

**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO
CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA**

**“Efecto de la presencia de las bacterias simbiotes intestinales en el desarrollo de
Triatoma dimidiata con miras a la paratransgénesis”.**

**Artículo para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Salud con área de
concentración en Enfermedades Transmitidas por Vector**

QFB. RENÉ MONTEJO LÓPEZ.

Generación 2014–2016

Director de Tesis:

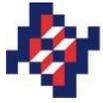
Dra. Teresa López Ordoñez

Asesor de Tesis:

Dr. Andrés Cruz Hernández

Tapachula, Chiapas, México.

Agosto 2016.



AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas las bendiciones que me da todos los días, por darme vida y salud.

A mis padres y mi hermano por apoyarme en cada proyecto de mi vida y por comprender las ausencias en momentos importantes.

A mi directora de tesis Dra. Teresa López Ordoñez (mi madre académica) por su amistad, cariño, apoyo y sobre todo la confianza que me ha brindado, así como también el compartir sus conocimientos. Le estaré eternamente agradecido por todo lo que ha hecho por mí.

A mi tutor Dr. José Luis Torres Estrada por su amistad, consejos y por su apoyo durante mis estudios de maestría.

A mi asesor Dr. Andrés Cruz Hernández por su amistad y por apoyarme en los proyectos que hemos emprendido y los que estamos por emprender.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios de posgrado y una estancia en la Universidad Autónoma de Querétaro.

A mi compañera de vida Liliana López Tirado, por tu amor, amistad, cariño y comprensión. Eres mi motor para seguir adelante.

A mis compañeros de clases Juan Alberto, Didier, Viridiana, Balam y Samanta por los momentos agradables que vivimos en la maestría, gracias por su amistad.

A todos y cada uno de mis familiares que creen en mí, gracias por su apoyo y cariño. En especial para mis familiares que ya no están conmigo, donde quiera que estén, sé que están festejando conmigo, los llevo siempre en mi corazón.





ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
Palabras clave	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS	5
a) Triatominos	5
b) Identificación de las bacterias simbiotes intestinales	5
c) Diseño experimental	6
d) Análisis estadístico	7
e) Consideraciones éticas y de bioseguridad	7
RESULTADOS	8
Bacterias simbiotes intestinales (endosimbiontes secundarios)	8
Efecto de la esterilización de los huevos y la adquisición de un endosimbionte secundario en el porcentaje de eclosión, supervivencia, mortalidad, talla y peso de los triatominos	10
DISCUSIÓN	15
CONCLUSIONES	20
PERSPECTIVAS	21
ANEXOS	22
BIBLIOGRAFÍA	29





ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Árbol filogenético de las bacterias simbiotes intestinales de <i>T. dimidiata</i>.....	9
Figura 2. Porcentaje de mortalidad.....	12
Figura 3. Curva de Supervivencia.....	13
Figura 4. Efectos de la aposimbiosis.....	14

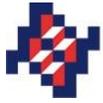




ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Bacterias simbiotas intestinales identificadas en las diferentes etapas de desarrollo de <i>T. dimidiata</i>.....	8
Tabla 2. Eliminación de bacterias en la superficie de los huevos (esterilización).....	10
Tabla 3. Efecto de la esterilización superficial de los huevos de <i>T. dimidiata</i> sobre el tiempo de eclosión.....	11
Tabla 4. El efecto de la aposimbiosis y la reintroducción de bacterias simbiotas en el crecimiento, desarrollo y mortalidad de <i>T. dimidiata</i>.....	12
Tabla 5. El efecto de la aposimbiosis y la reintroducción de bacterias simbiotas en el peso y talla de <i>T. dimidiata</i>.....	14





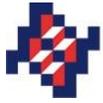
EFFECTO DE LA PRESENCIA DE LAS BACTERIAS SIMBIOTAS INTESTINALES EN EL DESARROLLO DE *Triatoma dimidiata* CON MIRAS A LA PARATRANSGÉNESIS

RESUMEN

Uno de los principales vectores biológicos de *Trypanosoma cruzi* es *Triatoma dimidiata*, insecto intra y peridomiciliar en México. Los triatomíneos poseen en su intestino bacterias simbiotas extracelulares que son esenciales para su crecimiento y normal desarrollo; favorecen la disponibilidad de Fe^{++} de los eritrocitos, aminoácidos esenciales y de vitaminas del complejo B. Estas bacterias se transmiten de insectos adultos a su progenie a través de la coprofagia y se pueden utilizar como vehículos para el control de la enfermedad transmitida por los mismos con base en el enfoque de la Paratransgénesis.

Novcientos huevos de *T. dimidiata* cepa Soconusco, genotipo Costa-Pacífico, se asignaron a 5 grupos iguales, un grupo control (no tratado) en condiciones de laboratorio, cuatro grupos tratados con violeta de genciana al 0.5% durante 3 min y mantenidos en una campana de esterilidad (a fin de obtener ninfas aposimbiotas). Las ninfas del grupo control se alimentaron con sangre de conejo Nueva Zelanda; el segundo grupo (aposimbiota) fue alimentado con sangre estéril, el tercero, cuarto y quinto grupos fueron alimentados con sangre suplementada con 1×10^5 UFC de *Bacillus megaterium* cepa QM B1551, 1×10^5 UFC de *Micrococcus luteus* cepa NCTC 2665 y una combinación de ambas bacterias, respectivamente. Se midió el porcentaje de eclosión, supervivencia, mortalidad peso y talla de las ninfas (antes y después de la alimentación). El análisis estadístico de supervivencia se ajustó a un modelo proporcional de Cox y las comparaciones múltiples se realizaron con contrastes ortogonales y corrección de Bonferroni. El peso y la talla de las ninfas fueron analizados por ANOVA de una vía seguido por pruebas de rango múltiple de Duncan en el programa R versión 3.1.1. En los 5 grupos se observó el 100% de eclosión, la supervivencia se vio afectada en los grupos tratados, 172 ninfas del grupo control alcanzaron el tercer estadio, en el segundo grupo ninguna de las ninfas alcanzó el tercer estadio, 15, 6 y 23 ninfas de los grupos 3, 4, y 5 alcanzaron el tercer estadio





respectivamente. El modelo de Cox demuestra que existe una diferencia altamente significativa entre los grupos ($p(>|\text{Chi}|) < 2.2e-16$), sin embargo los contrastes ortogonales demostraron que no existe diferencia significativa entre el grupo 3 y 4 ($p(>|z|) 0.227817$). Existe una diferencia significativa en cuanto a la cantidad de sangre ingerida durante la alimentación, el grupo 2 (ninfas aposimbiontes) ingiere más sangre en el primer estadio ($F= 33.9$; $gl= 4$; $p < 0.0001$), y en el segundo estadio ingieren menos sangre ($F= 9.38$; $gl= 4$; $p < 0.0001$) respecto a los demás grupos; no existe diferencia significativa en la cantidad de sangre ingerida por las ninfas de tercer estadio ($F= 0.365$; $gl= 3$; $p > 0.05$). Existe una diferencia significativa en la talla de las ninfas de segundo estadio ($F= 3.5$; $gl= 4$; $p=0.008$), las ninfas del grupo aposimbionte mostraron un menor tamaño en comparación con los demás grupos; no se encontraron diferencias significativas en la talla de las ninfas de primer y tercer estadio ($p > 0.05$). En conclusión, los resultados de este estudio indican que, como en otros hemípteros, las ninfas aposimbiontes producidas por la esterilización superficial de los huevos, exhiben un crecimiento retardado con aumento de la mortalidad en las primeras etapas de desarrollo, lo que sugiere que los simbiotes bacterianos juegan un papel importante en supervivencia, desarrollo, crecimiento, control de la libido, ecdisis y defecación. Los resultados demuestran que no es suficiente el que una sola bacteria colonice el tracto digestivo para que los triatominos alcancen el estado adulto, como se había propuesto en otros estudios; los resultados obtenidos nos permiten proponer a *Bacillus megaterium* como un candidato promisorio para ser utilizado en el enfoque de la Paratransgénesis.

PALABRAS CLAVE: *Triatoma dimidiata*, Enfermedad de Chagas, bacterias simbiotes, aposimbiosis, paratransgénesis.



INTRODUCCIÓN

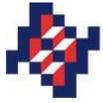
La enfermedad de Chagas es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, que es transmitido por insectos triatomínicos (WHO, 2016). Uno de los principales vectores de *T. cruzi* es *Triatoma dimidiata* con hábitos de alimentación intra y peridomiciliar (Dumonteil *et al.* 2002).

