

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



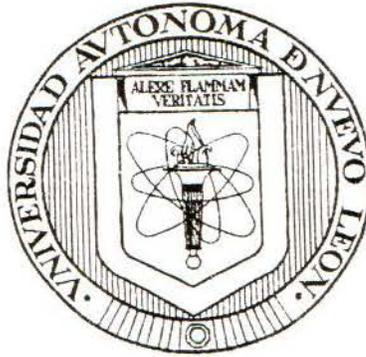
"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GENES QUE
CODIFICAN PARA LOS PEPTIDOS DE BAJO PESO
MOLECULAR DEL VENENO DE LA HORMIGA
Pseudomyrmex sp."

Por
M.C. FERMIN MAR AGUILAR

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en
Microbiología

Octubre, 2006

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“CARACTERIZACION MOLECULAR DE LOS GENES QUE
CODIFICAN PARA LOS PEPTIDOS DE BAJO PESO MOLECULAR
DEL VENENO DE LA HORMIGA *Pseudomyrmex* sp.”**

Por

M.C. FERMIN MAR AGUILAR

**Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología**

Octubre, 2006

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“CARACTERIZACION MOLECULAR DE LOS GENES QUE
CODIFICAN PARA LOS PEPTIDOS DE BAJO PESO MOLECULAR
DEL VENENO DE LA HORMIGA *Pseudomyrmex* sp.”**

Por

M.C. FERMIN MAR AGUILAR

**Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología**

Octubre 2006

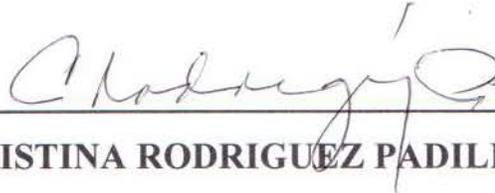
**“CARACTERIZACION MOLECULAR DE LOS GENES QUE
CODIFICAN PARA LOS PEPTIDOS DE BAJO PESO MOLECULAR
DEL VENENO DE LA HORMIGA *Pseudomyrmex sp.*”**

Comisión de la Tesis:



DRA. DIANA RESENDEZ PEREZ

Presidente



DRA. CRISTINA RODRIGUEZ PADILLA

Secretario



DR. MARIO MORALES VALLARTA

Vocal



DRA. LAURA TREJO AVILA

Vocal



DR. JUAN MANUEL ALCOCER GONZALEZ

Vocal

“Todo en la vida está escrito con un lápiz sobre el agua”
Kyabje Tulku Ugyen Rimpoche

Dedicatoria

Esta tesis esta dedicada a 3 personas con las que tengo la gran fortuna de coincidir en esta vida y que me han enseñado que lo mas valioso que tengo es disfrutar la vida con ellos cada día

A

Maribel, Lucia y Alejandro

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Diana Reséndez por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por toda la ayuda que me ha brindado durante mi estancia en su laboratorio y confiarme la realización del proyecto de las hormigas que tantas sorpresas y satisfacciones nos ha dado.

A la Bióloga Julieta Ledezma y la Bióloga Alejandra Valdivia del Departamento de Entomología del Museo de Historia Natural "Noel Kemp Mercado" de Santa Cruz, Bolivia porque gracias a su ayuda fue posible la colecta de las hormigas y por aguantar los piquetes durante la colecta.

A Dr. Jorge Verduzco por todos los valiosos consejos que me sirvieron para enriquecer este trabajo.

A Claudio Moreno compañero y amigo desde los tiempos de la ULIEG por todas las horas de consejos, enseñanzas, discusiones y debates que hicieron del laboratorio un lugar para descubrir y disfrutar.

A Maribel porque a pesar de tener muchas cosas que hacer tuvo el tiempo y la paciencia para lograr clonar y expresar los péptidos en varios vectores.

A Jeannie por las horas de plática sobre hormigas, péptidos, patentes y otras cosas mas que tanta falta hacen para tener ánimo de seguir trabajando.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado.

A los demás miembros del L8: Alejandra, Alejandro, Arturo, Carlos, Carolina, Delia, Diana, Ixchetyl, Izaskun, Karina, Melisa, Nancy, Paco, Ricardo, Salomé, Titi, Yenni y Wendy gracias por formar un equipo inigualable y por la diversión durante la comida.

...¿Llegará el momento en que habrá datos suficientes —preguntó el Hombre—, o el problema es insoluble en todas las circunstancias concebibles?

El AC Cósmico respondió: «Ningún problema es insoluble en todas las circunstancias concebibles».

—Cuanto tendrás datos suficientes para contestar la pregunta?

El AC Cósmico respondió: «Aun no hay datos suficientes para dar una respuesta significativa».

—¿Seguirás trabajando en ello?

El AC Cósmico respondió: «Lo haré».

—Esperaremos —dijo el Hombre...

*Isaac Asimov
La última pregunta
Cuentos completos 1, pp:385-399*

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Diana Reséndez Pérez.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
NOMENCLATURA.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	iv
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCION.....	3
4. HIPOTESIS.....	4
5. OBJETIVOS.....	4
5.1 Objetivo general.....	4
5.2 Objetivos particulares.....	4
6. IMPORTANCIA.....	5
7. ANTECEDENTES.....	6
7.1 Generalidades de toxinas presentes en los venenos.....	6
7.2 Biogénesis de los péptidos.....	7
7.3 Péptidos con propiedades anti-inflamatorias.....	7
7.4 Hormigas de la subfamilia Pseudomyrmicinae.....	8
7.5 Estudios de los péptidos de las hormigas de la subfamilia Pseudomyrmicinae.....	9
7.6 Caracterización de las mirmexinas.....	12
7.6.1 Efecto de las mirmexinas sobre un edema inducido por carragenina.....	14
8. ESTRATEGIA GENERAL.....	15
9. MATERIALES Y METODOS.....	16
9.1 Colecta las hormigas <i>Pseudomyrmex</i> sp.....	16
9.2 Caracterización morfológica.....	16
9.3 Diseño de oligonucleótidos.....	16
9.4 Obtención de la secuencia nucleotídica de las subunidades menores.....	17
9.4.1 Extracción de RNA total.....	17
9.4.2 Síntesis de DNAC.....	17
9.4.3 Amplificación de la secuencia nucleotídica de las subunidades menores.....	18
8.4.3.1 Electroforesis en gel de agarosa.....	19
9.4.4 Clonación del producto amplificado.....	19
9.4.4.1 Extracción de DNA plasmídico.....	20
9.4.4.1.1 Verificación de la presencia de inserto en las clonas obtenidas.....	20
9.4.4.2 Purificación del DNA plasmídico.....	21
9.4.5 Secuenciación de las clonas obtenidas.....	21
9.5 Obtención del DNAC completo de las subunidades menores.....	21
9.5.1 Amplificación rápida de los extremos del DNAC (RACE) de las subunidades menores.....	21
9.5.1.1 Desfosforilación del RNA.....	23
9.5.1.1.1 Precipitación del RNA.....	23
9.5.1.2 Eliminación del CAP del RNAm.....	24

9.5.1.3 Ligación del oligonucleótido de RNA al RNAm sin CAP.....	24
9.5.1.4 Transcripción reversa del RNAm.....	25
9.5.1.5 Amplificación de los extremos 5' y 3' del DNAc.....	26
9.5.1.5.1 PCR anidado.....	27
9.5.1.5.1.1 Clonación de los productos amplificados del DNAc completo de las subunidades menores.....	28
9.6 Obtención de la secuencia nucleotídica de los genes que codifican para las subunidades menores.....	28
9.7 Obtención de la secuencia nucleotídica de las subunidades mayores.....	29
9.7.1 Amplificación de la secuencia nucleotídica de las subunidades mayores.....	29
9.8 Obtención del DNAc completo de las subunidades mayores.....	30
9.8.1 Amplificación de los extremos 5' y 3' del DNAc de las subunidades mayores.....	30
9.8.2 Clonación de los productos amplificados del DNAc completo de las subunidades mayores.....	30
9.9 Obtención de la secuencia nucleotídica de los genes que codifican para las subunidades mayores.....	30
10. RESULTADOS.....	31
10.1 Colecta e identificación de la hormiga <i>Pseudomyrmex</i> sp.....	31
10.2 Extracción de DNA genómico y RNA total de la hormiga <i>Pseudomyrmex</i> sp.....	36
10.3 Amplificación de la secuencia nucleotídica de las subunidades menores de las mirmexinas mediante PCR.....	36
10.3.1 Clonación y secuenciación del producto amplificado de las subunidades menores de las mirmexinas.....	37
10.4 Obtención del DNAc completo de las subunidades menores de las mirmexinas utilizando la técnica de RACE.....	38
10.4.1 Obtención del extremo 3' del DNAc.....	38
10.4.2 Obtención del extremo 5' del DNAc.....	39
10.5 Amplificación de los genes de las subunidades menores.....	42
10.6 Amplificación mediante PCR del DNAc de las subunidades mayores.....	44
10.6.1 Clonación y secuenciación del producto amplificado de las subunidades mayores de las mirmexinas.....	45
10.7 Obtención del DNAc completo de las subunidades mayores de las mirmexinas utilizando la técnica de RACE.....	45
10.7.1 Obtención del extremo 3' del DNAc.....	45
10.7.2 Obtención del extremo 5' del DNAc.....	47
10.8 Amplificación de los genes de las subunidades mayores.....	49
11. DISCUSION.....	52
12. CONCLUSIONES.....	57
13. PERSPECTIVAS.....	59
14. LITERATURA CITADA.....	60
15. APENDICE DE PREPARACION DE REACTIVOS.....	65

NOMENCLATURA

%	Porcentaje
aa	Aminoácido
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Acido aspártico
ATP	Adenosin trifosfato
Ca ²⁺	Ión calcio
CIP	Fosfatasa intestinal de carnero
°C	Grados celsius
Da	Daltones
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAc	DNA complementario al RNA mensajero
DEPC	Dietil piro carbonato
DTT	Ditiotreitol
dNTP	Dinucleótidos trifosfatados
EDTA	Ácido etilen diaminotetra-acético
g	Gramos
GR-5'	Oligo GeneRacer 5'
GR-3'	Oligo GeneRacer 3'
GR-5'N	Oligo GeneRacer 5' anidado
GR-3'N	Oligo GeneRacer 3' anidado
GSP-5'	Oligo específico 5'
GSP-5'N	Oligo específico 5' anidado
GSP-3'	Oligo específico 3'
GSP-3'N	Oligo específico 3' anidado
GSP-3'N	Oligo específico 3' anidado
His	Histidina
KDa	Kilodaltones
Kg	Kilogramo
L	Litro
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
log	Logaritmo base 10
LS1	Subunidad mayor 1
LS2	Subunidad mayor 2
LS3	Subunidad mayor 3
LS4	Subunidad mayor 4
Lys	Lisina
M	Concentración Molar
mg	Miligramos
miliQ	Agua ultrapurificada
min	Min

ml	Mililitros
mM	Concentración milimolar
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Concentración micromolar
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno
Poli A	Cola de poli adeninas
RACE	Amplificación rápida de los extremos de un DNAC
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Acido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
seg	Segundos
SB	Sodio Boratos
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SS1	Subunidad menor 1
SS2	Subunidad menor 2
SS3	Subunidad menor 3
SS4	Subunidad menor 4
SOC	Medio de cultivo bacteriano rico en sales
Taq	DNA polimerasa proveniente del microorganismo <i>Thermophilus aquaticus</i>
TENS	Buffer para extracción de DNA plasmídico
Thr	Treonina
Tm	Temperatura media de alineamiento
TAP	Pirofosfatasa ácida de tabaco
U	Unidades
UV	Ultravioleta
V	Voltios
X	Veces la concentración
Xgal	5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactosido

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Biogénesis de los péptidos.....	7
2	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las subunidades de las mirmexinas.....	13
3	Estrategia general.....	15
4	Esquema de amplificación rápida de los extremos de un DNAC (RACE).....	22
5	Morfología de <i>Pseudomyrmex</i> sp colectada en Santa Cruz, Bolivia.....	32
6	Disección y análisis morfológico de la cabeza de <i>Pseudomyrmex</i> sp.....	33
7	Disección del tórax y abdomen de <i>Pseudomyrmex</i> sp.....	34
8	Anexos torácicos de <i>Pseudomyrmex</i> sp.....	35
9	DNA genómico y RNA total de <i>Pseudomyrmex</i> sp.....	36
10	Amplificación de las secuencias nucleotídicas codificantes de las subunidades menores mediante PCR.....	37
11	Obtención del extremo 3' de la subunidad SSI del DNAC de <i>Pseudomyrmex</i> sp.....	39
12	Obtención del extremo 5' de la subunidad SSI del DNAC de <i>Pseudomyrmex</i> sp.....	40
13	Predicción de la presencia de un péptido señal en la secuencia SS2.....	41
14	Amplificación de los genes de las subunidades menores usando un gradiente de temperatura.....	43
15	Estructura de los genes de las subunidades menores.....	44
16	Amplificación de las secuencias nucleotídicas codificantes de las subunidades mayores mediante PCR.....	45
17	Obtención del extremo 3' de la subunidad LSI del DNAC de <i>Pseudomyrmex</i> sp.....	46
18	Obtención del extremo 5' de las subunidades mayores del DNAC de <i>Pseudomyrmex</i> sp.....	47
19	Predicción de la presencia de un péptido señal por el programa SignalP 3.0.....	48
20	Amplificación de los genes de las subunidades mayores.....	50
21	Diagrama de la estructura de los genes de las subunidades mayores.....	50

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Características de las proteínas del veneno de <i>P. triplarinus</i>	10
II	Actividad de los componentes del veneno de <i>P. triplarinus</i>	10
III	Aminoácidos libres encontrados en el veneno de <i>P. triplarinus</i>	11
IV	Pesos moleculares de las isoformas de las mirmexinas.....	12
V	Pesos moleculares de las subunidades de las mirmexinas.....	13
VI	Inhibición del edema inducido por carragenina debido a las mirmexinas y al veneno completo.....	14
VII	Reacción de transcripción reversa.....	18
VIII	Reacción de PCR para la amplificación de la secuencia nucleotídica de las subunidades menores.....	18
IX	Condiciones de amplificación de la secuencia nucleotídica de las subunidades menores.....	19
X	Reacción de digestión para la verificación de la presencia del inserto.....	21
XI	Reacción de desfosforilación.....	23
XII	Reacción para la eliminación del CAP.....	24
XIII	Reacción de ligación del oligonucleótido de RNA.....	24
XIV	Reacción de transcripción reversa.....	25
XV	Amplificación de los extremos del DNAc.....	26
XVI	Condiciones de amplificación para los extremos del DNAc.....	26
XVII	Reacción de PCR anidado de los extremos del DNAc.....	27
XVIII	Condiciones de amplificación del PCR anidado para los extremos del DNAc de las subunidades menores.....	27
XIX	Reacción de PCR para la amplificación de la secuencia nucleotídica de los genes que codifican para las subunidades menores.....	28
XX	Condiciones de amplificación de la secuencia nucleotídica de los genes que codifican para las subunidades menores.....	29
XXI	Reacción de PCR para la amplificación de la secuencia nucleotídica de las subunidades mayores.....	29

1. RESUMEN

Debido a que existe evidencia que los péptidos de bajo peso molecular que componen el veneno de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus* poseen actividad anti-inflamatoria, el objetivo de esta tesis consistió en clonar y secuenciar los DNAC completos para las subunidades menores y mayores de las mirmexinas, así como determinar la estructura del gen que codifica para cada uno de éstos péptidos de bajo peso molecular. La colecta de las hormigas *Pseudomyrmex* sp. fue realizada en el Jardín botánico de la ciudad de Santa Cruz de la Sierra, Republica de Bolivia con la colaboración del Departamento de Entomología del Museo de Historia Natural "Noel Kemp Mercado" de esa ciudad. Para la búsqueda de la secuencia de los DNACs que codifican para los péptidos de bajo peso molecular se diseñaron oligonucleótidos degenerados que fueron utilizados para la amplificación del DNAC codificante para cada subunidad. La técnica de amplificación rápida de los extremos de un DNAC permitió obtener las secuencias nucleotídicas completas de los DNACs codificantes para las subunidades menores y mayores SS2, SS3, LS1, LS2 así como las secuencias de tres subunidades nuevas denominadas SS4, LS3 y LS4 incluyendo 54 pb de la región 5' no traducible y 137 pb de la región 3' no traducible. Las secuencias nucleotídicas obtenidas en esta tesis demostraron la presencia de un aminoácido extra en el extremo carboxilo terminal de las subunidades menores y dos aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal de las subunidades mayores. Las regiones no traducibles de ambos extremos fueron utilizadas para el diseño de oligonucleótidos específicos para la amplificación de los genes completos de cada una de las subunidades. La secuenciación de las bandas obtenidas en este ensayo permitió observar por primera vez la secuencia nucleotídica correspondiente a los genes de las subunidades menores y mayores, los cuales presentaron la misma estructura de 4 exones y 3 intrones (a excepción de SS4 que tiene 3 exones y 2 intrones). Un hallazgo interesante de esta tesis fue que las secuencias de los intrones de las subunidades menores y mayores mostraron porcentajes elevados de similitud de al menos 70%, asimismo las regiones 5' y 3' no traducibles mostraron un 83% y 97% de similitud respectivamente, mientras que el péptido señal entre las subunidades mayores y menores mostraron una similitud del 84% y del 70% con el péptido señal de la hormiga *Myrmecia pilosula*. Esta alta similitud podría indicar que probablemente los genes que codifican para estas subunidades proceden de un mismo origen, es decir un gen ancestral que dio origen a estas secuencias. En resumen los resultados de esta tesis permitieron la obtención de las secuencias nucleotídicas de los genes y los DNACs de las distintas subunidades que pueden ser clonados en un vector apropiado para la obtención de grandes cantidades de estos péptidos para el análisis funcional de los mismos. Además, los altos porcentajes de similitud entre las secuencias de las subunidades menores y mayores abren la posibilidad de que estas secuencias puedan ser utilizadas para el estudio filogenético de las hormigas con glándula venenosa.

2. ABSTRACT

Due to the evidence that low molecular weight peptides isolated from venom of tropical ant *Pseudomyrmex triplarinus* have anti-inflammatory properties, the objective of this thesis was to clone and sequence the complete cDNAs of the small and large subunits of myrmexins to determine the structure of the genes encoding for this peptides of low molecular weight. The *Pseudomyrmex* sp ants were collected at the botanical garden at Santa Cruz de la Sierra, Bolivia with the collaboration of the Entomology Department of the Museo de Historia Natural "Noel Kemp Mercado". To obtain cDNAs sequences codifying of the low molecular weight peptides degenerated oligonucleotides were used. We identified by rapid amplification of cDNA ends (RACE) from total RNA ant complete cDNAs encoding small and large subunits of myrmexins SS2, SS3, LS1, LS2 and nucleotide sequences of three new subunits named SS4, LS3 and LS4, including 54 bp of the 5' UTR and 137 bp of 3' UTR. The nucleotide sequences obtained in this thesis showed one extra aminoacid at the C-terminal end of the small subunit and two extra aminoacids at the C-terminal end of the large subunit. 5' and 3' UTR sequence were used to design specific oligonucleotides for amplification of the corresponding genes. Sequences of the bands obtained in this assay showed for first time genes codifying for small and large subunits with same structure containing 4 exons and 3 introns in all genes, except for SS4, which contained 3 exons and 2 introns. One interesting finding in the sequences of introns of large and small subunits was a high similarity (70%) and the comparison of the sequences of 5' and 3' UTR of small versus large subunits showed 83% and 97% of similarity respectively, meanwhile signal peptide of small and large subunits showed a similarity of 84% and compared to the signal peptide of *Myrmecia pilosula* showed a 70% of similarity. In summary we got the complete cDNAs and nucleotide sequences of all genes encoding the small and large subunits of myrmexins to be cloned in expression vectors able to obtain enough recombinant peptides for the functional assays. In addition, sequence similarity obtained may be an indication of these genes proceeds from one ancestral gene and we propose that these sequences may be used to study of phylogenetic relationships in ants with venom gland.

