INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PUBLICA

Centro Regional de Investigación en Salud Pública

Efecto biológico del bloqueo del gen de la Catepsina L, en ***Triatoma dimidiata,*** (genotipo-costa-pacífico)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL **GRADO** DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:

AMILCAR MENDOZA VAZQUEZ

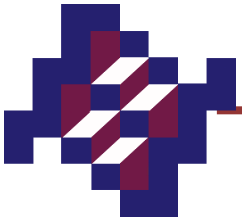
Director de Tesis:

DRA. TERESA LÓPEZ ORDÓÑEZ

CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

Asesor:

DRA. PAMELA PENNINGTON



TAPACHULA, CHIAPAS; MÉXICO. AGOSTO 2013

ÍNDICE

Dedicatoria ---------- 5

Agradecimientos ---------- 6

Resumen ---------- 7

Abstract ---------- 8

1. Introducción ---------- 9

1.1. Sistema digestivo y enzimas digestivas -------- 11
1.2. Bioquímica de la digestión en los triatominos -------- 12
1.3. Justificación ---------- 13
1.4. Hipótesis ---------- 14
1.5. Objetivos ---------- 14

2. Metodología ---------- 15

2.1. Caracterización del gen de Cat-L de *Triatoma dimidiata* 15
2.2. Elaboración de una molécula de ARN de doble cadena 17
2.3. Determinación de la expresión del gen de Cat-L como consecuencia de la interferencia del gen -------- 17
2.4. Impacto biológico de la ingesta de ARNdc en ninfas 2° 19
2.5. Análisis estadístico ---------- 19

3. Resultados ---------- 20

3.1. Análisis de secuencia ---------- 20
3.2. Clonación de ADNc de Cat-L ---------- 24
3.3. Colonia sincronizada de *T. dimidiata* ---------- 26
3.4. Producción in vitro de ARNdc ---------- 29
3.5. Inducción de ARNi mediante la inoculación de ARNdc de Cat-L 31
3.6. Evaluación de la inhibición de la expresión del gen de Cat-L 31
3.7. Análisis del efecto de la presencia de ARNdc sobre la ingesta de sangre en los insectos ---------- 35

4. Discusión ---------- 37
5. Conclusiones ---------- 38
6. Literatura consultada ---------- 39

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1 ---------- **22**

Alineamiento de la secuencia de Catepsina de *Triatoma dimidiata*

Figura 2 ---------- **24**

Plásmidos extraídos con inserto de ADNc de Cat-L de *T. dimidiata*

Figura 3 ---------- **26**

Tasa de ovipostura de la subcolonia de *T. dimidiata*

Figura 4 ---------- **27**

Porcentaje de eclosión de la subcolonia de *T. dimidiata*

Figura 5 ---------- **29**

Síntesis de ARN de doble cadena (ARNdc) específico del gen de Cat-L

Figura 6 ---------- **31**

Detección de ARNm del gen de Cat-L en el intestino de ninfas de *T. dimidiata*

Figura 7 ---------- **33**

Detección de ARN de Cat-L por RT-PCR a las 24 horas después de los diferentes tratamientos

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1 ---------- 28

Concentración de ARNdc sintetizado

DEDICATORIA

A DIOS

Por todas las grandes bendiciones que me has dado en todo momento y porque sé que tú me proteges y provees de todo lo necesario cada día de mi vida, muchas gracias por amarme y ser bueno conmigo y porque siempre estas a mi lado.

A mis PADRES

Por el infinito amor, por los sacrificios, por creer en mí y por los consejos y ánimo que siempre me han dado y que me han servido a lo largo de mi vida, muchas gracias. Dios los bendiga siempre. Los amo muchísimo.

A mí amada ESPOSA y mi PRINCESA

Por todo el apoyo que siempre me has brindado, por tus consejos y por estar conmigo en los buenos y no tan buenos momentos. Mi amor este logro también es tuyo. Princesa eres la luz que me incita día con día a salir adelante, llenas mí mundo con cada una de tus sonrisas. Bendiciones para las dos. Las amo infinitamente.

A mis HERMANOS

Les agradezco el apoyo moral y el ánimo que siempre me dieron para seguir adelante y no desertar. Muchas gracias. Dios los bendiga donde quiera que estén. Los quiero muchísimo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Teresa López Ordóñez

Investigadora en Ciencias Médicas "B" Centro Regional de Investigación en Salud Pública. Instituto Nacional de Salud Pública. Por todo el apoyo brindado, su tiempo, paciencia y los conocimientos necesarios para trabajar de la manera correcta y que me ayudaran en mi vida profesional. Muchas gracias.

A la Dra. Pamela Pennington

Investigadora y Catedrático de la Universidad Valle de Guatemala, por sus observaciones, comentarios y consejos que me proporciono.

A mis compañeros de laboratorio

QFB. José Domingo, QFB. Luis Alonso Escobar, por todo el apoyo y ánimo que me brindaron y por los comentarios que me ayudaron para realizar un mejor trabajo. Gracias.

A mis compañeros de clases

Daena, Fabiola, Abel, Carlos, Sury Antonio y Federico. Por ser parte de este recorrido, por sus consejos, comentarios, apoyo, y por la amistad que me brindaron. Se les quiere y estima mucho. Dios los bendiga en gran manera.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Por el apoyo brindado para estudiar el postgrado.

Efecto biológico del bloqueo del gen de la Catepsina L, en *Triatoma dimidiata*, genotipo costa-pacifico.

Resumen

Introducción. La enfermedad de Chagas es una afección parasitaria causada por *Trypanosoma cruzi*. La principal forma de transmisión es la vectorial a través de insectos de la subfamilia *Triatominae*. El método de control más utilizado, es el rociamiento intradomiciliar de insecticidas residuales, considerando las desventajas de este método, es necesario desarrollar nuevas estrategias para el control sostenido de estos insectos. En base a los abordajes genéticos propuestos por otros autores se evaluó el efecto de la inoculación oral de ARNdc de Catepsina L, una enzima intestinal, sobre el desarrollo en *Triatoma dimidiata*.

Metodología. Se alimentaron ninfas de segundo estadio con el ARNdc generado a partir del cDNA de la catepsina, un grupo de insectos control se alimentó con ARNdc de un gen no relacionado. Un conjunto de insectos fue disectados para aislar ARNm y determinar la expresión del gen. Otro conjunto de insectos se siguió por 25 días para evaluar el efecto biológico. Se analizaron los datos con R 2.11 y SPSS.

Resultados. Se estandarizaron las técnicas de síntesis ARN de doble cadena, Northern dot blot y la inoculación por vía oral del ARNi de Cat-L. Se obtuvieron dos clones con insertos de Cat-L. Se encontraron diferencias significativas en los días que tardaron en mudar las chinches tratadas con ARNi comparados con los grupos controles con valor de $p<0.05$. La diferencia encontrada en los días que tardaron las ninfas en mudar sugiere que Cat-L es un blanco de utilidad para diseñar un estrategia de control para estos insectos.

Conclusión. El bloqueo de la expresión del gen que codifica para la catepsina tipo L en *Triatoma dimidiata*, retrasa la muda de las ninfas.

Palabras claves. Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi, Triatoma dimidiata*, ARNi, Catepsina L, Efecto biológico.

Biological effect of blocking cathepsin L gene in *Triatoma dimidiata* Pacific-coast genotype.

Abstract

Chagas' disease is a parasitic disease caused by *Trypanosoma cruzi*. The main transmission route is through a vector from the subfamily *Triatominae*. The most used control method is indoor residual insecticide spraying. Due to the disadvantages of this method, it is necessary to develop new strategies for sustained control of these insects. Therefore, and based on the genetic approaches utilized by others, the effect of the oral inoculation of Cathepsin L (an intestinal enzyme) dsRNA on *Triatoma dimidiata* development was tested in this work.

Second instar nymphs were fed dsRNA, the treatment group was fed on Cathepsin-derived dsRNA, a control group was fed on dsRNA from a non-related gene. A group of insects was dissected; so RNA was isolated to determine the level of gene expression. Another group was monitored for 25 days for biological effect assessment. Data were analyzed with R 2.11 and SPSS.

Standardized techniques for dsRNA synthesis, Northern dot blot, and oral inoculation of RNAi were achieved. Two clones with inserts of Cat-L were obtained. Statistical significant differences were observed in the time that bugs take to molt between treated and control groups compared with p-value < 0.05. This difference suggests that Cat-L is a potential useful target to design a control strategy for these insects.

Keywords. Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, *Triatoma dimidiata*, RNAi, Cathepsin L, Biological effect.

1. Introducción

La enfermedad de Chagas es una afección parasitaria, sistémica, crónica, transmitida por vectores y causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*. Se estima que hay 11 millones de personas infectadas y 100 millones en riesgo de contraer la enfermedad en el continente (1). Se distribuye desde México hasta Argentina, aunque existen vectores y reservorios incluso en el sur de los Estados Unidos, y en la actualidad se han identificado casos en Canadá, EEUU, Australia y Japón, (1).

La principal forma de transmisión es la vectorial a través de triatominos, hemípteros (chinches), de la subfamilia *Triatominae*, con alimentación hematófaga, que actúan como vectores biológicos de *T. cruzi*, adquieren el parásito a través de la ingesta de sangre durante la picadura de personas o animales infectados y lo trasmiten a otras personas por medio de las deposiciones emitidas durante la picadura. Existen otras formas de infectarse en ausencia del vector, por ejemplo, transfusiones sanguíneas, infección congénita, trasplantes de órganos, ingestión de carne de animales parasitados o de alimentos contaminados con las heces de las chinches, (1).

Uno de los principales vectores es *Triatoma dimidiata* que es intra y peridomiciliar (2). En Chiapas *T. dimidiata* se encuentra domiciliada (3).