El éxito y la diversificación evolutiva de los insectos han dependido en gran parte de sus múltiples relaciones con microorganismos beneficiosos, principalmente las bacterias simbiotes (Douglas, 2011). Estas bacterias tienen varios efectos benéficos sobre sus hospederos ya que mejoran o complementan las dietas carentes de nutrientes (Ferrari & Vavre, 2011), ayudan a la digestión de los alimentos, proveen protección contra depredadores, parásitos y agentes patógenos (Haine, 2008; Brownlie & Johnson, 2009; Douglas, 2011); además de contribuir a la comunicación inter e intraespecífica y controlar el sistema reproductivo (Engelstädter & Hurst, 2009; Douglas, 2011). En los insectos vectores de enfermedades, las bacterias simbiotes pueden influir en la competencia vectorial (McMeniman *et al.* 2009; Ricci *et al.* 2012) o el tiempo de desarrollo (Chouaia *et al.* 2012) y por lo tanto son considerados como objetivos potenciales para el control de las enfermedades transmitidas por vector (ETV).

Las bacterias simbiotes existen naturalmente en el intestino de insectos silvestres y en cautiverio, se adquieren mediante la ingesta de azúcares, obtención de sangre y a través de materia orgánica en descomposición utilizada como alimento (Hurwitz *et al.* 2011; McCarthy *et al.* 2011).

Actualmente, se desarrolla una estrategia de control de vectores, basada en la modificación de bacterias simbiotes, llamada “Paratransgénesis” (Weiss & Aksoy, 2011). En esa estrategia, la microbiota bacteriana nativa de vectores transmisores de agentes etiológicos se aísla y se transforman genéticamente *in vitro* para exportar moléculas que interfieren con la transmisión de patógenos (Hurwitz *et al.* 2011). Los ensayos de semicampo han demostrado que existe un buen control en la difusión de los simbiotes modificados genéticamente en las poblaciones naturales de triatomínicos, reforzando así la viabilidad de la Paratransgénesis como parte de un

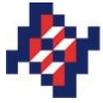




programa de control integrado de vectores de la enfermedad de Chagas (Durvasula *et al.* 1999; Hurwitz *et al.* 2011). El control de las ETV's por medio de la Paratransgénesis es más favorable en comparación con otros métodos de control. En primer lugar, la manipulación genética de las bacterias simbiotes es mucho más simple y más rápida que la manipulación genética de los insectos y los simbiotes modificados genéticamente son mucho más fáciles de introducir en las poblaciones de insectos que los transgenes y en segundo lugar las bacterias modificadas pueden ser producidas a gran escala a un bajo costo.

El presente trabajo de investigación, se enfocó en observar la influencia de dos de las bacterias simbiotes intestinales en el desarrollo y ciclo de vida de *T. dimidiata*, vector principal de la enfermedad de Chagas en el Sur de México, Centroamérica y la parte norte de Sudamérica.





MATERIALES Y MÉTODOS

a). **Triatominos**

Se utilizaron 900 huevos de *Triatoma dimidiata* cepa Soconusco, Genotipo Costa-Pacífico pertenecientes a una colonia del insectario del CRISP y mantenidos a 27 ± 2 °C; 65 ± 5 % HR con un fotoperiodo de 8:16 L:O.

b) **Identificación de las bacterias simbiotas intestinales**

El contenido intestinal de los insectos se obtuvo mediante disección del abdomen, el intestino completo se colocó en un tubo Eppendorf de 0.6ml con 50µl de PBS, se homogenizó y posteriormente se llevó a cabo la siembra de este en placas de agar para Infusión Cerebro Corazón durante 24h a 37°C. Las colonias obtenidas fueron sembradas en caldo LB, 14h a 37°C, a partir de este cultivo se realizó la extracción de ADN bacteriano.

Aislamiento de ADN

El aislamiento de ADN se realizó a partir de los pellets obtenidos del cultivo en LB, con el kit comercial DNazol® Reagent de la marca Molecular Research Center, Inc.

Amplificación del gen 16S ribosomal.

Se realizó la amplificación del gen 16S ribosomal mediante PCR, utilizando primers específicos 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') y 907R (5'-CCGTC AATTCMTTGTGAGTTT-3'), dando como resultado un producto de 900pb.

Purificación y secuenciación de los productos de interés

Los productos amplificados fueron purificados con el kit comercial QIAquick® PCR Purification (QIAGEN). Posteriormente fueron enviados al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) para su secuenciación. Las secuencias obtenidas de los electroferogramas resultantes, se inspeccionaron mediante observación directa de la amplitud de señal para determinar los fragmentos que convenían analizar en el programa bioinformático Chromas Lite v2.0. El análisis consistió en comparar las secuencias obtenidas





con las almacenadas en la base de datos GenBank utilizando el programa de Nucleotide Blast versión 2.4.0+, disponible en el portal de internet del NCBI de los Estados Unidos de Norte América (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), a fin de encontrar similitudes y determinar los géneros y especies de las bacterias detectadas.

Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas fueron introducidas al programa MUSCLE (Edgar, 2004) en Seaview version 4.0 (Gouy *et al.* 2010) a fin de realizar el alineamiento de las secuencias. Posteriormente se utilizó el programa jModeltest2 para elegir el mejor modelo de sustitución de nucleótidos para el conjunto de datos (Darriba *et al.* 2012). Se realizó una reconstrucción filogenética bayesiana con el programa MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003), con una cadena de longitud de 5 millones de generaciones, las muestras fueron tomadas cada 1000 generaciones. Se descartó el primer 25% de las muestras y la versión final del árbol filogenético fue editado en Figtree V.1.2.2 (Rambaut & Drummond, 2008).

c) Diseño experimental

Se utilizó un diseño de bloques al azar. El número de huevos fue dividido en 5 grupos (180 individuos c/u), el grupo 1 no recibió ningún tratamiento, los cuatro grupos restantes recibieron un tratamiento de esterilización superficial con violeta de genciana al 0.5% durante 3 minutos (modificado de Brecher & Wigglesworth, 1944).

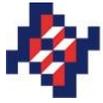
Una vez eclosionados los huevos, las ninfas del grupo 1 fueron monitoreadas en el insectario y las de los cuatro grupos restantes se mantuvieron en una campana de esterilidad (CBS Scientific Company, Inc.), las ninfas fueron alimentadas con sangre de conejo, bajo el siguiente esquema de alimentación:

Grupo 1: “grupo control” alimentadas con sangre de conejo.

Grupo 2: “Aposimbiosis” alimentadas con sangre estéril (lavado de eritrocitos e inactivación del plasma).

Grupo 3: alimentadas con sangre estéril y suplementada con 10^5 UFC de *M. luteus* cepa NCTC-2665.





Grupo 4: alimentadas con sangre estéril y suplementada con 10^5 UFC de *B. megaterium* cepa QM-B1551.

Grupo 5: alimentadas con sangre estéril y suplementada con 10^5 UFC de ambas bacterias.

Los parámetros evaluados fueron: porcentaje de eclosión, supervivencia, mortalidad, talla y peso de las ninfas (antes y después de la alimentación).

d). Análisis estadístico

El análisis estadístico de supervivencia se ajustó a un modelo proporcional de Cox y las comparaciones múltiples se realizaron con contrastes ortogonales y corrección de Bonferroni. El peso y la talla de las ninfas fueron analizados por ANOVA de una vía seguido por pruebas de rango múltiple de Duncan como comparación múltiple de medias. Todos los análisis fueron realizados en el programa R versión 3.1.1.

e). Consideraciones éticas y de bioseguridad

Todas las consideraciones éticas y de bioseguridad fueron revisadas y aprobadas por la comisión de ética y de bioseguridad del Instituto Nacional de Salud Pública con los números de aprobación CI:776 y CB730 respectivamente (Anexos 3 y 4).



RESULTADOS

Bacterias simbiotes intestinales (endosimbiontes secundarios)

En los cultivos bacterianos se observaron muy pocas colonias morfológicamente diferentes en cada placa de cultivo y para cada estadio, una característica poco común de estas bacterias es, que su crecimiento óptimo en medio líquido es a las 14 horas de cultivo. Se identificaron un total de 7 cepas diferentes de todos los especímenes de *T. dimidiata*, mismas que cuentan con un registro (número de acceso) en el de GenBank (Tabla 1).

Tabla 1. Bacterias simbiotes intestinales identificadas en las diferentes etapas de desarrollo de <i>T. dimidiata</i>.		
Número de acceso GenBank	Bacteria species	Etapas de desarrollo
KX184211	<i>Bacillus thuringiensis</i> cepa TDTAP 01	3 ^{er} estadio ninfal
KX184214	<i>Brevibacterium avium</i> cepa TDTAP 02	4 ^{to} estadio ninfal
KX184219	<i>Staphylococcus sp.</i> cepa TDBCT 01	3 ^{er} estadio ninfal
KX184221	<i>Staphylococcus lentus</i> cepa TDTAP 03	4 ^{to} estadio ninfal
KX184222	<i>Staphylococcus nepalensis</i> cepa TDTAP 04	5 ^{to} estadio ninfal
KX184223	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> cepa TDBCT 02	1 ^{er} estadio ninfal
		2 ^{do} estadio ninfal
		Adulto (macho)
		Adulto (hembra)
KX184224	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> cepa TDTAP 05	1 ^{er} estadio ninfal
		3 ^{er} estadio ninfal
		4 ^{to} estadio ninfal
		5 ^{to} estadio ninfal
		Adulto (macho)
		Adulto (hembra)

Las 7 cepas encontradas pertenecen a 3 géneros diferentes (*Bacillus*, *Brevibacterium* y *Staphylococcus*) pertenecientes a los filo: Actinobacteria y Firmicutes. El filo con el mayor número de bacterias fue Firmicutes (6/7 aislados) (Fig.1).



