personal). Se determinó que la absorbancia de la hemolinfa a 412 nm era muy baja comparada con otros experimentos (Paiva-Silva, 2002) y para comprobar la presencia de la proteína se realizó un SDS-PAGE en el cual se puede observar la baja concentración de la proteína en la mayoría de las muestras. Las muestras B4, R2 y C1 son las únicas muestras donde pudo visualizarse la proteína. Para cada grupo, las muestras con mayor absorbancia fueron B4, R2, P1 y C2. Existe alguna concordancia entre la absorbancia y la cantidad de proteína en

el gel, pero no es una relación directa. Solo se observa que las muestras R2 y C1 presentan suficiente proteína para mostrar la presencia de la proteína RHBP (Figura 15). Es muy probable que esto se deba a un proceso de degradación de la misma durante la extracción y/o preservación y descongelamiento. En futuros estudios se debería de congelar inmediatamente con nitrógeno líquido la hemolinfa luego de extraída y luego almacenarla a  $-70^{\circ}\text{C}$  para evitar la degradación. El amortiguador contenía inhibidores de proteasas (PMSF), el cual es un inhibidor de proteasas de serina. Es posible que la hemolinfa contenga otro tipo de proteasas, por lo que sería importante evaluar el uso de un coctel de inhibidores con distintos blancos.

A pesar de la degradación observada y el tamaño pequeño de muestra con el cual no se pueden obtener resultados estadísticamente válidos el presente trabajo sirvió para estandarizar un método para la detección de la relación apo/hemo en hemolinfa de hembras. Este método complementa el desarrollado previamente para medición con HPLC.

## IX. CONCLUSIONES

- No se detecta diferencia en la motilidad de ninfas de segundo estadio al alimentarlas con bacteria productora de ARNdh de RHBP comparado con los controles.
- La técnica de espectrofotometría descrita en el estudio es adecuada para medir la relación apo:hemo de la proteína RHBP circulante en la hemolinfa de hembras de *R. prolixus*.
- No se detecta diferencia en la relación RHBP-hemo:RHBP-apo en las hembras alimentadas con bacteria productora de ARNdh de RHBP.

## **X. RECOMENDACIONES**

Dada la importancia biológica de la agregación de estos insectos, se recomienda realizar experimentos con ninfas en los que estas se encuentren agrupadas.

Se recomienda realizar el experimento para medición de RHBP con un número de individuos más grande para poder tener una muestra significativa y poder tener conclusiones con significancia estadística.

Se recomienda no enfriar a los especímenes para la extracción de hemolinfa, ya que reduce la cantidad que se logra extraer.

Sería recomendable medir la cantidad de proteína en las muestras de hemolinfa para normalizar los datos.

Al repetir el experimento se debería congelar inmediatamente la hemolinfa en nitrógeno líquido y luego mantener a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  para evitar degradación proteica.

Se deberá volver a determinar la dilución para analizar con el espectrofotómetro, ya que la absorbancia sería mayor sin degradación de proteína.

## XI. LITERATURA CITADA

- Araujo, Ricardo, *et al.* 2006. <<RNAi of the salivary gland Nitrophorin 2 in the Triatomine Bug *R. prolixus* by dsRNA Ingestion or Injecion.>> *Insect Biochemistry and Mollecular Biology*. 36(9):683-693
- Beard, Ben, C. Cordon-Rosales y R. Durvasula. 2002 <<Bacterial symbionts of triatominae and their poteintial use in control of Chagas disease transmission>> *Annual Review of entomology*. (47)123-141
- Bráz, *et al.* 2001. <<*Rhodnius* Heme-Binding protein (RHBP) is a heme source for embryonic development in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae)>> *Insect Biochemistry and Mollecular Biology*. 32(4):361-367
- Castro, José, M. Montalto y L. Bartel. 2006. <<Toxic side effects of drugs used to treat Chagas disease. >> *Human & Experiment Toxicology*. (25):471-479
- Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet (revise in june 2010)*. 2010. World Health Organization. (WHO)
- Chagas disease: A Latin American Nemesis*.2007. Institue for OneWorld Health. (iOWH) 105 págs.
- Control of Chagas disease*. 2002. World Health Organization.(WHO) 109 págas.
- Dansa-Peterski, Marílvia, *et al.* 1995. <<Antioxidant role of *R. prolixus* heme-binding protein>>. *The Journal of Biological Chemestry*. 270(18):10893-10896
- de Souza, Wenderley, T. Ulisses y E. Santos. 2010. <<Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell infection>>. *International Journal of Cell Biology*
- Djuran, Jean, *et al.* 1998. <<The origin of *R. prolixus* in Central America>>. *Medical and Veterinary Entomology*. (12):113-115

