

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA



**"DETECCIÓN DE LOS OLIGOPEPTIDOS DEL VENENO
DE LA HORMIGA *Pseudomyrmex* sp."**

TESIS

**QUE EN OPCION AL TITULO DE
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO**

**PRESENTA:
DELIA CAROLINA REYNA ALVARADO**

**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. DIANA RESENDEZ PEREZ**

JULIO 2006

“DETECTACION DE LOS OLIGOPÉPTIDOS DEL VEINENO

DE LA HORMIGA *Pseudomyrmex* sp.”

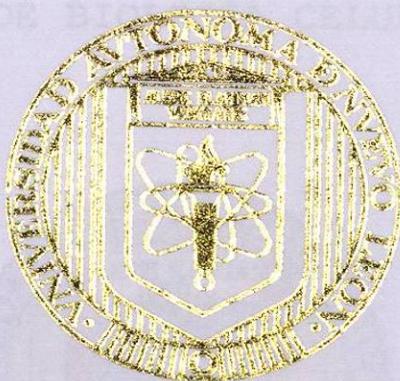
D. C. R. A.

TL
QL568
.F7
R49
2006
c.1



1080093201

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA



"DETECCION DE LOS OLIGOPEPTIDOS DEL VENENO
DE LA HORMIGA *Pseudomyrmex* sp."

TESIS

QUE EN OPCION AL TITULO DE
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

PRESENTA:

DELIA CAROLINA REYNA ALVARADO

DIRECTOR DE TESIS:

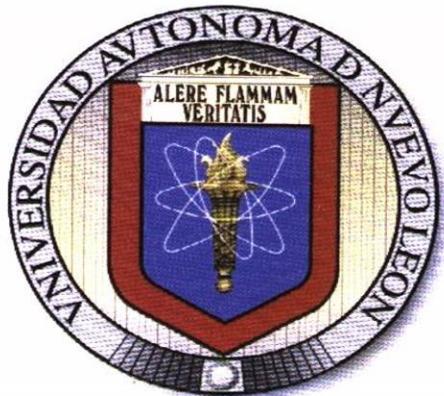
DRA. DIANA RESENDEZ PEREZ

JULIO 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA



**"DETECCIÓN DE LOS OLIGOPÉPTIDOS DEL VENENO DE LA
HORMIGA *Pseudomyrmex sp.*"**

TESIS

**QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITOLOGO**

PRESENTA:

DELIA CAROLINA REYNA ALVARADO

DIRECTOR DE TESIS:

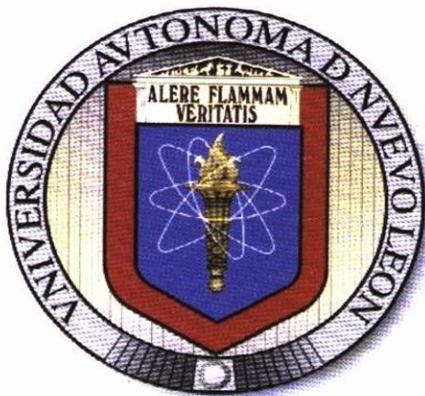
DRA. DIANA RESÉNDEZ PÉREZ

JULIO DEL 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA



"DETECCIÓN DE LOS OLIGOPÉPTIDOS DEL VENENO DE LA HORMIGA *Pseudomyrmex sp.*"

TESIS

QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO DE

QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO

PRESENTA:

Delia Carolina Reyna Alvarado

COMISIÓN DE TESIS

Dra. Diana Reséndez Pérez
Director

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Co-director

Dr. Mario Morales Vallarta
Secretario

Dr. Jorge Verduzco Martínez
Vocal

DEDICATORIA

En especial a Dios y para Aquella que subiendo bella como la luna, brillante como el sol y terrible como un ejército formado en batalla, por que me han iluminado, cuidado y fortalecido durante toda mi vida para concluir mis metas. Esta es una mas.

Para mis padres: Ruperto Reyna Manzanarez y Lidia Alvarado Robles por que a pesar de las caídas me han enseñado a levantarme siempre con la frente en alto.... gracias por esa paciencia tan grande, por la fuerza que transpiran, por todos los desvelos, por su comprensión siempre por robarles tiempo que les pertenecía y por todo su apoyo incondicional...a ustedes les debo lo que soy...

A mi hermano Alberto Reyna Alvarado por su paciencia y cariño aunque demuestre lo contrario...

A mi abuelita Ninfa Robles de Alvarado por que forma parte de mi presente gracias abuelita por tu apoyo y tus palabras de aliento siempre...tqm!!!

A la Familia Serna Vásquez por ser mi segunda familia, gracias por todo...los quiero mucho!

A mis excelentes amigos de generación: Suleida, Beto, Gaby, Claudia y Brenda. Nos quedan muchas cosas por vivir amigos!!

A todas esas personas que estuvieron a mi lado....

A toda mi generación de QBP's ...

A mis amigos los biologos y LCA's...

A Fermín Serna Vásquez por tu increíble apoyo, por tu paciencia, por tu cariño, por mantenerte siempre a mi lado cuando mas necesitaba de alguien...simplemente por ser tu quien ilumino un camino en penumbra...tu sabes cuanto te quiero...

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a la Dra. Diana Reséndez por que sin dudarlo me abrió las puertas de su laboratorio para formar parte de su equipo de investigación y me brindo toda su confianza para la realización de este proyecto, por sus consejos, por su valiosa amistad y por todo el apoyo. Muchas gracias...

A Titi (M.C Argentina Flores) por su grandiosa amistad y por que todavía recuerdo el día en el que tuvimos una gran charla y me animo para tomar esta gran decisión que ha marcado mi vida. Todavía recuerdo tus palabras...y los entrenamientos de volleyboll.

Al M.C Fermín Mar Aguilar (para mi ya Dr. Fermín Mar) por su grandiosa ayuda y por la aportación de las secuencias nucleotídicas para llevar a cabo la realización de esta tesis. Por ser mi primer tutor.... Muchas gracias Dr. !!

A cada uno de mis compañeros y amigos que forman parte de la Unidad de Biología del Desarrollo: al M.C Claudio Moreno por ayudarme y orientarme siempre desde que llegue al L8, y por todas esas convivencias tan especiales que espero nunca terminen (cheve-pizza), al Dr. Jorge Verduzco, por su apoyo, por sus valiosos consejos siempre y por alimentarnos con café y galletas los fines de semana o casi siempre!!, al Dr Mario Morales por su amistad y por permitirmos utilizar las instalaciones de su laboratorio....gracias profe!!!!, a Nancy Villarreal por su amistad tan sincera, por ser tan atenta y por estar siempre con esa gran disposición de ayuda...gracias Nancy!, a la M.C Maribel Luna por sus charlas y por que trabajar contigo ha sido un gustazo, a Karina por ese extraño humor que compartimos que bien nos sienta y por que has sido una grandiosa amigui!!, a Ixchelt por su sensibilidad, su resistencia y por estar tan cerca (por las consultas gratis!), a Arturo por ser amigo inseparable en este tiempo, por compartir trabajo de laboratorio, tristezas, cosquilleos y risas, a Melisa por ser simplemente Melisa!!, es un honor tenerte como amiga!!!, a Wendy que a pesar de que se encuentra un poco lejos recordare sus frases universales (excelente compañía en el L8), al M.C Ricardo Canales por los cafés y su agradable compañía en el L8 divagando temas, etc., a Yenny por su amistad y su generosidad, a Alejandra por su charlas sobre el espacio!!!, a Izaskun por ser una gran persona (invítame a España!!), a la M.C Jeanny por estar siempre ahí al pendiente de todo mientras realizaba este proyecto... gracias Jeanny!, a Diana por su grata compañía y todas esa platicas, a Paco por su entera disposición siempre...y mantenerme al tanto de todo!!, y finalmente a los nuevos integrantes y futuros científicos: Carlos, Alejandro, Salomé, Yadira, Carolina e Irepan.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT # 39479-Q) y al Programa de Apoyo a la Investigación en Ciencia y Tecnología (PAICYT proyecto # CN1130-05) por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

Sentimos que aun cuando todas las posibles
cuestiones científicas hayan recibido respuesta,
nuestros problemas vitales todavía no se han rozado lo mas mínimo.
Por supuesto que entonces ya no queda pregunta alguna;
y esto es precisamente la respuesta.

Ludwig Wittgenstein
Tractatus Logico-Philosophicus

**"DETECCIÓN DE LOS OLIGOPÉPTIDOS DEL VENENO DE LA
HORMIGA *Pseudomyrmex sp.*"**

PRESENTA

DELIA CAROLINA REYNA ALVARADO

Área de Trabajo

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología y Virología y en el Departamento de Biología Celular y Genética, de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León en Monterrey, N.L., bajo la asesoría de la Dra. Diana Reséndez Pérez.



TABLA DE CONTENIDO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. HIPÓTESIS	5
4. OBJETIVOS	6
4.1 Objetivo general	6
4.2 Objetivos particulares	6
5. ANTECEDENTES	7
5.1 Venenos	7
5.2 Importancia de las diferentes toxinas en los venenos	8
5.2.1 Toxinas producidas por caracoles conídicos	8
5.2.2 Toxinas producidas por escorpiones	9
5.2.3 Toxinas producidas por arañas	9
5.2.4 Toxinas producidas por anémonas	10
5.2.5 Toxinas en serpientes	10
5.2.6 Toxinas producidas por hormigas	10
5.3 Composición de los venenos	11
5.3.1 Veneno de Himenópteros	11
5.3.2 Veneno de Serpientes	12
5.3.3 Veneno de Escorpiones	12
5.3.4 Veneno de Hormigas	13
5.3.4.1 Veneno de <i>Pseudomyrmex triplarinus</i>	13
5.4 Biogénesis de los péptidos	15
5.5 Procesamiento de los péptidos en las glándulas venenosas	15
5.6 Rutas secretorias de los venenos peptídicos	16
5.6.1 Ruta constitutiva	17
5.6.2 Ruta reguladora	17
5.7 IMPORTANCIA	18
6. MATERIALES Y METODOS	19
6.1 Colecta de la hormiga <i>Pseudomyrmex sp.</i>	19
6.2 Observación y disección morfológica	19
6.3 Transcripción <i>in vitro</i> de las secuencias nucleotídicas codificantes a los péptidos de bajo peso molecular	20
6.3.1 Obtención de las secuencias nucleotídicas	20
6.3.1.1 Preparación y transformación de bacterias competentes de <i>Escherichia coli.</i>	20
6.3.1.2 Obtención del DNA plasmídico mediante minipreparación por el método de lisis alcalina	21
6.3.1.3 Electroforesis de DNA plasmídico en gel de agarosa	21



6.3.1.4 Digestión de los DNAs plasmídicos con enzimas de restricción	21
6.3.1.5 Diseño de los oligonucleótidos con el promotor T7	22
a) T7-SS2	22
b) T7-LS1	23
6.3.1.6 Purificación de los DNAs amplificados T7-SS2 y T7-LS1 a partir de geles de agarosa	24
6.3.1.7 Transcripción <i>in vitro</i> de T7-SS2 y LS1	25
6.3.1.8 Visualización de los RNAs en condiciones desnaturalizantes usando glioxal	25
6.4 Traducción <i>in vitro</i> de los RNAs de la hormiga <i>Pseudomyrmex</i> sp.	25
6.4.1 Obtención del RNA total de la hormiga <i>Pseudomyrmex</i> sp.	25
6.4.1.1 Procesamiento del gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes	27
6.4.2 Extracción del RNA poliA ⁺	27
6.5 Estandarización de los anticuerpos anti-SS1 y LS1	29
6.5.1 Expresión de las proteínas de fusión MBP-SS1 y MBP-LS1	29
6.5.2 Detección de las proteínas de fusión en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	29
6.5.3 Inmunodetección mediante Western-blot	30
6.6 Traducción <i>in vitro</i>	31
6.7 Inmunodetección de los péptidos de bajo peso molecular en extractos protéicos de <i>Pseudomyrmex</i> sp.	32
6.7.1 Extractos protéicos de hormiga <i>Pseudomyrmex</i> sp.	32
6.7.2.1 Homogenización	32
6.7.2.2 Detección de los péptidos en extractos proteicos	33
6.7.2 Inmunodetección de los péptidos de bajo peso molecular en los extractos protéicos de la hormiga <i>Pseudomyrmex</i> sp.	33
7. RESULTADOS	33
7.1 Observación morfológica de la hormiga <i>Pseudomyrmex</i> sp.	34
7.2 Disección de la hormiga <i>Pseudomyrmex</i> sp.	34
7.3 Transcripción <i>in vitro</i> de las secuencias codificantes a los péptidos de bajo peso molecular	36
7.3.1 Secuencia codificante a T7-SS2	36
7.3.1.1 Obtención de la secuencia codificante a SS2	36
7.3.1.2 Amplificación mediante PCR de las secuencias codificantes a T7-SS2	36
7.3.2 Secuencia codificante a T7-LS1	37
7.3.2.1 Obtención del DNA plasmídico de pCR-TOPO 2.1-LS1	37
7.3.2.2 Amplificación mediante PCR de la secuencia codificante a T7-LS1	38
7.3.3 Transcripción <i>in vitro</i> de T7-SS2 y LS1	39
7.4 Traducción <i>in vitro</i> de los RNAs de la hormiga <i>Pseudomyrmex</i> sp.	39
7.4.1 Obtención de los RNAs totales de la hormiga <i>Pseudomyrmex</i> sp.	39
7.4.2 Obtención de RNA poliA ⁺ de la hormiga <i>Pseudomyrmex</i> sp.	40



7.4.3 Estandarización de los anticuerpos anti-SS1 y LS1	40
7.4.4 Traducción <i>in vitro</i>	41
7.5 Inmunodetección de los péptidos de bajo peso molecular en extractos protéicos de <i>Pseudomyrmex sp.</i>	43
7.5.1 Detección de los péptidos de bajo peso molecular en extractos de la hormiga <i>Pseudomyrmex sp.</i>	43
7.5.2 Inmunodetección de las subunidades menores de la hormiga <i>Pseudomyrmex sp.</i>	45
7.5.3 Inmunodetección de las subunidades mayores de la hormiga <i>Pseudomyrmex sp.</i>	46
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	50
9. LITERATURA CITADA	53
10. APÉNDICE	62
11. ANEXO	65



LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius	SS2	Subunidad menor 2
CaCl₂	Cloruro de calcio	SDS	Dodecil-sulfato de sodio
DNA	Ácido desoxirribonucleico	SDS-PAGE	Dodecil-sulfato de sodio gel de poliacrilamida
Da	Daltones	SB	Buffer con Hidróxido de sodio y ácido bórico
DEPC	Diethylpirocarbonato	TE	Tris-EDTA
dNTP's	Dinucleótidos trifosfatados	Tm	Temperatura media de alineamiento
DMSO	Dimetil Sulfoxido	Tris	Tris-hidroxi-metil aminometano
ECL	Sustrato de quimioluminiscencia	TEMED	N, N, N', N'- Tetrametiletildiamina
EDTA	Ácido etilen diamino-tetra-acético	TBS	Tris base-cloruro de sodio
g	gramos	TBS-T	Tris base-cloruro de sodio-Tween 20
HCl	Ácido clorhídrico	U	Unidades
HRP	Peroxidasa de rábano	U/ul	Unidades por microlitro
h	Horas	V	Voltio
IPTG	Isopropiltio-β-D-galactosidasa	μg	Microgramos
kDa	Kilodaltones	UV	Ultravioleta
LB	Medio de cultivo Luria Bertani	v/v	Volumen por volumen
LS1	Subunidad mayor 1	V/cm	Voltio por centímetro cuadrado
M	Concentración molar	X	Concentración con respecto a la solución
mA	Miliamperes	%	Porcentaje
MBP	Proteína de Unión a Maltosa	μl	Microlitros
MgCl₂	Cloruro de magnesio		
mg	Miligramos		
min	Minutos		
miliQ	Agua ultrapurificada		
mg/ul	Miligramo por microlitro		
mg/ml	Miligramo por mililitro		
ml	Mililitros		
mM	Concentración milimolar		
MOPS	3-(N-Morpholino) Ácido propanesulfónico		
NaCl	Cloruro de sodio		
NaOH	Hidróxido de sodio		
NaOAc	Acetato de sodio		
N	Concentración Normal		
nm	Nanómetros		
ng	Nanogramo		
ng/μl	Nanogramo por microlitro		
pb	Pares de bases		
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa		
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno		
PSA	Persulfato de amonio		
PVDF	Polivinildifluoruro		
RLU	Unidades relativas de luminiscencia		
RNA	Ácido Ribonucleico		
RNAse	Enzima ribonucleasa		
rpm	Revoluciones por minuto		
seg	Segundos		
SS1	Subunidad menor 1		



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema representativo de los aparatos venenosos de diferentes organismos.	8
2. Biogénesis de los péptidos.	15
3. Esquema representativo de la vía secretoria.	17
4. Diagrama representativo de la obtención del RNA total.	26
5. Representación de la obtención del RNA poliA ⁺ .	28
6. Esquema representativo de la transferencia de proteínas.	31
7. Colecta de las hormigas.	35
8. Anatomía de la hormiga.	35
9. Disección de la hormiga.	36
10. Obtención del DNA codificante SS2 a partir de pCR-TOPO 2.1-SS2.	37
11. Amplificación mediante PCR de la secuencia SS2 con el promotor T7.	38
12. Obtención del DNA codificante a LS1 a partir de pCR-TOPO 2.1-LS1.	39
13. Ampliación mediante PCR de la secuencia LS1 con el promotor T7.	40
14. Transcripción in vitro de T7-SS2 y T7-LS1	41
15. RNA total de la hormiga <i>Pseudomyrmex sp.</i>	42
16. Extracción de RNA poliA ⁺ de la hormiga <i>Pseudomyrmex sp.</i>	42
17. Estandarización de los anticuerpos anti-SS1 y anti-LS1.	43
18. Ensayos de traducción <i>in vitro</i> usando el RNA de luciferasa.	44
19. Análisis de los extractos protéicos de la hormiga <i>Pseudomyrmex sp</i>	44
20. Inmunodetección de los péptidos codificantes a las subunidades menores de la hormiga <i>Pseudomyrmex sp.</i>	46
21. Análisis del peso molecular de los péptidos precursores, péptidos intermedios y maduros en los extractos la hormiga <i>Pseudomyrmex sp</i>	47
22. Inmunodetección de los péptidos de las subunidades mayores de la hormiga <i>Pseudomyrmex sp.</i>	48
23. Análisis del peso molecular de los péptidos precursores, péptidos intermedios y maduros en los extractos. de la hormiga <i>Pseudomyrmex sp.</i>	49



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
I. Programa utilizado para la amplificación de la subunidad menor SS2	23
II. Programa utilizado para la amplificación de la subunidad mayor LS1	24
III. Reacción Estandar utilizada para realizar la Traducción <i>in vitro</i>	32
IV. Pesos moleculares detectados por el Programa Gel-PRO 3.1 Analyzer en la inmunodetección de las subunidades menores	46
V. Pesos moleculares detectados por el Programa Gel-PRO 3.1 Analyzer en la inmunodetección de las subunidades mayores	48



1. RESUMEN

Estudios en el veneno de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus* revelan la existencia de componentes con propiedades anti-inflamatorias, una alta actividad fosfolipasa así como una mediana actividad hemolítica. La caracterización de los componentes peptídicos del veneno de esta hormiga mostró que contiene 12 proteínas con pesos moleculares que van desde 4,200 Da hasta 100, 000 Da, con cuatro proteínas más abundantes, de las cuales la fracción que corresponde a los péptidos de bajo peso molecular demostró tener una alta actividad anti-inflamatoria. En el análisis de estos péptidos de bajo peso molecular se encontraron 6 isoformas diferentes con pesos moleculares que varían entre 6.998 y 7.142 kDas. Estas isoformas denominadas Mirmexinas I-VI son muy similares entre si y están constituidas de diferentes heterodímeros formados de una subunidad pequeña (SS1, SS2 ó SS3) unida mediante puente disulfuro a una subunidad mayor (LS1 ó LS2) en todas las combinaciones posibles.

El objetivo de esta tesis fue realizar la traducción *in vitro* de los RNAs codificantes a los péptidos de bajo peso molecular del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* para determinar el tamaño de los oligopéptidos, así como el procesamiento de los mismos en la glándula de la hormiga.

Para cumplir con el objetivo, se aislaron los RNAs totales y el RNA poliA⁺ del tejido de la hormiga y se utilizaron como testigos positivos las secuencias codificantes para SS2 y LS1 clonadas en el vector pCR-Topo 2.1 por el M.C Fermín Mar Aguilar (Tesis de Doctorado, FCB, 2006). Estas secuencias se amplificaron por PCR usando oligonucleótidos específicos con la secuencia de promotor T7 para la adición del mismo en ensayos de transcripción *in vitro*. Posteriormente, se llevo a cabo la estandarización de los anticuerpos policlonales anti-SS1 y LS1 mediante inmunodetección de las proteínas de fusión MBP-SS1 y MPB-LS1. Los resultados obtenidos mostraron que no fue posible detectar la traducción de los RNAs totales y RNA poliA⁺, ni de los transcritos obtenidos previamente en los ensayos de transcripción *in vitro* de las secuencias T7-SS2 y T7-LS1.

Debido a lo anterior, se realizó el análisis y detección de los oligopéptidos de bajo peso molecular mediante inmunodetección a partir de extractos protéicos del abdomen de la hormiga utilizando los anticuerpos policlonales anti-SS1 y LS1. Los extractos abdominales de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* obtenidos del tejido *in vivo* confirmaron la presencia de los péptidos de bajo peso molecular mediante geles de poliacrilamida Tricina-SDS-PAGE e inmunodetección en el abdomen de la hormiga. La inmunodetección permitió claramente la detección de los péptidos maduros tanto de las subunidades menores como de las mayores así como de los diferentes péptidos precursores e intermedios de las subunidades menores.

Consideramos que la falta de detección y/o variabilidad de los péptidos precursores e intermedios en la inmunodetección de la subunidades mayores es debida probablemente a la mayor susceptibilidad de estos péptidos a degradación y/o al procesamiento más rápido de los mismos en la glándula de la hormiga *Pseudomymirmex sp.* El análisis de los pesos moleculares obtenidos de los péptidos maduros y de las diferentes formas de procesamiento



corroboró la expresión y procesamiento de estos péptidos de bajo peso molecular en la glándula de la hormiga.

El presente trabajo abre la posibilidad para un análisis posterior que permita confirmar el procesamiento preciso de los péptidos de bajo peso molecular en la glándula de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* así como la presencia del propéptido encontrado en las secuencias nucleotídicas clonadas de la hormiga.



2. INTRODUCCIÓN

Los oligopéptidos naturales son pequeñas moléculas formadas por cadenas de 2 a 50 aminoácidos encontrados en todos los organismos vivos que presentan alta variabilidad. Estos péptidos son generalmente moléculas regulatorias debido a que la mayoría de ellos están involucrados en procesos de regulación fisiológica en diversos sistemas: nervioso, endocrino e inmune (Sewald y Jakube, 2002). La biogénesis de los péptidos esta caracterizada por la producción de un polipéptido precursor el cual esta compuesto por tres fragmentos: el péptido señal, el propéptido que pueden estar unidos a uno o varios péptidos maduros. Inicialmente, se libera el péptido señal quedando el propéptido y el péptido maduro y posteriormente mediante la acción de proteasas se libera el péptido maduro (Zamyatnin, 1990,1991, 2004).

Las funciones reguladoras de los oligopéptidos se extienden más allá de los límites de un solo sistema de órgano o de una especie biológica por ejemplo, los oligopéptidos antimicrobianos producidos por procariotes regulan la competencia de nichos ecológicos y funcionan simultáneamente en la comunicación intercelular (Woo *et al.*, 2003). Incluso las toxinas peptídicas de eucariotes desempeñan papeles importantes en reacciones de regulación interespecies (Zamyatnin, 1996).

Se conocen alrededor de 6000 oligopéptidos naturales que son producidos por síntesis ribosomal (Zamyatnin, 2004). Este número se ha ido aumentando por la adición de estructuras naturales producidas por bacterias y hongos como resultado de una síntesis no-ribosomal (Whitmore y Wallace, 2004).

La mayoría de los péptidos pueden ser aislados y purificados, y su estructura química puede ser determinada directamente. Aunque muchas secuencias aminoácidas también se deducen usando la traducción de las secuencias nucleotídicas correspondientes.

Muchos péptidos exhiben la existencia concurrente de formas múltiples producidas como resultado de las reacciones enzimáticas. La coexistencia de un péptido maduro con varias enzimas proteolíticas conduce a la degradación dando como resultado fragmentos cortos de la molécula inicial (Skeggs *et al.*, 1956). La producción de múltiples formas de péptidos ha sido considerada como un fenómeno común por ejemplo la somatostatina (Brazeau *et al.*, 1973 y Pradayrol *et al.*, 1980), el péptido atrial natriuretico (Iimura *et al.*, 1987 y Geller *et al.* 1984), etc. Por lo tanto, millones de péptidos probablemente también existan en formas múltiples, pero todavía no se identifican. Un mismo organismo puede presentar péptidos estructurales homólogos coexistentes con características funcionales idénticas. Sus secuencias aminoácidas contienen substituciones, sin embargo son codificados por diferentes genes con diferente secuencia nucleotídica y producidos independientemente y no como resultado de modificaciones postraduccionales (Kim *et al.*, 2000). Además, el splicing alternativo puede dar como resultado múltiples formas de RNAm que puede producir péptidos con estructura y función similar.



En la mayoría de los casos al parecer las familias de péptidos homólogos pueden inducir el mismo tipo de actividad, sin embargo existen familias peptídicas estructurales homólogas con actividades diversas (Lee *et al.*, 1988).

Debido a que existe poca información del procesamiento de los péptidos en general y prácticamente es nula en los péptidos de bajo peso molecular del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* en esta tesis nos enfocamos a analizar el tamaño de los oligopéptidos de bajo peso molecular presentes en el veneno de la hormiga *Pseudomyrmex sp.*



3. HIPOTESIS

La inmunodetección permitirá determinar los péptidos precursores, intermedios y maduros en los péptidos de bajo peso molecular presentes en el veneno de la hormiga *Pseudomyrmex* sp.



4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar el tamaño de los oligopéptidos de bajo peso molecular presentes en el veneno de la hormiga *Pseudomyrmex sp.*

4.2 Objetivos Particulares

1. Colecta, disección y análisis morfológico de la hormiga *Pseudomyrmex sp.*
2. Transcripción *in vitro* de las secuencias codificantes a los péptidos de bajo peso molecular.
3. Obtención del RNA total de la hormiga *Pseudomyrmex sp.*
4. Obtención del RNA poliA⁺ de la hormiga *Pseudomyrmex sp.*
5. Estandarización de los anticuerpos policlonales anti-SS1 y anti-LS1.
6. Traducción *in vitro* de los oligopéptidos que codifican a los péptidos de bajo peso molecular.
7. Obtención de extractos protéicos abdominales de la hormiga *Pseudomyrmex sp.*
8. Inmunodetección de los péptidos de bajo peso molecular a partir de los extractos protéicos abdominales de la hormiga *Pseudomyrmex sp.*



5. ANTECEDENTES

5.1 Venenos

Los venenos en sentido estricto, son aquellas sustancias capaces, incluso en cantidades muy pequeñas, de ocasionar la muerte a un individuo. En sentido más amplio, con este término se designan las sustancias capaces de provocar en el individuo una condición patológica en la que los tejidos orgánicos pueden ser lesionados de una manera temporal o permanente. Desde la antigüedad el hombre ha buscado y descubierto un gran número de venenos, en su mayor parte procedentes de animales, y se ha servido de ellos, tanto por su acción tóxica como por sus efectos curativos.

El mecanismo de acción de un veneno es variado y siempre muy complejo, pero en general se puede afirmar que la introducción de un veneno en el organismo determina una acción química o físico-química que modifica la composición y las propiedades de los componentes con los que el veneno entra en contacto y, como consecuencia de ello, provoca grandes desequilibrios orgánicos o funcionales o incluso la muerte. Muchos de estos venenos los podemos encontrar en plantas así como en animales terrestres e incluso en animales marinos debido a que ellos juegan un papel muy importante en el mecanismo de defensa contra predadores así como en la caza de sus presas (Mebs, 2001, Mackessy, 2002, Roodt *et al.*, 2005 y Córdoba *et al.*, 2006).

Los venenos juegan un papel de suma importancia en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos de origen natural contra trastornos neurológicos como esquizofrenia, ansiedad, enfermedad de Parkinson e incluso diabetes, esclerosis múltiple y enfermedades cardiovasculares. Actualmente, se conoce un rango muy amplio de diferentes venenos peptídicos que participan en la señalización del dolor y varios subtipos están implicados en estados clínicos semejantes al dolor, infarto y epilepsia. Los venenos crudos contienen una gran diversidad de diferentes péptidos, muchos de los cuales son bioactivos junto con una gran variedad de moléculas pequeñas, ricos en cisteínas, selectivos para receptores y para una gran variedad de canales iónicos (Jun *et al.*, 2003, Zeng *et al.*, 2003 y Wilson *et al.*, 2004).