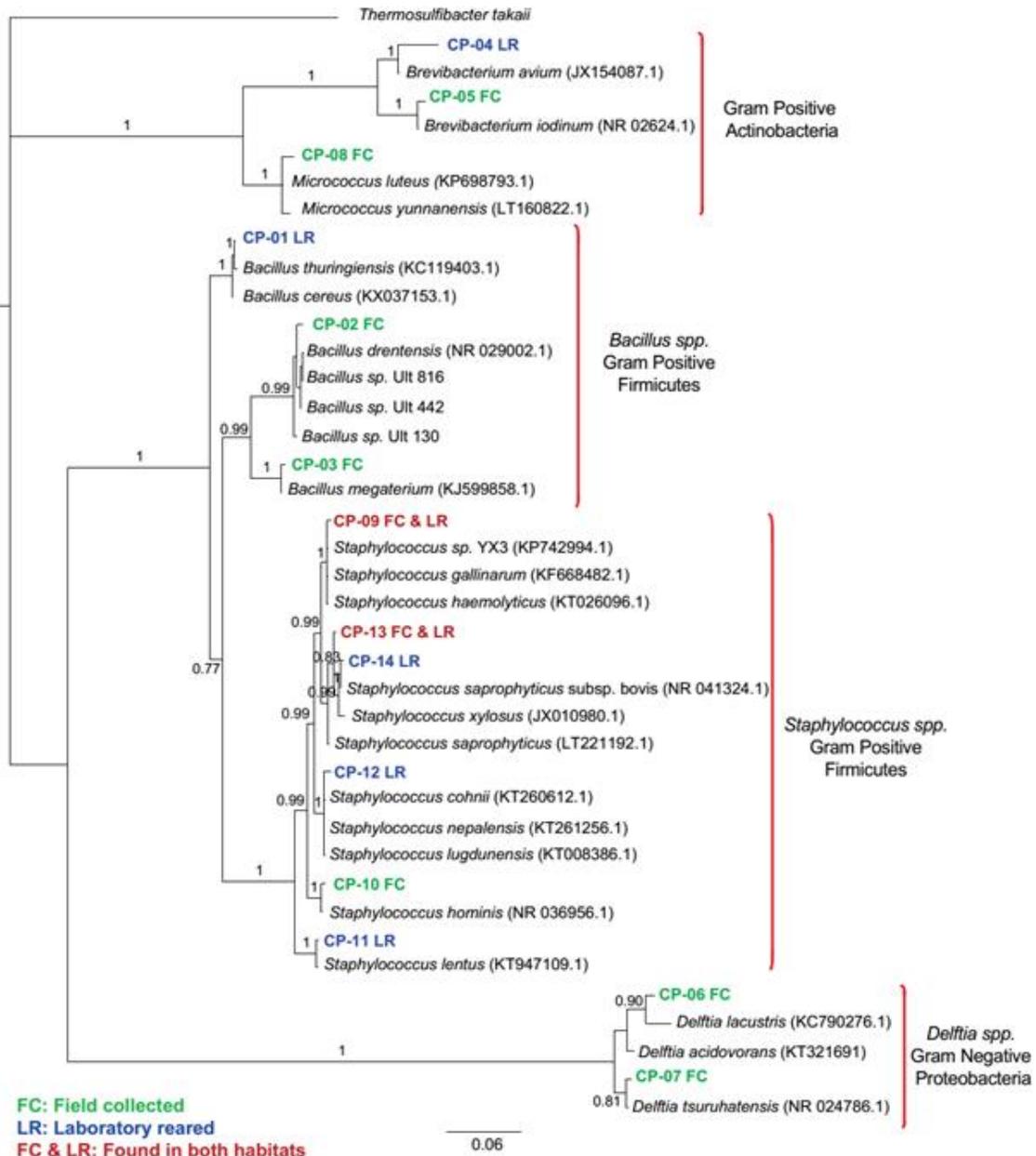
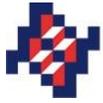


Figura 1. Árbol filogenético de las bacterias simbiotes intestinales de *T. dimidiata*.

Staphylococcus saprophyticus fue la única especie que se encontró en las diferentes etapas de desarrollo, la cepa TDBCT 02 está presente en los dos primeros estadios ninfales, tanto en el tracto intestinal como en las heces, así como también en las heces de los adultos (hembras y machos). La subespecie bovis cepa TDTAP 05 se encontró en la mayoría de los estadios ninfales (excepto en la segunda etapa ninfal) y adultos (machos y hembras), tanto en el tracto intestinal como en las heces.





Efecto de la esterilización de los huevos y la adquisición de un endosimbionte secundario en el porcentaje de eclosión, supervivencia, mortalidad, talla y peso de los triatominos

Se evaluaron 4 desinfectantes (etanol, hipoclorito de sodio, violeta de genciana y iodopovidona) a diferentes tiempos de exposición (3, 4 y 5 minutos) (Tabla 2) a fin de establecer un protocolo adecuado para la esterilización de huevos de *T. dimidiata*. Violeta de genciana exhibió el mejor porcentaje de eclosión una viabilidad de las ninfas similar a lo observado en el grupo 1 (control).

Tabla 2. Eliminación de bacterias en la superficie de los huevos (esterilización). La esterilización superficial de huevos permite la obtención de ninfas aposimbiontes.

Grupo	Tratamiento	Tiempos de exposición a los desinfectantes.								
		3 min.			4 min.			5 min.		
		No.	EC	VB	No.	EC	VB	No.	EC	VB
1	Et-OH 100%	10	0	0	10	0	0	10	0	0
2	Et-OH 90%	10	0	0	10	0	0	10	0	0
3	Et-OH 80%	10	0	0	10	0	0	10	0	0
4	Et-OH 70%	10	0	0	10	0	0	10	0	0
5	Et-OH 60%	10	1	2	10	0	0	10	0	0
6	Et-OH 50%	10	1	5	10	0	0	10	0	0
7	NaClO 10%	10	0	0	10	0	0	10	0	0
8	NaClO 5%	10	0	0	10	0	0	10	0	0
9	NaClO 2%	10	5	4	10	1	1	10	0	0
10	NaClO 1%	10	5	4	10	1	1	10	0	0
11	NaClO 0.5%	10	6	6	10	1	1	10	0	0
12	V. GEM 1%	10	0	0	10	0	0	10	0	0
13	V. GEM 0.9%	10	0	0	10	0	0	10	0	0
14	V. GEM 0.8%	10	1	1	10	0	0	10	0	0
15	V. GEM 0.7%	10	1	2	10	0	0	10	0	0
16	V. GEM 0.6%	10	4	9	10	1	3	10	0	0
17	V. GEM 0.5%	10	10	15-20	10	3	7	10	1	1
18	I-POV 4%	10	0	0	10	0	0	10	0	0
19	I-POV 3%	10	2	1	10	0	0	10	0	0
20	I-POV 2%	10	3	5-6	10	0	0	10	0	0
21	I-POV 1%	10	6	10	10	1	3	10	0	0
22	I-POV 0.5%	10	7	12	10	2	5	10	1	1

Numero de insectos (No.); eclosión (EC); VB (viabilidad).

Etanol (Et-OH); Hipoclorito de sodio (NaClO);

Violeta de genciana (V. GEM); Iodopovidona (I-POV).





El protocolo de esterilización (violeta de genciana al 0.5%, durante 3 minutos) no afecto el desarrollo embrionario de los cuatro grupos tratados, el 100% de los huevos eclosionó (Fig. 2), no existe diferencia significativa en el tiempo de eclosión de los cinco grupos ($F= 1.09$, $gl= 4$, $p=0.359$) (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la esterilización superficial de los huevos de *T. dimidiata* sobre el tiempo de eclosión. ANOVA de un factor sobre el tiempo de eclosión.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	16.500	4	4.125	1.091	.359
Intra-grupos	3382.500	895	3.779		
Total	3399.000	899			

El efecto de la esterilización de la superficie del huevo fue más pronunciado en el desarrollo post-embrionario, es decir, el tiempo de desarrollo de los primeros dos estadios ninfales (Grupo 2: Aposimbionte), la reintroducción de las bacterias simbiotes: *Bacillus megaterium* y *Micrococcus luteus* en el primer estadio ninfal, disminuyen el porcentaje de mortalidad, permite la ecdisis de un mayor número de insectos hasta el tercer estadio ninfal, así como también un aumento en la supervivencia de cada estadio ninfal (Tabla 4; Fig. 2; Fig. 3).