El método más utilizado para el control de este vector, es el rociamiento intradomiciliar de insecticidas residuales, pero existen problemas en la sostenibilidad de esta intervención, por la necesidad de repetir los rociados y también que los triatominos podrían desarrollar resistencia (4). Además se debe considerar el daño al medio ambiente u otros insectos, por lo cual es necesario desarrollar nuevas estrategias para el control sostenido de los vectores de la Enfermedad de Chagas.

Una de las estrategias alternas para el control de esta enfermedad son los abordajes genéticos, y en estos insectos en particular se ha mostrado que una vía práctica para la transformación genética es el uso de los simbiontes del tracto intestinal, estrategia conocida como paratransgénesis (5). En este sistema de transformación se aprovecha la dependencia de los triatominos por sus simbiontes

para usarlos como vehículos para la introducción de genes que interfieran con el desarrollo del parásito (6). Sin embargo esta estrategia no disminuye las poblaciones de insectos, por ello los estudios de paratransgénesis se han enfocado recientemente a la introducción de genes que impidan el desarrollo de los triatominos. Con este objetivo, una de las técnicas que podría aplicarse es la de ARN interferente (ARNi).

El ARNi son moléculas pequeñas de ARN de 20 a 25 nucleótidos que suprime la expresión de genes específicos mediante mecanismos conocidos generalmente como ribointerferencia o interferencia por ARN (7).

El sistema de ARNi consiste en la incorporación a la célula de una molécula de ARN de doble cadena llamada dsARN (Double-Stranded RNA), la cual puede ser introducida artificialmente. La molécula de dsRNA es reconocida en el citoplasma por las enzimas Dicer que la fragmenta en pequeñas moléculas de doble cadena, llamadas siRNA (Small Interfering RNA). Las moléculas pequeñas son incorporadas a un complejo multiproteico llamado RISC (RNAi Silencing Complex). Este complejo separa las dos hebras de la molécula quedándose una de las hebras incorporadas en el complejo, la cual es usada como molde para reconocer la molécula de ARNm. Si la complementariedad con la molécula de ARNm blanco es perfecta el complejo RISC degrada este ARNm, por el contrario, si la complementariedad no es perfecta el complejo RISC no degrada el ARNm pero evita la unión del ribosoma, por lo tanto de una u otra manera se produce el silenciamiento del gen complementario (8).

El silenciamiento génico post-transcripcional es un fenómeno biológico que ha sido observado en plantas, protozoarios, artrópodos, nemátodos y mamíferos. Tiene como principal función silenciar genes por reconocimiento de la secuencia nucleotídica especifica (9).

La primera aplicación de este fenómeno fue la producción de ARN de doble cadena (ARNdc) para estudiar la función de genes mediante experimentos de “knockdown” (10).

La inyección de ARNdc se ha utilizado en artrópodos vectores como garrapatas, *Anopheles spp* y *Rhodnius prolixus* para el silenciamiento génico específico con gran éxito (11, 12).

Recientemente ARNi ha sido utilizada en garrapatas y en *R. prolixus* para identificar genes importantes para la hematofagia y la transmisión de patógenos (13, 14, 15, 16).

En *R. prolixus*, se utilizó ARNi para inhibir la expresión de una hemoproteína de las glándulas salivales, la nitroforina. En este caso, el ARNdc se inoculó por inyección intratorácica y por vía oral (11).

1.1. Sistema digestivo y enzimas digestivas

El sistema digestivo de los triatominos está formado por cuatro regiones y en cada una existen proteínas que tienen funciones particulares. La primera región es el esófago donde se encuentran enzimas de la saliva que evitan la coagulación de la sangre (17). Enseguida el intestino anterior (estómago o buche) que contiene a las enzimas β-acetylglucosaminidasa, α-galactosidasa, α-glucosidasa, α-manosidasa, lisozima, amilasa (derivado de simbiontes), fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, apirasa (secretada por glándulas salivares) y aminopetidasas; en esta sección se lleva a cabo el almacenamiento de la sangre, eliminación de agua, almacenamiento intracelular de lípidos y residuos iónicos y la lisis de eritrocitos. En la región del intestino medio se lleva a cabo la digestión, síntesis, secreción y absorción de nutrientes y se encuentran enzimas como α-galactosidasa, α-glucosidasa, β-glucosidasa, α-manosidasa, β-manosidasa, lisozima, amilasa (derivado de simbiontes), fosfatasa alcalina, Catepsina D y B, aminopeptidasa, carboxipeptidasa A y, carboxipeptidasa B. Por último se encuentra el intestino grueso o posterior (que incluye al recto), donde se lleva a cabo la absorción de algunos nutrientes y la recuperación de agua y electrolitos (18).

Las enzimas lisosomales como las catepsinas las cuales son cisteínas proteasas, se encargan de catalizar el rompimiento de enlaces peptídicos y su sitio activo está formado principalmente por cisteína e histidina, son enzimas cuyo pH óptimo es ácido. Las primeras enzimas descritas fueron las catepsinas B, H, L y S (19).

La especificidad del sustrato se utiliza para identificar las enzimas de forma individual, por métodos bioquímicos, por ello en el pasado, la descripción del tipo de catepsinas encontrado en los sistemas biológicos era de fácil confusión, dado que más de una catepsina puede degradar el mismo sustrato (20).

Los insectos, con su gran capacidad de adaptación, han desarrollado sistemas enzimáticos adecuados a los entornos ecológicos en los que habitan, de manera que la cantidad y la calidad de enzimas en su tracto digestivo dependen de la composición química de la dieta ingerida (21).

1.2. Bioquímica de la digestión en los triatominos

La digestión se lleva a cabo tanto en el buche como en el intestino medio, sin embargo se dice que en el intestino se lleva a cabo la digestión verdadera, ya que ahí es donde se han encontrado las enzimas proteolíticas, mientras que en el buche se da la digestión de los carbohidratos (22).

El intestino anterior (buche) es donde se almacena el alimento ingerido, se deshidrata y dosifica. El líquido del alimento es absorbido en la hemolinfa y es secretado por los tubos de Malpighi. El intestino medio se conecta al intestino posterior (recto), donde se recuperan los iones y el agua (18).

La digestión de la sangre empieza con la hidrólisis de los eritrocitos en el buche por un factor hemolítico, que libera la hemoglobina. El alimento pasa al intestino medio donde la hemoglobina es hidrolizada (presumiblemente por las catepsinas) hasta péptidos pequeños, los cuales atraviesan la membrana extracelular y son digeridos por aminopeptidasas y algunas dipeptidasas y luego son absorbidos (22, 23, 24, 25).

Las enzimas caracterizadas bioquímicamente en el intestino de *R. prolixus* son: una catepsina de tipo B, una carboxipeptidasa B y una aminopeptidasa (26).

En un estudio donde se realizó la búsqueda de cisteína proteasa por amplificación de mensajeros, se identificó un ADN complementario (ADNc), cuyo análisis por comparación de secuencias la identificó como una Catepsina tipo L. El análisis filogenético la colocó dentro de un grupo de catepsinas L de insectos y otros artrópodos, claramente separado de las catepsinas B (27).

En estudios preliminares hechos por nuestro grupo, se ha detectado la presencia de fragmentos de ADN que amplifican con iniciadores de cisteína proteasas, lo que sugiere que el sistema digestivo de *T. dimidiata* contiene proteínas con funciones específicas, del tipo Catepsina L (Cat-L) que, presumiblemente, participan en la digestión de la sangre, por lo que se propuso bloquear el RNA mensajero de este gen, hipotetizando que la digestión se modificaría y eso podría interferir con el desarrollo y longevidad del insecto. Si estos eventos biológicos se llevaran a cabo, la técnica podría utilizarse como base para el diseño de un método de control para los vectores de la enfermedad de Chagas.

1.3. Justificación

La enfermedad de Chagas es una infección sistémica provocada por *T. cruzi*, el cual se trasmite principalmente por triatominos. Este padecimiento se encuentra presente en 21 países de América, con 56,000 nuevos casos anuales y 12, 000 muertes por año.

La enfermedad se considera un severo problema de salud, en áreas rurales de México, América Central y Sudamérica. Actualmente, se reportan casos en las ciudades de Latinoamérica, así como de EUA, Europa y Japón, debido a la migración de personas.

En Chiapas hay reportes de casos de pacientes con la Enfermedad de Chagas, a la vez que en algunas localidades de la región hay presencia del vector *T. dimidiata* el cual generalmente se encuentra dentro de las casas.

Como es bien sabido el principal método de control de este vector es el uso de insecticidas residuales, sin embargo, con el paso del tiempo se ha visto que esta estrategia se ha vuelto ineficaz, poco sostenible y los residuos pueden ser dañinos para el medio ambiente y otros insectos. Por lo cual es necesario desarrollar nuevas estrategias para el control sostenido de los vectores de la Enfermedad de Chagas.

En la actualidad una de las estrategias alternas para el control de los vectores de la enfermedad de Chagas son las modificaciones genéticas, como lo es, el uso de los simbiontes del tracto intestinal, estrategia conocida como paratransgénesis,

pero debido, a que esta estrategia no disminuye las poblaciones de insectos, los estudios se han enfocado recientemente a la introducción de genes que impidan el desarrollo de los triatominos.

Considerando la función de algunas proteínas que participan en la digestión en los triatominos, en especial la Catepsina L, se propone que al bloquear el RNA mensajero del gen de la Catepsina L, la digestión se modificaría y eso podría interferir con el desarrollo del insecto. Si estos eventos biológicos tienen lugar, la técnica podría utilizarse como base para el diseño de un método de control para los vectores de la enfermedad de Chagas.