Recientemente, un gran grupo de compuestos peptídicos de bajo peso molecular se han aislado durante las dos últimas décadas. Esta nueva clase de péptidos con diferentes propiedades químicas se sabe que exhiben propiedades antimicrobianas, esto ha sido elemental para el descubrimiento de nuevas drogas para el tratamiento de enfermedades bacterianas y fúngicas (Marshall y Arenas, 2003). Estos péptidos antimicrobianos han sido aislados de diferentes especies de vertebrados e invertebrados. La mayoría de estos han sido clasificados en base a sus propiedades bioquímicas y estructurales (Tossi y Sandri, 2002, Zasloff, 2002). Por ejemplo los llamados péptidos cationicos constituyen un grupo muy grande y donde casi el 50 % de ellos han sido aislados de insectos y entre los más importantes destacan las cecropinas que son una familia de 3-4 kDa aislada de la hemolinfa de insectos a principios de los 80's. Otras son las magaininas aisladas de la piel de la rana



Xenopus laevis (Hultmark *et al.*, 1980, Zasloff, 1987, Bechinger *et al.*, 1993, Andréu y Rivas, 1998, Boman, 1997, Simmaco *et al.*, 1998, Bulet *et al.*, 1999, Zheng y Zheng, 2002).

5.2 Importancia de las diferentes toxinas en los venenos

Se sabe que los venenos contienen toxinas de naturaleza peptídica que son asociadas con aparatos de envenenamiento especiales que permiten la inyección del veneno en los tejidos suaves de otros animales ya sea por vía subcutánea o por rutas intravenosas como se muestran en la Figura 1 donde se destacan los principales aparatos venenosos utilizados por diferentes organismos.

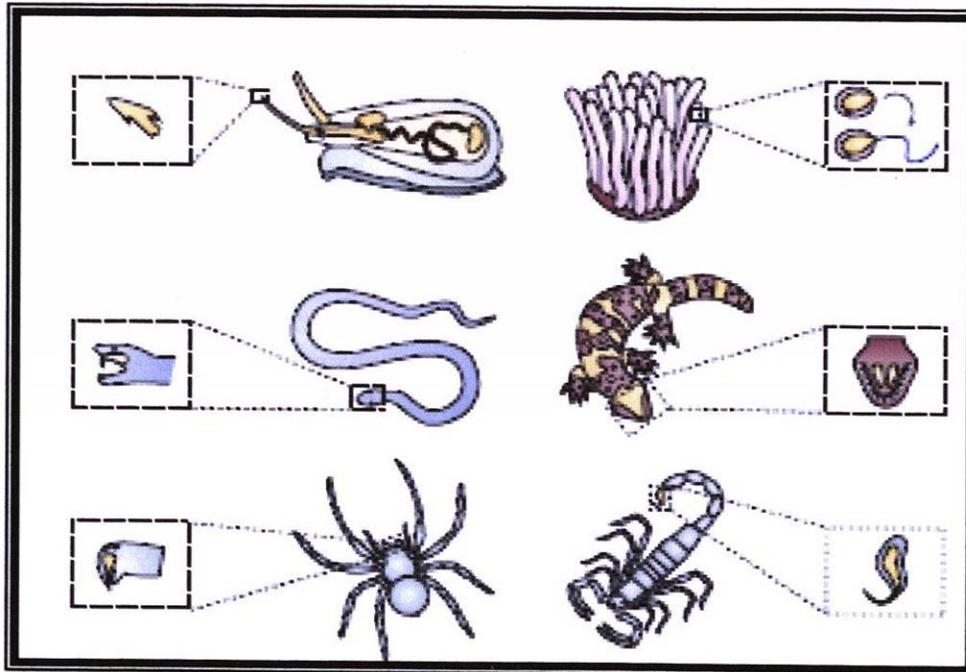


Figura 1. Esquema representativo de los aparatos venenosos de diferentes organismos. En el Caracol coníptico, anémona de mar, serpiente, monstruo de Gila, araña y escorpión. Se destacan los diferentes aparatos venenosos tales como nematocistos, arpón, dientes y aguijón. (Tomado de Lewis y García, 2003).

5.2.1 Toxinas producidas por caracoles conícticos

Ciertos venenos son producidos por caracoles conícticos, por ejemplo las ω -conotoxinas de 25 a 30 aminoácidos que son consideradas como herramientas con las que se puede identificar y determinar el papel fisiológico neuronal de diferentes canales de calcio. El flujo de Ca^{2+} dentro de las terminaciones nerviosas a través del potencial generado por los canales de calcio $-VSCCs-$ (del inglés, voltage-sensitive calcium channels) desencadena la liberación de neurotransmisores. Otro ejemplo de conotoxinas son las α -conotoxinas que son una clase de péptidos pequeños que inhiben competitivamente a los receptores de acetilcolina-nicotina (nAChRs). Por otro lado, las α -neurotoxinas han sido estudiadas intensamente uniéndose a diferentes nAChRs como un agente potencial con propiedades analgésicas. Dado el papel crucial en el sistema nervioso central y peritoneal no es sorprendente que los numerosos venenos de arácnidos, anémonas,



corales y caracoles quizás hayan evolucionado para tener como blanco estos canales (Eldridge *et al.*, 1992, Antil-Delbeke *et al.*, 2001, Palsk *et al.*, 2002, Lewis y García, 2003, Sandall *et al.*, 2003 y Santos *et al.*, 2003).

5.2.2 Toxinas producidas por escorpiones

Los venenos de los escorpiones son tradicionalmente estudiados por la presencia de neurotoxinas que afectan a los canales de sodio, potasio, calcio y cloro. Tal es caso del escorpión mexicano llamado *Hadrurus aztecus* donde se aisló de la hemolinfa el péptido llamado hadrurin el cual se descubrió que tiene propiedades antimicrobianas. Actualmente en los escorpiones africanos se han descubierto péptidos formadores de poros con estructura α -helicoidal con propiedades antibacteriales y antifúngicas como la parabutoporina aislada del veneno de *Parabuthus schlechteri* y las pandininas (Verdonck *et al.*, 2000, Torres *et al.*, 2000, Corzo *et al.*, 2001, Dai *et al.*, 2001, Dai *et al.*, 2002 y Moerman *et al.*, 2002). Otro de los péptidos aislados a partir del veneno de escorpión fue la margatoxina (MgTX) proveniente del escorpión *Centruroides margaritatus*, que bloquea los canales de potasio. En estos canales radica su importancia debido a que son una familia grande y diversa de proteínas que participan en la regulación de muchas funciones celulares como la contracción del músculo liso, la actividad neuronal, la regulación de la secreción de electrolitos, y la proliferación. Se sabe que los péptidos que bloquean estos canales uniéndose a epítopes externos representan una alternativa interesante en lugar de utilizar alguna droga para la regulación de algunas de las actividades mencionadas anteriormente (Bianchi *et al.*, 1998 y García *et al.*, 2001).

5.2.3 Toxinas producidas por arañas

Las toxinas peptídicas de las arañas presentan afinidad por algunos receptores y constituyen una promesa farmacológica para encontrar nuevas estrategias para entender el papel fisiológico de los canales iónicos así como el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos (Corzo *et al.*, 2003, Xiao F *et al.*, 2003, Zeng *et al.*, 2003, Xiao YC *et al.*, 2003). En los arácnidos el estudio de sus venenos a sido relevante debido a que se han descubierto diversas toxinas péptidicas bloqueadoras de canales de potasio tal es el caso de las henatoxinas 1 y 2 (HaTx 1 y 2) aisladas de la tarántula chilena *Grammostola spatulata* y recientemente fueron encontradas las heteropodatoxinas (HpTx 1 y 2) aisladas del veneno de la araña *Heteropoda venatoria*. Similares a los aminoácidos de las HaTx 1 y 2 se encontraron las semaforinas las cuales contribuyen a la dirección del axón durante el desarrollo del sistema nervioso (Swartz y MacKinnon, 1995, Sanguinetti *et al.*, 1997, Corzo y Escoubas, 2003). Se sabe que el veneno de arácnidos produce una necrosis de tejidos celulares cuando es inyectado a sus presas. Algunas moléculas responsables de este deterioro celular tienen un carácter anfipático, es decir son solubles en ambientes polares (acuosos) o no polares (lipídicos). Recientemente, se han encontrado moléculas antipáticas provenientes del veneno de arácnidos debido a que pueden actuar como antibióticos contra microorganismos patógenos tal es el caso de la molécula Oxki1 proveniente de *Oxyopes kitabensis* (Corzo, 2004).



5.2.4 Toxinas producidas por anémonas

Por otro lado, se encontró una nueva clase de toxinas bloqueadoras de canales de potasio en el veneno de diferentes especies de anémonas, tales como: *Bunodosoma granulifera* donde se descubrió el péptido BgK, en *Stichodactyla helianthus* se encontró el péptido ShK que interactúa con los canales de potasio y además ha mostrado eficacia en modelos animales para la esclerosis múltiple. Entre otros tipos de anémonas se encuentran *Anemonia sulcata* y *Heteractis magnifica* que no presentan homología con otras toxinas de canales de potasio (Aneiros *et al.*, 1993, Schweitz *et al.*, 1995, Dauplais *et al.*, 1996, Gendeh *et al.*, 1997, Kalman *et al.*, 1998, Garateix *et al.*, 2000). Se ha demostrado que algunas de estas toxinas de anémonas bloquean los canales tipo Kv expresados en oocitos de *Xenopus* o células de mamíferos y algunos canales de potasio dependientes de calcio. Los canales de potasio dependientes de calcio y los Kv 1.3 se expresan en gran número en los linfocitos T humanos, por lo que la inhibición de estos canales puede ser de utilidad terapéutica por suprimir la proliferación de los linfocitos. Además, los canales de potasio dependientes de calcio están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso, cardiovascular y gastrointestinal, por lo que los estudios dirigidos a esclarecer las interacciones de las toxinas de anémonas con estos canales pueden proporcionar información importante desde el punto de vista terapéutico acerca de la modulación selectiva de los mismos (Pennigton *et al.*, 1996, Alessandri-Haber *et al.*, 1999).

5.2.5 Toxinas en serpientes

Con respecto a los péptidos como agentes anti-hipertensivos podemos mencionar los venenos de serpientes del género *Bothrops* ya que poseen actividades específicas tales como fibrinolítica y fibrinogenolítica. El primer ejemplo de una droga basada en veneno es el captopril derivado del veneno de la víbora *Bothrops jararaca* conocido en el mercado como Capoten o Amakena el cual inhibe la enzima convertidora de angiotensina (ACE) que es esencial en la producción de angiotensina por lo tanto es un vasoconstrictor o vasodilatador asociado con la hipertensión. Un factor potenciador llamado bradikina ha sido encontrado en el veneno de esta misma serpiente. Este factor está relacionado también con la conversión de la angiotensina I (Ferreira *et al.*, 1970, Ondetti *et al.*, 1971; Ondetti *et al.*, 1988, Maruñak *et al.*, 2006). De la misma manera el veneno de la serpiente mamba negra *Dendroaspis polylepis polylepis* contiene un péptido de 60 aminoácidos llamado calceseptina el cual es un relajante del músculo liso y un inhibidor de las contracciones cardíacas. Su acción fisiológica se asemeja a diversas drogas tales como la 1,4-dihidropiridina, importante en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (de Weille *et al.*, 1991).

5.2.6 Toxinas producidas por hormigas

En el veneno de la hormiga tropical *Paraponera clavata* fue encontrado un neuropéptido pequeño llamado poneratoxina de aproximadamente 25 aminoácidos. Cuando



la poneratoxina se expresó en células de insecto se observó unión a las membranas de las células. También se encontró que afecta los canales de sodio y bloquea la transmisión sináptica en el sistema nervioso central de los insectos que caza (Piek *et al.*, 1991 y Szolajska *et al.*, 2004).

La actividad antimicrobiana puede ser útil para las hormigas para evitar las infecciones de la colonia después de que se captura la presa y se lleva al hormiguero. Respecto a esto se encuentra el caso de la hormiga depredadora *Pachycondyla goeldii* donde se analizaron 15 oligopéptidos y se demostró que las llamadas proteínas ponerocinas presentaban actividades antimicrobianas, insecticidas y hemolíticas. Los oligopéptidos tenían una longitud de 24 a 30 aminoácidos (Orivelt *et al.*, 2001). De la misma manera, el veneno de la hormiga de fuego *Solenopsis invicta* demostró tener una actividad antibiótica, lo cual también se ha demostrado para péptidos en los venenos de otros artrópodos como avispas y abejas, arañas, así como de varias serpientes (Jouvenaz *et al.*, 1972 y Schmidt, 1986).

5.3 Composición de los venenos

5.3.1 Veneno de Himenópteros

El veneno de los himenópteros es una mezcla compleja de sustancias químicas con actividades tóxicas que incluyen compuestos orgánicos de bajo peso molecular, péptidos y compuestos orgánicos de alto peso molecular que varían en composición y acción biológica entre los grupos y especies del Orden.

Uno de los venenos más investigados es el veneno de la abeja *Apis mellifera*. Entre los compuestos identificados se encuentran la apamina; polipéptidos como la melitina y enzimas como la hialuronidasa con un peso molecular de 43 kDa y la fosfolipasa A₂ que hidrolizan el enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos liberando ácidos grasos, principalmente el ácido araquidónico y lisofosfolípidos. Las fosfolipasas A₂ de secreción son producidas por numerosas células bajo la acción de diferentes estímulos como la interleucina-1, el factor de necrosis tumoral y los lipopolisacáridos, los cuales provocan su acumulación en los líquidos inflamatorios y en el plasma de pacientes con diversas enfermedades inflamatorias (Gauldie *et al.*, 1976, Gmachl *et al.*, 1992 y Valdés *et al.*, 2002).

Los citratos constituyen otro de los componentes mayores del veneno de las abejas *Apis mellifera* (9% del peso seco-140mM en el veneno líquido), y se estableció su posible acción como inhibidores endógenos de enzimas divalentes metalo-ion-dependientes (como las fosfolipasas calcio dependientes). La presencia de citratos en los venenos tendría que ver con su acción sobre receptores de toxinas, sobre los canales iónicos o sobre las toxinas divalentes ion-dependientes.

La melitina y la fosfolipasa A₂ constituyen los principales y más abundantes componentes del veneno de las abejas; representan cerca del 75 % de ellos. La melitina que consiste de 26 aminoácidos es el polipéptido más abundante en el veneno, seguida por la



fosfolipasa A₂ que se adhiere a las membranas de los glóbulos rojos, produciendo hemólisis. La fosfolipasa A₂ es el mayor de los alérgenos del veneno y actúa como agente bloqueador que puede provocar parálisis respiratoria.

La apamina, otro de los compuestos con acción biogénica, representa cerca del 2% del veneno total; es menos tóxica que los compuestos anteriores y se comporta como neurotoxina de acción motora; además de presentar un efecto cardioestimulante parecido al de las drogas adrenérgicas, tiene propiedades antiarrítmicas. Un 2% del veneno de las abejas es el péptido MCD (Mást Cell Degranulation) o factor desgranulador de los mástocitos; es uno de los compuestos responsables de la liberación de histamina y serotonina en las personas picadas. Se han identificado además compuestos como fosfatasa ácida, norepinefrina, dopamina e histamina (Valderrama, 2003 y Biló *et al.*, 2005).

5.3.2 Veneno de Serpientes

Si bien algunas especies de serpientes representan un problema de salud para la gente que habita en zonas rurales y en los trópicos debido a las mordeduras que causan, para la ciencia es uno de los reptiles más estudiados por el veneno tan complejo que producen (Del Brutto, 2003). Las caracterizaciones del veneno de algunas serpientes han demostrado la existencia de metales, aminoácidos libres, péptidos, nucleósidos, carbohidratos, lípidos, amins biogénicas y algunas enzimas tales como colagenasa, fosfolipasa A₂, nucleotidasa, hialuronidasa y acetilcolinesterasa. Tal es el caso del veneno de la serpiente peruana *Bothrops* que es una mezcla de diversas sustancias activas incluyendo metaloproteinasas donde se sabe que son las responsables del envenenamiento, algunas toxinas, enzimas, péptidos, nucleótidos, amins biogénicas, carbohidratos, sales, ácidos orgánicos, esterases y la fosfolipasa A₂. Así mismo, existen otros tipo de toxinas como las que aislaron Slotta & Frankel Conrat en 1938 llamada cronotoxina en el veneno de la cascabel sudamericana *Crotalus durissus terrificus* y posteriormente se demostró que se trataba de un complejo en el cual uno de los componentes era la fosfolipasa A₂ con acción neurotóxica, también se ha aislado la llamada miotoxina del veneno de *Crotalus viridis viridis*. Se han purificado otras neurotoxinas como la crotamina, convulxina y dioxina, esta última es asociada a la enzima similar a trombina (Greene, 1997, Lazo *et al.*, 1998, Gutiérrez, 1980, Remuzgo *et al.*, 2000 y Chacur *et al.*, 2004)

5.3.3 Veneno de Escorpiones

Por otro lado, el veneno de los escorpiones que es un "cocktail" compuesto por unos 80 péptidos de bajo peso molecular que reconocen canales iónicos (Na⁺ y K⁺), de mamíferos, insectos y crustáceos su característica más singular es que a diferencia de los venenos de serpiente, avispas, abejas u hormigas, él carece de fosfolipasas, proteasas y factores de irritación. Su letalidad radica en la presencia de toxinas dirigidas a sitios específicos de la membrana citoplasmática modificando así el comportamiento de los mecanismos de selección iónica imprescindibles para la fisiología celular. En años recientes estos péptidos han sido estudiados de forma intensa, porque además de excelentes modelos para estudios de la relación estructura-función de proteínas, son también sondas exquisitas para el estudio del funcionamiento de los canales iónicos. Actualmente se sabe y aun esta



en estudio el hecho de que el veneno de *Tityus discrepans* activa el sistema de coagulación sanguínea. Las toxinas del género *Tityus* mejor estudiadas desde el punto de vista químico-funcional pertenecen a las especies: *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. stigmurus* de Brasil, *T. discrepans*, *T. caripitensis*, *T. ivic-nancor* y *T. isabelceciliae* sp. de Venezuela. En estas especies hay por lo menos seis subtipos distintos de péptidos tóxicos, que han sido aislados a homogeneidad y cuyas estructuras han sido determinadas. Algunos de los componentes de este veneno bloquean canales de potasio eléctricamente excitable y calcio dependientes. La mayoría son péptidos cortos de alrededor de 30 a 40 aminoácidos con tres puentes disulfuro, mientras que la última variante estudiada dentro de este grupo, con un sólo representante hasta el momento (TsTX-K β), tiene un peso molecular de 8.160 kDa y fue descrito en el veneno de *T. serrulatus*. Este péptido afecta a canales de potasio no inactivantes de sinaptosomas de cerebro de rata. Todas estas toxinas producen una perturbación severa de los procesos de excitación y conducción del impulso nervioso, además de alterar los procesos neuroquímicos al inducir liberación desorganizada de neurotransmisores como la acetilcolina, adrenalina y el óxido nítrico (Selisko *et al.*, 1996, García *et al.*, 2001, Zhu *et al.*, 2003 y D' Suze *et al.*, 2004).

5.3.4 Veneno de Hormigas

Aunque el veneno de las hormigas no representa un peligro como el de abejas, arañas y reptiles, se ha realizado la caracterización de componentes y del establecimiento de una actividad biológica debido al modo de sobrevivencia de sus colonias (Orivelt *et al.*, 2001). Comparadas con los insectos no sociales, las hormigas tienen desarrollado un elaborado sistema defensor que ayuda a proteger sus colonias de patógenos. (Habermann, 1971, Blum y Hermann, 1978 y Pastrana, *et al.*, 2003). En el caso de la hormiga australiana *Myrmecia pilosula* donde la potencia de su picadura es debido a que su veneno contiene varios péptidos bioactivos así como las enzimas fosfolipasa, hialuronidasa y fosfatasa, se conoce que los péptidos alergénicos principales son la pilosulina 1 y 2. Aunque pilosulina 1 tiene actividades hemolíticas y citotóxicas fuertes, las funciones biológicas de estos pilosulinas son desconocidas. También fueron encontrados péptidos alergénicos en la hormiga *Myrmecia pilosula* llamados Myr p I y Myr p II (Street, 1996). Desde 1986 Schmidt y colaboradores se dieron la tarea de investigar los venenos de veinte especies de himenópteros incluyendo nueve especies de hormigas y nueve especies de avispas. La actividad enzimática del veneno de estos insectos sociales fue analizado encontrando que la actividad fosfatasa estaba presente en ocho de los nueve venenos de las hormigas analizadas y ausente en todos los venenos de las avispas mientras que la actividad fosfatasa alcalina era claramente perceptible en los venenos de solo dos especies de hormigas. Por otro lado, en la actualidad se conoce que la hormiga *Solenopsis invicta* conocida como la hormiga de fuego también contiene cuatro conocidos alérgenos: fosfolipasa A1 (Sol i 1), Sol i 2, antígeno 5 (Sol i 3) y Sol i 4 (Inagaki *et al.* 2004 y Biló *et al.*, 2005).

5.3.4.1 Veneno de *Pseudomyrmex triplarinus*

Entre los venenos de hormigas que han sido estudiados por su efecto anti-inflamatorio se encuentra el veneno de la hormiga *Pseudomyrmex arboris-sanctae* mejor conocida como *Pseudomyrmex triplarinus* ya que mantiene una simbiosis con los árboles Polygonaceae del género *Triplaris americana* que son árboles que pueden medir hasta 30 m



de alto con cavidades medulares en el tallo donde habitan las hormigas *P. triplarinus*. Estos árboles se localizan en regiones cálidas y pantanosas de Sudamérica como Bolivia, Brasil y Perú. Estas hormigas son muy agresivas y su picadura muy dolorosa debido a que tienen en su abdomen un aguijón o estilete muy desarrollado (Wheeler, 1942). El veneno de la hormiga *P. triplarinus* está contenido en un saco abdominal o glándula venenosa y es inyectado dentro de la víctima por medio del aguijón o estilete el cual es retráctil. Este veneno es un líquido cristalino, bacteriológicamente estéril, de pH 5.8 y químicamente estable (Lewis y De la Lande, 1967 y Shultz y Arnold, 1978).

Debido a que existe evidencia que el veneno de la hormiga *P. triplarinus* alivia el dolor y la inflamación en pacientes con artritis reumatoide, empezaron los estudios sobre la acción anti-inflamatoria del veneno de estas hormigas. En 1968, Holzmann un médico alemán que vivía en América del Sur utilizó el veneno de éstas hormigas para tratar la artritis reumatoide que padecía observando una mejora generalizada en su padecimiento, éste trabajo permitió iniciar diversos estudios con el veneno de estas hormigas encontrando efectos benéficos en pacientes artríticos a quienes les administró el veneno de *P. triplarinus*. Estos estudios clínicos, fueron confirmados en el Laboratorio Clínico de Serrales en Santo Domingo en un estudio de doble ciego realizado por el M. D., Charles Sisk Director del Centro Médico y Científico de la Fundación Nacional de Artritis (Holzmann *et al.*, resultados no publicados, Schultz y Arnold, 1984). En 1986 se analizaron los componentes del veneno de la hormiga *P. triplarinus* en comparación con el de abejas, avispas y otras hormigas mostrando una alta actividad de fosfolipasa así como una mediana actividad hemolítica (Schmidt *et al.*, 1986)

La caracterización parcial de los componentes peptídicos del veneno de la hormiga *P. triplarinus* mostró que éste contiene 12 proteínas con pesos moleculares que van desde 4,200 Da hasta 100, 000 Da, con cuatro proteínas más abundantes, que fueron aisladas y purificadas mediante cromatografía de baja presión. La fracción de menor peso molecular demostró tener actividad anti-inflamatoria (Hink *et al.*, 1994). Posteriormente, Pan y Hink llevaron a cabo el análisis de los péptidos de bajo peso molecular que poseen propiedades anti-inflamatorias aislando 6 isoformas diferentes del veneno de *P. triplarinus* con pesos moleculares que varían entre 6.998 y 7.142 kDas. Estas isoformas denominadas Mirmexinas I-VI son muy similares entre si mismas y están constituidas de diferentes heterodímeros formados de una subunidad pequeña (SS1, SS2 ó SS3) unida mediante puente disulfuro a la subunidad mayor (LS1 ó LS2) en todas las combinaciones posibles. Así mismo estos investigadores reportaron la secuencia aminoacídica de las subunidades que componen las Mirmexinas (Pan y Hink, 2000).

Los 5 oligopéptidos de *P. triplarinus* no presentan homología con otros péptidos conocidos, a diferencia de las Ponericinas (grupo G) las cuales muestran una homología del 60% con las proteínas cecropinas. Estos son una familia de péptidos antimicrobianos que se han encontrado en dos familias de insectos Díptera y Lepidóptera que tienen un espectro amplio de actividad contra bacterias y hongos, pero no afectan a las células eucariotas (Booman, 1987, y Ekergren, 1999).



5.4 Biogénesis de los péptidos

Los oligopéptidos son pequeñas moléculas formadas por cadenas de 2 a 50 aminoácidos encontrados en todos los organismos vivos. Generalmente son llamados moléculas regulatorias, debido a que la mayoría de ellos están involucrados en procesos de regulación fisiológica en los sistemas: nerviosos, endocrino e inmune (Sewald y Jakube, 2002). La biogénesis de los péptidos esta caracterizada por la producción de un polipéptido precursor el cual esta compuesto por tres fragmentos como se muestra en la Figura 2. El primer fragmento pre- se le denomina péptido señal, el segundo fragmento pro- es el propéptido, el cual puede incluir uno o varios péptidos (Figuras 2a y b). Inicialmente se libera el péptido señal quedando el propéptido y el péptido maduro como se muestran en la Figura 2c y mediante la acción de proteasas se libera el péptido individual como se muestra en la Figura 2d (Zamyatnin, 1990, 1991, 2004).

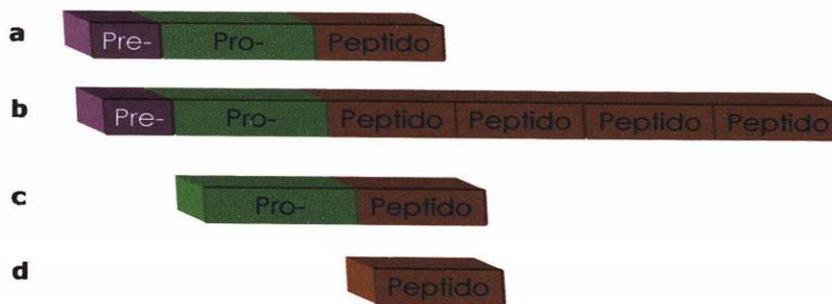


Figura 2. Biogénesis de los péptidos. El esquema representa el procesamiento de los péptidos a partir de un polipéptido precursor. a) El precursor de los péptidos contiene tres regiones Pre- (péptido señal), Pro- (propéptido) y Péptido, b) El precursor puede contener varios péptidos, c) región del Propéptido y Péptido d) Péptido.

5.5 Procesamiento de los péptidos en las glándulas venenosas

La mayor parte de la investigación en los venenos de animales esta enfocada en el aislamiento y la caracterización bioquímica de los componentes y en la actividad funcional sobre blancos celulares específicos que pueden ser explotados con fines terapéuticos (Cao *et al.*, 2003, Corzo *et al.*, 2003, Huang *et al.*, 2003 y Wilson *et al.*, 2004). En cambio existe escasa información del procesamiento de péptidos en las células secretoras de las glándulas venenosas y la información sobre estas glándulas básicamente es a nivel ultraestructural por medio de microscopia electrónica (Zeng *et al.*, 2003).

Mediante el fraccionamiento y la caracterización bioquímica de los residuos aminoacídicos, se sabe que la estabilidad de los péptidos a proteasas presentes en el mismo veneno se realiza frecuentemente a través de las modificaciones postraduccionales y/o a través de la unión de puentes disulfuro los cuales pliegan y estabilizan su estructura (Vandenplas *et al.*, 1985). Típicamente las modificaciones postraduccionales incluyen amidación, sulfatación, brominación, glicosilación, γ -carboxilación, hidroxilación, piroglutamación, N-C-ciclización e isomerización de D- aminoácidos. Enzimas específicas



son usadas durante la producción de los péptidos del veneno, para introducir modificaciones en sitios específicos, y estas pueden potenciar la biodisponibilidad del péptido y su potencia, además de aumentar la estabilidad (Imperial *et al.*, 2003 y Lewis y García, 2003). Recientemente se ha aplicado un enfoque molecular al estudio de los venenos peptídicos, mediante la generación de bibliotecas de DNAc y la caracterización de RNAm codificantes a estos péptidos. Esto ha permitido deducir el tamaño del precursor, el péptido señal y el sitio de corte proteolítico en algunos casos (Gmachl *et al.*, 1995 y Santos *et al.*, 2003). Los péptidos de los caracoles conídicos se han estudiado considerablemente a casi todos los niveles mencionados anteriormente y en algunos casos se cuenta con la descripción de la estructura terciaria (Lewis y García, 2003 y Santos *et al.*, 2003).