En los cuatro grupos tratados, el mayor porcentaje de mortalidad se acentuó en el primer estadio ninfal, para el grupo control, el mayor porcentaje de mortalidad, se observó en el segundo estadio ninfal; de igual manera, la supervivencia, se vio afectada en los grupos tratados, 172 ninfas del grupo control alcanzaron el tercer estadio, en el segundo grupo (Aposimbiosis) ninguna de las ninfas alcanzo el tercer estadio, 15, 6 y 23 ninfas de los grupos 3, 4, y 5 alcanzaron el tercer estadio respectivamente. El modelo de Cox demuestra que existe una diferencia altamente significativa en la supervivencia de los grupos ($p(>|\text{Chi}|)<2.2e-16$), el análisis de contrastes ortogonales nos indica que no se encontró diferencia significativa entre el grupo 3 y 4 ($p(>|z|) 0.227817$) (Fig. 3; Tabla 4).





Tabla 4. El efecto de la aposimbiosis y la reintroducción de bacterias simbiotes en el crecimiento, desarrollo y mortalidad de *T. dimidiata*. Se observó la duración de cada etapa ninfal y la mortalidad por estadios.

	Tiempo de desarrollo (días)				Porcentaje de mortalidad			
	Huevo	1 ^{er} estadio ninfal	2 ^{do} estadio ninfal	3 ^{er} estadio ninfal	huevo	1 ^{er} estadio ninfal	2 ^{do} estadio ninfal	3 ^{er} estadio ninfal
Grupo 1 (control)	17.5±1.7 (180)	17±2 (179)	29±2 (172)	32±2 (169)	0	0.6% (1)	3.9% (7)	1.6% (3)
Grupo 2 (aposimbiosis)	17.7±1.7 (180)	31±18 (180)	7±2 (4)	NA	0	97.7% (176)	2.2% (4)	NA
Grupo 3 (<i>M. luteus</i>)	17.9±2.1 (180)	79±31 (180)	64±8 (24)	13±5 (7)	0	86.6% (156)	9.4% (17)	3.8% (7)
Grupo 4 (<i>B. megaterium</i>)	17.7±2.4 (180)	64±35 (180)	67±16 (60)	50±11 (15)	0	66.6% (120)	25% (45)	8.3% (15)
Grupo 5 (<i>B. meg.</i> + <i>M. lut.</i>)	17.7±1.7 (180)	76±38 (180)	66±12 (66)	65±10 (23)	0	63.3% (114)	23.8% (43)	12.7% (23)

NA: no aplica (no existe registro).

En el apartado de tiempo de desarrollo, los números entre paréntesis representan el número de individuos existentes, y número de individuos muertos en el apartado de Mortalidad.

Mortalidad post-embriónal

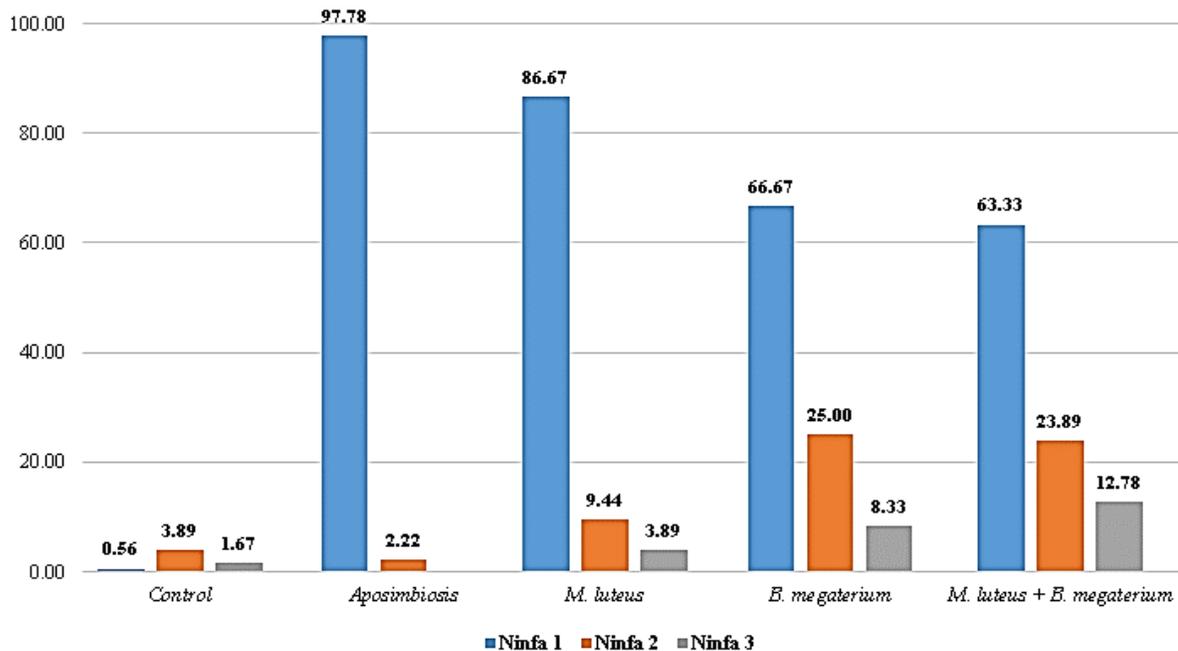


Figura 2. Porcentaje de mortalidad. La reintroducción de las bacterias simbiotes disminuye la mortalidad en cada etapa de desarrollo.



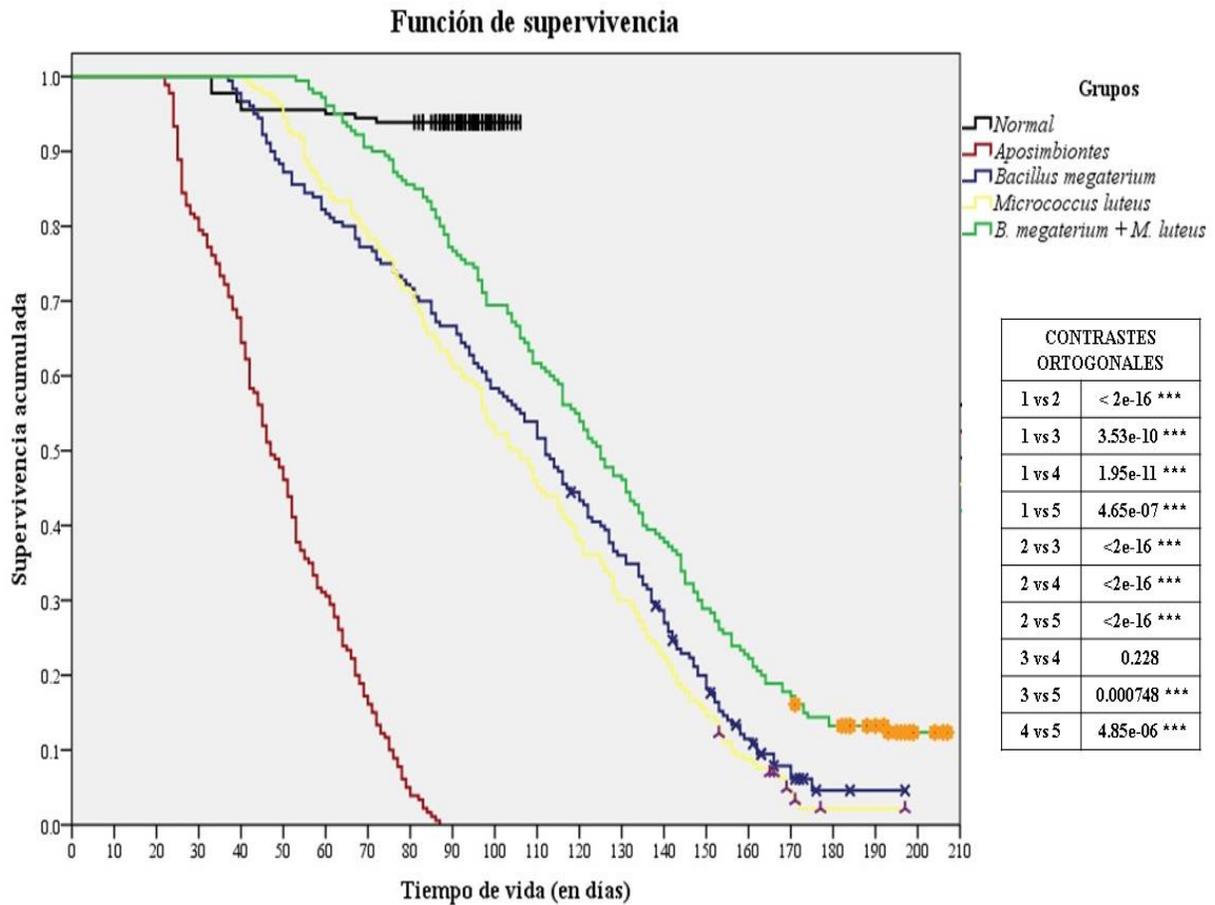
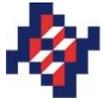


Figura 3. Curva de Supervivencia. La Aposimbiosis reduce la supervivencia de las ninfas de *T. dimidiata*, la reintroducción de las bacterias simbiotas aumenta tanto la supervivencia como la ecdisis.

