

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR Y GENETICA



"CLONACION DE LAS SUBUNIDADES MAYORES DE  
MIRMEXINAS DEL VENENO DE LA HORMIGA  
*Pseudomyrmex triplarinus*"

TESIS  
QUE EN OPCION AL TITULO DE  
BIOLOGO  
PRESENTA:  
ARGENTINA FLORES ESPINOLA

DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. DIANA RESENDEZ PEREZ

MONTERREY, N. L.

ENERO 2002

TL  
RC933  
.A2  
F56  
2002  
c.1

CLONACION DE LAS SUBUNIDADES MAYORES DE AMFIBEXINAS DEL

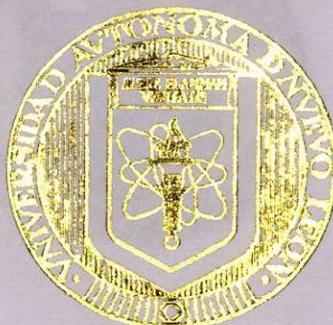
VENENO DE LA HORMIGA *Pseudomyrmex triplicatus*

2002



1080124458

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA



"CLONACIÓN DE LAS SUBUNIDADES MAYORES DE MIRMEXINAS  
DEL VENENO DE LA HORMIGA  
*Pseudomyrmex triplarinus*"

TESIS

QUE EN OPCION AL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA:

ARGENTINA FLORES ESPINOLA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. DIANA RESENDEZ PEREZ

MONTERREY, N. L.

ENERO 2002



TL  
RC 933

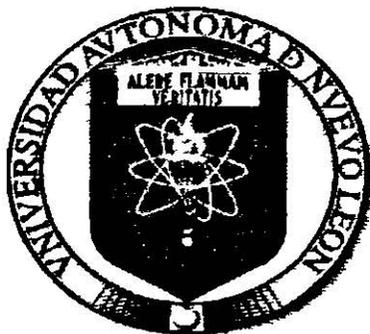
• A2

FS6

2002



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA



“CLONACIÓN DE LAS SUBUNIDADES MAYORES DE MIRMEXINAS  
DEL VENENO DE LA HORMIGA *Pseudomyrmex triplarinus*”

TESIS

QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

ARGENTINA FLORES ESPÍNOLA

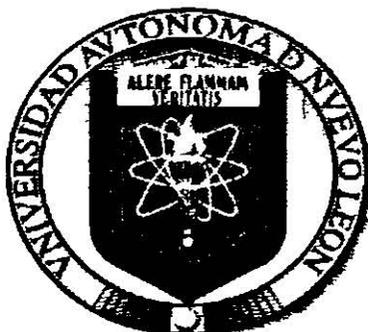
DIRECTOR DE TESIS:

DRA. DIANA RESÉNDEZ PÉREZ

MONTERREY, N.L.

ENERO 2002

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA



"CLONACIÓN DE LAS SUBUNIDADES MAYORES DE MIRMEXINAS  
DEL VENENO DE LA HORMIGA *Pseudomyrmex triplarinus*"

TESIS

QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

Argentina Flores Espínola

COMISIÓN DE TESIS

Dra. Diana Reséndez Pérez  
Director:

Dra. Cristina Rodríguez Padilla  
Co-Director

Biol. Jorge Verduzco Martínez  
Vocal

Dr. Mario Morales Vallarta  
Secretario

## DEDICATORIA

**A mis padres quienes me dieron el regalo más hermoso**

**"La Vida"**

**A mi madre:**

**M.E. Consuelo J. Espínola A.**

**Gracias por apoyarme y hacer siempre que mis sueños y metas se vean fáciles de alcanzar mamita.**

**A mi padre:**

**Ing. Enrique Flores Estrada**

**Gracias por los consejos que me das, por darme tu confianza en mis aspiraciones y hacer de mi vida una melodía papito.**

**A mis hermanas a quienes quiero y admiro profundamente**

**Argelia y Artemisa Flores Espínola**

**A la generación de Biólogos <sup>19</sup>97-2001 porque esto es el principio de muchos frutos venideros.**

## AGRADECIMIENTOS

A mi querida amiga protagónica la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus* por haberme hecho trabajar para descubrir un poco más de ella.

A la Dra. Diana Reséndez Pérez por todo su apoyo, por sus consejos y sobretodo por su paciencia en estos tres años de mi vida bien aprovechados en el laboratorio 8.

Armando por estar a mi lado siempre en las buenas y en las malas, por entenderme y ayudarme, se que puedo contar contigo en cualquier momento gracias por darme siempre esa energía para seguir adelante te quiero muchísimo.

Miguito Adrián por tus ideas y tu gran aportación en el diseño de la tesis en verdad tus dibujos son geniales, gracias por el apoyo incondicional que me brindaste pero sobretodo por tu valiosa amistad.

A mis amig@s a quienes estimo y quiero muchísimo: Los Meza, los guanatos del 8, Walter, Gore, Almendra, Dana, Pau, Laura, Gaby, Seila, Jaime, Ma Fernanda, Majo y Fam. Mater Dei, Fer Salas, a mis gacelitas 34 que con su alegría y entusiasmo le dan a mi vida un toque mágico.

Aram gracias por ayudarme en la identificación.

A mi padrino Scout: Luis Hdz. por confiar en mí, gracias porque en verdad eres un adulto digno de confianza se que puedo contar contigo en todo momento .

A mis compañeros del Lab: Nancy, Suraya, Janeth, Ricardo, Edith, Diana, Maribel, Fermín, Profr. Jorge Verduzco, Magda, Efrén.

Al M.C. Claudio M. por tus sabios consejos y tu valiosa ayuda en la realización de esta tesis.

Anita del Centro de Biotecnología Genómica IPN-Reynosa por haber secuenciado las clonas.

## TABLA DE CONTENIDO

Lista de Abreviaturas .....	x
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tablas.....	xii
Área de Trabajo.....	xiii
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN	
II.1 Antecedentes.....	2
II.2 Importancia.....	10
II.3 Relevancia del proyecto.....	14
III.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
IV. MATERIALES	
IV.1 Origen de los reactivos.....	17
IV.2 Material biológico.....	17
V. MÉTODOS	
V.1 Colecta y caracterización morfológica de la hormiga <i>P. triplarinus</i> .....	18
V.2 Colecta de muestras de veneno de la hormiga <i>P. triplarinus</i> .....	19
V.3 Componentes proteicos del veneno de <i>P. triplarinus</i> .....	19
V.4 Obtención del DNA genómico de la hormiga.....	20
V.5 Diseño de los oligonucleótidos específicos y PCR virtual.....	22
V.6 Amplificación mediante PCR.....	25
V.7 Purificación del DNA por fibra de vidrio.....	26
V.8 Clonación de los productos amplificados.....	27
V.9 Obtención del DNA plasmídico de las clonas positivas.....	28
V.10 Caracterización del DNA mediante digestión con enzimas de restricción.....	28
V.11 Determinación de la secuencia nucleotídica.....	29

<b>VI. RESULTADOS</b>	
VI.1 Observación morfológica de <i>Pseudomyrmex triplarinus</i> .....	30
VI.2 Disección y análisis morfológico de <i>Pseudomyrmex triplarinus</i> .....	30
VI.3 Análisis de los componentes proteicos del veneno mediante electroforesis SDS-PAGE.....	36
VI.4 DNA genómico de <i>Pseudomyrmex triplarinus</i> .....	37
VI.5 Amplificación mediante PCR de la subunidad LS1, LS2 y sintético...38	
VI.6 Purificación de los fragmentos de las subunidades LS1 y LS2 mediante fibra de vidrio.....	41
VI.7 Clonación de los fragmentos amplificados.....	42
VI.8 Aislamiento del DNA plasmídico de los fragmentos clonados.....	43
VI.9 Análisis y caracterización del DNA obtenido en las clonas positivas.....	43
VI.10 Determinación de la secuencia nucleotídica.....	47
<b>VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>48</b>
<b>IX. APÉNDICE</b>	
IX.1 Preparación de soluciones.....	52
<b>X. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>56</b>

## Lista de Abreviaturas

Abs	Absorbancia
BSA	Albúmina Sérica Bovina
°C	Grados Centígrados
DNA	Ácido desoxirribonucleico
M	Concentración molar
mM	Concentración milimolar
N	Concentración normal
g	Gramos
mg	Miligramos
µg	Microgramos
l	Litros
µl	Microlitros
µm	Micrómetro
m	Metro
cm	Centímetro
ml	Mililitros
h	Horas
min	Minutos
seg	Segundos
X	Concentración con respecto a la solución de trabajo
mm	Milímetros
nm	Nanometros
%	Por ciento
pH	Potencial hidrógeno (logaritmo negativo de la concentración del ión hidrógeno)
rpm	Revoluciones por minuto
Kd	Kilodaltones
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Tm	Temperatura media de alineamiento
Tris	Tris-hidroxi-metil aminometano
U	Unidades
UV	Ultravioleta
V	Voltio

## Lista de Figuras

Figura 1	Subfamilias de Formicidae.....	3
Figura 2	Diagrama de <i>Pseudomyrmex triplarinus</i> .....	4
Figura 3	Purificación del polisacárido del veneno de la hormiga.....	7
Figura 4	Corte Histológico de una articulación normal y dañada por la Artritis.....	11
Figura 5	Articulación afectada por Artritis Reumatoide.....	12
Figura 6	Morfología de <i>Pseudomyrmex triplarinus</i> .....	31
Figura 6.1	Disección y análisis morfológico de la cabeza de la hormiga <i>P.</i> <i>triplarinus</i> .....	32
Figura 6.2	Disección y análisis morfológico del Tórax de la hormiga <i>P.</i> <i>triplarinus</i> .....	33
Figura 6.3	Disección y análisis morfológico del Abdomen de la hormiga <i>P.</i> <i>triplarinus</i> .....	34
Figura 6.4	Disección y análisis morfológico de los Apéndices Torácicos de la hormiga <i>P. triplarinus</i> .....	35
Figura 7	SDS-PAGE al 16% de los componentes proteicos del veneno de <i>P.triplarinus</i> .....	36
Figura 8	DNA genómico de <i>Pseudomyrmex triplarinus</i> .....	37
Figura 9	Electroforesis en gel de agarosa al 2%, amplificación mediante PCR de la subunidad LS1.....	38
Figura 10	Electroforesis en gel de agarosa al 2%, amplificación mediante PCR de la subunidad LS2.....	39
Figura 11	Electroforesis en gel de agarosa al 2%, amplificación mediante PCR del sintético.....	39
Figura 12	Electroforesis en gel de poliacrilamida 6% de las subunidades LS1 y LS2.....	40
Figura 13	Purificación de los fragmentos de las subunidades LS1 y LS2 mediante fibra de vidrio.....	41
Figura 14	Selección de las clonas positivas.....	42

<b>Figura 15</b>	<b>Aislamiento del DNA plasmídico de clonas positivas.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 16</b>	<b>Análisis de los fragmentos clonados mediante aelectroforesis en gel de agarosa al 2%.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 17</b>	<b>Análisis de las clonas positivas de LS1 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 18</b>	<b>Análisis de las clonas positivas de LS2 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 19</b>	<b>Análisis de las clonas positivas por LS1 (DNA sintético) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 6%.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 20</b>	<b>Gel de secuenciación.....</b>	<b>47</b>

#### Lista de Tablas

<b>Tabla I</b>	<b>Fases de la Artritis Reumatoide.....</b>	<b>12</b>
<b>Tabla II</b>	<b>Criterio diagnóstico de Artritis Reumatoide.....</b>	<b>13</b>
<b>Tabla III</b>	<b>Drogas usadas en artritis reumatoide y sus posibles efectos secundarios.....</b>	<b>15</b>

### **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, UANL. Monterrey, N.L., bajo la asesoría de la Dra. Diana Reséndez Pérez y Dra. Cristina Rodríguez Padilla.**

## I. RESUMEN

El veneno de insectos y reptiles ha sido estudiado desde la época de los romanos para combatir enfermedades inflamatorias. Históricamente, la picadura de la hormiga para tratar síntomas de Artritis Reumatoide se remonta a tiempos precolombinos donde evidencias populares indican que algunas poblaciones indígenas sudamericanas utilizaban el veneno de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus* para aminorar los síntomas de la Artritis Reumatoide. Esta medicina tradicional es utilizada en áreas rurales de América del Sur y era una terapia común en la boca del Amazonas en las regiones montañosas superiores en el lado Atlántico de los Andes. Los nativos golpeaban el árbol hospedero para permitir que las hormigas los atacaran e inyectaran el veneno en la zona afectada. La hormiga *P. triplarinus* se encuentra siempre asociada a los árboles *Polygonaceus* del género *Triplaris americana* con el que establece una simbiosis habitando en la cavidad medular. Su distribución abarca Brasil, Perú y en Bolivia se le ha llamado "Palo Santo" o "Palo Diablo" debido a la agresividad de las hormigas con herbívoros y depredadores.

El veneno de *P. triplarinus* contiene 12 proteínas, siendo 4 proteínas las más abundantes e interesantemente, los péptidos de menor peso molecular presentan una alta actividad anti-inflamatoria en el modelo animal de ratas inducidas con carragenina. El análisis reciente de estos péptidos denominados Mirmexinas permitió aislar 6 isoformas diferentes del veneno con pesos moleculares que varían entre 6998 y 7142 Da. Estos péptidos están constituidos de una subunidad pequeña (SS1, SS2 o SS3) unida mediante un puente disulfuro a una subunidad mayor (LS1 o LS2) en diferentes combinaciones. Los estudios funcionales con el veneno completo y éstos péptidos de bajo peso molecular han presentado mucha variabilidad tanto en el modelo animal como en pacientes tratados. Debido a lo anterior, en este trabajo clonamos y determinamos la secuencia nucleotídica de l péptido correspondiente a la subunidad mayor (LS1) de Mirmexinas para la producción a mediano plazo ~~de~~ de estos péptidos en el laboratorio en condiciones controladas que permitan su reproducibilidad en el tratamiento de Artritis Reumatoide.



## II.1 Antecedentes

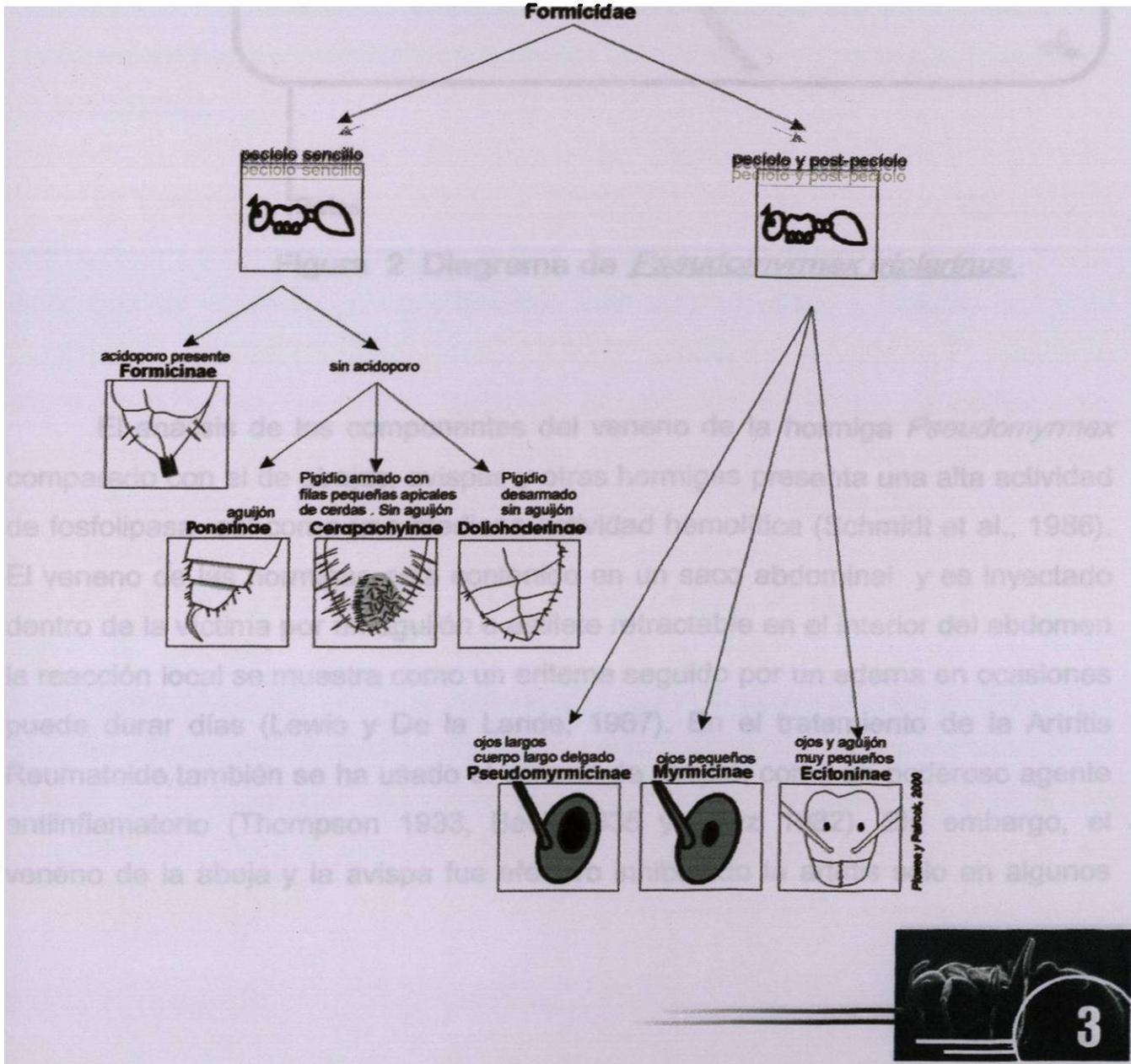
La hormiga *Pseudomyrmex arboris-sanctae* es conocida como *Pseudomyrmex triplarinus* ya que se le encuentra siempre asociada a los árboles Polygonaceae que son plantas herbáceas de hojas alternas, con estipulas soldadas y membranosas con formación de vaina alrededor del tallo. Presenta flores pequeñas, <sup>quien? que?</sup> hermafroditas, monoperiantadas, de seis a nueve estambres, carpelos de dos a tres supero y ovario unilocular con un solo óvulo. Se conocen cerca de 800 especies del genero *Triplaris americana* L. Este árbol puede medir hasta 30 m de alto, las cavidades medulares del tallo son habitadas por las hormigas *P. triplarinus* con las que mantiene una simbiosis, el tronco tiene un margen de 32 cm de longitud, las flores se encuentran en grandes panículas, las hembras muestran flores rojas en la sombra y el cáliz es de 6-3 lóbulos desarrollados en conspicuas alas adheridas al fruto. Los frutos caen con el movimiento hilado del cáliz de las alas. Es un árbol nativo comúnmente localizado en varias regiones de Sudamérica como Brasil, Bolivia y Perú. *T. americana* es conocido en Brasil como "Tachi", en Perú como "Tangarana" y en Bolivia es popularmente conocido como "Palo Santo" o "Palo Diablo", debido a que las hormigas hospederas son muy agresivas con herbívoros y depredadores por lo que dejan un círculo de protección alrededor del árbol que permite la mejor obtención de nutrientes del árbol (Wheeler 1942).

En general las hormigas pueden llegar a vivir por mucho tiempo y mantienen siempre una vida social en la que existen diferentes jerarquías o castas: las obreras, soldados, la reina y un macho. Las obreras carecen de alas, y tienen una muy marcada fusión de regiones torácicas, el metanotum desaparece en las hembras y el tamaño es variable dependiendo de la especie. *P. triplarinus* se caracteriza por medir de 6 - 7 mm de longitud, tener 12 segmentos antenales, Posee ojos grandes que ocupan aproximadamente  $\frac{2}{3}$  ó menos de longitud de la cabeza, la mandíbula casi siempre tiene un diente marginal sobre el margen basal, una sutura promesonotal flexible, el surco metabasitarsal esta ausente, las patas son largas y presenta un aguijón o estilete bien desarrollado. Las hormigas soldados se diferencian ya que tienen cabezas largas y son de mayor tamaño comparadas con las obreras. La reina es una hembra ponedora de huevos que presenta alas sobre el tórax y un metanotum bien desarrollado a diferencia



de las obreras donde este último desaparece. Los machos de esta especie se caracterizan por tener 12 segmentos antenales, el margen posterior del estemito VIII emarginado, el margen de la mandíbula con 6-18 dientes o dentículas y rara vez adentado, el margen basal de la mandíbula es de la mitad o menos que la longitud del margen masticatorio las dos convergen en ángulo hacia el diente ápicobasal, cavidad metacoxal cerrada y un bien desarrollado postpecíolo. La hormiga *P. triplarinus* que tiene el cuerpo con dos segmentos reducidos pecíolo y postpecíolo como se observa en la figura 1 (Ward 1985, 1991, 1993 y 1999) pertenece a la subfamilia *Pseudomirmicinae* (Figura 2) Estas hormigas son muy agresivas y sus picaduras muy dolorosas ya que tienen estilete o aguijón muy desarrollado.