La proteína melitina es el veneno peptídico más estudiado a nivel de procesamiento ya que es el principal péptido tóxico del veneno de la abeja de miel. Esta constituye una de las pocas proteínas de insectos y arácnidos de las cuales se ha clonado el gen, caracterizado sus requerimientos para inserción a la membrana, procesamiento proteolítico y almacenamiento (Zimmermann, 1986, Gmachl *et al.*, 1995 y Moerman *et al.*, 2002). El RNAm de este gen se tradujo *in vitro* en un sistema libre de células y el producto proteico se secuenció mediante la degradación automática de Edman. El tamaño del péptido precursor, el cual fue de 70aa, por lo que se requiere cuando menos 3 reacciones postraduccionales para convertir la promelitina en melitina (Suchanek 1975, Suchanek 1978, Zimmermann 1986). La clonación del DNAc confirmó la ausencia de intrones y la capacidad máxima codificante del marco de lectura abierto de 70aa como el producto de traducción *in vitro*. La secuencia péptido señal se ha empleado para dirigir proteínas heterólogas a la ruta secretoria en células de insecto (Vlasak *et al.*; 1983). Mientras que en las mirmexinas no se han reportado modificaciones postraduccionales, todas las ponerinas excepto las del mosquito *Aedes*, son amidadas (Lowenberger *et al.*, 1999, Sun *et al.*, 1998, Andreu y Rivas, 1998).

5.6. Rutas secretorias de los venenos peptídicos

El mecanismo secretor o vía secretora incluye las proteínas que son secretadas por la célula, enzimas y otras proteínas que permanecen en el lumen del Reticulo Endoplasmico (RE), del Golgi y de los lisosomas, lo mismo que proteínas integrales de las membranas de estos organelos y de la membrana plasmática.

Debido a que cada molécula que viaja a lo largo de esta ruta biosintética secretoria pasa a través de múltiples compartimientos, la célula puede modificar las moléculas en pasos controlados en cada uno de ellos, almacenarlas y entonces cederlas a un dominio específico en la superficie celular por un proceso llamado exocitosis. Los compartimientos de la ruta biosintética secretoria están en comunicación constante unos con otros por medio del transporte de vesículas, las cuales geman continuamente de una membrana y se fusionan con otra. Este tráfico está profundamente organizado y va desde RE al aparato de Golgi y a la superficie celular. Las enzimas destinadas a los lisosomas se fosforilan en el cis- Golgi, con lo que se producen múltiples residuos de manosa 6-fosfato (M6P). Los receptores de M6P en el retículo trans- Golgi fijan las proteínas fosforiladas y dirigen su



transferencia hacia los endosomas tardíos, en donde los receptores y las proteínas se disocian. Luego los receptores son reciclados hacia el Golgi o la membrana plasmática y las enzimas lisosómicas son entregadas o dirigidas a los lisosomas. Todas las enzimas del Golgi que se conocen se insertan en la membrana del RE rugoso y luego son movidas en vesículas de transporte hacia el Golgi, en donde permanecen. El mecanismo de transporte en la Figura 3 muestra la vía de secreción en el RE y complejo de Golgi. Para efectuar esta función cada vesícula que gema desde un compartimento debe tomar solo las proteínas apropiadas y debe fusionarse solo con la membrana correcta. Cada compartimento debe mantener su propia identidad mientras participa en este flujo constante de componentes de membrana (Kornfeld, 1992, Jhonson, 1997, Karp, 1998, Blázquez y Shennan, 2000).

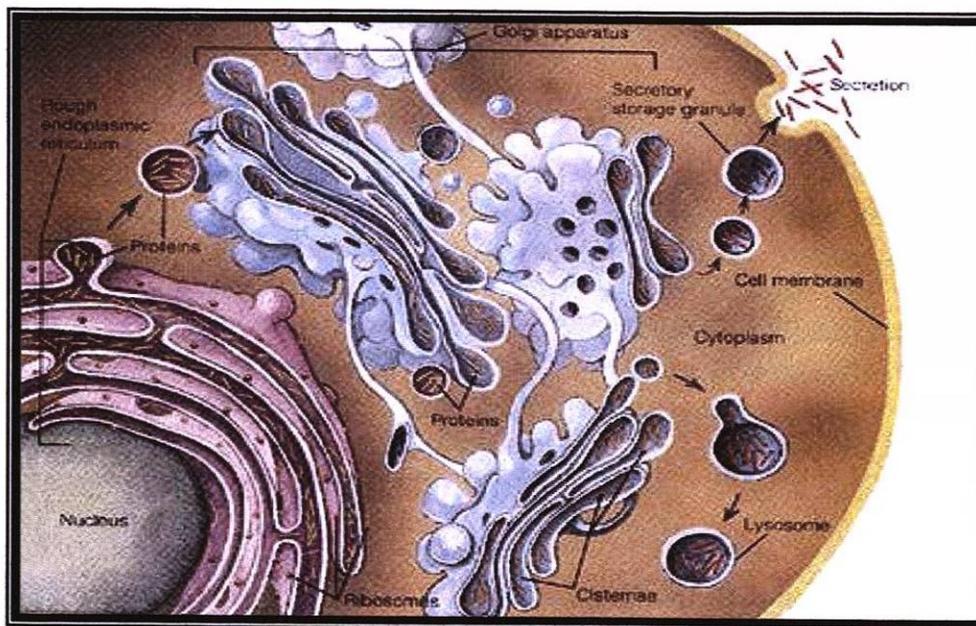


Figura 3. Esquema representativo de la vía secretoria. Las proteínas portadoras de la secuencia señal se adhieren a la membrana de RE rugoso. Las cadenas polipeptídicas se insertan en la membrana del RE o la atraviesan hacia el lumen. La ruta secretoria continua con la formación de vesículas de transporte en el complejo de Golgi y vesículas secretorias a la superficie celular (Modificado de Blázquez y Shennan, 2000)

5.6.1 Ruta constitutiva

La ruta desde el RE, al aparato de Golgi hasta la superficie celular se le conoce también como la ruta por “default” o constitutiva, debido a que las proteínas no parecen requerir de señales especiales para seguirla, esto es que cualquier proteína que entra al RE pasará automáticamente al aparato de Golgi y a la superficie celular a menos que contenga señales de retención para un compartimento específico, como la secuencia de retención en el RE conocida como KDEL (Lis, Asp, Glu y Leu). Posteriormente, ocurre el proceso de glicosilación y se secretan (Chávez *et al.*, 1996, Lodish *et al.*, 2003 y Sakaguch, 1997).

5.6.2 Ruta reguladora

Todas las células contienen una “ruta secretoria constitutiva” para obtener las proteínas membranales, sin embargo las células secretorias especializadas tienen una segunda ruta secretoria en la que las proteínas solubles y otras sustancias son almacenadas



en vesículas secretorias para la liberación posterior de su contenido. Esta “ruta secretoria regulada” se encuentra en las células secretorias dentro de glándulas y órganos productores de hormonas, neurotransmisores, venenos peptídicos o enzimas digestivas. Muchas hormonas polipeptídicas y neuropéptidos, así como enzimas hidrolíticas secretables, se sintetizan como una proteína precursora inactiva de la cual produce la forma activa mediante proteólisis con una proteasa unida a la membrana. Estos cortes inician desde el trans-Golgi y continúan en las vesículas secretorias y algunas veces hasta en el fluido extracelular después que ha ocurrido la secreción.

Algunas proteínas como las encefalinas (neuropéptido de 5 aminoácidos) son tan cortos en su forma madura para que se transporten cotraduccionalmente en el lumen del RE o para incluir señales necesarias para empacarse en las vesículas secretorias, por lo que la presencia de precursores es indispensable (Le Borgne, *et al.*, 1998, Dannies, 1999, Blázquez *et al.*, 2000, Lodish *et al.*, 2003). El paso final en la ruta secretoria regulada es la liberación del producto por exocitosis. La señal para secretarlas frecuentemente es un mensajero químico como una hormona que se une a receptores sobre la superficie celular. La activación resultante genera una señalización intracelular, frecuentemente incluye el aumento en la concentración de calcio libre en el citosol. En el caso de los neurotransmisores la señal es una excitación eléctrica. Por un mecanismo desconocido las vesículas secretorias se fusionan con la plasma membrana y liberan su contenido al espacio extracelular. Se cree que la vía de maduración de las proteínas de secreción, en levaduras, algas, fibroblastos y células acinares pancreáticas, es funcional en todas las células eucariotas (Alberts *et al.*, 1994, Sakaguchi, 1997, Dannies, 1999 y Lodish *et al.*, 2003).

La ruta secretoria en células neuroendocrinas, células exocrinas, neuronas peptidogénicas, mástocitos, y otras células secretoras contienen procesos adicionales de concentración de proteínas específicas dentro de gránulos secretores. Las proteínas salivares como la amilasa son removidas por gránulos después de que son formadas y liberadas a su ruta consecutiva (Dannies, 1999, Castle *et al.*, 1998, Hirst y Robinson, 1998, Dannies, 1999 y Kelly, 1985). De igual forma existen distinta variedad de organismos como artrópodos, víboras, dípteros y otros insectos que cuentan con una variedad de glándulas como los son las glándulas salivares y glándulas venenosas donde existe la posibilidad de que la misma ruta secretora sea utilizada (Lui X *et al.*, 2004).

5.7 IMPORTANCIA

Debido a que la información generada con respecto a la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus* se encuentra basada en las propiedades anti-inflamatorias de los péptidos de bajo peso molecular y hasta la fecha se desconocen los mecanismos de secreción de estos péptidos y no se han descrito modificaciones postraduccionales, en el desarrollo de esta tesis se realizó la detección de los péptidos de bajo peso molecular mediante inmunodetección en extractos protéicos abdominales del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex* sp.



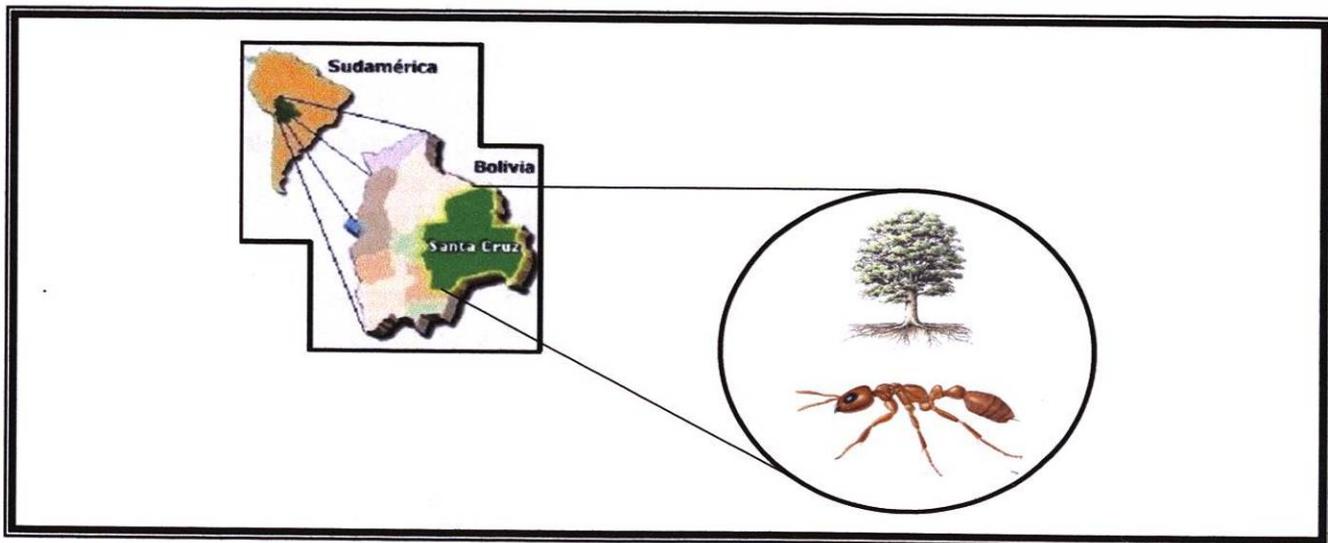
Los resultados obtenidos en el desarrollo de la presente tesis nos permitirán analizar la forma de procesamiento de estos péptidos y abrir una investigación más extensa con respecto al estudio de otras hormigas y/o insectos.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Colecta de la hormiga *Pseudomyrmex* sp.

La colecta de las hormigas *Pseudomyrmex* sp. se llevó a cabo en la ciudad de Santa Cruz, República de Bolivia, en colaboración con el Departamento de Entomología del Museo de Historia Noel Kempff Mercado, dependiente de la Universidad Autónoma Gabriel René Moreno.

Las hormigas *Pseudomyrmex* sp. habitan en los árboles *Triplaris americana* llevando a cabo un simbiosis hormiga-árbol. Una vez que se localizaron los árboles las hormigas fueron colectadas utilizando la técnica de golpeteo que permite la defensa de su territorio y por consecuencia la colecta de las mismas (Schultz y cols., 1984). Las hormigas colectadas se almacenaron en RNA later™ utilizando de 5-10 volúmenes de RNA later™ (Ambion, Inc. USA) que es una solución acuosa no toxica para el almacenamiento de tejidos que rápidamente hace permeable el tejido y protege el RNA celular de los tejidos *in situ* en muestras sin congelar a -70°C.



6.2 Observación y disección morfológica

Para validar que realmente los especimenes eran los correctos se realizó un análisis morfológico detallado de las hormigas *Pseudomyrmex* sp. (Wheeler, 1942, Flores, 2002 y Salinas, 2002).

Para la observación las hormigas fueron lavadas en agua destilada para eliminar la solución estabilizadora de RNA (RNA later™, Ambion, Tx USA), después fueron fijadas en glicerol y ácido acético (1:4) para una mejor manipulación en el montaje en laminillas así como la disección de cabeza, tórax, abdomen y patas. Finalmente, la observación morfológica se llevó a cabo en un microscopio Olympus CKX41SF y en el estereoscopio



Olympus SZ61. Las imágenes fueron documentadas en una cámara digital Olympus C-4000 ZOOM.

6.3 Transcripción *in vitro* de las secuencias nucleotídicas codificantes a los péptidos de bajo peso molecular

6.3.1 Obtención de las secuencias nucleotídicas

Las secuencias nucleotídicas codificantes a los péptidos de bajo peso molecular fueron obtenidas a partir de las construcciones de las construcciones de pCRTopo 2.1-SS2 y pCRTopo 2.1-LS1 proporcionadas por el M.C Fermín Mar Aguilar. La construcción pCRTopo 2.1-SS2 contiene la secuencia SS2 y pCRTopo 2.1-LS1 de LS1. Ambas secuencias nucleotídicas se obtuvieron mediante transformación en bacterias calcio competentes de la cepa DH5 α , la obtención de los DNAs plasmídicos y digestión de los mismos se describe a continuación:

6.3.1.1 Preparación y transformación de bacterias competentes de *Escherichia coli*.

Para la preparación de bacterias competentes se inoculó una colonia de la cepa *Escherichia coli* DH5 α en medio caldo LB (del inglés Luria-Bertani. NaCl 1%, extracto de Levadura y Triptona 0.5%) y se incubó a 37°C en agitación toda la noche a 250 rpm. A continuación se inoculó 1 ml de cultivo en 100 ml de medio LB fresco en la incubadora (Shaker Brinkmann Orbimix 1010) a 37°C en agitación hasta que se alcanzó una Densidad Óptica entre 0.3 y 0.4 a una absorbancia de 590 nm. Llegando a este punto, el cultivo en fase exponencial, se transfirió a un tubo de centrifuga estéril de 50 ml y se incubó en hielo 10 min. El sedimento celular se recuperó por centrifugación a 5 000 rpm a 4°C durante 10 min desechando el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 10 ml de CaCl₂ 0.1 M estéril hasta que se disolviera bien y se incubó en hielo por 30 min. Al término de la incubación el paquete celular fue centrifugado por 10 min a 5 000 rpm a 4°C, el sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 2 ml de CaCl₂ 0.1 M y se almacenaron a 4°C en hielo. La eficiencia de transformación se verificó utilizando el vector PTYB11 1 ng/ μ l. Para conservar las bacterias se les añadió glicerol estéril frío al 15 % en alícuotas de 200 μ l, las cuales se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C. Para la transformación se colocó una dilución 1:10 del vector pCRTopo 2.1-SS2 en 50 μ l de bacterias competentes de la cepa *Escherichia coli* DH5 α y el mismo procedimiento se realizó para el vector pCRTopo 2.1-LS1. La mezcla de las reacciones anteriores se incubó en hielo durante 30 min. Seguidamente, se aplicó un choque térmico a 42°C por 1 minuto e inmediatamente se transfirió a hielo durante 5 min. Después de aproximadamente 1 hora de recuperación en medio LB a 37°C en agitación, las bacterias transformadas se centrifugaron por 20 segundos y se desecharon 200 μ l del medio de cultivo, los 50 μ l restantes se utilizaron para resuspender las bacterias y sembrarlas en placas con agar LB mas ampicilina (50 mg/ml) incubando toda la noche a 37°C.



6.3.1.2 Obtención del DNA plasmídico mediante minipreparación por el método de lisis alcalina

Después de la transformación se seleccionaron colonias blancas de las construcciones pCRTopo 2.1-SS2 y pCRTopo 2.1-LS1 las cuales fueron inoculadas en un tubo estéril con 3 ml de medio líquido LB con ampicilina (50 mg/ml) y se dejaron crecer a 37°C toda la noche en el agitador orbital ya mencionado. Posteriormente, se realizó la preparación del DNA plasmídico usando el método de lisis alcalina (Birnboim 1979, Kraft, 1988 y Maniatis, 1982). Primeramente se recogió el sedimento celular en un tubo estéril (1.5 ml) centrifugando a 14 000 rpm por 2 min. Se descartó el sobrenadante y se recuperó la pastilla de las muestras resuspendidas en 150 µl de solución de lisis (solución I: glucosa 50mMEDTA 10mM pH 8.0 y Tris-HCl 25mM, pH 8.0) después de incubarlas por 5 min a temperatura ambiente se añadieron 150 µl de la solución desnaturalizante (solución II: NaOH 0.2N y SDS 1.0%) mezclándolas por inversión cada una. Luego se añadieron 150 µl de la solución III (Acetato de Sodio 3M, pH 5.2) y las muestras se incubaron durante 5 min a -20°C. A continuación se centrifugaron durante 5 min a 14 000 rpm y se recogió el sobrenadante el cual se transfirió a un tubo limpio. El DNA fue precipitado con 500 µl de isopropanol 100 % y mezclado una vez más por inversión e incubado por 10 min a -20°C. La técnica continuo centrifugando por 5 min a 14 000 rpm y descartado inmediatamente el sobrenadante para obtener las pastillas las cuales fueron lavadas con 400 µl de etanol 70 % mediante agitación con vórtex. Posteriormente, las pastillas se dejaron secar por un tiempo de 10 min a temperatura ambiente y finalmente se resuspendieron en 20 µl de H₂O miliQ con ribonucleasa (RNAasa) 10 mg/ml.

6.3.1.3 Electroforesis de DNA plasmídico en gel de agarosa

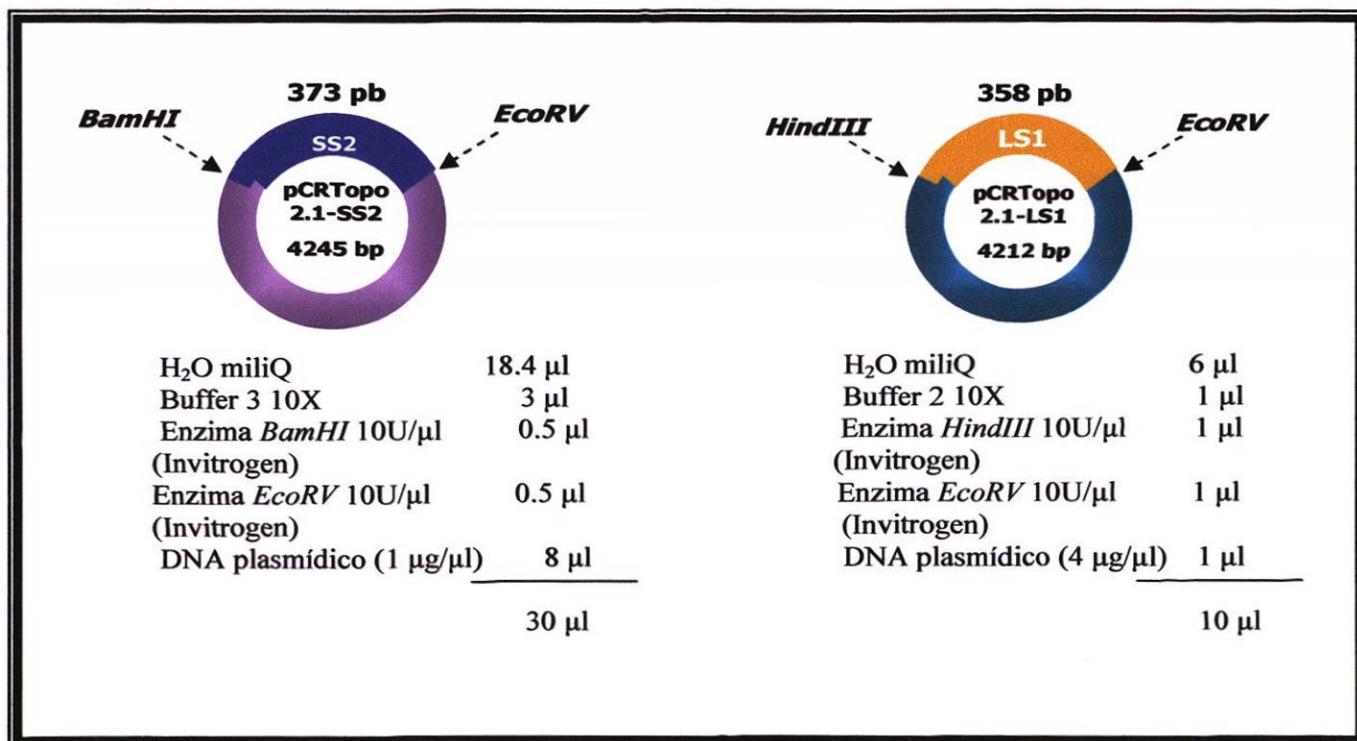
La separación e identificación del DNA plasmídico fue realizada con las técnicas electroforeticas que permiten a las macromoléculas cargadas desplazarse en un campo eléctrico, con velocidad proporcional a su carga e inversamente proporcional a su tamaño (Davis *et al.*, 1994). De acuerdo a este fundamento las electroforesis se realizaron sobre soportes sólidos de agarosa de 0.8, 1 y 1.5 % los cuales fueron colocados en una cámara de electroforesis horizontal modelo B1A (Owi-Separation Systems, Protsmouth, NH,USA) sumergidos en SB 1X (Hidróxido de Sodio (10Mm y Ácido Bórico 0.8M) que funciona como solución amortiguadora. Las muestras de DNA se depositaron en los pozos del gel mezclándolas con 1 µl de jugo azul 6X (Azul de bromofenol 0.25 %, xilencianol 0.25 % y glicerol 30 %). Las condiciones de corrimiento de la electroforesis fue de 80-100V y los geles se tiñeron 10 min en una solución de bromuro de etídio (5 ug/ml) para la visualización de los fragmentos de DNA, los geles se colocaron sobre un transiluminador de luz UV (UVP UV/W Transilluminator Model-20 Upland, CA, USA) y la adquisición de las imágenes se llevó a cabo con una cámara digital Olympus C-4000 ZOOM.

6.3.1.4 Digestión de los DNAs plasmídicos con enzimas de restricción

Los DNAs plasmidicos de las construcciones pCRTopo 2.1-SS2 y LS1 obtenidos mediante la técnica de minipreparación fueron digeridos con enzimas de restricción para lograr liberar el inserto de interés que permitió su amplificación. Para la obtención de la



secuencia SS2 se utilizaron las endonucleasas *Bam*HI y *Eco*RV (Invitrogen, Carlsband, California USA) que liberaron un fragmento de 373 pb. Basándonos en las especificaciones de la casa comercial se digirieron 1 µg de DNA añadiendo a la solución 3 µl de buffer 3 10X, 0.3 µl de la enzima *Bam*HI 10U/µl, 0.3 µl de la enzima *Eco*RV 10U/µl y 18.4 µl de agua miliQ para obtener un volumen final de 30 µl. La mezcla de la reacción se incubó durante toda la noche para lograr una digestión total del DNA en una incubadora Binder GMBH a la temperatura óptima (37°C). El mismo procedimiento se llevó a cabo con el vector pCRTopo 2.1-LS1. En este caso las enzimas de restricción utilizadas fueron *Hind*III y *Eco*RV (Invitrogen, Carlsband, California USA) que liberaron la secuencia de la subunidad mayor LS1 de 358 pb como se esperaba. La doble digestión se realizó a partir de 4 µg de DNA plasmídico agregando 1 µl de buffer 2 10 X, 1 µl de la enzima *Hind*III 10U/µl, 1 µl de la enzima *Eco*RV 10U/µl y 6 µl de agua miliQ para completar un volumen de 10 µl finales de reacción. La digestión se incubó por 3 h a 37°C. Posteriormente, ambas digestiones se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1.5 %.



6.3.1.5 Diseño de los oligonucleótidos con el promotor T7

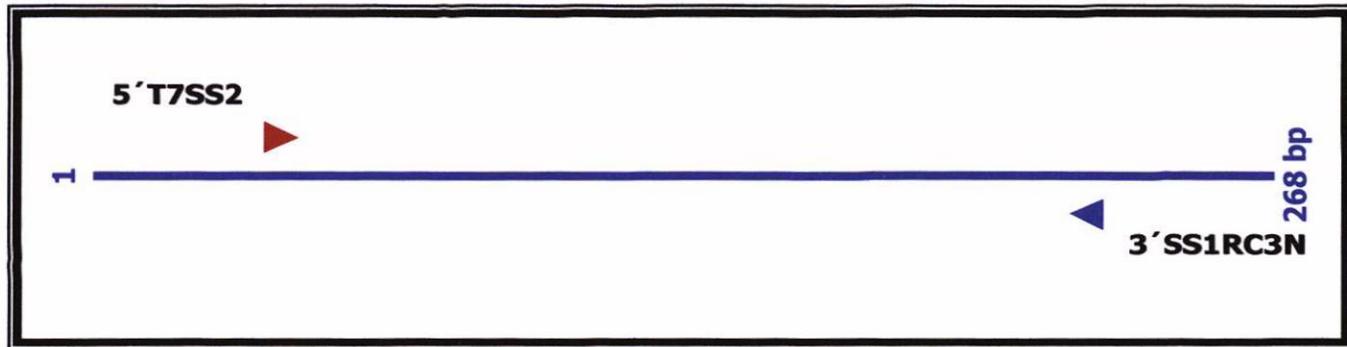
a) T7-SS2

Para incluir el promotor T7 en la secuencia SS2 se realizó el diseño del oligonucleótido 5' T7SS2 con una T_m teórica final de 76.3°C y se utilizó el oligonucleótido 3' SS1RCN3 previamente diseñado por Fermín Mar Aguilar (Tesis de Doctorado, FCB, 2006) con una T_m de 63.7°C. Usando el programa Oligo4.0 (Nacional Biosciences, Plymouth, MN, USA) se verificó la estructura secundaria de los oligonucleótidos y se obtuvo una temperatura de alineamiento de 55.6°C. De acuerdo a el programa Amplify 1.2 (University Wisconsin, Madison, WI USA) que simula las condiciones de estabilidad y unión de los oligonucleotidos se realizó la PCR virtual empleando ambos oligonucleotidos,



en este caso la estabilidad del oligonucleótido 5' T7SS2 fue de un 84 % mientras que la estabilidad de unión de 63 %. El oligonucleótido 3' SS1RCN3 mostró una estabilidad del 100 % y una estabilidad de unión de un 70 %. La secuencia del oligonucleótido 5' T7SS2 que contiene la secuencia del promotor T7 para llevar a cabo la transcripción *in vitro* se describe en el Anexo.

El resultado del análisis del PCR virtual muestra como se esperaba el fragmento de 268 pb como se observa en el siguiente diagrama:



El oligonucleótido 5' T7SS2 fue resuspendido en TE 1X a una concentración de 100 ng/μl y utilizado con el oligonucleótido 3' SS1RCN3 para llevar a cabo una amplificación mediante PCR utilizando gradiente temperatura. Las condiciones óptimas de la mezcla de reacción para la amplificación por PCR fueron: 19.6 μl de H₂O miliQ, 2.5 μl de buffer 10X, 0.75 μl de MgCl₂ 50mM, 0.25 μl de dNTP's 20mM, 0.3 μl de cada oligonucleótido con una concentración de 100ng/μl, 0.3 μl de Taq polimerasa 5U/μl de Promega (Madison Wi, USA) y finalmente 1μl de DNA. El gradiente se analizó con un rango de temperaturas de alineamiento que van de 55°C a 62°C. El resultado de esta primera reacción de PCR se analizó en un gel de agarosa al 1%. El programa de gradiente utilizado se describe a continuación:

Tabla I.

