

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA - CISEI



FACULTAD  
DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

**PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR pgrp-1c DE *Triatoma pallidipennis* EN LA  
PRODUCCIÓN DE DEFENSINA DESPUÉS DE UN RETO BACTERIANO**

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A:  
ANA PAOLA MORALES GARCÍA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. Alejandro Alvarado Delgado**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**Noviembre, 2023**



Instituto Nacional  
de Salud Pública

Tarde o temprano aprendo, que la vida  
solo es un momento. Nunca olvidaré  
que cuando tropezaba, tú ahí estabas.  
Nada nos venció.  
- Los de septiembre, José Madero

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Enfermedades Transmitidas por Vector del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, del Instituto Nacional de Salud Pública, bajo la dirección del Dr. Alejandro Alvarado Delgado.



## **DEDICATORIA**

Dedico con todo mi corazón mi tesis a mi padre, Rodolfo Morales que siempre me acompaña en mi camino desde el cielo, gracias por educarme, por ayudarme incondicionalmente, forjar los valores que ahora tengo y la persona que soy, papá te extraño siempre y te amo con todo mi corazón.

A mi madre Ana María García, gracias por el apoyo que me brindaste en su momento.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer al Dr. Alejandro Alvarado, por siempre alentarme a dar lo mejor de mí, por confiar en mi capacidad de aprendizaje y conocimiento, por las constantes explicaciones acerca de este proyecto, por proporcionarme las herramientas necesarias para finalizar el mismo y por su apoyo. A Lilia Juárez por todas y cada una de sus enseñanzas en el laboratorio 3 planta baja del INSP y en el insectario, a Federico Zumaya por los consejos y aclaraciones de los temas que requerí. Sin toda su contribución, no habría podido finalizar ni perfeccionar este proyecto.

A mi padre, que sé que me acompaña a cada paso que doy, aun cuando está en el cielo, quiero escribir que lo extraño siempre, gracias por confiar en mí, por el apoyo incondicional, por escucharme cuando lo necesité y siempre alentarme a ser mejor cada día de mi vida, te dedico con todo mi corazón mi trabajo de Tesis y cada logro que alcanzaré en mi vida, sé que siempre estarás cuidándome.

A mi madre, que me animó a seguir adelante, a no rendirme, gracias por tu amor.

A Alex, que está en el cielo y ahora es un ángel, gracias por estar ahí.

A Fidel, por estar en muchas etapas difíciles de mi vida, gracias por el amor que me brindaste.

Agradezco a cada persona que conocí en la Facultad de Ciencias Biológicas, los compañeros con los que conviví y ahora tenemos recuerdos que no podremos olvidar, gracias por todo.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Enfermedad de Chagas .....	1
1.2 Ciclo de vida de <i>Tripanosoma cruzi</i> .....	2
1.3 <i>Triatoma pallidipennis</i> .....	4
1.4 Morfología de <i>Triatoma pallidipennis</i> .....	6
1.5 Respuesta inmune de insectos .....	7
1.6 Tipos de péptidos antimicrobianos.....	9
1.7 Vías inmunes generadoras de PAM's en insectos.....	12
1.8 La vía de inmunodeficiencia (IMD).....	12
1.9 Proteína de Reconocimiento de Peptidoglicano, isoforma lc (PGRP-LC) .....	13
2. ANTECEDENTES .....	15
3. JUSTIFICACIÓN .....	16
4. HIPÓTESIS .....	16
5. OBJETIVOS .....	16
5.1 Objetivo general .....	16
5.2 Objetivos específicos .....	16
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	17
7. METODOLOGIA .....	17
7.1 Obtención de chinches <i>Triatoma pallidipennis</i> .....	17
7.2 Obtención del cuerpo graso .....	18
7.3 Obtención del RNA total de cuerpo graso .....	18
7.4 Cuantificación y análisis de integridad del RNA total .....	19
7.5 Tratamiento del RNA con DNAsa.....	19
7.6 Síntesis de DNA complementario .....	20
7.7 Estandarización de las condiciones de amplificación del receptor <i>pgrp-lc</i> .....	20
7.8 Transcripción <i>in vitro</i> del <i>pgrp-lc</i> .....	22
7.9 Cinética de Inhibición de <i>pgrp-lc</i> .....	23
7.10 Análisis de la inhibición del receptor <i>pgrp-lc</i> en muestras de cuerpo graso de <i>T. pallidipennis</i> inoculadas con RNA de doble cadena.....	23
7.11 Análisis de la participación de <i>pgrp-lc</i> en la expresión de péptidos antimicrobianos después de un reto bacteriano .....	24
8. RESULTADOS.....	25
8.1 Extracción y cuantificación de RNA total de <i>Triatoma pallidipennis</i> .....	25

8.2 Estandarización de condiciones para la amplificación del receptor <i>pgrp-lc</i> de <i>Triatoma pallidipennis</i> .....	26
8.3 Transcripción <i>in vitro</i> de RNA de doble cadena de <i>pgrp-lc</i> de <i>Triatoma pallidipennis</i> .....	28
8.4 Cinética de inhibición del receptor <i>pgrp-lc</i> de <i>Triatoma pallidipennis</i> .....	29
8.5 Extracción y cuantificación de RNA total de chinches de quinto estadio de <i>Triatoma pallidipennis</i> interferidas con RNAi de <i>pgrp-lc</i> y RNAi irrelevante con retos de <i>E. coli</i> y <i>M. luteus</i> .....	29
8.6 Análisis de la inhibición de <i>pgrp-lc</i> de chinches de quinto estadio de <i>Triatoma pallidipennis</i> .....	30
9. DISCUSIÓN .....	34
10. CONCLUSIONES .....	36
11. PERSPECTIVAS .....	37
12. REFERENCIAS .....	38