Figura 1. Sub familias de Formicidae



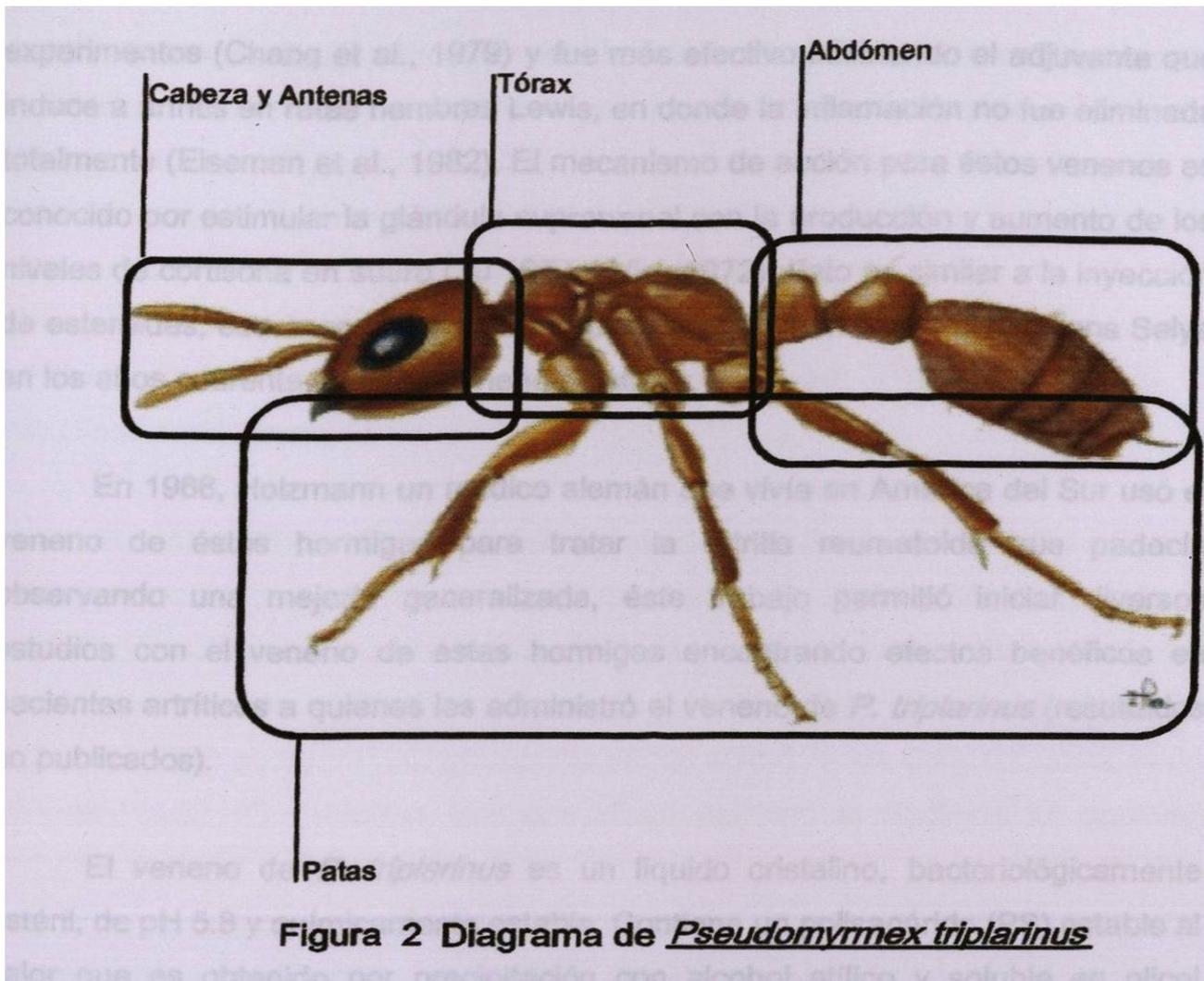


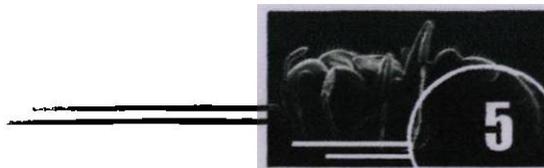
Figura 2 Diagrama de *Pseudomyrmex triplarinus*

El análisis de los componentes del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex* comparado con el de abejas, avispas y otras hormigas presenta una alta actividad de fosfolipasa así como una mediana actividad hemolítica (Schmidt et al., 1986). El veneno de las hormigas está contenido en un saco abdominal y es inyectado dentro de la víctima por un aguijón o estilete retractable en el interior del abdomen. La reacción local se muestra como un eritema seguido por un edema en ocasiones puede durar días (Lewis y De la Lande, 1967). En el tratamiento de la Artritis Reumatoide también se ha usado el veneno de abejas, como un poderoso agente antiinflamatorio (Thompson 1933, Beck 1935 y Mraz 1982). Sin embargo, el veneno de la abeja y la avispa fue efectivo inhibiendo la artritis solo en algunos

experimentos (Chang et al., 1979) y fue más efectivo inhibiendo el adjuvante que induce a artritis en ratas hembras Lewis, en donde la inflamación no fue eliminada totalmente (Eiseman et al., 1982). El mecanismo de acción para éstos venenos es conocido por estimular la glándula suprarrenal con la producción y aumento de los niveles de cortisona en suero (Tu 1977 y Vick 1972). Esto es similar a la inyección de esteroides, este mecanismo fue evaluado primeramente por el Dr. Hans Selye en los años cuarenta, en el fenómeno de stress.

En 1968, Holzmann un médico alemán que vivía en América del Sur usó el veneno de éstas hormigas para tratar la artritis reumatoide que padecía observando una mejoría generalizada, 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* (resultados no publicados).

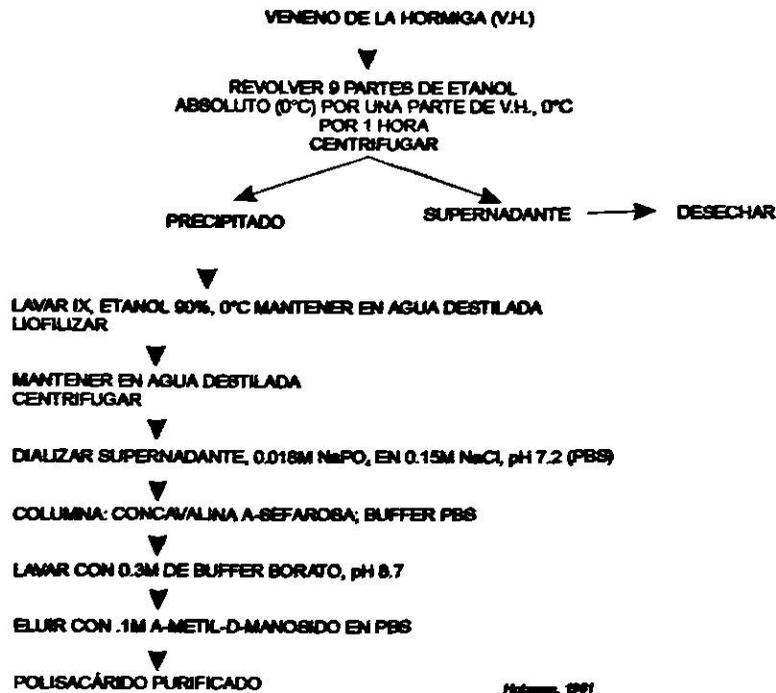
El veneno de *P. triplarinus* es un liquido cristalino, bacteriológicamente estéril, de pH 5.8 y químicamente estable. Contiene un polisacárido (PS) estable al calor que es obtenido por precipitación con alcohol etílico y soluble en glicol propilénico y glicerol (Shultz y Arnold 1978). El efecto del veneno de *P. triplarinus* sobre la actividad hemolítica funcional de algunas proteínas específicas del Complemento y sus moduladores fueron estudiadas *in vitro* con suero humano normal incubado con el veneno durante 4 horas a 37 °C. Los resultados mostraron la pérdida significativa de la actividad comprobándose la pérdida significativa de la actividad de C4, I y C3, mientras que el veneno no tenía efecto alguno o muy poco sobre el inhibidor C1 (activado), C5, C8 y C9. El análisis mediante Inmunolectroforesis indicó que este veneno causó la conversión de un factor B a Ba y Bb (Shultz and Arnold 1977). Otros experimentos con suero tratado con el veneno de *P. triplarinus* mostraron una disminución importante en la titulación para C4 y C2 (Shultz and Arnold 1978). Al incubar el veneno con suero normal se



mostró que un factor (ó factores) causaba activación de C1. Como C4 y C2 son substratos naturales de C1 en suero, esto podría explicar el consumo de ambos componentes a 37°C. Esta suposición fue confirmada mediante otra serie de experimentos donde la reacción en suero humano fue inhibida mediante ácido etileno-diamino-tetracético. El factor que causaba la activación de C1 y el consumo de C2 y C4 en suero humano, es estable al calor, lo que se comprobó mediante electroforesis de disco con el veneno sometido a ebullición durante 15 min (Shultz and Arnold 1977).

El polisacárido (PS) precipitado del veneno de *P. triplarinus* (Figura 3) con alcohol etanol a 0 °C contiene manosa, N-acetilglucosamina, galactosa, fucosa, N-acetilgalactosamina y glucosa, además de un alto contenido de ácido hexurónico, que da al PS una neta carga negativa. Este PS presenta efectos negativos sobre suero de cobayo, consumiendo solo 11% de C4 y C2 después de 120 min a 37 °C. Mientras que con suero humano el 93% de la actividad hemolítica de C4 y 84% de C2 fueron consumidos (Shultz et al., 1979a). Dos pequeños oligosacaridos (840 y 430 de peso molecular) fueron separados después de una hidrólisis enzimática del PS nativo. El mayor de los dos oligosacáridos causa la activación de C1 y el consumo de C4 y C2 en suero humano normal, esto fue causado por un pequeño carbohidrato que activa la vía clásica del complemento (Dieminger et al., 1979).





**Figura 3 PURIFICACIÓN DEL POLISACÁRIDO DEL VENENO DE LA HORMIGA**

Los estudios realizados inicialmente por Holzmann fueron confirmados en 1975 por Charles Sisk y Harvey Brown en un estudio doble ciego llevado a cabo en 30 pacientes adultos con artritis reumatoide en Serrales, Santo Domingo Republica Dominicana. La administración del veneno mostró una mejoría estadísticamente significativa en las articulaciones adoloridas e inflamadas y mayor fuerza de presión en el grupo que se sometió al tratamiento con el veneno comparado con el testigo negativo. No se detectaron reacciones adversas únicamente inflamación local en los sitios donde se aplicaron las inyecciones, la cual desapareció después de una o dos semanas y no se presentaron anomalías hepáticas, hematológicas o renales después del tratamiento ni aumento en los niveles de cortisol (Holzmann y cols 1981).

Por otro lado, extractos obtenidos del abdomen de estas hormigas presentaron actividad anti-inflamatoria usando el modelo de edema en ratas inducidas con carragenina (Winter et al., 1962). Las ratas tratadas mostraron



mejoría en la pata trasera y en el tamaño de la inflamación (resultados no publicados). La inyección de una fracción del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* parcialmente purificado fue administrado a la ratas Sprague-Dawley inducidas a artritis con adjuvante de Freud's mostrando una completa supresión de la artritis (Schultz y Arnold, 1984).

Posteriormente, Altman y cols de la División de Artritis de la Facultad de Medicina de la Universidad de Miami, realizaron un doble ciego controlado con 30 pacientes con artritis reumatoide clásica por el criterio de ARA (Ropes et al., 1958). La preparación del veneno consistió de un extracto alcohólico del veneno de la hormiga 15 pacientes control recibieron 0.1mg de histamina fosfato por inyección para estimular los efectos del veneno de la hormiga (testigo negativo). El veneno o placebo fue administrado subcutáneamente de la siguiente manera: 0.1ml el primer día incrementando la dosis hasta 1ml por día durante 5 días, 1ml del 6to al 14vo día. La actividad reumatoide fue medida en base al criterio descrito por Lansbury en 1956 y 1958. Los resultados mostraron que después de 14 días de tratamiento, la rigidez matutina disminuyó en un 78%, la fatiga no sufrió cambios, la fuerza de presión mejoró un 22% y las articulaciones sensibles al dolor bajaron de 24 a 3 en el índice articular de Ritchie. Esta mejoría generalizada frecuentemente se mantuvo por espacio de 6 meses, sin embargo el factor reumatoide, y los niveles de colesterol no se modificaron (Altman et al., 1982 y 1984).

Una fracción parcialmente purificada del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus* fue aplicada en 10 pacientes con artritis reumatoide. Estos pacientes tratados mostraron una mejoría estadísticamente significativa en la rigidez matutina, el índice de Ritchie y en la intensidad del dolor. Las reacciones adversas se limitaron a eritema en el sitio de la inyección en todos los pacientes y prurito local con fiebre en un paciente (Astorga et al., 1992). La eficacia y seguridad del extracto del veneno parcialmente purificado fue probado en 15



pacientes con artritis reumatoide activa, que tenían tratamiento con medicamentos anti-inflamatorios y en algunos casos con metrotexate. Los resultados mostraron una mejoría significativa en el número de articulaciones afectadas así como el índice de Ritchie, rigidez matinal y la intensidad del dolor. Dos pacientes experimentaron reacciones moderadas locales y no se encontraron alteraciones en las pruebas de laboratorio clínico de los pacientes durante este estudio (Burgos y Vargas, 1993).

La caracterización parcial de componentes peptídicos del veneno de *P. triplarinus* mostró que el veneno contiene 12 proteínas de 4200 a > 100 000 Kd, con cuatro proteínas abundantes que fueron aisladas y purificadas mediante cromatografía de baja presión (Hink et al., 1994). Los péptidos de menor peso molecular del veneno mostraron una alta actividad anti-inflamatoria en ratas inducidas con carragenina. Desafortunadamente, el tratamiento clínico en pacientes con estos péptidos purificados mostraron resultados no reproducibles que requieren ser confirmados para evitar las variaciones y los problemas técnicos que se encontraron en los pacientes tratados (R. Kinsolving comunicación personal).

El análisis reciente de los péptidos de bajo peso molecular permitió aislar 6 isoformas diferentes del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus* con pesos moleculares que varían entre 6998 y 7142 Kd. Estas isoformas denominadas Mirmexinas I-VI están constituídas de diferentes heterodímeros formados de una subunidad pequeña (SS1,SS2 ó SS3) unida mediante puente disulfuro a la subunidad mayor (LS1 ó LS2) en diferentes combinaciones. El análisis funcional con una dosis de 12 mg/kg del veneno completo proporcionó un 82% de actividad anti-inflamatoria en el modelo animal. Como las mirmexinas representan el 44% del total de proteínas del veneno, se probó la dosis correspondiente (5.4mg/kg) que mostró solamente un 52% actividad anti-



inflamatoria. Sin embargo, Cuando se incrementó la dosis de Mirmexinas a 9.8mg/kg la actividad anti-inflamatoria aumentó hasta 90% en el modelo de inducción por carragenina (Pan y Hink, 2000).

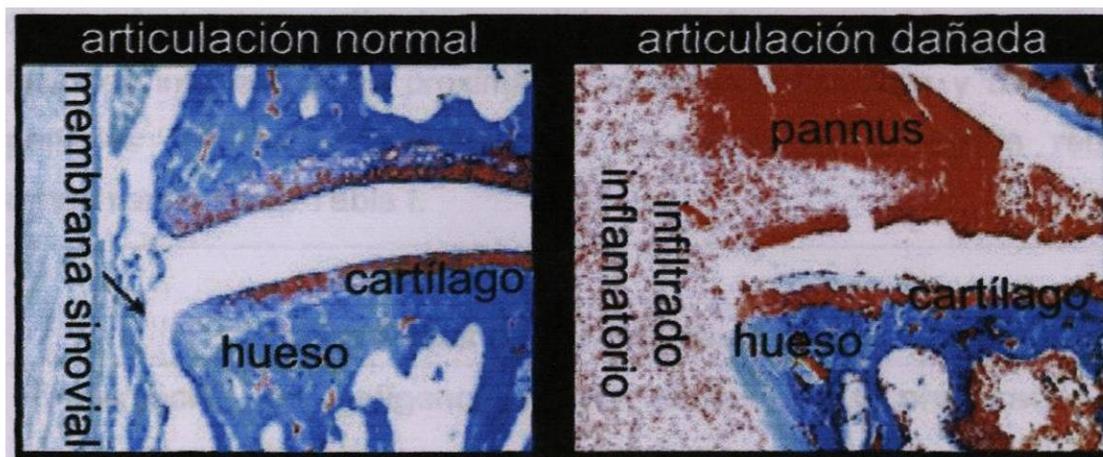
Debido a la importancia potencial de éstos péptidos de bajo peso molecular durante el desarrollo de la presente tesis nos enfocamos a clonar y determinar la secuencias nucleotídicas que codifican para las subunidades mayores LS1 y LS2 de las Mirmexinas del veneno de la hormiga *P. triplarinus*.

## II.2 Importancia

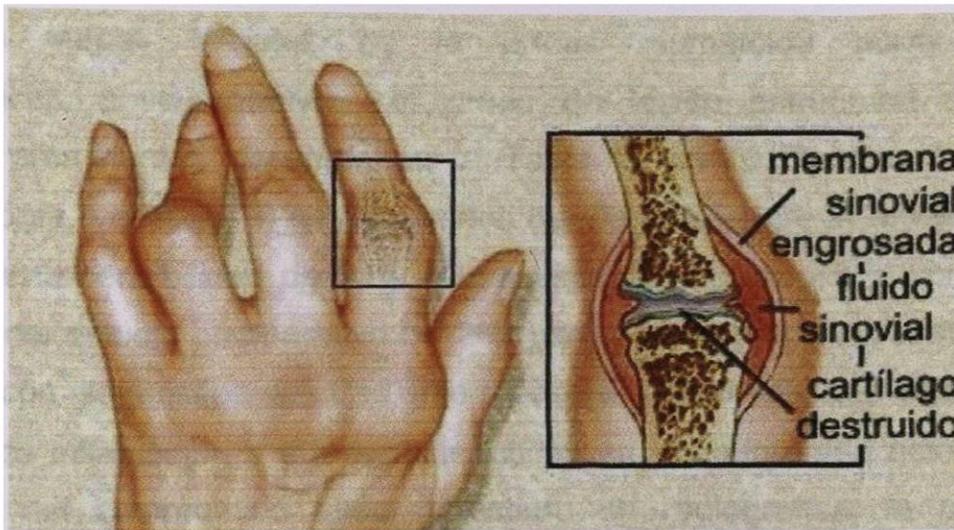
La Artritis Reumatoide es una enfermedad inflamatoria que afecta en forma simétrica las articulaciones periféricas, con la presencia de sinovitis persistente, la cual conduce a daño articular y del hueso subcondral. El daño es muy variable, difícil de predecir y es una enfermedad incapacitante, por la deformidad articular y la sintomatología dolorosa que la acompaña. La artritis es una enfermedad autoinmune de causa desconocida y multifactorial y las estrategias terapéuticas disponibles permiten solo cierto control sobre la progresión de la enfermedad y el tratamiento es de tipo paliativo, esta enfermedad puede aparecer a cualquier edad con una incidencia máxima en la tercera y cuarta década de la vida la prevalencia en la población es del 0.8% por lo que se estima que el 80% de los pacientes desarrolla la enfermedad entre los 30 y 50 años de edad y tiene una duración variable, irregular en general larga, por lo que es una enfermedad crónica y frecuente ya que de cada 100 mexicanos uno padece artritis reumatoide (según la Sociedad Mexicana de Reumatología, [www.descope.com/reumatología/smr/p200.asp](http://www.descope.com/reumatología/smr/p200.asp)).



El desarrollo de la Artritis Reumatoide es la respuesta inmune anormal a un agente infeccioso en un individuo con susceptibilidad inmunogenética. El rasgo histológico característico de la artritis reumatoide es una sinovitis proliferativa que origina un tejido inflamatorio denominado "pannus" (Figura 4), como resultado de la hiperplasia de las células de la capa de revestimiento interno de la membrana sinovial ver (Figura 5). Este tejido está compuesto por fibroblastos activados, macrófagos, mastocitos, linfocitos T, plasmocitos y vasos sanguíneos que invaden y destruyen el cartílago articular y el hueso subcondral como lo muestran las figuras. Existen dos mecanismos implicados en la patogenia de la enfermedad, el primero involucra a las células del estroma sinovial, mientras que el segundo tiene que ver con la activación de los linfocitos T CD4+, los cuales producen diversas citocinas proinflamatorias que mantienen y promueven la hiperplasia sinovial.



**Figura 4. Corte histológico de una articulación normal y dañada. La membrana sinovial, hueso y cartilago se muestra de color azul (izquierda); mientras que el corte de la articulación dañada (derecha) muestra hiperplasia de las células de la membrana sinovial produciendo un infiltrado inflamatorio de color rojo.**  
([Http://www.chondrex.com](http://www.chondrex.com))



**Figura 5. Articulación afectada por artritis reumatoide. Se observa la membrana sinovial que recubre la articulación y es responsable del dolor e hinchazón frecuentes. La persistencia de la inflamación lleva consigo daños hasta el hueso subcondral (www.medspain.com/n5\_jun99/artritis\_tto.htm)**

Las etapas de la Artritis Reumatoide pueden manifestarse con cansancio, anorexia, malestar generalizado con dolor articular y sinovitis que afectan las articulaciones interfalángicas proximales, metacarpofalángicas y radiocarpianas; acompañadas de rigidez matutina. La evolución de la artritis reumatoide comprende varias fases Tabla I.