Este estudio nos proporcionará información acerca de la eficiencia del silenciamiento de genes en el desarrollo de *T. dimidiata*, lo que podría dar lugar al diseño de una nueva estrategia a base ARNdc que tenga efectos sobre la longevidad de estos insectos.

1.4. Hipótesis

"El bloqueo de la expresión del gen de la Catepsina L, afecta el tiempo de la muda de *Triatoma dimidiata* (genotipo, costa pacífico)."

1.5. Objetivo general

Evaluar los efectos del bloqueo del gen de la Catepsina L del intestino en el desarrollo de *Triatoma dimidiata* (genotipo costa pacífico).

Objetivos específicos

- Caracterizar el gen de Catepsina L de *Triatoma dimidiata* y evaluar la metodología para elaborar una molécula de ARN de doble cadena.
- Medir el impacto biológico de la inhibición de expresión del gen de la Cat-L en el desarrollo de *T. dimidiata*.

2. Metodología

2.1. Caracterización del gen de Cat-L de *Triatoma dimidiata*

Insectos: Se utilizaron insectos provenientes de la colonia de *T. dimidiata* que se ha mantenido en el insectario del Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP), en Tapachula, Chiapas por más de 3 años sin introducción de ejemplares nuevos. La subpoblación de insectos para este trabajo se inició con 15 hembras y 5 machos colocados en frascos de Poli Etilén Tereftalato (PET) de 500 ml de capacidad, a una relación de tres hembras por cada macho, en condiciones ambientales constantes de laboratorio a 25±1ºC, 65% a 70% de humedad relativa, fotoperiodo de 10 horas luz y 14 horas de oscuridad, alimentadas cada 15 días con sangre de conejo (Nueva Zelanda) durante 15 minutos. Una vez que las hembras empezaron a ovipositar los huevos eran separados en frascos nuevos hasta eclosionar. Las ninfas fueron criadas en frascos de PET de 250ml, de boca ancha cubierta con una malla de tul, el cual contenía un pedazo de papel en forma de acordeón que les servía como refugio.

Aislamiento de ARN: Se disectarón chinches de 4° instar para obtener intestino, durante las disecciones el cuerpo de los insectos se mantuvieron en solución salina de fosfato (PBS) para mantener los tejidos hidratados. Las muestras se colocaron en TRIZOL® (Reagent Invitrogen) y el ARN se extrajo inmediatamente por el método recomendado por el fabricante. El ARN se resuspendió en 50µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), se trató con ADNasa I para eliminar el ADN como contaminante y se midieron las absorbancias a 260 y 280 nm para determinar la concentración en una dilución 1:50. El ARN restante se almacenó a -80°C hasta el momento de usarlo. Como una manera de verificar la calidad de la extracción del ARN se realizó un corrimiento electroforético de 10µl de las muestras extraídas en gel de agarosa al 1.5% con 2µl de bromuro de etidio 10mg/ml, a 100volts durante una hora y el gel fue observado en un trans-iluminador de luz UV. Se cuidó que el ARN extraído mostrara la banda típica del ARN ribosomal.

RT-PCR: El ADNc de doble cadena fue construido y amplificado a partir de 2µl de ARN total en un volumen de 50µl de reacción, para ello se utilizó el sistema SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen Cat. No. 10928-042). La reacción incluyó a las enzimas transcriptasa reversa y Taq polimerasa, 2.5mM $MgCl_2$, 10mM de dNTP´s, 10mM de cada primer: CO-5 (5´ACAGAATTCCARGGGCARTGYGGGTCGTGYTGG3´) y CO-6 (3´TTAAAGCTTCCARCTRTTYTTGACRATCCARTA5´) que sintetizan un fragmento de 500pb aproximadamente, correspondiente al gen de la Catepsina L de *Rhodnius prolixus* (López-Ordoñez *et al.,* 2001). Las condiciones de las reacciones: un ciclo de 30 minutos a 55°C y 2 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 44°C y 45 segundos a 68°C; posteriormente un ciclo de 5 minutos a 68°C y conservado a 4°C . Diez µl de cada reacción, incluyendo un control negativo sin ADN y un marcador de peso molecular conocido, se corrieron electroforéticamente a 100V por una hora, en gel de agarosa al 1,5% teñido con 2µl de bromuro de etidio 10mg/ml y se verificaron las bandas de interés buscando un producto de aproximadamente 500pb revelando el gel en un transilumniador de UV.

Purificación y secuenciación del producto de interés: El producto de la RT-PCR fue purificado con el kit QIAquick PCR purificación (QIAGEN), y posteriormente se envió a la unidad de secuenciación del IBT de la UNAM. Con la secuencia del fragmento en estudio se hizo un análisis de comparación con la base de datos del GeneBank utilizando el programa de BLASTX v.2.1.1 disponible en el portal de internet del NCBI de los Estados Unidos (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/).

Clonación: Los productos genéticos de amplificación fueron clonados en el vector TOPO TA Cloning® Invitrogen, PCR® 2.1, siguiendo las indicaciones del fabricante. Un clon que contenía un producto de 500pb fue purificado y secuenciado (primer CO5 y CO6) de la manera antes mencionada y fue utilizado para la síntesis del ARNdc.

2.2. Elaboración de una molécula de ARN de doble cadena

Síntesis de ARNdc in vitro: A partir de un clon positivo se extrajo el plásmido por medio del kit PlasmidPureLinkTMQuick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y se preparó un molde de ADNc que poseía la secuencia del promotor T7 en el extremo 5´de cada cadena, el cual fue utilizado para la síntesis de ARNdc. El ARNdc fue sintetizado por transcripción in vitro utilizando el kit Megascript RNAi (Ambion, Austin, TX) tanto para el gen de la Cat-L como para un gen no relacionado con la enzima y que se incluyó como control de funcionalidad en el kit. La calidad del producto se verificó con una electroforesis al 1% agarosa en TAE 1x con agua DEPC, a 100V por 45 minutos. Si se veía una sola banda, el ARNdc se purificaba y cuantificaba por espectrofotometría, en placas de 274 pozos con absorbancia a 260nm, la eficiencia del ARNdc se estimó con la fórmula:

$$A_{260} \times 50 \text{ (Factor de dilución)} \times 40 = \mu g/mL$$

El ARNdc se almacenó a -80ºC hasta su uso.

2.3. Determinación de la expresión del gen de Cat-L como consecuencia de la interferencia del gen

Alimentación de ninfas de 2º estadio (N2) con ARNdc: Se pesaron de manera individual 20 ninfas (N2) por cada grupo experimental, con 20 días de eclosión, y se colocaron en tubo de centrífuga de 50ml con un pedazo de papel en forma de acordeón para que pudieran moverse y a la vez utilizar como refugio. Cada grupo fue alimentado con su respectivo tratamiento: 1) con ARNdc de Cat-L; 2) ARNdc no relacionado (molde control en el Kit Megascript RNAi); 3) Agua DEPC. Los individuos fueron alimentados con sangre estéril de conejo por medio de campanas artificiales con capacidad de 500µl a 37ºC, se colocaron 200µl de sangre y se agregó una concentración final de 1µg/µl de cada ARNdc o su equivalente en agua DEPC. Una vez alimentados, cada chinche fue pesada para determinar el volumen de sangre y la cantidad de ARNdc ingerido, para ello los insectos fueron marcados en la parte dorsal con corrector blanco con una numeración del I al XX para diferenciarlos.

Obtención de ARN después de la alimentación: Las disecciones se realizaron a las 24 horas, a los 3 y 6 días después de la inoculación, para cada tiempo se disectarón 5 chinches de cada grupo, para obtener el ARN y evaluar la inhibición de la expresión del gen Cat-L. Por grupos fueron colocados 20 minutos a 4ºC para inmovilizarlos, luego se procedió a disectarlos con la ayuda de un estereoscopio; colocados sobre su dorso en caja Petri y sujetadas del abdomen con pinzas. Durante la disección se obtuvo el intestino de cada insecto. Los instrumentos de disección fueron debidamente esterilizados antes de ser utilizados. El ARN fue extraído inmediatamente por el método de TRIZOL® Reagent Invitrogen, como se describió anteriormente.

Marcado de la sonda: La sonda de ADN fue marcada con *Digoxigenin-11-dUTP (Roche)* mediante PCR. Se utilizaron los mismos iniciadores que se usaron para generar el ADNc correspondiente al sitio activo de la catepsina L. La reacción de PCR se produjo bajo los siguientes parámetros: primer 10mM de cada uno, 10mM dNTPs (dCTP, dGTP, y dATP, dTTP y dUTP-11-DIG), 1 unidad Taq polimerasa, 2.5.mM MgCl2, 10µl amortiguador PCR (20mM Tris-HCl, 50mM KCl), en un volumen final de 50µl de reacción con 1µl de ADNc molde. La reacción se sometió a un ciclo de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 45°C y 45 segundos a 72°C por ultimo un ciclo de 10 minutos a 72°C y a 4°C de manera infinita. El producto amplificado marcado con Digoxigenina (sonda) fue resuelto en agarosa al 1.5%, revelado en el transilumniador de luz UV y purificado utilizando el kit QIAquick PCR purification (QIAGEN), antes de ser utilizado en pruebas de hibridación.

Northern dot blot: Se depositaron 5µl de ARN del intestino de *T. dimidiata* en la membrana de nylon se dejó secar y se expuso a luz UV por 10 minutos. La membrana se pre-hibridó durante dos horas e hibridó durante una noche a 60°C con solución de prehibridación y la sonda marcada con Digoxigenina. Al siguiente día la membrana se retiró de la solución de pre-hibridación y se lavó. Posteriormente se realizó el bloqueo de la membrana. Se agregó una solución con

anticuerpos (Anti-Digoxigenina-Conjugado con AP) y se mantuvo en agitación por 30 minutos. Se agregó búfer de detección (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, pH 9.5) y se incubo por 20 minutos con agitación. Se incubo la membrana en 10ml de sustrato de color durante 16 horas y la reacción se detuvo con agua tridestilada.