## Índice de figuras

Figura 1. Distribución mundial de la enfermedad de Chagas .....	2
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	3
Figura 3. Distribución de Triatominos en México .....	4
Figura 4. Distribución geográfica de <i>Triatoma pallidipennis</i> en la República Mexicana ....	5
Figura 5. Ciclo biológico de <i>Triatoma pallidipennis</i> .....	6
Figura 6. Insectos de la especie <i>Triatoma pallidipennis</i> en etapa adulta .....	7
Figura 7. Mecanismos de la respuesta inmune de insectos .....	7
Figura 8. Respuesta inmune en insectos.....	8
Figura 9. Dos de las principales vías de señalización para la generación de péptidos antimicrobianos .....	9
Figura 10. Clasificación de PAM's (defensinas) .....	11
Figura 11. Defensinas de <i>Triatoma pallidipennis</i> .....	11
Figura 12. Vía de inmunodeficiencia en triatominos. ....	13
Figura 13. Secuencia aminoacídica de la proteína PGRP-LC .....	14
Figura 14. Órganos internos de <i>Triatoma pallidipennis</i> .....	18
Figura 15. ARN total extraído del cuerpo graso de ejemplares de <i>Triatoma pallidipennis</i> .. ..	25
Figura 16. Producto de PCR de <i>pgrp-lc</i> .....	26
Figura 17. PCR de gradiente de un fragmento de <i>pgrp-lc</i> .....	27
Figura 18. Banda de <i>pgrp-lc</i> .....	27
Figura 19. Amplificación de <i>pgrp-lc</i> .....	28
Figura 20. Transcripción <i>in vitro</i> para generar RNA <sub>dc</sub> de <i>pgrp-lc</i> .....	28
Figura 21. Cinética de inhibición del receptor <i>pgrp-lc</i> .....	29
Figura 22. RNA total de chinches de quinto estadio de <i>Triatoma pallidipennis</i> con RNAi de <i>pgrp-lc</i> .....	30
Figura 23. Expresión de <i>pgrp-lc</i> en chinches de quinto estadio de <i>Triatoma pallidipennis</i> , ante retos bacterianos .....	31
Figura 24. Expresión relativa de <i>pgrp-lc</i> en chinches de quinto estadio de <i>Triatoma pallidipennis</i> inoculadas con RNAi <i>anti-pgrp-lc</i> después de retos bacterianos .....	32
Figura 25. Expresión relativa de <i>defensina</i> en chinches no inoculadas con RNAi <i>anti-pgrp-lc</i> .....	32
Figura 26. Expresión relativa de <i>defensina</i> en chinches inoculadas con RNAi <i>anti-pgrp-lc</i> .....	33



## Índice de tablas

Tabla 1. Reactivos para realizar la síntesis de DNAc .....	20
Tabla 2. Oligonucleótidos para la amplificación del receptor pgrp-lc de <i>T. pallidipennis</i> 20	
Tabla 3. Oligonucleótidos para sintetizar RNAdc contra pgrp-lc de <i>T. pallidipennis</i> .....	21
Tabla 4. Oligonucleótidos para el análisis por qPCR .....	21
Tabla 5. Condiciones para PCR punto final .....	22
Tabla 6. Reactivos para la transcripción in vitro.....	22
Tabla 7. Reactivos para realizar el análisis por qPCR .....	23
Tabla 8. Condiciones para el qPCR.....	24

## Abreviaturas

Abreviatura	Significado
°C	Grados centígrados
µl	Microlitros
Aa	Aminoácidos
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DAP	Ácido diaminopimérico
DEPC	Dietil piro carbonato
DGE	Dirección General de Epidemiología
DNAsa	Desoxirribonucleasa
DNTPs	Deoxinucleosido trifosfato
DREDD	<i>Death related ced-3/Need2-like caspase</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
imd	Molécula de la vía IMD
Jak-STAT	<i>Janus-cinasas-transductores de la señal y activadores de la transcripción</i>
kDa	Kilo dáltones
ml	Mililitros
mM	Mili Molar
msnm	Metros sobre el nivel del mar
ng	Nano gramos
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAMs	Péptidos antimicrobianos
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGRP-LC	Proteína de reconocimiento de peptidoglicano tipo c
pgrp-lc	Transcrito de pgrp-lc
pmol	Pico moles
qPCR	PCR cuantitativa
Rel/NF-KB	<i>Nuclear factor kappa beta</i>
RELISH	Homólogo del factor de transcripción NFκβ
RNA	Ácido ribonucleico

<b>RNA<sub>dc</sub></b>	<b>Ácido ribonucleico de doble cadena</b>
<b>RNA<sub>i</sub></b>	<b>Ácido ribonucleico interferente</b>
<b>RNA<sub>i</sub> irrelevante</b>	<b>Ácido ribonucleico control</b>
<b>RNA<sub>r</sub></b>	<b>Ácido ribonucleico ribosomal</b>
<b>rpm</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>RT</b>	<b>Enzima retro transcriptasa</b>
<b><i>T. cruzi</i></b>	<b><i>Trypanosoma cruzi</i></b>
<b><i>T. dimidiata</i></b>	<b><i>Triatoma dimidiata</i></b>
<b><i>T. longipennis</i></b>	<b><i>Triatoma longipennis</i></b>
<b><i>T. pallidipennis</i></b>	<b><i>Triatoma pallidipennis</i></b>
<b>TAE</b>	<b>Tris acetato-EDTA</b>
<b>TOLL</b>	<b><i>Toll- like receptors</i></b>
<b>Vía IMD</b>	<b>Vía de inmunodeficiencia</b>