3. INTRODUCCION

Las toxinas han evolucionado en plantas, animales y microbios como parte de su sistema de defensa o como una estrategia para capturar a sus presas, la mayoría de los venenos comprenden mezclas altamente complejas de péptidos a menudo con características farmacológicas diferentes (Lewis and García, 2003). A pesar de que en general se cataloga a los venenos de forma negativa muchos de ellos presentan un papel importante en el desarrollo de nuevos medicamentos de origen natural que los proponen como nuevos candidatos en terapias para diversos padecimientos. Entre los venenos mas estudiados se encuentran los producidos por insectos sociales como las abejas (Habermann, 1971), avispas, abejorros y hormigas, además de las arañas y reptiles (Pastrana, *et al.*, 2003). Estos organismos han sido considerados como una farmacia natural debido a que los péptidos aislados poseen diferentes propiedades terapéuticas como son: antibacterianas (Cruciani *et al.*, 1992; Duclohier *et al.*, 1989), antifúngicas (Cociancich *et al.*, 1993), analgésicas (Lewis and García, 2003) ó anti-inflamatorias (Neumann *et al.*, 1952). En los años 80s un extracto parcialmente purificado del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. fue probado en un estudio de doble ciego en pacientes con artritis reumatoide. La pacientes que fueron tratados con el veneno mostraron mejoría en los síntomas así como la disminución en el número de articulaciones con dolor y con inflamación. El índice de articulaciones inflamadas mejoró en un 60% en los pacientes tratados con el veneno, aunque otros parámetros no mostraron cambio significativo. La reducción de las articulaciones inflamadas fue seguida por una mejoría en los síntomas que algunas veces duró por semanas. Las reacciones secundarias se limitaron a eritema en el lugar de la infección (todos los pacientes) y prurito local (dos terceras partes de los pacientes; Altman *et al.*, 1984). Los péptidos de menor peso molecular del veneno de *P. triplarinus* denominados mirmexinas presentaron una alta actividad anti-inflamatoria al ser probados en un modelo animal (Pan and Hink, 2000).

Debido a la importancia potencial de los péptidos de bajo peso molecular del veneno de *Pseudomyrmex* sp, en esta tesis realizamos la clonación de los DNACs completos codificantes a los péptidos de bajo peso molecular y la clonación de los genes que codifican para estos péptidos que permitieron la determinación de la estructura de los distintos genes. Las secuencias nucleotídicas obtenidas permitirán en el futuro la clonación de estas secuencias en vectores de expresión para obtener cantidades suficientes de estos péptidos que permitan realizar estudios funcionales sobre su actividad en el proceso anti-inflamatorio *in vitro* e *in vivo*.

4.0 HIPOTESIS

La caracterización molecular de los genes que codifican a las mirmexinas permitirá estudiar la participación de estos péptidos en los procesos inflamatorios

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Clonar las secuencias codificantes de los péptidos de bajo peso molecular del veneno de *Pseudomyrmex* sp así como realizar la caracterización de los genes que codifican para estos péptidos.

5.2 Objetivos Particulares

1. Realizar una colecta de hormigas de la especie *Pseudomyrmex* sp en la ciudad de Santa cruz, Bolivia.
2. Realizar la caracterización morfológica de la hormiga *Pseudomyrmex* sp
3. Realizar la extracción de RNA y DNA de la hormiga *Pseudomyrmex* sp
4. Determinar las secuencias nucleotídicas completas del DNAC que codifica para la síntesis de los péptidos de bajo peso molecular del veneno de *Pseudomyrmex* sp
5. Determinar la estructura de los genes que codifican para los péptidos de bajo peso molecular del veneno de *Pseudomyrmex* sp

6. IMPORTANCIA

Los tratamientos actuales disponibles para tratar la Artritis Reumatoide proporcionan alivio al dolor y reducción de la inflamación así como mejoría en el desarrollo de la enfermedad; pero ninguno es curativo; todos ellos provocan importantes y variadas reacciones adversas. Por lo tanto, es de suma importancia la búsqueda de nuevos tratamientos que ofrezcan una ayuda eficaz en los síntomas y pronóstico de esta enfermedad. En estudios de laboratorio se ha probado el efecto anti-inflamatorio de las mirmexinas en un modelo animal, por ello la caracterización molecular de las secuencias nucleotídicas que codifican para los péptidos que componen las mirmexinas es de vital importancia para la clonación de las secuencias de estos péptidos en los vectores de expresión adecuados para su obtención de grandes cantidades que permitan mayores estudios de estos péptidos. Así mismo el conocimiento de la estructura de los genes que codifican para estos péptidos puedan dar indicios del grado de conservación de estas secuencias en el genoma de la hormiga, lo cual sería muy útil en la búsqueda de la presencia de estos péptidos en otras especies de hormigas.

7. ANTECEDENTES

7.1 Generalidades de toxinas presentes en los venenos

Las toxinas han evolucionado en plantas, animales y microbios como parte de su sistema de defensa o como una estrategia para capturar a sus presas, la mayoría de los venenos comprenden mezclas altamente complejas de péptidos a menudo con características farmacológicas diferentes. Las toxinas no peptídicas son activas oralmente mientras que las toxinas peptídicas se encuentran usualmente con venenos de origen animal y están asociadas con un aparato especializado para su inyección y que permite la liberación de este en el tejido blando de los animales vía subcutánea, intramuscular o intravenosa. Los venenos peptídicos necesitan ser lo suficientemente estables para sobrevivir a la degradación química a temperatura ambiente y a la degradación enzimática debida a las proteasas presentes en el veneno así como las presentes en los tejidos de la presa. La estabilidad necesaria es a menudo alcanzada de manera natural a través de modificaciones post-traduccionales como amidación del extremo C-terminal, sulfatación de las tirosinas, bromidación del triptófano, glicosilación en las treoninas, etc así como la formación de puentes disulfuro que pliegan el péptido para que este alcance una estructura estable. Enzimas específicas son utilizadas durante la producción de los venenos peptídicos para introducir estas modificaciones en posiciones específicas, las cuales pueden incrementar la biodisponibilidad, la potencia y la estabilidad. A pesar de todas estas modificaciones, los venenos peptídicos no siempre tienen todos los requerimientos óptimos que se necesitan para ser utilizados en aplicaciones terapéuticas, ya que algunos de los aspectos que deben tomarse en cuenta para este tipo de aplicaciones incluyen la formulación, costo de producción, estabilidad, selectividad y mecanismo de acción. Quizá una de las limitaciones mas grandes de los péptidos es su incapacidad para cruzar las capas epiteliales incluyendo la barrera sangre-cerebro, además debido a su tamaño relativamente grande y naturaleza hidrofílica los venenos peptídicos (10 a 40 aa) tienen generalmente una biodisponibilidad oral muy pobre. Debido a esto es muy típico observar que los péptidos deben ser administrados directamente en el sitio donde se requiere su acción ya sea por inyección intravenosa, intratecal, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o epidural (Lewis and García, 2003).

7.2 Biogénesis de los péptidos

Los péptidos son pequeñas moléculas formadas por cadenas de 2 a 50 aminoácidos (Zamyatnin, 1991a,b) encontrados en todos los organismos vivos. Generalmente son llamados moléculas regulatorias, debido a que la mayoría de ellos están involucrados en procesos de regulación fisiológica en los sistemas: nerviosos, endocrino e inmune. La biogénesis de los péptidos se caracteriza en general por la producción de un polipéptido precursor el cual está compuesto por tres fragmentos como se muestra en la Figura 1. El primer fragmento pre- se le denomina péptido señal, el segundo fragmento pro- es el precursor del péptido, el cual puede incluir uno o varios péptidos (Figuras 1a y b). Inicialmente se libera el péptido señal quedando el propéptido y el péptido como se muestran en la Figura 1c y mediante la acción de proteasas se libera el péptido individual como se muestra en la Figura 1d (Zamyatnin, 2004).

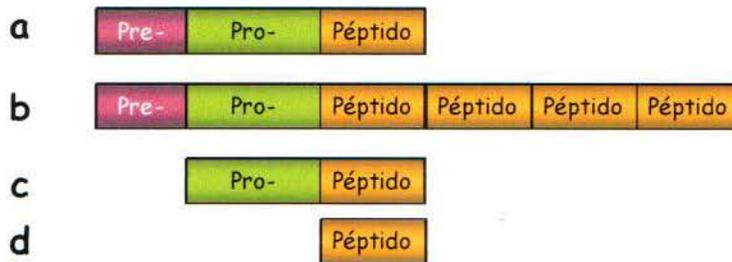


Figura 1. Biogénesis de los péptidos. El esquema representa el procesamiento de los péptidos a partir de un polipéptido precursor. a) El precursor de los péptidos contiene tres regiones Pre-, Pro- y Péptido, b) El precursor puede contener varios péptidos, c) región del propéptido y péptido, d) péptido.

7.3 Péptidos con propiedades anti-inflamatorias

Los venenos de insectos y de reptiles han sido descritos como benéficos en el tratamiento de condiciones inflamatorias en humanos (Tu, 1977). Desde la época de los romanos se utilizaba el veneno de la abeja con un valor terapéutico para algunos desordenes inflamatorios en humanos, como es la Artritis Reumatoide. Thompson en 1933 describió al veneno de abejas como un agente curativo o calmante para ciertos tipos de reumatismos. El aislamiento de un péptido del veneno de la abeja *Apis mellifera* el cual es activo en el proceso de desgranulación de los mastocitos, llamado péptido MCD del inglés Mast Cell-Degransulating (Fredholm, 1966; Breithaupt and Habermann, 1968), posteriormente fue designado con el nombre de péptido 401 (Gauldie *et al.*, 1976) el cual ha sido descrito como terapéuticamente útil como un factor anti-inflamatorio. Los experimentos utilizando el modelo de edema en ratas inducido con carragenina, permitieron describir al péptido 401 como un potente agente anti-inflamatorio (Banks *et al.*, 1976). La desventaja de utilizar la apiterapia es que se tiene que utilizar el veneno

completo de la abeja para que tenga un efecto lo cual puede causar hipersensibilidad en pacientes además que la terapia es dolorosa y estresante.

Dentro de los insectos con propiedades benéficas encontramos a la hormiga *Pseudomyrmex arboris-sanctae* conocida actualmente *Pseudomyrmex triplarinus*, la cual se encuentra asociada al árbol *Triplaris americana* conocido en Brasil como "Tachi", en Perú como "Tangarana" y en Bolivia como "Palo Santo" o "Palo diablo". Algunos nativos en Sudamérica golpeaban el árbol permitiendo que las hormigas que viven en simbiosis en la cavidad medular del árbol les inyectara el veneno observando que había una mejoría en la inflamación que padecían (Wheeler, 1942).

7.4 Hormigas de la subfamilia Pseudomyrmicinae

Las hormigas Pseudomyrmecinas son generalmente delgadas y de tamaños medianos, similares a las hormigas ponerinas, pero las de la familia Pseudomyrmecinae son casi exclusivamente arborícolas, diurnas y con el pecíolo y el postpecíolo entre el gaster (abdomen) y el tórax. Los ojos son grandes y son usados para cazar y evitar depredadores. El aguijón está bien desarrollado y pueden picar muy fuerte. Estas hormigas son negras, café, rojas y/o amarillas. Muchas de estas especies tienen ámbitos de distribución que se extienden bastante hacia el norte y hacia el sur del país. *Pseudomyrmex* está poco representado en cuanto a especies en las zonas extra-tropicales. Se encuentran estas hormigas en todas las áreas neotropicales bajo unos 2000 m de altura. En Costa Rica se encuentran en todos los tipos de hábitats abajo de los 2000 m, y tiene igual número de especies en bosque seco que en bosque lluvioso.

Las especies de *Pseudomyrmex* son depredadoras de insectos pequeños y es frecuente encontrarlas buscando presas o visitando glándulas nectáreas en la vegetación de hoja ancha. Cada hormiga busca comida solitariamente, y no se da agrupamiento en una fuente de comida. Todas tienen sus nidos dentro de las ramas o espinas huecas. La mayoría de las especies no están restringidas a una especie de árbol para nidificación. Sin embargo unas pocas especies participan en un mutualismo en el que ellas protegen la planta donde se hospedan (ejemplos son las hormigas del cornizuelo, del palo santo y del laurel, con sus respectivas plantas - *Acacia collinsii*, *Triplaris melanaeodendron* y *Cordia alliodora*). Estas especies de *Pseudomyrmex* son diurnas y nocturnas. Las hembras aladas de *Pseudomyrmex* son cortejadas y copulan durante la madrugada en la cima de una copa de un árbol alto y ambos sexos son muy diferentes en su apariencia. Una colonia normalmente tiene sólo una reina. Los nidos frecuentemente son pequeños, de solamente unos cientos de larvas y adultos; las larvas y los adultos de una reina pueden estar repartidas entre varios nidos. Sin embargo, las especies que forman mutualismos con una especie de planta pueden tener colonias muy grandes, por ejemplo, una colonia de hormigas del cornizuelo puede contener hasta 100,000 individuos (Janzen, 1966). Una de las primeras descripciones muy precisas de la relación de este árbol con las Pseudomyrmicinae (Schultz and Arnold, 1984) es la que realizó el jesuita Bernabé Cobo en su libro Historia del Nuevo Mundo publicado en 1653 y que dice así:

“El árbol tiene cavidades por todas partes desde el tronco hasta las ramas mas delgadas las cuales están llenas de unas hormigas amarillas bastante grandes, muy virulentas y su picadura es capaz de causar fiebre y muy dolorosa. Debido a las hormigas están ocultas en el árbol estas no son visibles y por esta razón aquel quien no conoce el secreto, no esta en guardia para defenderse; ya que cuando una simple hoja es tocada un enjambre de hormigas sale de todas partes del árbol y atacan a la persona que esta tocando el árbol y si no se retira a tiempo, la torturan con sus picaduras”.

7.5 Estudios de los péptidos de las hormigas de la subfamilia Pseudomyrmicinae

En 1984 un extracto parcialmente purificado del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex* sp fue probado en un estudio de doble ciego en pacientes con artritis reumatoide. La pacientes que fueron tratado con el veneno mostraron mejoría en los síntomas como la disminución en el número de articulaciones con dolor y con inflamación. El índice de articulaciones inflamadas mejoró en un 60% en los pacientes tratados con el veneno, aunque otros parámetros no mostraron cambio significativo. La reducción de las articulaciones inflamadas fue seguida por una mejoría en los síntomas que algunas veces duró por semanas. Las reacciones secundarias se limitaron a eritema en el lugar de la infección (todos los pacientes) y prurito local (dos terceras partes de los pacientes) (Altman *et al.*, 1984).

En 1994 Hink y colaboradores realizaron la caracterización bioquímica parcial del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus*, en este estudio ellos demostraron que el veneno contiene 11 proteínas con pesos moleculares comprendidos entre 97 000 y 4200 Da y una de mas de 100 000 Da. El análisis densitométrico del gel reveló que las ocho proteínas de mayor peso molecular constituyen aproximadamente el 8% o menos del total de las proteínas presentes en el veneno. Las otras proteínas están presentes en cantidades significativamente mas grandes pero las bandas de las proteínas de menor peso molecular (4200 Da) tuvieron el mayor porcentaje con respecto al peso total de las proteínas del veneno con 44 %, los pesos moleculares y porcentajes con respecto a las proteínas totales se muestran en la tabla 1, de las cuales solo las 4 proteínas de mayor peso molecular estaban glicosiladas (Hink *et al.*, 1994).

Tabla I
Características de las proteínas del veneno de *P. triplarinus*

Proteínas	Peso Molecular (Da)	Porcentaje de proteína total
1-8	>100 000-40 000	8
9	24 500	8
10	20 400	25
11	14 100	17
12	4 200	44

Leluk y col. reportó que el veneno de 6 especies de hormigas contenían 2 proteínas con pesos moleculares similares de aproximadamente 75 000 y 24 000 Da y una o mas de peso molecular bajo (< 18 000 Da). El veneno de *Pseudomyrmex triplarinus* es similar en esto ya que contiene bandas de aproximadamente 75 000 y 24 500 Da y 2 de aproximadamente 18 000 Da. Los tres polipéptidos con los pesos moleculares mas bajos en *P. triplarinus* son mas ligeros que la mayoría de las proteínas descritas para venenos de 14 especies de avispas. Sin embargo, los péptidos de bajo peso molecular son comunes en venenos de otros Himenóptera, por ejemplo las melitinas de las abejas y alergenos de 13 000 a 24 000 Da presentes en las hormigas de fuego. Las pruebas para lipoproteínas fueron negativas así como para ácidos grasos, glicerol fue detectado a razón de 3.1 % del peso seco del veneno, cabe señalar que este fue el primer reporte de la presencia de este compuesto en el veneno de un artrópodo, sin embargo su presencia no fue propiamente una sorpresa ya que el glicerol se encuentra comúnmente en la hemolinfa del insecto (Hink *et al.*, 1994).

Los venenos de todas las especies de los Himenóptera son utilizados para defensa y contienen fosfolipasas. Estas enzimas funcionan como alergenos o agentes citolíticos. La actividad de fosfolipasa₂ en el veneno de *P. triplarinus* fue la mas elevada que se ha descrito (en un veneno completo) para una hormiga o abeja. La actividad fue de 292±10 U/mg la cual es mas de tres veces el valor reportado para la hormiga *P. badius*, el veneno de abeja tiene una actividad de 91 U/mg. En la tabla II se muestran los valores obtenidos en los ensayos de actividad de fosfolipasa, hemólisis y actividad de hialuronidasa para todas las proteínas del veneno de *P. triplarinus* (Hink *et al.*, 1994).

Tabla II
Actividad de los componentes del veneno de *P. triplarinus*

Proteína	Actividad de fosfolipasa	Actividad hemolítica	Actividad de hialuronidasa
Veneno total	292	5.8	+
1-8	Sin actividad	Sin actividad	+
9	1800	6.2	Sin actividad
10	2000	Sin actividad	Sin actividad
11	1800	31	Sin actividad
12	Sin actividad	70	Sin actividad

Además finalmente, se demostró que el veneno de *P. triplarinus* contiene 17 aminoácidos libres que comprenden el 3 % del peso seco del veneno total. Los aminoácidos mas concentrados fueron ácido aspártico, ácido glutámico y prolina, estos aminoácidos juntos conforman el 72 % de la masa total de aminoácidos. El veneno de *P. triplarinus* es similar al veneno de otras hormigas en el aspecto de que todos tienen elevados niveles de ácido glutámico. En la tabla III se muestran los porcentajes de todos los aminoácidos libres encontrados en el veneno de *P. triplarinus* (Hink *et al.*, 1994).

Tabla III
Aminoácidos libres encontrados en el veneno de *P. triplarinus*

Aminoácido	% peso seco en veneno	Aminoácido	% peso seco en veneno
Asp	1.14	Val	0.07
Glu	0.45	Gly	0.06
Pro	0.32	Tyr	0.06
Ser	0.17	Leu	0.05
Arg	0.17	Thr	0.05
Ala	0.15	Ile	0.03
His	0.12	Phe	0.03
Trp	0.11	Lys	0.02
		Met	0.02

Otros investigadores han analizado los componentes del veneno de esta hormiga en un esfuerzo por identificar compuestos anti-inflamatorios y se describió un polisacárido heterogéneo con 6 azúcares que activa la vía del complemento, ellos describieron que el veneno contenía polisacáridos que al ser hidrolizados producían 2 pequeños oligosacáridos (840 y 430 Da) y el mas grande de estos activaba la vía del complemento (Dieminger L *et al.*, 1979; Schultz and Arnold, 1977, 1978, 1979, 1981, 1984; Schultz *et al.*, 1979). Sin embargo el veneno estudiado fue obtenido macerando el abdomen de las hormigas en solución salina lo cual sin lugar a dudas contaminó el veneno con el contenido intestinal y las enzimas digestivas y se piensa que estas son las verdaderas fuentes de estos materiales (Hink *et al.*, 1994).

7. 6 Caracterización de las mirmexinas

El complejo de las mirmexinas fue aislado por cromatografía de baja presión y al analizarlo en SDS-PAGE se observó una sola banda. El fraccionamiento del veneno mediante HPLC dió 6 picos continuos que corresponden a cada isoforma de las mirmexinas. Posteriormente cada uno de los picos fue purificado a homegeneidad y por medio de MALDI-TOF se determinó su peso molecular, la tabla IV muestra los pesos moleculares de cada una de las isoformas de las mirmexinas (Pan and Hink, 2000).

Tabla IV
Pesos moleculares de las isoformas
de las mirmexinas

Mirmexinas	Peso molecular (Da)
I	7069
II	6998
III	7090
IV	7143
V	7017
VI	7069

Una vez que las mirmexinas fueron purificadas, el complejo fue sometido a reducción, lo cual mostró la presencia de dos bandas que migraron mas abajo que el complejo nativo de las mirmexinas, esto demostró que las mirmexinas estaban constituidas por 2 subunidades unidas entre si por puentes disulfuro. Utilizando HPLC se purificaron todas las subunidades y por medio de MALDI-TOF se determinó el peso molecular de cada una de ellas. En base al peso molecular de cada una de las subunidades las mirmexinas fueron clasificadas como subunidades mayores (LS1, por sus siglas en inglés) y subunidades menores (SS1, por sus siglas en inglés). Los pesos moleculares de todas las subunidades se muestran en la tabla V. Estos resultados demostraron que cada una de las isoformas de las mirmexinas están formadas por una subunidad menor y una subunidad mayor, unidas entre si por un puente disulfuro. Una vez calculados los pesos moleculares de las subunidades se pudo inferir cuales subunidades están formando cada una de las isoformas, por lo tanto la mirmexina I está formada por las subunidades SS1 y LS2, la mirmexina II por SS1 y LS1, la mirmexina III por SS2 y LS2, la mirmexina IV por SS3 y LS2, la mirmexina V por SS2 y LS1 y la mirmexina VI por SS3 y LS1 (Pan and Hink, 2000).