RT-PCR de Cat-L a las 24 horas: Se realizó una RT-PCR con ARN extraído a las 24horas post-alimentación bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente, esto se hizo con el objetivo de verificar los resultados obtenidos por Northern dot blot.

2.4. Impacto biológico de la ingesta de ARNdc en ninfas de 2º estadio

Se pesaron y separaron 30 ninfas de segundo instar (N2) por cada grupo experimental, con 20 días de eclosión, peso promedio de 0.0034mg, y se colocaron en tubo de centrífuga de 50ml con un pedazo de papel en forma de acordeón para que pudieran moverse y a la vez utilizar como refugio. Cada grupo fue alimentado con su respectivo tratamiento: 1) con ARNdc de Cat-L; 2) ARNdc no relacionado; 3) Agua DEPC. Los individuos fueron alimentados con sangre estéril de conejo por medio de campanas artificiales con capacidad de 500µl a 37ºC, se colocaron 200µl de sangre y se agregó una concentración final de 1µg/µl de cada ARNdc o su equivalente en agua DEPC. Una vez alimentados, cada chinche fue pesado para determinar el volumen de sangre y la cantidad de ARNdc ingerido, para diferenciar los insectos se marcaron en la parte dorsal con corrector con una numeración del I al XXX. Estos individuos fueron monitoreados diariamente en relación a la muda o mortalidad, hasta 3 semanas después de alimentarlas. Los ensayos se hicieron por triplicado.

2.5. Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos fueron capturados en el programa Excel (Microsoft 2010), y se analizaron utilizando el paquete estadístico SPSS 20.0 y R 2.11. Se realizó una prueba de Mann-Whitney suma de rangos, $p<0.05$ para determinar la existencia de una diferencia significativa con respecto a la cantidad de sangre

ingerida entre los diferentes tratamientos. Los datos del experimento de efectos de muda de N2 a N3 se analizaron mediante una prueba de Modelo lineal generalizado con respuesta binomial para determinar la presencia de alguna variación significativa en relación al retraso en la muda. Un análisis similar se realizó para determinar la existencia de diferencia significativa en la mortalidad de los especímenes. Para analizar el número de días que tardaron los individuos en mudar o en morir se realizó una Prueba de t student con valor de $p<0.05$.

3. Resultados

3.1. Análisis de secuencia: La comparación del fragmento de 539pb amplificado a partir de *T. dimidiata* con las bases de datos disponibles en el NCBI mostró que tiene alta similitud con otras cisteínas proteasas de triatominos y de otros insectos (Figura 1):

No. Acceso	% de identidad
AAR12009.1 cathepsin B-like proteinase [Triatoma infestans]	67
AAT48984.1 cathepsin B-like proteinase [Triatoma sordida]	66
AAT48985.1 cathepsin B-like proteinase [Triatoma vitticeps]	64
XP_001842337.1 cathepsin L [Culex quinquefasciatus]	59
ENN79853.1 hypothetical protein partial [Dendroctonus ponderosae]	55

Las identidades mostradas corresponden a un fragmento de 94 aminoácidos, resultado de la traducción de la secuencia de nucleótidos en uno de los 6 marcos de lectura posibles. Las 5 homologías más altas corresponden a enzimas catepsinas de tres especies de triatominos diferentes, una de mosquito y una de escarabajo. Aunque las identidades más altas aparecen relacionadas a catepsinas de tipo B, con la secuencia que se tiene al momento no es posible determinar si la enzima es una catepsina L o B, ya que hacen falta los fragmentos cuya secuencia determina la identidad de una u otra (el motivo ERFNIN, típico de las catepsinas L, se localiza en la región alrededor de los aminoácidos 30-40). Sin embargo, es

posible localizar la cisteína 125 (numeración de la papaína por convención), que forma parte del sitio activo de las enzimas catepsinas B y L, así como las secuencias aledañas, muy conservadas en estas enzimas.

Figura 1. **Alineamiento de la secuencia de la catepsina de *Triatoma dimidiata* con otras catepsinas de insectos almacenadas en el Gene-Bank. Se señalan por subrayado los aminoácidos alrededor de la cisteína que forma parte del sitio activo de la enzima.**

```
AAL34984        89   NGKIYVPSNE--NLPKSVD----WRQRGAVTPVKDQGHCGSCWSFSATGSLEGQLFLKT-GRL-VSLSEQNLVDCSKTYG  160
AAR12009        70   LPKRQVSLDV--TLPKEFDARKHWPNCTSIAEIRDQGSCGSCWAFGAVEAMSDRICIHSNGKLQVHLSAENLVSCCDSCG  147
AAT48984        70   LPKRKVSLDV--TIPDEFDARKQWPNCPSITDIRDQGSCGSCWAFGAVEAMSDRICIHSNGKLQVHLSAENLVSCCDSCG  147
AAT48985        70   LPKRQVSVDV--TVPDEFDARKHWPNCSSITEIRDQGSCGSCWAFGAVEAMSDRICIHSNGKLQVHLSAENLLSCCDSCG  147
ENN79853       647   PPVHIHTLEG-vEIPSSFDSREQWPDCPTIREIRDQGSCGSCWAFGAVEVMSDRVCIHSKGKTHFRISADDLVSCCYTCG  725
XP_001842337    70   PPVMLHDLDEgdDLPENFDAREQWPNCPTIREIRDQGSCGSCWAFGAVEAMSDRICIHSKGKVHFRVSAEDLVSCCHTCG  149
10001            1   ------------------------------TLFKNPGQWGSCWAFGAVEAMYDRICIHRIGKLQVRLFAEKFVSCCDPCN   50

AAL34984       161   nSGCEGGLMNQAFQYVRdNKGIDTEASY-------PYEARE-------------------NNCRFKEDKVGG--------  206
AAR12009       148   -FGCDGGYPASAWDYWQ-NVGIVSGGNYGSKQGCQPYSIAPCEHHVPGPRPACSGE-GSTPDCRNQCDKRSGISYDKDLY  224
AAT48984       148   -YGCDGGFPASAWDYWQ-NEGIVSGGNYGSKQGCQPYSIAPCEHHVPGSRPACSGG-GDTPDCRNQCDEGSGISYDQDHY  224
AAT48985       148   -YGCLGGSAENAWEYWH-KFGIVSGGNYGSKQGCQPYSIAPCEHSIPGSRPACEGV-RDTPKCKKQCEKGYGIPYGDDLC  224
ENN79853       726   -LGCNGGFPGAAFHYWV-RKGIVSGGPYGSDQGCRPYEIAPCEHHVNGTRPACTGDdNKTPKCVQECEKGYNVPYEKDRN  803
XP_001842337   150   -FGCNGGFPGAAWSYWV-RKGLVSGGPYGSDQGCQPYAISPCEHHVNGTRGPCNGE-GKTPKCVKKCQASYNVPYAKDKF  226
10001           51   -IGCNGGYPSAAWEYCI-VFGIVSGGNYGFKLRCQPYSFADCDLHVHRKRT----------------------------   99
```

Accession	Description
AAL34984.1	cathepsine L-like cysteine protease [Rhodnius prolixus]
AAR12009.1	cathepsin B-like proteinase [Triatoma infestans]
AAT48984.1	cathepsin B-like proteinase [Triatoma sordida]
AAT48985.1	cathepsin B-like proteinase [Triatoma vitticeps]
ENN79853.1	hypothetical protein YQE_03673, partial [Dendroctonus ponderosae]
XP_001842337.1	cathepsin L [Culex quinquefasciatus] >gb|EDS42770.1| cathepsin L [Culex quinquefasciatus]
lcl|10001	**Triatoma dimidiata cathepsin**

3.2. Clonación de ADNc de Cat-L: Se tamizaron 10 clones de los cuales se obtuvieron 2 con insertos de Cat-L en el plásmido usado (Figura 2). El inserto fue secuenciado para su validación. Uno de estos clones fue utilizado para preparar el molde de ADNc, para ello se diseñaron nuevos primers que contienen en los extremos la secuencia del promotor T7, de manera que se obtuviera un molde de ADN que se pueda utilizar para anclar la RNA polimerasa de T7 en ambos sentidos y éste fue utilizado para la síntesis de ARNdc.