Se realizaron mediciones del peso y la talla de los triatominos en los diferentes estadios ninfales, para el caso del peso, se hicieron mediciones antes y después de alimentar, a fin de conocer la cantidad de sangre ingerida. Los resultados demuestran que existe una diferencia significativa en la cantidad de sangre ingerida por las ninfas de primer estadio de los cinco grupos ($F= 33.9$, $gl= 4$, $p<0.0001$), las comparaciones múltiples de medias por Duncan indican que las ninfas del grupo 2 (aposimbiosis) ingieren más sangre (Fig. 4d,e), las ninfas de segundo estadio del grupo 2 (aposimbiosis) ingiere menos sangre respecto a los demás grupos ($F= 9.38$, $gl= 4$, $p<0.0001$); no se encontró diferencia significativa en la cantidad de sangre ingerida por las ninfas de tercer estadio ($F= 0.365$, $gl= 3$, $p>0.05$) (Tabla 5).



Existe una diferencia significativa en la talla de las ninfas de segundo estadio ($F= 3.5$, $gl= 4$, $p=0.008$), las ninfas del grupo aposimbionte mostraron un menor tamaño, 0.1383 cm menos respecto a los demás grupos (Tabla 5), esto debido a malformaciones, se observó que no existe un desarrollo eficiente del tórax haciendo que la cabeza se doble hacia el abdomen, también se observó una ecdisis incompleta (muerte del insecto dentro de la exuvia) (Fig. 4); no existe diferencia significativa en la talla de las ninfas de primer y tercer estadio ($p>0.05$).

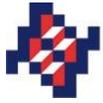


Figura 4. Efectos de la aposimbiosis. Las imágenes a, b, y c muestran malformaciones en las ninfas de segundo estadio así como la interrupción de la ecdisis; las imágenes d y e muestran ninfas que murieron a causa de la sobrealimentación.

Tabla 5. El efecto de la aposimbiosis y la reintroducción de bacterias simbiotes en el peso y talla de *T. dimidiata*.

	Sangre ingerida (gr)			Talla (cm)		
	1 ^{er} estadio ninfal	2 ^{do} estadio ninfal	3 ^{er} estadio ninfal	1 ^{er} estadio ninfal	2 ^{do} estadio ninfal	3 ^{er} estadio ninfal
Grupo 1 (control)	0.0032	0.0115	0.0899	0.2979	0.4761	1.5917
Grupo 2 (aposimbiosis)	0.0043	0.0018	NA	0.2905	0.3350	NA
Grupo 3 (<i>M. luteus</i>)	0.0034	0.0117	0.0919	0.2924	0.4712	1.0943
Grupo 4 (<i>B. megaterium</i>)	0.0033	0.0116	0.0909	0.2933	0.4724	1.1047
Grupo 5 (<i>B. meg.</i> + <i>M. lut.</i>)	0.0032	0.0115	0.0902	0.2951	0.4733	1.1074
valor de p	0.000	0.000	0.778	0.566	0.008	0.968





DISCUSIÓN

En el presente estudio se investigó el papel de los endosimbiontes secundarios en el crecimiento y desarrollo de *T. dimidiata*. Durante mucho tiempo se ha establecido que las bacterias simbiotas de los insectos pueden estar implicadas en la digestión de los alimentos, proporcionar nutrientes esenciales que están ausentes en la alimentación, la desintoxicación a través de la degradación o eliminación de desechos tóxicos de la alimentación, la producción de feromonas, la regulación del pH, la síntesis de esteroides y vitaminas, termotolerancia, resistencia contra los agentes patógenos y parasitoides, e incluso la modificación de la conducta alimentaria, así como también la resistencia a los insecticidas (Dillon & Dillon 2004; Genta *et al.* 2006; Feldhaar 2007; Toh *et al.* 2010; Ferrari y Vavre 2011; Kikuchi *et al.* 2012); También están implicadas en el desarrollo del insecto, la defensa contra los enemigos naturales, la inmunidad, la reproducción y la especiación (Braendle *et al.* 2003; Dillon & Dillon 2004; Bäckhed *et al.* 2005; Azambuja *et al.* 2005; Dong *et al.* 2009; Genes *et al.* 2011). En este tenor se demuestra que las bacterias simbiotas *Bacillus megaterium* y *Micrococcus luteus* juegan un papel importante en la viabilidad, el tiempo de desarrollo, la talla y el peso de las ninfas de *T. dimidiata*.

Con el fin de conocer si las bacterias simbiotas antes mencionadas están presentes en los ejemplares colonizados en insectario, se aislaron e identificaron las bacterias simbiotas de estos insectos. Se encontró una baja diversidad de bacterias simbiotas en *T. dimidiata* (insectos colonizados en insectario) siete cepas de tres géneros diferentes (*Bacillus*, *Brevibacterium* y *Staphylococcus*) pertenecientes a los filum: Actinobacteria y Firmicutes. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Montejo-López (2013), quien identificó las bacterias simbiotas intestinales de *T. dimidiata* colectadas en campo, encontrando diez cepas de cinco géneros diferentes (*Bacillus*, *Brevibacterium*, *Delftia*, *Micrococcus* y *Staphylococcus*) pertenecientes a los fila: Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria. Una baja diversidad de bacterias ha sido reportada en otros insectos (Weiss & Aksoy, 2011; Da Mota *et al.* 2012), en donde se encontraron bacterias pertenecientes a los fila: Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, y Proteobacteria (Gumiel *et al.* 2015). De manera general se ha observado que en los insectos colonizados en laboratorio tienen una baja diversidad de bacterias en comparación con los insectos de campo (Rani *et al.* 2009; Belda *et al.* 2011; Rinke *et al.* 2011; Da Mota *et al.* 2012), esto puede deberse a que, siendo los triatomíneos insectos rastreros la mayor parte de





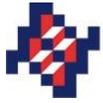
su vida estos pueden adquirir bacterias presentes en el suelo. Por el contrario, la transmisión de algunas especies de bacterias podría verse facilitada por el estilo de vida en el insectario, donde las condiciones de temperatura, humedad y fuentes de alimentación son constantes y la ausencia de suelo podrían favorecer el desarrollo de algunas especies bacterianas y dar lugar a la modificación de la composición de la microbiota en los intestinos de los triatominos a lo largo del tiempo (Eichler & Schaub, 2002; Da Mota *et al.* 2012; Gumiel *et al.* 2015).

La bacteria *Staphylococcus saprophyticus* está presente tanto en insectos colectados en campo (Montejo-López 2013) como en los insectos criados en laboratorio, esto hace suponer que esta especie ha conservado una estrecha asociación con su hospedero a pesar de la adaptación de los insectos al cautiverio, además de estar presente en todas las etapas ninfales, en machos y hembras, lo que sugiere que esta especie juegan un papel muy importante en la fisiología de *T. dimidiata* (Fig. 1). La presencia de esta bacteria podría ser el motivo por el cual se encontraron en su mayoría bacterias Gram-positivas ya que posee la capacidad de sintetizar estreptomicina, antibiótico que presenta actividad contra bacterias Gram-negativas (WHO, 1991; Kuroda *et al.* 2005). En este sentido, algunos simbiotes intestinales de termitas han sido reportados con la capacidad de producir antibióticos, hecho que abre la puerta a nuevas investigaciones enfocadas en la bioprospección (Matsui *et al.* 2012; Kurtböke *et al.* 2015).

Staphylococcus saprophyticus es una bacteria Gram-positiva perteneciente al filum Firmicutes, la secuenciación completa de su genoma demuestra que tiene las enzimas necesarias para la biosíntesis de algunas vitaminas del complejo B y Aminoácidos (arginina, fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, tirosina, triptófano y valina), así como también tiene las enzimas necesarias para la degradación de clorociclohexano (molécula básica de los insecticidas organoclorados) y clorobenceno (solvente para ciertas formulaciones de pesticidas) (Kuroda *et al.* 2005), características que hacen sugerir que esta bacteria podría jugar un papel importante en el crecimiento y desarrollo de *T. dimidiata*, por lo que es importante conocer que aspectos fisiológicos mejora en los insectos aposimbiontes.

En el presente estudio, para la obtención de ninfas aposimbiontes, se realizó la esterilización superficial de los huevos de *T. dimidiata*. La aposimbiosis en *T. dimidiata* al igual que en otros





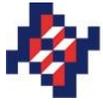
insectos, retrasa el crecimiento y desarrollo, se observa un aumento significativo en la mortalidad en los primeros estadios ninfales impidiendo que los insectos alcancen la etapa adulta, en este estado (aposimbiosis) los insectos pesan menos, ingieren más sangre y tienen menor diuresis que los insectos con simbiotas (Abe *et al.* 1995; Beard *et al.* 1998; Eichler & Schaub, 1998; Prado & Almeida 2009; Kaltenpoth *et al.* 2009).