Tabla V
Pesos moleculares de las subunidades de las mirmexinas

Subunidad	Peso molecular (Da)	Subunidad	Peso molecular (Da)
SS1	3343	LS1	3644
SS2	3372	LS2	3722
SS3	3425		

Cada una de las subunidades fue sometida a secuenciación de aminoácidos para determinar su composición aminoacídica y su grado de similitud. Como se esperaba las subunidades menores mostraron un alto grado de similitud entre si. La subunidad SS1 difiere de las subunidad SS2 por 1 sola substitución aminoacídica (Lys₁₀ en SS1 por Arg₁₀ en SS2) y de la subunidad SS3 por 4 substituciones (Gly₄-Leu₅-Leu₆-Lys₁₀ en SS1 por Asn₄-Ile₅-Ile₆-Arg₁₀). Por otro lado, las subunidades mayores también mostraron una gran similitud ya que solo 7 aminoácidos (Leu₁-Gly₄-Thr₅-Leu₁₃-Ala₁₄-Asn₂₂-His₂₃) fueron reemplazados por (Ile₁-Ala₄-Gln₅-Ile₁₃-Lys₁₄-Asp₂₂-Asn₂₃). En la figura 2 Se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de todas las subunidades de las mirmexinas (Pan and Hink, 2000).

Subunidades menores

```

SS1  LFGGLLDKLLK  EKIKKYCNKE  NLDKACSKL
SS2  -----R  -----
SS3  ---NII---R  -----

```

Subunidades mayores

```

LS1  LSLGTIKKLL  QILAQGLKAI  CNHRDDLIAGK  CQA
LS2  I-AQ-----  --IK-----  -DN-----

```

Figura 2 . Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las subunidades de las mirmexinas. El alineamiento de las secuencias de las subunidades menores y mayores mostró el alto grado de similitud entre las subunidades mayores y menores.

La técnica de MALDI-TOF fue empleada para calcular los pesos moleculares de las mirmexinas, esta técnica se caracteriza por su exactitud y flexibilidad en la medición de los pesos moleculares de biopolímeros (Kaufmann, 1995). Típicamente, la exactitud de la masa determinada por MALDI-TOF es de alrededor de $\pm 0.1\%$ para proteínas que tienen un rango de peso molecular de 1 a 40 kDa (Zaluzec et al., 1995). En este estudio los pesos moleculares determinados por MALDI-TOF para las subunidades menores fueron muy cercanos a los calculados a partir de la secuencia de aminoácidos, sin embargo para las subunidades mayores se encontró que los valores de peso molecular calculados por MALDI-TOF eran 112 y 114 Da (LS1 y LS2, respectivamente) mas

elevados que los calculados en base a la secuencia de aminoácidos. Los autores llegan a la conclusión de que la diferencia en el peso molecular se debe a modificaciones post-traduccionales que la secuenciación fue incapaz de detectar (Pan and Hink, 2000).

La investigación en el campo de la caracterización bioquímica de las sustancias anti-inflamatorias en venenos de hormigas todavía es muy limitada. En cambio las proteínas con propiedades anti-inflamatorias en el veneno de abeja han sido investigadas mas que la de cualquier otro insecto (Billingham *et al.*, 1973; Gauldie *et al.*, 1978; Chang and Bliven, 1979; Eiseman *et al.*, 1982; Shkenderov and Koburova, 1982; Koburova *et al.*, 1985; Banks *et al.*, 1990; Inoue *et al.*, 1994). Los mecanismos de la actividad anti-inflamatoria son diferentes dependiendo del tipo de proteínas presentes en el veneno. Por ejemplo la actividad anti-inflamatoria de los péptidos MCD se deben a su actividad sobre las desgranulación de los mastocitos y por ello reduce las fases de inflamación que son mediadas tanto química como celularmente (Banks *et al.*, 1990). La crotapotina, un polipéptido acomplejado con la fosfolipasa A₂ (PLA₂) proveniente del veneno de serpiente tiene efecto inhibitorio sobre el edema inducido por carragenina, ya que interactua con el PLA₂ extracelular generado durante el proceso de la respuesta inflamatoria (Landucci *et al.*, 1995). Las mirmexinas no muestran similitud con las proteínas mencionadas o con otras presentes en diferentes venenos por ello deben tener un mecanismo de inhibición de la inflamación diferente y que se desconoce.

7.6.1 Efecto de las mirmexinas sobre un edema inducido por carragenina

Las mirmexinas inhiben el edema inducido por carragenina en ratas de una manera dosis dependiente, debido a que las mirmexinas representan el 44 % de las proteínas totales del veneno de *P. triplarinus*, de manera que una dosis de mirmexinas de 5.4 mg/kg es la cantidad presente en una dosis de 12 mg/kg del veneno completo. Esta dosis de mirmexinas producen un 52% de la inhibición de la inflamación mientras que el veneno completo produce un 82% de inhibición, cuando se incremento la dosis de las mirmexinas 1.8 veces es decir 9.8 mg/kg se produjo una inhibición del edema del 90 %. Por lo tanto, es probable que las mirmexinas no sean las responsables de la actividad total del veneno de *P. triplarinus*. En la tabla VI se muestran los resultados completos de este experimento (Pan and Hink, 2000).

Tabla VI
Inhibición del edema inducido por carragenina debido a las mirmexinas y al veneno completo

Material inyectado	Dosis (mg/kg)	% de inhibición del edema
Veneno completo	12.0	82
Mirmexinas	9.8	90
Mirmexinas	5.4	52

8. ESTRATEGIA GENERAL

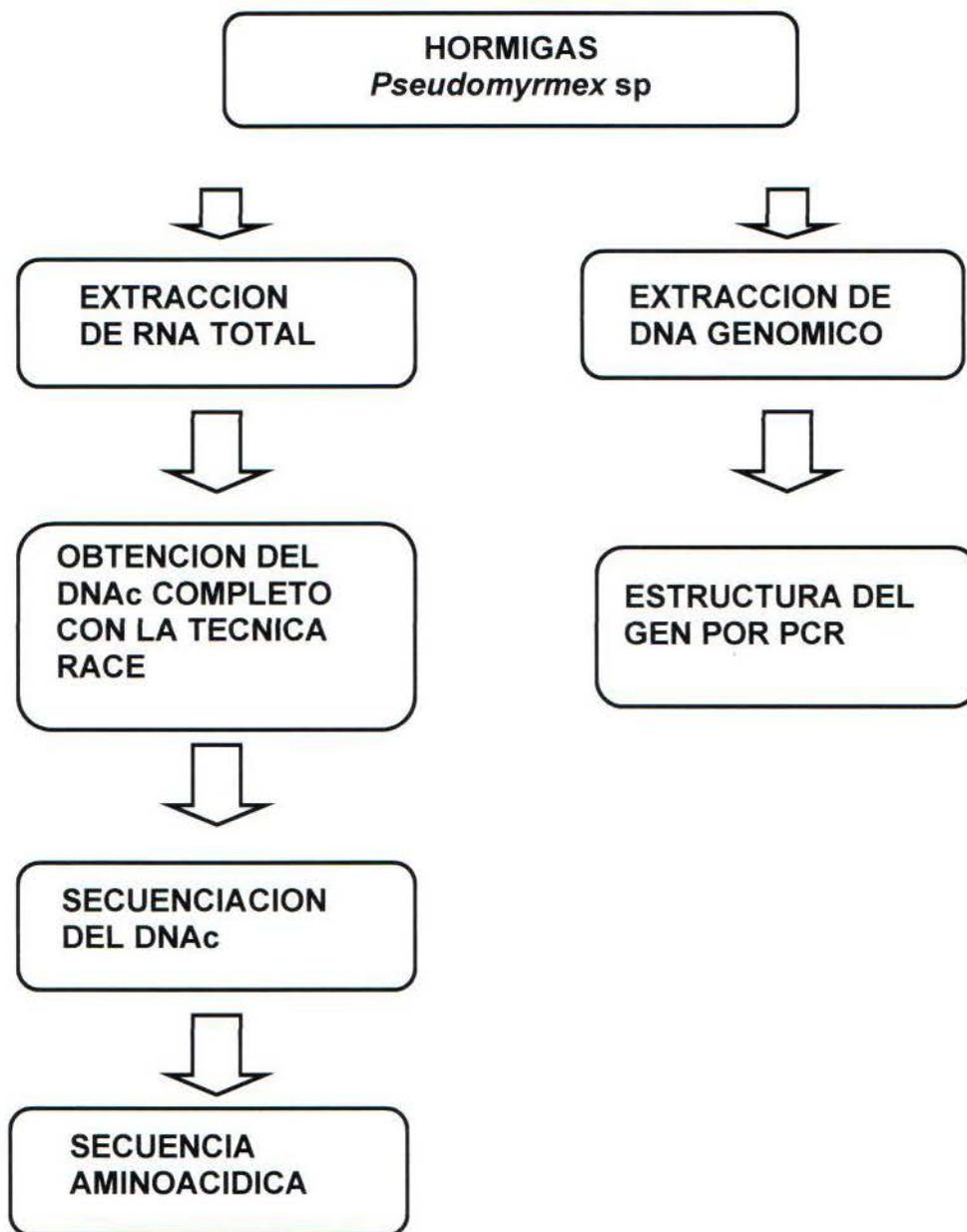


Figura 3. Estrategia general para la obtención de los DNAc completos y la estructura de los genes de los péptidos de bajo peso molecular del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex* sp.

9. MATERIALES Y METODOS

9.1 Colecta las hormigas *Pseudomyrmex* sp

La colecta se realizó utilizando la metodología descrita por Hink y colaboradores. en 1994. Una vez localizado el árbol *Triplaris americana* donde habitan las hormigas se procedió a la colecta como se describe a continuación.

1. En un recipiente limpio y seco se añadieron aproximadamente 50 ml de la solución "RNA later" (Ambion, Austin, Tx USA), esta es una solución acuosa, no tóxica para los tejidos que tiene la función de estabilizar y proteger el RNA celular, lo cual elimina la necesidad de congelar el tejido o este caso los organismos inmediatamente después de la colecta y lograr una buena conservación del RNA.
2. Utilizando una brocha de 2.5 cm de ancho se colectaron a las hormigas del tronco del árbol al recipiente que contenía la solución RNA later.
3. Una vez terminada la colecta, las hormigas fueron colocadas en un tubo falcon de 50 ml y este fue guardado en una mochila aislante que contenía bolsas de refrigerante para mantener la temperatura a 4°C, hasta el momento de guardar el tubo en refrigeración.
4. Posteriormente las hormigas fueron almacenadas a -20°C hasta la realización de la extracción del RNA.

9.2 Caracterización morfológica de la hormiga.

Las hormigas previamente colectadas fueron fotografiadas con la ayuda de un estereoscopio (Olimpus, USA) y disectadas utilizando instrumentos de disección.

9.3 Diseño de los oligonucleótidos utilizados en esta tesis

Los oligonucleótidos utilizados en esta tesis fueron diseñados utilizando los siguientes programas computacionales: DNA Strider 1.4f6, Amplify 1.1 y Blast 1.8. Los valores de temperatura media (Tm) de los oligonucleótidos, Tm del producto amplificado así como la temperatura de alineamiento teórica de la PCR fueron calculadas con las siguientes formulas (Mueller *et al.*, 1993; Sambrook *et al.*, 1989; Rychlik and Rhoads, 1989):

T_m del oligo= $81.5 + (16.6 \times \log [Na^+] + 41 \times \%GC - 675/\text{longitud del oligo}$

T_m del producto amplificado= $16.6 \times \log [Na^+] + 0.4 \times \%GC - 675/\text{longitud del producto amplificado} + 81.5$

Temperatura de alineamiento teórica= $0.3 \times T_m$ oligonucleótido + $0.7 \times T_m$ del producto amplificado- 14.9

La secuencia de todos los oligonucleótidos diseñados en esta tesis se muestra en el anexo 1.

9.4 Obtención de la secuencia nucleotídica de las subunidades menores

9.4.1 Extracción de RNA total

1. Se pesaron 100 mg de hormigas conservadas en la solución "RNA later" y se colocaron en un mortero, previamente horneado a 200°C por 2 horas.
2. Se agregó 1 ml de Trizol, se maceró con el pistilo y se dejó incubando por 5 min a temperatura ambiente.
3. Se añadieron 0.2 ml de cloroformo y se mezcló en el vortex durante 15 seg y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente.
4. Se centrifugó la muestra a 14 000 rpm durante 15 min a 4°C.
5. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se añadieron 0.5 ml de isopropanol y se incubó por 10 min a temperatura ambiente.
6. Se centrifugó la muestra por 8 min a 4°C.
7. Se removió el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 75 %, y se centrifugó por 5 min.
8. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se dejó secar al aire por 3 min y el RNA se resuspendió en 40 µL de agua DEPC.

9.4.2 Síntesis de DNAc

Para llevar a cabo la síntesis del DNAc se realizó lo siguiente.

1. A 3 µL (2 µg) de RNA total de *P. triplarinus* se le añadió 1 µL (0.5 µg/µL) de oligo dT y se añadieron 8 µL (para completar el volumen de reacción de 12 µL) de agua DEPC y se incubó a 70°C por 5 min. Una vez terminada la incubación se transfirió al hielo inmediatamente.
2. La mezcla de reacción para la transcripción reversa se preparó como se muestra en la tabla VII

Tabla VII
Reacción de transcripción reversa

Componente	Volumen (μL)
RNA + oligo dT (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	12
dNTP's (20 mM)	1
Buffer 5X	5
Agua DEPC	1
Volumen final	19

- Se añadió 1 μL de transcriptasa reversa (Invitrogen, CA USA) y se incubó a 42°C por 60 min.
- Al término de la incubación la reacción se detuvo incubando a 70°C por 10 min.
- El DNAc se almacenó a -20°C hasta su uso.

9.4.3 Amplificación de la secuencia nucleotídica de las subunidades menores

Para realizar la amplificación del DNAc de la subunidad SS1 se utilizaron los oligonucleótidos degenerados SS12 y SS123. Las concentraciones de los reactivos para la PCR se muestran en la tabla VIII.

Tabla VIII
Reacción de PCR para la amplificación de la secuencia nucleotídica de las subunidades menores

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración
SS12 100 ng/ μL	1	4 ng/ μL
SS123 100 ng/ μL	1	4 ng/ μL
Buffer 10X	2.5	1X
MgCl ₂ 25 mM	1.5	1.5 mM
dNTP's 20 mM	0.25	200 μM
Taq DNA pol 5 U/ μL)	0.2	1 U/ μL
Agua	17.55	--
DNAc	1	--
Volumen final	25	--

Una vez mezclados los reactivos, el tubo se centrifugó brevemente para coleccionar toda la solución en el fondo del tubo y este se colocó en el termociclador, bajo las condiciones de reacción indicadas en la tabla IX

Tabla IX
Condiciones de amplificación de la secuencia
nucleotídica de las subunidades menores

Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
94	45 seg	1
94	30 seg	
50	45 seg	35
72	45 seg	
72	10 min	1

9.4.3.1 Electroforesis en gel de agarosa

El producto amplificado obtenido en este ensayo fue analizado de la siguiente manera.

1. 5 μ L del producto amplificado fueron colocados en un tubo para microcentrífuga y se añadió 1 μ L de jugo azul 6X.
2. La mezcla fue colocada en un gel de agarosa al 1.2% y se realizó la electroforesis a 200 V por aproximadamente 25 min.
3. Una vez terminada la electroforesis, el gel fue sumergido en una solución de bromuro de etidio 2 μ g/mL durante 5 min.
4. Las bandas fueron visualizadas en un transiluminador de luz UV acoplado a un sistema fotodocumentador Gel Pro (Dinco Rhenium, USA) el cual permitió guardar las imágenes para su análisis posterior.

9.4.4 Clonación del producto amplificado

Una vez verificada la amplificación de la secuencia nucleotídica de las subunidades menores se procedió a la clonación de dicho fragmento en el vector pCR Topo 2.1 (Invitrogen, USA), como se describe a continuación:

1. En un tubo eppendorff de 0.5 ml se colocaron 4 μ L de producto amplificado, 1 μ L de solución de sales (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂) y 1 μ L de vector Topo 2.1
2. Los componentes se mezclaron suavemente y se incubaron a temperatura ambiente por 5 min.
3. Se colocaron 2 μ L de la reacción de ligación en un vial conteniendo 50 μ L de células calcio competentes, las cuales habían sido previamente descongeladas manteniéndolas en hielo.
4. Se mezcló suavemente y se incubó 5 min en hielo.
5. Una vez concluida la incubación el tubo se colocó en un baño de agua a 42°C por 30 seg (choque térmico) sin agitación y una vez transcurrido el tiempo se colocó en hielo inmediatamente y se dejó por 2 min.
6. Se añadieron 250 μ L de medio SOC a temperatura ambiente y el tubo se colocó en una incubadora a 37°C con agitación (200 rpm) por 1 hora y al mismo tiempo

7. se colocaron las cajas petri con medio LB + ampicilina (50 µg/ml) en una incubadora a 37°C para que estuvieran listas a la hora de plaquear la transformación.
8. Una vez concluida la incubación se sacaron las placas de la incubadora y en condiciones estériles se le añadió 40 µL de XGal (40 µg/ml) y se diseminó por toda la placa con la ayuda de perlas de vidrio estériles, posteriormente se agregaron 100 µL de la transformación y de igual manera se diseminó con la ayuda de perlas de vidrio y se dejó secar la placa por 5 min.
9. La placa se incubó a 37°C por 16 horas.
10. Al término del periodo de incubación se seleccionaron 10 colonias blancas y con cada una de ellas se inoculó un tubo de ensaye que contenía 3 ml de caldo LB + ampicilina (50 µg/ml), los cuales fueron incubados toda la noche a 37°C con agitación (250 rpm)

9.4.4.1 Extracción de DNA plasmídico

1. Se colocaron 1.5 ml del cultivo en tubo eppendorf de 1.5 ml en condiciones de esterilidad y se centrifugó durante 15 seg a 14 000 rpm, se decantó el sobrenadante dejando aproximadamente 50 µl de medio en el tubo.
2. La células se resuspendieron en el medio mezclando en vortex por 10 seg.
3. Se añadieron 300 µL de solución TENS recién preparada (TE 94 mM; EDTA 9.4 mM; NaOH 0.1 N; SDS 0.5%) y se mezcló en el vortex por 20 seg.
4. Se añadieron 150 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 se mezcló en el vortex por 15 seg y se centrifugó por 6 min a 14 000 rpm.
5. El sobrenadante se transfirió a nuevo tubo eppendorff de 1.5 ml y se agregaron 900 µL de etanol al 100 % frío, se mezcló por inversión y se centrifugó por 5 min a 14 000 rpm.
6. Se decantó el sobrenadante y el DNA se lavó con 1 ml de etanol al 70 % frío y se centrifugó a 14 000 rpm por 3 min, se decantó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente el tubo por unos segundos a 14 000 rpm y el etanol que quedó se removió con una pipeta, finalmente la pastilla de DNA se dejó secar a temperatura ambiente por 5 min.
7. El DNA se resuspendió en 30 µL de agua conteniendo RNAsa a una concentración final de 20 µg/ml
8. El DNA se almacenó a -20°C hasta su utilización.

9.4.4.1.1 Verificación de la presencia de inserto en las clonas obtenidas

Para verificar si las clonas obtenidas tenían el inserto deseado se realizó una digestión con la enzima *EcoRI*, ya que el vector contiene 2 sitios de reconocimiento para esta enzima flanqueando el inserto. La reacción de digestión se llevo a cabo como se indica en la tabla X

Tabla X
Reacción de digestión para la verificación de la presencia del inserto

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración
DNA	2	500 ng/ μL
Buffer 10X	1	1X
EcoR1 10 U/ μL	0.2	--
Agua mQ	6.8	2 U
Volumen total	10	--

La reacción de digestión se incubó a 37°C por 2 horas y los 10 μL de la reacción se colocaron en un gel de agarosa al 0.8% para visualizar la presencia del inserto.

9.4.4.2 Purificación del DNA plasmídico

Para llevar a cabo la secuenciación de las clonas obtenidas se purificó con el kit "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega, USA), como se describe a continuación:

1. Al producto amplificado obtenido por PCR se le añadió un volumen de solución de unión y la mezcla se transfirió a una minicolumna y se incubó por 1 min a temperatura ambiente.
2. La columna se centrifugó por 1 min a 14 000 rpm y se agregaron 700 μL de solución de lavado y se centrifugó por 1 min a 14 000 rpm, se agregaron nuevamente 500 μL de solución de lavado y se centrifugó por 5 min a 14 000 rpm.
3. La columna se transfirió a un tubo nuevo, se agregaron 30 μL de agua y se dejó incubando por 1 min, posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 1 min.
4. El DNA purificado se almacenó a -20°C hasta su utilización.