## RESUMEN

La Tripanosomiasis americana mejor conocida como Enfermedad de Chagas, ha sido un problema de salud en las últimas décadas, y puede ser mortal si no es detectada a tiempo. Esta enfermedad es causada por el parásito *Tripanosoma cruzi*, un protozooario hemoflagelado transmitido por varias especies de triatomíneos conocidos coloquialmente como chinche besucona, vinchucas, etc. El insecto vector está distribuido geográficamente en alrededor de 22 países del continente americano, afectando principalmente las zonas rurales. Entre las especies transmisoras se encuentran *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma pallidipennis*, esta última representa el principal vector en México y Morelos.

La respuesta inmune de estas chinches, al igual que en muchos otros insectos, es de tipo celular y humoral. La respuesta humoral involucra la generación de péptidos antimicrobianos, la activación de las vías IMD y Toll que utilizan para defenderse contra diversos microorganismos incluyendo a *T. cruzi*. Interesantemente, en *T. pallidipennis* se ha reportado la presencia de las moléculas involucradas en la activación y síntesis de estos péptidos, y estudios preliminares sugieren que la activación de estas vías es específica contra diversos tipos de bacterias. En este trabajo se analizó la participación de la molécula receptora-activadora PGRP-LC mediante la interferencia de sus transcritos y la producción del péptido antimicrobiano defensina en la especie *Triatoma pallidipennis* antes y después de un reto bacteriano.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Enfermedad de Chagas

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas descubierta en 1909 por el médico e investigador brasileño Carlos Ribeiro Justiniano Chagas por quien se le atribuye el nombre, es una afección provocada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad es endémica de 21 países de América Latina y transmitida a los seres humanos principalmente por las heces u orina de insectos conocidos como vinchucas, chinches o con otros nombres según la zona geográfica (OMS, 2019).

Se calcula que en el mundo entre 6 – 7 millones de personas están infectadas con *T. cruzi*, la gran mayoría en América Latina (OMS, 2019) (Fig. 1). Hay distintas formas de adquirir la enfermedad, entre ellas el consumo de alimentos contaminados mediante heces del insecto o carne proveniente de animales infectados, también se puede contraer por la transfusión de sangre infectada o bien, por vía materna donde la madre infecta a su hijo durante el embarazo o el parto (OMS, 2019). Sin embargo, la principal vía de transmisión es la vectorial, la cual es ocasionada por insectos pertenecientes a la subfamilia Triatominae, que se lleva a cabo por infección directa de la chinche al humano, cuando se alimenta de las personas (Díaz, P. *et al.*, 2016).

En México fue el doctor Luis Mazzoti quien reportó los dos primeros casos humanos en el país en 1940 (Rojo *et al.*, 2018). La enfermedad de Chagas se considera un problema de salud pública en nuestro país, ya que se estima que 1.1 millones de personas están infectadas (Rojo *et al.*, 2018). En los últimos años, los registros de casos confirmados de esta enfermedad, según la Dirección General de Epidemiología (DGE), oscilan entre 966 en 2015, a 669 en 2018 (D.G.E, 2019). Para el estado de Morelos, en el año de 2018 se reportaron 132 casos agudos, lo que lo convierte en el Estado de la República Mexicana con mayor número de casos (Programa sectorial de salud, 2018).