Programa utilizado para la amplificación de la subunidad menor SS2

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Evento
1	94	2 min	Desnaturalización inicial
2	94	30 segundos	Desnaturalización
3	55°C-62°C	30 segundos	Amplificación
4	72°C	1 minuto	Extensión
5	72°C	2 min	Extensión final

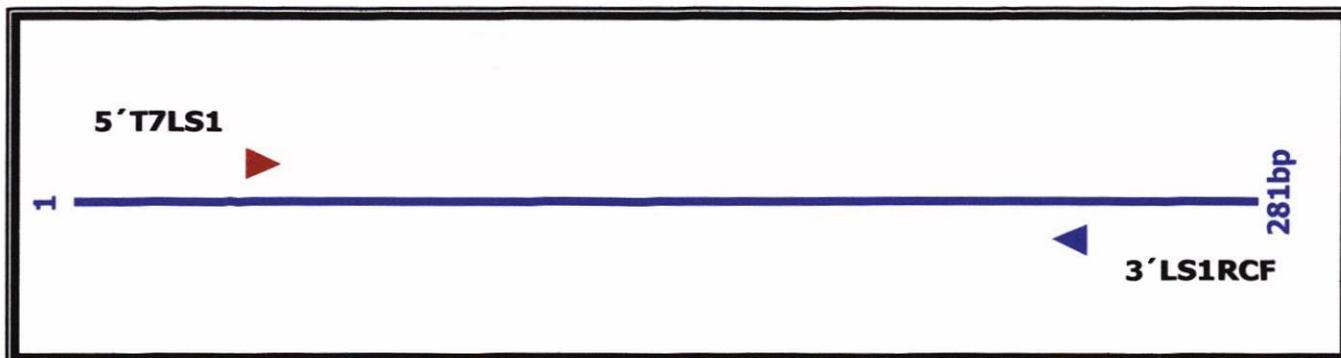
b) T7-LS1

Para incluir el promotor T7 en la secuencia nucleotídica LS1 se diseñó el oligonucleótido 5' T7LS1 que de acuerdo al programa Oligo4.0 (Nacional Biosciences, Plymouth, MN, USA) tiene una T_m de 71.7°C. También se utilizó el oligonucleótido 3' LS1RCF (Mar Aguilar, Tesis de Doctorado, FCB, 2006) el cual tiene una T_m de 63.7°C. El programa indicó utilizar una temperatura de alineamiento de 55.1°C. De igual forma se realizó el PCR virtual empleando el programa Amplify 1.2 (University Wisconsin, Madison, WI USA) donde se obtuvo el análisis de la estabilidad del oligonucleótido 5' T7LS1 la cual correspondió a un 84 % y una estabilidad de unión del 60 %. El



oligonucleótido 3' LS1RCF demostró una estabilidad de un 100 % y una estabilidad de unión de un 71 %.

La secuencia del oligonucleótido 5' T7LS1 contiene la secuencia del promotor T7 para llevar a cabo la transcripción *in vitro* se muestra en el Anexo. El resultado del análisis del PCR virtual mostró como se esperaba el fragmento de 281 pb como se observa en el siguiente diagrama.



A continuación el oligonucleótido 5' T7LS1 fue resuspendido en TE 1X a una concentración de 100 ng/μl y fue utilizado con el oligonucleótido 3'LS1RCF para la amplificación mediante PCR utilizando un gradiente de temperaturas. Las condiciones óptimas de la reacción para la amplificación por PCR fueron: 19.6 μl de H₂O miliQ, 2.5 μl de buffer 10X, 0.75 μl de MgCl₂ 50mM, 0.25 μl de dNTP's 20mM, 0.3 μl de cada oligonucleótido con una concentración de 100ng/μl, 0.3 μl de Taq polimerasa 5U/μl de Promega (Madison Wi, USA) y finalmente 1μl de DNA. El gradiente se realizó utilizando un rango de temperaturas de alineamiento que van de 55°C a 65.2°C. El resultado de la amplificación de PCR se analizó en un gel de agarosa al 1% y el programa de gradiente utilizado se describe a continuación:

Tabla II.

Programa utilizado para la amplificación de la subunidad mayor LS1

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Evento
1	94	2 min	Desnaturalización inicial
2	94	30 segundos	Desnaturalización
3	54°C-65.2°C	30 segundos	Amplificación
4	72°C	1 minuto	Extensión
5	72°C	2 min	Extensión final

6.3.1.6 Purificación de los DNAs amplificados T7-SS2 y T7-LS1 a partir de geles de agarosa

La purificación de los DNAs amplificados por PCR se llevó a cabo a partir de geles de agarosa al 1 % utilizando las columnas del Kit Wizard® (Promega Corporation, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Este método se basa en la utilización de una columna con resina de sílice para la captura y purificación de los fragmentos o bandas de DNA de interés visualizadas en el gel de agarosa añadiendo una solución de unión compuesta de isotiocianato de guanidina. Cada muestra purificada fue colocada en tubos eppendorf libres de Rnasas y fueron resuspendidas en 20 μl de agua



tratada con DEPC. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de calidad y concentración de los productos purificados mediante absorbancia con luz ultravioleta a 260 y 280 nm. Además, se verificó la concentración de los DNAs mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

6.3.1.7 Transcripción *in vitro* de T7-SS2 y LS1

Para la transcripción *in vitro* de las secuencias codificantes a SS2 y LS1 se utilizaron como DNAs templado las secuencias amplificadas T7-SS2 y LS1 de 268 y 281 pb, así como el Kit AmpliCamp siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Epicentre, Madison, WI, USA). En un tubo eppendorf se añadieron los siguientes componentes: 1 µl de inhibidor de RNAsas, 1 µg de DNA linealizado, 2 µl de buffer de transcripción 10X, 6 µl de nucleótidos Cap/NTP PreMix (7.5mM ATP, CTP y UTP, 1.5mM GTP, 6mM m⁷G[5']ppp[5']G Cap Analog), 2 µl de DTT 10mM y 2 µl de RNA polimerasa T7 (20 U/µl). La reacción se desarrollo durante 2 h a 37°C y posteriormente se visualizó en un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes con glioxal al 1.5 % para la comprobación de la transcripción.

6.3.1.8 Visualización de los RNAs en condiciones desnaturalizantes usando glioxal

Para la preparación del gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes usando glioxal se fundieron 3 g de agarosa en 200 ml de buffer BTPE 1X (10 mM PIPES, 30 mM Bis-Tris, y 1 mM EDTA). La preparación de las muestras se realizó utilizando 3 µg de RNA y se procesaron con 10 µl de una solución de glioxal-bromuro de etidio que incluyó 6 µl de DMSO, 2 ml de glioxal desionizado, 1.2 ml de amortiguador BTPE, 600 µl de glicerol 80 % y 0.2 ml bromuro de etidio 10 mg/ml. La mezcla se calentó a una temperatura de 50-55°C durante 1 hora y posteriormente se cargo en los pozos del gel usado un carril con jugo azul 6X (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol 30%) y como solución amortiguadora BTPE 1X. La electroforesis se realizó a 40 V/cm por 3 h, se enjuagó con agua corriente y se colocó por 15 min en una bandeja con una solución de bromuro de etidio (50 µg/ml) preparada con agua tratada con DEPC. El gel se analizó en un transiluminador de luz UV (UVP UV/W Transilluminator Model-20 Upland, CA, USA) para visualizar el RNA y se fotodocumentó con una cámara digital Olympus C-4000 ZOOM. Por ultimo, se determinó la integridad del RNA mediante la visualización de las bandas de RNAs ribosomales 28S y 18S mayoritarias.

6.4 Traducción *in vitro* de los RNAs de la hormiga *Pseudomyrmex* sp.

6.4.1 Obtención del RNA total de la hormiga *Pseudomyrmex* sp.

Debido a la existencia de las ribonucleasas (RNAsas) durante el proceso y manipulación del RNA se utilizaron materiales, soluciones y reactivos libres de RNAsas. Para evitar la contaminación de estas enzimas todo el material se horneo mínimo 4 h a 200°C y las soluciones se prepararon a partir de reactivos para biología molecular libres de RNAsas. Las superficies, pipetas y la cámara de electroforesis fueron tratadas con RNAaseZap (Ambion, Tx USA).



El método utilizado para la extracción de RNA total de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* fue una modificación a lo descrito por Chomeczynki y Sacchi en 1987 utilizando la técnica de trizol (Invitrogen, Carlsband, California USA) que es un agente caotrópico que causa lisis de las células rompiendo la membrana celular y la de los organelos logrando la desnaturalización de las proteínas como se muestra en la Figura 4.

Las hormigas almacenadas a -70°C fueron descongeladas en hielo y después se maceraron de 700 a 1160 mg de tejido en morteros previamente horneados a 200°C adicionando 1 ml de trizol por cada 100 mg de tejido. Los tejidos se homogenizaron pipeteando varias veces el volumen para después pasarlo a un tubo eppendorf de 1.5 ml libre de RNasas. Posteriormente el homogenizado se dejó incubando a temperatura ambiente por 5 min para permitir la disociación de los complejos nucleoprotéicos. Se añadieron 200 μl de cloroformo y la muestra se agitó vigorosamente por 15 segundos y se dejó incubando de 2 a 3 min. Se realizó una centrifugación a 12 000 rpm por 15 min a 4°C . Se recuperó la fase superior transparente que contiene el RNA (aproximadamente 600 μl) evitando tomar la interfase y la fase inferior (roja). Se añadieron 500 μl de isopropanol para después incubarlo a temperatura ambiente 10 min. De nuevo se realizó una centrifugación a 12 000 rpm por 10 min a 4°C . El sobrenadante se decantó con mucho cuidado y se le añadió 1 ml de etanol al 75 % para lograr lavar la pastilla del fondo.

Posteriormente se mezcló por medio de vórtex por 5 segundos para lograr despegar la pastilla. El líquido se volvió a centrifugar a 7 500 rpm por 5 min a 4°C y el sobrenadante fue desechado para lograr secar la pastilla de RNA la cual debe de observarse como una gelatina. El RNA fue disuelto en 10 μl de agua tratada con DEPC y se dejó incubando a 60°C por 10 min para ayudar a disolver el RNA y deshacer las estructuras secundarias. Inmediatamente después, se colocó en hielo para ser cuantificado y lograr visualizarlo en un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente los RNA totales de la hormiga fueron almacenados a -70°C en alicotas de 2 μl .

Para determinar la concentración del RNA se colocó 1 μl de la muestra en una celdilla nueva la cual contenía 1 ml de agua tratada con DEPC. Se hicieron mediciones de absorbancia en espectrofotómetro a 260nm y 280nm tres veces para evitar variaciones entre las lecturas. Se multiplico el valor de A_{260} por 40 (factor para RNA) y el resultado obtenido correspondió a la concentración de $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. De acuerdo a las mediciones realizadas en el espectrofotómetro se obtuvo la pureza del RNA.

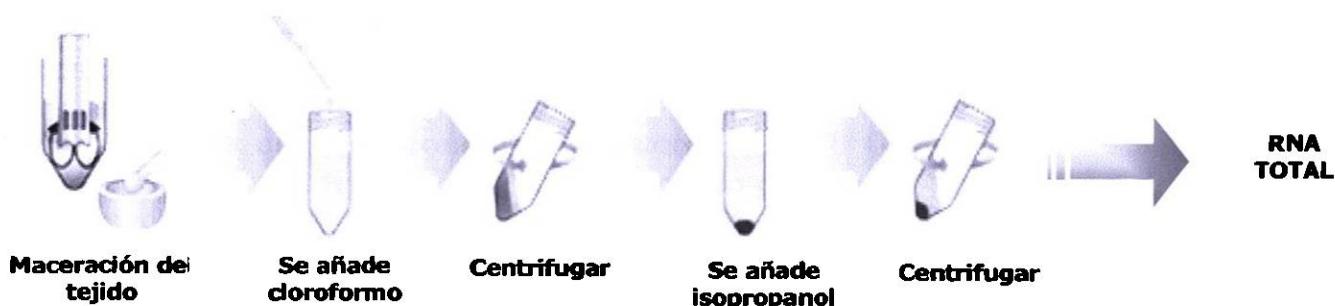


Figura 4. Diagrama representativo de la obtención del RNA total. El esquema describe el protocolo realizado para la obtención del RNA total de la hormiga *Pseudomyrmex sp.*



6.4.1.1 Procesamiento del gel de agarosa en condiciones desnaturizantes usando formaldehído

El RNA aislado se analizó, mediante una electroforesis en gel de agarosa que contenía formaldehído al 1 %. Esta electroforesis se lleva a cabo en condiciones que aseguren la desnaturización del RNA, para minimizar la formación de estructuras secundarias y conseguir así que su migración electroforética sea inversamente proporcional a su masa molecular. Para ello, se recurre a agentes desnaturizantes como glioxal, formaldehído, urea o hidróxido de metilmercurio, que son añadidos tanto al gel como a las muestras. La manera en la que se realizó el gel desnaturizante fue mediante el siguiente procedimiento: Se precalentaron 17.5 ml de formaldehído y 3 ml de buffer MOPS 10 X (3M NaCl, 0.5M Tris-HCl) a 55°C. Se fundieron 0.3 g de agarosa en 25 ml de agua tratada con DEPC. La agarosa se dejó enfriar para poder añadir la mezcla realizada con el buffer MOPS 10 X y el formaldehído. Para la preparación de las muestras de RNA se realizó una premezcla para cada una con 1.5 µl de buffer MOPS 10 X, 5.5 µl de formaldehído al 37%, 15 µl de formamida al 99.5% y 1 µl de RNA (3 µg). Posteriormente, se agitaron mediante vórtex todas las muestras y se incubaron por 15 min a 60°C para desnaturizar el RNA, luego fueron incubadas en un baño de hielo. Después de la desnaturización inmediatamente se añadieron 10 µl de jugo azul 6X (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol 30%) mezclando cada muestra para después depositarla en los pozos del gel de agarosa con buffer MOPS 1X el cual fue utilizado como buffer de corrida el cual fue colocado en la cámara electroforética horizontal modelo B1A de BioRad (Owi-Separation Systems, Protsmouth, NH, USA). La electroforesis se realizó a 40 V/cm por 3 h, se enjuagó con agua corriente y se colocó por 15 min en una bandeja con una solución de bromuro de etídio (5 µg/ml) preparada con agua tratada con DEPC. El gel se analizó en un transiluminador de luz UV (UVP UV/W Transilluminator Model-20 Upland, CA, USA) para visualizar el RNA y se fotografió con una cámara digital Olympus C-4000 ZOOM. Por ultimo se determinó la integridad de las bandas de RNAs ribosomales 28S y 18S mayoritarias.

6.4.2 Extracción del RNA poliA⁺

A partir del tejido de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* se realizó el aislamiento del RNA poliA⁺ utilizando un sistema de purificación basado en partículas magnéticas con oligo (dT) (Kit Straight A's mRNA Isolation System, Novagen, Madison, WI USA) que son las encargadas de capturar el RNAm poliA⁺. Se siguió el protocolo descrito en el manual de instrucciones proporcionado por la casa comercial (Novagen, Madison, WI USA) como se muestra en la Figura 5.

Las hormigas que se encontraban almacenadas a -70°C se dejaron descongelar en hielo y se colectaron los tejidos frescos lo más rápido posible. Se pesaron 0.5 g de tejido el cual fue macerado con 25 ml de buffer de lisis en morteros horneados 4 h a 200°C. Inmediatamente después se añadió DTT con una concentración final de 10 mM (100 µl de DTT 1 M por 10 ml de buffer de lisis). Se homogenizaron los fragmentos de tejido de 1-2 min. El material fue pipeteado a frascos que fueron centrifugados a 9 000 x g por 15 min a 4°C.

Posteriormente, las partículas magnéticas oligo (dT) fueron sometidas a un tratamiento donde son preparadas para su uso en un tubo de 15 ml realizando 2 lavados con el buffer wash, mediante agitación tipo vórtex, capturándolas con el stand de separación y



decantando el sobrenadante. Se utilizaron 2 ml de buffer wash por 20 mg de partículas magnéticas oligo (dT) (2 ml). Finalmente las partículas magnéticas oligo (dT) se resuspendieron en 2 ml de buffer wash. Después de la centrifugación de los tejidos se decantó el sobrenadante dentro de un tubo de 50 ml donde se añadieron las partículas magnéticas oligo (dT) ya preparadas y se mezcló el tubo suavemente por inversión para lograr distribuir las partículas. Se continuó con una incubación de 5 min a temperatura ambiente. Se capturaron las partículas de la solución con el stand de separación y se decantó el sobrenadante. Las partículas capturadas anteriormente fueron lavadas utilizando 6 volúmenes del buffer wash y capturadas (este paso se repitió 2 veces más).

Posteriormente, se añadió 1 ml de buffer wash con el cual se resuspendieron las partículas y después fueron transferidas a tubos de 1.5 ml donde una vez más fueron capturadas removiendo el sobrenadante. Las partículas se resuspendieron en 0.5 ml de agua tratada con DEPC y se incubaron a 60°C por 10 min para lograr eluir el RNAm. Nuevamente las partículas magnéticas oligo (dT) se capturaron con el stand de separación y el sobrenadante que es el que contiene el RNAm se transfirió a un tubo de 1.5 ml donde se le añadió 2 µl de glicógeno 10mg/ml, 50 µl de NaOAc 3 M y 0.6 volúmenes de isopropanol los cuales se mezclaron mediante vórtex. Inmediatamente después, se centrifugaron a 14 000 x g por 10 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla de RNA se lavó con 0.5 ml de etanol al 70 % luego se centrifugó por 5 min a 14 000 rpm descartando el sobrenadante. La pastilla se dejó secar por 10 min y finalmente el RNA se resuspendió en 25 µl de agua tratada con DEPC. Para determinar la concentración del RNAm se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente. Para lograr visualizar el RNA poliA⁺ se preparó un gel de agarosa 1.5 % en condiciones desnaturalizantes como anteriormente se describió.

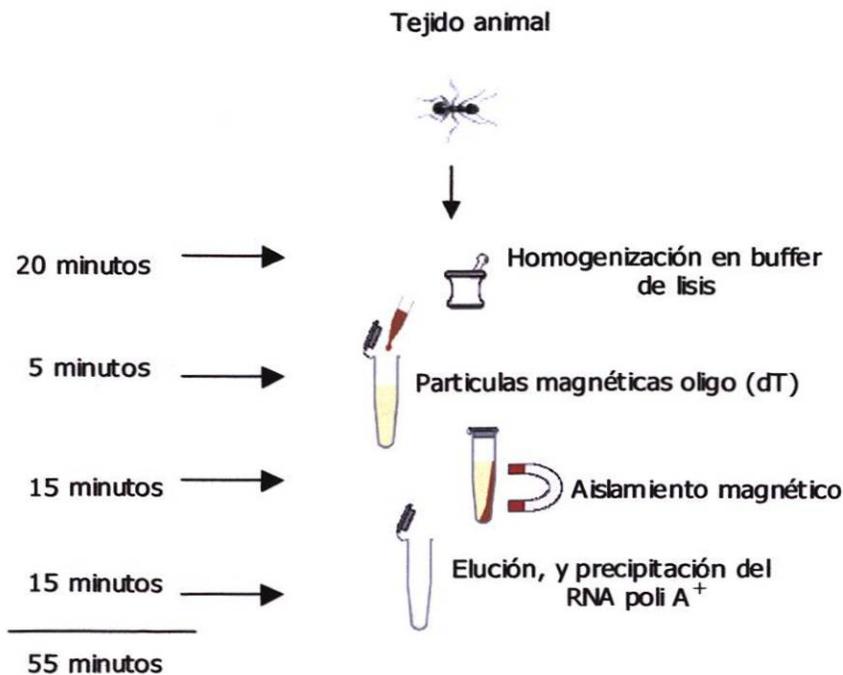


Figura 5. Representación de la obtención del RNA poliA⁺. El esquema muestra el protocolo para la obtención del RNA poliA⁺ de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. basado en las indicaciones de la casa comercial Novagen



6.5 Estandarización de los anticuerpos anti-SS1 y LS1

6.5.1 Expresión de las proteínas de fusión MBP-SS1 y MBP-LS1

Para la estandarizar las condiciones de la detección de los anticuerpos se realizó la obtención de las proteínas de fusión MBP-SS1 y LS1 (Salinas, 2005 y Flores Espinola, Tesis de Maestría, FCB, 2006) usando el protocolo descrito por la casa comercial (New England Biolabs NEB, Beverly, USA). El DNA de las construcciones pMALc-SS1 y pMALc-LS1 fue transformado en bacterias competentes de la cepa de expresión *Escherichia coli* TB1 preparadas como ya se describió anteriormente. Posteriormente, se tomó una colonia y se inoculó en tubos de ensaye con 3 ml de medio LB + 3 μ l de ampicilina 50 mg/ml y se dejaron incubando toda la noche a 37°C con una agitación constante de 250 rpm (Shaker Brinkmann Orbimix 1010).

Posteriormente, se tomó 0.5 ml de cultivo que fue inoculado en 5 ml de medio LB + 5 μ l de ampicilina (50 mg/ml), incubando por 1 hora a 37°C a una velocidad de agitación de 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a una absorbancia de 600 nm. Posteriormente se tomó 1 ml el cual fue centrifugado por 2 min a 14 000 rpm y la pastilla se resuspendió en 50 μ l de buffer de carga 2X (Tris-HCl pH 6.8, SDS 1%, 2- β -Mercaptoetanol 4%, azul G brillante 0.02%, glicerol 24%) con la finalidad de tener muestras sin inducción de la expresión. Al resto del cultivo se le agregaron 15 μ l de IPTG 0.1 M y se dejó incubando a 37°C con una buena aereación por 3 horas. El pellet obtenido se resuspendió en 100 μ l de buffer de muestra 2X. Las muestras se congelaron a -20°C para su análisis mediante electroforesis SDS-PAGE.

6.5.2 Detección de las proteínas de fusión en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

La electroforesis de poliacrilamida con Tricina-SDS se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Se elaboraron geles de poliacrilamida del 7.5 % al 16.5 % para verificar el tamaño de las proteínas. La electroforesis permitió el análisis de las proteínas de fusión MBP-SS1 y LS1.

La separación de las proteínas, se obtiene desnaturalizándolas en un medio reductor a 95°C en presencia del detergente SDS, y manteniendo las condiciones desnaturalizantes durante el proceso de electroforesis. El SDS se une a las proteínas (previamente desnaturalizadas por calor) impidiendo que estas se reestructuren. Además, neutraliza los aminoácidos cargados de las proteínas haciendo que se comporten como si tuvieran una relación carga-masa idéntica. Debido a la presencia del detergente y al pH ligeramente básico del buffer de la electroforesis, todas las proteínas migran hacia el ánodo al someterlas a un campo eléctrico. El agente reductor, β -mercaptoetanol, presente en el buffer de muestra 2X, rompe los puentes disulfuro de las proteínas favoreciendo su desestructuración.

La electroforesis se llevó a cabo en unos vidrios con un gel inferior o de separación al 7.5 % con 2.75 ml de agua miliQ, 1.25 ml de buffer Tris-SDS 4X pH 8.8, 0.937 ml de arcilamida al 40 %, 50 μ l APS al 10 %, 10 μ l de TEMED. La mezcla para el gel superior o concentrador al 5 % correspondió a 1.88 ml de agua miliQ, 0.750 ml de buffer Tris-SDS 4X pH 6.8, 0.370 ml de arcilamida al 40 %, 50 μ l de APS al 10 % y 10 μ l de TEMED. Después de realizadas las mezclas se colocó un peine para esperar la polimerización. Una



vez polimerizados tanto el gel concentrador como el separador en un tiempo de aproximadamente 10 min se lavaron los carriles con el mismo buffer de corrida correspondiente al buffer Tris-Glicina 1X y se colocó el gel dentro de la mini cámara vertical de electroforesis (E-C 120 Apparatus, NY, USA) cubriendo el gel con el buffer de corrida antes mencionado.

Las muestras proteicas fueron diluidas en buffer de muestra 2X y se mezclaron por pipeteo para posteriormente incubarlas a 95-100°C durante 2-5 min. Las condiciones de electroforesis fueron de 80 V por 10 min y después se incrementó a 100 V. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se sumergió en la solución colorante que contiene el colorante Azul de Comassie durante 2 h y posteriormente se procedió a la descoloración del gel sumergiéndolo varias veces en solución descolorante hasta conseguir el resultado. El gel fue secado con papel celofán dulce (Papelería el Guerrero, N.L, México) previamente humedecido con agua corriente a temperatura ambiente entre 2 marcos de acrílico (BIORAD) durante toda la noche.

6.5.3 Inmunodetección mediante Western-blot

La técnica de Western blot se fundamenta en la separación de proteínas en un gel SDS-PAGE o en un gel Tricina-SDS-PAGE y una electrotransferencia a un soporte sólido de nitrocelulosa o nylon. La inmunodetección se basa en la capacidad de un anticuerpo (al que se le denomina anticuerpo primario) para reconocer específicamente una determinada proteína y en la capacidad de un anticuerpo comercial (anticuerpo secundario) para reconocer específicamente el primero. Este anticuerpo secundario lleva unido una enzima que permitirá posteriormente su detección y el revelado de las bandas de proteína.

Se realizaron varios geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE y Tricina-SDS-PAGE) al porcentaje requerido. Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron equilibrados durante 10 min en buffer de transferencia 1X preparado a partir de una solución 10X (Tris- Base 48mM, Glicina 39 mM). Las proteínas separadas mediante electroforesis fueron transferidas en una membrana Immobilon-P (Milipore Corporation, MA, USA), previamente hidratada con metanol al 100 % y posteriormente equilibrada en buffer de transferencia 1X al cual se le añade metanol 0.0375 %.

Las esponjas y los papeles filtros se trataron con buffer de transferencia 1X y durante la electrotransferencia se colocaron las esponjas, papeles filtros, el gel y la membrana en el sistema humedecido Mini-Trans-Blot dentro de la cámara EC 142 (EC-Apparatus Corporation, NY, U.S.A) llena con el buffer de transferencia 1X a 25 V por 2 h como se muestra en la Figura 6. Concluida la transferencia la membrana se enjuagó con agua miliQ y la presencia de proteínas sobre la membrana se comprobó por tinción reversible con una solución colorante (rojo Ponceu concentrado, Sigma-Aldrich Química, Toluca, México) por 5 min que fueron posteriormente desteñidas con agua destilada. La membrana se incubó con una solución bloqueadora al 5 % (p/v) de leche en polvo (Carnation Instant Nonfat Dry), Tween-20 0.1 % (v/v) en buffer TBS (Tris-Base 200mM, NaCl 1.5 M) durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación constante a 150 rpm. Terminando el bloqueo la membrana se incubó toda la noche a 4°C con agitación constante con el anticuerpo primario anti- conejo SS1 (Biosíntesis Incorporated, Lewisville, USA) disuelto con leche en polvo 5 %, buffer TBS y Tween-20 0.1 % (v/v) realizando una dilución del anticuerpo 1:500. Al termino de la incubación se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TBS y Tween-20 0.1 % (v/v). Se siguió con la incubación por 1 h a temperatura ambiente con el



segundo anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (Biomeda Corporation, Foster City, CA) acoplado a la fosfatasa alcalina disuelto en leche en polvo 5 %, buffer TBS y Tween-20 0.1 % (v/v) en una dilución 1:10,000. Se realizaron 3 lavados con agitación constante a la membrana una vez mas con TBS y Tween-20 0.1 % (v/v).

Finalmente, la membrana se incubó con la solución de detección que contiene el sustrato de la fosfatasa alcalina ECL (Amersham Biosciences, Buckingham, England) utilizando 500 µl de solución 1 y 500 µl de solución 2 por 1 min. La membrana se colocó dentro de un casete de exposición y sobre una película (Daigger, IL, USA) que posteriormente fue colocada por 1 min en solución reveladora (Estman Kodak Company, NY, USA) agitando suavemente, después se enjuagó con agua corriente por 1 min y se colocó en solución fijadora (Estman Kodak Company NY, USA) por 1 min.

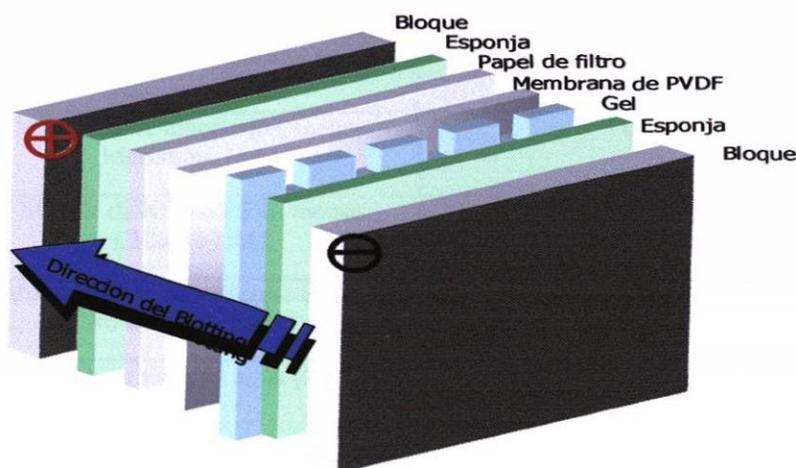


Figura 6. Esquema representativo de transferencia de proteínas. La figura muestra el orden de cada uno de los elementos necesarios para llevar a cabo la transferencia de proteínas a una membrana de PVDF con respecto a los electrodos.