Mediante la identificación de las bacterias simbiotas en los triatominos y la generación de insectos aposimbiotas a través de esterilización de la superficie de los huevos, se logra demostrar que, como en otros insectos, los simbiotas se transmiten horizontalmente a través de la superficie del huevo. La transferencia de simbiotas a los huevos se produce por manchas de heces sobre la superficie de huevos que dejan las hembras durante la oviposición (Fig. 4) (Kaltenpoth *et al.* 2009) este evento se comprueba con los resultados observados en el grupo control (huevos no esterilizados) donde los insectos se desarrollan de manera normal, tienen una baja mortalidad (6.11%), la talla y el peso son similares a lo reportado para otras cepas de la misma especie (Zeledón *et al.* 1972).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, permiten inferir, tal cual lo hacen Kaltenpoth & cols. (2009), que las bacterias simbiotas son capaces de sobrevivir fuera del intestino del huésped hasta los 17.5 ± 1.7 días cuando son adquiridos por las ninfas mediante una secreción que dejan las hembras en la superficie del huevo, lo que posiblemente proporciona un microclima anaerobio, o bien las bacterias se diferencian a una etapa aerotolerante y metabólicamente inactivas y al ser ingeridas por los insectos, se reactivan en el intestino de los mismos.

Bacillus megaterium es una bacteria Gram-positiva perteneciente al filo Firmicutes (identificada por Montejo-López 2013 en *T. dimidiata* de campo). El presente estudio mostró que esta bacteria al ser reintroducida en ninfas aposimbiotas prolonga el tiempo de desarrollo, regula el crecimiento, la saciedad, la diuresis y el peso de las ninfas, reduce la mortalidad, permitiendo que el insecto alcance el tercer estadio ninfal. La secuenciación completa del genoma de esta bacteria demuestra que tiene las enzimas necesarias para la biosíntesis de algunas vitaminas del complejo B (Eppinger *et al.* 2011), por lo que es posible que *T. dimidiata* obtenga este y otros



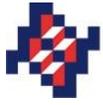


nutrientes más de esta bacteria, ya que su alimentación carece de estas vitaminas (Baines, 1956). Esta bacteria también produce sideróforos, importantes en el transporte y asimilación de hierro de los eritrocitos (Santos *et al.* 2014), con lo cual ayudaría a *T. dimidiata* a desintoxicarse de los productos de degradación de la sangre. Estas características han llamado la atención para que esta bacteria sea una excelente candidata para su uso en estudios de paratransgénesis en moscas de la arena (vectores de Leishmaniasis) (Hillesland *et al.* 2008; Mukhopadhyay *et al.* 2012).

Micrococcus luteus es una bacteria Gram-positiva del Filum Actinobacteria (identificada por Montejo-López 2013 en *T. dimidiata* de campo). Los resultados sugieren fuertemente que esta bacteria al ser reintroducida en ninfas aposimbiontes mejora las funciones fisiológicas del insecto, pero en menor medida que *B. megaterium*. Sin embargo, juega un papel importante en la regulación del crecimiento de otras bacterias (Mukamolova *et al.* 1998); la secuenciación completa de su genoma demuestra que tiene las enzimas necesarias para la biosíntesis de Novobiocina (Young *et al.* 2010), antibiótico que presenta actividad contra estafilococos coagulasa negativos, pero no así contra *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. xylosus*, *S. lentus* y *S. gallinarum* (Koneman *et al.* 2008), esto hace suponer que, en otros insectos, puede tener la función en la regulación de la diversidad de bacterias y que podría tener la misma función en *T. dimidiata*, aunque esta bacteria solamente fue aislada en un espécimen capturado en campo.

En este estudio se observa que la reintroducción de una sola bacteria simbiote en ninfas aposimbiontes no mejora todas las características fisiológicas del insecto y tampoco es suficiente para que estos alcancen la madurez sexual, efectos distintos a lo observado por Beard & cols. (1998), cuando reintrodujeron la bacteria *Rhodococcus rhodnii* en *Rhodnius prolixus* (aposimbionte). Este grupo mostró que las ninfas revierten los efectos de la aposimbiosis y alcanzan la madurez sexual con la presencia de una sola especie de bacteria. En el presente trabajo se muestra que cuando se reintroducen dos bacterias simbiotes se mejoran aún más los efectos producidos por la aposimbiosis (Fig. 3), los estudios de Metagenómica y las bases de datos de genes y genomas (KEGG) sugieren que entre las bacterias simbiotes se complementan las rutas metabólicas para la producción de nutrientes y que estas a su vez complementan la de los insectos y viceversa (Upadhyay *et al.* 2015), motivo por el cual es casi imposible afirmar





que la reintroducción de una sola bacteria simbiote pueda revertir los efectos negativos de la aposimbiosis.

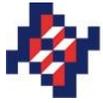
De manera general los resultados de este estudio muestran que la bacteria *Bacillus megaterium* tiene la capacidad de revertir en gran medida los efectos deletéreos producidos por la aposimbiosis. Por lo tanto, se perfila como una seria candidata para ser utilizada en la paratransgenesis a fin de tener una alternativa para el control de la enfermedad de Chagas; sin embargo es necesario hacer la evaluación de otra de las bacterias *S. saprophyticus* sobre la aposimbiosis, ya que esta bacteria parece tener una relación más estrecha con el insecto, al ser identificada tanto en insectos de campo como en los colonizados en el insectario.



CONCLUSIONES

1. Las bacterias simbiotes intestinales identificadas en *T. dimidiata* cepa Soconusco, genotipo Costa-Pacífico en condiciones de insectario, fueron principalmente Gram positivas, pertenecientes a los filas: Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria.
2. *Triatoma dimidiata* cepa Soconusco, genotipo Costa-Pacífico exhibe una baja mortalidad en los primeros tres estadios de desarrollo (6.11%); un tiempo de desarrollo de 94 días (huevo-N3), una talla de 0.2979cm para el primer estadio ninfal, 0.4761cm para el segundo estadio y 1.5917cm para el tercer estadio y un peso de 0.0032gr en el primer estadio ninfal, 0.0115gr en el segundo estadio ninfal y 0.0899gr en el tercer estadio ninfal.
3. La Aposimbiosis en *T. dimidiata* retarda el tiempo de desarrollo, propicia una mortalidad del 97.7% en el primer estadio de desarrollo, el insecto en esta condición exhibe malas funciones intestinales (defecan menos y en algunos casos no defecan), descontrol de la saciedad relacionada con un exceso de ingestión de alimento, hiperactividad, agresión, disminuye la diuresis, la defecación y la ecdisis.
4. *Micrococcus luteus* mejora los efectos observados por la Aposimbiosis, permitiendo que el insecto tenga un mejor tiempo de desarrollo, disminuya la mortalidad y propicia la ecdisis de segunda etapa ninfal a la tercer etapa.
5. *Bacillus megaterium* mejora los efectos observados en la condición de Aposimbiosis, exhibiendo un mejor efecto que *Micrococcus luteus* en cuanto al tiempo desarrollo, la mortalidad por estadios y la ecdisis.
6. La reintroducción de ambas bacterias en las ninfas aposimbiontes muestran un mayor beneficio para el insecto, en cuanto al número de insectos que alcanzan el tercer estadio y el tiempo de desarrollo.





PERSPECTIVAS

Este es el primer trabajo en la identificación y aislamiento de bacterias simbiotes intestinales de *T. dimidiata* en condiciones controladas de laboratorio, de tal manera que es necesario reforzar estos datos, haciendo uso de herramientas moleculares como la Metagenómica, que permitirá conocer tanto los endosimbiontes primarios como secundarios en cada etapa de desarrollo del insecto.

A fin de proponer el mejor candidato para efectuar la paratransgénesis, es necesario realizar la evaluación de *Staphylococcus saprophyticus* sobre el crecimiento y desarrollo de *T. dimidiata*. Sin tomar en cuenta los resultados de dicha evaluación sería conveniente secuenciar el genoma completo de esta bacteria, ya que está presente en todas las etapas de desarrollo del insecto y esto sugiere que juega un papel metabólico importante.

Triatoma dimidiata tiene resistencia a ciertos insecticidas y en este sentido, algunos estudios demuestran que algunas bacterias endosimbiontes tienen la capacidad de degradar insecticidas y aprovechar los metabolitos, productos de la degradación, como fuente de nutrientes. Por lo que es necesario aislar e identificar las bacterias que tengan esta capacidad y que posiblemente estén confiriéndole la resistencia al insecto.





ANEXOS

01.- *Bacillus megaterium* cepa QM B1551



CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N. Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares

24 de Octubre de 2014

Dra. Teresa López Ordóñez,
Investigadora.
Coordinadora de la Maestría en Ciencias en ETVs,
Centro Regional de Investigación en Salud Pública.
Instituto Nacional de Salud Pública.