**Tabla I Fases de la Artritis Reumatoide**

- |   |
|---|
| 1. Presentación de antígenos a las células T. y proliferación de sinoviocitos y fibroblastos.                     |
| 2. Angiogénesis e infiltración de la membrana sinovial por linfocitos.  |
| 3. Activación de linfocitos B, síntesis de autoanticuerpos y migración de polimorfonucleares al líquido sinovial. |
| 4. Invasión de cartílago por el tejido de granulación y destrucción del cartílago articular.                      |
| 5. destrucción de cartílago y del hueso subcondral y alquilosis de la articulación.                               |

Las etapas iniciales de la artritis reumatoide normalmente son asintomáticas, posteriormente el grado de lesión estructural ocasiona los síntomas prominentes descritos en la Tabla I. Por El Colegio Americano de Reumatología (ver tabla II) estos criterios de diagnóstico de la artritis reumatoide alcanzan una sensibilidad de 94% y una especificidad de 89%, con base en el resultado del estudio comparativo de 262 pacientes con artritis reumatoide y 262 controles con diagnóstico de otras enfermedades articulares. Los criterios incluyen el grado de inflamación y sus características en las diferentes articulaciones, la extensión del compromiso óseo detectado en radiografías, la presencia de manifestaciones extra articulares como nódulos reumatoides y la detección del factor reumatoide en sangre periférica.

**Tabla II. CRITERIO DIAGNOSTICO DE ARTRITIS REUMATOIDE**

<b>1. Rigidez matinal</b>
<b>2. Artritis de 3 o más articulaciones</b>
<b>3. Artritis en las articulaciones de las manos</b>
<b>4. Artritis simétrica</b>
<b>5. Nódulos Reumatoides</b>
<b>6. Factor reumatoide positivo en suero</b>
<b>7. Cambios radiológicos característicos</b>
<b>* El diagnóstico requiere de 4 o más criterios positivos.</b>

El tratamiento de la artritis reumatoide es complejo e involucra muchos aspectos de la vida del paciente (ver Tabla III). Es una enfermedad a la cual no se le conoce curación, excepto en casos cuando un paciente puede obtener remisión completa de manera espontánea. En general, los tratamientos actuales y disponibles en artritis reumatoide proporcionan alivio al dolor y reducción de la

inflamación así como mejoría en el desarrollo de la enfermedad, pero ninguno es curativo y todos ellos provocan importantes y variadas reacciones adversas. Existen algunos parámetros generales que se deben tener en cuenta. Para el manejo adecuado de los enfermos se requiere un diagnóstico temprano así como informar sobre su enfermedad y ofrecer apoyo físico, ocupacional y psicológico. Es de suma importancia encontrar nuevos tratamientos que ofrezcan una ayuda eficaz en los síntomas y pronóstico de esta enfermedad.

### II.3 Relevancia del Proyecto

La Artritis Reumatoide ha sido tratada con diferentes medicamentos sin efectos benéficos significativos a largo plazo. Muchos de estos medicamentos crean efectos secundarios indeseables como podemos ver en la Tabla III. Normalmente el alivio es a corto plazo y el curso de la enfermedad raramente se altera.

La característica más importante del veneno de *P. triplarinus* en el tratamiento de artritis reumatoide ha sido que produce una mejoría generalizada que en la mayoría de los casos se ha mantenido por espacio de seis meses, por lo que no necesita aplicarse continuamente como la mayoría de los medicamentos que se usan actualmente. Esto nos presenta este veneno como un medicamento con muchas ventajas para su caracterización, estudio funcional y aplicación en el tratamiento de artritis reumatoide.

La relevancia de este estudio con el análisis funcional de los péptidos de bajo peso molecular del veneno de *P. triplarinus* en la actividad anti-inflamatoria en artritis reumatoide nos permitirá analizar a mediano y a largo plazo un producto farmacológico valioso para el tratamiento y el pronóstico de los pacientes con Artritis Reumatoide.



**Tabla III Drogas usadas en artritis reumatoide y sus posibles efectos secundarios**

Nombre de la droga	Posibles efectos secundarios
Cortisona, Esteroides	El uso prolongado y excesivo de cortisona puede provocar que la glándula suprarrenal se active, causando hipertensión, diabetes, cataratas, úlceras, osteoporosis, y distribución impar de la grasa corporal
Naprosyn, Nalfon, Tolectin, Meclomen, Clinoril, Aspirina	Dolor estomacal, úlceras y daños renales
Diclofenaco sodico	Nueva droga, sin efectos secundarios conocidos a la fecha
Terfectin	Efectos secundarios menos agudos que otras drogas
Interferon	Síntomas similares a los presentados por fiebre y resfriado
Cyclosporina	Daño renal, presión sanguínea alta y perturbaciones estomacales
Sales de Oro, Metotrexate	Produce intolerancia digestiva, fiebre, astenia, exacerbación breve de la sintomatología articular, o elevación transitoria de las enzimas hepáticas. Lesiones de las membranas mucosas, dermatitis, afecciones tóxicas en la sangre y riñones, reacciones anafilácticas y daño del hígado.

## HIPÓTESIS

El uso del veneno completo de *P. triplarinus* y las mirmexinas han mostrado respectivamente una mejoría generalizada en pacientes con A. Reumatoide y una alta actividad anti-inflamatoria en el modelo animal. Sin embargo, se ha detectado una alta variabilidad en el tratamiento administrado a pacientes, por lo que <sup>si</sup> clonamos las secuencias nucleotídicas responsables de las mirmexinas en un vector de expresión podremos producir los péptidos responsables de esta actividad en condiciones controladas en el laboratorio.]

## OBJETIVOS

- Obtención <sup>del</sup> del DNA genómico de la hormiga *P. triplarinus* .
- Amplificación <sup>mediante</sup> mediante PCR <sup>de</sup> de las secuencias nucleotídicas que codifican para las subunidades mayores de las Mirmexinas LS1 y LS2 con oligonucleótidos específicos.
- Clonación <sup>de</sup> de los fragmentos amplificados en el vector pCR 2.1
- Determinación <sup>de</sup> de la secuencia nucleotídica de los productos de clonación positivos.



# Materiales Y Métodos



PCR lo obtuvimos de PROMEGA (Madison WI, E.U.A.) y el vector de clonación TOPO de Invitrogen (Carlsbad, CA, E.U.A.).

## IV.2 Material Biológico

Las hormigas y el veneno fueron colectados y enviados directamente de Santa

## IV.1 Origen de los Reactivos

Obtuvimos de Sigma Chemical (Saint Louis, Missouri, E.U.A.) : trizma base, ácido etilen diamino tetra acético (EDTA), dodecil sulfato de sodio (SDS), cloruro de sodio (NaCl), azul de bromofenol, xylene cianol, glicerol, bromuro de etidio, hidroxido de sodio (NaOH), glucosa, acetato de potasio, acetato de sodio, BSA, Cloruro de magnesio, ampicilina, Triton X-100, cloruro de calcio, sulfato de magnesio hepta anhidro, 2- mercaptoetanol, ácido clorhídrico, glicina, Cloruro de potasio, HEPES, ácido bórico, Bioline obtuve X-Gal, CTR : metanol, etanol, ácido acético

Se obtuvo la triptona y levadura de DIFCO Laboratories Detroit .

Los oligonucleótidos diseñados se solicitaron a sintetizar en la casa comercial OPERON (Alameda CA. E.U.A.), La enzima de restricción EcoRI fue obtenida de New England Biolabs (California, E.U.A.) El Kit para la amplificación mediante PCR lo obtuvimos de PROMEGA (Madison Wi, E.U.A.) y el vector de clonación TOPO de Invitrogen ( Carlsbad, CA. E.U.A.).

## IV.2 Material Biológico

Las hormigas y el veneno fueron colectados y enviados directamente de Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. Las células *Escherichia coli* Ca<sup>++</sup> competentes TOP 10 provenían del kit de clonación (Invitrogen, Carlsbad CA. E.U.A.).

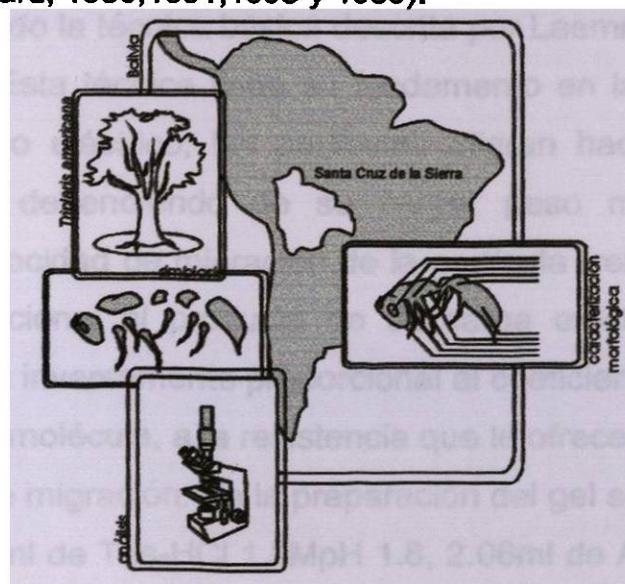
→ no se colectaron por la tesis



## MÉTODOS

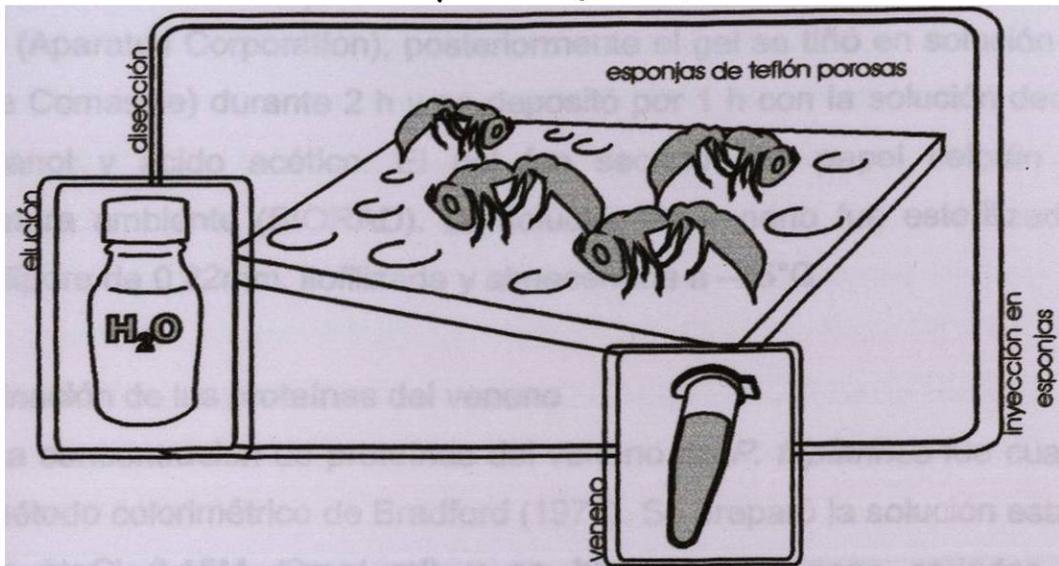
### V.1 Colecta y caracterización morfológica de la hormiga *P. triplarinus*

Las hormigas fueron colectadas en Santa Cruz de la Sierra, Bolivia, de los árboles *Triplaris americana* localizados comúnmente en lugares cuya humedad relativa es alta y favorable para la simbiosis hormiga-árbol existente. Una vez localizados éstos se golpearon provocando que las hormigas <sup>salieran</sup> salgan de éstos a defender su territorio y es aquí cuando son colectadas y almacenadas a 4°C. Las hormigas se fijaron en una solución de glicerol y ácido acético 1:4 y fueron montadas en laminillas permanentes con solución Faure's (Roberts D. B, 1998). La observación morfológica se llevó a cabo inicialmente en un microscopio estereoscópico y posteriormente se disectaron las diferentes estructuras como antenas, cabeza, tórax, abdomen y patas para su caracterización morfológica (Vazquez y Villalobos, 1980). La observación se realizó en un microscopio de contraste de fases Olympus CH-3PHb/CH3-PH y los estereoscopios Leica 200M 2000 y Olympus SZ-CTV SV40, Las imágenes se fotodocumentaron con el programa Gel-Pro con una cámara digital Sonny. Las hormigas fueron identificadas (Wheeler 1942) utilizando claves taxonómicas para subfamilia (Bolton, 1994) para género y especie (Ward, 1985,1991,1993 y 1999).



## V.2 Colecta de veneno de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus*

Las esponjas de colores brillantes fueron colocadas alrededor del árbol *T. americana* posteriormente se proporcionan pequeños golpes al árbol para la inducción de las hormigas a inyectar directamente el veneno en las almohadillas porosas de teflón previamente esterilizadas, de esta forma el veneno se obtiene libre de extractos tisulares o de contenido intestinal. El método utilizado es una modificación de la técnica descrita por Hink y cols., en 1989.



## V.3 Análisis de los componentes proteicos del veneno de *Pseudomyrmex triplarinus*.

Las muestras de veneno fueron visualizadas mediante electroforesis SDS-PAGE 16.5% utilizando la técnica básica descrita por Laemmli, 1970, Garfin, 199 y Nochumson, 1985. Esta técnica tiene su fundamento en la migración de solutos iónicos en un campo eléctrico; las partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +) dependiendo de su carga, peso molecular y estructura tridimensional, la velocidad de migración de la partícula (relación carga / peso) es directamente proporcional al producto de su carga efectiva y el gradiente de potencial eléctrico es inversamente proporcional al coeficiente de fricción relativo a la talla y forma de la molécula, a la resistencia que le ofrece el medio, el pH influye sobre la velocidad de migración. En la preparación del gel separador se colocaron: 1.70ml de agua, 1.3ml de Tris-HCl 1.5MpH 1.8, 2.06ml de Acrilamida al 40%, 50 $\mu$ l



de SDS al 10%, 50 $\mu$ l de APS al 10% y 2 $\mu$ l de TEMED. El gel concentrador se preparó mezclando 2.225ml de agua, 375 $\mu$ l de Acrilamida al 40%, 3 $\mu$ l de Tris-HCl 1.5 M pH 8.6, 30 $\mu$ l de SDS 10%, 30 $\mu$ l de APS 10% y 3 $\mu$ l de TEMED. Una vez polimerizados tanto el gel concentrador como el separador se colocó el buffer Tris-Glicina 1X. Los carriles se cargaron con las muestras del veneno previamente desnaturalizadas así como el marcador de peso de rango bajo (Biorad). Se realizó la electroforesis de 80-100 Voltios en la cámara de sistema en gel vertical modelo EC 120 (Aparatus Corporation), posteriormente el gel se tiñó en solución teñidora (Azul de Comassie) durante 2 h y se depositó por 1 h con la solución decolorante de metanol y ácido acético. El gel fue secado con papel celofán dulce a temperatura ambiente (BIORAD). La solución de veneno fue esterilizada en un filtro Millipore de 0.22mm, liofilizada y almacenada a  $-75^{\circ}\text{C}$

#### Determinación de las proteínas del veneno

La concentración de proteínas del veneno de *P. triplarinus* fue cuantificado por el método colorimétrico de Bradford (1976). Se preparó la solución estándar de BSA en NaCl 0.15M (2mg/ ml) y se hicieron diluciones seriadas (7.81 a 1000ug/ml). Estas se colocaron en las microplacas 10 $\mu$ l de las diluciones estándar + 150 $\mu$ l del reactivo Bradford. Del veneno de *P. triplarinus* se colocaron 10 $\mu$ l + 150 $\mu$ l de reactivo de Bradford y fue leído a una longitud de onda de 630nm. La absorbancia obtenida del veneno cuantificada en la curva de calibración de BSA donde obtuvimos la cantidad de proteína contenida en el veneno eluido de las esponjas.

#### V.4 Obtención del DNA genómico de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus*.

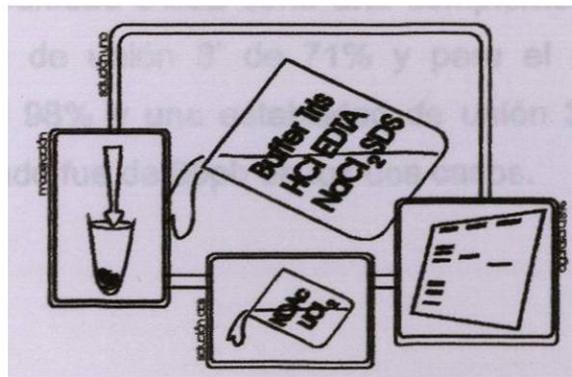
Para la obtención de DNA de la hormiga se utilizó la técnica de precipitación de cloruro de litio descrita por Sullivan y cols, (2000) que consiste en macerar las hormigas adicionando un buffer de Gris HCl (pH 7.5) EDTA 10mM, NaCl<sub>2</sub> 5M, SDS al 10%. Posteriormente, la mezcla se incubó a 65 $^{\circ}\text{C}$  por 30 min,



adicionando KOAc 3M y NaCl25M, mezclando por inversión y se depositó en hielo 4°C 1h. La muestra se centrifugó por 15 min. a 14000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, agregando isopropanol frío y mezclando por inversión. Se centrifugó nuevamente 15 min. eliminando el sobrenadante y lavando la pastilla con etanol al 70%, finalmente se dejó secar 5 min. para posteriormente disolver la pastilla en H<sub>2</sub>O miliQ.

### Análisis del DNA mediante electroforesis en geles de agarosa.

El DNA genómico obtenido de las hormigas fue visualizado en un gel de agarosa al 0.8%. La técnica de los geles de agarosa está fundamentada en la separación de moléculas basada en su movilidad en un campo eléctrico usando como soporte un gel de agarosa en una solución amortiguadora, el procedimiento fue la preparación del gel al 0.8% en buffer TBE 1X (Gris-Base-EDTA), el cual se colocó en la cámara electroforética horizontal modelo EC 320 de BioRad. El gel se cubrió con buffer TBE 1X. Las muestras se mezclan con jugo azul 6X (Azul de Bromofenol 0.25%, Xilencianol 0.25% y glicerol 30%) y se depositaron en los pozos del gel. Se realizó la electroforesis de 80-100V, se tiñeron 15 min. en una solución de Bromuro de Etidio (50ug/ml). El DNA obtenido fue visualizado en el transiluminador UV y los geles fotodocumentados con el programa Gel-Pro. Para la determinación de la concentración del DNA genómico se usó de referencia el DNA de *Drosophila melanogaster* cuantificado por densidad óptica con una absorbancia de 260 la cual equivale a una concentración de 0.05ug/μl de DNA por lo que multiplicamos la absorbancia por 0.5 (factor de conversión)(Sambrook et al., 1989).



## V.5 Diseño de los oligonucleótidos específicos.

La secuencia aminoacídica de las subunidades mayores LS1 y LS2 se tradujeron a secuencias nucleotídicas utilizando la tabla de conversión de codones de *Drosophila melanogaster*. seleccionando los codones más utilizados en insectos ([http:// www.kazusa.or.jp/codon/](http://www.kazusa.or.jp/codon/) del Instituto de investigación de DNA Kazusa Chiba, Japón). El diseño de los oligonucleótidos específicos para las subunidades se realizó utilizando las secuencias 5' y 3' de las diferentes subunidades. Se utilizó el programa Oligo4.0 para realizar el cálculo de la temperatura de alineamiento (Tm) de cada uno de los oligonucleótidos. La secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos que se diseñaron para amplificar las subunidades LS1 y LS2 está descrita en el Anexo I. (*No estan*).

Para la subunidad LS1 diseñamos los oligonucleótido llamado 5' LS1 constituido de 24pb con una Tm de 73.6°C. Para amplificar la subunidad LS2 diseñamos el oligonucleótido nombrado 5'LS2 de 24pb con una Tm. de 73.2°C. Debido a la similitud de las secuencias LS1 y LS2 se diseño un solo oligonucleótido 3' denominado LS1/2 con una Tm. de 74.8°C. La Tm. final calculada fue de 69°C.

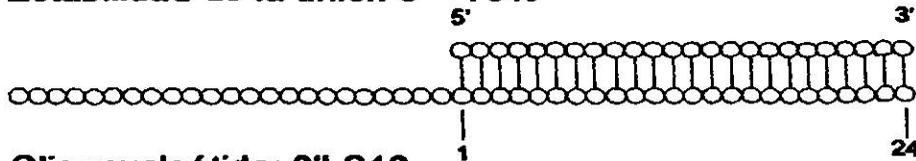
Se utilizó el programa de Amplify 1.2 para realizar el PCR virtual el cual simula las condiciones de estabilidad y unión de los oligonucleótidos. En este caso el resultado de la amplificación para la subunidad 5'LS1 tiene una estabilidad o complementariedad del iniciador del 100% mientras que para la estabilidad de unión 3' es un 79%. Para la 3'LS1/2 su estabilidad del iniciador es del 98% y de unión un 74%. La subunidad 5'LS2 tiene una complementariedad del iniciador de 91% y su estabilidad de unión 3' de 71% y para el iniciador 3' LS1/2 una complementariedad del 98% y una estabilidad de unión 3' de 74%. El producto amplificado fue calculado fue de 99pb en los dos casos.