- Durvasula, Ravi, *et al* 1999. <<Strategy for Introduction of Foreign Genes into Field Populations of Chagas Disease Vector>>. *Annals of the Entomological Society of America* 92(6):937-943
- Fire, Andrew, *et al.* 1998. <<Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *C. elegans*>>. *Nature*. 19;391(6669):806-11
- Juárez, Guillermo. <<Evaluación de métodos para inducir interferencia de ARN por medio de ARN de doble hebra en la expresión del gen RHBP (Rhodnius Heme-Binding Protein) en ninfas de *Rhodnius prolixus* Stahl 1859, vector de la enfermedad de Chagas>>. Tesis Universidad del Valle de Guatemala
- McKerrow, James, *et al.* 2009. <<Two approaches to discovering and developing new drugs for chagas>>. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*. 104(I):263-269
- Moncayo, Álvaro, M. Ortíz. 2006. <<An update on Chagas disease>>. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 100(8):663-677
- Nakagawa, Junichi, *et al.* 2003 <<Impact of residual spraying on *Rhodnius prolixus* and *Triaroma dimidiata* in the department of Zacapa in Guatemala>> *Mem inst Oswaldo Cruz* 98(2):277-281
- Nakagawa, Junichi, *et al.* 2005. <<Geographical characterization of the triatomine infestations in northern-central Guatemala>>. *Annals of Tropical Medicin and Parasitology*. 99(3):307-15
- Ngô, Huân, *et al.* 1998. <<Double-stranded DNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*>>. *Proceeding of the National Academy of Science of the Unites States of America*. 8;95(8):14687-92
- Oliveira, Pedro, *et al.* 1995. <<A heme-binding protein from hemolymph and oocytes of the blood sucking insect *R. prolixus*>>. *The Journal of Biological Chemistry*. 270(18):10893-10896

- Pavia-Silvia, Gabriela, *et al.* 2002. <<On the biosynthesis of *Rhodnius prolixus* heme binding protein>>. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. (32):1533-1541
- Pedrini, Nicolás, *et al.* 2009. <<Control of pyrethroids-resistant chagas disease vector with entomopathogenic fungi>> *PLOS neglected tropical diseases* 3(5):e434
- Pennington, Pamela. 2010. << Evaluación de una molécula como candidata para blanco de un insecticida microbiano contra los vectores de la enfermedad de chagas>>. FODECYT 039-2007
- Saleh, Maria-Carla, *et al.* 2006. <<The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing>>. *Nature cell biology*. 8(8):793-802
- Schilman, Pablo, S. Minoli y C. Lazzari. 2009. <<The adaptive value of hatching towards the end of the night: lessons from eggs of the haematophagous bug *Rhodnius prolixus*>>. *Physiological Entomology*. (34):231-237
- Taracena, Mabel. 2011 << Bacterial delivery of dsRNA with a potential insecticidal effect in *Rhodnius prolixus*>>. Tesis. Universidad Federal de Rio de Janeiro
- Tijsterman, Marcel; R. F. Ketting y R.H.A. Plasterk. 2002. <<The Genetics of RNA Silencing>>. *Annual Reviews Genetics*. (36):489-515
- Tyler, Kevin y D. Engman. 2001. <<The life cycle of *Trypanosoma cruzi*>>. *International Journal of Parasitology*. (31):472:481

## XII. ANEXOS

Cuadro 6: Resultado de ANOVA comparando el tiempo que le toma a una ninfa de segundo estadio llegar de un punto a otro en una caja de petri.

	Suma de cuadrados	df	Media de cuadrados	F	Valor p
Entre grupos	17741.887	3	5913.962	.182	.909
Dentro de grupos	8128154.995	250	32512.620		
Total	8145896.882	253			