6.6 Traducción *in vitro*

Los sistemas de traducción basados en un Lisado de Reticulocitos de Conejo (Promega Corporation, Madison, WI, USA) se utilizan para identificar los productos de traducción de distintas especies de RNAs, para la caracterización de los productos protéicos y para la investigación a nivel transcripcional y traduccional. Un lisado contiene los componentes mínimos necesarios para la síntesis de proteínas como RNAs, ribosomas, aminoácidos, factores de iniciación, elongación y terminación. El RNA total obtenido de la hormiga, así como el RNA poliA⁺, y los productos obtenidos en la transcripción *in vitro* T7-SS2 y T7-LS1 fueron utilizados para realizar la traducción *in vitro* de los RNAs. Estos fueron desnaturalizados a 65°C por 5 minutos e inmediatamente después fueron enfriados en hielo para incrementar la eficiencia de la traducción específicamente en regiones ricas en GC, destruyendo estructuras secundarias. Posteriormente, se mezclaron los componentes descritos en la Tabla III para llevar a cabo la traducción *in vitro*. Inmediatamente, la reacción traduccional se incubó a 30°C por 90 minutos y los resultados fueron analizados por medio de una autoradiografía a partir de la técnica de inmunodetección en geles de Tricina-SDS-PAGE y utilizando diluciones 1:500 de los anticuerpos anti-SS1 y anti-LS1.



Como testigo positivo para la reacción se usó el RNAm de luciferasa el cual se utilizó para verificar el proceso por medio de bioluminiscencia mediante el uso de un luminómetro (Luminómetro OPTOCOMP I) siguiendo las instrucciones descritas en el kit de Luciferasa (Kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega). El tiempo entre la preparación de la reacción del testigo y la medición no fue mayor a 2 segundos y el tiempo de medición en el luminómetro fue de 20 segundos. La reacción enzimática fue descrita como Unidades Relativas de Luminiscencia (RLU). También se utilizó el Lisado de Reticulocitos sin traducir como testigo negativo.

Tabla III.
Reacción Estándar utilizada para realizar la Traducción *in vitro*

Componentes	Reacción Estándar
Lisado de Reticulocitos de Conejo	17.5 µl
Mezcla de Aminoácidos, menos Metionina 1mM	0.5 µl
Mezcla de Aminoácidos menos Cisterna 1mM	0.5 µl
Inhibidor de Ribonucleasas RNAsin 40 u/ µl (Promega)	1 µl
Substrato de RNA en agua (2 µg/ µl)	1.5 µl
Agua libre de RNasas	4 µl
Volumen final	25 µl

6.7 Inmunodetección de los péptidos de bajo peso molecular en extractos protéicos de *Pseudomyrmex sp.*

6.7.1 Extractos protéicos de la hormiga *Pseudomyrmex sp.*

6.7.2.1 Homogenización

Para lograr obtener los extractos protéicos de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* se realizó una modificación a la técnica de obtención de extractos protéicos de embriones de la mosca *Drosophila melanogaster*. Las hormigas que se encontraban almacenadas a -70°C con RNA *later* se sometieron a varios lavados para eliminar el reactivo y continuar con la disección de los abdómenes, tórax, cabezas y patas. Posteriormente, haciendo uso de morteros horneados previamente y enfriados a 4 °C en una bandeja de hielo se obtuvieron los extractos protéicos.

De cada parte disectada se pesaron de 390 a 520 mg añadiendo 1 ml de Buffer H (25mM Tris pH 7.5, 1mM DTT, 1mM EDTA y Glicerol al 8.7 %) mas 1 µl de Inhibidor de Proteasas (AEBSF 2mM, EDTA 1mM, Bestatin 130 µM, 14 µM, Leupeptin 1 µM, Aproptin 0.3 µM) (Sigma-Aldrich Química, Toluca, México) por cada 700 mg de tejido.



Esta regla se basó de acuerdo a la cantidad mínima de tejido utilizada para obtener el RNA total. El sobrenadante obtenido en la maceración de las estructuras fue recuperado e inmediatamente centrifugado por 10 min a 14 000 rpm a 4°C para su almacenamiento a -70°C. El análisis de los extractos protéicos se realizó en un gel Tricina-SDS-PAGE 16.5 % para la detección de péptidos pequeños.

6.7.2.2 Detección de los péptidos en extractos protéicos

La separación de los péptidos pequeños en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo mediante el análisis de la alta abundancia de péptidos de bajo peso molecular en los extractos protéicos de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. usando geles Tricina-SDS-PAGE 16.5 % en condiciones desnaturalizantes. La separación electroforética se llevó a cabo en una cámara vertical para electroforesis (EC 120 Apparatus Corporation, NY, USA). Posteriormente se utilizó una concentración del 16.5 % para el gel inferior o de separación para lo cual se realizó una mezcla de 0.83 ml de agua miliQ, 1.8 ml de buffer-gel 3X(Tris-base 3.0 M, SDS 0.3% pH 8.45), 2.97 ml de acrilamida al 40 %, 2.4 ml de glicerol al 50 %, 50 µl de APS al 10 % y 10 µl de TEMED.

La mezcla para el gel concentrador al 4 % correspondió a 2.2 ml de agua miliQ, 2.2 ml de buffer-gel 3X, 0.27 ml de acrilamida al 40 %, 50 µl de APS al 10 % y 10 µl de TEMED. Después de realizadas las mezclas se colocó un peine para esperar la polimerización (aproximadamente 10 min). La electroforesis se efectuó con una solución amortiguadora de corrida para el cátodo (-) (100mM Tris-Base, 100 mM Tricina, 0.1% SDS) y otra para el ánodo (+) (200mM Tris pH 8.9).

La preparación de las muestras se realizó siguiendo el protocolo de electroforesis SDS-PAGE ya mencionado. La electroforesis se llevó a cabo a 20 mA corriente constante por 2-3 h, el gel se lavó con agua destilada por 10 min, se fijó durante 1 hora con glutaraldehído al 5 % preparado inmediatamente, después se lavó con agua destilada por 5 min con cuidado y se colocó en una solución de tñido por 1 hora. Posteriormente se procedió a la decoloración del gel sumergiéndolo varias veces en solución de desteñido (ácido acético 10 %) hasta conseguir la visualización de las bandas. El gel fue secado durante toda la noche en papel celofán dulce (Papelería el Guerrero, N.L, México) previamente humedecido con agua corriente a temperatura ambiente entre 2 marcos de acrílico.

6.7.2 Inmunodetección de los péptidos de bajo peso molecular en los extractos protéicos de la hormiga *Pseudomyrmex* sp.

Para realizar la inmunodetección de los péptidos de bajo peso molecular de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. los extractos protéicos fueron resuspendidos en buffer de muestra 2X y ebullicos durante 5 min. Posteriormente, cada muestra fue colocada en un pocillo del gel Tricina-SDS-PAGE. A continuación se realizó la técnica de Western blot previamente descrita donde se utilizó una dilución 1:500 del anticuerpo primario anti-conejo SS1 (Biosíntesis Incorporated, Lewisville, USA).

Como testigo positivo del proceso de inmunodetección se utilizaron 10 ng del péptido de 20 aminoácidos de la región conservada en el carboxilo terminal de las subunidades menores (2359 Da) y como testigo negativo el extracto proteico perteneciente a la cabeza, tórax y patas. Una vez que se obtuvo el resultado por medio de una autoradiografía se



recurrió al programa Gel-PRO 3.1 Analyzer (Dinco & Rhenium Industries, R. F, Israel) para un posterior análisis y se fotodocumentaron las imágenes. El mismo procedimiento se realizó para la inmunodetección de los precursores y de las subunidades mayores de la hormiga *Pseudomyrmex sp* se utilizó una dilución 1:500 del anticuerpo policlonal anti-LS1 (Biosíntesis Incorporated, Lewisville, USA).

También se utilizó como testigo positivo del proceso 10 ng del péptido de 20 aminoácidos correspondientes a la región conservada en el carboxilo terminal de las subunidades mayores (2143 Da) y como testigo negativo el extracto proteico obtenido de cabeza, tórax y patas. Una vez que se obtuvo el resultado se tomaron en cuenta las distintas bandas encontradas en la autoradiografía y se recurrió al programa Gel-PRO 3.1 Analyzer (Dinco & Rhenium Industries, R. F, Israel) para un posterior análisis y se documentaron las imágenes

7. RESULTADOS

7.1 Observación morfológica de la hormiga *Pseudomyrmex sp.*

Las hormigas *Pseudomyrmex sp.* colectadas en la Ciudad de Santa Cruz de la Sierra en Bolivia fueron analizadas en varios ejemplares completos mediante observación al microscopio y estereoscopio como se muestra en la Figura 7. El análisis morfológico de las principales estructuras de la hormiga se realizó en los diferentes componentes de la cabeza, tórax, abdomen y patas de acuerdo a las principales características morfológicas usadas en las claves de taxonomía (Wheeler, 1942, Bolton, 1994, Ward, 1985, 1991, 1993 y 1999). La mayoría de las hormigas *Pseudomyrmex sp.* colectadas pertenecían a la clase trabajadora como se observa en la Figura 8.

7.2 Disección de la hormiga *Pseudomyrmex sp.*

La disección de las diferentes estructuras de la hormiga se realizó en la cabeza, tórax, abdomen y patas para su caracterización morfológica (Vázquez y Villalobos, 1980). La Figura 9A muestra que la cabeza posee dos antenas, ojos grandes muy oscuros que abarcan casi 1/3 aproximadamente de la cabeza y el aparato bucal donde la hormiga cuenta con una mandíbula muy marcada. B) El tórax de la hormiga *Pseudomyrmex* presenta metatórax y mesotórax bien desarrollados. C) También se observó en la hormiga el pecíolo y pospecíolo peculiares de la subfamilia bien definidos. D) En las patas se observaron las articulaciones predominando el fémur y una espuela pectinada. E) En el abdomen se logró observar parte del aguijón o estilete. Posteriormente, estas estructuras fueron utilizadas para obtener extractos celulares para el análisis protéico de las diferentes estructuras

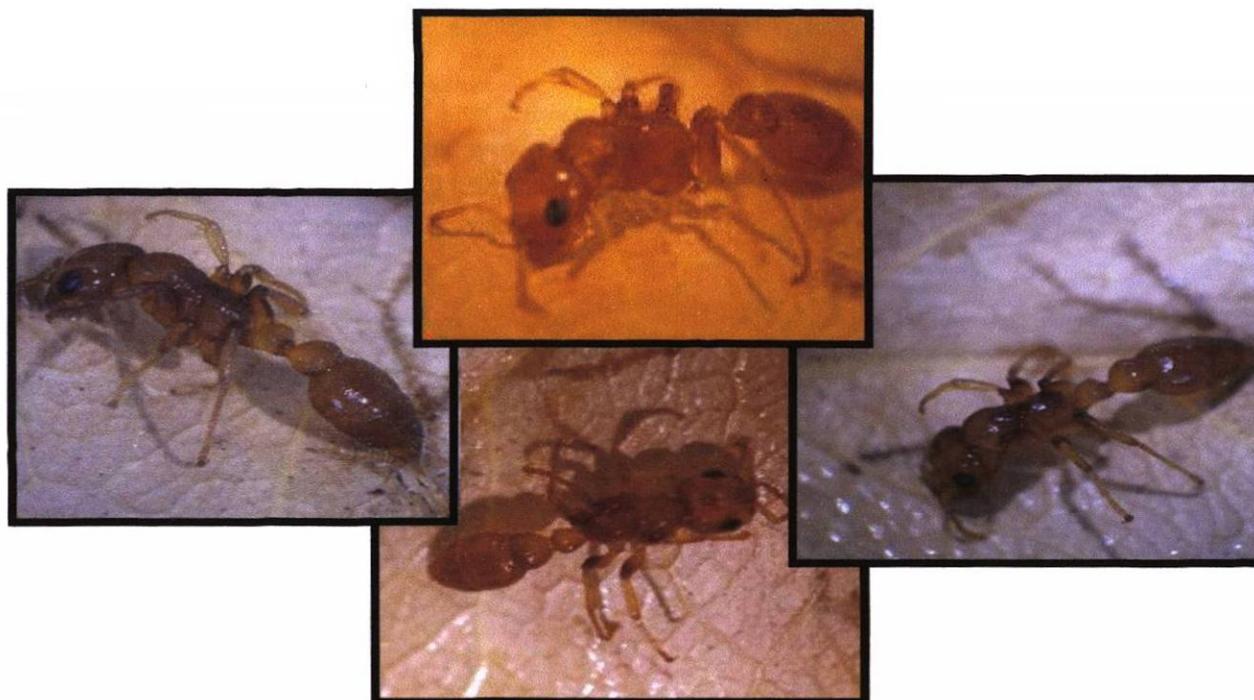


Figura 7. Colecta de las hormigas *Pseudomyrmex sp.* Las hormigas *Pseudomyrmex sp.* fueron colectadas del árbol hospedero *Triplaris americana* en la Ciudad de Santa Cruz de la Sierra, República de Bolivia, en colaboración con el Departamento de Entomología del Museo de Historia Natural Noel Kempff Mercado, de la Universidad Autónoma Gabriel René Moreno.

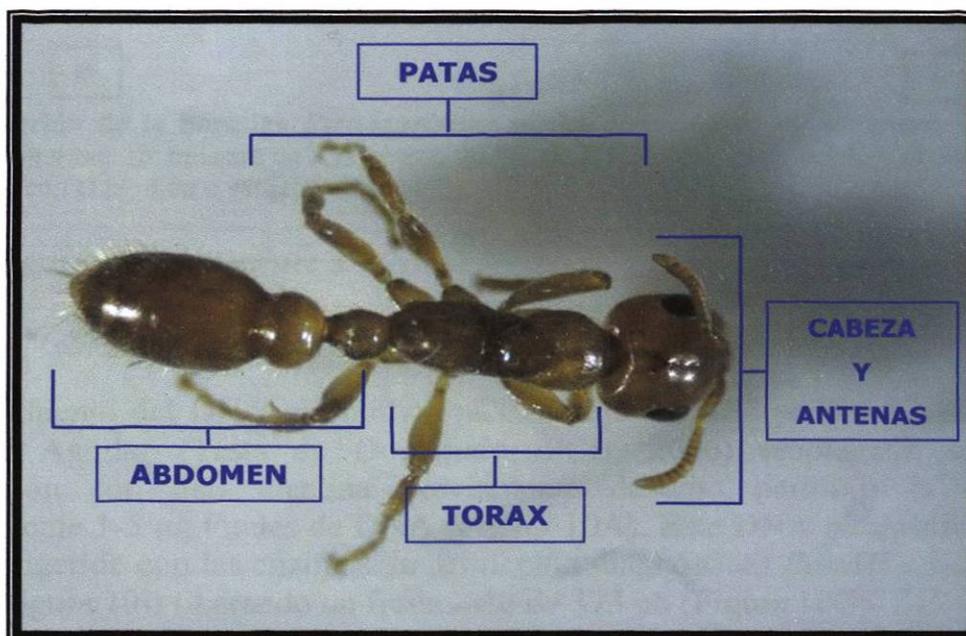


Figura 8. Anatomía general de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* La hormiga trabajadora *Pseudomyrmex* de la subfamilia *Pseudomyrmicinae* presenta las principales partes de su anatomía como cabeza, antenas, tórax, abdomen y patas.



7.3 Transcripción *in vitro* de las secuencias codificantes a los péptidos de bajo peso molecular

Para llevar a cabo la transcripción *in vitro*, se utilizó la secuencia nucleotídica y codificante a la subunidad SS2 obtenida por Fermín Mar Aguilar (Tesis de Doctorado, FCB, 2006) para posteriormente realizar con el producto obtenido la traducción *in vitro* como control positivo.

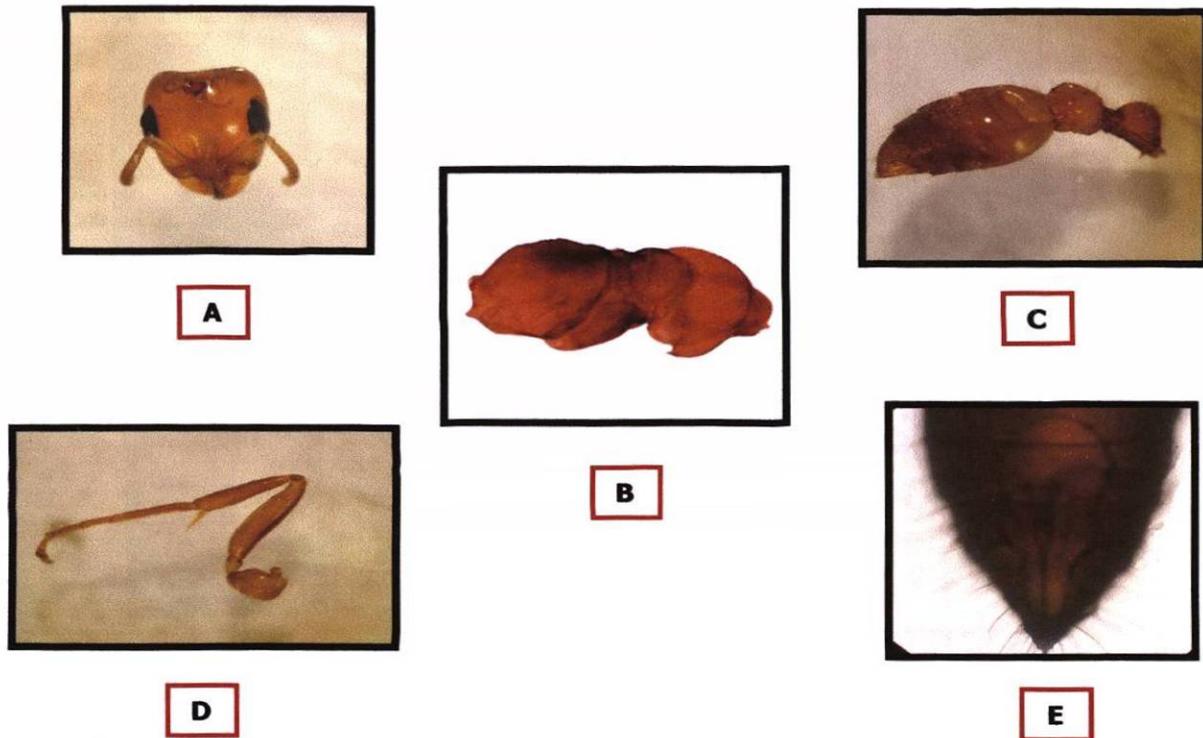


Figura 9. Disección de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* La disección de las diferentes estructuras de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* muestra en A) Cabeza, B) Tórax, C) Pecíolo, postpecíolo y abdomen, D) Pata, E) Saco abdominal con el aguijón o estilete.

7.3.1 Secuencia codificante a T7-SS2

7.3.1.1 Obtención de la secuencia codificante a SS2

El aislamiento del DNA plasmídico pCR-TOPO 2.1-SS2 proporcionado por el M.C Fermín Mar Aguilar (Tesis de Doctorado, FCB, 2006) empleando el método de minipreparación con lisis alcalina previamente descrito permitió la obtención de aproximadamente 1-5 μg totales de DNA (Figura 10A). Este DNA plasmídico pCR-TOPO 2.1-SS2 fue digerido con las enzimas de restricción diagnósticas *BamHI* y *EcoRV* como se indica en la Figura 10B liberando un fragmento de 373 pb (Figura 10C).

7.3.1.2 Amplificación mediante PCR de la secuencia codificante a T7- SS2

La adición del promotor T7 en la secuencia SS2 fue integrada mediante la amplificación por PCR usando oligonucleótidos específicos diseñados previamente. El fragmento de 373 pb con la secuencia codificante a SS2 fue utilizado como templado para



la amplificación de dicha secuencia con un gradiente de temperaturas que van de 55°C a 62°C utilizando los oligonucleótidos 5'T7SS2 que contiene la secuencia del promotor T7 y 3'SS2RC3N (Mar Aguilar, Tesis de Doctorado, FCB, 2006). La Figura 11A muestra el fragmento T7-SS2 de 268 pb obtenido mediante amplificación por PCR. Este producto amplificado T7-SS2 fue además purificado con una buena eficiencia de recuperación como se muestra en la Figura 11B permitiendo la obtención de cantidades que van de 17 a 20 ng necesarios para realizar la transcripción *in vitro* de esta secuencia.

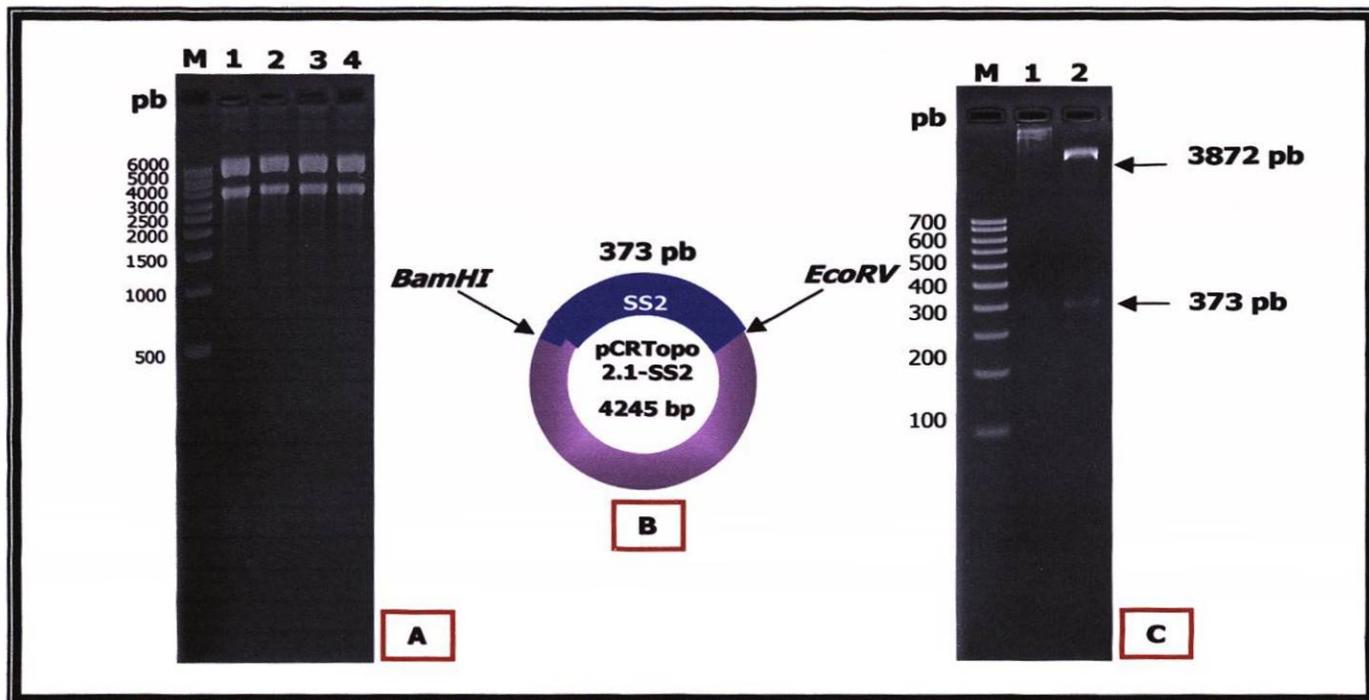


Figura 10. Obtención del DNA codificante SS2 a partir de pCR-TOPO 2.1-SS2. A) El DNA plasmídico pCR-TOPO 2.1-SS2 fue obtenido mediante minipreparación y el análisis electroforético realizado en un gel de agarosa al 0.8 %. En los carriles del 1-4 se muestra la calidad de DNA plasmídico pCR-TOPO 2.1-SS2. M= marcador 1 Kb ladder. B) Representación esquemática del plásmido pCR-TOPO 2.1-SS2 con los sitios de corte de las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRV*. C) La digestión del plásmido pCR-TOPO 2.1-SS2 con *BamHI* y *EcoRV* se analizó en un gel de agarosa al 1.5 %. El carril 1 muestra el DNA sin digerir y el carril 2 muestra los fragmentos de 3872 pb y 373 pb de la doble digestión. M= marcador de peso molecular 100 ladder (Novagen).

7.3.2 Secuencia codificante a T7-LS1

7.3.2.1 Obtención del DNA plasmídico de pCR-TOPO 2.1-LS1

De la misma forma que en la sección anterior, para llevar a cabo la transcripción *in vitro*, se utilizó la secuencia nucleotídica y codificante a la subunidad LS1 para posteriormente realizar con el producto obtenido la traducción *in vitro* como control positivo.

El DNA plasmídico pCR-TOPO 2.1-LS1 proporcionado por el M.C Fermín Mar Aguilar (Tesis de Doctorado, FCB, 2006) se realizó usando el método de minipreparación con lisis alcalina permitiendo la obtención aproximadamente de 1-5 µg totales de DNA (Figura 12A). Este DNA plasmídico pCR-TOPO 2.1-LS1 fue digerido con las enzimas de



restricción *HindIII* y *EcoRV* (Figura 12B) que permitieron la liberación del fragmento de 358 pb como se muestra en la Figura 12C.

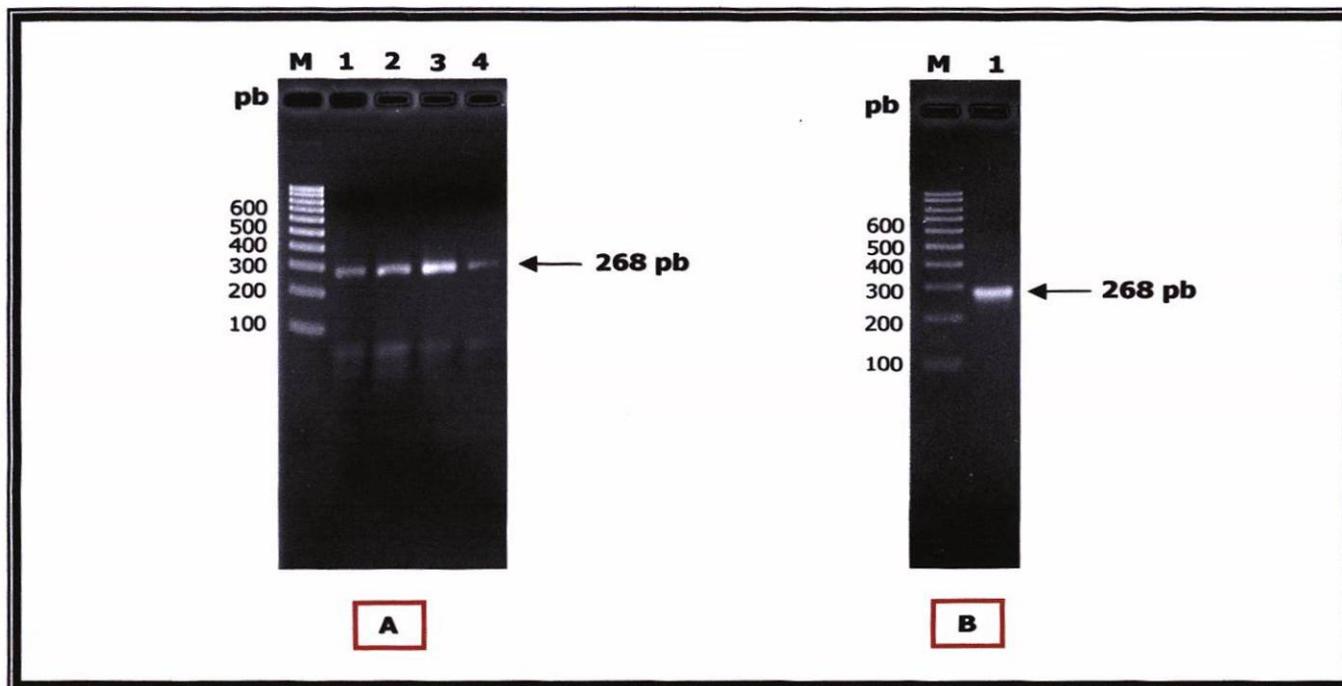


Figura 11. Amplificación mediante PCR de la secuencia SS2 con el promotor T7. A) La amplificación mediante PCR de T7-SS2 se obtuvo usando el DNA templado SS2 y los oligonucleótidos 5' T7 SS2 y 3' SS2RC3N. El gradiente de temperatura mostró la banda de amplificación de 268 pb en todas las temperaturas: 55.3°, 56.9°, 59.9° y 61.8°C (carriles 1-4). B) El producto amplificado de 268 pb (carril 1) fue purificado y visualizado en un gel de agarosa al 1 %. M= marcador de peso molecular 100 ladder (Novagen).