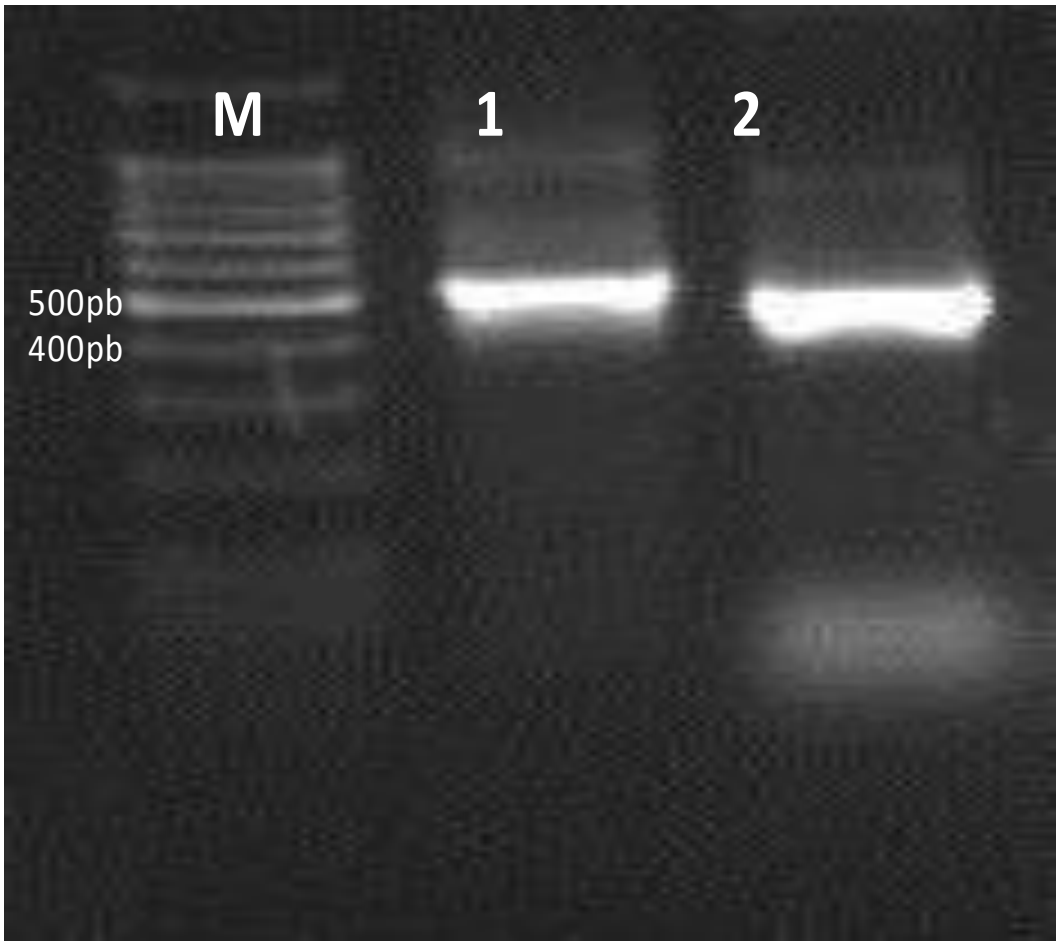


Figura No. 2 Plásmidos extraídos con inserto de ADNc de Cat-L de *T. dimidiata*. Gel de agarosa al 1.5% en TBE teñido con bromuro de etidio 10mg/ml. M: Marcador de peso molecular 100pb (promega). Pozo 1 y 2: plásmidos con insertos del ADNc de Cat-L, evidenciados por PCR con iniciadores específicos.

3.3. Colonia sincronizada de *Triatoma dimidiata*: La colonia de *T. dimidiata* destinada a este trabajo, se mantuvo en el insectario del CRISP por más de un año, observando una mayor producción de huevos entre los meses de abril a junio del 2012 (Figura 3). Así mismo se encontró que el mayor porcentaje de eclosión se encontró entre los meses de abril a diciembre de 2011 (Figura 4). De estos ejemplares se obtuvieron las ninfas sincronizadas durante el resto del año con lo que se logró tener ninfas de todas las etapas de desarrollo, incluyendo las de segundo estadio que fueron las utilizadas en el experimento.

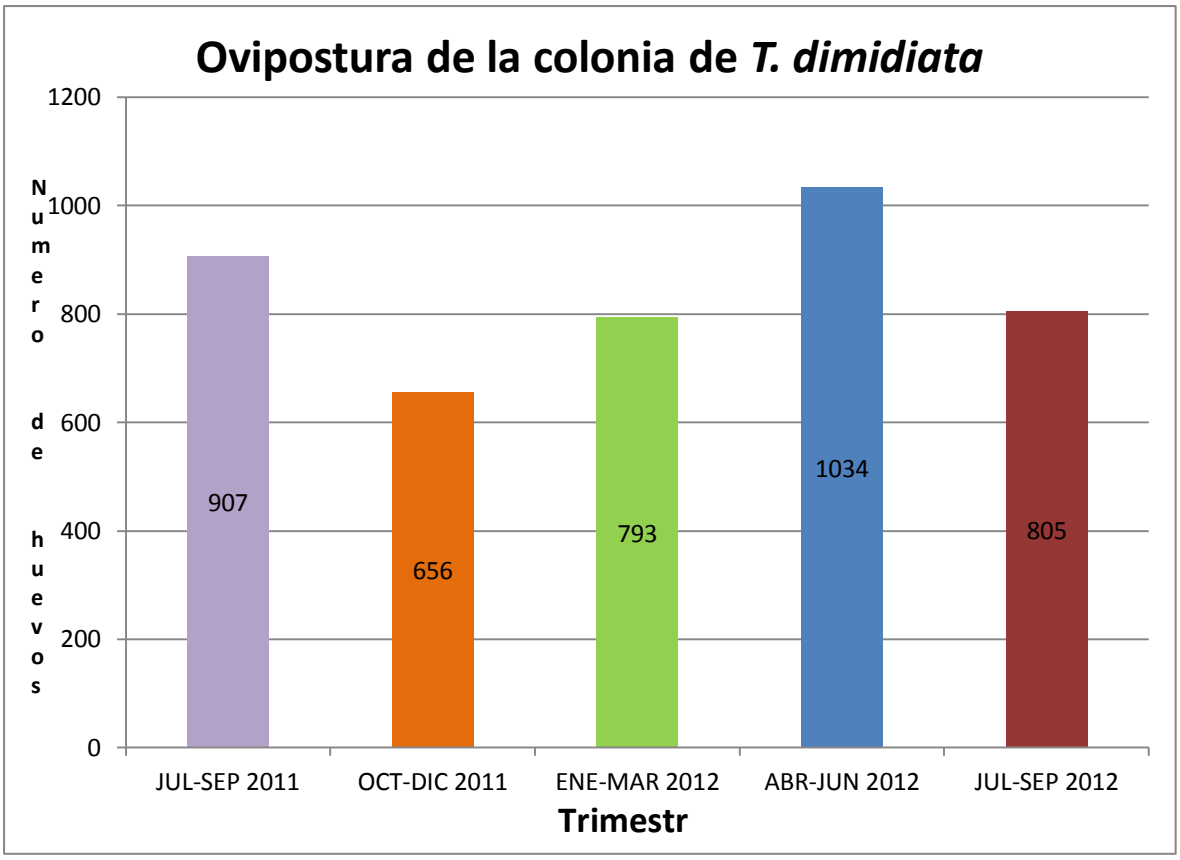


Figura No. 3 Tasa de ovipostura de la subcolonia de *T. dimidiata.* Se observa la tasa de producción de huevos de las hembras en transcurso de un año divido por trimestres y de donde se obtuvieron los especímenes para los diferentes ensayos.

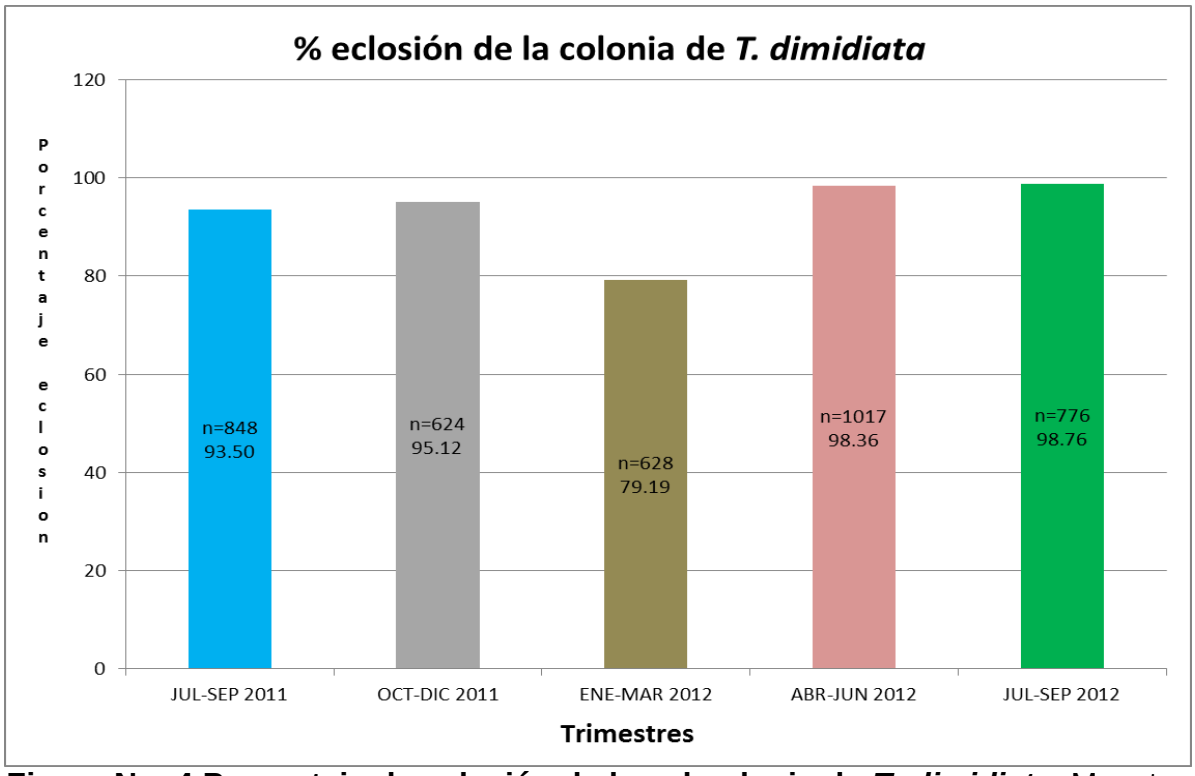


Figura No. 4 Porcentaje de eclosión de la subcolonia de *T. dimidiata*. Muestra el porcentaje de huevos que eclosionaron desde julio del 2011 hasta septiembre del 2012.