9.4.5 Secuenciación de las clonas obtenidas

Las clonas purificadas fueron secuenciadas en un equipo Abi Prism 3700 (Applied biosystems, USA) por el método de electroforesis capilar con terminadores fluorescentes, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos

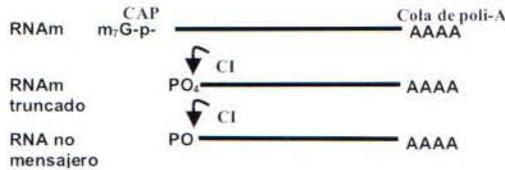
9.5 Obtención del DNAc completo de las subunidades menores

9.5.1 Amplificación rápida de los extremos del DNAc (RACE) de las subunidades menores

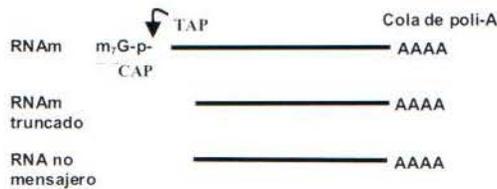
La técnica denominada amplificación rápida de los extremos de un DNAc (RACE, por sus siglas en ingles) permite obtener el DNAc completo tanto en su extremo 5' como 3', a partir de una porción conocida del DNAc de interés. Esta técnica se basa en la ligación

de un oligonucleótido de RNA al RNAm sin cap usando la T4 RNA ligasa, posteriormente se retrotranscribe a DNac y se amplifica mediante PCR utilizando oligos específicos para la secuencia de interés. El esquema general de este procedimiento se muestra en la figura 4.

1. Desfosforilación del RNA. El RNA total es tratado con CIP para remover el grupo 5' fosfato de los RNAm truncados y no mensajeros



2. Eliminación del CAP del RNAm. Tratamiento con TAP para remover el CAP del RNAm



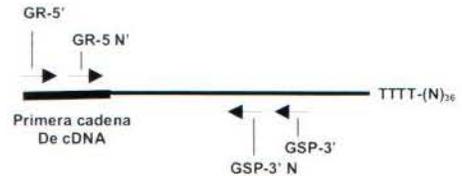
3. Ligación del oligo de RNA al extremo 5' del RNAm



4. Transcripción reversa del RNAm



5. Amplificación del extremo 5'



6. Amplificación del extremo 3'

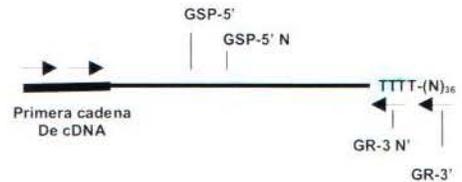


Figura 4. Esquema de amplificación rápida de los extremos de un DNac (RACE). En este esquema se muestra el proceso de la amplificación rápida de los extremos de un DNac en seis etapas: el primer paso consiste en la desfosforilación del RNA total, en este paso solo los RNAm truncados y los RNAs que no son mensajeros desfosforilados, en el segundo paso se elimina el CAP de los RNAm, en el tercer paso los RNAm son los únicos RNAs que tienen un grupo fosfato, el cual es utilizado para ligar un oligo de RNA a este extremo, en el cuarto paso el RNAm con el oligo ligado se retrotranscribe con oligo dT, el cual incluye un adaptador, el paso 5 se procede a la amplificación del extremo 5' a partir de un oligo específico y un oligo para el adaptador y en el paso 6 se amplifica el extremo 3' a partir de un oligo específico para el adaptador 3'.

El protocolo usado para la obtención del DNAc completo mediante el método de RACE para las subunidades menores y mayores se describe a continuación:

9.5.1.1 Desfosforilación del RNA

1. Se añadieron los siguientes reactivos en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml

Tabla XI
Reacción de desfosforilación

Reactivo	Volumen	Concentración
RNA	5	5 µg
Buffer CIP 10X	1	1X
RNase Out (40 U/µL)	1	4 U/µL
Enzima CIP (10 U/µL)	1	1 U/µL
Agua DEPC	2	--
Volumen total	10	--

2. Los reactivos fueron mezclados de manera suave por pipeteo y se centrifugó durante algunos segundos para coleccionar el fluido.
3. La reacción se incubó a 50°C durante 1 hora.
4. Una vez concluido el periodo de incubación se centrifugó brevemente y la reacción se colocó en hielo.

9.5.1.1.1 Precipitación del RNA

1. A la reacción anterior se le agregaron 90 µL de agua DEPC y 100 µL de una mezcla de fenol-cloroformo y se mezcló vigorosamente en vortex durante 30 segundos.
2. La muestra se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min a temperatura ambiente.
3. Se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo de microcentrífuga nuevo.
4. Se añadieron 2 µL de glicógeno (10 mg/ml), 10 µL de acetato de sodio 3M a pH 5.2 y se mezcló, finalmente se añadieron 220 µL de etanol 95 % y se mezcló en vortex brevemente.
5. Se incubó a -70°C durante 10 min.
6. La muestra se centrifugó a 14 000 rpm durante 20 min a +4°C
7. Se removió el sobrenadante con una pipeta, teniendo mucho cuidado de no tocar la pastilla de RNA.
8. Se añadieron 500 µL de etanol al 70% y se mezcló por inversión.
9. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 2 min a 4°C.
10. Se removió el sobrenadante con una pipeta, teniendo mucho cuidado de no tocar la pastilla de RNA y se centrifugó a 14 000 rpm durante unos segundos para remover todo el etanol posible y se dejó secar la pastilla durante 2 min a temperatura ambiente.
11. La pastilla fue resuspendida en 7 µL de agua DEPC y se procedió con el siguiente paso.

9.5.1.2 Eliminación del CAP del RNAm

1. Se añadieron los reactivos descritos en la tabla XII en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml (todo el proceso se realizó en hielo)

Tabla XII
Reacción para la eliminación del CAP

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración
RNA desfosforilado	7	--
Buffer TAP 10X	1	1X
RNase Out (40 U/ μL)	1	4 U/ μL
Enzima TAP (0.5 U/ μL)	1	0.05 U/ μL
Volumen total	10	--

2. Se mezcló suavemente por pipeteo y se centrifugó durante algunos segundos para colectar todo el líquido en el fondo del tubo.
3. Se incubó a 37°C por una hora.
4. Al término de la incubación se centrifugó brevemente y se colocó en hielo.
5. La precipitación del RNA se realizó como se indicó en el punto 5.5.1.1.1 y la pastilla fue resuspendida en 7 μL de agua DEPC y se procedió con el siguiente paso.

9.5.1.3 Ligación del oligonucleótido de RNA al RNAm sin CAP

1. Se colocaron los 7 μL de RNA desfosforilado y sin CAP en un tubo que contiene el oligo de RNA prealiquotado y liofilizado (0.25 μg) y se mezcló por pipeteo, y se centrifugó a 14000 rpm brevemente para depositar todo en el fondo del tubo.
2. Se incubó a 65°C por 5 min para eliminar las estructuras secundarias del RNA. Nota: después de la incubación el volumen total de la mezcla puede disminuir 1 μL debido a evaporación.
3. El tubo se colocó en hielo durante 2 min y se centrifugó a 14000 rpm brevemente.
4. Se añadieron los reactivos descritos en la tabla XIII al tubo, se mezcló por pipeteo y se centrifugó a 14000 rpm brevemente.

Tabla XIII
Reacción de ligación del oligonucleótido de RNA

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración
Buffer de ligasa 10X	1	1 X
ATP 10 mM	1	1 mM
RNase Out (40 U/ μL)	1	4 U/ μL
T4 RNA ligase (5U/ μL)	1	0.5 U/ μL
Volumen total	10	--

5. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora.
6. La muestra se centrifugó a 14000 rpm brevemente y se colocó hielo para proceder a precipitar el RNA.
7. La precipitación del RNA se realizó como se indicó en el punto 5.5.1.1.1 y la pastilla fue resuspendida en 10 µL de agua DEPC y se procedió con el siguiente paso.

9.5.1.4 Transcripción reversa del RNAm

1. En un tubo para microcentrifuga de 500 µL se colocaron los 10 µL del RNA del paso anterior y se le agregó 1 µL de "GeneRacer oligo dT" y 1 µL de dNTP's 10 mM c/u.
2. Se incubó a 65°C durante 5 min.
3. La mezcla se enfrió en hielo por 2 min y se centrifugó a 14000 rpm brevemente.
4. A la mezcla anterior se le agregó los reactivos descritos en la tabla XIV.

Tabla XIV
Reacción de transcripción reversa

Reactivo	Volumen	Concentración
Buffer 5X	1	4 X
DTT 1 mM	2	0.1 mM
RNase Out (40 U/µL)	1	2 U/µL
RT SuperScript (200 U/µL)	1	10 U/µL
Volumen total	20	--

5. Una vez agregado lo anterior se mezcló por pipeteo y se centrifugó a 14 000 rpm brevemente.
6. La mezcla se incubó a 42°C durante 50 min.
7. Una vez concluida la transcripción reversa la reacción fue inactivada incubando a 70°C por 15 min y posteriormente se enfrió en hielo durante 2 min y se centrifugó a 14000 rpm brevemente.
8. Se añadió 1 µL de RNasa H (2 U) a la mezcla y se incubó a 37°C por 20 min.
9. Se centrifugó brevemente a 14000 rpm y se almacenó a -20°C para usarse posteriormente en la reacción de PCR.

9.5.1.5 Amplificación del los extremos 5' y 3' del DNAc

1. Para obtener el extremo 5' y 3' del DNAc por PCR, en un tubo de 500 μ L se mezclaron los reactivos descritos en la tabla XV

Tabla XV
Amplificación de los extremos del DNAc

Reactivo	5' RACE (μ L)	3' RACE (μ L)	Conc. final
Oligo "GeneRacer" 5' 10 mM	3	--	0.6 mM
Oligo específico 3' (SS1RCN3) 100 ng/ μ L	1	--	2 ng/ μ L
Oligo "GeneRacer" 3' 10 mM	--	3	0.6 mM
Oligo específico 5' (SS1RC5) 100 ng/ μ L	--	1	2 ng/ μ L
Templado	1	1	--
Buffer DNA polimerasa 10 X	5	5	1X
MgCl ₂ 25 mM	3.0	1.5	1.5 mM
dNTP's 20 mM	0.5	0.5	200 μ M
Agua mQ	36.5	36.5	--
Volumen total	50	50	--

2. Una vez depositados todos los reactivos en el tubo se mezclaron por pipeteo y se centrifugó brevemente a 14000 rpm para depositar todo en el fondo.
3. Los tubos se colocaron en el termociclador y se llevó a cabo el programa mostrado en la tabla XVI

Tabla XVI
Condiciones de amplificación para los extremos del DNAc

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	2 min	1
94°C	30 seg	5
72°C	2 min	
94°C	30 seg	5
70°C	2 min	
94°C	30 seg	
65°C	30 seg	20
72°C	2 min	
72°C	10 min	1

4. Una vez concluido el programa de PCR los tubos fueron almacenado a 4°C para su posterior análisis

9.5.1.5.1 PCR anidado

Debido a que en el experimento anterior se pueden obtener múltiples bandas de carácter inespecífico se realizó un PCR anidado para garantizar la especificidad de este ensayo.

1. En un tubo de 500 μ L se mezclaron los reactivos descritos en la tabla XVII

Tabla XVII
Reacción de PCR anidado de los extremos del DNAC

Reactivo	5' RACE (μ L)	3' RACE (μ L)	Conc. final
Oligo "GeneRacer" 5' Nested 10 mM	1	--	0.6 mM
Oligo específico 3' (SS1RCN3) 100 ng/ μ L	1	--	2 ng/ μ L
Oligo "GeneRacer" 3' Nested 10 mM	--	1	0.6 mM
Oligo específico 5' (SS1RC5) 100 ng/ μ L	--	1	2 ng/ μ L
Templado	1	1	--
Buffer DNA polimerasa 10 X	5	5	1X
MgCl ₂ 25 mM	3	3	1.5 mM
dNTP's 20 mM	0.5	0.5	200 μ M
Agua mQ	38.5	38.5	--
Volumen total	50	50	--

2. Una vez depositados todos los reactivos en el tubo se mezclaron por pipeteo y se centrifugó brevemente a 14 000 rpm para depositar todo en el fondo.
3. Los tubos se colocaron en el termociclador y se llevó a cabo el programa descrito en la tabla XVIII

Tabla XVIII
Condiciones de amplificación del PCR anidado para los extremos del DNAC de las subunidades menores

Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
94	2 min	1
94	30 seg	
65	30 seg	25
72	2 min	
72	10 min	1

4. Una vez concluido el programa de PCR los tubos fueron almacenados a 4°C para su posterior análisis.

9.5.1.5.1.1 Clonación de los productos amplificados del DNAc completo de las subunidades menores

Los productos amplificados obtenidos fueron clonados y secuenciados como se indicó en los puntos 5.3.4 al 5.3.5.

9.6 Obtención de la secuencia nucleotídica de los genes que codifican para las subunidades menores.

Basándose en las secuencias que se obtuvieron del DNAc completo de las subunidades menores se diseñaron oligonucleótidos específicos para las regiones 5' y 3' no traducibles que permitieron amplificar los genes que codifican para las subunidades menores a partir de DNA genómico de la hormiga *Pseudomyrmex* sp.

La reacción de PCR que se utilizó para la amplificación de estos genes se describe en la tabla XIX y las condiciones de amplificación se describen en la tabla XX. Los productos amplificados obtenidos fueron clonados y secuenciados como se indicó en los puntos 5.3.4 al 5.3.5.

Tabla XIX
Reacción de PCR para la amplificación de la secuencia nucleotídica de los genes que codifican para las subunidades menores

Reactivo	Volumen (μ L)	Conc. final
SS1g5' 100 ng/ μ L	1	4 ng/ μ L
SS1g3' 100 ng/ μ L	1	4 ng/ μ L
Buffer 10X	2.5	1X
MgCl ₂ 25 mM	1.5	1.5 mM
dNTP's 20 mM	0.25	200 μ M
Taq polimerasa 5U/ μ L	0.5	2.5 U
DNA genómico 100 ng/ μ L	2	200 ng
Agua	16.25	--
Volumen total	25	--

Tabla XX
Condiciones de amplificación de la secuencia nucleotídica de los genes que codifican para las subunidades menores

Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
94	2 min	1
94	30 seg	35
50	45 seg	
72	1 min	
72	10 min	1

9.7 Obtención de la secuencia nucleotídica de las subunidades mayores

9.7.1 Amplificación de la secuencia nucleotídica de las subunidades mayores

Para realizar la amplificación del DNAc de la subunidad LS2 se utilizó el mismo DNAc obtenido en el punto 5.3.2 y de igual manera que la amplificación de las subunidades menores se utilizaron oligonucleótidos degenerados (LS2' y LS12) cuya secuencia se muestra en el anexo 1. Las concentraciones de los reactivos para la PCR se muestran en la tabla XXI.

Tabla XXI
Reacción de PCR para la amplificación de la secuencia nucleotídica de las subunidades mayores

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración
LS1 100 ng/µL	1	4 ng/µL
LS12 100 ng/µL	1	4 ng/µL
Buffer 10X	2.5	1X
MgCl ₂ 25 mM	1.5	1.5 mM
dNTP's 20 mM	0.25	200 µM
Taq DNA pol 5 U/µL)	0.2	1 U/µL
Agua	17.55	--
DNAc	1	--
Volumen final	25	--

Una vez mezclados los reactivos, el tubo se centrifugó brevemente para coleccionar toda la solución en el fondo del tubo y este se colocó en el termociclador, bajo las condiciones de reacción que se indicaron en la tabla XX. El producto amplificado fue analizado como se indicó en el punto 5.3.3.1. La clonación del producto amplificado se realizó como se explicó en el punto 5.3.4 y la secuenciación de las clonas obtenidas se realizó como se indicó en el punto 5.3.5.

9.8 Obtención del DNAc completo de las subunidades mayores

9.8.1 Amplificación del los extremos 5' y 3' del DNAc de las subunidades mayores.

Para la realización de este ensayo se utilizó el mismo DNAc obtenido en el punto 5.4.1.4, los volúmenes de la reacción de PCR fueron los mismos utilizados en la tabla XV, pero en este caso se utilizó el oligo específico 5' LS1RC5 y el oligo específico 3' LS1RCF3. Los tubos se colocaron en el termociclador y se utilizó el programa mostrado en la tabla XVI y las muestras fueron analizadas como se indicó en el punto 5.3.3.1. Para garantizar la especificidad de los productos amplificados se realizó una reacción de PCR anidado como se mostró en la tabla XVII utilizando los oligos específicos LS1RC5 y LS1RCF3, mientras que el programa de amplificación utilizado fue el que se mostró en la tabla XVIII.

9.8.2 Clonación de los productos amplificados del DNAc completo de las subunidades mayores

Los productos amplificados obtenidos fueron clonados y secuenciados como se indica en los puntos 5.3.4 al 5.3.5

9.9 Obtención de la secuencia nucleotídica de los genes que codifican para las subunidades mayores.

Para la obtención de la secuencia nucleotídica de los genes que codifican a las subunidades mayores se utilizó el mismo procedimiento mostrado la tabla XIX pero en este caso se utilizaron los oligos LSg5' y LSg3', la reacción de amplificación se montó como se indicó en la tabla XIX y el programa de amplificación utilizado se describió en la tabla XX.

10. RESULTADOS

10.1 Colecta e identificación de la hormiga *Pseudomyrmex* sp

La colecta de las hormigas *Pseudomyrmex* sp fue realizada en el Jardín botánico de la ciudad de Santa Cruz de la Sierra, Republica de Bolivia y se realizó con la colaboración del Departamento de Entomología del Museo de Historia Natural "Noe Kempp Mercado" de esa ciudad. Una vez localizado el árbol *Triplaris americana* donde habitan las hormigas se procedió a la colecta como se describió en materiales y métodos.

Para identificar morfológicamente la anatomía general de la hormiga se utilizaron ejemplares completos. La figura 5 muestra una hormiga obrera de la subfamilia Pseudomyrmicinae con las características morfológicas principales usadas en taxonomía (Wheeler, 1942; Bolton, 1994; Ward, 1985, 1991, 1993, 1999). En este ejemplar identificamos diferentes estructuras como: el alitrongo (primer segmento abdominal fusionado junto con el tórax verdadero) y dentro de el se localiza el pronotum, espiráculo mesotorácico, mesonotum, metanotum, escutelum, espiráculo del metanotum y el propodeum. El gáster es la parte baja abdominal de la cintura que contiene el peciolo el cual es un pedicelo compuesto de solo un segmento abdominal, esternitos y terguitos tanto en el gáster como en el alitrongo se localiza la membrana intersegmental, los funículos se refiere a toda la antena excepto el primer segmento, tiene un estilete muy desarrollado, es el órgano cercano al ultimo segmento abdominal sale por el pigidio (ultimo segmento abdominal visible). Los anexos torácicos constan de coxa, trocanter, fémur, tibia, espuela pectinada, tarso y uñas. Tiene un lóbulo frontal conteniendo el occipucio, la cabeza, ojos, antenas y mandíbula. La disección de las hormigas permitió identificar 12 segmentos antenales, un diente marginal sobre el margen basal, ojos de un tercio de longitud comparados con la cabeza (Figura 6), metanotum bien desarrollado, tórax formado por 3 segmentos protórax, mesotórax y metatórax (figura 7A) en la (figura 7B) se muestra un peciolo y postpeciolo característico de la identificación para la subfamilia *Pseudomyrmicinae* (Bolton, 1994) y un estilete bien desarrollado, el surco metabarsital esta ausente (Figura 8). Las claves taxonómicas (Ward, 1985, 1991, 1993, 1999) nos permitieron identificar el género *Pseudomyrmex* sp.

- 1 Pigidio
- 2 Terguitos
- 3 Postpeciolo
- 4 Peciolo
- 5 Torax
- 6 Ojos
- 7 Esternitos
- 8 Uñas
- 9 Antenas

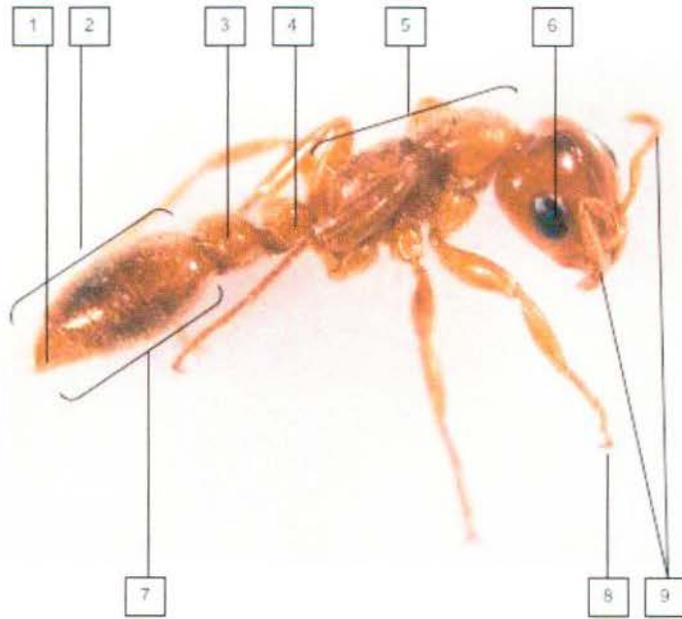


Figura 5. Morfología de *Pseudomyrmex* sp colectada en Santa Cruz, Bolivia. En esta figura se observan algunas de las estructuras mas características de la esta hormiga.