7.3.2.2 Amplificación mediante PCR de la secuencia codificante a T7-LS1

Con el objetivo de incorporar el promotor T7 a la secuencia codificante a LS1 se realizó la amplificación mediante PCR de la secuencia LS1 utilizando como templado el fragmento de 358 pb así como los oligonucleótidos 5'T7LS1 con la secuencia del promotor T7 y 3' LS1RCF (Mar Aguilar, Tesis de Doctorado, FCB, 2006). La Figura 13A muestra la amplificación obtenida de la secuencia nucleotídica codificante a T7-LS1 de 281 pb en todas las temperaturas del gradiente. Este producto amplificado T7-LS1 fue purificado con una buena eficiencia de recuperación como se observa en la Figura 13B. La cuantificación del DNA purificado mostró de 30 a 50 ng necesarios para realizar la transcripción *in vitro*.

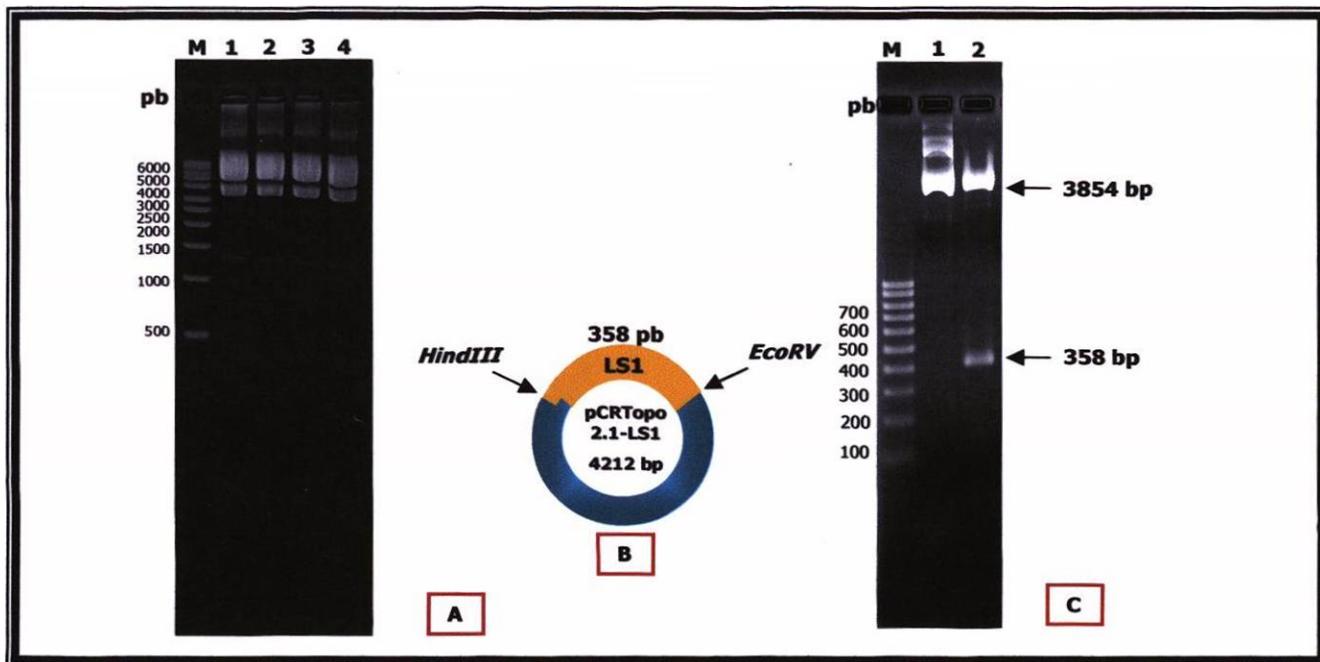


Figura 12. Obtención del DNA codificante a LS1 a partir de pCR-TOPO 2.1-LS1. A) El DNA plasmídico pCR-TOPO 2.1-LS1 fue obtenido mediante minipreparación por lisis alcalina y el análisis electroforético realizado en un gel de agarosa al 0.8 %. En los carriles del 1-4 se muestra la calidad de DNA plasmídico pCR-TOPO 2.1-LS1. M= marcador 1 Kb ladder. B) Representación esquemática del plásmido pCR-TOPO 2.1-LS1 con los sitios de corte de las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRV*. C) La digestión del plásmido pCR-TOPO 2.1-LS1 con *HindIII* y *EcoRV* se analizó en un gel de agarosa al 1.5 %. El carril 1 muestra el DNA sin digerir y el carril 2 muestra los fragmentos de 3854 pb y 358 pb de la doble digestión. M= marcador de peso molecular 100 ladder (Novagen).

7.3.3 Transcripción *in vitro* de T7-SS2 y LS1

La transcripción *in vitro* de las secuencias codificantes a SS2 y LS1 se realizó utilizando como DNA templado las secuencias amplificadas T7-SS2 y T7-LS1 de 268 y 281 pb respectivamente. Los resultados mostraron que se obtuvieron de 23 a 30 μg de T7-SS2 logrando así casi el 70 % de la transcripción *in vitro*. Para la secuencia de T7-LS1 se obtuvieron de 40 a 43 μg del RNAm esto corresponde a casi el 90 % de la transcripción *in vitro*. La Figura 14A muestra los RNAm de T7-SS2 y de en B se muestra T7-LS1 ambos con el peso molecular aproximado de los transcritos de 0.2 Kb como se esperaba.

7.4 Traducción *in vitro* de los RNAs de la hormiga *Pseudomyrmex* sp.

7.4.1 Obtención de los RNAs totales de la hormiga *Pseudomyrmex* sp.

Los RNAs totales procesados a partir de 900 mg de tejido mostraron una alta pureza en la relación de absorbancia A_{260}/A_{280} de 1.6 a 1.8 con una producción de los RNAs en cantidades que variaron de 2.96 a 3.04 μg totales. A pesar de que los RNAs totales extraídos de la hormiga mostraron una degradación parcial, se logró determinar la integridad mediante visualización de las bandas más abundantes de los RNAs ribosomales 28, 18 y 5S como se observa en la Figura 15.

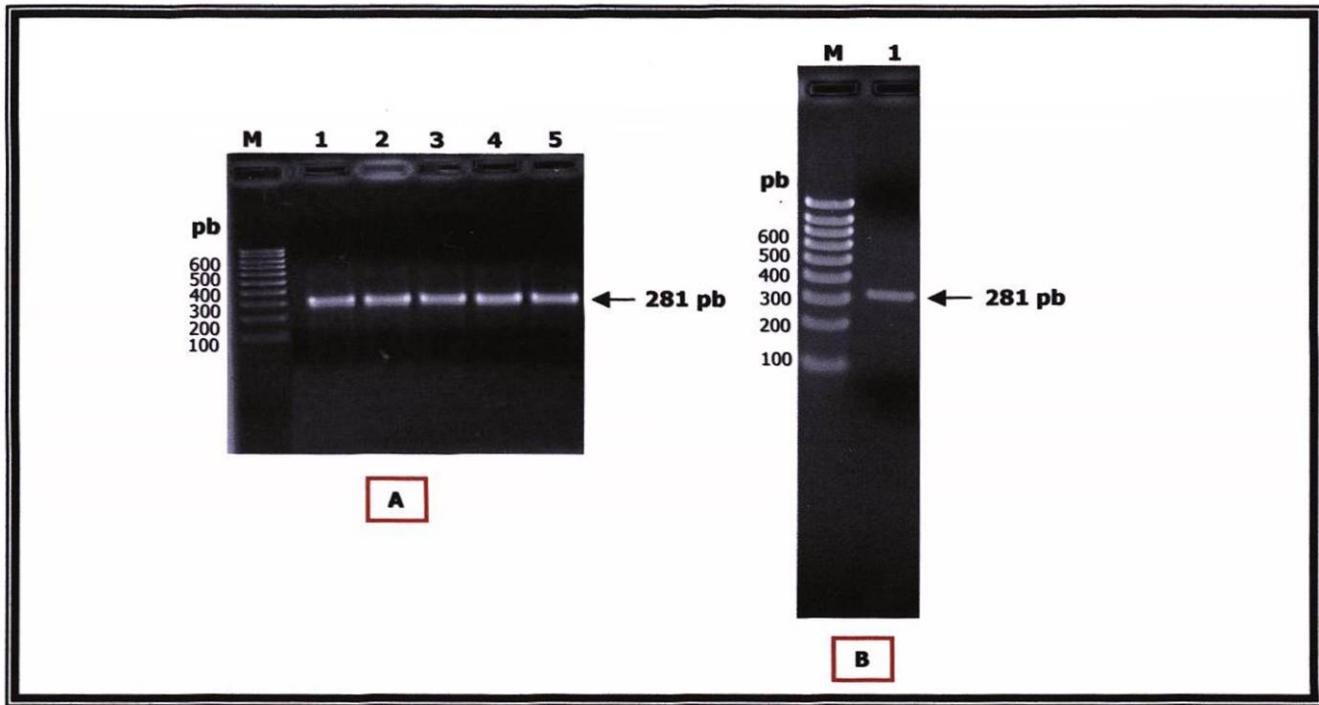


Figura 13. Amplificación mediante PCR de la secuencia LS1 con el promotor T7. A) La amplificación mediante PCR de T7-LS1 se obtuvo usando el DNA templado LS1 y los oligonucleótidos 5' T7LS1 y 3' LS1RCF. El gradiente de temperatura mostró la banda de amplificación de 281 pb en todas las temperaturas 54.5°, 57.2°, 59.8°, 62.2° y 65.2°C (carriles 1-5). **B)** El producto amplificado de 281 pb (carril 1) fue purificado y visualizado en agarosa al 1 %. M= marcador de peso molecular 100 ladder (Novagen).

7.4.2 Obtención de RNA poliA⁺ de la hormiga *Pseudomyrmex sp.*

La extracción del RNA poliA⁺ a partir de 0.5 g de tejido de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* mostró una relación de absorbancia A_{260}/A_{280} de 1.3 con una producción total de ~ 2 µg de RNA. El RNA poliA⁺ presentó buena integridad como se visualizó en condiciones desnaturalizantes en la Figura 16 comparado con ~ 3 ug/ de los RNAs totales previamente extraídos de la hormiga.

7.4.3 Estandarización de los anticuerpos anti-SS1 y LS1

Para estandarizar las condiciones de uso del anticuerpo policlonal SS1 se realizó la expresión del plásmido recombinante pMAL-c2X-SS1 en la cepa de expresión TB1 de la bacteria *Escherichia coli* Ca⁺⁺ competente inducida por 4 horas con IPTG (Salinas, 2005) como previamente se describe en materiales y métodos. La inmunodetección de la proteína de fusión conteniendo el péptido SS1 (MBP-SS1) con un peso de 45.7 KDa se realizó usando una dilución 1:500 del anticuerpo policlonal anti-SS1 mediante Western blot como se muestra en la Figura 17A. De la misma forma, se realizó también la estandarización del anticuerpo policlonal LS1 en extractos bacterianos que expresaron la proteína de fusión con el péptido LS1 (MBP-LS1) (Flores, 2006). La inmunodetección mediante Western blot permitió detectar la proteína de fusión MBP-LS1 con un peso molecular de 46 KDa utilizando una dilución 1:500 del anticuerpo anti-LS1 como lo demuestra la autoradiografía de la Figura 17B.



Las bandas no indicadas en la autorradiografía son probablemente inespecificidad y/o resultado del tiempo de exposición máximo debido a que los anticuerpos son de origen policlonal.

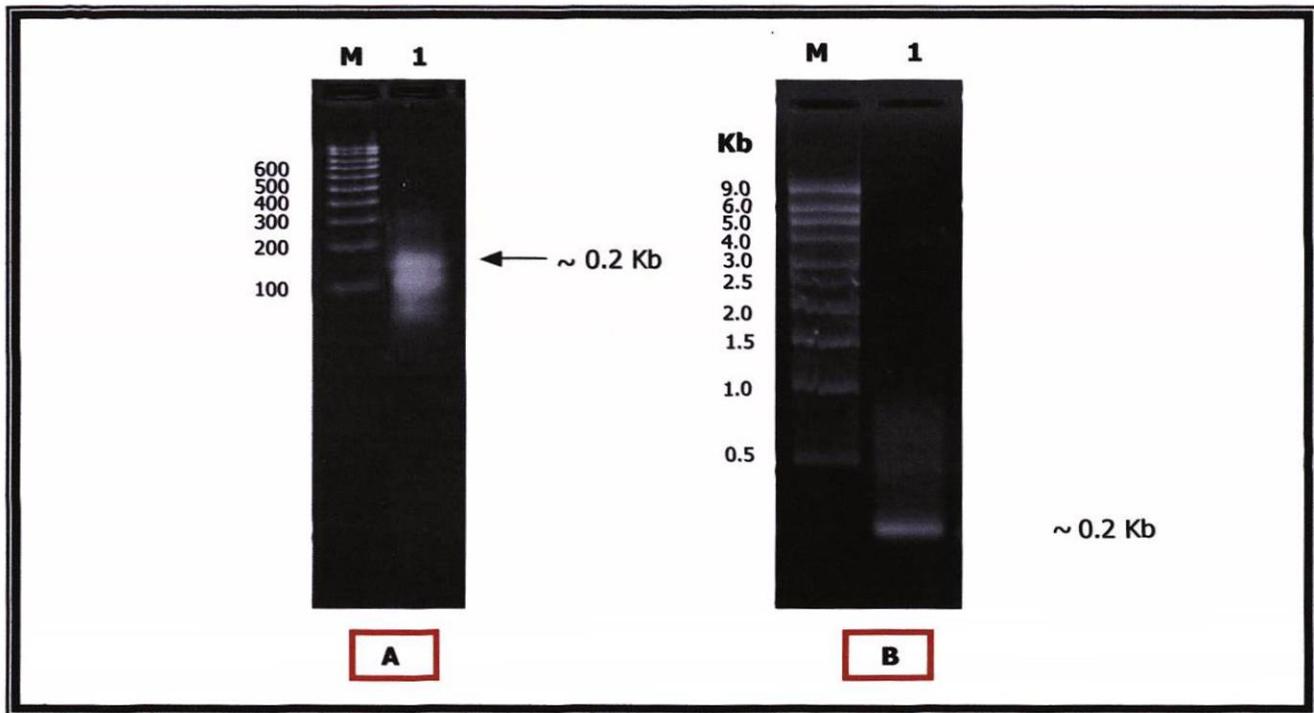


Figura 14. Transcripción *in vitro* de T7-SS2 y T7-LS1. (A) El gel de agarosa al 1.5 % muestra en el carril 1 el RNAm de ~ 0.2 Kb obtenido de la transcripción *in vitro* del DNA templado T7-SS2 usando el Kit AmpliCap™ T7 & SP6. M= Marcador de peso molecular 100 ladder (Novagen) (B) El gel de agarosa en condiciones desnaturizantes con glioxal al 1.5 % confirma la calidad y peso molecular del transcrito de ~ 0.2 Kb obtenido del DNA templado T7-LS1 en el carril 1. M= marcador RNA Millennium (Ambion).

7.4.4 Traducción *in vitro*

Para llevar la traducción *in vitro* de los RNAs obtenidos de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. se utilizó el sistema de lisado de reticulocitos provenientes de conejo previamente descrito en la sección de materiales y métodos. En la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos de la traducción *in vitro* del testigo positivo (RNAm de luciferasa) en Unidades Relativas de Luminiscencia (RLU) en seis ensayos independientes realizados. Estos resultados confirman la traducción del RNA control de luciferasa como testigo positivo en los que desafortunadamente no fue posible detectar la traducción de los RNAs de la hormiga (RNA poliA⁺ y RNA total). Tampoco fue posible detectar la traducción *in vitro* de los RNAs transcritos obtenidos previamente en la transcripción de las secuencias T7-SS2 y T7-LS1.

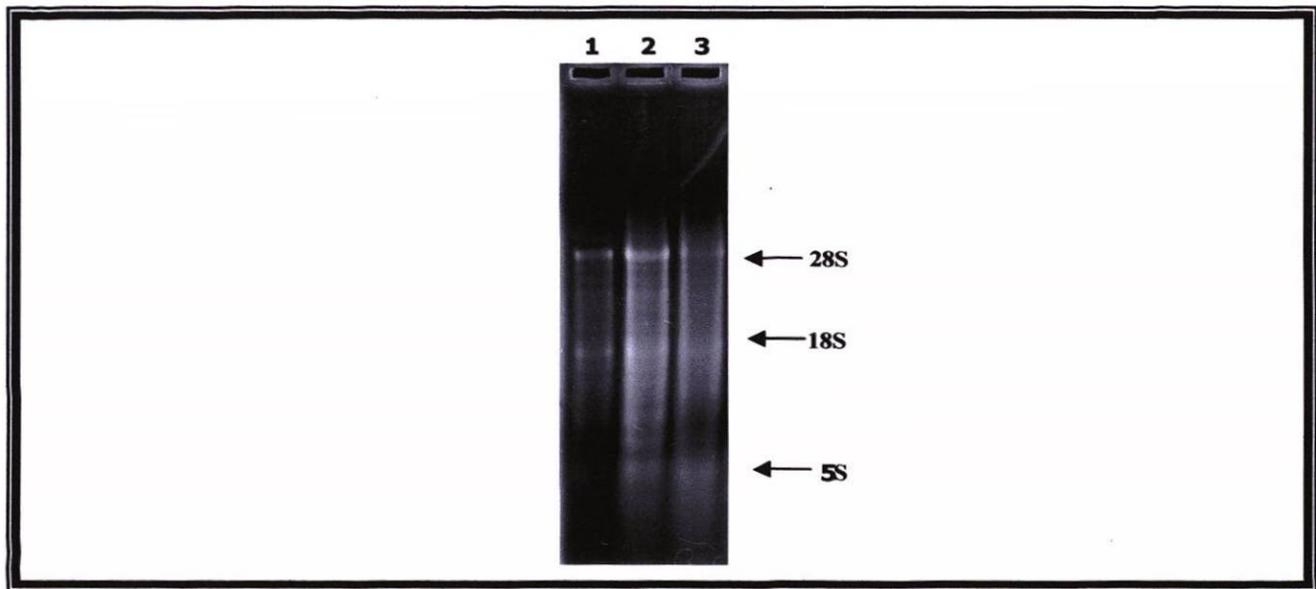


Figura 16. RNA total extraído de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* El RNA total de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* se obtuvousando la técnica de Trizol como se describe en materiales y métodos. El análisis electroforetico de los RNAs se realizó en un gel en condiciones desnaturalizantes con formaldehído al 1 % demostrando la integridad de ~ 3 µg de RNA por carril con las bandas 28, 18 y 5S (flechas).

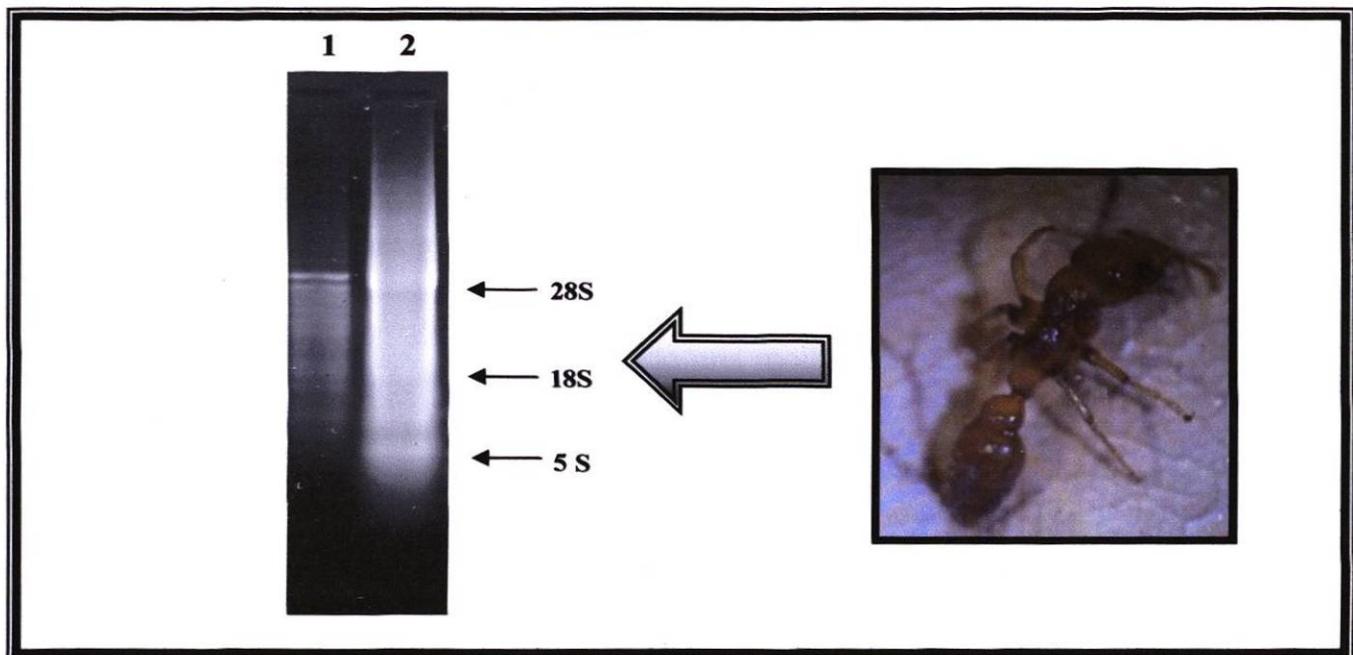


Figura 16. Extracción de RNA poliA⁺ de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* El RNA poliA⁺ fue obtenido directamente de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* usando el estuche comercial Straight A's mRNA Isolation System (Novagen). El RNA poliA⁺ obtenido fue visualizado en un gel de agarosa con glioxal al 1.5 % (carril 1). El carril 2 contiene ~ 3 µg de la muestra de RNA total obtenido por medio de la técnica de Trizol.

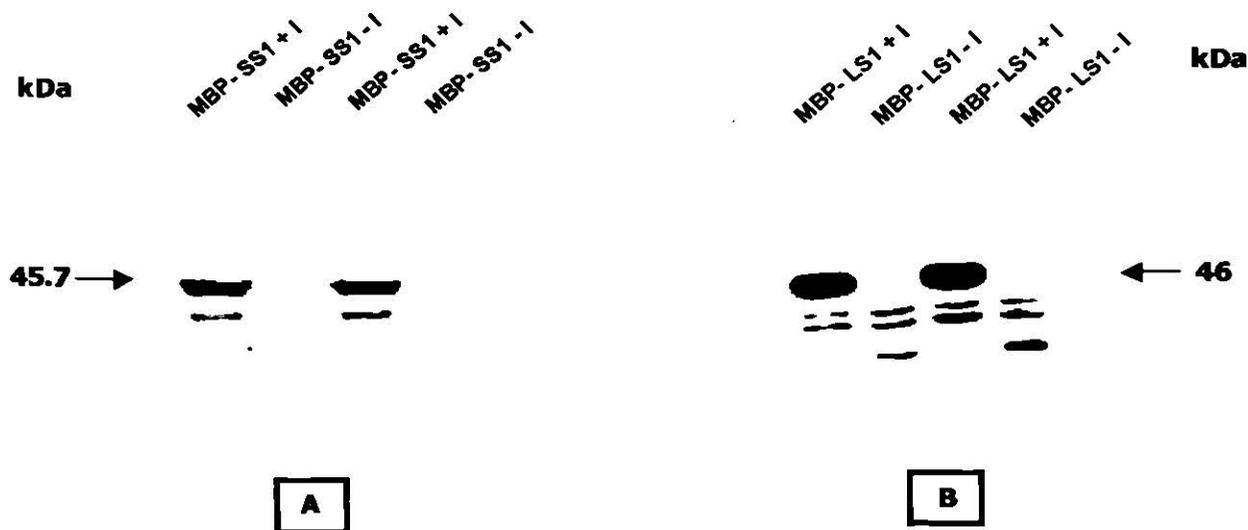


Figura 17. Estandarización de los anticuerpos anti-SS1 y anti-LS1 mediante Western blot. A) La autoradiografía muestra la inmunodetección de la proteína de fusión MBP-SS1 en las muestras inducidas por 4 horas con IPTG usando una dilución 1:500 del anticuerpo anti-SS1 con un peso molecular de 45.7 KDa. B) La inmunodetección de la proteína de fusión MBP-LS1 en las muestras inducidas por 4 horas con IPTG usando una dilución 1:500 del anticuerpo anti-LS1 mostró la banda de 46 KDa esperada. M= marcador de amplio espectro molecular (Protein Molecular Weights, BIORAD). Las bandas inespecíficas son resultado del tiempo de exposición máximo.

7.5 Inmunodetección de los péptidos de bajo peso molecular en extractos protéicos de *Pseudomyrmex sp.*

7.5.1 Detección de los péptidos de bajo peso molecular en extractos de la hormiga *Pseudomyrmex sp.*

La obtención de los extractos protéicos de abdomen, tórax, cabeza y patas de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* se realizó usando una modificación a la técnica de preparación de extractos de embriones de la mosca *Drosophila melanogaster* como se describió en materiales y métodos. La Figura 19 muestra un gel de Tricina-SDS-PAGE al 16.5 % con los extractos protéicos de las diferentes estructuras de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* donde se visualiza claramente en los extractos abdominales la alta abundancia de los péptidos de bajo peso molecular con una banda muy prominente como la ya descrita previamente en el veneno de la hormiga (Hink *et al.*, 1994, Flores y Salinas, 2002).

El gel muestra los péptidos de bajo peso molecular en los extractos provenientes de los abdómenes (carriles del 1-5) con un peso molecular mayor que el testigo positivo (péptido de 20 aminoácidos) como se esperaba. Estos péptidos no se detectaron en los extractos de la cabeza y patas de la hormiga (carriles 6 y 7) y los resultados corroboran la presencia de los péptidos de bajo peso molecular exclusivamente en el abdomen de la hormiga *Pseudomyrmex sp.*

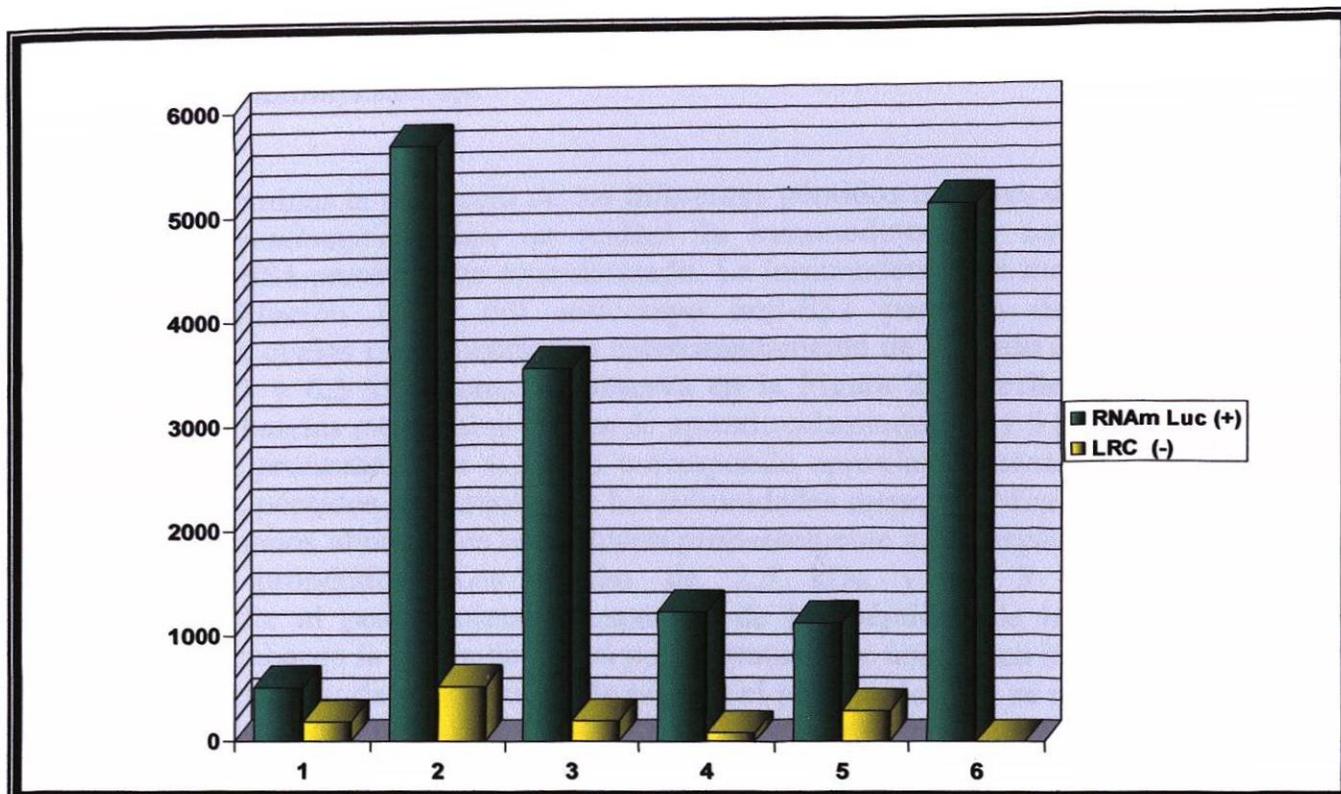


Figura 18. Ensayos de traducción *in vitro* usando el RNA de luciferasa. El análisis de los diferentes ensayos de la traducción *in vitro* fue realizado utilizando RNAm de luciferasa. La grafica muestra la actividad detectada en los diferentes ensayos de la traducción *in vitro* del RNAm de luciferasa en Unidades Relativas de Luminiscencia (RLU). Cada barra corresponde a experimentos independientes. La columna en color verde representa al RNAm de luciferasa traducido (+) y la columna en color amarillo representa al lisado de reticulocitos sin traducir como control negativo (-).