3.4. Producción in vitro de ARNdc: El ARNdc se sintetizó in vitro usando como molde los plásmidos, utilizando el kit Megascript RNAi (Ambion, Austin, TX). El cuadro 1, muestra las concentraciones y cantidades aproximadas de ARNdc producida por reacción, la cual osciló entre 50-127µg para ARNdc de Cat-L y de 61-165µg para el ARNdc no relacionado. Se utilizó una dosis de 1µg/µl de ARNdc para los experimentos. Las alícuotas fueron analizadas en un gel de agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de etidio, observando la banda de interés (Figura 5).

Cuadro 1.- Concentración de ARNdc producido en cada reacción tanto del ARNdc de Cat-L como de ARNdc no relacionado.

Concentración de las alicuotas de ARNdc de Cat-L y del gen control		
Alicuota de ARNdc	**Concetracion (µg/µL)**	**Cantidad total (µg/40µL)**
ARNdc Cat-L, 28/09/2012	1.748	69.92
ARNdc Cat-L, 05/10/2012	1.256	50.24
ARNdc Cat-L, 07/10/2012	3.193	127.72
ARNdc Control, 28/09/2012	2.274	90.96
ARNdc Control, 05/10/2012	1.531	61.24
ARNdc Control, 07/10/2012	4.138	165.52

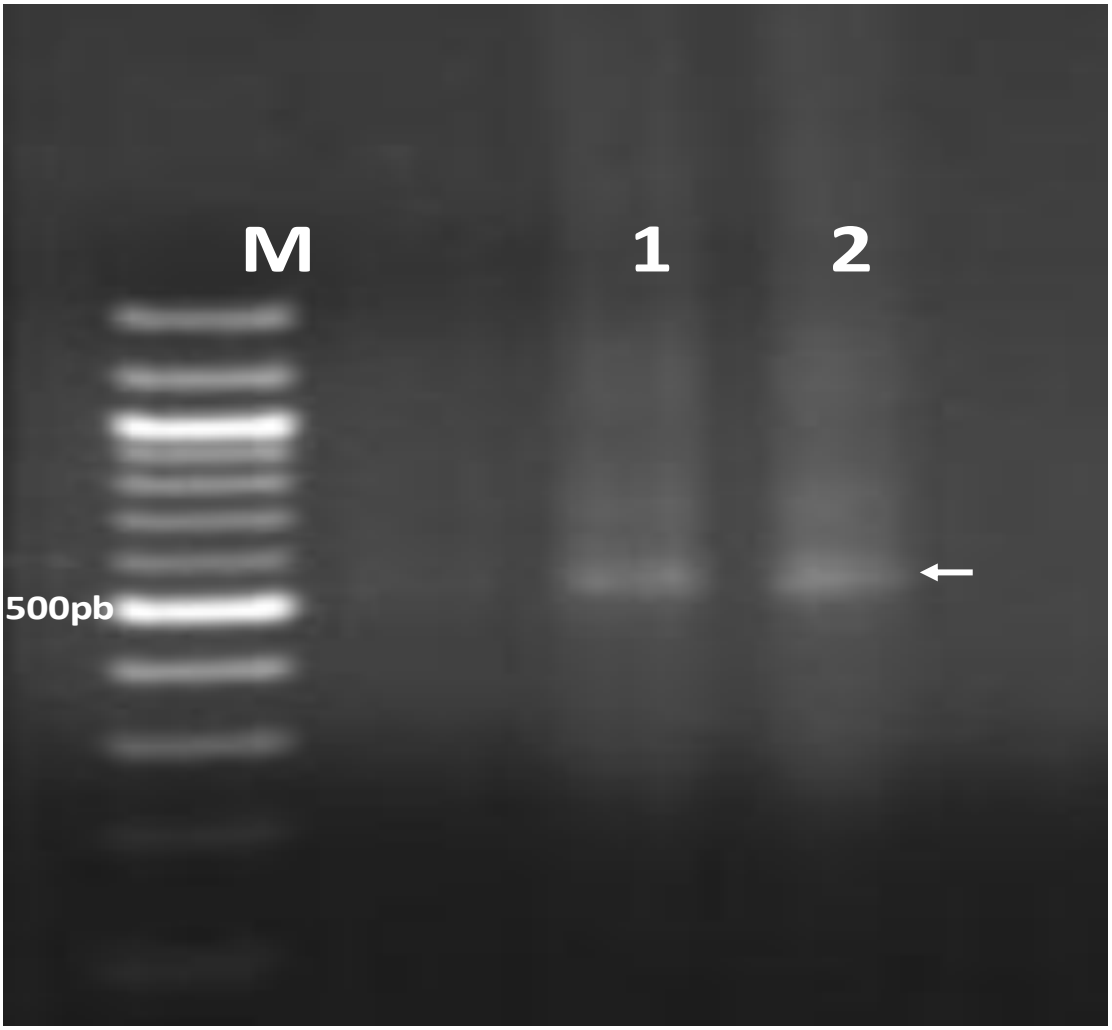


Figura No. 5 Síntesis de ARN de doble cadena (ARNdc) específico del gen de Cat-L. Gel de agarosa al 1.5% en TBE teñido con bromuro de etidio 10mg/ml. M: Marcador de peso molecular 100pb (promega). Pozo 1: ARN de doble cadena de Cat-L. 2: ARN de doble cadena no relacionado.

3.5. Inducción de ARNi mediante la inoculación de ARNdc de Cat-L: En el ensayo se utilizaron especímenes de segundo instar con 20 días de haber eclosionado y sin ser alimentadas. Para la inoculación se produjo ARNdc in vitro y se mezcló con sangre de conejo estéril, para alimentar a las ninfas. Cada individuo ingirió un volumen aproximado de entre 10 y 12µl de sangre con 1µg/µl de ARNdc, tanto para ARNdc de Cat-L, ARNdc no relacionado y sangre normal.

3.6. Evaluación de la inhibición de la expresión del gen de la Cat-L. Como resultado de la determinación de la presencia de ARNm en muestras de las chinches que se alimentaron con ARNdc, se observa que hay mayor expresión del gen de Cat-L en el grupo de insectos que fueron alimentados con sangre y ARNdc de Cat-L, tanto a las 24 horas como a los 3 y 6 días post-alimentación, aunque también podemos observar una disminución gradual a medida que transcurre el tiempo después de la alimentación. Asimismo, se observa que en el grupo alimentado con ARNdc no relacionado hay expresión del gen a las 24horas pero no así a los 3 y 6 días. Para el grupo de insectos que se alimentaron con sangre y Agua DEPC (sin ARN), se aprecia que a los 3 días hay mayor expresión en comparación con las 24 horas y 6 días (Figura 6). Estos ensayos fueron realizados por triplicado para corroborar la identidad de las muestras y la consistencia de los resultados.

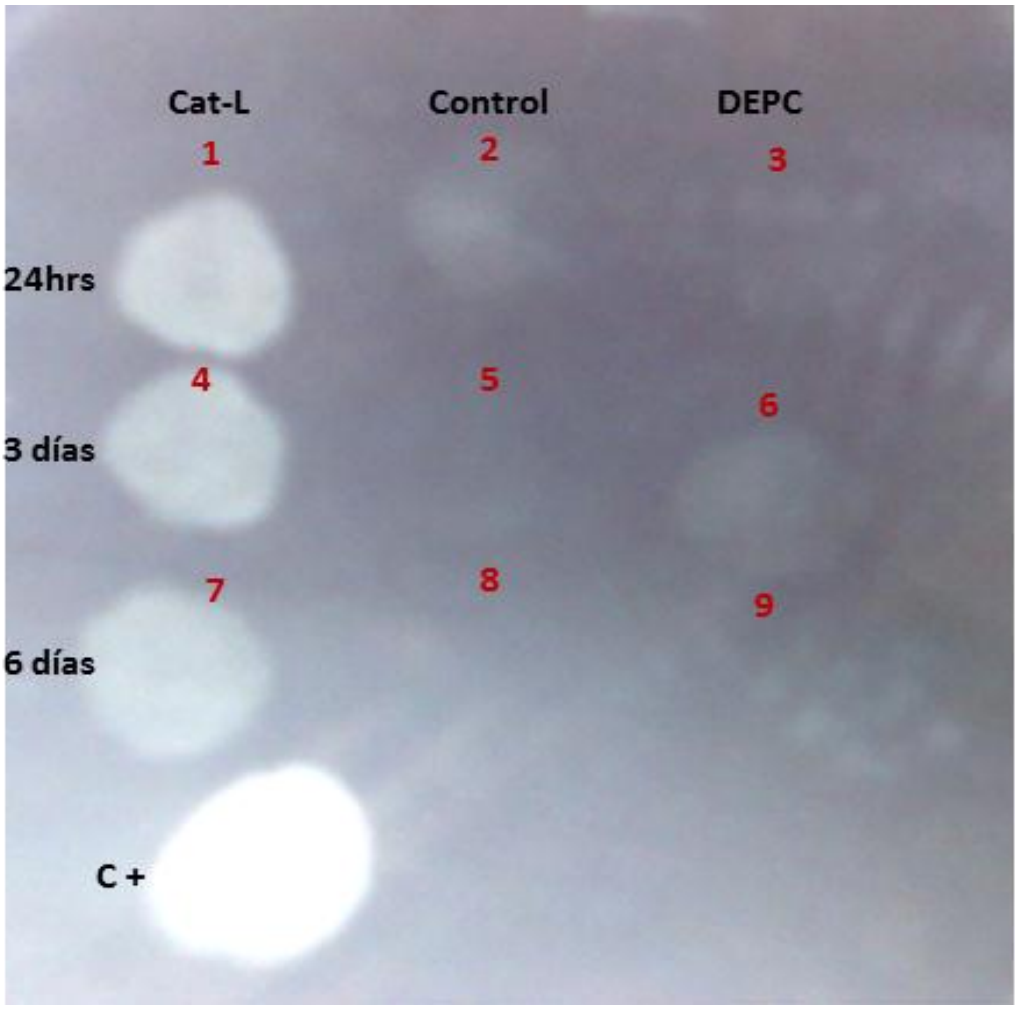


Figura No. 6 Detección de ARNm del gen de Cat-L en el intestino de ninfas de *T. dimidiata* por Northern dot blot en membrana de nylon. Se evaluó la presencia de ARN de Cat-L en las chinches sometidas a los diferentes tratamientos y a diferentes tiempos después de la alimentación. C+: Control positivo (ADNc de Cat-L). 1; ARN Cat-L 24 hrs. 2: ARN no relacionado 24hrs. 3: Sangre normal 24 hrs. 4: ARN Cat-L 3 días. 5: ARN no relacionado 3 días. 6: Sangre normal 3 días. 7: ARN Cat-L 6 días. 8: ARN no relacionado 6 días. 9: Sangre normal 6 días.