Presente,

Junto a la presente se hace la entrega de la cepa por ustedes solicitada y cuyos registros en la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares afiliada a la WFCC (World Federation for Culture Collection) bajo en acrónimo CDBB corresponde a:

***Bacillus megaterium* CDBB-B-33**

Con esta, se adquiere el compromiso de utilizar el material biológico para fines de investigación y no hacer uso comercial, donarlos y/o intercambiarlos, así mismo si generan publicaciones de las investigaciones realizadas, agradeceremos se otorguen los créditos correspondientes a la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINVESTAV.

Se anexa la información reportada para la cepa en nuestro sistema de información y el perfil bioquímico.

Atentamente,

Biol. Juan C. Estrada Mora,
Colección de Cultivos Microbianos.
CINVESTAV.





02.- *Micrococcus luteus* cepa NCTC 2665



CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.
Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares

24 de Agosto de 2014

Dra. Teresa López Ordóñez,
Investigadora.
Coordinadora de la Maestría en Ciencias en ETVs,
Centro Regional de Investigación en Salud Pública.
Instituto Nacional de Salud Pública.

Presente.

Junto a la presente se hace la entrega de la cepa por Usted solicitada y cuyos registros en la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares afiliada a la WFCC (World Federation for Culture Collection) bajo en acrónimo CDBB corresponde a:

***Micrococcus luteus* CDBB-B-998**

Al recibir la mencionada cepa, Usted contrae el compromiso de utilizar el material únicamente para fines de investigación y no hacer uso comercial, donarlos y/o intercambiarlos, así mismo si generan publicaciones de las investigaciones realizadas, agradeceremos se otorguen los créditos correspondientes a la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINVESTAV.

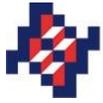
Anexo la información reportada para la cepa y el perfil bioquímico.

Atentamente.

Biól. Juan C. Estrada Mora,
Colección Nacional de Cepas
Microbianas y Cultivos Celulares.

Av. Instituto Politécnico Nacional # 2508, Col. San Pedro Zacatenco, G.A. Madero, México, D.F., C.P. 07360
E-mail: jmartine@cinvestav.mx, jestrada@cinvestav.mx
Tel. +52 (55) 5747-3800 Exts. 1758 y 3903
Fax: +52 (55) 5747-3975, +52 (55) 5747-7002





03.- Aprobación del Comité de Ética.



Instituto Nacional de Salud Pública

Generación de conocimiento para el desarrollo de políticas de salud



CEI Comité de Ética en Investigación

Instituto Nacional de Salud Pública

Registro ante CONBIOÉTICA: 17CEI00120130424

Registro ante COFEPRIS: 13 CEI 17 007 36

FWA: 00015605

Cuernavaca, Mor., 19 de octubre, 2015

Protocolo CI: 776

RENÉ MONTEJO LÓPEZ
Maestría en Ciencias en
Enfermedades transmitidas por Vector
Presente

Por medio del presente me permito informar a usted que el dictamen del Comité de Ética en Investigación a su proyecto titulado “*Efecto de la presencia de las bacterias simbiotes intestinales en el desarrollo de Triatoma dimidiata con miras a la paratransgénesis*” fue:

Aprobado

Le informamos que esta aprobación tiene vigencia hasta el 18 de octubre del 2016.

Renovación anual: Si su estudio se extiende por un periodo mayor, favor de presentar el formato de *Renovación anual* con 45 días de anticipación a su fecha de vencimiento. Favor de solicitar vía electrónica el formato correspondiente a este Comité. Nota: Es responsabilidad de usted como Investigador/a Responsable de este proyecto solicitar la renovación anual de su estudio con suficiente anticipación.

Addenda/Modificaciones: Le recuerdo que cualquier cambio o actualización en los procedimientos de este estudio deberá ser enviado a este Comité previo a su implementación, utilizando el sistema SIID.

Atentamente

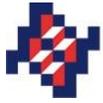
Angélica Ángeles Llerenas
Presidente

cp.- Dra. Teresa López Ordoñez – Coordinadora Maestría en Ciencias – Enfermedades Transmitidas por Vector
Mtro. Miguel Ángel Reyes – Depto. Asuntos Escolares

Avenida Universidad 655
Cerrada Los Pinos y Caminera
Colonia Santa María Ahuacatlán
62100 Cuernavaca, Morelos, México
corr.: (777) 329 3000

www.insp.mx





04.- Aprobación del Comité de Bioseguridad.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA COMITÉ DE BIOSEGURIDAD



CBI6-005.

Cuernavaca, Mor., a 22 de enero de 2016.

CB: 730

René Montejó López
Responsable de Proyecto
Enfermedades Transmitidas por Vector-ESPM
P r e s e n t e

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el protocolo tesis titulado: “Efecto de la presencia de las bacterias simbiotas intestinales en el desarrollo de *Triatoma dimidiata* con miras a la paratransgénesis”, el dictamen del Comité de Bioseguridad es: APROBADO debido a que dicho proyecto establece todas las medidas de uso y manejo de residuos peligrosos biológico infecciosos (RPBI) y CRET; por lo que desde el punto de vista de Bioseguridad no existe ninguna objeción para continuar su proceso.

Le recordamos que deberá entregar el resto de las cartas responsivas del manejo y disposición final de los RPBI del resto de los estados participantes en el proyecto así como de la lista detallada de los responsables de la entrega, traslado y recepción de material biológico del proyecto de investigación.

Atentamente,

Dra. Celia M. Alpuche Aranda
Presidente del Comité
de Bioseguridad-INSP

Col. Santa María Ahuacatillán
62508 Cuernavaca, Morelos, México

e-mail: celia.alpuche@insp.mx

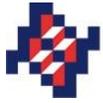
Tel-Fax: 01 (777) 3293000 ext 7204
Secretaría Técnica: ext 1525
e-mail: alejandra.contreras@insp.mx



BIBLIOGRAFÍA

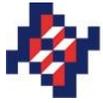
- 1) Abe Y, Mishiro K, Takanashi M. Symbiont of brown-winged green bug *Plautia stali* Scott. *Jpn. J Appl Entomol Zool.* 1995; (39): 109–115. doi:10.1303/jjaez.39.109.
- 2) Azambuja P, Garcia E, Ratcliffe N. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends in Parasitology.* 2005; 21 (12): 568-572.
- 3) Bäckhed F, Ley ER, Sonnenburg LJ, Peterson AD, Gordon IJ. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science.* 2005; 307 (5717): 1915-1920. doi:10.1126/science.1104816.
- 4) Baines S. The Role of the Symbiotic Bacteria in the Nutrition of *Rhodnius Prolixus* (Hemiptera). *J. Exp. Biol.* 1956; 33: 533–41.
- 5) Beard CB, Durvasula RV, Richard FF. Bacterial Symbiosis in Arthropods and the Control of Disease Transmission. *Emerging Infectious Diseases.* 1998; 4 (4): 581-591. doi:10.3201/eid0404.980408.
- 6) Belda E, Pedrola L, Peretó J, *et al.* Microbial Diversity in the Midguts of Field and Lab-Reared Populations of the European Corn Borer *Ostrinia nubilalis*. Lopez-Garcia P, ed. *PLoS ONE.* 2011; 6 (6): e21751. doi:10.1371/journal.pone.0021751.
- 7) Braendle C, Miura T, Bickel R, Shingleton AW, Kambhampati S, Stern DL. Developmental Origin and Evolution of Bacteriocytes in the Aphid–Buchnera Symbiosis. *PLoS Biol.* 2003; 1(1): e21. doi:10.1371/journal.pbio.0000021.
- 8) Brecher G & Wigglesworth VB. The transmission of *Actinomyces rhodnii* Erikson in *Rhodnius prolixus* Stol. (Hemiptera) and its influence on the growth of the host. *Parasitol.* 1944; 35: 220.
- 9) Brownlie JC. & Johnson KN. Symbiont mediated protection in insect hosts. *Trends Microbiol.* 2009; 17 (8): 348-54. doi:10.1016/j.tim.2009.05.005.
- 10) Chouaia B, Rossi P, Epis S, *et al.* Delayed larval development in *Anopheles* mosquitoes deprived of *Asaia* bacterial symbionts. *BMC Microbiol.* 2012; 12 (Suppl 1): S2. doi:10.1186/1471-2180-12-S1-S2.
- 11) Da Mota FF, Marinho LP, Moreira CJ de C, *et al.* Cultivation-Independent Methods Reveal Differences among Bacterial Gut Microbiota in Triatomine Vectors of Chagas Disease. Myler PJ, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2012; 6 (5): e1631. doi:10.1371/journal.pntd.0001631.