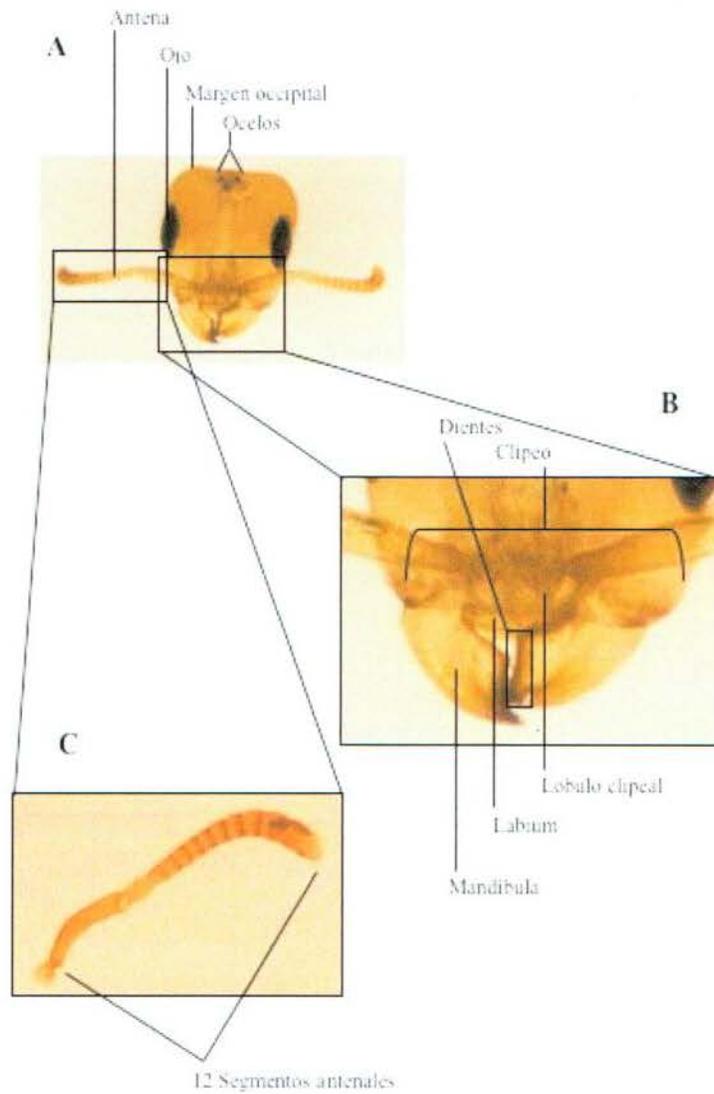


Figura 6. Disección y análisis morfológico de la cabeza de *Pseudomyrmex* sp. En esta figura se muestran algunas de las características principales de la hormiga. En **A** se muestran los ojos los cuales son de gran tamaño, así como los ocelos y las antenas, en **B** se muestra el complejo frontoclipeal donde se observa la mandíbula y los dientes, en **C** se muestra un acercamiento de la antena en la cual se observan los 12 segmentos antenales que posee.

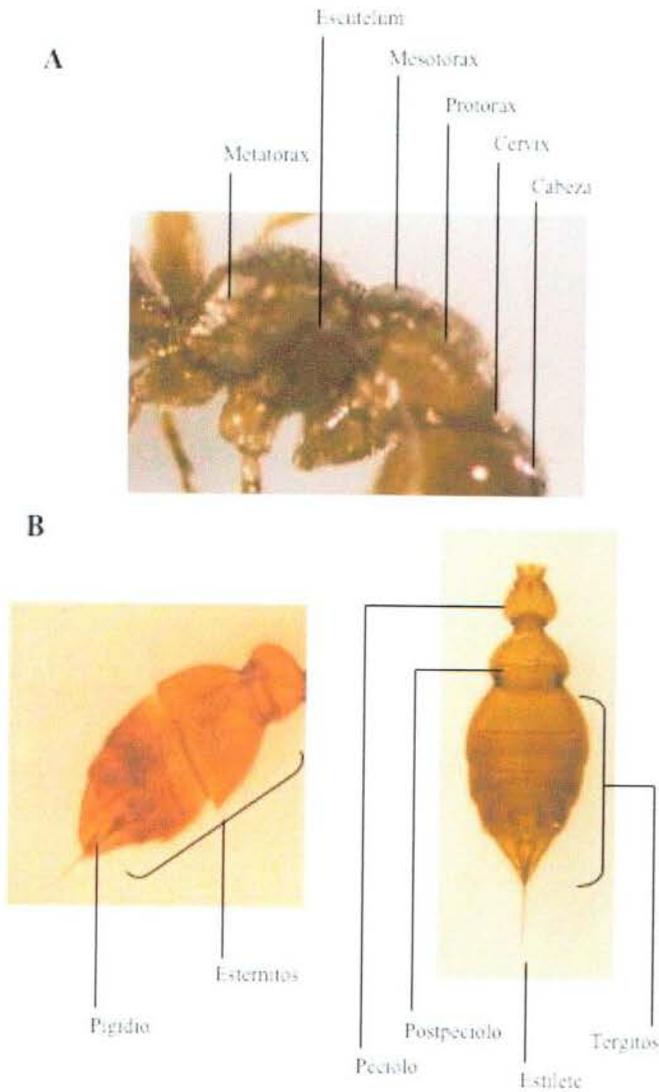


Figura 7. Disección del tórax y abdomen de *Pseudomyrmex* sp. A muestra el tórax de la hormiga obrera donde se aprecian algunas de las estructuras principales. B muestra el abdomen donde se aprecia el postpeciolo el cual es una de las principales estructuras que distinguen a esta subfamilia, además se aprecia el estilete bien desarrollado.

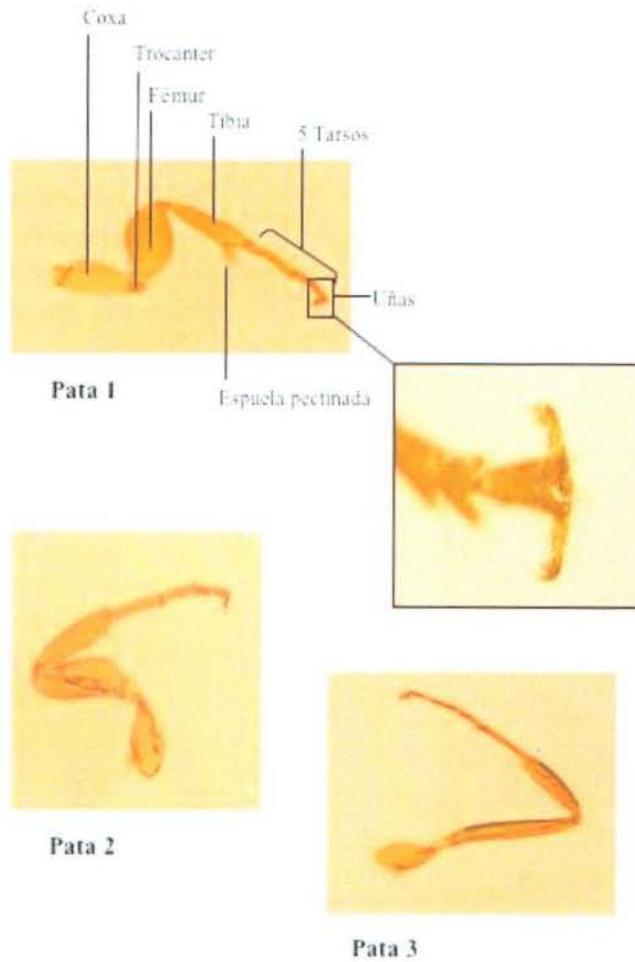


Figura 8. Anexos torácicos de *Pseudomyrmex* sp. Las patas están articuladas en la región pleural de los segmentos torácicos y están formadas por artejos, el fémur es de mayor tamaño siendo el mas fuerte de todos. La hormiga presentan coxa, trocánter, tibia, dos segmentos tarsales y 2 uñas, además la espuela pectinada.

10.2 Extracción de DNA genómico y RNA total de la hormiga *Pseudomyrmex* sp

La extracción de RNA total de la hormiga *Pseudomyrmex* sp se realizó según el protocolo con Trizol descrito en materiales y métodos. La concentración obtenida fue verificada por espectrofometría UV y la calidad del RNA total extraído fue comprobada por visualización en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes. El RNA total obtenido mostró calidad aceptable observándose las bandas de 28S y 18S con una concentración de aproximadamente 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Este fue almacenado a -70°C para su utilización posterior (Figura 9).

El DNA genómico fue extraído por la técnica de cloruro de litio y de igual manera la concentración fue determinada por espectrofotometría UV y la calidad fue comprobada mediante visualización en gel de agarosa al 0.8 % como se observa en la figura 9.

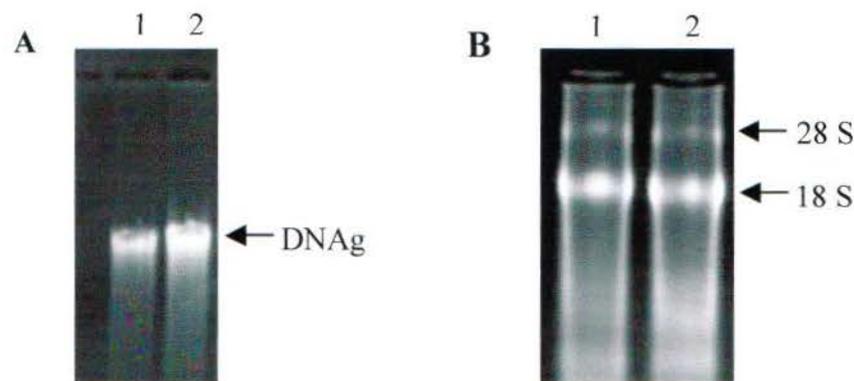


Figura 9. DNA genómico y RNA total de *Pseudomyrmex* sp. En A los carriles 1 y 2 muestran la banda correspondiente al DNA genómico y en B se muestra el RNA total extraído de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. (carriles 1 y 2)

10.3 Amplificación de la secuencia nucleotídica de las subunidades menores de las mirmexinas mediante PCR

La amplificación por RT-PCR de las secuencias nucleotídicas codificantes a las subunidades menores de las mirmexinas se llevo a cabo usando los oligonucleótidos SS12 y SS123 (Anexo 1) como se indicó previamente en materiales y métodos. En la figura 10 se muestra el análisis de los productos de PCR que detectó una banda de aproximadamente 87 pb la cual correspondió al tamaño esperado.

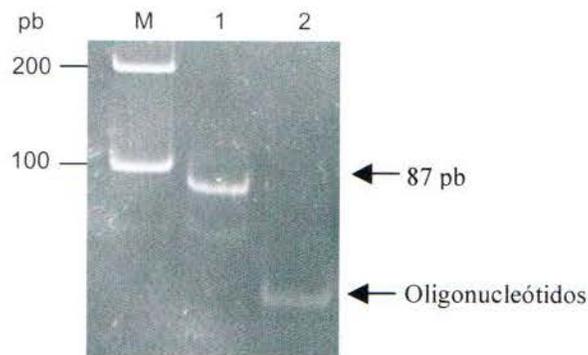


Figura 10. Amplificación de las secuencias nucleotídicas codificantes de las subunidades menores mediante PCR. A partir del DNAc de la hormiga se realizó la amplificación mediante PCR utilizando los oligos degenerados SS1/2 y SS123. Los productos de PCR se analizaron en un gel poliacrilamida al 8% en el carril 1 se muestra la banda de 87 pb correspondiente a una región del DNAc de la subunidad SS2, en el carril 2 se observa el control negativo de la reacción de PCR. M= Escalera de 100 pb,

10.3.1 Clonación y secuenciación del producto amplificado de las subunidades menores de las mirmexinas

El fragmento de 87 pb amplificado por RT-PCR fue clonado en el vector pCR Topo 2.1, se seleccionaron 5 colonias las cuales se caracterizaron con la enzima *EcoRI* para comprobar la presencia del inserto deseado y 3 clonas fueron secuenciadas como previamente se describió en materiales y métodos En el anexo 2A se muestra la secuencia codificante de la subunidad SS1 flanqueada por los oligos (color azul). En la parte inferior de la secuencia de nucleótidos (Anexo 2B) se muestran los aminoácidos que se deducen de dicha secuencia que correspondieron totalmente con la secuencia descrita previamente (Pan and Hink, 2000). La obtención de esta secuencia fue un paso muy importante, ya que nos fue útil para el diseño de los oligonucleótidos específicos necesarios para los ensayos de RACE. Cabe mencionar que dichos oligos solo podían estar situados en los 47 pb de la porción central de la secuencia, mostrados en color negro en el anexo 2A, ya que la secuencia que corresponde a los oligos no es exacta, debido a que se utilizaron oligos degenerados.

10.4 Obtención del DNAc completo de las subunidades menores de las mirmexinas utilizando la técnica de RACE

10.4.1 Obtención del extremo 3' del DNAc

Una vez obtenida la secuencia nucleotídica que codifica para la subunidad SS1 (Anexo 2) de las mirmexinas, estas fueron utilizadas para el diseño del oligonucleótido específico SSIRC5 para la obtención del extremo 3' del DNAc completo por la técnica de RACE. En vista de que se necesitaba un oligo con orientación 5' la secuencia fue analizada para encontrar el mejor sitio para el iniciador que además debía de tener un valor de Tm similar al del oligo que se iba a utilizar en la técnica de RACE. El anexo 3 muestra la secuencia nucleotídica del oligo SSIRC5 en rojo así como la Tm que mostró ser compatible con los oligos de RACE.

A partir del RNA total extraído de las hormigas y una vez realizados los pasos de desfosforilación, eliminación del CAP, ligación del adaptador y transcripción reversa con oligo dT previamente descritos, el DNAc obtenido se utilizó para la amplificación del extremo 3' utilizando el oligonucleótido específico para la subunidad SS1 (SSIRC5), diseñado anteriormente y el oligo específico para el adaptador 3' (GeneRacer 3'). La reacción no mostró amplificación como se muestra en la figura 11, por ello se realizó inmediatamente una reacción de PCR semianidada utilizando los oligos SSIRC5 y GeneRacer 3' nested. Una vez concluida esta reacción de amplificación se observó la presencia de una banda de aproximadamente 250 pb como se muestra en la Figura 11, (carril 3), la cual fue clonada en el vector pCR Topo 2.1 para su secuenciación y análisis. La secuencia obtenida fue alineada con la secuencia nucleotídica de la subunidad SS1 previamente descrita (Pan and Hink, 2000) y se comprobó la presencia del iniciador SSIRC5 como se muestra en el anexo 4. Se determinó que la secuencia nucleotídica del extremo 3' posee un codón extra, inmediatamente después de encuentra el codón de terminación seguido de una región 3' no traducible de 137 pb que incluye la señal de poliadenilación (AATAAA) y la cola de poliA que presentó diferente tamaño en cada clona. En total fueron secuenciadas 6 clonas producto de 2 reacciones de PCR, el alineamiento de las secuencias nucleotídicas de todas las clonas mostró que las secuencias obtenidas fueron prácticamente idénticas con solo 2 cambios nucleotídicos a lo largo de toda la secuencia (Anexo 5).

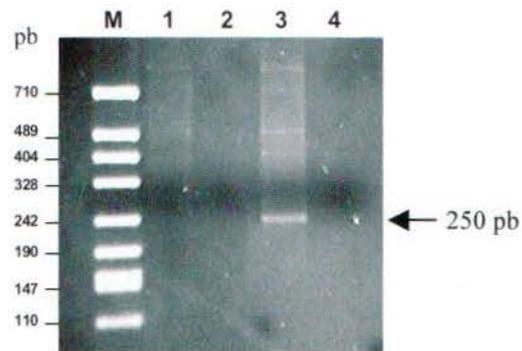


Figura 11. Obtención del extremo 3' de la subunidad SSI del DNAc de *Pseudomyrmex* sp. El gel de agarosa al 1.2% muestra en el carril 1 la reacción de PCR para la obtención del extremo 3' del DNAc sin banda aparente, en el carril 2 el control negativo de esta reacción, en el carril 3 la reacción de PCR anidada donde se observa la amplificación de una banda de aproximadamente 250 pb y una banda un poco mas débil de aproximadamente 300 pb y en el carril 4 el control negativo. M= pBS + *MspI*.

10.4.2 Obtención del extremo 5' del DNAc

Una vez obtenida la secuencia del extremo 3' del DNAc que codifica para la subunidad SS1 de las mirmexinas; esta fue utilizada para el diseño del oligonucleótido específico SS1RCN3 para la obtención del extremo 5' del DNAc por la técnica de RACE. En vista de que se necesitaba un oligonucleótido con orientación 3', la secuencia fue analizada para encontrar el mejor sitio para el iniciador que además debía de tener un valor de T_m similar al de los oligos que se iba a utilizar en la técnica de RACE, en el anexo 6 se muestra la secuencia del iniciador, su posición así como su valor de T_m .

A partir del RNA total extraído de las hormigas se realizó la técnica de RACE, con este método se obtuvo la amplificación de una banda de aproximadamente 80 pb como se muestra en la figura 12, para confirmar o descartar esta banda se realizó una reacción de PCR semianidada utilizando los oligos SS1RCN3 y GeneRacer 5' nested. Una vez concluida la reacción se observó la desaparición de la banda de 80 pb, lo cual indicó que esta era inespecífica y la aparición de una banda de aproximadamente 330 pb como se muestra en la figura 12 (carril 3) que se consideró específica del extremo 5' del DNAc y fue clonada en el vector pCR Topo 2.1. De la transformación con este plásmido recombinante se seleccionaron 10 colonias y estas fueron caracterizadas con la enzima *EcoRI* para comprobar la presencia del inserto del tamaño esperado. Finalmente, las clonas secuenciadas fueron analizadas con el programa DNA Strider 1.4f6 para la búsqueda de la fase de lectura abierta.

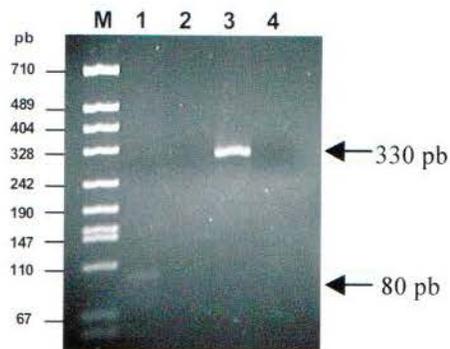


Figura 12 Obtención del extremo 5' de la subunidad SSI del DNAc de *Pseudomyrmex* sp. El gel de agarosa al 1.2% muestra en el carril 1 una banda de aproximadamente 80 pb en la primera reacción de PCR para la obtención del extremo 5' del DNAc, en el carril 2 el control negativo de esta reacción, en el carril 3 la reacción de PCR anidada donde se observa la amplificación de una banda de aproximadamente 330 pb y en el carril 4 el control negativo. M= pBS + *Msp*I.

El análisis de esta secuencia del extremo 5' del DNAc mostró una fase de lectura abierta de 201 pb, las cuales codifican para 67 aminoácidos. Dentro de esta fase de lectura los últimos 30 aminoácidos pertenecen al péptido maduro (SS2 ó SS3). En esta secuencia también se determinó que los 54 pb que se encuentran río arriba del codón de inicio de la traducción corresponden al extremo 5' no traducible. Debido a que las mirmexinas son proteínas de las glándulas venenosas de la hormiga, es muy probable que se trate de proteínas de secreción y por lo tanto dentro de su secuencia deben contener un péptido señal. Para verificar si los 37 aminoácidos que se encuentran río arriba de la secuencia del péptido maduro es un péptido señal, se utilizó el programa SignalP 3.0 el cual predice la presencia de un péptido señal en una secuencia aminoacídica y calcula el sitio mas probable de corte de la peptidasa señal. En la Figura 13 se muestran los resultados obtenidos del análisis de una de las secuencias obtenidas (subunidad SS2). La predicción muestra la presencia de un péptido de señal de 25 aminoácidos con el sitio de corte entre los aminoácidos 25 y 26 y debido a que el péptido maduro inicia en el aminoácido 38, la secuencia de 12 aminoácidos desde la posición 26 a la 37 probablemente constituye un propéptido. En el anexo 7A se muestra la secuencia obtenida para una de las subunidades menores (SS2), en naranja se muestra el codón de inicio de la traducción, en rojo el codón de terminación de la traducción, en azul se muestra la secuencia del péptido maduro, en verde la secuencia del péptido señal, en morado la secuencia del propéptido, en negro y con minúsculas la secuencia de las regiones 5 y 3' no traducibles, en la parte inferior de la secuencia de nucleótidos se muestra la secuencia de aminoácidos que se deduce. En el anexo 7B se muestra el alineamiento de la secuencia descrita previamente para SS2 y la secuencia de SS2 obtenida en esta tesis, en el cual puede notarse que el último aminoácido en el extremo carboxilo terminal no se encuentra en la secuencia previamente reportada, Finalmente, la flecha roja indica el sitio de corte del péptido señal calculado por el programa SignalP 3.0.