## PCR virtual de LS1

Oligonucleótido: 5'LS1

Estabilidad del oligonucleótido = 100%

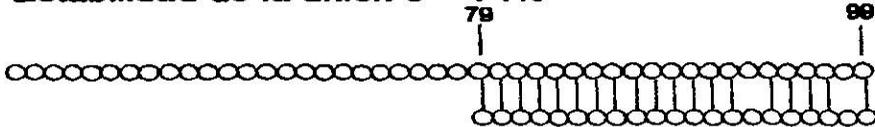
Estabilidad de la unión 3' = 79%



Oligonucleótido: 3'LS12

Estabilidad del oligonucleótido = 98%

Estabilidad de la unión 3' = 74%



5' LS1



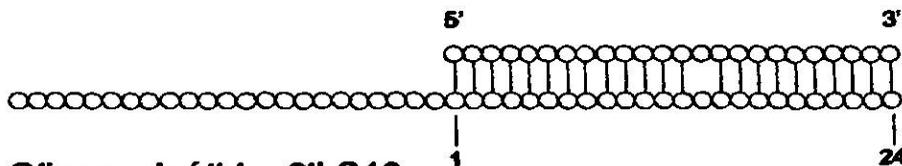
3' LS12

## PCR virtual de la LS2

Oligonucleótido: 5'LS2

Estabilidad del oligonucleótido = 91%

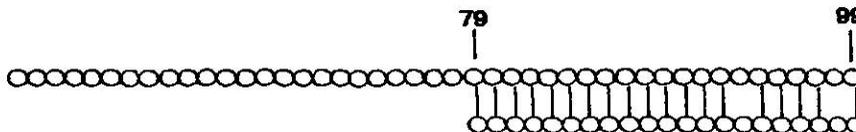
Estabilidad de la unión 3' = 71%



Oligonucleótido: 3'LS12

Estabilidad del oligonucleótido = 98%

Estabilidad de la unión 3' = 74%



5' LS2

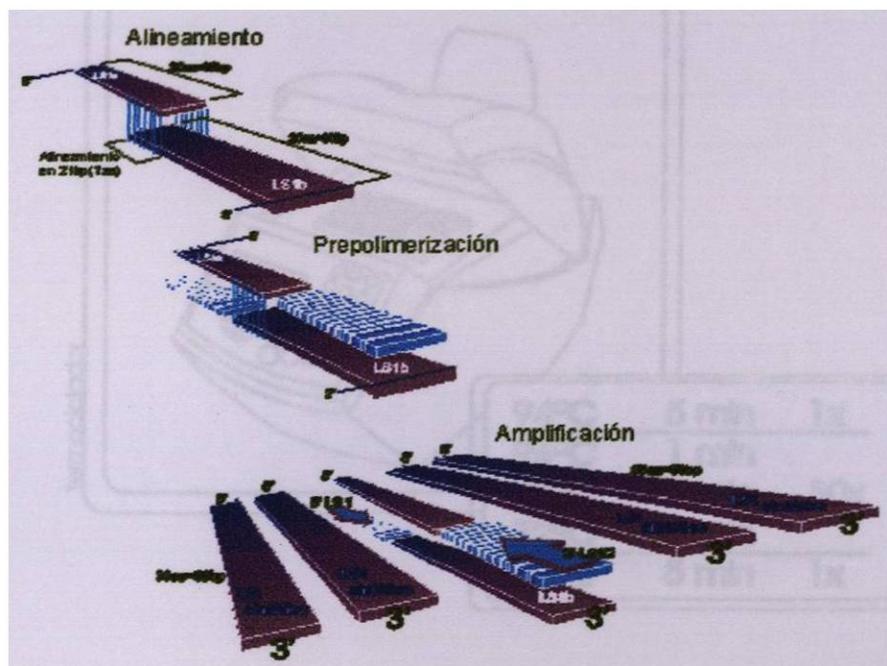


3' LS12



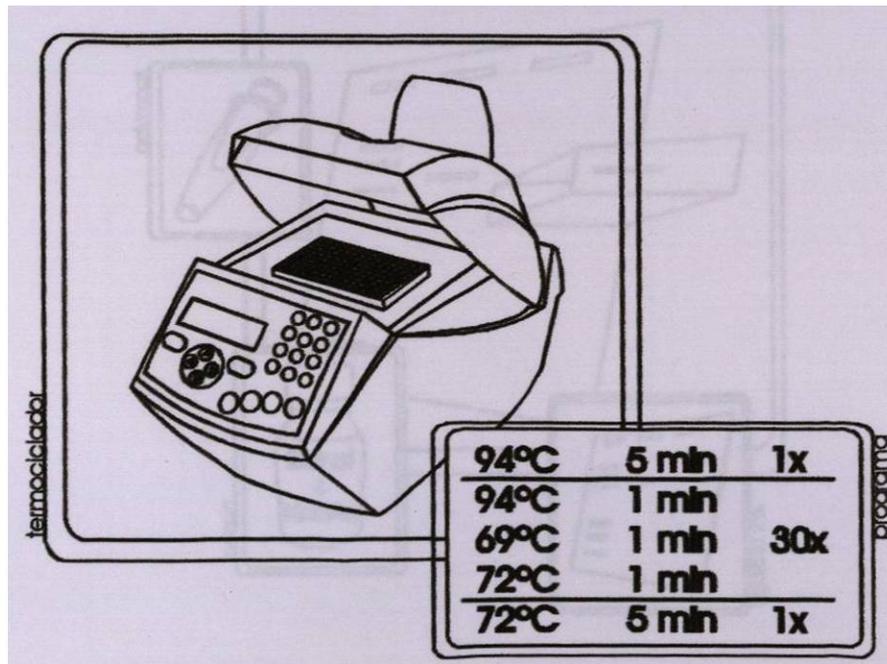
Como una estrategia alterna también se tradujo la secuencia aminoacídica de la subunidad LS1 usando la tabla de conversión de codones de *E. coli* para producir la secuencia directa de la subunidad LS1 libre de intrones etc. La secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos LS1a y LS1b esta descrita en el Anexo I.

Los oligonucleótidos se resuspendieron en TE 1X a una concentración  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y se realizó el alineamiento de LS1a y LS1b (de  $5\mu\text{g}$ ) colocando en un tubo  $5\mu\text{l}$  de cada uno en el buffer de alineamiento conteniendo  $6.6\mu\text{l}$  de  $\text{Gris HCl } 1\text{M}$ ,  $5.2\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2 \text{ } 0.25\text{mM}$ ,  $0.6\mu\text{l}$  de  $\text{DTT } 1.0\text{M}$  y  $0.26\mu\text{l}$  de  $\text{EDTA } 0.5\text{M}$ . Para permitir el alineamiento de los oligonucleótidos se colocó en el termociclador por un ciclo que decreció la temperatura  $88^\circ\text{C}/2 \text{ min.}$ ,  $65^\circ\text{C}/10 \text{ min.}$ ,  $55^\circ\text{C}/1 \text{ min.}$  y  $37^\circ\text{C}/10 \text{ min.}$  Posteriormente se dejo la reacción alineada toda la noche a temperatura ambiente y se realizó la pre-polimerización de la secuencia colocando  $3\mu\text{l}$  de la reacción de alineamiento en un tubo con  $5\mu\text{l}$  de buffer 10X,  $0.25\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2 \text{ } 0.25\text{mM}$ ,  $0.25\mu\text{l}$  dNTP's 100X y  $0.25\mu\text{l}$  de la Taq polimerasa ( $5\text{U}/\mu\text{l}$ ). Finalmente, se adicionó  $1\mu\text{l}$  de los oligonucleótidos 5' LS1 y 3' LS1/2  $100\text{ng}/\mu\text{l}$  +  $0.25\mu\text{l}$  de dNTP's y se amplifico el fragmento por PCR con un gradiente de temperaturas usando el programa que se describe en la siguiente sección.



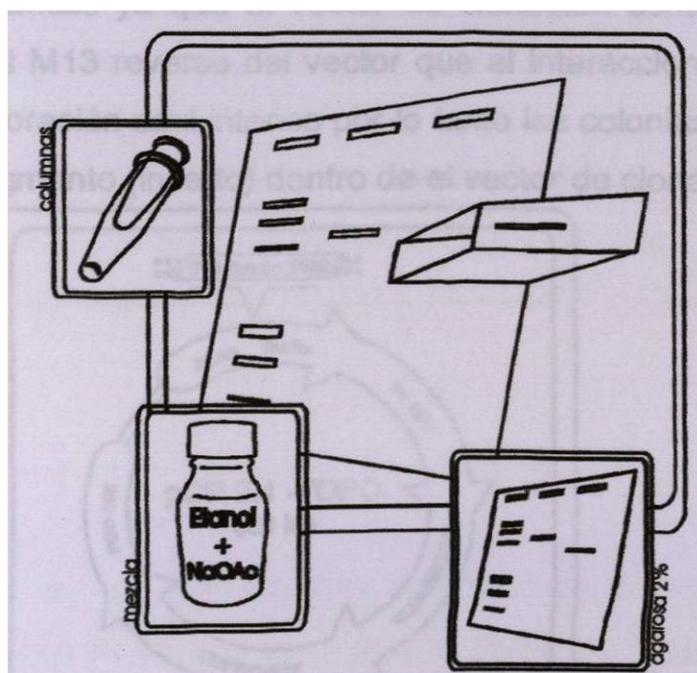
## V.6 Amplificación mediante PCR

A partir del DNA genómico obtenido de la hormiga *P. triplarinus* fue ensamblada la reacción de PCR (Barrera y cols 1993). Para amplificar el DNA de las subunidades mayores del veneno se coló 1 $\mu$ l de DNA genómico, 25 $\mu$ l de Buffer 10X, 1.5 $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 0.25mM, 0.25 $\mu$ l de dNTPs 100X, 1 $\mu$ l de cada oligonucleótido con una concentración de 100ng/ $\mu$ l, 0.25 $\mu$ l de enzima Taq polimerasa (5U/ $\mu$ l) de Promega (Madison Wi, E.U.A.) y 16.5 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O mili Q. El programa que se utilizó se basó en las T<sub>m</sub>(s) calculadas anteriormente y consistió inicialmente de una temperatura desnaturizante de 94°C/ 5 min. durante un ciclo el cual fue largo debido a que usamos DNA genómico, los 30 ciclos restantes consistieron de la temperatura desnaturizante de 94°C/ 1 min., 69°C/ 1 min y 72°C/1min. Por último, fue aplicado un ciclo de extensión de 72°C/ 5 min. Una vez realizadas las reacciones correspondientes se colocaron en el termociclador PCR express (Hybaid HBP 110 serie 19612), bajo las condiciones preestablecidas y siguiendo las instrucciones del manual. El cálculo de las T<sub>m</sub>s se realizó haciendo un promedio y restando 5°C para calcular la temperatura de alineamiento final para cada reacción.



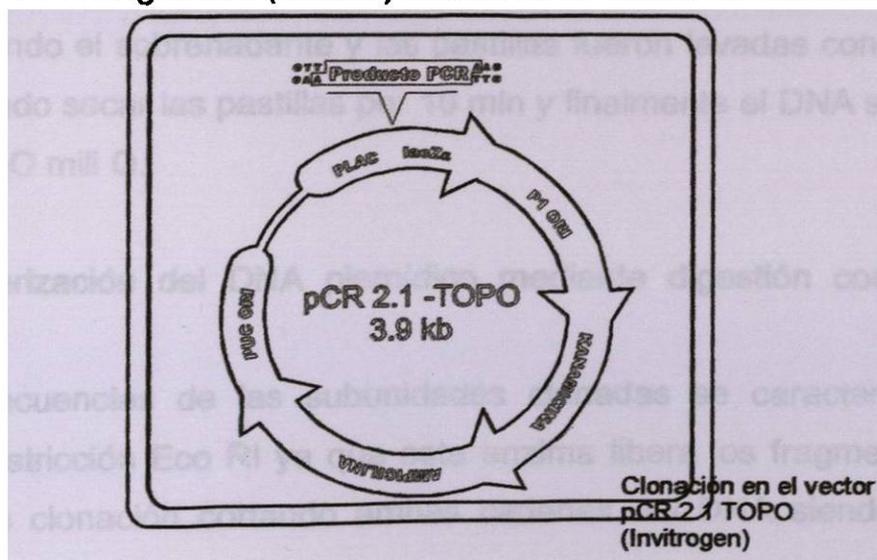
## V.7 Purificación del DNA amplificado mediante la técnica de fibra de vidrio

El DNA amplificado mediante PCR fue purificado cortando en el gel de agarosa 0.8% el ó los fragmentos de interés colocándolos en columnas hechas con dos tubos ependorf de 1.5ml y 0.5ml respectivamente (ensamblados uno en el otro). El fragmento de agarosa con el DNA se colocó en el tubo de 0.5ml con fibra de vidrio y posteriormente se centrifugó a 14,000rpm por 5 min. El DNA pasa a través de la columna y es recuperado en el fondo del tubo de 1.5ml. Se le agregaron 10 $\mu$ l de NaOAc 3M y 250 $\mu$ l de etanol al 100%. Se mezcló mediante vórtex (Thermolyne serie 268) y de inmediato fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1h, después fue centrifugado (centrífuga ependorf 5415C) por 15 min. a 14,000rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70%. Después se centrifugó por 5 min. a 14,000rpm, se eliminó el sobrenadante por decantación y la pastilla se dejó secar por 10 min. Finalmente y se resuspendió con H<sub>2</sub>O miliQ en el mismo volumen de la muestra inicial para después ser visualizado en un gel de agarosa al 2% siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para preparación en geles de agarosa.



## V.8 Clonación de los productos amplificados

La clonación de los productos amplificados fue realizada utilizando el vector de clonación comercial TOPO pCR 2.1 (Invitrogen). Los productos amplificados mediante PCR de las subunidades LS1 y LS2 fueron ligados mediante una reacción química colocando 4 $\mu$ l de DNA amplificado (400ng/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l de sol. salina y 1 $\mu$ l de vector pCR 2.1 TOPO. Posteriormente, se incubó la reacción 30 min a temperatura ambiente y se colocó en hielo durante 5 min. Para la transformación se colocaron 2 $\mu$ l de reacción de la ligación en un tubo con bacterias TOP10 Ca<sup>++</sup> competentes incubando por 20 min. Se proporcionó el choque térmico a las células por 30 seg. a 42°C y se adicionaron 250 $\mu$ l de medio nutritivo SOC. Las células se colocaron a 37°C en agitación por 1h en la incubadora (Brinkmann Orbimix 1010 y Brinkmann Incubator 1000) y se plaqueo por difusión con 50 y 100 $\mu$ l de la transformación en placas con LB + Ampicilina + X-Gal. El testigo positivo ( + ) fue el plásmido pUC18 y el testigo negativo ( - ) H<sub>2</sub>O estéril. Posteriormente, las placas con agar LB se dejaron en crecimiento toda la noche en la incubadora de Precisión NAPCO modelo 818 a 37°C y se seleccionaron las clonas de colonias blancas ya que el vector de clonación contiene el gen lacZ (ATG) localizado en el M13 reverse del vector que al interaccionar con X-gal da como resultado un coloración azul intenso por lo tanto las colonias blancas indican la presencia de un fragmento (inserto) dentro de el vector de clonación.



## **V.9 Obtención del DNA plasmídico de las clonas positivas.**

Para caracterizar y obtener los fragmentos clonados se realizó la obtención de DNA mediante minipreparación con el método de lisis alcalina (Kraft,1988, Lech, 1987, Maniatis, 1982). Se sembraron 12 colonias de cada subunidad en medio LB+Ampicilina siguiendo el protocolo para su aislamiento. Para obtener el DNA de los productos (LS1, LS2 y sintético) clonados utilizamos la técnica de minipreparación por lisis alcalina que consistió en inocular cepas de las subunidades clonadas en 3 ml de LB caldo (NaCl 1%, extracto de Levadura y Triptona 0.5%) estéril y con ampicilina (100µg/ml) y se incubó 16 h a 150 rpm (37°C). Posteriormente se tomó 1.5ml del cultivo y se transfirió a un tubo de microcentrifuga (1.5 ml) y se centrifugo por 2 min a 16000 rpm. Se descarto el sobrenadante y se recupero la pastilla, la cual se resuspende en 150µl de solución I (glucosa 50mM, EDTA 10mM y Gris-HCL 25mM, pH 8.0), después de 5 min a temperatura ambiente, se adicionó 300µl de solución II (NaOH 0.2N y SDS 1%) se mezcló por inversión. Se agregaron 250µl de solución III (Acetato de Sodio 3M , pH 5.2), se incubó por 5 min a -20°C y luego fueron centrifugadas por 5 min a 16000 rpm y el sobrenadante fue transferido a otro tubo. El DNA fue precipitado agregando 1 volumen de isopropanol (600µl) al 100%, mezclando por inversión e incubando por 10 min a -20°C. Posteriormente se centrifugó por 5 min a 16000 rpm descartando el sobrenadante y las pastillas fueron lavadas con 1ml de etanol al 70% dejando secar las pastillas por 10 min y finalmente el DNA se resuspendió en 50µl de H<sub>2</sub>O mili Q.

## **V.10 Caracterización del DNA plasmídico mediante digestión con enzimas de restricción.**

Las secuencias de las subunidades clonadas se caracterizaron con la enzima de restricción Eco RI ya que esta enzima libera los fragmentos clonados del vector de clonación cortando ambas cadenas del DNA siendo una enzima

palindrómica ya que puede reconocer ambas cadenas complementarias. Eco RI el sitio de corte para la enzima es: 5' G↓AATTC 3'

Del DNA plasmídico obtenido de las clonas positivas se utilizaron 400ng/ $\mu$ l para liberar el inserto de interés. Se realizaron 12 digestiones para cada subunidad, colocando 2 $\mu$ l de DNA (400ng), 1 $\mu$ l de buffer 100X, 0.3 $\mu$ l de enzima Eco RI y 6.7 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O miliQ. El volumen por reacción fue de 10 $\mu$ l los cuales se incubaron a 37°C durante 24h en la incubadora de Precisión NAPCO modelo 818.

#### V.11 Determinación de la secuencia nucleotídica

Para la determinación de la secuencia nucleotídica de los productos amplificados de las clonas recombinantes positivas se preparó el DNA por el método de lisis alcalina (Kraft, 1988, Lech, 1987, Maniatis, 1982). La secuencia de las clonas positivas se determinó mediante la técnica descrita por Sanger, en 1977. 2 $\mu$ g del DNA plasmídico fueron purificados mediante paso por columnas de QIAGEN. La secuenciación se realizó utilizando oligonucleótidos derivados del fago M13 (Anderson, 1996). marcados con IR-800, detectado la secuencia nucleotídica por luz infrarroja en el DNA sequencer Long Reader 4200 LI-COR IR2 semiautomático.

Forward 5' G TAA AAC GAC GGC CAG 3'

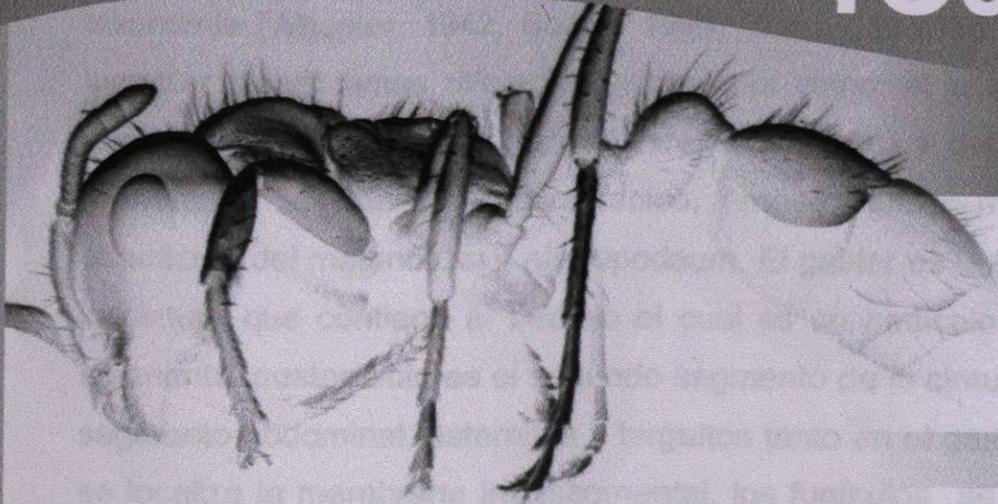
Reverse 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'



## VI.1 Observación morfológica de *Pseudomyrmex rufiventris*

Para identificar morfológicamente la anatomía general de la hormiga utilizamos:

# resultados



al último segmento abdominal sale por el pigidio (último segmento abdominal visible). Los apéndices torácicos constan de coxa, trocánter, fémur, tibia, espuela pectinada, tarso y uñas. Tiene un lóbulo frontal conteniendo el ocelo, la cabeza, ojos, antenas y mandíbula.