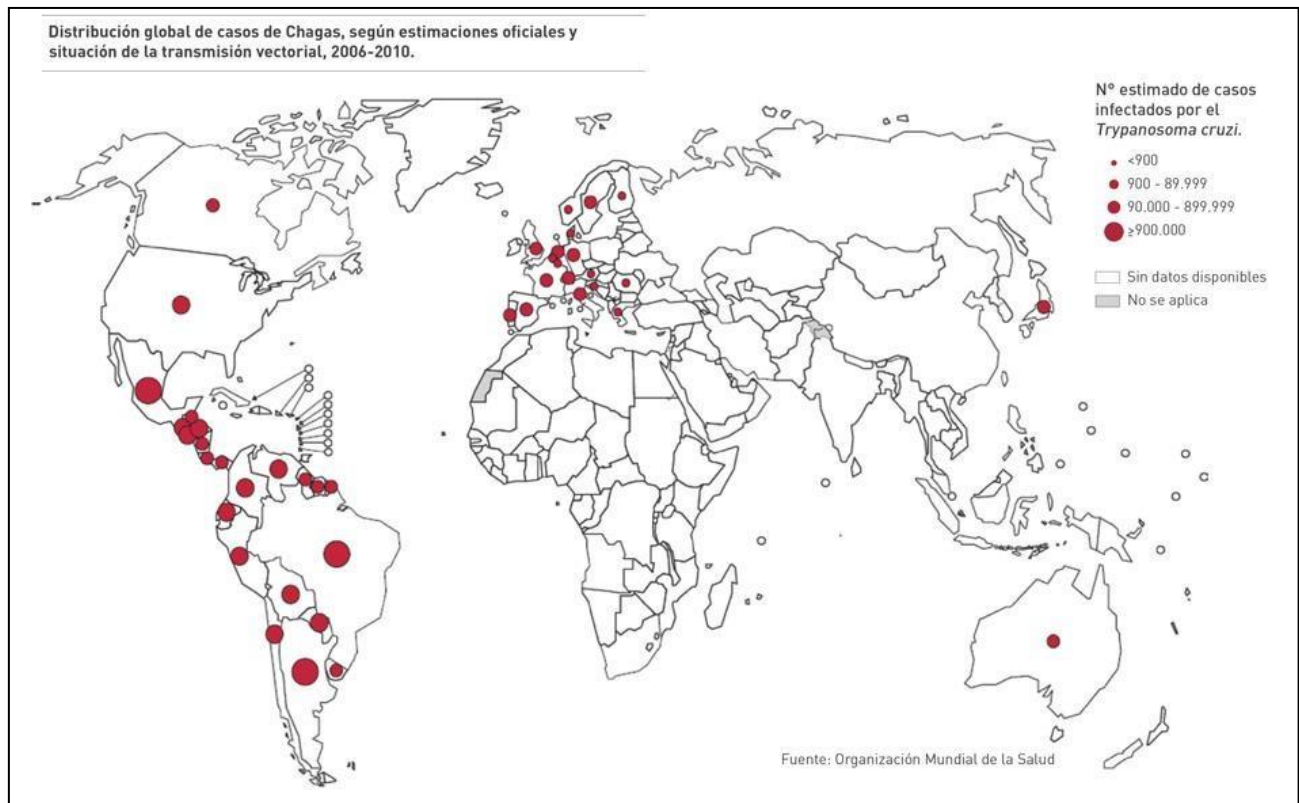


Figura 1. Distribución mundial de la enfermedad de Chagas

(imagen tomada de OMS, 2019)

## 1.2 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* se presenta en la naturaleza con tres estadios morfológicos que son: tripomastigote, epimastigote y amastigote (Tay *et al.*, 2003). El ciclo biológico del parásito inicia cuando el vector se alimenta de un huésped mamífero el cual se encuentra infectado con tripomastigotes sanguíneos que circulan en la fase aguda de la enfermedad, en la región media del intestino dichos tripomastigotes se transforman en epimastigotes y en el recto se transforman en tripomastigotes meta cíclicos que son eliminados en las heces y orina, que son la fuente de infección del hospedador vertebrado, en el humano u hospedero vertebrado el ciclo empieza con la infección por tripomastigotes que penetran en las células alrededor de la picadura, los cuales en el interior de estas se transforman en amastigotes que se multiplican por fisión binaria dentro de las células y tejidos infectados, después se transforman en tripomastigotes y provocan la rotura de las células, al salir de estas viajan por el torrente sanguíneo hasta encontrar otras células e infectarlas y transformándose nuevamente en amastigotes y el

ciclo se repite (Fig. 2) (Azambuja *et al.*, 2005; García *et al.*, 2010; Montiel, G. y Díaz, G., 2002).

Las personas infectadas con el parásito pueden presentar dos fases clínicas de la enfermedad, la fase aguda que ocurre dentro de los primeros seis meses de la infección en la cual el tratamiento farmacológico tiene mayor eficacia, pero limitada, esta fase con frecuencia es asintomática lo que significa que no hay presencia de signos y síntomas, lo que hace difícil su diagnóstico. La segunda es la fase crónica, en esta se desarrollan patologías cardíacas entrelazadas a muerte súbita, mega vísceras y anomalías del sistema nervioso (Dutra *et al.*, 2005).