Amplificación del ARN de Cat-L a las 24 horas: Para complementar los resultados del ensayo de Northern dot blot, y verificar la presencia del ARNm de la Cat-L, se corrió un ensayo de RT- PCR de las muestras de ARN extraídas a las 24horas en los diferentes tratamientos. Como resultados se tiene que efectivamente el ARNm está presente en los tres grupos pero en distinta proporción (Figura 7), tal como se mostró por la técnica de Northern dot blot.

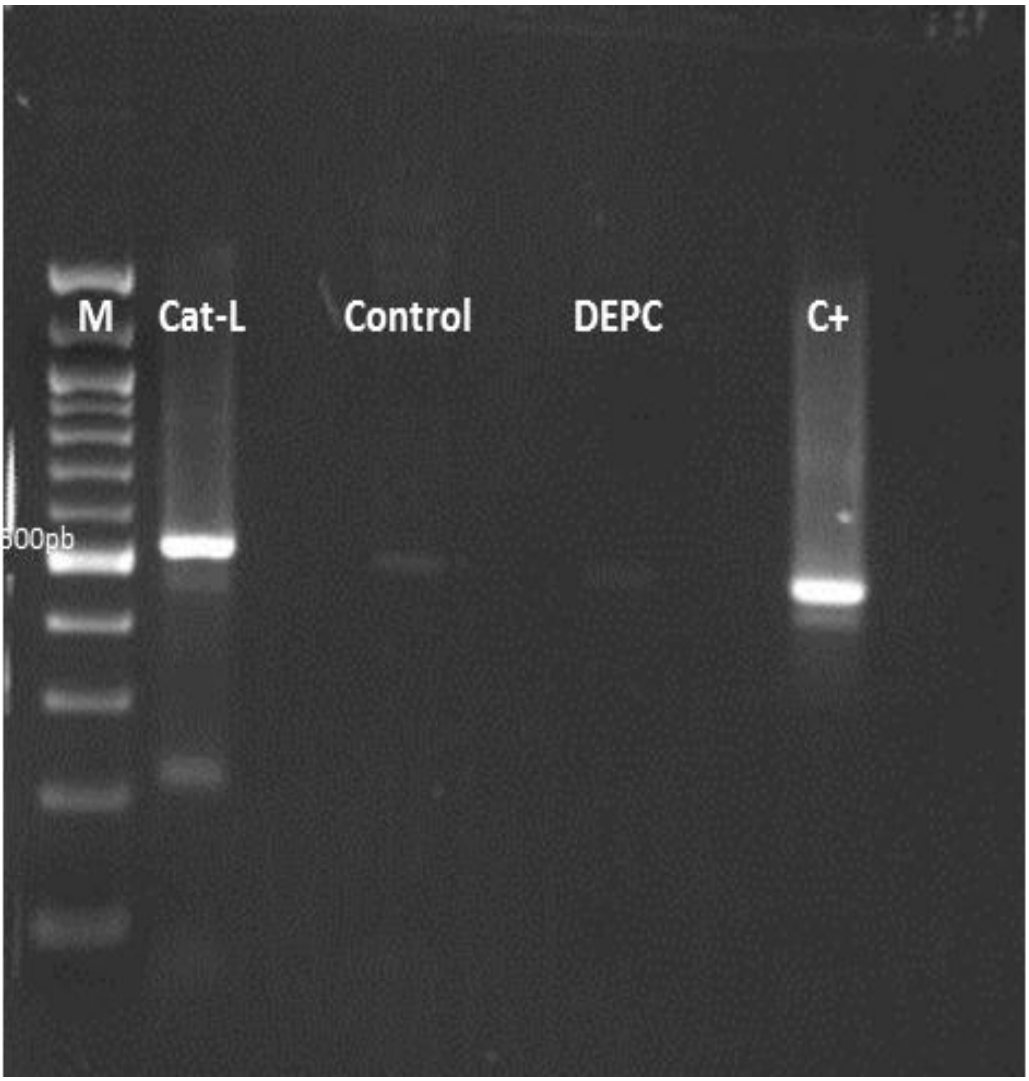


Figura No. 7 Detección de ARN de Cat-L por RT-PCR a las 24 horas después de los diferentes tratamientos. M: Marcador de peso molecular 100pb (promega). Cat-L: ARNdc del gen de la Catepsina L. Control: ARNdc no relacionado. DEPC: ARN de chinches alimentadas con sangre normal. C+: ADNc como control positivo.

3.7. Análisis del efecto de la presencia de ARNdc sobre la ingesta de sangre en los insectos.

Se trabajaron dos grupos experimentales de insectos: 1) los destinados a la extracción de ARN para verificar la alteración en la expresión del gen Cat-L por Northern dot blot y por RT-PCR; y 2) los destinados a comprobar el efecto de la ingestión del ARNdc sobre el desarrollo del insecto.

Se determinó la presencia de diferencias significativas entre los pesos de la ingesta de sangre en ambos grupos experimentales. En el grupo 1, con ninfas N2 para la obtención de ARN, los individuos ingirieron un promedio de 12.1 ± 0.18 µg (media ± desviación estándar) de sangre sin ARNdc; 11.80 ± 0.17 µg de sangre con ARNdc no relacionado y 11.78 ± 0.16 µg de sangre con ARNdc Cat-L. Al comparar los tres tratamientos, sangre sin ARNdc (n=30), ARNdc no relacionado (n=30) y el ARNdc de Cat-L (n=30) se encontró diferencia significativa en la cantidad de sangre ingerida (prueba de Mann-Whitney suma de rangos, $p<0.05$) en los grupos tratados con ARNdc en comparación con el grupo que no recibió ARNdc, las comparaciones se hicieron por pares; comparando los tratamientos (sangre sin ARNdc con ARNdc no relacionado, se obtuvo un valor de $p=0.0002$); (sangre sin ARNdc con ARNdc de Cat-L valor de $p=0.0004$) y (ARNdc no relacionado con ARNdc Cat-L valor de $p=0.85$).

Los individuos del grupo experimental 2, ingirieron un promedio de 12.05 ± 0.1 µg (media ± desviación estándar) sangre sin ARNdc; 11.90 ± 0.09 µg ARNdc no relacionado y 11.90 ± 0.19 µg ARNdc Cat-L. La ingesta de sangre de los individuos de los tres grupos mostro diferencia significativa entre los tratamientos de sangre sin a ARNdc con respecto a los tratamiento de sangre con ARNdc ($p<0.05$). Las comparaciones se hicieron por pares; comparando los tratamientos (sangre sin ARNdc con ARNdc no relacionado, se obtuvo un valor de $p=0.0007$); (sangre sin ARNdc con ARNdc de Cat-L valor de $p=0.006$) y (ARNdc no relacionado con ARNdc Cat-L valor de $p=0.82$).

Estos resultados muestran que la alimentación de los individuos se ve afectada al agregar o no ARNdc en la sangre.

Efecto de la ingesta del ARNdc de Cat-L en el desarrollo de ninfas de 2° instar.

Los datos estadísticos muestran que no existen diferencias entre los grupos, con respecto al número total de individuos que mudaron y que murieron con un valor de p=0.39 (Modelo lineal generalizado con respuesta binomial).

Sin embargo los datos muestran diferencias significativas en el número de días que tardaron los individuos en mudar de N2 a N3, durante las tres semanas de seguimiento. Esta diferencia ocurre al comparar el tratamiento de sangre con ARNdc de Cat-L, con respecto a los tratamientos de sangre sin ARNdc y ARNdc no relacionado (Prueba de t student con valor de $p<0.05$). Los individuos alimentados con ARNdc Cat-L tardaron aproximadamente 15 días para mudar en comparación a los que se alimentaron con ARNdc no relacionado que tardaron 11 días, comparado con grupo alimentado que no recibió ARNdc, el cual tardó 10 días. Comparando los dos grupos controles no encontramos diferencias significativa en los días en que mudaron (p=0.81).

Así mismo se encontraron diferencias significativas en la mortalidad entre el grupo tratado con ARNdc Cat-L en comparación con los grupos controles ($p<0.05$). Encontrando que los individuos del grupo alimentado con ARNdc Cat-L empezaron a morir a los 9 días, los individuos del grupo tratado con ARNdc no relacionado mostraron mortalidad a los 12.67 días y el grupo sin tratamiento a los 13 días.

Por lo tanto, los datos sugieren que el tratamiento con ARNdc Cat-L puede tener efectos deletéreos en el desarrollo de los insectos.