## VI.2 Descripción y análisis morfológico de *Pseudomyrmex rufiventris*

Las hormigas anteriormente fijadas se colocaron y se les realizó (1/4) frotamiento

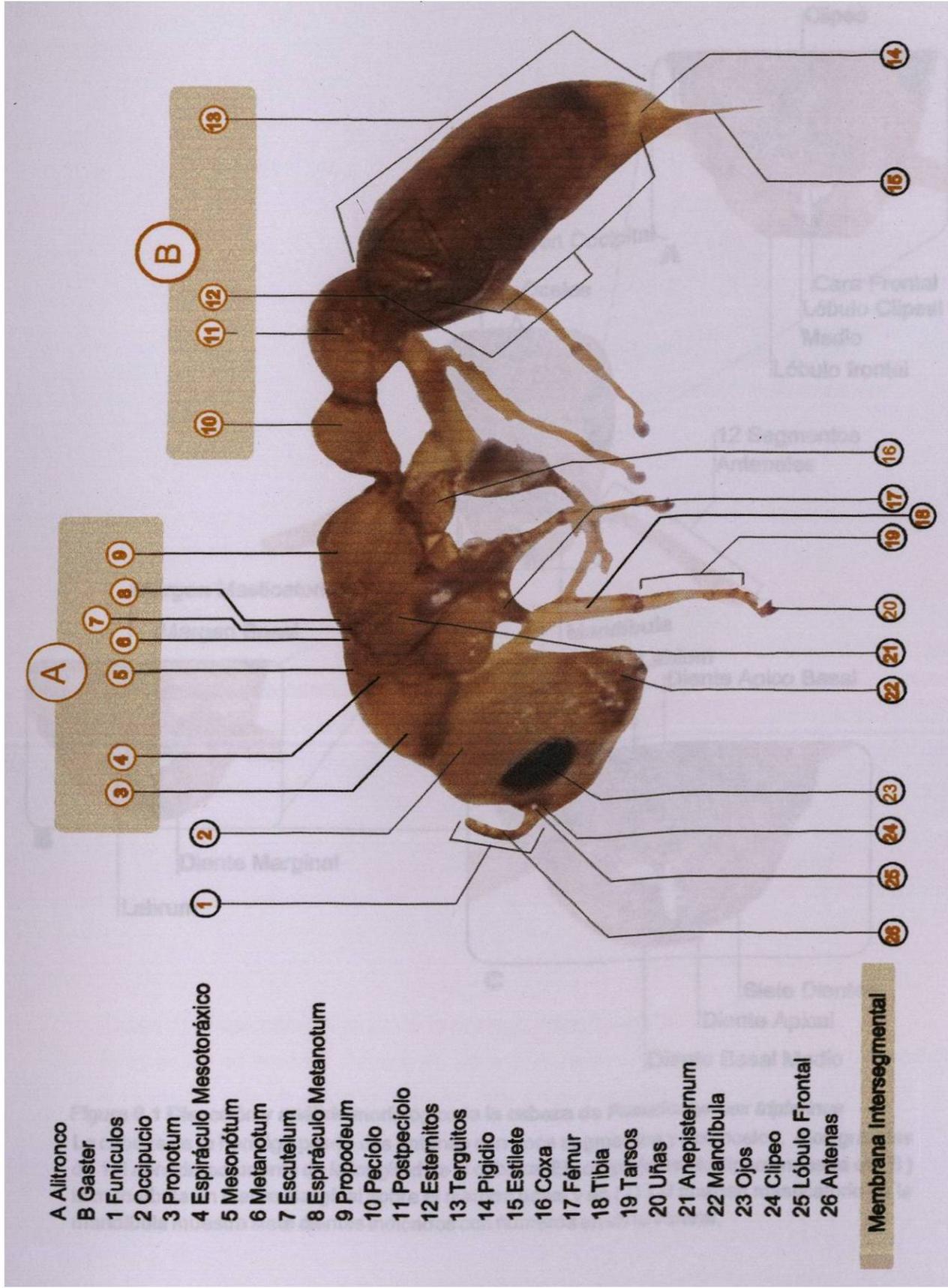
## VI.1 Observación morfológica de *Pseudomyrmex triplarinus*

Para identificar morfológicamente la anatomía general de la hormiga utilizamos ejemplares completos. La figura 6 muestra una hormiga trabajadora de la subfamilia *Pseudomyrmicinae* con las características morfológicas principales usadas en taxonomía (Wheeler, 1942, Bolton, 1994, Ward, 1985,1991,1993 y 1999). En este ejemplar identificamos diferentes estructuras como: el alitrongo (primer segmento abdominal fusionado junto con el tórax verdadero) y dentro de el se localiza el pronotum, espiráculo mesotóraco, mesonótum, metanótum, escutelum, espiráculo del metanotum y el propodeum. El gaster es la parte baja abdominal de la cintura que contiene al pecíolo el cual es un pedicelo compuesto de solo un segmento, postpecíolo es el segundo segmento de la cintura compuesto del tercer segmento abdominal, esternitos y terguitos tanto en el gaster como en el alitrongo se localiza la membrana intersegmental, los funículos se refiere a toda la antena excepto el primer segmento, tiene un muy desarrollado estilete; es el órgano cercano al último segmento abdominal sale por el pigidio (último segmento abdominal visible). Los apéndices torácicos constan de coxa, trocanter, fémur, tibia, espuela pectinada, tarso y uñas. Tiene un lóbulo frontal conteniendo el occipucio, la cabeza, ojos, antenas y mandíbula.

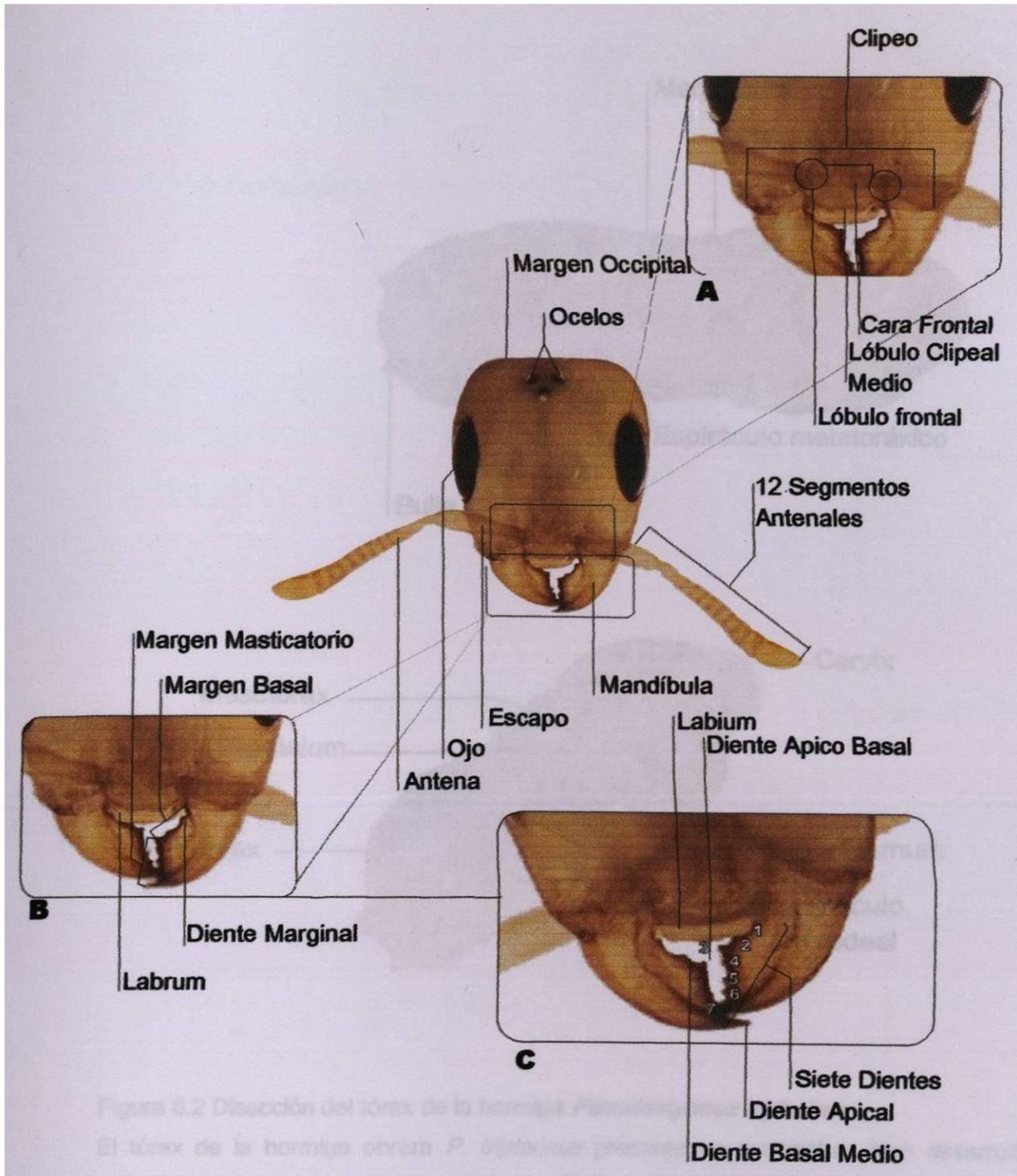
## VI.2 Disección y análisis morfológico de *Pseudomyrmex triplarinus*

Las hormigas anteriormente fijadas en glicerol y ácido acético (1:4) fueron disectadas utilizando instrumentos de disección especiales haciendo preparaciones de laminillas permanentes con solución Faure's. Identificamos 12 segmentos antenales, un diente marginal sobre el margen basal, ojos de 1/3 de longitud comparada con la cabeza (Fig. 6.1), metanotum bien desarrollado, tórax formado por tres segmentos protórax, mesotórax y metatórax (Fig. 6.2), En la figura 6.3 podemos observar un pecíolo y post-pecíolo característico de la identificación para la subfamilia *Pseudomyrmicinae* (Bolton, 1994) y un estilete bien desarrollado, el surco metabasitarsal esta ausente (Fig. 6.4). Las claves taxonómicas (Ward 1985, 1991,1993 y 1999). nos permitieron identificar el género *Pseudomyrmex*, especie *triplarinus*





**Figura 6** Morfología de *Formicomyrmex trabeatorum* colectada en Santa Cruz, Bolivia



**Figura 6.1** Disección y análisis morfológico de la cabeza de *Pseudomyrmex triplarinus*. La cabeza de la hormiga posee dos antenas con doce segmentos y dos ocelos, ojos grandes de 1/3 aproximadamente de la longitud de la cabeza. El complejo frontoclipeal muestra en (B) la mandíbula un diente marginal sobre el margen basal y en (C) el margen masticatorio de la mandíbula muestra siete dientes indicados con números en vista ventral.

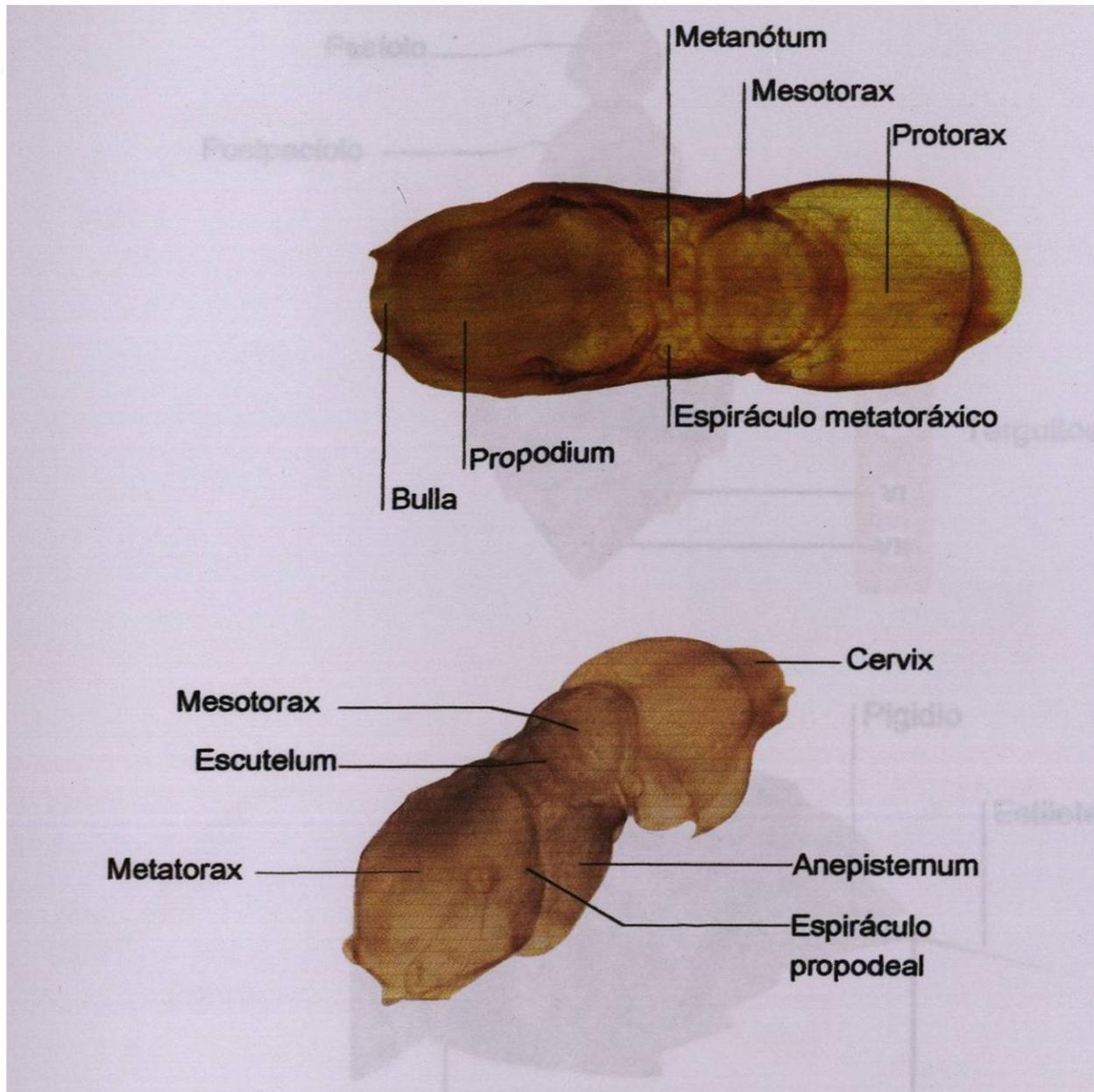


Figura 6.2 Disección del tórax de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus*

El tórax de la hormiga obrera *P. triplarinus* presenta un metanótum bien desarrollado, formada por tres segmentos protórax, mesotórax y metatórax en los que se insertan un par de apéndices.

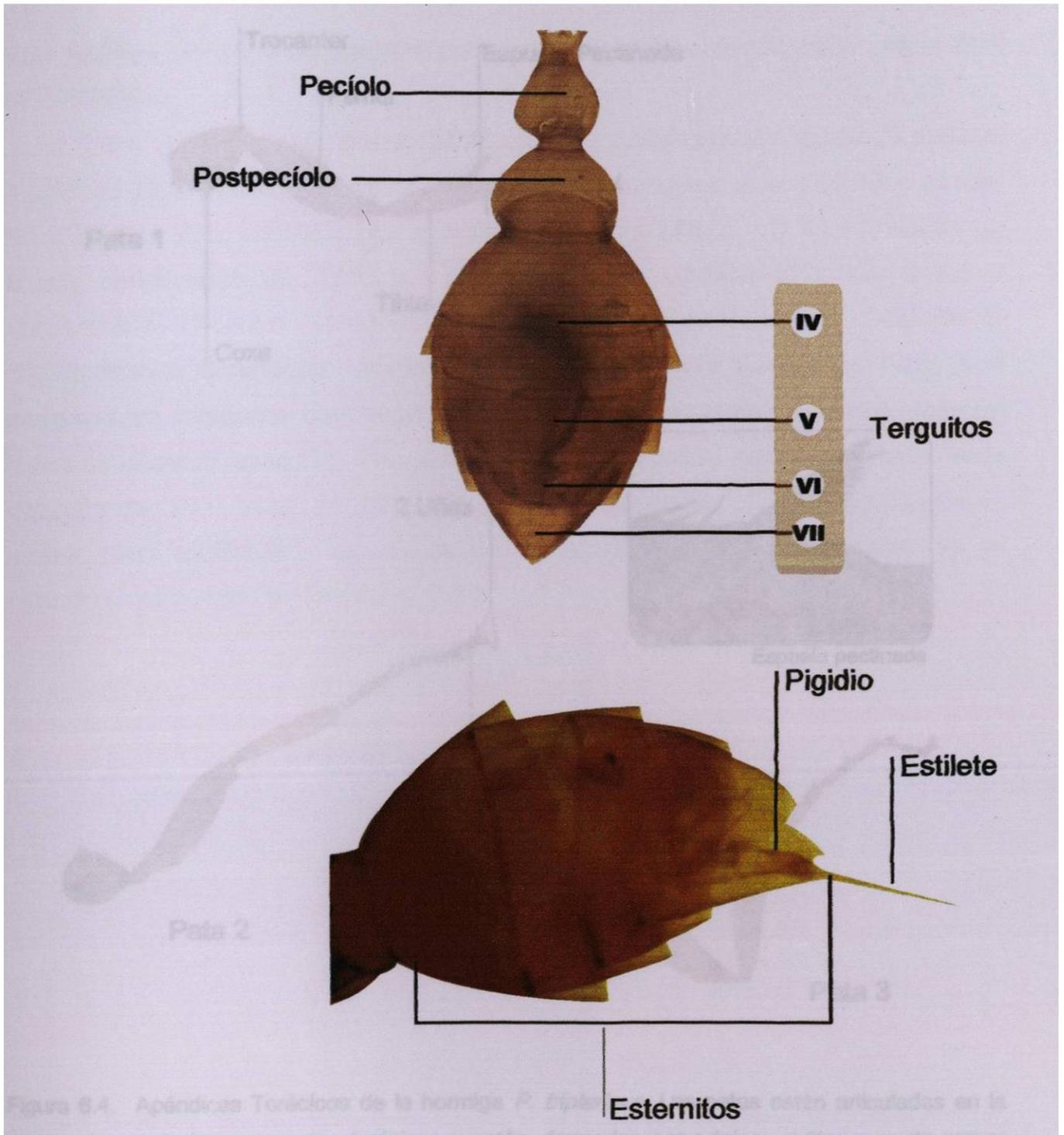


Figura 6.3. Abdomen de hormiga *P. triplarinus*

Los terguitos y esterguitos en el abdomen unidos por membranas pleurales. Una característica distintiva de la subfamilia es el cuerpo con dos segmentos reducidos pecíolo y postpecíolo bien definidos y un muy desarrollado estilete.

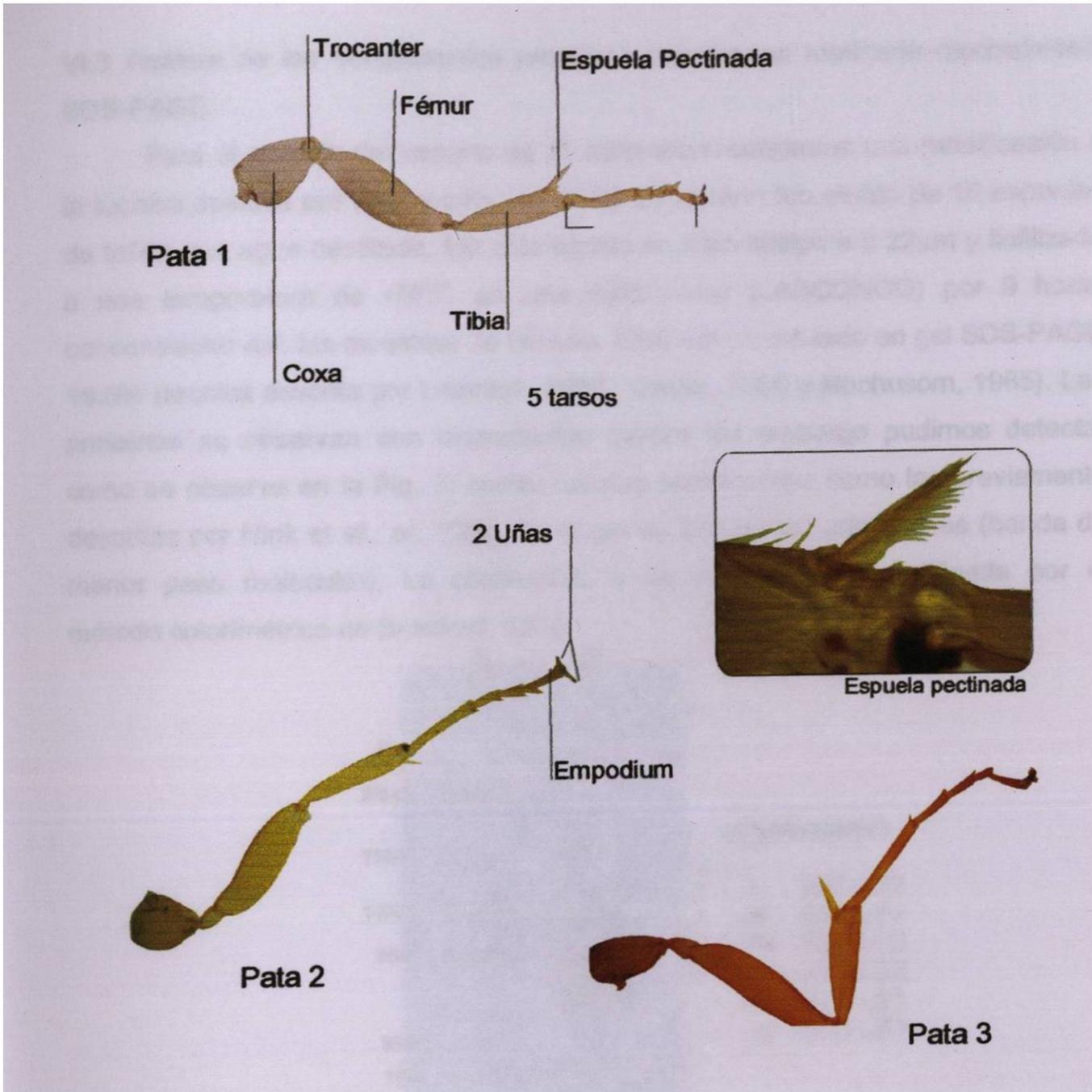


Figura 6.4. Apéndices Torácicos de la hormiga *P. triplarinus*. Las patas están articuladas en la región pleural de los segmentos torácicos y están formadas por artejos, el fémur es de mayor tamaño siendo el más fuerte de todos. Presentan coxa, trocanter, tibia, los segmentos tarsales y dos uñas. Presentan en la tibia la espuela pectinada característica y el surco metabasitarsal esta ausente

### VI.3 Análisis de los componentes proteicos del veneno mediante electroforesis SDS-PAGE.

Para el análisis del veneno de *P. triplarinus* realizamos una modificación a la técnica descrita por Hink y cols., en 1989. El veneno fue eluido de 10 esponjas de teflón con agua destilada, fue esterilizado en filtro Millipore 0.22 $\mu$ m y liofilizado a una temperatura de -70°C en una liofilizadora (LABCONCO) por 9 horas concentrando así, las muestras de veneno. Este fue visualizado en gel SDS-PAGE 16.5% (técnica descrita por Laemmli, 1970, Garfin, 1990 y Nochusom, 1985). Las proteínas se observan con degradación parcial sin embargo pudimos detectar como se observa en la Fig. 7; cuatro bandas prominentes como las previamente descritas por Hink et al., en 1994. En el gel se indican las mirmexinas (banda de menor peso molecular). La concentración de veneno fue cuantificada por el método colorimétrico de Bradford, 1976.