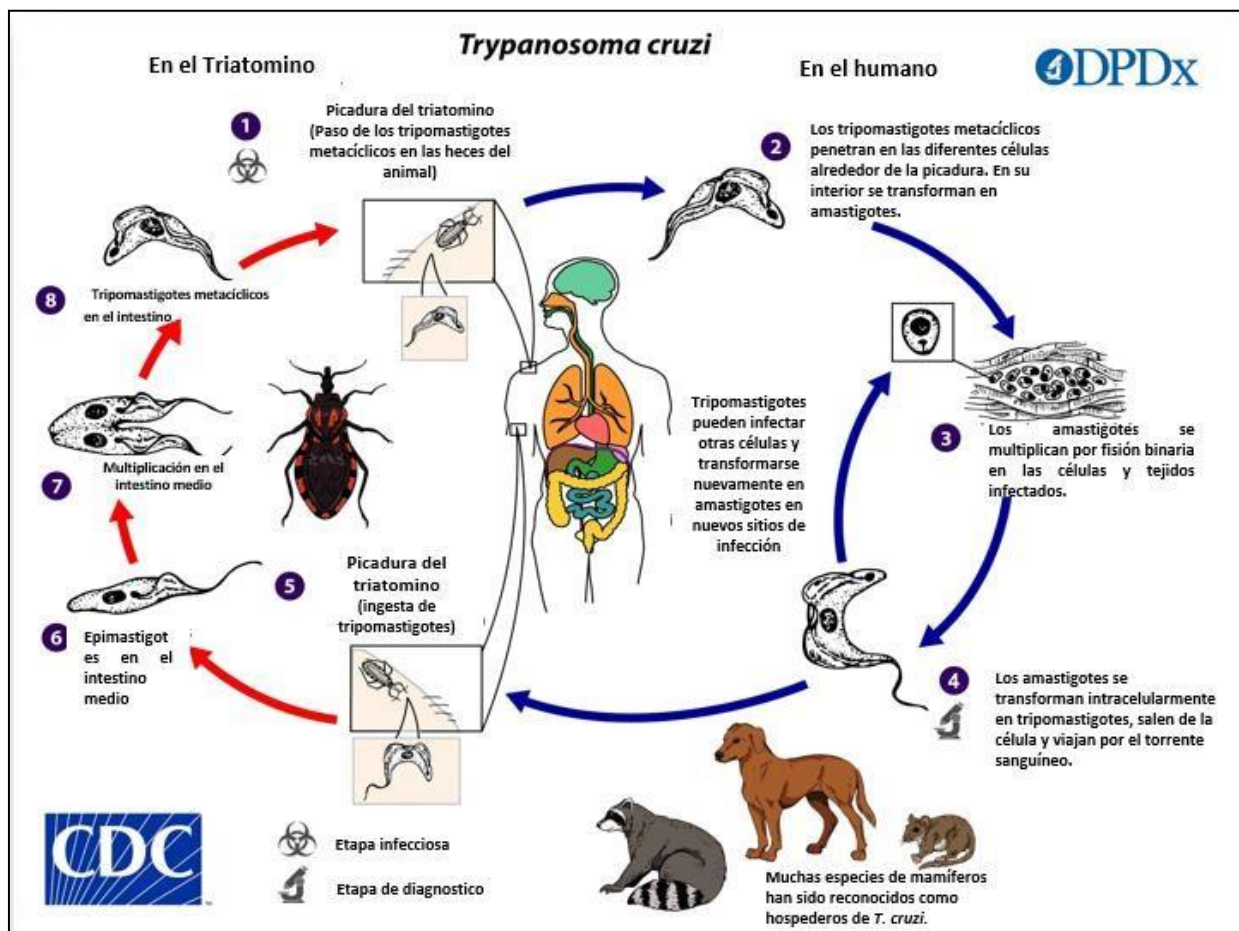


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*

(Adaptado de CDC, 2019)

### 1.3 *Triatoma pallidipennis*

Los Triatominos que transmiten la enfermedad de Chagas, pertenecen al orden Hemiptera, la familia Reduviidae, subfamilia *Triatominae* (Rodríguez *et al.*, 2007). En México se han reportado 8 géneros con 31 especies de triatominos, *T. longipennis*, *T. pallidipennis*, *T. dimidiata* son las tres principales especies presentes en México que se distribuyen principalmente en las zonas centro-occidente, sur, sureste del Golfo de México (Rojo *et al.*, 2018) (Fig.3).

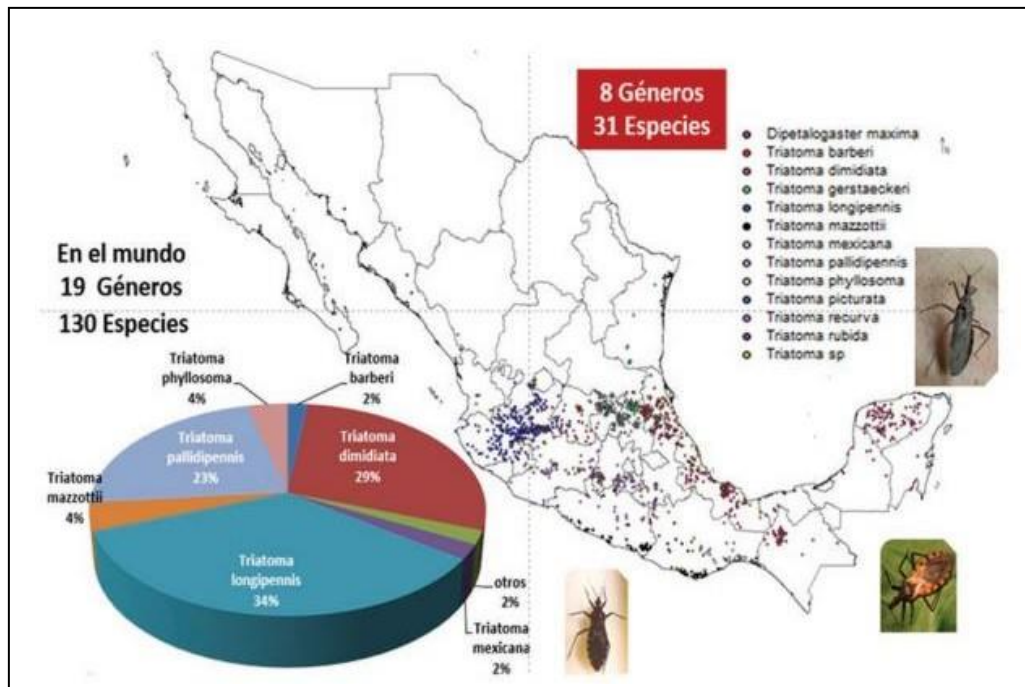


Figura 3. Distribución de Triatominos en México

(Tomada de Rojo *et al.*, 2018)

*T. pallidipennis* es una de las principales especies transmisoras de *T. cruzi* en nuestro país, vive en climas templados subhúmedos, y altitudes de hasta 2400 msnm, habita en al menos 10 estados del centro, sur, occidente y del golfo de la República (Fig. 4). Esta especie se caracteriza por su amplia capacidad de colonización en ambientes doméstico y peridoméstico, y se han reportado prevalencias de infección con *T. cruzi* de hasta el 90% (Salazar *et al.*, 2005).