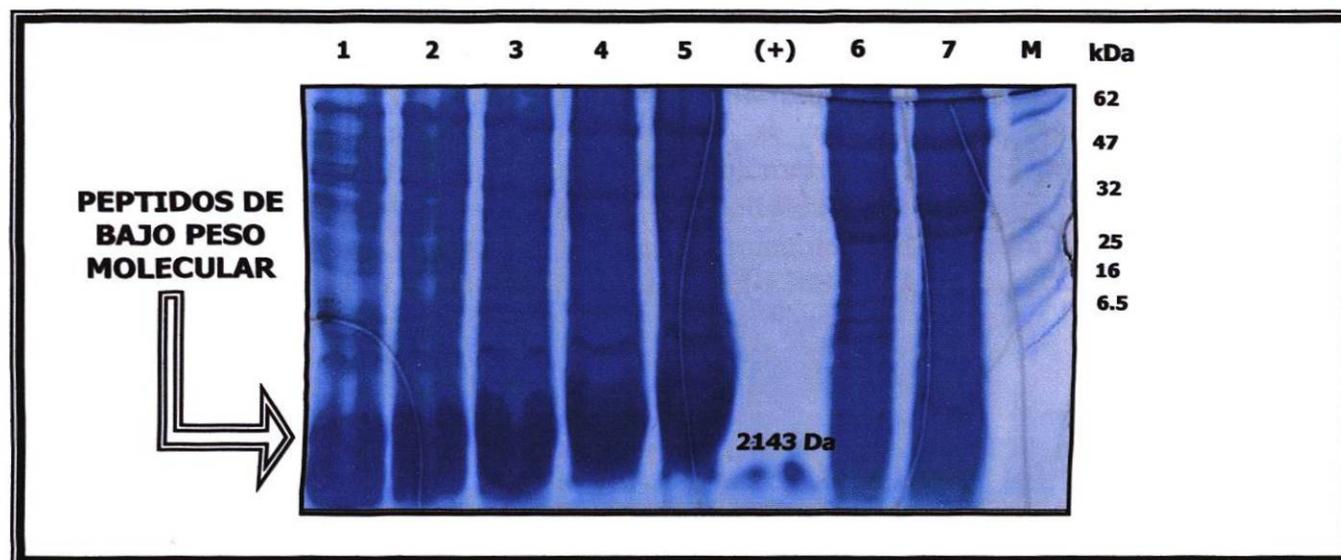


Figura 19. Análisis de los extractos protéicos de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. Los extractos protéicos de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. fueron analizados mediante electroforesis Tricina-SDS-PAGE al 16.5 %. Los carriles 1-5 muestran distintas cantidades del extracto obtenido a partir del abdomen de la hormiga (2, 4, 6, 8 y 10 µl) indicando con una flecha los péptidos de bajo peso molecular (+)= Péptido de 20 aminoácidos de la región conservada en el carboxilo terminal de las subunidades mayores. El carril 6 contiene el extracto de la cabeza y el carril 7 el extracto del tórax y patas. M= Marcador de peso molecular (Cell Signaling).



7.5.2 Inmunodetección de las subunidades menores de la hormiga

Pseudomyrmex sp.

Para determinar la presencia de los diferentes péptidos menores de los abdómenes de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. se realizó la inmunodetección usando el anticuerpo policlonal anti-SS1 previamente estandarizado. La inmunodetección mediante Western blot usando una dilución 1:500 del anticuerpo anti-SS1 permitió detectar dos bandas prominentes las cuales correspondieron aproximadamente de acuerdo al marcador de peso molecular a 2.5 y 6.5 kDa como se observa en la Figura 20 (carriles 1-3). Además, se detectaron tres bandas menos abundantes de aproximadamente 3, 4 y 5 kDa.

La banda prominente de 6.5 kDa corresponde aproximadamente al peso molecular esperado de los péptidos precursores de las subunidades menores. Mientras que, las bandas de 4 y 5 kDa menos abundantes constituyen probablemente a los péptidos intermedios que conservan el propéptido. Las bandas de 2.5 kDa y de 3 kDa corresponden aproximadamente al peso molecular esperado de los péptidos de bajo peso molecular maduros. Sin embargo la banda de 3 kDa podría tratarse de una forma intermedia.

Para determinar de una forma más precisa el peso molecular se realizó el análisis de las bandas utilizando el programa Gel-PRO 3.1 Analyzer (Dinco & Rhenium Industries, R. F, Israel). El peso molecular aproximado de los diferentes péptidos localizados en la autoradiografía se muestra en la Figura 21.

En el análisis el programa logró detectar la banda de 6.5 kDa la cual mostró un peso molecular entre 5.9358 y 6.3261 kDa, lo que indica que probablemente se trata de las formas precursoras de estos péptidos. En el caso de las bandas menos abundantes de 4 y 5 kDa el análisis mostró un peso molecular de 4.3100 correspondiente a la banda de 4 kDa y 5.3200 kDa para la banda de 5 kDa respectivamente lo que apoya que probablemente constituyen probablemente a los diferentes péptidos intermedios que conservan el propéptido. Asimismo, la banda de 2.5 kDa tuvo un peso molecular de 2.5101 kDa, así como la banda de 3 kDa con un peso molecular de 3.0100 kDa lo cual corresponde con el tamaño de los péptidos maduros. Además, se detectó una banda con un peso correspondiente de 2.0901 kDa que muy probablemente se trata del péptido maduro de la subunidad SS4 de acuerdo a la secuencia nucleotídica (Mar Aguilar, Tesis de Doctorado, FCB, 2006). La Tabla IV muestra los pesos moleculares detectados y analizados de las subunidades menores por medio del programa Gel-PRO 3.1 Analyzer.

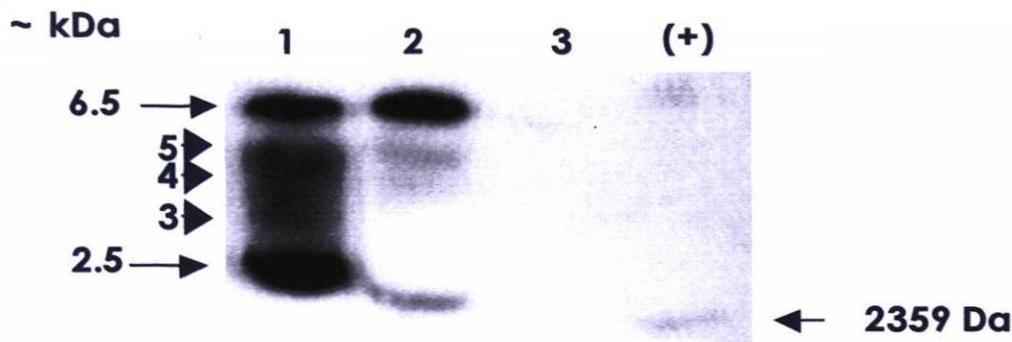


Figura 20. Inmunodetección de los péptidos codificantes a las subunidades menores de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* por medio de Western blot. La autorradiografía muestra la inmunodetección de las distintas subunidades encontradas en el abdomen de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* (carriles 1 al 3) usando una dilución 1:500 del Anticuerpo Anti-SS1. (+)= Péptido de 20 aminoácidos de la región conservada en el carboxilo terminal de las subunidades menores.

Tabla IV.

Pesos moleculares detectados por el Programa Gel-PRO 3.1 Analyzer en la inmunodetección de las subunidades menores

Bandas	Resultado Gel- PRO	Péptido correspondiente
6.5 kDa	5.9358 Da 6.3261 Da	Precursor
4 kDa	4.3100Da	Intermedio
5 kDa	5.3200 Da	Intermedio
3 kDa	3.0100 Da 2.0901 Da	Péptido maduro Péptido maduro
2.5	2.5101 Da	Péptido maduro

7.5.3 Inmunodetección de las subunidades mayores de la hormiga *Pseudomyrmex sp.*

De la misma forma se analizaron los péptidos de las subunidades mayores de la hormiga *Pseudomyrmex sp* por medio de inmunodetección usando una dilución 1:500 del anticuerpo policlonal LS1 previamente estandarizado. La Figura 22A muestra la detección mediante Western blot de los extractos abdominales donde se logró detectar en la mayoría de los experimentos realizados una sola banda correspondiente a 3.5 kDa de acuerdo al marcador de peso molecular (carriles 1 y 2). Esta banda de 3.5 kDa probablemente corresponde a los péptidos maduros de las subunidades mayores debido a que esta banda presentó el peso molecular esperado para ellas. Por otro lado, en la Figura 21B los extractos abdominales mostraron únicamente dos bandas de 6.5 kDa y 4 kDa. La banda de 6.5 kDa probablemente podrían tratarse de los péptidos precursores, mientras que la banda de 4 kDa respectivamente apoya lo que posiblemente corresponde a los diferentes péptidos intermedios o maduros.

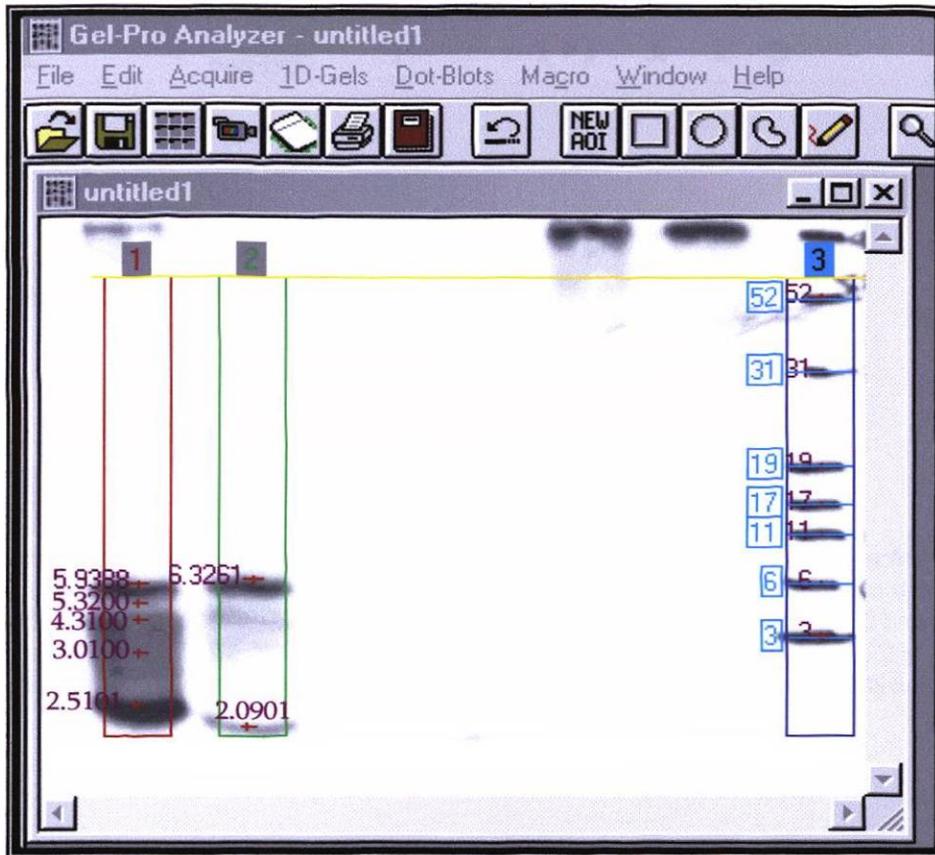


Figura 21. Análisis del peso molecular de los péptidos precursores, péptidos intermedios y maduros en los extractos de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* usando el software Gel-PRO 3.1 Analyzer. La imagen muestra la presencia de bandas de diferente peso molecular detectadas mediante Western blot usando el programa Gel-PRO 3.1 Analyzer. Se indican los pesos moleculares de los péptidos precursores, péptidos intermedios y maduros en color rojo (carriles 1 y 2) correspondientes a las subunidades menores. Marcador MultiMark Multi-Colored (Invitrogen) en carril 3.

De igual manera para determinar el peso molecular de una forma mas precisa en la inmunodetección de las subunidades mayores se llevo a acabo el análisis utilizando el programa Gel-PRO 3.1 Analyzer (Dinco & Rhenium Industries, R. F, Israel). La Tabla V indica los tamaños detectados en el análisis de las bandas de las subunidades mayores por medio del Programa Gel- PRO.

Asimismo, la Figura 23B muestra el análisis llevado a cabo para la banda de 6.5 kDa con un peso molecular de entre 6 y 6.6452 kDa que corresponde a los péptidos precursores de las subunidades mayores. Por otro lado, la Figura 23A muestra el análisis de la banda correspondiente a 4 kDa un peso molecular de 4.3846 kDa por lo que sugiere la presencia de los péptidos intermedios que conservan el propéptido o a los péptidos maduros.

De igual manera en análisis asignó para la banda de 3.5 kDa un peso molecular entre 3.8400 kDa y 3.8408 kDa por lo que podría corresponder a los péptidos maduros de las subunidades mayores.

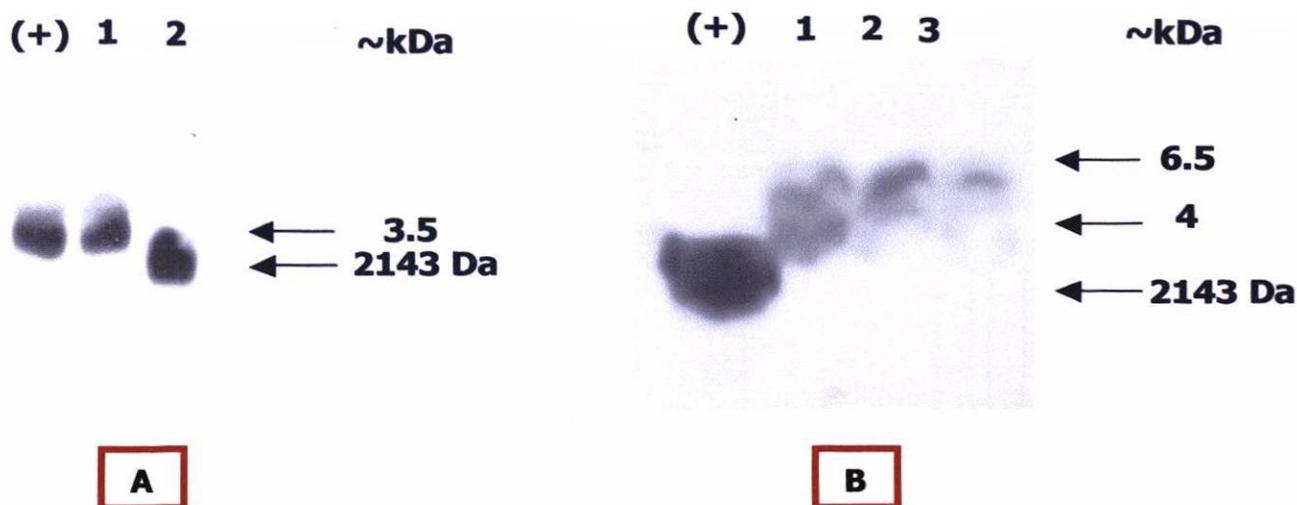
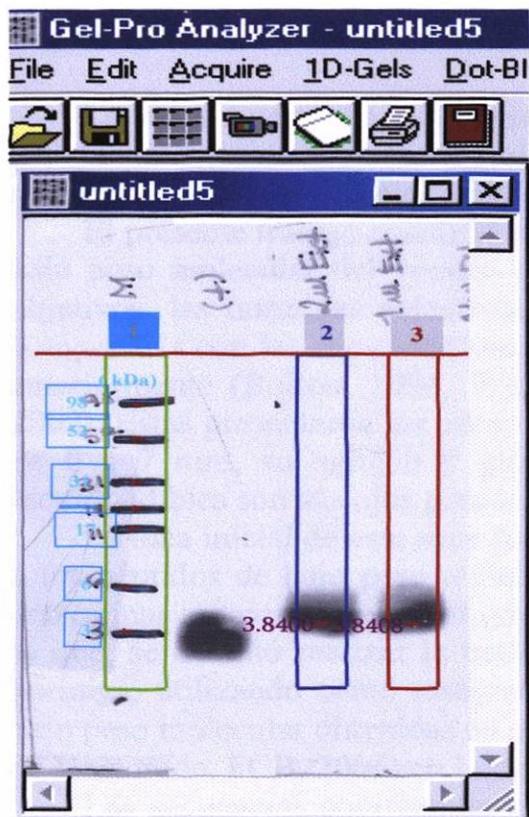


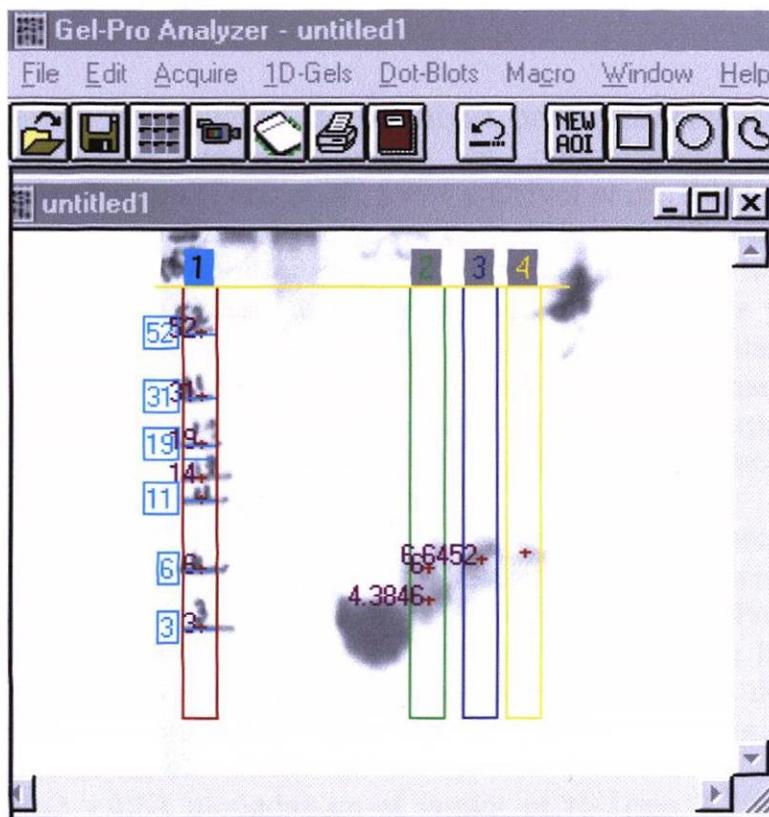
Figura 22. Inmunodetección de los péptidos de las subunidades mayores de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. mediante Western blot. La autorradiografía muestra en A la inmunodetección de las distintas subunidades mayores encontradas en el abdomen de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. (carriles 1 y 2) usando una dilución 1:500 del Anticuerpo Anti-LS1. En B la inmunodetección se observa en los carriles 1, 2 y 3. (+)= Péptido de 20 aminoácidos de la región conservada en el carboxilo terminal de las subunidades mayores.

Tabla V.
Pesos moleculares detectados por el Programa Gel-PRO 3.1 Analyzer en la inmunodetección de las subunidades mayores

Bandas	Resultado Gel- PRO	Péptido correspondiente
6.5 kDa	6 Da 6.64552 Da	Precursor
4 kDa	4.3846 Da	Intermedio
3.5 kDa	3.8400 Da 3.8408 Da	Péptido maduro



A



B

Figura 23. Análisis del peso molecular de los péptidos precursores, péptidos intermedios y maduros en los extractos de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* usando el software Gel-Pro Analyzer. La imagen muestra las distintas bandas encontradas en las inmunodetecciones por medio del programa Gel-Pro indicando los pesos moleculares de las diferentes subunidades. Se indican los pesos moleculares de los péptidos en color rojo.



8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La mayor parte de la información de los venenos de hormigas principalmente se enfoca principalmente a nivel bioquímico, caracterizando los componentes y relacionándolos con posibles actividades biológicas (Park *et al.*, 1994 y Orivel *et al.*, 2001).

El presente trabajo consistió en detectar y analizar el procesamiento de los péptidos de bajo peso molecular del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. Para cumplir con los objetivos, las hormigas colectadas en el árbol *Triplaris americana* fueron observadas y comparadas con las características taxonómicas de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. descritas anteriormente (Bolton, 1994, Ward, 1985, 1991, 1993 y 1999, Flores, 2002 y Salinas, 2002). Estas presentaron las características principales basadas en la longitud de su cuerpo de 6 a 7 mm, su aguijón y glándula venenosa bien desarrolladas y lo que las hace inconfundibles son sus ojos grandes de forma ovalada. (Ward, 1999).

La idea inicial de esta tesis fue realizar la traducción *in vitro* de los RNAs codificantes a los péptidos de bajo peso molecular del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. para determinar el tamaño de los oligopéptidos, así como el procesamiento de los mismos. Por lo que, se decidió realizar la traducción *in vitro* de los RNAs obtenidos del tejido de la hormiga, utilizando como testigos positivos las secuencias codificantes a los péptidos de bajo peso molecular obtenidas en nuestro laboratorio por el M.C Fermín Mar Aguilar (Tesis de Doctorado, FCB, 2006) en la traducción *in vitro*.

Las secuencias codificantes para SS2 y LS1 clonadas en el vector pCR-Topo 2.1 se obtuvieron mediante digestión con enzimas de restricción y se amplificaron por PCR usando oligonucleótidos específicos con la secuencia del promotor T7 para la adición del mismo en los ensayos de transcripción *in vitro*. Los productos amplificados obtenidos mostraron como se esperaba un tamaño de 268 y 281 pb para T7-SS2 y LS1 respectivamente con cantidades de 23 a 30 μ g para T7-SS2, y 40 a 43 μ g para T7-LS1.

Una vez obtenida la transcripción *in vitro* de las secuencias nucleotídicas de los testigos positivos T7-SS2 y T7-LS1 se obtuvieron 3 μ g de RNAs totales a partir de 900 mg del tejido de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. por medio de la técnica de Trizol. Además, se realizó la obtención del RNA poliA⁺ de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. utilizando el estuche comercial Straight A's mRNA Isolation System (Novagen, Madison, WI, USA) con una producción de aproximadamente 2 μ g por 0.5 g de tejido.

Los resultados mostraron que no fue posible detectar la traducción del RNAs totales y poliA⁺, ni de los transcritos obtenidos previamente en los ensayos de transcripción *in vitro* de las secuencias T7-SS2 y T7-LS1. Sin embargo, en seis ensayos de traducción *in vitro* independientes fue posible detectar la traducción del RNAm de luciferasa (testigo positivo) en Unidades Relativas de Luminiscencia que confirmaron la traducción *in vitro* del RNA control.

La detección de la traducción *in vitro* de los RNAs de la hormiga fue analizada mediante Western blot con los anticuerpos anti-SS1 y anti-LS1 así como utilizando el marcaje de las proteínas con Leucina [³H] (resultados no mostrados). La síntesis de proteínas de los RNAs de la hormiga no fue detectada a pesar de que los anticuerpos policlonales anti-SS1 y anti-LS1 mostraron claramente la detección de las proteínas de fusión MBP-SS1 y MBP-LS1. La estandarización de los anticuerpos policlonales anti-SS1 y anti-LS1 (Biosíntesis Incorporated, Lewisville, USA) mostró que el uso de una dilución



1:500 fue capaz de detectar los péptidos de bajo peso molecular en las proteínas de fusión MBP-SS1 y MBP-LS1.

Algunas de las probables causas que afectaron la síntesis de proteínas *in vitro* podría ser la presencia de inhibidores en la traducción como tioles oxidizados, algunos polisacáridos que son típicos inhibidores en la traducción y/o la concentración de ciertas sales que esta relacionada con la baja eficiencia de traducción tal es el caso de las concentraciones de potasio y magnesio que dependen del RNAm utilizado en la reacción (Manual Promega Corporación, Madison, WI, USA).

Debido a la falta de éxito en la traducción *in vitro* de los RNAs de la hormiga, se decidió cambiar la estrategia experimental para analizar la inmunodetección de los péptidos de bajo peso molecular directamente del tejido *in vivo* a partir de extractos protéicos abdominales de la hormiga *Pseudomyrmex* sp.

Los extractos abdominales de la hormiga fueron obtenidos usando una modificación a la técnica de preparación de extractos de embriones de la mosca *Drosophila melanogaster*, que permitió de una forma rápida y sencilla, la preservación de las proteínas sin degradación aparente. La presencia de los péptidos de bajo peso molecular fue confirmada exclusivamente en los extractos abdominales ya que estos péptidos no fueron detectados en los extractos protéicos de cabeza, patas y tórax de la hormiga.

Los resultados obtenidos en la inmunodetección de las subunidades menores mostraron dos bandas muy prominentes de 2.5 y 6.5 kDa y tres bandas menos abundantes de aproximadamente 3, 4 y 5 kDa. De acuerdo al análisis de los pesos moleculares deducidos de las secuencias nucleotídicas. La banda abundante de 6.5 kDa probablemente corresponde a los péptidos precursores de las subunidades SS1 (7268 Da), SS2 (7296 Da), SS3 (7353 Da) y SS4 (5811 Da). Mientras que las bandas de 4 y 5 kDa menos prominentes en la inmunodetección indican que probablemente corresponden a los péptidos intermedios que mantienen el propéptido, ya que los pesos moleculares corresponden a los pesos de bajo peso molecular SS1 (4563 Da), SS2 (4591 Da) y SS3 (4648 Da). Adicionalmente, las bandas de 2.5 y 3 kDa corresponden aproximadamente al peso molecular esperado de los péptidos maduros equivalentes para SS1 (3398 Da), SS2 (3426 Da), SS3 (3483 Da) y SS4 (1930 Da). Asimismo, la banda de 3 kDa podría tal vez corresponder a la forma intermedia SS4 que mantiene el propéptido ya el peso molecular esperado es de 3156 Da.

La inmunodetección realizada para detectar las subunidades mayores se llevo a cabo utilizando el mismo procedimiento de detección de las subunidades menores. Los resultados mostraron que en la mayoría de los casos se detectó una sola banda correspondiente a 3.5 kDa de acuerdo al marcador de peso molecular.

Si tomamos en cuenta la predicción de los pesos moleculares obtenidos de acuerdo a las secuencias nucleotídicas obtenidas por el M.C Fermín Mar Aguilar (Tesis de Doctorado, FCB, 2006) el péptido de 3.5 kDa coincide con los pesos moleculares de los péptidos maduros de las subunidades LS1 (3702 Da), LS2 (3711 Da), LS3 (3649 Da) y LS4 (3672 Da).

Es importante mencionar que en un ensayo la inmunodetección de los péptidos de las subunidades mayores de los extractos abdominales mostró dos bandas correspondientes a 6.5 y 4 kDa. Estos resultados muestran que la banda de 6.5 kDa podría corresponder a los péptidos precursores debido a que el peso molecular para las subunidades es para LS1 (7577 Da), LS2 (7586 Da), LS3 (7472 Da) y LS4 (7495 Da). Asimismo, la banda de 4 kDa podría corresponder ya sea a los péptidos maduros ó a los péptidos intermedios como se muestra en la Figura 24.



Consideramos que la falta de detección y/o variabilidad de los péptidos precursores e intermedios en la inmunodetección de la subunidades mayores es debida probablemente a la mayor susceptibilidad de estos péptidos a degradación y/o al procesamiento más rápido de los mismos en la glándula de la hormiga *Pseudomyrmex* sp.

La variabilidad encontrada en los pesos moleculares observados con respecto a los esperados podría ser explicada en parte debido al corrimiento electroforético en los geles de poliacrilamida aunque los pesos moleculares fueron confirmados de una forma más precisa utilizando el programa Gel- Pro 3.1 Analyzer (Dinco & Rhenium Industries, R. F, Israel). Este programa detectó pesos moleculares similares en las bandas de un mismo corrimiento y variabilidad de hasta 1 kDa en diferentes corrimientos.

Sin embargo, a pesar de la variabilidad observada en los diferentes geles, los resultados en el análisis de las bandas obtenidas mediante la inmunodetección de ambas subunidades presentaron resultados muy cercanos a la deducción de los pesos moleculares que se realizó en base a las secuencias aminoacídicas. Debido a lo anterior, consideramos que las bandas detectadas en la inmunodetección corresponden a los péptidos maduros, intermedios y precursores de bajo peso molecular de la hormiga *Pseudomyrmex* sp.