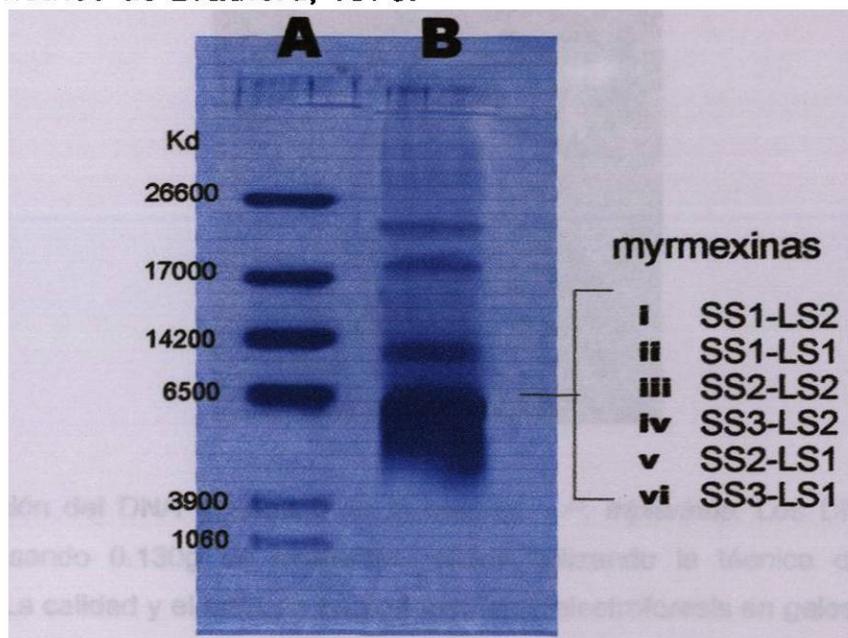


Figura 7. Análisis y caracterización de los componentes proteicos del veneno de *P. triplarinus*. Las muestras de veneno fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE al 16.5%. A) Marcador de peso molecular, B) la muestra de 7 $\mu$ l del veneno eluido presenta 4 proteínas más abundantes de 24500, 20400, 14100 y 6000 Kd. Los péptidos de bajo peso molecular constituyen las Mirmexinas que contienen las subunidades mayores LS1 y LS2.

#### VI.4 DNA genómico de *Pseudomyrmex triplarinus*.

El DNA genómico de la hormiga *P. triplarinus* se obtuvo utilizando la técnica de precipitación con cloruro de litio (Sullivan y cols, 2000), el resultado en la Figura 8.B, muestra aproximadamente 250ng/ $\mu$ l de DNA genómico obtenido de *P. triplarinus*. Esta cantidad es menor comparada con los DNAs genómicos de otros organismos analizados como (*Drosophila melanogaster*, ratón y agaves en los carriles A, C y D). La visualización en gel de agarosa al 0.8%. mostró que obtuvimos el DNA genómico de buena calidad electroforética ya que no muestra degradación.

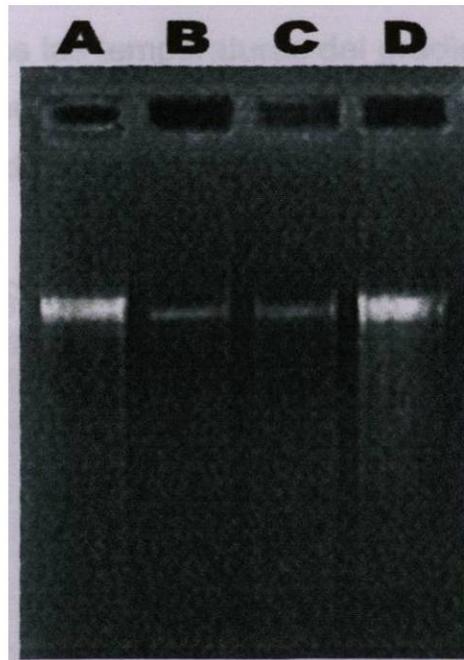
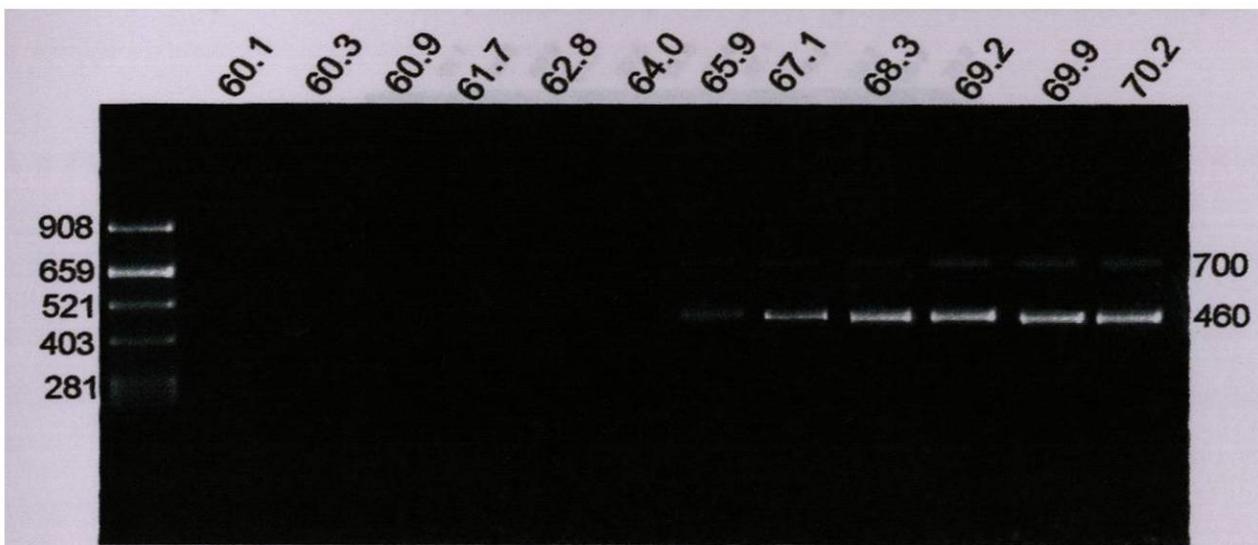


Figura 8. Obtención del DNA genómico de la hormiga *P. triplarinus*. Los DNAs genómicos se obtuvieron procesando 0.130g de diferentes tejidos utilizando la técnica de Cloruro de litio (Sullivan, 2000). La calidad y el DNA se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa 0.8%. DNAs genómicos de A) mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, B) hormiga *Pseudomyrmex triplarinus*, C) Agave y D) Ratón.

## VI.5 Amplificación mediante PCR de la subunidad LS1, LS2 y LS1 sintético

La cantidad de DNA genómico (250ng/ $\mu$ l) fue suficiente para realizar la amplificación de las subunidades mayores de las Mirmexinas. Los productos de PCR obtenidos con la Subunidad LS1 del DNA genómico (Fig. 9) mostraron dos fragmentos amplificados de 700 y 460 pb con las temperaturas que van de 65.9 a 70.2 °C en el gradiente de temperaturas al que fueron sometidas. La amplificación de la Subunidad LS2 se obtuvo de un PCR con una  $T_m$  de 69°C mostrando dos fragmentos de 500 y 260 pb (Fig. 10). El PCR para amplificar la LS1 del DNA sintético con la estrategia alterna mostró exitosamente un fragmento de ~99pb como se esperaba en todas las temperaturas del gradiente (Fig. 11). El tamaño de las bandas de ambas subunidades (LS1 y LS2) de las amplificaciones mediante PCR se verificaron en gel de poliacrilamida al 16.5% (Figura 12).



**Figura 9.** Amplificación mediante PCR de la subunidad mayor LS1. Fue visualizado en un gel de agarosa al 2%. Se realizó un gradiente de temperaturas de 60.1 a 70.2°C. el primer carril muestra el Marcador de peso molecular pBR322+AluI, los demás carriles muestran las amplificaciones realizadas a partir de las temperaturas entre 65.9°C y 70.2°C mostraron 2 bandas de aproximadamente 700 y 460pb.

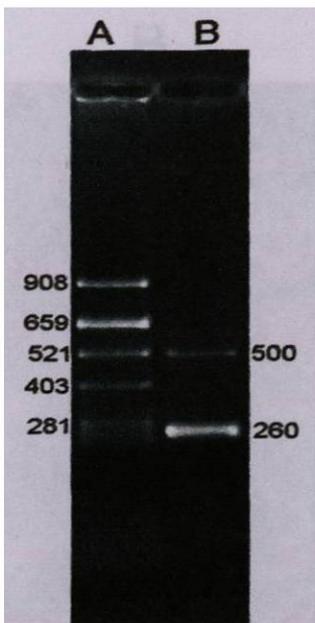


Figura 10. Amplificación mediante PCR de la subunidad mayor LS2. Los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. A) Marcador de peso molecular pBR 322+Alu I, B) Se observan dos productos amplificados de aproximadamente 500 y 260pb.

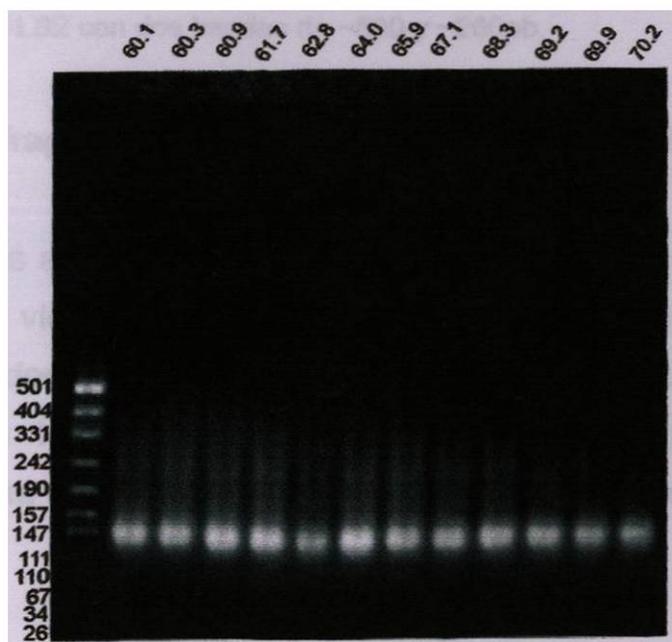


Figura 11. Amplificación mediante PCR del DNA sintético LS1. El resultado mostró una amplificación en todas las temperaturas del gradiente. Los productos de la amplificación mediante PCR; muestran el fragmento de ~99pb como lo esperado en todas las temperaturas analizadas. El primer carril muestra el Marcador de peso molecular pUC 19 + Msp I.

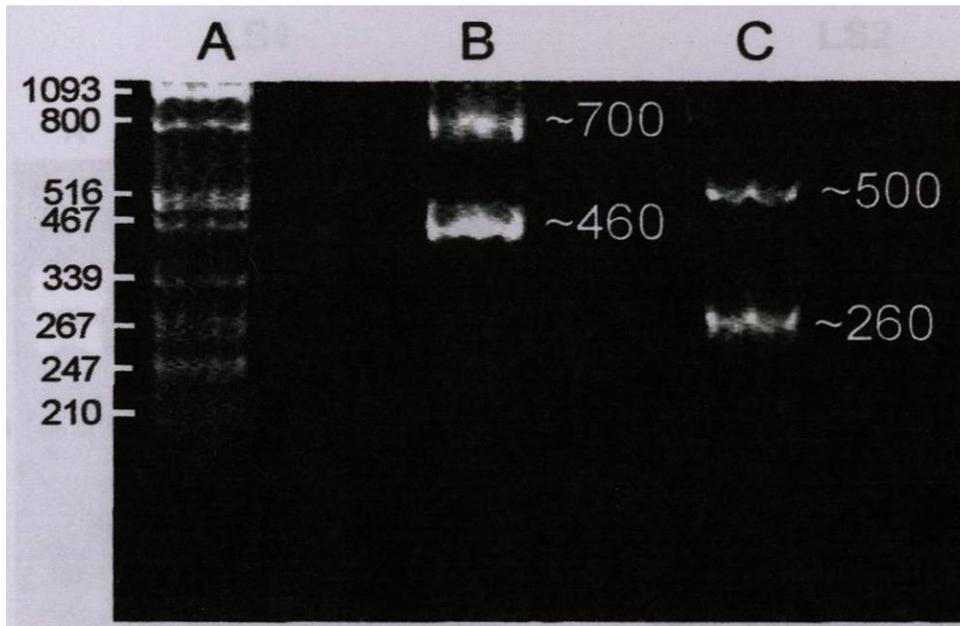
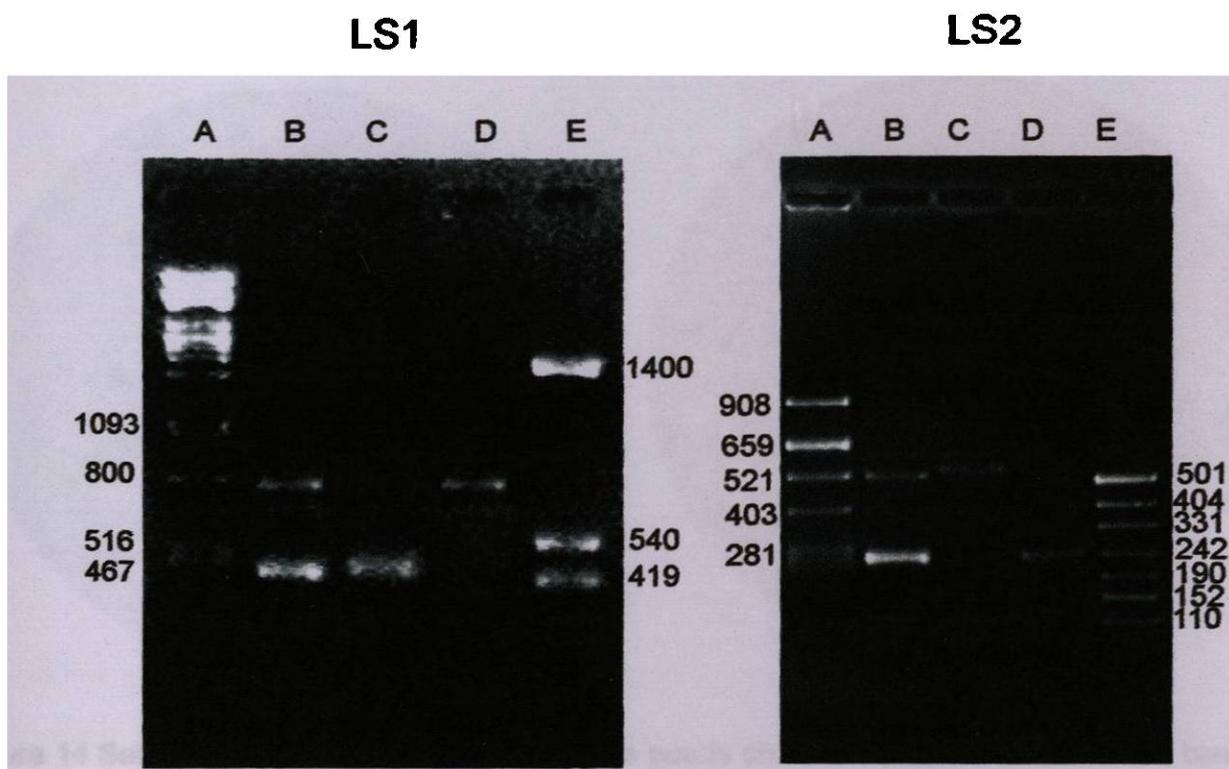


Figura 12. Análisis de los productos amplificados LS1 y LS2 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%. A) marcador de peso molecular lambda + Pst 1. B) secuencias amplificadas de la subunidad mayor de Mirmexinas LS1 donde se observan dos bandas; una de ~700pb y otra de ~460pb. C) subunidad LS2 con dos bandas de ~500 y ~260pb.

## VI. 6 Purificación de fragmentos de las subunidades LS1 y LS2 mediante fibra de vidrio

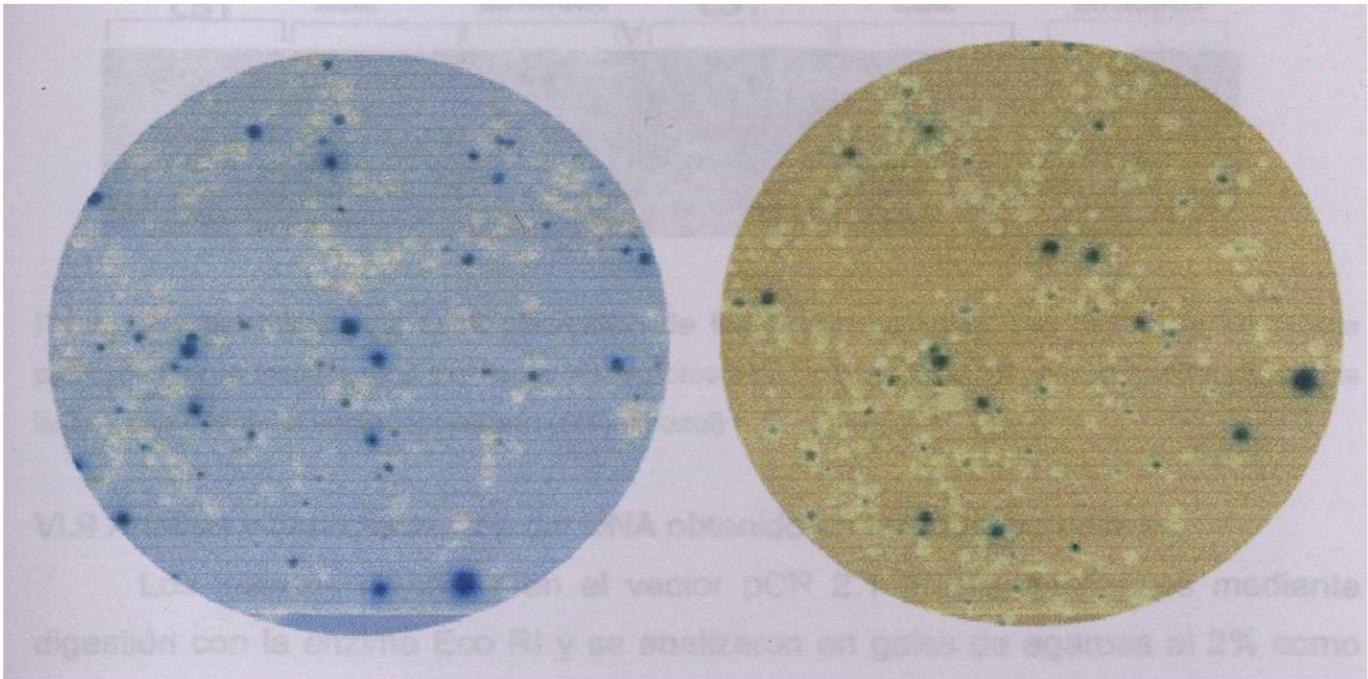
Los fragmentos amplificados para ambas subunidades se purificaron por la técnica de fibra de vidrio (Maniatis, 1982). En la figura 13 se muestran los fragmentos amplificados para las subunidades LS1 y LS2 en un gel de agarosa al 2% y se comparan los fragmentos purificados con los productos de PCR mostrando una mínima pérdida de DNA en el proceso de purificación.



**Figura 13. Purificación de los fragmentos de las subunidades LS1 y LS2 mediante fibra de vidrio.** Los fragmentos purificados de la subunidad LS1 se corrieron en un gel de agarosa al 2% (LS1): A) 10µl marcador de peso molecular lambda + Msp I, B) LS1 producto de PCR sin purificar bandas de ~700 y ~460bp, C) Fragmento de 460 pb purificado, D) Fragmento de 700 pb purificado, E) marcador de peso molecular PBS + Dde I. Los Fragmentos purificados de la subunidad LS2 (LS2): A) marcador de peso molecular pBR322+Alu I. B) producto de PCR de la subunidad LS2; C) Fragmento de 500 pb purificado; D) Fragmento de 260 pb purificado.

## VI.7 Clonación de los fragmentos amplificados en el vector pCR 2.1

Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector comercial TOPO pCR 2.1 proporcionando una alta eficiencia de clonación en los productos de PCR amplificados. En la Figura 14 se pueden observar las cajas petri con medio LB + ampicilina con crecimiento de las colonias con color blanco (clonas positivas) en contraste con las colonias azules (sin inserto).



**Figura 14 Selección de clonas positivas.** Como se puede observar se obtuvieron colonias blancas (con inserto) y colonias azules (sin inserto). Las colonias blancas se seleccionaron para su posterior aislamiento plasmídico, caracterización y análisis nucleotídico. Las cajas contenían LB + ampicilina (10mg/ml) + X-Gal (40mg/ml).