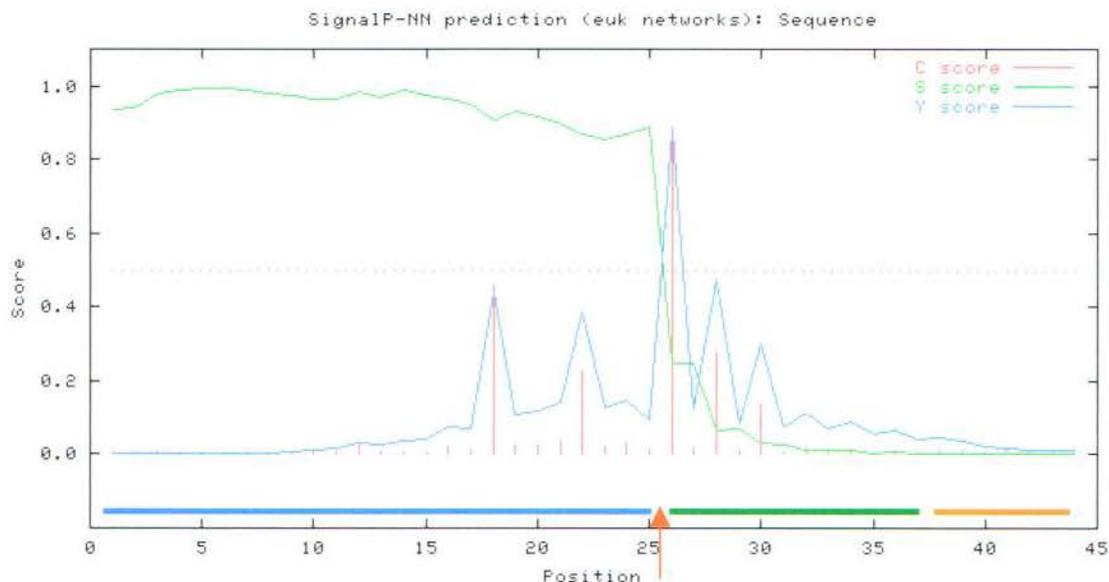


Figura 13. Predicción de la presencia de un péptido señal en la secuencia SS2. El análisis de la secuencia de SS2 con el programa SignalP 3.0 predijo la presencia de un péptido señal de 25 aminoácidos (línea azul), el sitio más probable de corte está entre los aminoácidos 25 y 26 (flecha roja). Los 12 aminoácidos entre el péptido SS2 (línea verde) y el péptido señal son considerados como un propéptido.

Debido a que el iniciador diseñado para la amplificación de las subunidades menores amplifica toda la región codificante del péptido e incluye el codón de terminación de la traducción, fue posible realizar la búsqueda de las subunidades menores restantes (SS1 y SS3) secuenciando más clonas para la determinación del extremo 5'. De esta manera se realizaron 3 ensayos de amplificación por PCR a partir del DNAc de las subunidades menores. Del primer ensayo se secuenciaron 5 clonas de las cuales 3 fueron SS2 y 2 fueron SS3, del segundo se secuenciaron 5 de las cuales 3 correspondían a SS2 y 2 a SS3 y del tercero se secuenciaron 11 clonas de las cuales 9 fueron SS2 y 2 fueron SS3.

En resumen fueron secuenciadas un total de 21 clonas, las cuales 15 corresponden al precursor de SS2 y 6 al precursor de SS3, el precursor de SS1 no fue encontrado. En el anexo 8 se muestra el alineamiento de las secuencias de 21 clonas con el programa MacVector 8.0.2, en naranja se muestra el codón de inicio de la traducción, en rojo el codón de terminación de la traducción, en azul se muestra la secuencia del péptido maduro, en verde la secuencia del péptido señal, en morado la secuencia del propéptido, en negro y con minúsculas la secuencia de las regiones 5' y 3' no traducibles. Finalmente, la zona resaltada en amarillo señala la posición donde los cambios de la secuencia nucleotídica codifican a las diferencias en la secuencia de aminoácidos entre las subunidades SS2 y SS3. En el anexo 9 se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias de nucleótidos obtenidas en esta tesis, en naranja se muestra el codón de inicio de la traducción, en azul se muestra la secuencia del péptido maduro, en verde la secuencia del péptido señal y en morado la secuencia del propéptido.

Una vez que se ensamblaron las secuencias tanto del extremo 5' como del 3' para integrar el DNAC completo de cada una de las subunidades menores se concluyó que los DNACs están constituidos de 392 pb de los cuales 54 corresponden a la región 5' no traducible y 201 nucleótidos que pertenecen a la fase de lectura abierta. De estos 75 pb (25 aa) corresponden al péptido señal, 36 pb (12 aa) al propéptido y 90 pb (30 aa) al péptido SS2, 137 pb que corresponden a la región 3' no traducible. Finalmente, la cola de poliA presenta tamaño variable, que va desde 51 a 80 pb. En el anexo 10 se muestra la secuencia de los DNAC completos tanto de la subunidad SS2 como de SS3, en naranja se muestra el codón de inicio de la traducción, en rojo el codón de terminación de la traducción, en azul se muestra la secuencia del péptido maduro, en verde la secuencia del péptido señal, en morado la secuencia del propéptido, en negro y con minúsculas la secuencia de las regiones 5 y 3' no traducibles y por último en rosa e indicado por una línea se muestra la señal de poliadenilación.

10.5 Amplificación de los genes de las subunidades menores

Una vez obtenido el DNAC completo de las subunidades menores se diseñaron los oligonucleótidos específicos SS2g5' y SS2g3' en las regiones 5 y 3' no traducibles para la amplificación de los genes que codifican para las subunidades menores a partir del DNA genómico. El programa Amplify 1.1 fue utilizado para probar si el oligo amplificaba el fragmento esperado a partir de la secuencia blanco, la secuencia y la posición de los oligonucleótidos se muestra en el anexo 11.

Para la amplificación del gen de las subunidades menores se realizó una PCR con gradiente de temperatura (50.1° a 64.9°C) con el objetivo de determinar las condiciones mas favorables para la obtención del producto amplificado específico, ya que hasta este momento no conocíamos cual iba a ser el tamaño de la banda, por el desconocimiento del número de intrónes. En la figura 14 se muestra el gradiente que se realizó, como puede observarse se obtuvieron 2 bandas de amplificación, una de aproximadamente 600 pb y otra de 400 pb. Debido a que desconocíamos cual de estas bandas era específica para el gen de las subunidades menores y debido a que las 2 bandas tenían un grado de intensidad aceptable, se optó por secuenciar ambas. El análisis de la secuencia de la banda de 600 pb mostró que este producto amplificado fue específico para los genes de las subunidades menores. La estructura del gen codificante para la subunidad SS2 se muestra en la figura 15 conteniendo, 4 exónes de 135, 27, 30 y 9 pb respectivamente y 3 intrónes de 109, 84 y 87 pb respectivamente. La estructura del gen que codifica para la subunidad SS3 es idéntica y solo difiere en la región donde se diferencian las subunidades.

El análisis de la secuencia de la banda de 400 pb mostró que este producto amplificado correspondió al gen de una nueva subunidad menor que no había sido reportada previamente y que se denominó SS4. La estructura del gen para esta nueva subunidad se muestra en la figura 7 con 3 exónes de 126, 30 y 9 pb respectivamente y 2 intrónes de 49 y 87 pb. En el anexo 12 se muestra la secuencia completa de los genes de las subunidad SS2, SS3 y SS4, en naranja se muestra el codón de inicio de la traducción, en rojo el codón de terminación, en verde se indica la secuencia codificante para el

péptido señal, en morado la secuencia para el propéptido, en azul la secuencia para el péptido maduro, en negro y con minúsculas se indican los intrónes, en rosa se muestran los sitios donadores y aceptores de "splicing" y finalmente en la parte inferior de la secuencia se muestran los aminoácidos que corresponden a cada codón. Se realizó un alineamiento entre la secuencia codificante para la subunidad SS2 y SS4 (Anexo 13) en el cual puede apreciarse en naranja el codón de inicio de la traducción, en rojo el codón de terminación, en verde se indica la secuencia codificante para el péptido señal, en morado la secuencia para el propéptido, en azul la secuencia para el péptido maduro, en negro y con minúsculas se indican los intrónes, en rosa se muestran los sitios donadores y aceptores de "splicing". En esta figura puede apreciarse claramente en la secuencia de la subunidad SS4 la delección completa del segundo exón así como de parte del primer y segundo intrón.

Se secuenciaron un total de 20 clonas producto de 2 experimentos de PCR de las cuales 15 clonas representaron la subunidad SS3 y 5 clonas a la subunidad SS2. Al igual que en la secuencia del DNAc de las subunidades menores en esta secuencia se encontró en el extremo carboxilo terminal un aminoácido extra, lo cual confirma la presencia de este en las subunidades menores. El alineamiento de las 20 secuencias obtenidas se muestra en el anexo 14 y mostró un alto grado de similitud entre las secuencias.

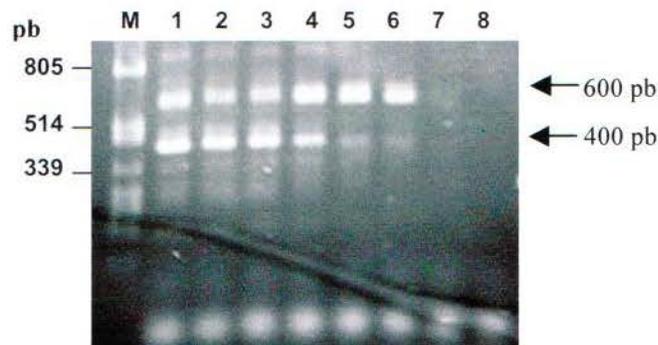


Figura 14. Amplificación de los genes de las subunidades menores usando un gradiente de temperatura. El gel de agarosa al 1.2% muestra el gradiente de temperatura realizado para la amplificación específica de los genes que codifican para las subunidades menores. Del carril 1 al 7 se probaron las siguientes temperaturas 50,1°, 52.6°, 54.2°, 58.8°, 60.7°, 62.4° y 64.9° C respectivamente, en el carril 8 se observa el control negativo. M= DNA λ + *Pst*I.

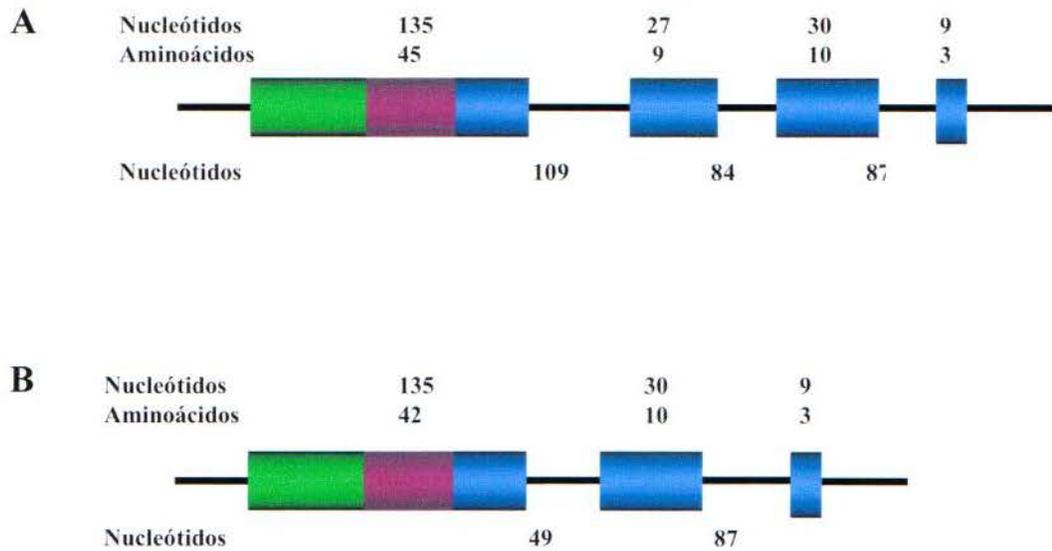


Figura 15 Estructura de los genes de las subunidades menores. **A** Estructura de los genes para las subunidades SS2 y SS3, el primer exón contiene a secuencia para el péptido señal, el propéptido y 8 aminoácidos del péptido maduro, el resto del péptido se encuentra en los 3 exones restantes, en la parte superior se muestran los tamaños en nucleótidos y aminoácidos de los exones, mientras que en la parte inferior se observa el tamaño de los intrones. **B** Estructura del gen para la subunidad SS4, el primer exón contiene a secuencia para el péptido señal, el propéptido y 6 aminoácidos del péptido maduro, el resto del péptido se encuentra en los 2 exones restantes, en la parte superior se muestran los tamaños en nucleótidos y aminoácidos de los exones, mientras que en la parte inferior se observa el tamaño de los intrones.

10.6 Amplificación mediante PCR del DNAc de las subunidades mayores

La amplificación mediante PCR de las subunidades mayores de las mirmexinas se llevó a cabo utilizando los oligos LS2 y LS12 como se indicó previamente en materiales y métodos, en este caso se realizó un gradiente para encontrar la temperatura óptima de amplificación. Como se muestra en la figura 16 se obtuvo una banda de aproximadamente 100 pb la cual correspondió al tamaño esperado.

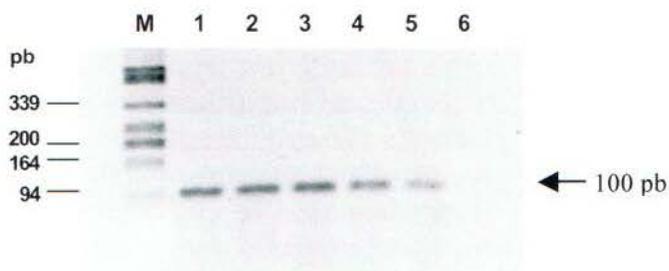


Figura 16 Amplificación de las secuencias nucleotídicas codificantes de las subunidades mayores mediante PCR. A partir del DNAc de la hormiga se realizó la amplificación mediante PCR utilizando los oligos degenerados LS2 y LS12. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1.2 % y en los carriles 1 al 5 se observa el gradiente de temperatura (45.1, 47.6, 51.1, 53.8 y 57.4°C, respectivamente), en todos los casos se observa el producto amplificado de aproximadamente 100 pb, el carril 6 se observa el control negativo. M= DNA λ + *Pst*I.

10.6.1 Clonación y secuenciación del producto amplificado de las subunidades mayores de las mirmexinas.

El fragmento amplificado de 100 pb obtenido por RT-PCR fue clonado en el vector pCR Topo 2.1, se seleccionaron 5 colonias las cuales se caracterizaron con la enzima *Eco*RI para comprobar la presencia del inserto deseado y 3 clonas fueron secuenciadas. En el anexo 15A se muestra la secuencia de la subunidad LS1 flanqueada por los oligos utilizados para su amplificación (color azul). En la parte inferior de la secuencia de nucleótidos se muestran los aminoácidos que se deducen de dicha secuencia que correspondieron a la secuencia previamente descrita en el anexo 15B.

10.7 Obtención del DNAc completo de las subunidades mayores de las mirmexinas utilizando la técnica de RACE

10.7.1 Obtención del extremo 3' del DNAc

Una vez obtenida la secuencia nucleotídica que codifica para la subunidad LS1 de las mirmexinas, esta fue utilizada para el diseño del oligonucleótido específico LS1RC5 para la obtención del extremo 3' del DNAc completo por la técnica de RACE. En vista de que se necesitaba un oligo con orientación 5' la secuencia fue analizada para encontrar el mejor sitio para el iniciador que además debía de tener un valor de T_m similar al del oligo que se iba a utilizar en la técnica de RACE. El anexo 16 muestra la secuencia nucleotídica del oligo LS1RC5 en rojo así como la T_m que mostró ser compatible con los oligos de RACE.

A partir del RNA total extraído de las hormigas se realizó la obtención del extremo 3' del DNAc por la técnica de RACE utilizando el oligonucleótido específico para la subunidad LS1 (LSIRC5) y el oligo específico para el adaptador 3' (GeneRacer 3'). En esta amplificación se obtuvieron varias bandas muy tenues como se muestra en la figura 17 (carril 1), por lo que se realizó una reacción de PCR semianidada utilizando los oligos LSIRC5 y GeneRacer 3' nested. Una vez concluida la reacción se observó la presencia de una banda de aproximadamente 230 pb (Figura 17, carril 2), la cual fue clonada en el vector pCR Topo 2.1, se seleccionaron 10 colonias y estas fueron caracterizadas con la enzima *EcoRI* para comprobar la presencia del inserto del tamaño deseado que finalmente fueron secuenciadas. Una de las secuencias obtenidas fue alineada con la secuencia de la subunidad LS1 y se comprobó la presencia del iniciador LSIRC5 (Anexo 17A). Posteriormente, esta secuencia fue traducida a la secuencia de aminoácidos correspondientes y se realizó la comprobación de la secuencia donde se había alineado el oligo degenerado (durante el paso de obtención de la secuencia de LS1). De la misma forma que las subunidades menores se determinó que esta secuencia posee dos codones extra en el carboxilo terminal con referencia a la secuencia reportada previamente (Pan and Hink, 2000). Inmediatamente después, se encuentra el codón de terminación seguido de una región 3' no traducible de 137 pb que incluye la señal de poli adenilación y la cola de poliA que presentó diferente tamaño en cada clona. En el anexo 17B se muestra el alineamiento entre la secuencia de LS1 reportada previamente y la obtenida en el presente trabajo. En total fueron secuenciadas 7 clonas producto de una reacción de PCR, la secuencia de todas las clonas fueron prácticamente idénticas con solo 2 cambios nucleotídicos a lo largo de toda la secuencia (Anexo 18).



Figura 17 Obtención del extremo 3' de la subunidad LSI del DNAc de *Pseudomyrmex* sp. El gel de agarosa al 1.2% muestra en el carril 1 la reacción de PCR para la obtención del extremo 3' del DNAc con la presencia de varias bandas, en el carril 2 la reacción de PCR anidada donde se observa la amplificación de una banda de aproximadamente 230 pb y en el carril 3 el control negativo. M= pBS + *MspI*.

10.7.2 Obtención del extremo 5' del DNAC

Una vez obtenida la secuencia del extremo 3' del DNAC que codifica para la subunidad LS1 de las mirmexinas fue utilizada para el diseño de un oligonucleótido específico para la obtención del extremo 5' del DNAC por la técnica de RACE. En vista de que se necesitaba un oligo con orientación 3' la secuencia fue analizada para encontrar el mejor sitio para el iniciador que además debía de tener un valor de Tm similar al de los oligos que se iba a utilizar en la técnica de RACE (Anexo 19).

Se realizó la obtención del extremo 5' del DNAC por la técnica de RACE utilizando para ello se utilizó el oligonucleótido específico para las subunidades mayores (LSIRCF), diseñado anteriormente y el oligo específico para el adaptador 5' (GeneRacer 5'). Con esta reacción se obtuvo la amplificación de dos bandas una de aproximadamente 350 pb y otra mas débil de aproximadamente 450 pb (figura 18 A). Para confirmar o descartar esta banda se realizó una reacción de PCR semianidada utilizando los oligos LSIRCF y GeneRacer 5' nested. Una vez concluida la reacción se observó la presencia de una banda de aproximadamente 350 pb (figura 18B), la cual fue clonada en el vector pCR Topo 2.1. Se seleccionaron 10 colonias y estas fueron caracterizadas con la enzima *EcoRI* para comprobar la presencia del inserto. Finalmente, 2 clonas fueron secuenciadas y analizadas con el programa DNA Strider 1.4f6 para la búsqueda de la fase de lectura abierta.