Figura 4. Distribución geográfica de *T. pallidipennis* en la República Mexicana.

(Tomada de Salazar *et al.*, 2010)

El ciclo biológico de la chinche se divide en cinco estadios ninfales iniciando con la etapa adulta (Fig. 5). Una vez que se aparean, la hembra oviposita entre 10 y 50 huevos que eclosionan dando origen a las etapas ninfales. El ciclo de *T. pallidipennis* en condiciones de insectario dependiendo de la alimentación, tiene un promedio de vida de 308 días desde huevo a adulto mientras que en condiciones silvestres se ha reportado que su ciclo de vida es de, en promedio 396 días. Las tres primeras etapas ninfales tardan entre 35-48 días cada una; de la cuarta etapa ninfal a adulto el promedio de desarrollo es de 56-73 días (Tay *et al.*, 2008). Se considera que solo el 4% del insecto llega a estadio adulto (Tay *et al.*, 2008). El tiempo que tardan las hembras en comenzar a ovipositar en condiciones de insectario es de 50-60 días aproximadamente; son capaces de ingerir sangre hasta 6 veces su peso corporal cuando se alimentan en la 3ra etapa ninfal, lo que, a partir de esta etapa, les permite sobrevivir hasta 250 días en condiciones de ayuno (Tay *et al.*, 2008).

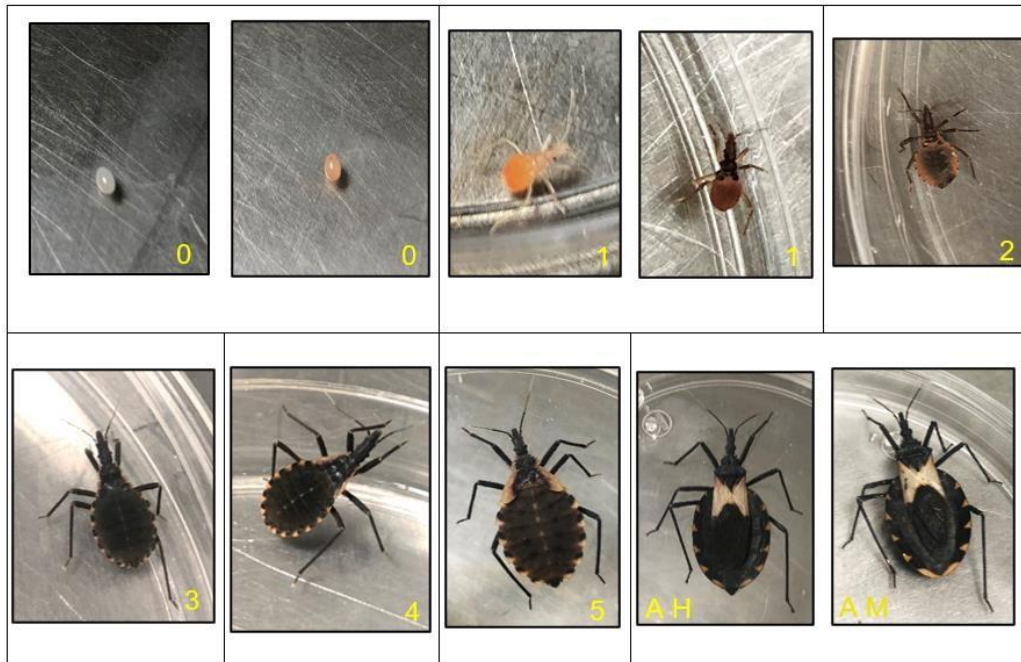


Figura 5. Ciclo biológico de *T. pallidipennis*.

0= Huevo de *T. pallidipennis*, tras la oviposición y próximo a eclosionar, 1= Primer estadio ninfal de *T. pallidipennis* recién emergida y días después de emerger, 2= Segundo estadio ninfal, 3= Tercer estadio ninfal, 4= Cuarto estadio ninfal, 5= Quinto estadio ninfal, A H= Adulto hembra de *T. pallidipennis*, A M= Adulto macho de *T. pallidipennis*.

#### 1.4 Morfología de *Triatoma pallidipennis*

En cuanto a su morfología, las chinches de esta especie tienen una cabeza con un pico recto denominado probóscide, la boca con labios segmentados que alojan las piezas bucales finas y delgadas denominadas estiletos que les ayuda a perforar la epidermis del vertebrado del cual se alimentan. Cuentan con antenas segmentadas en cuatro partes en ambos lados de la cabeza en la región anterior de los ojos, en el segundo segmento poseen pelos finos y largos que funcionan como quimiorreceptores (Olivares, 2007). Las ninfas de 5<sup>to</sup> estadio comienzan a tener cambios en la parte dorsal del tórax, en la etapa adulta, su color es negro, con manchas naranjas situadas de manera alterna en la parte dorsal.

Este tipo de insecto no presenta un dimorfismo fenotípico definido durante las etapas ninfales por lo que no se puede identificar la sexualidad de cada individuo, solo hasta la etapa adulta es donde se puede identificar el sexo, ya que es en esta etapa en donde presentan un dimorfismo sexual (Olivares, 2007) (Fig. 6).



Figura 6. Insectos de la especie *T. pallidipennis* en etapa adulta.

Las hembras se caracterizan por una protuberancia marcada y los machos por tener una forma redondeada al posterior de la porción caudal.

### 1.5 Respuesta inmune de insectos

Los insectos poseen un mecanismo innato de defensa que se divide en tres grupos: físicos, celulares y humorales que los protegen de potenciales patógenos (Fig. 7).