### **VI.8 Aislamiento del DNA plasmídico de los fragmentos clonados**

Se realizó el aislamiento del DNA plasmídico de 12 colonias para cada subunidad por el método de minipreparación con lisis alcalina como se puede observar en la Figura 15. Se obtuvieron aproximadamente de 1-8ug totales de DNA para cada clona y se observan diferencias en los tamaños lo cual indica que se introdujeron insertos de los productos de PCR en el vector de clonación.

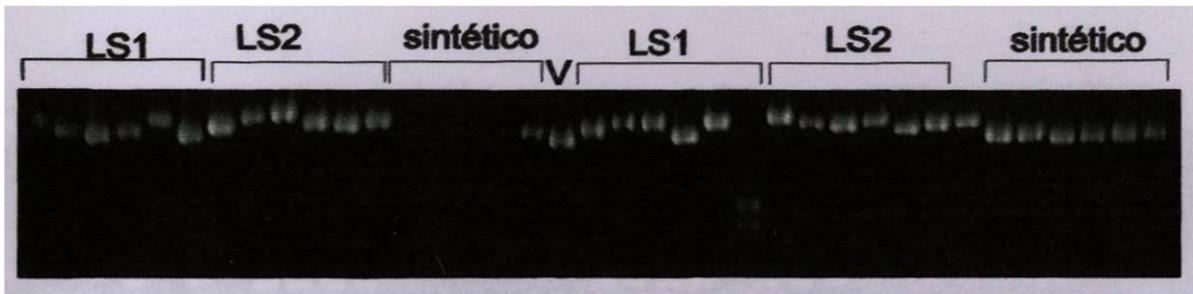


Figura 15. Aislamiento del DNA plasmídico de las clonas positivas. Los DNAs de las clonas positivas fueron visualizados mediante electroforesis en agarosa al 0.8%. el carril señalado con la letra V representa al vector sin inserto (colonia azul)

### VI.9 Análisis y caracterización del DNA obtenido en las clonas positivas.

Los insertos clonados en el vector pCR 2.1 fueron analizados mediante digestión con la enzima Eco RI y se analizaron en geles de agarosa al 2% como se puede observar en la Figura 16. Los fragmentos clonados mostraron gran variabilidad en el tamaño de los insertos liberados por lo que se decidió corroborar los pesos moleculares de las bandas clonadas en geles de poliacrilamida al 6% para mayor precisión del resultado. En la Figura 17 se muestra que para cada subunidad incluyendo el DNA sintético se observan diferentes pesos moleculares de los insertos. Para la subunidad LS1 se obtuvieron 7 fragmentos de ~150, 180, 230, 430, 500 y 700pb (Figura 17). Para la subunidad LS2 se clonaron 5 fragmentos de diferente peso molecular: ~230, 410, 430, 530 y 700pb (Figura 18). Para el DNA sintético se observó un patrón de 7 bandas con peso molecular de ~ 100 pb (Fig. 19). 3 fragmentos clonados corresponden como se esperaba a fragmentos > de 99pb debido a los nucleótidos del vector entre los sitios Eco RI (carriles 7, 8 y 9). Sin embargo, en los carriles 6 y 8 se muestran bandas de menor peso molecular del esperado y algunas de aproximadamente el mismo peso molecular al producto de PCR (carriles 3 y 4). Estas ultimas probablemente corresponden al vector sin inserto y ó clonas truncadas que se confirmaron con la determinación de la secuencia nucleotídica en la siguiente sección.

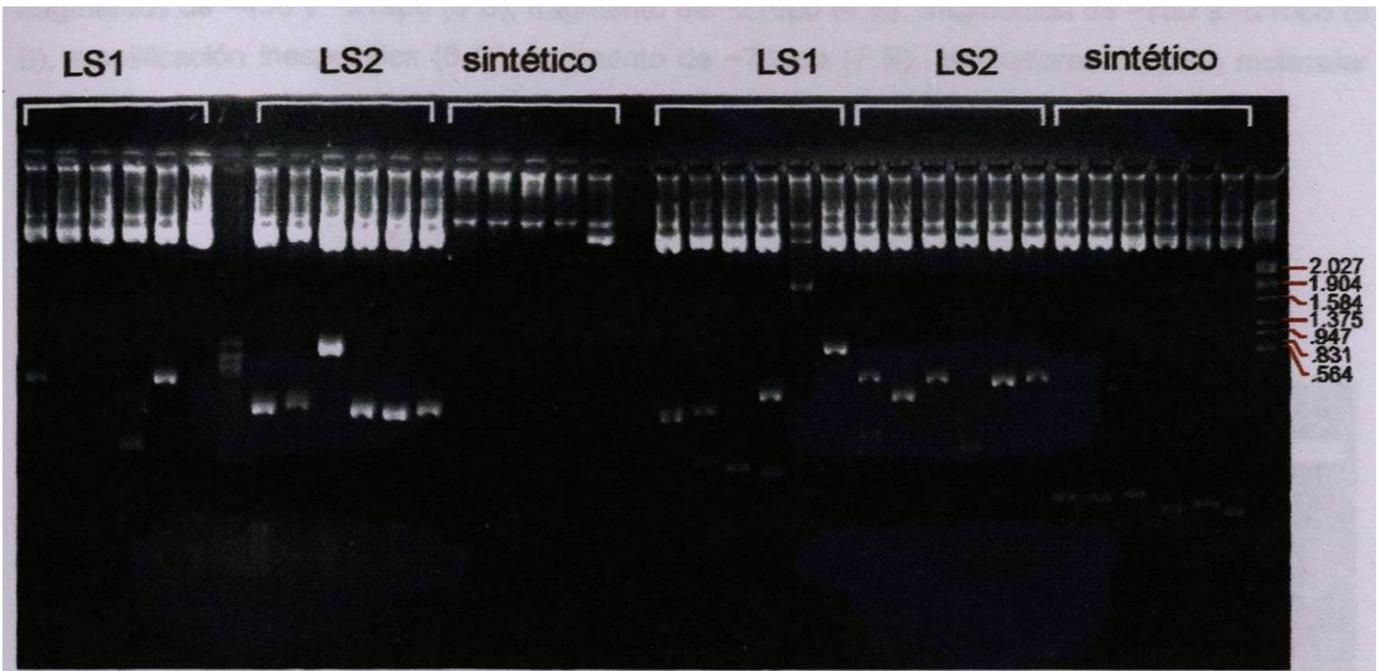


Figura 16. Análisis de los fragmentos clonados mediante electroforesis en gel de Agarosa 2%. Se analizaron 12 colonias blancas de las placas de LB para cada subunidad (LS1, LS2 y DNA sintético). El DNA plasmídico de las clonas fue digerido con la enzima de restricción Eco R I liberando los insertos que se muestran.

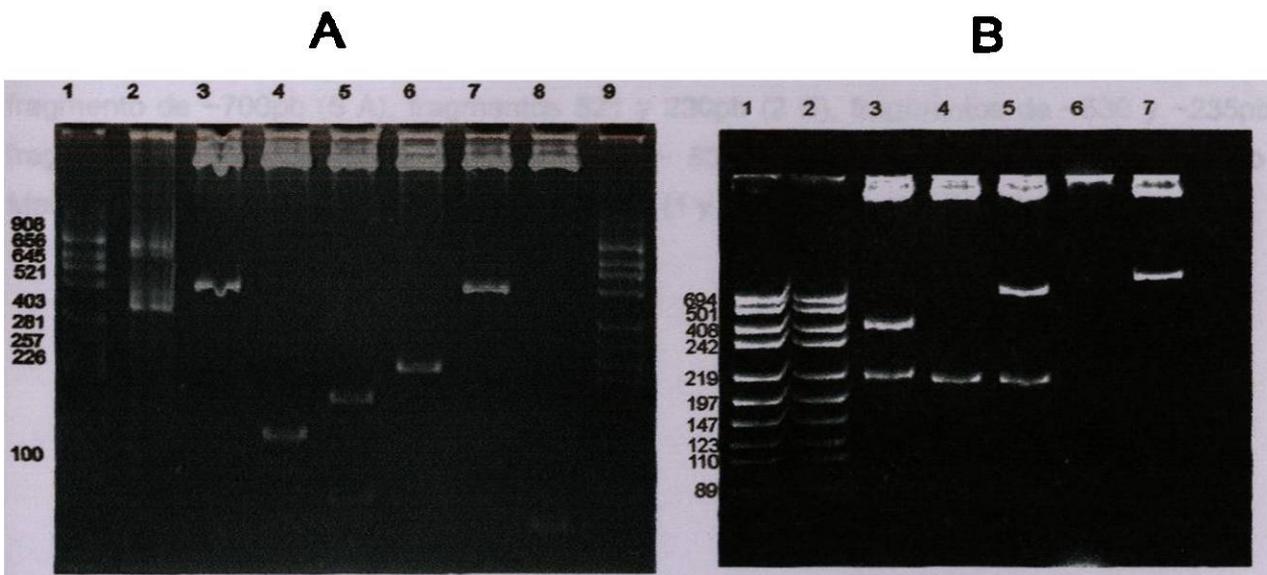
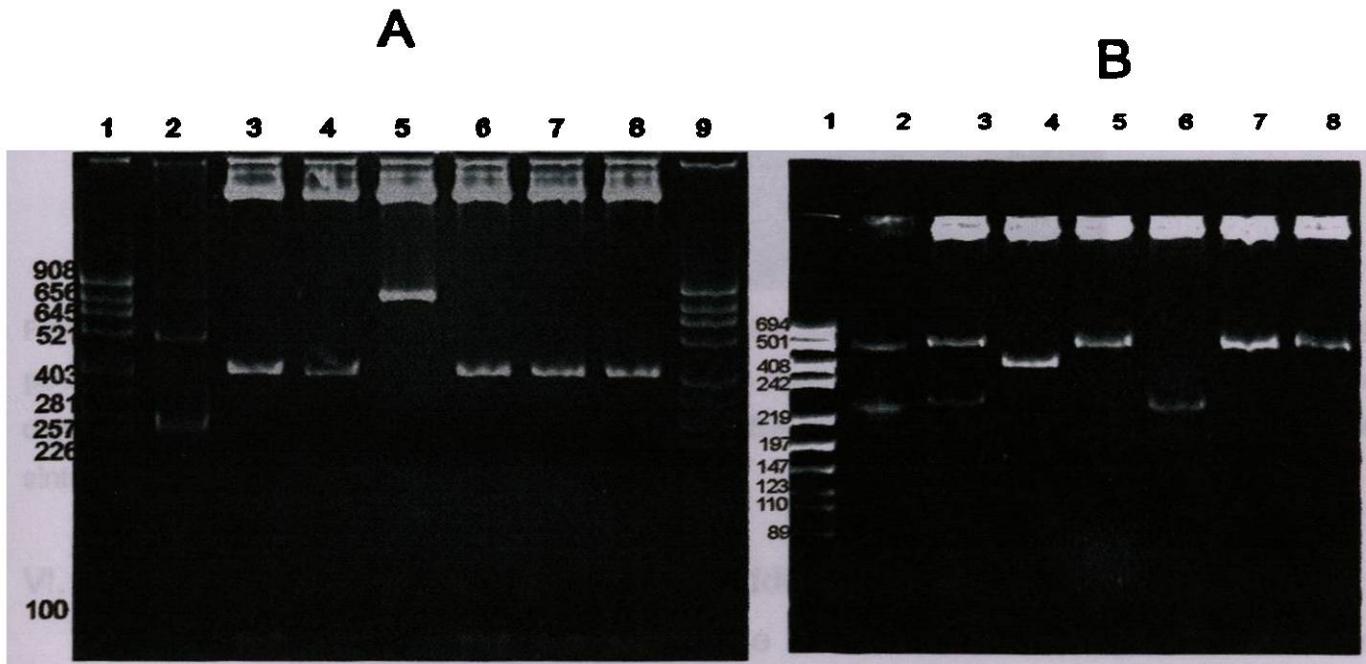
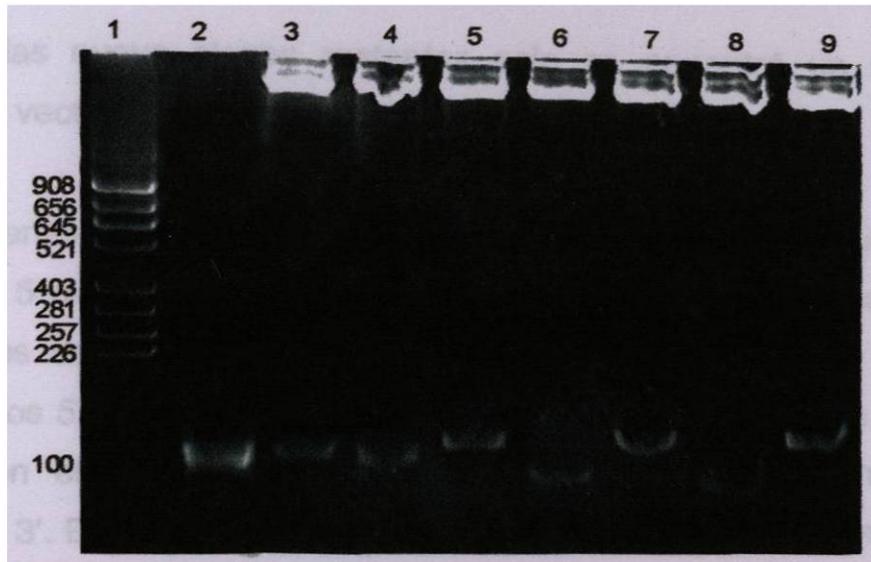


Figura 17. Análisis de las clonas positivas de LS1 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 6%. El DNA plasmídico de las clonas positivas de LS1 fue digerido con Eco R I. Los fragmentos liberados fueron: 460 y 700pb (2 A), fragmento de ~500pb (3 y 7 A), fragmento de ~150pb (4 A), fragmentos de ~180pb y de ~80pb (5 A), fragmento de ~226pb (6 A), fragmento < de 100pb, (8 A),

fragmentos de ~430 y ~219pb (3 B), fragmento de ~210pb (4 B), fragmentos de ~750 y ~210pb (5 B), amplificación inespecífica (6 B), fragmento de ~780pb (7 B), Marcadores de peso molecular pBR 322 + Alu I en los carriles (1 A y 9 A) y pUC 19 + Msp I (1 y 2 B).



**Figura 18. Análisis de las clonas positivas de LS2 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 6%. El DNA plasmídico fue digerido con Eco RI. Los fragmentos positivos liberados de la subunidad LS2 clonada fueron: fragmentos 500 y 230pb (2 A), fragmentos de ~410pb (3-4, 6-8 A), fragmento de ~700pb (5 A), fragmentos 521 y 230pb (2 B), fragmentos de ~530 y ~235pb (3 B), fragmento de ~430pb (4 B), fragmentos de ~ 530pb (5,7 y 8 B) fragmento de 230pb (6 B). Marcadores de peso molecular pBR 322 + Alu I (1 y 9 A) y pUC 19 + Msp I (1 B).**



**Figura 19.** Análisis de las clonas positivas del DNA sintético LS1 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 6%. El DNA plasmídico de las clonas positivas obtenidas del DNA sintético fueron digeridas con Eco R I. Marcador de peso molecular pBR 322 + Alu I (1), Producto de PCR del DNA sintético (2), insertos liberados de ~100pb (3-9).

#### VI.10 Determinación de la secuencia nucleotídica

En la Figura 20 se muestra un gel de secuenciación donde se obtuvieron las secuencias nucleotídicas en el secuenciador LI-COR IR2 semiautomático (Centro de Biotecnología Genómica IPN-Reynosa, Tamps). El secuenciador lee la secuencia en cada carril verticalmente iniciando de la parte inferior del gel y continuando hacia la parte superior. El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas se realizó identificando los dos sitios Eco RI del vector de clonación pCR 2.1, la secuencia del vector, los oligonucleótidos (5' y 3') y el inserto.

Para la LS1 se secuenciaron 7 clonas en total: dos clonas presentaron los sitios Eco RI con secuencias repetidas, una presentó al menos 7 repeticiones del oligonucleótido 3' y la otra 2 repeticiones del oligonucleótido 5'. En el resto de las clonas se encontró un solo sitio Eco RI, el fragmento del vector y el oligonucleótido 5'LS1.

Para la LS2 se secuenciaron: 11clonas en total. Dos clonas presentaron los sitios Eco RI y el fragmento de vector correspondiente. La secuencia de oligonucleótidos estaba repetida tanto para el oligonucleótido 5'LS2 como para el

3'LS1/2. En las nueve clonas restantes solo se encontró un sitio Eco RI, la secuencia del vector y los oligonucleótidos 5' LS2 repetidos.

Interesantemente, en la estrategia alterna del DNA sintético se secuenciaron 5 clonas en total. En 3 clonas se encontró la secuencia completa (99pb) con los dos sitios Eco RI, sus respectivos fragmentos del vector, los oligonucleótidos 5' LS1 y 3' LS1/2 y el inserto de 58pb. Las otras dos secuencias no presentaron el oligonucleótido 3'LS1/2 por lo que están incompletas con 80pb en el extremo 3'. El análisis de la secuencia nucleotídica de los insertos de las tres clonas secuenciadas mostraron una similitud del 100% con la esperada. Las descripción detallada de la secuencia nucleotídica se muestran en el Anexo I.

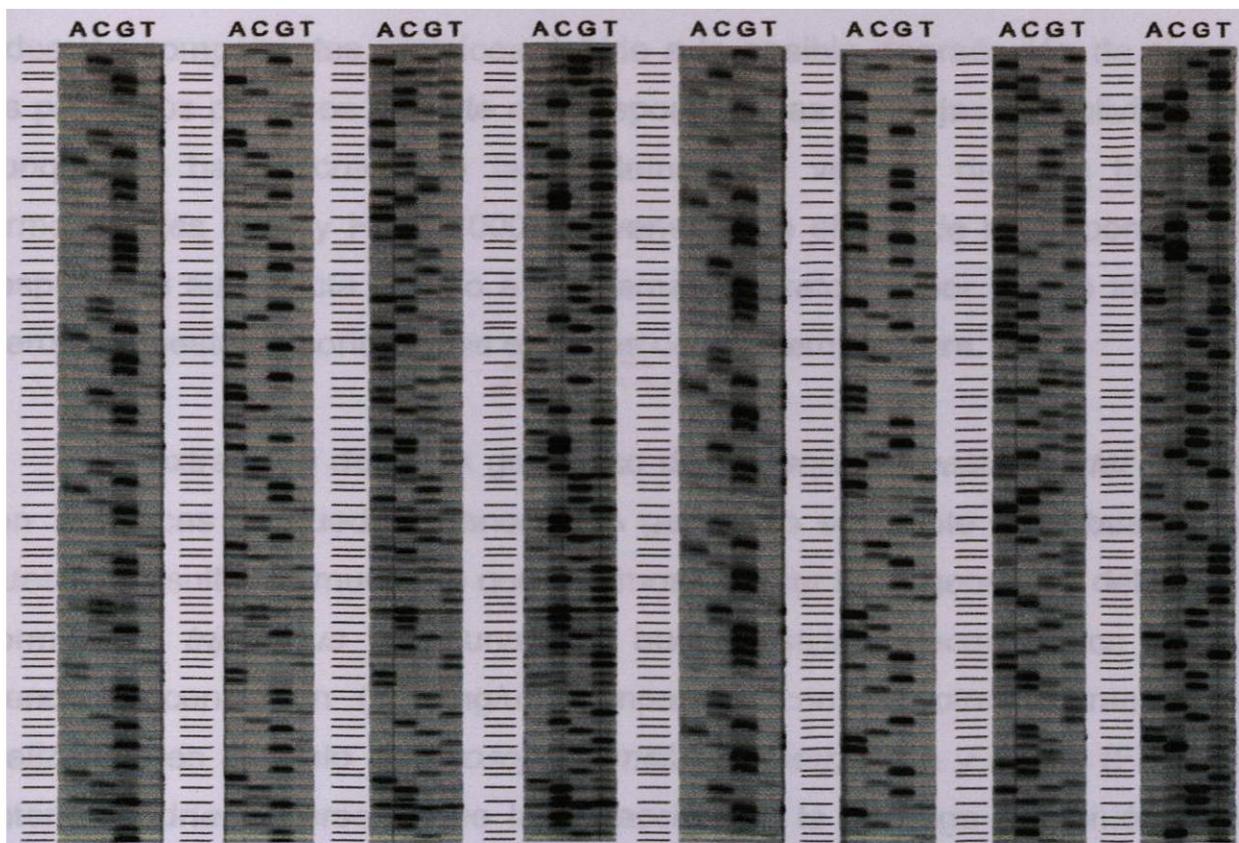


Figura 20. Gel de secuenciación de clonas positivas para LS1 y LS2. Se muestra un ejemplo del gel obtenido en la secuenciación de algunas clonas de las subunidades LS1 y LS2 donde se muestran los carriles para adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T).

## VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

deberían separarse

En base a los resultados obtenidos para la identificación de las hormigas colectadas en Santa Cruz de la Sierra, Bolivia, logramos la identificación específica según las claves taxonómicas descritas por Bolton 1994 y Ward 1985, 1991, 1993, 1999 correspondiente a la hormiga simbiote del árbol *Triplaris americana*, del género y especie: *Pseudomyrmex triplarinus*.