Los resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis demuestran que:

- ⇒ La inmunodetección de los péptidos maduros tanto de las subunidades menores como de las mayores del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex* sp.
- ⇒ La inmunodetección de los diferentes péptidos precursores e intermedios de las subunidades menores.
- ⇒ Los pesos moleculares obtenidos de los péptidos maduros y de las diferentes formas de procesamiento corroboran la expresión y procesamiento de los péptidos de bajo peso molecular en la glándula de la hormiga.

Los insectos constituyen el grupo más grande dentro del reino animal, con más de un millón de especies descritas (Valderrama, 2003). El análisis de los componentes de diferentes venenos ha mostrado algunos péptidos con un fuerte e importante potencial terapéutico (Lewis y García, 2003). Recientemente se ha aplicado un enfoque molecular mediante la generación de bibliotecas de DNAC y la caracterización de los RNAs codificantes a estos péptidos por lo que se ha logrado en algunos casos deducir el tamaño del precursor, el péptido señal y el sitio de corte proteolítico (Gmachl *et al.*, 1995 y Santos *et al.*, 2003). En animales marinos como los caracoles conidicos, donde su estudio esta fundamentado en el papel fisiológico neuronal se ha revelado mediante la creación de bibliotecas de DNAC regiones ricas en cisternas, constantes e hipervariables en los propéptidos de las conotoxinas, (Woodward *et al.*, 1990).

Sin embargo, en los himenópteros el veneno peptídico mas estudiado a nivel de procesamiento ha sido la melitina proveniente de la abeja de miel *Apis mellifera* de donde se conoce el precursor, el propéptido llamado promelitina e incluso la secuencia del péptido señal (Suchanek, 1975, Suchanek, 1978, Zimmermann, 1986 y Vlazac *et al.*, 1983)

Debido a lo anterior, el presente trabajo abre la posibilidad para un análisis posterior que permita confirmar el procesamiento de los péptidos de bajo peso molecular en la glándula de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. para verificar la predicción de procesamiento del propéptido postulado en las secuencias nucleotídicas clonadas de la hormiga.



9. BIBLIOGRAFIA

- Alessandri-Haber, N., Lecoq, A., Gasparini, S., Grangier-Macmath, G., Jacquet, G., Harvey, A. L., de Medeiros, C., Rowan, E. G., Gola, M., Menez, A., and Crest, M. 1999. Mapping the functional anatomy of BgK on Kv1.1, Kv1.2, and Kv1.3. Clues to design analogs with enhanced selectivity. *J Biol Chem* 274, 35653-35661.
- Andreu, D., and Rivas, L. 1998. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47, 415-433.
- Aneiros, A., Garcia, I., Martinez, J. R., Harvey, A. L., Anderson, A. J., Marshall, D. L., Engstrom, A., Hellman, U., and Karlsson, E. (1993). A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. Isolation, amino acid sequence and biological activity. *Biochim Biophys Acta* 1157, 86-92.
- Antil-Delbeke, S., Gaillard, C., Tamiya, T., Corringier, P.-J., Changeux, J.-P., Servent, D., and Menez, A. 2000. Molecular determinants by which a long chain toxin from snake venom interacts with the neuronal alpha 7-nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 275, 29594-29601.
- Bianchi, L., Wible, B., Arcangeli, A., Tagliatela, M., Morra, F., Castaldo, P., Crociani, O., Rosati, B., Faravelli, L., Olivotto, M., and Wanke, E. 1998. Herg encodes a K⁺ current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells? *Cancer Res* 58, 815-822.
- Bilo, B. M., Rueff, F., Mosbech, H., Bonifazi, F., and Oude-Elberink, J. N. (2005). Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy* 60, 1339-1349.
- Bechinger, B., Zasloff, M., and Opella, S. J. 1993. Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci* 2, 2077-2084.
- Blazquez M, Shennan KL. 2000. Basic Mechanisms of secretion: sorting into the regulated secretory pathway. *Biochem Cell.* 78(3):181-91.
- Boman HG y Hultmark D. 1987. Cell-free immunity in insects. *Annu Rev Microbiol.* 41: 103-126.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L., and Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol* 23, 329-344.
- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., River, J., and Guillemin, R. 1973 *Science*, 179, 77-79.



- Cao ZY, Shen WQ, Pan YP, Xiao X, Liu XM, Wang XL, Liang XT, Yu DQ. 2003. Purification, characterization of two peptides from *Buthus martensi* Karch. *J Pept Res.* 62(6):252-9.
- Córdoba, J., Martín, J. C., Yélamos, F., y Rodríguez F. Principios de Urgencias, Emergencias y Cuidados Críticos. Edición Electrónica. UNINET. 2006.
- Corzo G, Escoubas P, 2003. Pharmacologically active siper peptide toxins. *Cell Mol Life Sci.* 60(11):2409-26.
- Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K. J., He, W., Norton, R. S., and Nakajima, T. 2001. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem J* 359, 35-45.
- Corzo, G., Escoubas, P., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Kristensen, C. P., and Nakajima, T. (2000). Isolation, synthesis and pharmacological characterization of delta-palutoxins IT, novel insecticidal toxins from the spider *Paracoelotes luctuosus* (Amaurobiidae). *Eur J Biochem* 267, 5783-5795.
- Chacur, M., Gutierrez, J. M., Milligan, E. D., Wieseler-Frank, J., Britto, L. R., Maier, S. F., Watkins, L. R., and Cury, Y. (2004). Snake venom components enhance pain upon subcutaneous injection: an initial examination of spinal cord mediators. *Pain* 111, 65-76.
- Chacur, M., Milligan, E. D., Sloan, E. M., Wieseler-Frank, J., Barrientos, R. M., Martin, D., Poole, S., Lomonte, B., Gutierrez, J. M., Maier, S. F., *et al.* (2004). Snake venom phospholipase A2s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. *Pain* 108, 180-191.
- Chavez, R. A., Miller, S. G., and Moore, H. P. (1996). A biosynthetic regulated secretory pathway in constitutive secretory cells. *J Cell Biol* 133, 1177-1191.
- Dannies, Priscilla, S., Protein Hormones storage in secretory granules: Mechanism for concentration and sorting. *Endocrine Reviews.* 20(1):229-37.
- Dauplais, M., Gilquin, B., Possani, L. D., Gurrola-Briones, G., Roumestand, C., and Menez, A. (1995). Determination of the three-dimensional solution structure of noxiustoxin: analysis of structural differences with related short-chain scorpion toxins. *Biochemistry* 34, 16563-16573.
- De Roodt, A. R., Salomon, O. D., Orduna, T. A., Robles Ortiz, L. E., Paniagua Solis, J. F., and Alagon Cano, A. 2005. [Poisoning by bee sting]. *Gac Med Mex* 141, 215-222.
- De Roodt, A. R., Estevez-Ramirez, J., Paniagua-Solis, J. F., Litwin, S., Carvajal-Saucedo, A., Dolab, J. A., Robles-Ortiz, L. E., and Alagon, A. 2005. [Toxicity of venoms from snakes of medical importance in Mexico]. *Gac Med Mex* 141, 13-21.



- D' Suze, G., Salazar, V., Diaz, P., Sevcik, C., Azpurua, H., Bracho, N. 2004. Histopathological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rams. *Toxicon* 15: 44(8): 851-60.
- De Weille, J., Schweitz, H., Maes, P., Tartar, A., and Lazdunski, M. 1991. Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *PNAS* 88, 2437-2440.
- Eldridge, R., Li, Y., and Miller, L. K. 1992. Characterization of a baculovirus gene encoding a small conotoxinlike polypeptide. *J Virol* 66, 6563-6571.
- Ferreira, S. H., Bartelt, D. C., and Greene, L. J. (1970). Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* 9, 2583-2593.
- Garateix, A., Vega, R., Salceda, E., Cebada, J., Aneiros, A., and Soto, E. (2000). BgK anemone toxin inhibits outward K(+) currents in snail neurons. *Brain Res* 864, 312-314.
- Garcia, M. L., Gao, Y., McManus, O. B., and Kaczorowski, G. J. 2001. Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. *Toxicon* 39, 739-748.
- Gauldie, J., Hanson, J.M., Rumjanek, F.D., Shipolini, R.A., and Vernon C.A. 1976. The peptide components of bee venom. *Eur. J.Biochem.* 61: 369-376.
- Geller, D. M., Currie, M.G., Wakitani, K., Cole, B.R., Adams, S. P., Fok, F. K., Siegel, N. R., Eubanks, S. R., Gallupi, G. R., and Needleman, P. 1984. *Biochem. Biophys. Res. Común.*, 120, 333-338.
- Gmachl M. Kreil G. 1995. The Precursor of the Bee Venom Constituents Apamin and MCD Peptide are Escoded by two genes in tandem which share the same 3'-exon. *The Journal of Biological Chemistry.* 270(21):12704-12708.
- Gendeh, G. S., Chung, M. C., and Jeyaseelan, K. (1997). Genomic structure of a potassium channel toxin from *Heteractis magnifica*. *FEBS Lett* 418, 183-188.
- Gendeh, G. S., Young, L. C., de Medeiros, C. L., Jeyaseelan, K., Harvey, A. L., and Chung, M. C. (1997). A new potassium channel toxin from the sea anemone *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning, and functional expression. *Biochemistry* 36, 11461-11471.
- Gutierrez, J. M., Chaves, F., and Bolanos, R. (1980). [Comparative study of venoms of newborn and adult specimens of *Bothrops asper*]. *Rev Biol Trop* 28, 341-351.
- Habermann, E., and Zeuner, G. 1971. Comparative studies of native and synthetic melittins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmakol* 270, 1-9.



Harvey, A. 1999. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? *TIPS* 20 196-198.

Huang RH, Liu ZH, Lrang SP. 2003. Purification and characterization of a neurotoxic peptide huwentoxic-III and a natural inactive mutant from the venom of spider *Selenocosmia huwena wang* (*Ornithactonus huwena* Wang). *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 35(11):976-80.

Hink, W. F. Jaworski D.C, and Pappas, P.W. 1994. Partial Biochemical characterization of venom from the ant *Pseudomyrmex triplarinus*. *Toxicon* 32, 763-772.

Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., and Boman, H. 1980. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem* 106, 7-16.

Holzmann, G. 1981. United States Patent 4, 247, 540.

Iimura, O., Shimamoto, K., Ando, T., Ura, N., Ishida, H., Nakagawa, M., Yokoyama, T., Fukuyama, S., Yamaguchi, Y., and Yamaji, I. 1987. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 65,1701-1705.

Imperial JS, Watkins M, Chen P, Hillyard DR, Cruz LJ, Olivera BM. 2003. The augertoxins: biochemical characterization of venom components from the toxoglossate gastropod *Teverbra subulata*. *Toxicon*. 42(4):391-8.

Inagaki, H., Akagi, M., Imai, H. T., Taylor, R. W., and Kubo, T. (2004). Molecular cloning and biological characterization of novel antimicrobial peptides, pilosulin 3 and pilosulin 4, from a species of the Australian ant genus *Myrmecia*. *Arch Biochem Biophys* 428, 170-178.

Jun-Nentwing L. 2003. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell Mol Life Sci*. 60(12):2651-68.

Jouvenaz DP, Blum MS y MacConell JG. 1972. Antibacterial activity of venom alkaloids from the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2: 291-293

Kalman, K., Pennington, M. W., Lanigan, M. D., Nguyen, A., Rauer, H., Mahnir, V., Paschetto, K., Kem, W. R., Grissmer, S., Gutman, G. A., *et al.*, 1998. ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *J Biol Chem* 273, 32697-32707.

Karp Gerald, *Biología Celular y Molecular*, 1998, 1ª Edición. MacGraw- Hill Interamericana, México, pp 439 – 450.

Kim, J. B., Gadboll, V., Whittaker, J., Barton, B. A., and Conlon, J. M. 2000. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 120, 353-363.



- Le Borgne R, Hoflack B. 1998. Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cel. *Biochim Biophys Acta*. 1404(1-2): 195-209.
- Lee, C. Y., Chiappinelli, V. A., Takasaki, C., Kimura, S., Goto, K., and Masaki, T. 1988. *Nature*, 335, 303.
- Lewis, J.C., y De La Dande, I.S. 1967. Pharmacological and enzymic constituents of the venom of the an Australian 'bulldog' ant, *Myrmecia piriformis*, *Toxicon*, 6, 109.
- Lewis, R., and Garcia, M. 2003. Therapeutic potential of venom peptides. *Nat Rev Drug Discov* 2, 790-802.
- Liu X, Fellers JP, Wilde GE, Stuart w, Chen MS. 2004. Characterization of two genes expressed in the salivary glands the Hessian Fly, *Mayetiola destructor* (Say). *Insect Biochem Mol Biol*. 34(3):229-37.
- Lowenberger C, Charlet M, Vizioli J, Kamal S, Richman A, Christensen BM y Bulet P. 1999. Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and RNAm expression of a newly isolated member of the cecropin family from the mosquito vector *Aedes aegypti*. *J Biol Chem*. 274: 20092-20097.
- Mackessy, S.P. 2002 Toxinology of colubrid snakes: biology, venoms and envenomation. Introduction to the special volume. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews*. 21(1 & 2):vii-ix.
- Marshall, S. H., and Arenas, G. 2003. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Journal of Biotechnololy*. 2, 272-284.
- Mebs, D. 2001. Toxicity in animals. Trends in evolution? *Toxicon* 39, 87-96
- Moerman L, Bosteels S, Noppe W, Willems J, Clynen E, Schoofs L. 2002. Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *Eur J Biochem*. 269(19):4799-810.
- Ondetti, M. 1988. Structural relationships of angiotensin converting-enzyme inhibitors to pharmacologic activity. 77, - 174-178.
- Ondetti, M., Williams, N., Sabo, E., Pluscec, J., Weaver, E., and Kocy, O. 1971. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis. *Biochemistry* 10, 4033-4039.
- Orivel J, Redeker V, Le Caer J-P, krier F, Revol-Junelles A-M, Longeon A, Chaffotte A, Dejean A y Rossier J. 2001. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides form venom of ant *Pachycondyla goeldii*. *J Biol Chem*. 276(21): 17823-17829.



- Pastrana, J., Blasco, R., Erce, R., and Pinillos, M. 2003. Animal sting and bites. *An Sist Sanit Navar* 26 *Suppl* 1, 225-241
- Pan, J., and Hink, W. 2000. Isolation and characterization of myrmexins, six isoforms of venom proteins with anti-inflammatory activity from the tropical ant, *Pseudomyrmex triplarinus*. *Toxicon* 38, 1403-1413.
- Piek, T. (1991). Neurotoxic kinins from wasp and ant venoms. *Toxicon* 29, 139-149.
- Pennington, M. W., Mahnir, V. M., Krafe, D. S., Zaydenberg, I., Byrnes, M. E., Khaytin, I., Crowley, K., and Kem, W. R. 1996. An essential binding surface for ShK toxin interaction with rat brain potassium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219, 696-701.
- Pradayrol, L., Jornvall, H., Mutt, V., and Ribet, A. 1980. N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett.*, 109, 55-58.
- Quintana, C., and Otero, P. 2002. Envenenamiento aracnídico en las Americas. *MedUnab* 5, 1-9
- Sakaguchi, M. (1997). Eukaryotic protein secretion. *Curr Opin Biotechnol* 8, 595-601.
- Sandall, D., Satkunanathan, N., Keays, D., Polidano, M., Liping, X., Pham, V., Down, J., Khalil, Z., Livett, B., and Gayler, K. 2003. A novel alpha-conotoxin identified by gene sequencing is active in suppressing the vascular response to selective stimulation of sensory nerves in vivo. *Biochemistry* 42, 6904-6911.
- Sanguinetti, M. C., Johnson, J. H., Hammerland, L. G., Kelbaugh, P. R., Volkmann, R. A., Saccomano, N. A., and Mueller, A. L. (1997). Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels. *Mol Pharmacol* 51, 491-498.
- Santos AD, McIntosh JM, Hillyard DR, Cruz LJ, O livera BM. 2003. The A-superfamily of conotoxins: Structural and functional divergence. *J Biol Chem.*
- Schweitz, H., Bruhn, T., Guillemare, E., Moinier, D., Lancelin, J. M., Beress, L., and Lazdunski, M. (1995). Kalicludines and kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K⁺ channels. *J Biol Chem* 270, 25121-25126.
- Simmaco, M., Mignogna, G., and Barra, D. (1998). Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers* 47, 435-450.
- Selisko, B., Gacia, C., Becerril, B., Delepierre, M., Possani, L. D. 1996. An insect-specific toxin from *Centruroides noxius* Hoffmann. Cdna, primary structure, three-dimensional model and electrostatic surface potentials in comparison with other toxin variants. *Eur J Biochem* 1:242(2):235-42.



- Sewald, N., and Jakube, H. D. 2002. Peptides: Chemistry and Biology, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinmheim.
- Schmidt, J. O. 1986. Chemistry, pharmacology and chemical ecology of ant venoms. In: Venoms of the Hymenoptera, pp.425-508 Pike T. (ed). Academic Press, London.
- Schmidt, J. O., Blum, M. S. and Overal, W. L. 1986. Comparative enzimology af venom from stinging hymenoptera. *Toxicon* 29, 907- 921.
- Schultz, D.R and Arnold, P. I. 1978. Ant venom (*Pseudomyrmex* sp.) as an activator of C1 an inactivator of the C3b inactivator: Its use in rheumatoid arthritis. In *Clinical Aspects of the Complement System*, W. Opferkuch, K. Rother, and D. R. Schultz (Eds.). Georg Thieme Publishers, Stuttgart, pp. 172-186.
- Schultz, D.R and Arnold, P. I. 1984. Immunochemical and clinical studies of venom from the ant *Pseudomyrmex badius* sp. In: *Handbook of Nartural Toxins*, Vol. 2. Insects Poisons, Allegens and Other Invertebrate Venoms, pp. 243-290 (Tu, A.T., Ed.) New York: Marcel Dekker.
- Suchanek G, Kindas-mugge I y Kreil G. 1975. Translation of honeybee promelittin messenger RNA. Formation of a larger product in a mamalian cell-free system. *Eur J Biochem.* 60(1) : 309-315.
- Suchanek G, Kreil G y Hermodson MA. 1978. Aminoacid sequence of honeybee prepromelittin synthesized in vitro. *PNAS.* 75(2): 701-704.
- Swartz, K. J., and MacKinnon, R. (1995). An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron* 15, 941-949.
- Szolajska, E., Poznanski, J., Ferber, M. L., Michalik, J., Gout, E., Fender, P., Bailly, I., Dublet, B., and Chroboczek, J. (2004). Poneratoxin, a neurotoxin from ant venom. Structure and expression in insect cells and construction of a bio-insecticide. *Eur J Biochem* 271, 2127-2136.
- Torres, L. A., Gurrola, G. B., Zamudio, Z. F., Possani, D. L. 2000. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur. J. Biochem.* 267, 5023-5031.
- Tossi, A., and Sandri, L. 2002. Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides. *Curr Pharm Des* 8, 743-761.
- Valderrama, H. R. 2003. Aspectos toxinológicos y biomédicos del veneno de las abejas *Apis mellifera*. *IATREIA* 16, 217-227.
- Valdes, R. C. Y., Bilbao, D. M., León, A. J. L. and Merchan, G. F. 2002. Origen e importancia de la fosfolipasa A2 de secreción. *Rev Cubana Farm* v.36 n.2 (revista en linea)



- Vlasak R, unger-Ullmann C y Frischauf AM. 1983. Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for honeybee prepromelittin. *Eur J Biochem.* 135(1): 123-126.
- Vnadenplas ML. Vandenplas S, Brebner K, Bester AJ, Boyd CD. 1985. characterization of the messenger RNA population coding for components of vipid snake venom. *Toxicon.* 23(2):289-305.
- Wilson D, Alewood P. 2004. Australian Funnel- Web Spider Venom Analyzed With On-Line RP-HPLC-Techniques. *Methods Mol Biol.* 251:307-22.
- Wheeler, W. M. 1942. Studies of neotropical ant-plants and their ants. *Harvard Bull. Mus. Comp. Zool.* 90, 41-65.
- Ward, P.S. (1985) The Nearctic species of the genus *Pseudomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Quaestiones Entomologicae* 21: 209-246.
- Ward, P.S. (1991) Phylogenetic analysis of pseudomyrmecine ants associated with domatia-bearing plants. Pp. 335-352 in Huxley, C.R., Cutler, D.F. (eds.) *Ant-plant interactions*. Oxford University Press, xviii + 601pp.
- Ward, P.S. (1993) Systematic studies on *Pseudomyrmex* acacia-ants (Hymenoptera: Formicidae: Pseudomyrmecinae). *J. Hym. Res.* 2: 117-168.
- Ward, P.S. (1999) Systematics, biogeography and host plant associations of the *Pseudomyrmex viduus* group (Hymenoptera: Formicidae), *Triplaris* – and *Tachigali* – inhabiting ants. *Zoological Journal of the Linnean Society* 126: 451-540.
- Whitmore, L., and Wallace, B.A. 2004. *Nucleic Acids Res.*, 32, D593-D594.
- Wilson D, Alewood P. 2004. Australian Funnel- Web Spider Venom Analyzed With On-Line RP-HPLC-Techniques. *Methods Mol Biol.* 251:307-22.
- Winter, C., Risley, E., and Nuss, G. 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. 111, - 544-546.
- Woo, P. C., To, A. P., Lau, S. K., and Yuen, K. Y. 2003. Facilitation of horizontal transfer of antimicrobial resistance by transformation of antibiotic-induced cell-wall-deficient bacteria. *Med. Hypotheses*, 61, 503-508.
- Woodward, S. R., Cruz, L. J., Olivera, B. M. And Hillyard, D. R. 1990 Constant and Hypervariable regions in conotoxin propeptides. *EMBO Journal* 9, 1015-1020.
- Xiao F. Cao ZJ, L uM, Jiang DH, Mao X, Liu H, Li WX. 2003. Analysis of the genomic organization of a novel scorpion toxic Bm TXK beta. *Y, Chuan Xue Bao.* 30(7):663-7.



- Xiao YC, Liang SP. 2003. Purification and characterization of Hainantoxin-V, a tetrodotoxin-sensitive sodium channel inhibitor from the venom of the spider *Selenocosmia hainana*. *Toxicon* 41(6):643-50.
- Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.
- Zasloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5449-5453.
- Zamyatnin, A. 1990. Amino acid, peptide, and protein volume in solution. *Neirokhimia*, 9, 71-82.
- Zamyatnin, A. 1991. Specificity of the amino acid content of endogenous regulatory oligopeptides. *Prot. Seq. Data Anal* 4, 49-52.
- Zamyatnin, A. 1996. Physicochemical and biological features of endogenous oligopeptides toxins. *Neirokhimia*, 13, 243-259.
- Zamyatnin, A. 2004. Biochemical problems of regulation by oligopeptides. *Biochemistry (Mosc)* 69, 1276-1282.
- Zheng, X., and Zheng, A. 2002. Genomic organization and regulation of three cecropin genes in *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* 11, 517-525.
- Zeng XZ, Xiao QB, Liang SP. 2003. Purification and characterization of raventoxin-I and raventoxin-III, two neurotoxic peptides from the venom of the spider *Macrothele raveni*. *Toxicon*. 41(6):651-6.
- Zimmermann R y Mollay C. 1986. Import of honeybee propomelittin into the endoplasmic reticulum. Requirements for membrane insertion, processing and sequestration. *J Biol Chem*. 261(27): 12889-12895.
- Zeng XZ, Xiao QB, Liang SP. 2003. Purification and characterization of raventoxin-I and raventoxin-III, two neurotoxic peptides from the venom of the spider *Macrothele raveni*. *Toxicon*. 41(6):651-6.
- Zheng, X., and Zheng, A. 2002. Genomic organization and regulation of three cecropin genes in *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* 11, 517-525.



10. APENDICE

SOLUCION

Agar LB (Luria-Bertani) 1L

Bacto-triptona	10 g
Bacto-extracto de levadura	5 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	10 g
Bacto-agar	15g

Disolver en 1 L de agua bidestilada, esterilizar mediante autoclave. Dejar enfriar hasta 55°C, agregar elantibiótico requerido y servir en cajas de petri estériles (aproximadamente 20ml/caja)

Ampicilina 10 mg/ml (100X):

Ampicilina 1.0 g Disolver en 100ml de agua bidestilada.

Bromuro de Etidio 10 mg/ml (EtBr):

Pesar 1 g de EtBr. Disolver en 100 ml de agua bidestilada por varias horas utilizando la plancha magnética hasta asegurarse de que se haya disuelto totalmente, cubrir la solución con papel aluminio o transferir a un recipiente oscuro y almacenar a 4°C.

Buffer del Anodo pH 8.9 (500 ml)

Tris-base	12.19g
-----------	--------

Buffer de Catodo pH 8.25 (500 ml)

Tris-base	6.05g
Tricina	8.95g
SDS	0.5g

Buffer de carga 2X SDS

Tris-HCl pH 6.8	0.66 ml
SDS	1 ml
2-β-Mercaptoetanol	0.4 ml
Glicerol	2.4 ml
Azul G brillante	0.002 g

Buffer H (50 ml)

Tris-pH 7.5
DTT 1mM
EDTA 1mM
Glicerol 8.7 %

Buffer SB 20X (1 L)

Hidróxido de Sodio (NaOH)	8 g	10 mM
Ácido Bórico (H ₃ BO ₄)	51 g	0.8 M



Disolver el hidróxido de sodio en 700 ml de agua destilada, agregar posteriormente $\frac{3}{4}$ partes de ácido bórico y esperar a que se disuelva, medir el pH y agregar lentamente el resto del ácido conforme disminuya el pH a 8.5. Aforar con agua destilada.

Buffer de transferencia 10X (500 ml)

Tris-base	15.15 g
Glicina	72 g

Cloruro de Calcio 0.1 M (100 ml)

Cloruro de calcio (CaCl ₂)	1.47 g
--	--------

Disolver en 100 ml de agua bidestilada y esterilizar mediante la autoclave y almacenar a 4°C.

Dodecil Sulfato de Sodio SDS 10%

SDS 100 g, Disolver en 900ml de agua destilada, calentando a 68°C.
 Ajustar el pH a 7.2 agregando algunas gotas de HCl concentrado y después aforar a 1L.
 Nota: utilizar máscara al pesar el SDS y limpiar el área donde se pesó. No es necesario esterilizar el SDS 10%.

Gel Buffer 3X pH 8.45 (500 ml)

Tris-base	18.15 g
SDS	1.5 g

IPTG 0.1 M (50 ml)

IPTG 0.1M	1.19 g
-----------	--------

Medio LB

Bacto-tryptona	10 g
Bacto-extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Disolver en 1L de agua bidestilada y esterilizar mediante autoclave

Solución I (200 ml) (Solución para Lisis Alcalina)

Tris-HCl (pH 8.0) 1M	5 ml 25 mM
EDTA (pH 8.0) 500 mM	4 ml 10 mM

Solución II (200 ml) (Solución para Lisis Alcalina)

NaOH 10N	5 ml 0.2 N
SDS 1.0%	2 g

Solución III (100 ml) (Solución para Lisis Alcalina)

Acetato de Potasio (KOAc)	29.4 g
Ácido acético (CH ₃ COOH)	11.5 ml

Solución decolorante (500 ml) (geles Tris-glicina)

Ácido Acético (CH ₃ COOH)	25 ml
Agua destilada	475 ml



Solución de tñido azul de Coomassie (500 ml) (geles Tris-glicina)

Metanol (CH ₃ OH)		250 ml Ac. Acético
(CH ₃ COOH)		50 ml Agua
destilada		200 ml
Coomassie Blue R-250		0.25 g

TBS 10 X (500 ml)

Tris- Base (pH 7.5)	12.11 g	200 mM
Cloruro de Sodio (NaCl)	43.83 g	1.5 M

TBS-T 0.1% (500 ml)

TBS 10X		50ml
Agua destilada		450 ml
Tween 20		0.5 ml

Tris /SDS 4X pH 6.8 (100 ml)

Tris-base o HCl		6.05 g
SDS		0.4 g

Tris/ SDS 4X pH 8.8 (100 ml)

Tris-base ó HCl		30.33 g
SDS		0.66 g

Tris-Glicina 5X (1L)

Pesar 15.1 g de Tris-base, disolver en 500 ml de H₂O destilada, agregar 94 g de Glicina ajustar el pH a 8.3, agregar 50 ml de SDS 10 % y aforar a 1 litro de H₂O destilada.

Jugo azul 6X

Azul de bromofenol		0.25%
Xilencianol		0.25%
Glicerol		30%

PSA 10% (100 ml)

Persulfato de Amonio		10 g
----------------------	--	------

Solución de trabajo para Transferencia(1 L)

Agua destilada		700 ml
Metanol (CH ₃ OH)		200 ml
Buffer de trasferencia 10X		100 ml



11. ANEXO

5' T7SS

CAG AGA TGC ATA ATA GGA CTC ACT ATA GGG ATT TTA GTA AGC ACT AAA CAA AAT GCG

T7

5' T7LS1

CAG AGA TGC ATA ATA GGA CTC ACT ATA GGG AGT TTA GCA AGC ACT TAA CAA AAT GCG

T7