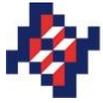
- 12) Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*. 2012; doi:10.1038/nmeth.2109.
- 13) Dillon RJ, Dillon VM. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology*. 2004; 49: 71-92. doi:10.1146/annurev.ento.49.061802.123416.
- 14) Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. Implication of the Mosquito Midgut Microbiota in the Defense against Malaria Parasites. Schneider DS, ed. *PLoS Pathogens*. 2009; 5 (5): e1000423. doi:10.1371/journal.ppat.1000423.
- 15) Douglas AE. Lessons from studying insect symbiosis. *Cell Host Microbe*. 2011; 10: 359–367. doi:10.1016/j.chom.2011.09.001.
- 16) Dumonteil E, Gourbiere S, Barrera PM, *et al.* Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *T. cruzi* in the Yucatan peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; 67:176–183.
- 17) Durvasula RV, Gumbs A, Panackal A, *et al.* Expression of a functional antibody fragment in the gut of *Rhodnius prolixus* via transgenic bacterial symbiont *Rhodococcus rhodnii*. *Med Vet Entomol*. 1999; 13 (2): 115–9.
- 18) Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004; doi:10.1093/nar/gkh340.
- 19) Eichler S, Schaub GA. The effects of aposymbiosis and of an infection with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the tracheal system of the reduviid bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol*. 1998; 44 (2):131-140. doi:10.1016/S0022-1910(97)00095-4.
- 20) Eichler S, Schaub GA. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Exp Parasitol*. 2002; 100: 17–27. doi:10.1006/expr.2001.4653.
- 21) Engelstädter JI, Hurst GD. What use are male hosts? The dynamics of maternally inherited bacteria showing sexual transmission or male killing. *Am Nat*. 2009; 173 (5): E159-70. doi:10.1086/597375.
- 22) Eppinger M, Bunk B, Johns MA, *et al.* Genome Sequences of the Biotechnologically Important *Bacillus megaterium* Strains QM B1551 and DSM319. *Journal of Bacteriology*. 2011; 193 (16): 4199-4213. doi:10.1128/JB.00449-11.





- 23) Feldhaar H, Straka J, Krischke M, *et al.* Nutritional upgrading for omnivorous carpenter ants by the endosymbiont *Blochmannia*. *BMC Biology*. 2007; 5: 48. doi:10.1186/1741-7007-5-48.
- 24) Ferrari J, Vavre F. Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2011; 366 (1569):1389-1400. doi:10.1098/rstb.2010.0226.
- 25) Genes C, Baquero E, Echeverri F, Maya JD, Triana O. Mitochondrial dysfunction in *Trypanosoma cruzi*: the role of *Serratia marcescens* prodigiosin in the alternative treatment of Chagas disease. *Parasites & Vectors*. 2011; 4:66. doi:10.1186/1756-3305-4-66.
- 26) Genta FA, Dillon RJ, Terra WR, Ferreira C. Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Insect Physiology*. 2006; 52 (6): 593-601. doi:10.1016/j.jinsphys.2006.02.007.
- 27) Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Mol. Biol. Evol.* 2010; 402. doi:10.1093/molbev/msp259.
- 28) Gumiel M, da Mota FF, Rizzo V de S, *et al.* Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods. *Parasites & Vectors*. 2015; 8:245. doi:10.1186/s13071-015-0836-z.
- 29) Haine ER. Symbiont-mediated protection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2008; 275 (1633): 353-361. doi:10.1098/rspb.2007.1211.
- 30) Hillesland H, Read A, Subhadra B, Hurwitz I, McKelvey R, Ghosh K, *et al.* Identification of aerobic gut bacteria from the kala azar vector, *Phlebotomus argentipes*: a platform for potential paratransgenic manipulation of sand flies. *Am J Trop Med Hyg*. 2008; 79: 881–6.
- 31) Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 2001; 17: 754–5.
- 32) Hurwitz I, Fieck A, Read A, *et al.* Paratransgenic Control of Vector Borne Diseases. *International Journal of Biological Sciences*. 2011; 7 (9):1334-1344.





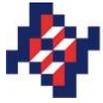
- 33) Kaltenpoth M, Winter AS, Kleinhammer A. Localization and transmission route of *Coriobacterium glomerans*, the endosymbiont of pyrrhocorid bugs. *FEMS Microbiology Ecology*. 2009; 69 (3): 373-383. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00722.x
- 34) Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, Nagayama A, Tago K, Fukatsu T. Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109 (22): 8618-8622. doi:10.1073/pnas.1200231109.
- 35) Koneman W, Winn C, Allen D, Janda M, Procop W, Schreckenberger C, Woods L. *Diagnostico Microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. 2008; Sexta edición. 1691pp. ISBN: 9500608952, 9789500608954. Argentina.
- 36) Kuroda M, Yamashita A, Hirakawa H, *et al.* Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102 (37): 13272-13277. doi:10.1073/pnas.0502950102.
- 37) Kurtböke DI, French JR, Hayes RA, Quinn RJ. Eco-taxonomic insights into actinomycete symbionts of termites for discovery of novel bioactive compounds. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2015; 147: 111-35. doi:10.1007/10_2014_270.
- 38) Matsui T, Tanaka J, Namihira T, Shinzato N. Antibiotics production by an actinomycete isolated from the termite gut. *J Basic Microbiol*. 2012; 52 (6): 731-5. doi:10.1002/jobm.201100500.
- 39) McCarthy CB, Diambra LA, Rivera Pomar RV. Metagenomic Analysis of Taxa Associated with *Lutzomyia longipalpis*, Vector of Visceral Leishmaniasis, Using an Unbiased High-Throughput Approach. Solano P, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011; 5 (9): e1304. doi:10.1371/journal.pntd.0001304.
- 40) McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, *et al.* Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*. 2009; 323 (5910): 141-144. doi:10.1126/science.1165326.
- 41) Montejo-López R. Identificación de bacterias que son posibles simbiotas en el intestino de *Triatoma dimidiata* (tesis de pregrado). Universidad Autónoma de Chiapas, Tapachula, Chiapas, México 2013.
- 42) Mukamolova G V, Kaprelyants AS, Young DI, Young M, Kell DB. A bacterial cytokine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 8916-21.





- 43) Mukhopadhyay J, Braig HR, Rowton ED, Ghosh K. Naturally occurring culturable aerobic gut flora of adult *Phlebotomus papatasi*, vector of *Leishmania major* in the Old World. *PLoS One*. 2012; doi:10.1371/journal.pone.0035748.
- 44) Prado SS & Almeida PR. Role of symbiotic gut bacteria in the development of *Acrosternum hilare* and *Murgantia histrionica*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2009; 132 (1): 21-29. doi:10.1111/j.1570-7458.2009.00863.x
- 45) Rambaut A, Drummond A. FigTree: Tree figure drawing tool, version 1.2.2. *Inst. Evol. Biol*. 2008.
- 46) Rani A, Sharma A, Rajagopal R, Adak T, Bhatnagar RK. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi* an Asian malarial vector. *Bmc Microbiol*. 2009; doi:10.1186/1471-2180-9-96.
- 47) Ricci I, Valzano M, Ulissi U, *et al*. Symbiotic control of mosquito borne disease. *Pathogens and Global Health*. 2012; 106 (7): 380-385. doi:10.1179/2047773212Y. 0000000051.
- 48) Rinke R, Costa AS, Fonseca FP, Almeida LC, Delalibera Junior I, Henrique-Silva F. Microbial diversity in the larval gut of field and laboratory populations of the sugarcane weevil *Sphenophorus levis* (Coleoptera, Curculionidae). *Genet Mol Res*. 2011; 10 (4): 2679-91. doi:10.4238/2011.
- 49) Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003; doi:10.1093/bioinformatics/btg180.
- 50) Santos S, Neto IF, Machado MD, Soares HM, Soares EV. Siderophore production by *Bacillus megaterium*: effect of growth phase and cultural conditios. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014; 172 (1): 549-60. doi:10.1007/s12010-013-0562-y.
- 51) Toh SQ, Glanfield A, Gobert GN, Jones MK. Heme and blood-feeding parasites: friends or foes?. *Parasites & Vectors*. 2010; 3: 108. doi:10.1186/1756-3305-3-108.
- 52) Upadhyay SK, Sharma S, Singh H, *et al*. Whitefly Genome Expression Reveals Host-Symbiont Interaction in Amino Acid Biosynthesis. Ghanim M, ed. *PLoS ONE*. 2015; 10 (5): e0126751. doi:10.1371/journal.pone.0126751.
- 53) Weiss B, Aksoy S. Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends in parasitology*. 2011; 27 (11): 514-522. doi:10.1016/j.pt.2011.05.001.





- 54) World Health Organization. Model Prescribing Information. Drug used in Mycobacterial Disease. 1991; ISBN 92 4 140103 6.
- 55) World Health Organization. Chagas Disease (Fact Sheet N° 340). 2016; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en>.
- 56) Young M, Artsatbanov V, Beller HR, *et al.* Genome sequence of the Fleming strain of *Micrococcus luteus*, a simple free-living actinobacterium. *J. Bacteriol.* 2010; 192: 841-860.
- 57) Zeledón R, Guardia VM, Zúñiga A, Swartzwelder JC. Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) I. Life cycle, amount of blood ingested, resistance to starvation, and size of adults. *J Med Entomol.* 1970; 7 (4): 313-319.