El veneno fue analizado encontrando los cuatro componentes proteicos más abundantes incluyendo las Mirmexinas que corresponden a los anteriormente descritos por Hink et al., en 1994 y Pan et al., en 2000. No se pudieron observar todos los componentes proteicos debido a la posible degradación de algunos de los productos proteicos durante el transporte de las esponjas de Bolivia a México. Aunque se ha descrito que las proteínas del veneno de esta hormiga son termoestables (Pan y Hink, 2000), el veneno fue eluido de las esponjas un mes después de su colecta debido a problemas migratorios por lo que las esponjas, fueron expuestas a condiciones externas de alta temperatura.  
*extrema?*

La extracción del DNA genómico de *Drosophila melanogaster* indica que con 3 moscas se puede obtener DNA genómico suficiente y de buena calidad. Nuestros resultados muestran que pudimos obtener DNA genómico del tejido de la hormiga *P. triplarinus* con una muy buena calidad electroforética aunque en menor concentración (~250ng/ul) comparado con las otras extracciones que realizamos en paralelo de *Drosophila melanogaster*, ratón y agave (Figura 8). Lo anterior podría deberse a que la extracción de la hormiga presentó problemas debido a la dureza de la cutícula de las hormigas.



Para el diseño de los oligonucleótidos específicos de las subunidades mayores de las mirmexinas se utilizó la tabla de uso de codones de *Drosophila melanogaster* ([www.kazusa.or.jp/codon/](http://www.kazusa.or.jp/codon/)) ya que se puede predecir una mayor similitud con el genoma de la hormiga. Para el DNA sintético de la estrategia alterna se utilizó la tabla de conversión de codones de *E. coli* para predecir la mejor expresión de la secuencia nucleotídica en un vector de expresión procariótico.

En la amplificación mediante PCR fue suficiente 1µl del DNA genómico (~250ng/ul) para obtener la amplificación de ambas subunidades (LS1 y LS2) las cuales mostraron en todos los casos fragmentos de mayor tamaño al esperado (Figura 12). Lo anterior podría deberse a la presencia de intrones en el DNA genómico de la hormiga *P. triplarinus*. La amplificación del DNA sintético se obtuvo exitosamente en todas las temperaturas del gradiente desde 60.1 a 70.2°C como se muestra en la Figura 11.

Los productos de amplificación fueron clonados en el vector pCR 2.1 TOPO (Invitrogen) el cual consta de: origen de replicación y terminación bacteriano, resistencia a Ampicilina y Kanamicina el sitio múltiple de clonación, y el gen LacZ que al interaccionar con X-Gal presenta el color azul en las colonias que no tienen el inserto mientras que las que tienen inserto se observaron de color blanco ya que interrumpe la secuencia del gen LacZ inhibiendo la reacción colorimétrica (Figura 14).

El aislamiento de DNA plasmídico por la técnica de lisis alcalina (Kraft, 1988, Lech, 1987, Maniatis, 1982) fue caracterizado mediante la visualización del DNA plasmídico en geles de agarosa y poliacrilamida. La concentración obtenida varió de 1 a 8µg totales aproximadamente en cada muestra. El vector de clonación tiene dos sitios Eco RI localizadas a los extremos del sitio múltiple de clonación donde



fueron insertados los productos de PCR (LS1, LS2 y LS1 sintético). No encontramos ningún problema al liberar los insertos mediante la digestión con Eco RI. Sin embargo, se encontraron fragmentos significativamente diferentes a los esperados en cuanto al peso molecular para ambas subunidades LS1 y LS2 (Figuras 16-18) lo que pensamos probablemente se debía a la presencia de intrones en el DNA genómico. En cambio, para el DNA sintético de la LS1 se encontraron tres clonas exactamente del tamaño esperado como se observa en la Figura 19.

Las secuencias nucleotídicas de los productos clonados se determinaron por la técnica descrita por Sanger, en 1977 en el secuenciador semiautomático LICOR. De la mayoría de las clonas secuenciadas se obtuvo la secuencia nucleotídica, aunque en algunas secuencias la calidad del gel de secuenciación no permitió la lectura automática por lo que la secuencia se leyó manualmente lo anterior probablemente fue debido a que la calidad del DNA no era la requerida.

En las 18 clonas secuenciadas del DNA genómico no encontramos la secuencia completa con los dos oligonucleótidos 5' y 3' en la misma secuencia, en la mayoría de los casos se encontraron repeticiones de los oligonucleótidos ya sea del 5' ó el 3'. Los problemas anteriores muy probablemente se deban a que el oligonucleótido 3'LS1/2 fue diseñado muy pequeño y presenta varias degeneraciones en la secuencia nucleotídica.

Para el DNA sintético se secuenciaron 5 clonas positivas de las cuales tres contenían la secuencia completa y las dos clonas restantes contenían una secuencia incompleta de 80 nucleótidos con ausencia del oligonucleótido 3'LS1/2 (menor peso molecular) que explica la diferente movilidad electroforética de las clonas positivas (Figura 19). El análisis de la secuencia nucleotídica de las tres clonas completa mostró exactamente la secuencia esperada de 99pb y la



traducción a secuencia aminoacídica (NCBI) confirmó que codifica para la subunidad mayor LS1 de las mirmexinas de la hormiga *P. triplarinus*.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el desarrollo de este trabajo nos permitieron:

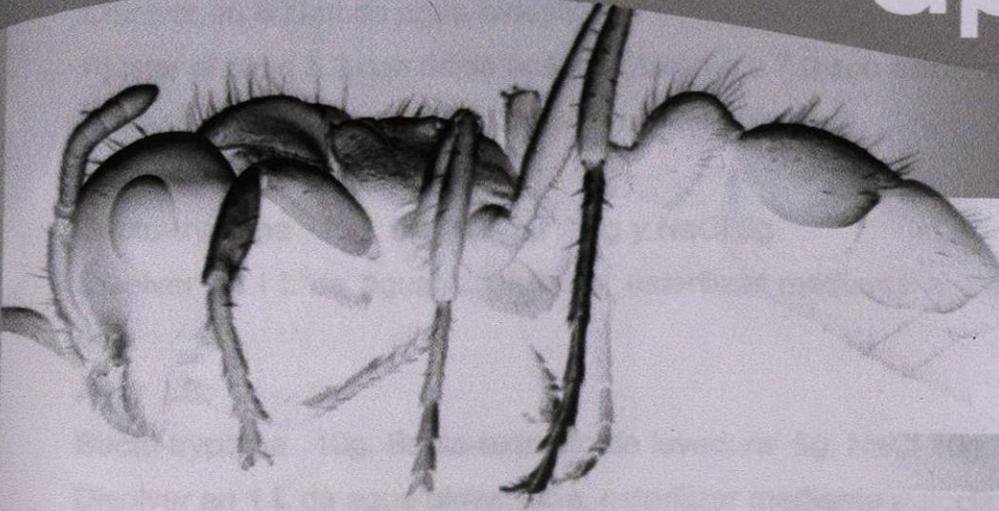
Se CONCLUSIONES

- ✓ Identificar taxonómicamente los ejemplares de *Pseudomyrmex triplarinus* colectados en Santa Cruz, Bolivia.   
 No era un objetivo -  
 No nuevo
- ✓ Verificar los componentes proteicos más abundantes del veneno de la hormiga *P. triplarinus*.   
 ? no nuevo.
- ✓ Obtener el DNA genómico de *P. triplarinus* con buena calidad electroforética.
- ✓ Amplificar mediante PCR las secuencias nucleotídicas que codifican para las subunidades mayores de las Mirmexinas LS1 y LS2.
- ✓ Clonar los fragmentos amplificados de las subunidades mayores LS1 y LS2.
- ✓ Determinar la secuencia nucleotídica de los productos de PCR clonados.
- ✓ Confirmar la secuencia nucleotídica de la subunidad LS1.

Los resultados obtenidos en el desarrollo del presente trabajo nos permitieron clonar la secuencia nucleotídica de la subunidad LS1 de las Mirmexinas para la producción a mediano plazo de los péptidos en condiciones controladas en el laboratorio que permitan caracterizar su actividad funcional en el tratamiento de Artritis Reumatoide.



# apéndice



abejas (aprox. 20m/caja)

Ampicilina 10 mg/ml (100X)

Ampicilina 1.0 g Disolver en 100ml de agua bidestilada.

Bromuro de Etilo 10mg/ml (EiBr)

EiBr 1g Disolver en 100ml de agua bidestilada por varias horas utilizando la plancha magnética hasta asegurar de que se haya disuelto totalmente. cubrir la solución con

## **IX.1 Preparación de soluciones**

### **Acetato de Sodio 3M (pH 5.2 y pH7.0):**

**Acetato de Sodio 408.1g**

**Disolver en 800ml de agua bidestilada**

**Ajustar el pH a 5.2 con ácido acético glacial o a 7.0 con ácido acético diluido.**

**Aforar a 1L , alicuotar y esterilizar mediante autoclave**

### **Agar blando:**

**Bacto-tryptona 10g, Bacto-agar 10g y NaCl 5g**

**Disolver en 1 L de agua bidestilada, esterilizar mediante autoclave y servir en viales de 3ml.**

### **Agar LB:**

**Bacto-tryptona 10g, Bacto-extracto de levadura 5g, NaCl 10g, Bacto-agar 15g**

**Disolver en 1 L de agua bidestilada, esterilizar mediante autoclave.**

**Dejar enfriar hasta 55°C, agregar el antibiótico requerido y servir en cajas de petri estériles (aprox. 20ml/caja)**

### **Ampicilina 10 mg/ml (100X):**

**Ampicilina 1.0 g Disolver en 100ml de agua bidestilada.**

### **Bromuro de Etidio 10mg/ml (EtBr):**

**EtBr 1g Disolver en 100ml 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.**

### **BSA (2mg/ml):**

**Pesar 0.08g en 40ml de NaCl 0.15M**

### **Buffer de muestra cargado 2X SDS:**

**100mM de Gris-HCl (pH 6.8), 200mM de DTT, 4% de SDS, 0.2% azul de Bromofenol y 20% de glicerol**

### **Buffer de muestra de Biorad (SIGMA) 2X:**

**0.66ml de Gris-HCl (pH 6.8), 1ml de SDS al 10%, 0.4ml de 2 mercaptoethanol, 0.002g de Brilliant Blue G y 2.4ml de glicerol**

**Cloruro de Calcio 100mM (0.1M):**

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.48 g, Disolver en 100ml de agua bidestilada y esterilizar mediante la autoclave y almacenar a 4°C.

**Cloruro de Magnesio MgCl<sub>2</sub> 1M :**

MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 20.33g, Disolver en 100ml de agua bidestilada y esterilizar mediante autoclave.

**Cloruro de Potasio KCl 1M:**

KCl 7.5g, Disolver en 100ml de agua bidestilada y esterilizar mediante autoclave

**Cloruro de Sodio NaCl 5M :**

NaCl 292.2g, Disolver en 800ml agua bidestilada , Aforar a 1L, alicuotar y esterilizar mediante autoclave.

**Dithiothreitol, Cleland's reagent DTT 1M:**

DTT 1.54g, Disolver en 10ml de acetato de sodio 0.01M (pH5.2)

Esterilizar mediante filtración, alicuotar y almacenar a -20°C 2ml de DTT

Disolver .309g de DTT en 2ml de acetato de sodio 0.01M (pH 5.2)

Esterilizar mediante filtración (con filtros Millipore), dividir en alícuotas de 0.5 ml (tubos Eppendorf) y almacenar a -20°C.

**Dodecyl 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%.

**HEPES 1M, pH 7. 5:**

HEPES 23.83g, Disolver en 100ml de agua bidestilada .

Ajustar el pH a 7.5 con KOH, almacenar a 4°C y esterilizar mediante autoclave.

**Medio LB:**

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

NaCl 10g, Disolver en 1L de agua bidestilada, esterilizar mediante autoclave.

**Medio SOC:**

Triptona 0.12g, Levadura 0.03g, NaCl 600ul, KCl 150ul, MgCl<sub>2</sub> 600ul, MgSO<sub>4</sub> 600ul, Glucosa 60ul, Aforar a 6ml con agua miliQ



**SDS 10%:**

Pesar 50g de SDS en 450ml de agua destilada, calentar a 68°C para mejor disolución de los componentes, ajustar el pH a 7.2 agregando unas gotas de HCl concentrado.

Ajustar el volumen a 500ml.

**Solución decolorante:**

Metanol 400ml	200ml
Ac acético 70ml	35ml
Aforar a 1L con agua bidestilada	Aforar a 500ml con agua bidestilada

**Solución de tefido de azul de Comassie Brilliant:**

Brilliant Blue 1.25g	0.625g
Methanol 227ml	113.5ml
Ac acético 46ml	23ml
Aforar a 500ml con agua bidestilada	Aforar a 250ml con agua bidestilada

**Sulfato de Magnesio MgSO4 1M:**

MgSO4 12.04g

Disolver en 100ml de agua bidestilada y esterilizar mediante autoclave.

**TBE 10 X:**

Tris Base 108 g , Acido Bórico 55 g, EDTA 0.5M pH8.0 40ml, Disolver en 800ml y aforar a 1L con agua bidestilada.

**Tris-HCl 1M, pH 7.6, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5:**

Gris-base 121.1g, Disolver en 800ml de agua bidestilada ,ajustar el pH con HCl concentrado y aforar a 1L. Permitir que la solución se encuentre a temperatura ambiente antes de realizar el ajuste final de pH y esterilizar mediante autoclave

pH	HCl concentrado
7.4	70ml
7.6	60ml
8.0	42ml

**Gris-Glicina, 5X:**

Pesar 15.1g de Gris-base, disolver en 500ml de H<sub>2</sub>O destilada, agregar 94g de Glicina, ajustar el pH a 8.3, agregar 50ml de SDS 10% y aforar a 1 litro con H<sub>2</sub>O destilada.

**Gris glicina 5%:**

Gris base 7.55g, Glicina 47g disolver en 400ml y se añade 25ml de SDS 10% y se afora a 500ml.

**Tris-HCl 1M, pH 7.6, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5:**

Gris base 121.1g, Disolver en 800ml de agua bidestilada, ajustar el pH con HCl concentrado y aforar a 1L. Permitir que la solución se encuentre a temperatura ambiente antes de realizar el ajuste final de pH y esterilizar mediante autoclave.

pH	HCl concentrado
7.4	70ml
7.6	60ml
8.0	42ml

**Tris-HCl pH 6.8, 1.5M:**

Pesar 36.33g de Gris base en 100ml de agua destilada, ajustar el pH con HCl concentrado y aforar a 200ml con agua destilada. Esterilizar mediante autoclave.

**Tris-HCl pH 8.8, 1.5M:**

Pesar 36.33g de Gris base en 100ml de agua destilada, ajustar el pH con HCl concentrado y aforar a 200ml con agua destilada. Esterilizar mediante autoclave.



## X. BIBLIOGRAFÍA

Altman, R.D., Schultz, D.R., Brown, H.E., and Collins, B.(1982).Pseudomyrmex-derived Venom polysaccharide in therapy of rheumatoid arthritis. 8th PanAmerican Cong. Rheumatol. (Abst.)

Altman, R.D., Schultz, D.R., Collins-Yudiskas, B., Aldrich, J., Arnold P. I. and Brown, H.E.(1984) The effects of a partially purified fraction of ant venom in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 27, 277-285.

Anderson, B., Lu, J., Edwards, K.E., Muzny, D.M., Gibbs, R.A., (1996). "Method for 96-Well M13 DNA Template Preparations for Large-Scale Sequencing." *BioTechniques.* 20:6, 1022-1027..

Astorga, G.P., (1992) Efecto del veneno de la hormiga en pacientes con artritis reumatoide VII Natl. Portuguese Congr. Rheumatology, Lisbon, Portugal.

Barrera, H., Ortiz, R., Rojas, A., Reséndez, D., (1993) Reacción en cadena de la polimerasa, *Ciencia y Desarrollo* Vol.     pp 50-60.

Beck, B. (1935) *Bee Venom Therapy.* Appleton-Century Crofts, New York.

Bolton, Barry (1994) *Identification guide to the Ant Genera of the World.* Cambridge: MA

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-252.

Burgos and Vargas, (1993) The effect of ant extract of the venom of *Pseudomyrmex triplarinus* in active Rheumatoid arthritis. Fifth Interscience World Conference on



inflammation, Antirheumatics Analgesics, Immunomodulators. Geneve(Switzerland)  
Palexpo 25-28 April

Chang, Y. H. and Bliven M. L., (1979) Anti-arthritic effects of bee venom. *Agents Actions* 9:205.

Dieminger, L., Schultz, D.R. and Arnold, P. I., (1979) Activation of the classical complement pathway in human serum by small oligosaccharide. *J. Immunol.* 23: 331-346.

Eiseman, J. L., Von Bredow J., And Alvares A. P. (1982) Effect of honeybee (*Apis mellifera*) venom on the course of adjuvant-induced arthritis and depression of drug metabolism in the rat. *Biochem Pharmacol* 31(6): 1139-1146.

Garfin D.E. (1990). One dimensional gel electrophoresis. *Methods in enzymology.* vol 182. Academic press.

Hink, W.F. Romstedt, K.J., Burke, J.W., Doskotch, R.W., and Feller, D.R. (1989) Inhibition of human platelet aggregation and secretion by ant venom and a compound insolated from venom iInflammation 13, 175-184.

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.

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

Kraft, R. J. Tardiff, K.S. Krauter and L.A. Leinwand (1988). Using mini-prep plasmid DNA for sequencing double stranded template with Sequenase. *BioTechniques* 6:544.

Landsbury, J., (1956) Quantitation of the activity of rheumatoid arthritis. 5. A method for the summation of the systemic indices of rheumatoid activity. *Am J Med Sci* 232:300-310.



Landsbury, J., (1958) Report of a three- year study on the systemic and articular indexes in rheumatoid arthritis: theoretical and clinical consideration. *Arthritis Rheum* 1:505-522.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lech, K. and R. Brent, (1987). Minipreps of plasmid DNA In F.M. Ausebel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl (Eds). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY. p. 1.6.1-1.6.4.

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.

Maniatis, T., E.T. Fritsch and J. Sambrook. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.

Mraz, C. (1982) Bee Venom for arthritis-an up-date. *Am. Bee J.* February:121.

Nochumson S. (1985), inventors; FMC Corporation, assignee. Polyacrylamide cross-linked with a polysaccharide resin as electrophoretic gel medium.US patent 4,542,200 Sep 17.

Pan, J. and Hink, W.F. (2000) Insolation and characterization of myrmexins, six Isoforms of venom proteins with anti-inflammatory activity from the tropical ant, *Pseudomyrmex triplarinus*. *Toxicon* 38, 1403-1413

Plowes R. J. N. and Patrock R. (2000) A field key to the ants (Hymenoptera, formicidae) found at brackenridge Field Laboratories, Austin Travis Country, Texas.



Pérez, E. Dibujo en acuarela *Pseudomyrmex triplarinus* – USB Universidad Simón Bolívar Laboratorio de Comportamiento Departamento de Biología de Organismos, Caracas Venezuela <http://atta.labb.usb.ve/Default.htm>

Roberts D. B, (1998) *Drosophila a practical approach*. Second Edition, Oxford University Press, United States, pp 198.

Ropes, M. S., Bennett, G. A., Cobbs, S., Jacox, R., and Jessar, R. A. (1958). Revision of diagnostic criteria for rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 18: 49-53.

Sambrook J. Fritsch E. F. Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, United States of America pp E.5 – 11.28.

Sanger, F.S. Nicklen y A. Coulson, (1977) DNA Sequencing with chain terminating inhibitor, *Proceedings of the National Academy of Science, Estados Unidos, Vol.74*, pp 5463-5467.

Schultz, D.R and Arnold, P. I. (1977) Venom of the *Pseudomyrmex* sp. Further characterization of two factors that affect human complement. *J. Immunol.* 119:1690-1699.

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., Arnold, P. I., de Medina, M., and Walling, J. (1979a) Isolation and partial characterization of a polysaccharide in ant venom (*Pseudomyrmex* sp.) that activates the classical complement pathway. *Mol. Immunol.* 16: 253-264.

Schultz, D.R and Arnold, P. I. (1984) Immunochemical and clinical studies of venom from ant *Pseudomyrmex* sp. In: Handbook of Natural Toxins, Vol.2, Insect Poisons, Allergens and Other Invertebrate Venoms, pp. 243-290 (TU. A. T., Ed). New York: Marcel Dekker.

Schmidt, J.O., Blum, M. S. and Overal, W. L. (1986) Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. *Toxicon* 29, 907-921.

Stuart, J.M., Brown, Cremer, M.A., Townes, A.S. and Kang, A.H. (1982) Type II collagen -induced arthritis in rats: passive transfer with serum and evidence that IgG anticollagen antibodies can cause arthritis. *J. Exp. Med.* 155, 1-16.

Sullivan, W., M. Ashburner, R. Scott Hawley (2000) *Drosophila* Protocols, Quick Genomic DNA Prep, Cold Spring Harbor Laboratory Pres., N.Y. pp 431.

Thompson, F. (1933) About bee venom. *Lancet* 1: 446-448.

Tu, A. T. (1977) Venoms of bees, hornets and wasps. In *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York. p. 504.

Vazquez L., Villalobos A. (1980) *Arthropoda parte II Mandibulata*. Publicaciones UNAM, pp 444-521.

Vick, J. A., Mehlman, B., Brooks, B., Philips, S. J., and Shipman, W. (1972) Effect of bee venom and melittin on plasma cortisol in the unanesthetized monkey. *Toxicon* 10:581-586.

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.

Wheeler, W. M. (1942) Studies of neotropical ant – plants and their ants. Harvard Bull. Mus. Comp. Zool. 90:41-65.

Winter, C.A., Risley, E.A., and Nuss, G.W. (1962) Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. Proc. Soc. Exptl. Biol. 111, 544-546