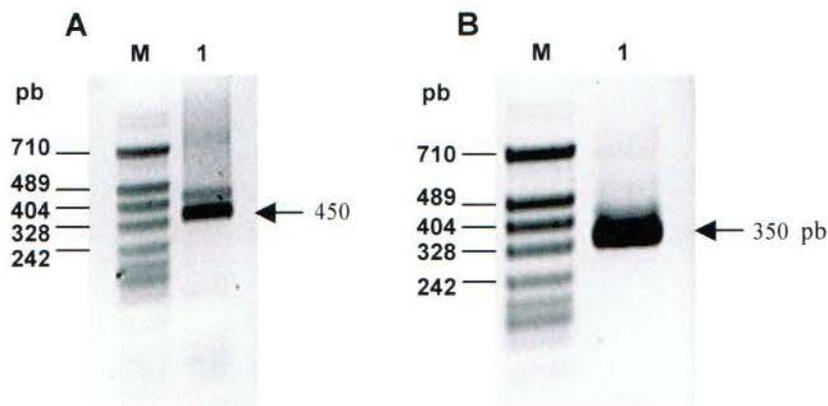


Figura 18 Obtención del extremo 5' de las subunidades mayores del DNAC de *Pseudomyrmex* sp. En **A** se muestra en el carril 1 la primera reacción de PCR donde se obtuvieron dos bandas una de aproximadamente 350 pb (la mas intensa) y una de aproximadamente 450 pb (mas débil). En la imagen en **B** en el carril 1 se observa la reacción de PCR anidado donde se obtuvo una banda muy intensa de aproximadamente 350 pb. M= pBS + *MspI*. Agarosa 1.2%

El análisis de la secuencia del extremo 5' del DNAC mostró una fase de lectura abierta de 216 pb, las cuales codifican para 72 aminoácidos. Dentro de esta fase de lectura los últimos 35 aminoácidos pertenecen al péptido maduro (Anexo 20A), la única diferencia que se detectó fue la presencia de dos aminoácidos en el extremo carboxilo terminal que no habían sido previamente reportados lo cual se muestra claramente en el anexo 20B, con el alineamiento entre la secuencia de LS1 previamente reportada y la secuencia del DNAC de LS1 determinada en esta tesis. De esta secuencia aminoacídica también podemos deducir que la secuencia que se encuentra río arriba del codón de

inicio de la traducción (54 pb) representó a la región 5' no traducible. Entre las secuencias analizadas se encontró una nueva subunidad que no había sido previamente reportada y que se denominó LS3 cuya secuencia se muestra en el anexo 21 la cual contiene 9 aminoácidos diferentes con respecto a la LS1. Debido a que estos péptidos son proteínas de secreción y por lo tanto dentro de su secuencia deben contener un péptido señal, se verificó si la secuencia de 37 aminoácidos que se encuentra río arriba de la secuencia de LS1 constituía un péptido señal, con el programa SignalP 3.0. En la figura 19 se muestra la grafica obtenida a partir del análisis de la secuencia del péptido LS1, el programa predice la presencia de un péptido señal de 27 aminoácidos colocando el sitio de corte entre los aminoácidos 27 y 28, dado que el péptido LS1 comienza en el aminoácido 35, la secuencia de 10 aminoácidos desde la posición 28 a la 37 fue considerada como un propéptido.

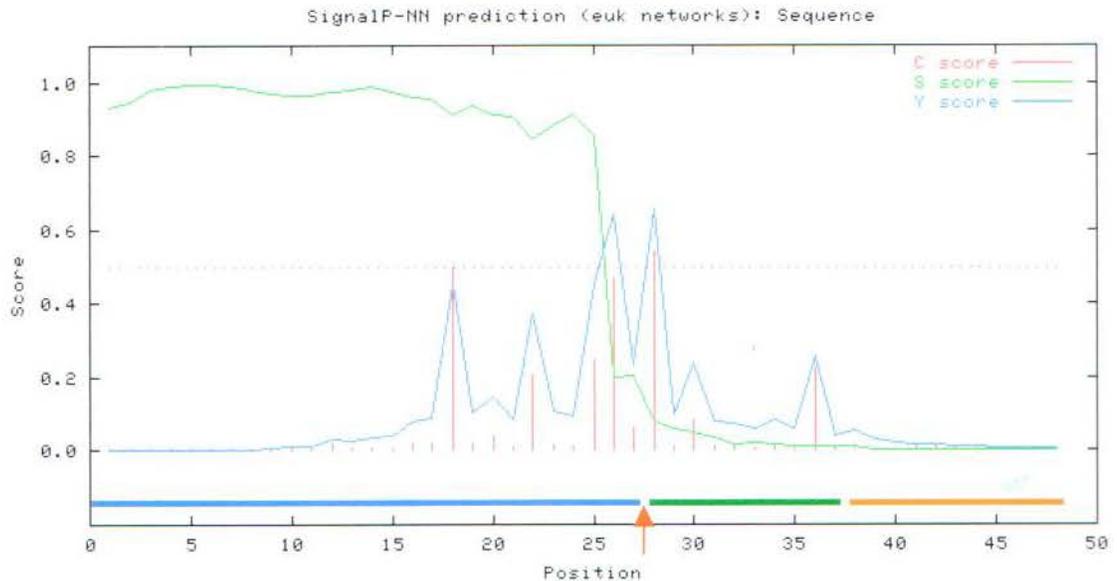


Figura 19 Predicción de la presencia de un péptido señal por el programa SignalP 3.0. En esta grafica se presenta el resultado del análisis con el programa SignalP 3.0, el programa predice la presencia de un péptido señal de 27 aminoácidos (línea azul), el sitio mas probable de corte esta entre los aminoácidos 27 y 28 (flecha roja), por lo tanto los 10 aminoácidos entre el péptido LS1 (línea naranja) y el péptido señal es el propéptido.

Una vez que se ensamblaron las secuencias tanto del extremo 5' como del 3' para integrar el DNAc completo de las subunidades mayores, se concluyó que este DNAc esta compuesto de aproximadamente 427 pb de los cuales 54 corresponden a la región 5' no traducible y 216 nucleótidos que pertenecen a la fase de lectura abierta. De estos 75 pb (25 aa) corresponden al del péptido señal, 36 pb (12 aa) al propéptido y 105 pb (35 aa) al péptido maduro y 137 pb que corresponden a la región 3' no traducible. Finalmente la cola de poliA presenta un tamaño de 18 pb, como se muestra en el anexo 22.

10.8 Amplificación de los genes de las subunidades mayores

Una vez obtenido el DNAC completo de las subunidades mayores se diseñaron un par de oligonucleótidos específicos sobre las regiones 5 y 3' no traducibles para la amplificación de los genes que codifican para las subunidades menores a partir del DNA genómico. El programa Amplify 1.1 fue utilizado para probar si el oligo amplificaba el fragmento esperado a partir de la secuencia blanco, la secuencia y la posición de los oligonucleótidos se muestra en el anexo 23

Se realizó la amplificación por PCR según las condiciones descritas en materiales y métodos La figura 20 muestra el gel que se realizó y como puede observarse se obtuvieron 4 bandas de amplificación, pero solo fueron clonadas 2 de ellas, las de aproximadamente 700 pb y de 600 pb, debido a que se presentaban en mayor cantidad y se ligaron al vector de manera mas eficiente.

El análisis de la secuencia de la banda de 700 pb mostró que este producto amplificado fue específico para el gen de la subunidad mayor LS1. La estructura del gen codificante para esta subunidad se muestra en la Figura 21A conteniendo, 4 exónes de 177, 30, 30 y 9 pb respectivamente y 3 intrónes de 109, 85 y 89 pb respectivamente.

El análisis de la banda de 600 pb mostró que este producto amplificado contenía una mezcla de secuencias de varias subunidades, ya que se pudieron identificar 3 subunidades, la LS2, la cual ya había sido previamente reportada y 2 subunidades nuevas la LS3 y LS4 (Figura 21B). Estos últimos constan de 4 exónes de 147, 30, 30 y 9 pb respectivamente y 3 intrónes de 96, 85 y 89pb respectivamente. Una de las principales diferencias entre estas secuencias aquí descritas es la delección de aproximadamente 100 pb en el intrón número 1 de las subunidades LS2, LS3 y LS4. En el anexo 24 se muestra cada una de las secuencias de las subunidades mayores (LS1, LS2, LS3 y LS4). Se secuenciaron un total de 9 clonas producto de 2 experimentos de PCR de las cuales 1 clona correspondió a la subunidad LS1, 3 clonas a la subunidad LS2, 3 a la subunidad LS3 y 2 a la LS4. El alineamiento de las 9 secuencias obtenidas se muestra en el anexo 25 donde se observa claramente la inserción de 99 pb en el intrón número uno de la subunidad LS1. En el anexo 26 se muestra el alineamiento de la traducción de cada una de las secuencias de nucleótidos a aminoácidos, en el cual se muestra cuales son los aminoácidos que difieren de la secuencia de LS1.

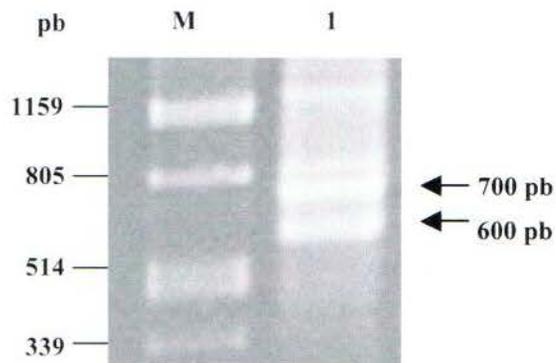


Figura 20. Amplificación de los genes de las subunidades mayores. El gel de agarosa al 1.2% muestra la amplificación de los genes que codifican para las subunidades menores. En el carril 1 se muestran las bandas de aproximadamente 600 y 700 pb que fueron clonadas y secuenciadas. M= DNA λ + *Pst*I.

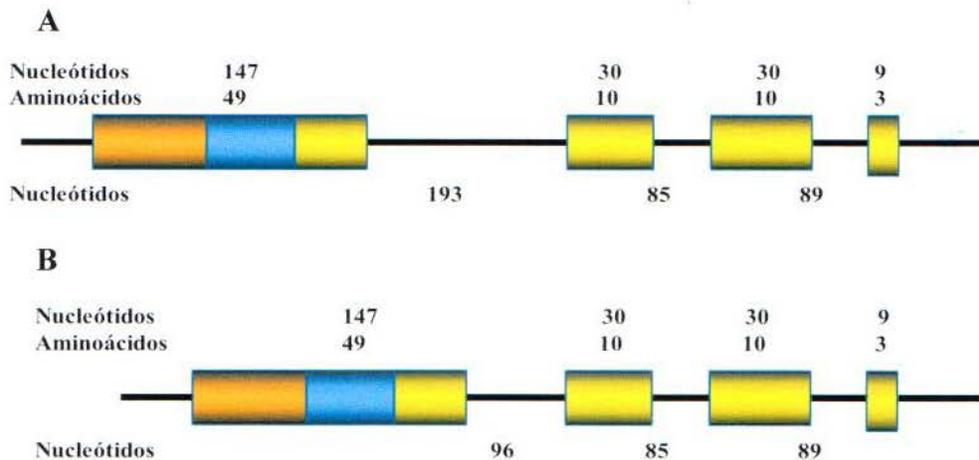


Figura 21. Diagrama de la estructura de los genes de las subunidades mayores. En A se muestra la estructura del gen para la subunidad LS1, la cual consta de 4 exónes y 3 intrónes. En B se muestra la estructura de los genes para las subunidades LS2, LS3 y LS4.

Para complementar los resultados obtenidos en esta tesis se realizaron alineamientos para comparar las secuencias de las regiones no traducibles en los DNAs y las secuencias de los intrónes en los genes. En el anexo 27 se muestra el alineamiento realizado entre las regiones 3' y 5' no traducibles de las subunidades mayores y

menores, como puede observarse en el anexo 26A se muestra el alineamiento entre las regiones 3' no traducibles de ambas subunidades y que muestra interesantemente un 97% de similitud, Por otro lado, en el anexo 26B se muestra el alineamiento entre las regiones 5' no traducibles de las subunidades menores y mayores también mostró que son muy similares con 88% de similitud entre ellas. Además, en el anexo 28 se muestra el alineamiento entre las secuencias de los intrones de ambas subunidades, para el intrón 1 de la subunidad LS1 con la secuencia consenso del intrón 1 de las subunidades menores y se obtuvo un 42% de similitud, en tanto que el alineamiento para el intrón 1 del resto de las subunidades mayores y el intrón 1 de las subunidades menores mostró un 68% de similitud. El alineamiento del intrón 2 mostró también un 77% de similitud y para el intrón 3 se obtuvo un 92% de similitud, esto entre las subunidades mayores y menores.

154723

11. DISCUSIÓN

El presente trabajo consistió en clonar las secuencias codificantes de los péptidos de bajo peso molecular del veneno de *Pseudomyrmex* sp así como en realizar la caracterización de los genes que codifican para estos péptidos.

La colecta de las hormigas *Pseudomyrmex* sp fue realizada en el Jardín botánico de la ciudad de Santa Cruz de la Sierra, Republica de Bolivia con la colaboración del Departamento de Entomología del Museo de Historia Natural "Noe Kempp Mercado" de esa ciudad. Las hormigas fueron conservadas en la solución RNA later (Ambion, USA), la cual permitió que el RNA se mantuviera intacto durante el periodo de almacenamiento y transporte de las hormigas desde Bolivia a México. En el laboratorio las hormigas fueron conservadas a -20°C hasta el momento en que se realizó la extracción de RNA total con la técnica de Trizol (Invitrogen, USA). La visualización del RNA total en un gel de agarosa demostró que la solución RNA later conservó el RNA total en buenas condiciones. Para la extracción de DNA genómico se colectaron hormigas las cuales fueron conservadas en etanol al 70%, de igual manera se obtuvo DNA genómico de muy buena calidad. Si se requiere es posible extraer DNA genómico de las hormigas conservadas en RNA later, pero es necesario lavar las hormigas con agua y etanol al 70% antes de iniciar el procedimiento de extracción, ya que si no son lavadas al llegar al paso de precipitación del DNA con etanol precipitan una gran cantidad de sales, las cuales hacen muy difícil la recuperación de DNA genómico. La identificación de las hormigas se realizó con la ayuda de un estereoscopio (Olympus, USA), y fueron analizadas en la búsqueda de las principales características que las distinguen de otras especies según las claves taxonómicas publicadas anteriormente (Wheeler, 1942; Bolton, 1994; Ward, 1985, 1991, 1993, 1999), llegando a la conclusión de que la hormiga colectada correspondió al género *Pseudomyrmex* sp.

En la búsqueda de la secuencia de los DNACs que codifican para las subunidades menores se utilizó la secuencia de aminoácidos de la subunidad SS1, con la cual se diseñaron un par de oligonucleótidos degenerados que fueron utilizados para la amplificación del DNAC codificante para esta subunidad. La reacción de RT-PCR produjo una banda de 87 pb que fue clonada y secuenciada y permitió conocer la secuencia nucleotídica codificante a una región de la subunidad SS1, ya que esta secuencia estaba flanqueada por los oligonucleótidos degenerados usados en la amplificación. Esta secuencia fue de gran utilidad ya que fue utilizada para el diseño de un oligonucleótido específico necesario para los ensayos de amplificación rápida de los extremos de un DNAC (RACE, por sus siglas en ingles). La técnica de RACE permitió obtener la secuencia de DNAC completo de una manera muy sencilla y sin tener que recurrir a la construcción de una biblioteca de DNAC, solo usando oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia de interés. Esta técnica permitió obtener la secuencia completa del DNAC codificante para las subunidades SS2 y SS3 incluyendo 54 pb de la región 5' no traducible y 137 pb de la región 3' no traducible. Las secuencias nucleotídicas codificantes a las subunidades menores obtenidas demostraron la presencia

de un aminoácido extra al final del extremo carboxilo terminal del péptido, dando un tamaño total de 30 aminoácidos, con respecto a los péptidos de 29 aminoácidos secuenciados previamente (Pan and Hink, 2000). Tomando en cuenta que la secuencia de aminoácidos del veneno fue obtenida por la secuenciación directa de los péptidos y dado que el aminoácido extra se encuentra en el extremo carboxilo terminal, probablemente el aminoácido faltante en estas secuencias se debe a una limitante de la técnica de secuenciación de aminoácidos que reportó una secuencia incompleta. La presencia de este aminoácido fue verificada analizando las secuencias de los DNAC en un total de 10 clonas que muestran claramente la presencia de 30 aminoácidos en lugar de los 29 descritos previamente (Pan and Hink, 2000).

Adicionalmente, las secuencias correspondientes a las regiones no traducibles de ambos extremos del DNAC fueron utilizadas para el diseño de oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen completo de cada una de las subunidades. La secuenciación de las bandas obtenidas en este ensayo permitió obtener por primera vez la secuencia correspondiente a los genes de las subunidades SS2 y SS3. El análisis de la estructura de estos genes muestra que están constituidos de 4 exónes y 3 intrónes que codifican un total de 67 aminoácidos. Utilizando este mismo par de oligonucleótidos se logró la secuenciación de una banda de peso molecular mas pequeño que codifica un total de 55 aminoácidos, dando como resultado la secuencia de una nueva subunidad que no había sido descrita previamente y que se denominó como SS4. El alineamiento mostrado en el anexo 13 muestra que este péptido es mas pequeño debido a una delección del exón número 2 de la secuencia de las mirmexinas. Todas las secuencias de las subunidades menores de las mirmexinas secuenciadas en el DNA genómico presentan al igual que la secuencia en DNAC el aminoácido extra en el extremo carboxilo terminal dando un total de 30 aminoácidos para el péptido maduro en el caso de SS2 y SS3 y 18 aminoácidos para SS4. Estos resultados confirman claramente la presencia de este aminoácido en las subunidades menores.

El análisis de las secuencias correspondientes a las subunidades SS2 y SS3 mostró que codifican a 67 aa de los cuales los péptidos de bajo peso molecular corresponden a los últimos 30 aa mientras que SS4 codifica a 55 aa donde los últimos 18 aminoácidos corresponden al péptido maduro. Esta predicción se realizó tomando en cuenta que estos son péptidos que se secretan en una glándula venenosa y deben ser exportados de la manera correcta por lo que el resto de los aminoácidos corresponden a un péptido señal. Los péptidos señal controlan la entrada de casi todas las proteínas hacia las vías de secreción tanto en procariones como en eucariotes (Gierasch, 1989; von Heijne, 1990; Rapoport, 1992). Estos péptidos comprenden la porción N-terminal de la cadena polipeptídica y son removidos mientras la proteína es translocada a través de la membrana. La estructura común de los péptidos señal de varias proteínas corresponde a una región cargada positivamente, seguida por una región hidrofóbica y una región neutra pero polar (von Heijne, 1983, 1986). Para determinar la presencia del péptido señal en las secuencias se utilizó el programa SignalP 3.0 (Nielsen *et al.*, 1997, Bendtsen *et al.*, 2004). Este programa es uno de los mas utilizados actualmente y esta construido sobre una red neural y puede predecir tanto la presencia de los sitios de corte para la peptidasa señal 1, así como la clasificación del péptido (secretorio o no secretorio). Este programa proporciona 3 valores ("Scores") entre 0 y 1 para cada posición en una

secuencia de aminoácidos. El valor S (S-score) es el resultado que indica si es un péptido señal o no lo es y puede ser interpretado como un estimado de la probabilidad de que esa zona pertenece a un péptido señal. En tanto que el valor C (C-score) que indica el sitio de rompimiento/sitio de no rompimiento) es interpretado como un estimado de la probabilidad de que esa posición sea la primera del péptido maduro (posición +1 relativa al sitio de rompimiento). En el caso de que se presenten varios valores C de intensidad comparable, el verdadero sitio de rompimiento puede ser localizado si observamos donde la curva del valor S coincide mejor con la región donde se produce la transición entre la región péptido señal y no-péptido señal (valor C). Para ello, el programa hace cálculos con el promedio geométrico del valor C y la derivada del valor S dando como resultado el valor Y (Y score), el cual confirma el verdadero sitio de rompimiento (Bendtsen *et al.*, 2004). El análisis de las secuencias de aminoácidos de todas las subunidades de las mirmexinas con el programa SignalP 3.0 predijo la presencia de un péptido señal de 25 aminoácidos. Este hallazgo fue confirmado al realizar una búsqueda en el programa Blast (Altschul *et al.*, 1997) con el cual se encontró la secuencia del péptido señal de la pilosulina, péptido encontrado en el veneno de la hormiga *Myrmecia pilosula* y que presenta un 70% de identidad con respecto a la secuencia del péptido señal descrito en esta tesis. En base a todo lo anterior y debido a que con la purificación de los péptidos del veneno completo (Pan and Hink, 2000) se sabe que el péptido maduro es de 30 aminoácidos por lo que se consideró que los 12 aminoácidos colocados entre el péptido señal y el péptido maduro corresponden a un propéptido. Reyna Alvarado en 2006 (Reyna-Alvarado, 2006) en su tesis de licenciatura mostró mediante Western blot a partir de extractos de glándula de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. La presencia de varias bandas que corresponden a las distintas etapas del procesamiento de los péptidos de bajo peso molecular (péptido señal + propéptido+ péptido maduro, en diferentes combinaciones). Las bandas obtenidas presentan pesos moleculares similares a los esperados de manera teórica que fueron calculados a partir de las secuencias descritas en esta tesis. Estos experimentos confirman la predicción del programa SignalP 3.0 en cuanto al sitio de rompimiento del péptido señal y apoyan la presencia de un propéptido

El procedimiento para la obtención del DNAc completo de las subunidades mayores se realizó de la misma forma. En un primer paso se amplificó por RT-PCR con oligonucleótidos degenerados la secuencia correspondiente al DNAc de la subunidad LS1, esta secuencia fue utilizada para el diseño de un oligonucleótido específico para los ensayos de RACE. La secuenciación de los productos amplificados de las subunidades mayores obtenidos por RACE nos permitió obtener el DNAc completo de estas subunidades, las cuales presentaron en este caso dos aminoácidos extra con respecto a las secuencias previamente descritas (Pan and Hink, 2000) en el extremo carboxilo terminal del péptido dando un total de 35 aminoácidos. En este caso la secuencia nucleotídica del DNAc completo fue de 72 aminoácidos donde solo los últimos 35 aminoácidos correspondieron a la secuencia previamente reportada, por lo tanto se utilizó de nuevo el programa SignalP 3.0 para la predicción de la presencia del péptido señal con el sitio de corte entre los aminoácidos 25 y 26. Esta predicción mostró que la longitud del péptido señal es de 25 aa, el propéptido de 12 aa y finalmente el péptido maduro de 35 aa. Para nuestra sorpresa las regiones 5' (54 pb) y 3' no traducibles (137 pb) fueron del mismo tamaño que en las subunidades menores. Esta similitud en tamaño

nos llevó a realizar un alineamiento de estas regiones para determinar el porcentaje de similitud. El alineamiento de las regiones 5' UTR de las subunidades mayores y menores mostró un 83% de similitud, mientras que las regiones 3' UTR mostraron un 97% de similitud. Este alto grado de similitud en la secuencias podría indicar que estas secuencias tienen un papel importante en la regulación de la expresión de estos genes. La similitud mostrada por las regiones UTRs de estas secuencias fue tomada en cuenta para el diseño de oligonucleótidos específicos para la amplificación de los genes de las subunidades mayores. Las bandas obtenidas producto de la amplificación de estos genes fueron clonadas y secuenciadas y por primera vez obtuvimos la secuencia codificante de los genes de las subunidades LS1, LS2 y de 2 nuevas subunidades que no habían sido previamente reportadas y que fueron denominadas LS3 y LS4. Las secuencias de las subunidades LS2, LS3 y LS4 fueron del mismo tamaño, mientras que la subunidad LS1 presentó una inserción de aproximadamente 93 nucleótidos en el intrón número 1. La estructura de los genes de las secuencias de las subunidades mayores también presentaron 4 exones y 3 intrones de manera similar a como se observó en las subunidades menores.