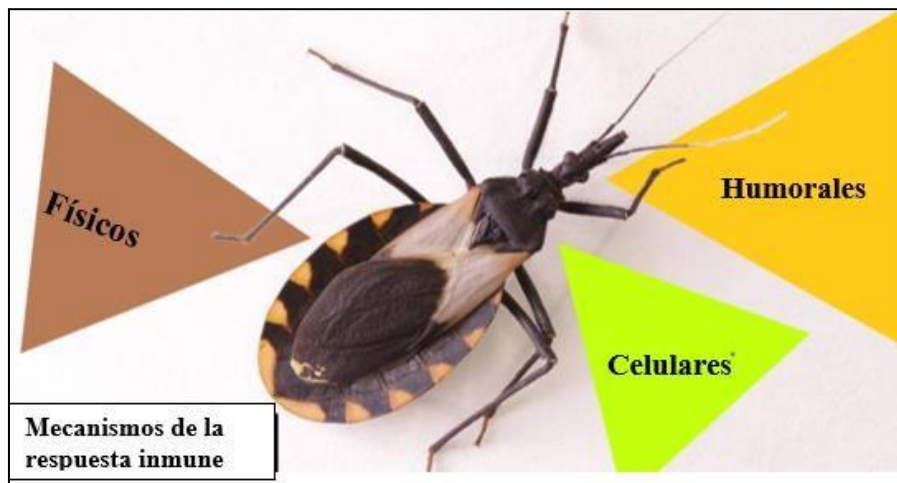


Figura 7. Mecanismos de la respuesta inmune de insectos. Los mecanismos de la respuesta inmune de insectos están conformados por los físicos, los celulares y los humorales, como la síntesis de moléculas secretadas.

Tomada y modificada de: ¿Qué es la enfermedad de Chagas? | Síntomas, causas y cómo tratar la enfermedad. (2019, 27 mayo). <https://www.lavanguardia.com/vida/salud/enfermedades-infecciosas/20190527/462508464787/chagas-infeccion-parasitaria-triatominos-america-latina-chozas-de-barro.html>

El primero se encuentra conformado por las barreras estructurales, la cutícula que es extremadamente rígida y protege del daño mecánico al insecto, otra barrera estructural que poseen son las células epiteliales que recubren a los órganos, como el tracto digestivo, los túbulos de Malpighi y los tractos reproductivos. El segundo es la respuesta

celular mediada por los hemocitos, que reconocen, activan diversas moléculas y atacan en caso de que los patógenos crucen las barreras estructurales y que desemboquen en el hemocele que es la cavidad donde se encuentran los órganos bañados en hemolinfa. Este tipo de respuesta se divide en fagocitosis, nodulación y melanización por la activación de la cascada de la fenoloxidasa (Moreno, 2017).

El tercero es la respuesta humoral en la que tiene lugar la síntesis de moléculas secretadas o intercelulares producidas por las glándulas reproductivas, las células del tracto digestivo, los hemocitos y el cuerpo graso (tejido muy cercano a la parte interna del abdomen) y que, además de ser el principal tejido generador de energía en los insectos, también es el principal tejido generador de especies reactivas de nitrógeno (ERO), como el óxido nítrico (NO) o del oxígeno, como el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), lisozimas y péptidos antimicrobianos (Fig. 8) (Moreno, 2017).

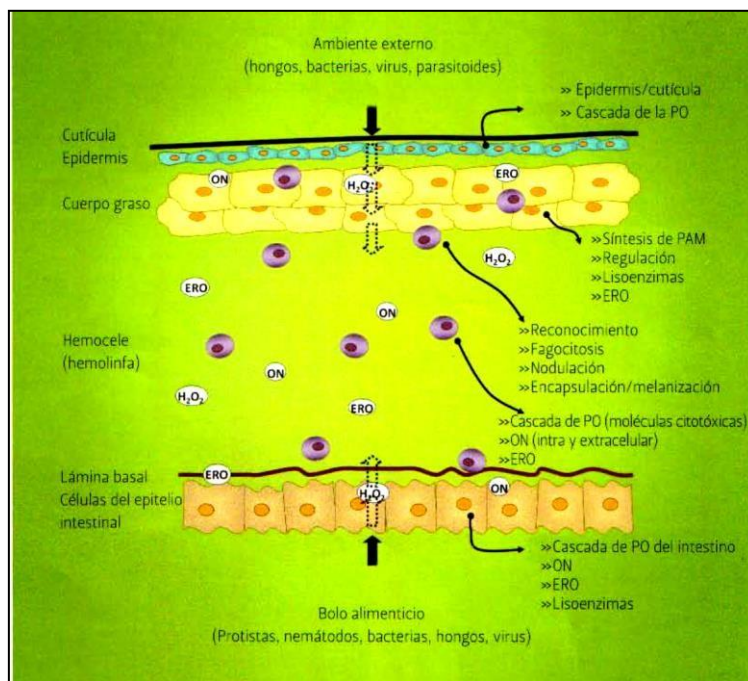


Figura 8. Respuesta inmune en insectos (Tomada de Moreno, 2017)

La generación de los péptidos antimicrobianos (PAMs) se lleva a cabo por medio de la activación de tres vías de señalización que son la vía de inmunodeficiencia (Vía IMD), la vía Toll, y la vía Jak-stat (Fig. 9). Cada una de las cuales se activa por el reconocimiento de diferentes estímulos. La vía IMD responde principalmente a bacterias Gram negativas, la vía Toll a bacterias Gram positivas y la vía Jak-stat a virus y

levaduras (Zumaya *et al.*, 2017). Los PAMs, actúan de dos maneras distintas, creando poros en la membrana de las bacterias que los atacan provocando su lisis celular o se insertan en el interior de las bacterias e inactivan algunas moléculas produciendo su muerte. Los PAMs requieren poca energía y recursos para su producción es por ello por lo que se sintetizan a gran escala (Bulet P. *et al.*, 1999).