4. Discusión

El control de los insectos vectores de la enfermedad de Chagas ha sido un problema de Salud pública que afecta a la población de manera constante. Por ello este estudio se enfocó en los ensayos preliminares de evaluación de una nueva estrategia de control basada en técnicas genéticas, en este caso el objetivo fue inducir interferencia de ARN en la expresión del gen Cat-L de *Triatoma dimidiata*. Se utilizaron ninfas de segundo instar con 20 días de eclosión y sin alimentar, la dosis de ARNdc utilizada fue de 1µg/µL para optimizar el material biológico y el tiempo, ya que estudios en *R. prolixus* demuestran que a mayor concentración los insectos no se alimentan.

El ARNdc fue inoculado por vía oral con la ayuda de un alimentador artificial y como coadyuvante se utilizó sangre de conejo estéril (11). Los análisis se realizaron con grupos de individuos en lugar de un solo individuo, tomando en cuenta la baja cantidad de material disponible para medir la expresión del gen.

El proceso que conlleva aplicar la técnica de ARN interferente y la metodología para detectar ARNm (Northern dot-blot) no son muy complejas, sin embargo debemos tener muchos cuidados en el manejo de todo el material a utilizar, porque se sabe que el ARN es muy poco estable y puede ser degrado muy fácilmente, este fue uno de los aspectos que dificultó un poco en el momento de hacer la estandarización de estas técnicas en el Laboratorio aunado a que era la primera vez que se realizaban en el grupo de trabajo.

El Kit de Megascript RNAi es bastante sencillo y con la práctica se obtiene mayor cantidad de ARNdc y de mejor calidad. La técnica de Northern Dot Blot, fue estandarizada correctamente, y con ella se pudo detectar el gen de Cat-L, a las 24hrs, y a los 3 y 6 días post alimentación en los diferentes grupos experimentales y lo cual fue corroborado con una RT-PCR con ARN extraído a las 24hrs después de alimentar. Sin embargo se sugiere la necesidad de tratar el intestino con ARNasaIII para eliminar el ARNdc ingerido y poder cuantificar el ARNm. También consideramos que la expresión de Cat-L parece estar activada en distintos tiempos en los controles, lo cual hace pensar la existencia de alguna modulación de la expresión de Cat-L en respuesta a ingesta de ARNdc.

Se logró la clonación y caracterización de un fragmento de 539pb con alta similitud con otras cisteínas proteasas de triatominos y de otros insectos. Las identidades corresponden a un fragmento de 94 aminoácidos. Las 3 homologías con mayor similitud corresponden a secuencias relacionadas con catepsinas B de insectos de la misma familia y género (*T. infestans, T. sordida y T. vitticeps*), pero no es posible determinar si la enzima es una catepsina L o B, ya que, tomando en cuenta la secuencia de la catepsina L de *Rhodnius prolixus*, el fragmento amplificado abarca de los aminoácidos 100 a 200 aproximadamente, mientras que el sitio del motivo ERFNIN característico de las catepsinas L, se localiza en la posición 30-50. Se localizó la cisteína 125, que forma parte del sitio activo de las enzimas catepsinas B y L, así como las secuencias aledañas, muy conservadas en estas enzimas.

Las catepsinas son enzimas con actividades proteolíticas y que tienen funciones diversas en el tracto digestivo principalmente en el intestino medio de los triatominos, que presumiblemente ayudan a la digestión de la sangre y asi obtener sus nutrientes (22), esto ayuda a que los insectos continúen con su desarrollo, lo cual hace pensar, que la diferencia de 2 en mortalidad y 5 días para mudar, encontrados en los individuos alimentados con ARNdc de Cat-L, es porque, efectivamente están sufriendo una alteración en la producción de la enzima que ayuda a digerir la sangre y por ende no obtener los nutrientes necesarios para su desarrollo de N2 a N3. Por lo tanto, los resultados sugieren que el tratamiento con ARNdc Cat-L puede tener efectos deletéreos en el desarrollo de los individuos y un impacto en el crecimiento de las poblaciones de estos insectos vectores de la Enfermedad de Chagas.

Como hemos comentado anteriormente los métodos de control contra los vectores de la enfermedad de Chagas son basados en productos químicos, lo cual se hace poco sostenible y con efectos adversos contra el ambiente y la posibilidad de desarrollar resistencia. Es por ello que en base a los resultados de nuestro estudio y tomando en cuenta el blanco molecular, consideramos que el uso de la técnica de ARNi afectaría la expresión génica y lo cual conllevaría a la reducción de las colonias de insectos.

El bloqueo de genes específicos en *T. dimidiata* parece ser una buena alternativa para el control de estos insectos.

5. Conclusiones

- Se estableció una colonia sincronizada de *Triatoma dimidiata*, utilizada para los experimentos.
- Se logró la caracterización y clonación de un fragmento del gen de la Cat-L de *T. dimidiata*.
- Se estandarizó la metodología para la síntesis de ARNdc.
- Se estandarizó la técnica de Northern dot blot para la detección ARNm de Cat-L.
- Se estandarizó la técnica para inducir ARNi mediante inoculación de ARNdc de Cat-L por vía oral.
- Se observó un efecto inhibitorio en el desarrollo de las ninfas N2 de *Triatoma dimidiata*, como resultado de la inoculación de ARNdc de Cat-L por vía oral.

Literatura consultada

1.- Organización Mundial de la salud (OMS). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Centro de prensa. Junio 2012. Nota descriptiva No. 340. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/index.html.

2.- Dumonteil E., Gourbiére S., Barrera PM., Rodriguez FE., Ruiz PH., *et al*., Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatán Peninsula of Mexico. Am J Trop Med Hyg. 2002; 67:176-83.

3.- Lopez-Ordoñez T, Gonzalez-Ceron L, Torres-Estrada JL, Salazar-Schettino PM, Dannis-Lozano R. Actual status of the Chagas disease seroprevalence and triatominae species in a foothill region of Chiapas, Mexico. 11th International Congress of Parásitology; 2006, Glasgow, Scotland, p. 142.

4. - Schofield, C. J., J. Jannin, *et al*. "The future of Chagas disease control." Trends Parasitol. 2006; 22(12): 583-8.

5.- Beard CB, Dotson EM, Pennington PM, Eichler S, Cordon-Rosales C, Durvasula RV. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. Int J Parasitol. 2001; 31(5-6):621-7.

6. - Beard CB, Mason PW, Aksoy S, Tesh RB, Richards FF. Transformation of an insect symbiont and expression of a foreign gene in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. Am J Trop Med Hyg. 1992; 46(2):195-200.

7. - Sen GL, Blau HM. A brief history of RNAi: the silence of the genes. FASEB J. 2006; 20 (9):1293-9.

8.- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature. 2001 24; 411 (6836):494-8.

9. - Dallas A, Vlassov AV. RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential. Med Sci Monit. 2006; 12 (4):RA67-74.

10. - Coumoul, X. and C. X. Deng. "ARNi in mice: a promising approach to decipher gene functions in vivo." Biochimie. 2006; 88(6): 637-43.

11. - Araujo, R. N., A. Santos, *et al*. "RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection." Insect Biochem Mol Biol. 2006; 36: 683-693.

12. - Brown, A. E. and F. Catteruccia. "Toward silencing the burden of malaria: progress and prospects for ARNi-based approaches." Biotechniques Suppl: 2006; 38-44.

13. - Ramakrishnan, V. G., M. N. Aljamali, *et al*. "Application of RNA interference in tick salivary gland research." J Biomol Tech. 2005 16(4): 297-305.

14. - Ramamoorthi, N., S. Narasimhan, *et al*. "The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host." Nature. 2005; 436(7050): 573-7.

15. - Pedra, J. H., S. Narasimhan, *et al*. "Disruption of the salivary protein 14 in Ixodes scapularis nymphs and impact on pathogen acquisition." Am J Trop Med Hyg. 2006; 75(4): 677-82.

16. - Kocan, K. M., R. Manzano-Roman, *et al*. "Transovarial silencing of the subolesin gene in three-host ixodid tick species after injection of replete females with subolesin dsRNA." Parásitol Res. 2007; 100(6): 1411-5.

17. - Lange, U. *et al.* Biochemical characterization of a thrombin inhibitor from the bloodsucking bug *Dipetalogaster maximus*. *Haemostasis*. 2000. 29, 204–211.

18. - Kollien AH and Schaub GA. The development of Trypanosoma cruzi in Triatominae. Parásitol Today. 2000; 16: 381–387.

19. - Rawlings and Barret AJ. Families of cysteine peptidases. In: Barret AJ (Editor) Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. Methods in Enzymology. 1994; 244: 461-468.

20. - Barret AJ y Kirschke H. Cathepsin B, Cathepsin H, and Cathepsin L. Methods in Enzymology. 1981; 80, 535-61.

21. - Wigglesworth VB. Insect Physiology. Octava Edición. Chapman y Hall. 1984. Reino Unido.

22. - Billingsley PF y Downe AER. Cellular localization of aminopeptidase in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. Cell Tiss Res. 1998; 241, 421-28.

23. - Ferreira C, Ribeiro AF, Garcia ES, Terra WR. Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma membranes of *Rhodnius prolixus* posterior midgut cells. Insect Biochem. 1988; 18, 521-30.

24. - Terra WR. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. Braz J Med Biol Res. 1988; 21: 675-734.

25. - Garcia ES, Gonzalez MS, Azambuja P. Biological factors involving *Trypanosoma cruzi* life cycle in the invertebrate vector *Rhodnius prolixus*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94, Suppl. 1999; 1: 213-216.

26. - Houseman JG y Downe AER. Characterization of an acidic proteinase from the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). Insect Biochem. 1982; 12, 651-55.

27.- López-Ordoñez T, Rodriguez MH, Hernández-Hernández FD. Tesis doctoral: “Moléculas que se expresan en el intestino de los triatominos”. CINVESTAV. Patología experimental. 2002.