Las clonas secuenciadas de DNAc y DNA genómico en el análisis de las subunidades menores sumaron un total de 60 entre las cuales la subunidad SS1 solo fue encontrada en una ocasión y solo en un producto amplificado a partir de oligonucleótidos degenerados y se proponen dos explicaciones probables a este hecho, en primer lugar pudiera ser posible que la subunidad SS1 se estuviera expresando a un nivel tan bajo que no fuera detectada en el experimento de RACE y que ya sea la región 5' y 3' no traducibles o ambas fueran ligeramente diferentes (con respecto a las otras subunidades) y esto no permitió que los oligonucleótidos se alinearan con la secuencia. La segunda explicación es que pudiera ser posible que hubiera un error durante la secuenciación de aminoácidos de esta subunidad, ya que la diferencia entre las subunidades SS1 y SS2 es de solo 1 aminoácido en la posición 10 (lisina por arginina).

Todas las secuencias tanto de nucleótidos como de aminoácidos fueron analizadas con el programa Blast (Altschul *et al.*, 1997) para la búsqueda de secuencias similares. En este caso solo se encontró una secuencia similar en la base de datos, la cual correspondió a la secuencia del péptido señal para el péptido denominado pilosulina (70 % de homología), el cual se encuentra en el veneno de la hormiga *Myrmecia pilosula*.

Es importante además señalar que las secuencias de aminoácidos de los péptidos maduros así como las secuencias de nucleótidos no mostraron un porcentaje de similitud significativo con ninguna secuencia reportada en la base de datos hasta el momento de la escritura de esta tesis.

Por otra parte, en experimentos realizados en el laboratorio con la hormiga *Pseudomyrmex* sp colectada en el Ejido Benito Juárez de Tuxpan, Veracruz, para amplificar los genes de esta hormiga utilizando los oligonucleótidos usados en la amplificación de los genes de las subunidades menores, tomando en cuenta el grado de similitud existente entre las UTR's de ambas subunidades obtenidas en esta tesis. El alineamiento de las secuencias obtenidas en los péptidos señal tanto de *Pseudomyrmex* sp (colectada en Bolivia) como de *Pseudomyrmex* sp (colectada en Veracruz) mostraron

un 92 % de similitud. Con ello se propone que la secuencia del péptido señal esta conservada en varias poblaciones de *Pseudomyrmex* en América.

Un hallazgo interesante de esta tesis se presentó al realizar el análisis de las secuencias de los intrones de las subunidades menores y mayores. Se encontró al comparar la secuencia del intrón número de 1 de la subunidad mayor LS1 y la secuencia consenso del intrón número 1 de las subunidades menores un 44% de similitud entre ambos intrones, pero tomando en cuenta que el intrón 1 de LS1 tiene una inserción de 93 pb se realizó un nuevo alineamiento removiendo esta inserción, dicho alineamiento proporcionó un 70% de similitud entre ambos intrones. Por otro lado, la secuencia consenso del intrón 2 de las subunidades menores y la secuencia consenso del intrón 2 de las subunidades mayores mostró un 86% de similitud, mientras que el intrón 3 mostró una similitud del 92%. Por otro lado, la similitud entre los exónes 1, 2, 3, y 4 es de 77, 47, 57 y 56% respectivamente. En este caso se debe tomar en cuenta que el exón 1 contiene el péptido señal y por ello su porcentaje de similitud es tan elevado, esta diferencia entre los porcentajes de similitud de los intrones y los exónes, puede indicar que probablemente los genes que codifican para estas subunidades proceden de un mismo origen, es decir un gen ancestral que dio origen a estas secuencias.

12. CONCLUSIONES

El presente trabajo consistió en clonar las secuencias codificantes de los péptidos de bajo peso molecular del veneno de las hormiga *Pseudomyrmex* sp así como en realizar la caracterización de los genes que codifican para estos péptidos y se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. Se determinaron las secuencias nucleotídicas de los DNAs completos para las subunidades menores y mayores del veneno de *Pseudomyrmex* sp.
2. Se determinaron las secuencias nucleotídicas de los DNAs completos de tres subunidades nuevas denominadas SS4, LS3 y LS4.
3. Las secuencias de los precursores de todas las subunidades de las mirmexinas constan de un péptido señal, un propéptido y el péptido maduro con una similitud del 96 % en el péptido señal entre las secuencias encontradas.
4. Los péptidos de bajo peso molecular están codificados por genes independientes para cada una de las subunidades SS2, SS3, SS4, LS1, LS2, LS3 y LS4 .
5. Los genes codificantes para todas las subunidades presentaron la misma estructura con 4 exones y 3 intrones, excepto SS4 que consta de 3 exones y 2 intrones.
6. Los intrones están conservados entre las subunidades menores y mayores, ya que el intrón 1 presentó hasta un 70% de similitud mientras que los intrones 2 y 3 presentaron un 86% de similitud.
7. Las secuencias nucleotídicas de los extremos 5' y 3' no traducibles entre las subunidades mayores y menores están altamente conservadas ya que presentaron un 83 y 97% de similitud respectivamente.
8. Las subunidades menores y mayores presentaron uno y dos aminoácidos extra respectivamente con respecto a la secuencia previamente descrita.

9. La secuencia consenso de los péptidos señal de las subunidades menores y mayores presentaron un 70% de similitud con la secuencia aminoacídica del péptido señal de pilosulina de la hormiga *Myrmecia pilosula*, lo que indica que probablemente el mecanismo de procesamiento de los péptidos en las glándulas esta conservado en las diferentes hormigas.

10. Las secuencias de los genes obtenidas en esta tesis no mostraron similitud significativa con ninguna secuencia reportada en las bases de datos a la fecha, por lo que se postulan como una nueva familia de genes.

13. PERSPECTIVAS

En conclusión los resultados de la tesis aportan las secuencias nucleotídicas de los genes y el DNAC de las distintas subunidades de las mirmexinas, lo cual permitirá su clonación en un vector apropiado para la obtención en grandes cantidades de estos péptidos para el análisis funcional en el laboratorio a corto y mediano plazo.

El hallazgo de los altos porcentajes de similitud entre las secuencias de las subunidades menores y mayores. la gran similitud entre las regiones no traducibles y los intrones de una especie de *Pseudomyrmex* (colectada en Veracruz, México) analizada en el laboratorio así como los péptidos señal de diferentes hormigas abren la posibilidad para evaluar si estas secuencias podrían ser utilizadas para el estudio filogenético de las hormigas. ;

Además, las secuencias de los genes obtenidos en esta tesis permitirá el diseño de oligonucleótidos específicos para la amplificación y secuenciación de las regiones promotoras que permitirán dilucidar si estos genes se encuentran formando un locus o están separados en el genoma de la hormiga.

Finalmente, a largo plazo la clonación de éstas secuencias nucleotídicas en vectores apropiados permitirán la producción y uso de estos péptidos con fines terapéuticos.

14. LITERATURA CITADA

- Altman RD, Schultz DR, Collins-Yudiskas B, Aldrich J, Arnold PI, Brown HE. 1984. The effects of a partially purified fraction of ant venom in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 27: 277-285.
- Altschul SF, Thomas LM, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
- Banks BEC, Rumjanek FD, Sinclair NM, Vernon CA. 1976. Possible therapeutic use of a peptide from bee venom. *Bull Inst Pasteur Paris* 74: 137-144.
- Banks BE, Dempsey CE, Vernon CA, Warner JA, Yamey J. 1990. Anti-inflammatory activity of bee venom peptide 401 (mast cell degranulating peptide) and compound 48/80 results from mast cell degranulation in vivo. *Br J Pharmacol* 99:350-354.
- Billingham ME, Morley J, Hanson JM, Shipolini RA, Vernon CA. 1973. Letter: an anti-inflammatory peptide from bee venom. *Nature* 245:163-164.
- Breithaupt H, Habermann E. 1968. MCD (mast cell-dregranulating) peptide from bee venom: Isolation and biochemical and pharmacological properties. *Naunyn-Schmiedbergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 261: 252-270.
- Chang YH, Bliven ML. 1979. Anti-arthritis effect of bee venom. *Agents Actions* 9: 205-211.
- Cociancich S, Goyffon M, Bontems F, Bulet P, Bouet F, Menez A, and Hoffmann J. 1993. Purification and characterization of a scorpion defensin a 4kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins. *Biochem Biophys Res Commun* 194:17-22.
- Cruciani R, Barker J, Durell S, Raghunathan G, Guy H, Zasloff M, Stanley E. 1992. Magainin 2, a natural antibiotic from frog skin, forms ion channels in lipid bilayer membranes. *Eur J Pharmacol* 226:287-296.

4

Dieminger L, Schultz DR, Arnold PI. 1979. Activation of the classical complement pathway in human serum by a small oligosaccharide. *J Immunol* 123(5):2201-11.

Duclohier H, Molle G, Spach G. 1989. Antimicrobial peptide magainin I from *Xenopus* skin forms anion-permeable channels in planar lipid bilayers. *Biophys J* 56:1017-1021.

Bendsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. 2004. Improved prediction of signal peptides - SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340(4):783-95.

Fredholm B. 1966. Studies on a mast cell degranulating factor in bee venom. *Biochem Pharmacol* 15:2037-2043.

Eiseman JL, von Bredow J, Alvares AP. 1982. Effect of honeybee (*Apis mellifera*) venom on the course of adjuvant-induced arthritis and depression of drug metabolism in the rat. *Biochem Pharmacol* 31:1139-1146.

Gauldie J, Hanson JM, Shipolini RA, Vernon CA. 1978. The structures of some peptides from bee venom. *Eur J Biochem* 83:405-410.

Gierasch LM. 1989. Signal sequences. *Biochemistry*. 28:923-930.

Habermann, E, Zeuner G. 1971. Comparative studies of native and synthetic melittins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 270:1-9.

Hink WF, Butz JJ. 1985. Primary culture of ant venom gland cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 21:333-339.

Hink WF, Romsted KJ, Burke JW, Doskotch RW, Feller DR. 1989. Inhibition of human platelet aggregation and secretion by ant venom and a compound isolated from venom. *Inflammation* 13:175-184.

Hink WF, Pappas PW, Jaworski D. 1994. Partial biochemical characterization of venom from the ant *Pseudomyrmex triplarinus*. *Toxicon* 32:763-772.

Inoue K, Fujisawa H, Motonaga A, Inoue Y, Kyoi T, Ueda F, Kimura K. 1994. Anti-inflammatory effects of etodolac: comparison with other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biol Pharm Bull.* 17:1577-1583.

Janzen DH. 1966. Coevolution of mutualism between ants and acacias in Central America. *Evolution* 20:249-275.

Kaufmann R. 1995. Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology. *J Biotechnol* 41:155-175.

Koburova KL, Michailova SG, Shkenderov SV. 1985. Further investigation on the anti-inflammatory properties of adolapin-bee venom polypeptide. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 11:50-55.

Landucci EC, Antunes E, Donato JL, Faro R, Hyslop S, Marangoni S, Oliveira B, Cirino G, de Nucci G. 1995. Inhibition of carrageenin-induced rat paw edema by crotafotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. *Br J Pharmacol* 114:578-583.

Lewis RJ, Garcia ML. 2003. Therapeutic potential of venom peptides. *Nature Reviews Drug discovery* 2:790-802.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

Martin W, Hartter P. 1980. Basic peptides in bee venom. VI. Structure-activity studies on the anti-inflammatory effects of derivatives and fragments of the MCD-peptide. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 361:525-535.

Neumann W, Habermann E, Amed G. 1952. Zur papierelektrophoresis den Fraktionierung tierischer Gifte. *Naturwissenschaften* 39:286-287.

Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10 (1):1-6.

Pastrana J, Blasco R, Erce R, Pinillos M. 2003. Animal sting and bites. *An Sist Sanit Navar* 26 Suppl 1:225-241

Rapoport TA. 1992. Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* 258:931-936.

Reyna-Alvarado DC. 2006. Detección de los oligopéptidos del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex* sp. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

Schultz DR, Arnold PI. 1977. Venom of the ant *Pseudomyrmex* sp.: further characterization of two factors that affect human complement proteins. *J Immunol* 119(5):1690-9.

Schultz DR and Arnold PI. 1978. Clinical aspects of the complement. Georg Thieme Publishers. Stuttgart, pp. 172-186.

Schultz DR, Arnold PI, Wu MC, Lo TM, Volanakis JE, Loos M. 1979. Isolation and partial characterization of a polysaccharide in ant venom (*Pseudomyrmex* sp.) that activates the classical complement pathway. *Mol Immunol* 16(4):253-64.

Schultz DR, Arnold PI. 1981. Activation of first component of complement (C1) in guinea pig serum by a polysaccharide is prevented by C1 inhibitor. *J Immunol* 126(4):1558-61.

Schultz DR, Arnold PI. 1984. Handbook of Natural Toxicon, Insect Poisons, Allergens and Other Invertebrate Venoms, vol. 2. Marcel Dekker, New York, pp. 243-290.

Shkenderov S, Koburova K. 1982. Adolapin-a newly isolated analgetic and anti-inflammatory poly-peptide from bee venom. *Toxicon* 20:317-321.

Tu AT. 1977. Venoms of bees, hornets, and wasps. in venoms: chemistry and molecular biology. John Wiley and Sons, New York, pp. 504.

von Heijne G. 1983. Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur J Biochem* 133:17-21.

von Heijne G. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res* 14,:4683-4690.

- von Heijne G. 1990. The signal peptide. *J Membrane Biol* 115: 195–201.
- Ward PS. 1985. The nearctic species of the genus *Pseudomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Quaestiones Entomologicae* 21:209-246.
- Ward PS. 1991. Phylogenetic analysis of pseudomyrmecine ants associated with domatia-bearing plants. *Ant-plant interactions*. Oxford University Press, pp 335-352.
- Ward PS. 1993. Systematic studies on *Pseudomyrmex* acacia-ants (hymenoptera:Formicidae: Pseudomyrmecinae). *J Hym Res* 2:117-168.
- Ward PS. 1999. Systematic biogeography and host plant associations of the *Pseudomyrmex viduus* group (Hymenoptera: Formicidae), *Triplaris* -and *Tachigali*-inhabiting ants. *Zoological Journal of the Linnean Society* 126: 451-540.
- Wheeler WM. 1942. Studies of neotropical ant-plants and their ants. *Harvard Bull Mus Comp Zool* 90:41-65.
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW. 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol* 111:544-546.
- Zaluzec EJ, Gage DA, Watson JT. 1995. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: application in peptide and protein characterization. *Protein Expression Purification* 6:109-123.
- Zamyatnin AA. 1991a. Structural classification of endogenous regulatory oligopeptides. *Protein Seq Data Anal* 4:53-6.
- Zamyatnin AA. 1991b. Specificity of the amino acid content of endogenous regulatory oligopeptides. *Protein Seq Data Anal* 4:57-60.
- Zamyatnin A. 2004. Biochemical problems of regulation by oligopeptides. *Biochemistry (Mosc)* 69:1276-1282.

15. APÉNDICE DE PREPARACION DE REACTIVOS

Preparación de reactivos

Acetato de sodio 3M pH 5.2

Disolver 40.8 g de acetato de sodio en 30 ml de agua ultrapura y ajustar el pH de la solución con ácido acético glacial, aforar a 100 ml.

Acetato de potasio 5 M

Disolver 49.07 g de acetato de potasio en 30 ml de agua ultrapura y aforar a 100 ml.

Acido etilen diamino tetra acetico (EDTA) 0.5 M pH 8.0

Disolver 186.1 g de EDTA en 800 ml de agua ultrapura, agregar NaOH en escamas hasta que comience a disolverse el EDTA y ajustar a pH 8.0 con NaOH 10 N, aforar a 1L.

Agar LB

En 800 ml de agua destilada mezclar 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro de sodio, 15 g de agar-agar, aforar a 1 L y esterilizar.

Agarosa 0.8 %

En un matraz con 100 ml de buffer SB 1X agregar 0.8 g de agarosa y calentar a ebullición hasta que la agarosa se disuelva completamente, vaciar en el molde apropiado.

Agarosa 1.2 %

En un matraz con 100 ml de buffer SB 1X agregar 1.2 g de agarosa y calentar a ebullición hasta que la agarosa se disuelva completamente, vaciar en el molde apropiado.

Ampicilina 50 mg/ml

Disolver 500 mg de ampicilina en 8 ml de agua ultrapura, aforar a 10 ml.

Bromuro de etidio 2 mg/ml

Disolver 200 mg de bromuro de etidio en 80 ml de agua ultrapura, aforar a 100 ml y almacenar a 4°C protegido de la luz (en recipiente de vidrio ámbar). De esta solución se hizo una dilución 1:1000 para teñir los geles. No autoclavar.

Agua DEPC (DEPC 0.1 %)

A 999 ml de agua ultrapura añadir 1 ml de DEPC, mezclar e incubar a 37°C por 12 horas y autoclavar.

Cloruro de litio 6 M

Disolver 25.43 g de cloruro de litio en 50 ml de agua ultrapura, aforar a 100 ml

Jugo azul 6X (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glycerol 30%)

En 5 ml de agua ultrapura mezclar 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3 ml de glycerol, aforar a 10 ml. No autoclavar.

Cloruro de sodio 0.5 M

Disolver 2.92 g de cloruro de sodio en 80 ml de agua ultrapura, aforar a 100 ml.

Caldo LB

En 800 ml de agua destilada mezclar 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio, aforar a 1 L y esterilizar.

Hidroxido de sodio 10 N

Disolver 4 g de hidroxido de sodio en 5 ml de agua ultrapura, aforar a 10 ml.

Medio SOC (Tryptona 1 %, extracto de levadura 0.5 %, cloruro de sodio 1 %, glucosa 20 mM)

En 80 ml de agua destilada agregar 1 g de triptona, 0.5 g de extracto de levadura, 1 g de cloruro de sodio, 0.36 g de glucosa y aforar a 100 ml, esterilizar por filtración.

SDS 10 %

Disolver 10 g de SDS en 60 ml de agua mQ (agregar el SDS al agua lentamente con agitación constante) y aforar a 100 ml.

SB 20X pH 8.0 (NaOH 200 mM, ácido bórico)

Disolver 8 g de NaOH en 700 ml de agua mQ, ajustar a pH 8.0 con ácido bórico (aproximadamente 51g) y aforar a 1 L.

TE 10X pH 7.4 (Tris-HCl 100 mM pH 7.4, EDTA 10 mM pH 8.0)

A 80 ml de agua ultrapura agregar 10 ml de Tris-HCl 100 mM pH 7.4 y 2 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0, aforar a 100 ml.

Tris-HCl 1 M pH 7.4

Disolver 12.1 g de Tris base en 100 ml de agua ultrapura y añadir 7 ml de HCl concentrado y aforar a 100 ml.

XGal 20 mg/ml

Disolver 100 mg en 4 ml de dimetilformamida, aforar a 5 ml.