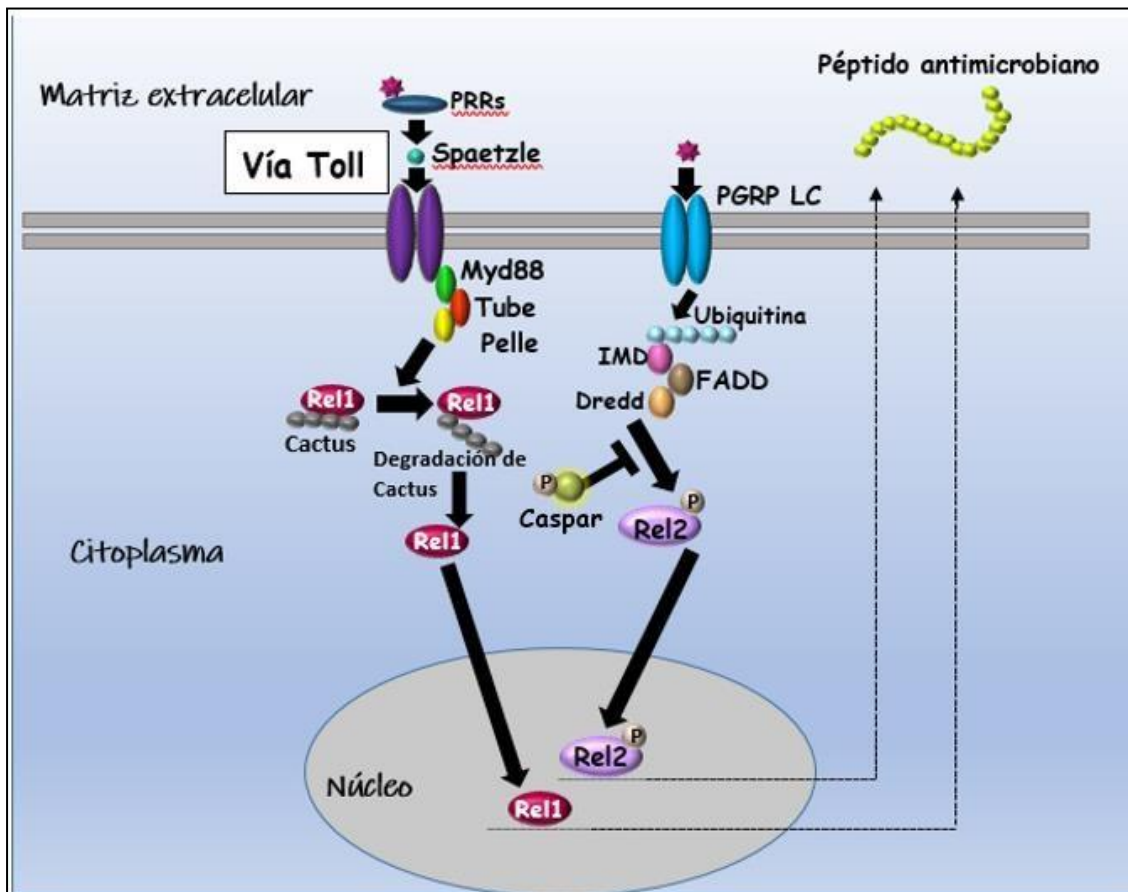


Figura 9. Dos de las principales vías de señalización para la generación de péptidos antimicrobianos: la vía Toll se activa por el receptor Toll que desencadena la traslocación de un factor de transcripción tipo Relish (Rel 1) al núcleo, produciendo la generación de péptidos antimicrobianos, mientras que la vía IMD se activa a través del receptor PGRP-LC, que desencadena un trómero con las moléculas IMD, Dredd y FADD, que activan la traslocación de Rel2 al núcleo y producir así mismo péptidos antimicrobianos.

(Tomada y modificada de Kumar, A. (s. f.). *Mosquito Innate Immunity*. MDPI.

## 1.6 Tipos de péptidos antimicrobianos

Los PAMs son moléculas efectoras de la respuesta inmune innata, están conformados por alrededor de 15 a 45 residuos de aminoácidos, la mayoría posee carga positiva y son anfipáticos (Rivas *et al.*, 2006; Villaruel *et al.*, 2004). Tienen la característica principal de eliminar instantáneamente a cualquier microorganismo susceptible a ellos,

de ahí su gran importancia ya que tienen orígenes con propiedades antibacterianas y antifúngicas para su uso clínico o agrícola (Vilcinskas, 2010).

La mayoría de los PAMs ya descritos son codificados por diversos genes y son sintetizados en los ribosomas (Téllez y Castaño, 2010).

Los PAMs pueden ser clasificados de acuerdo con su conformación estructural, a su tipo de secuencia y la ubicación de sus puentes disulfuro como lineales sin cisteínas (grupo I), con cisteínas unidas por puentes disulfuro (grupo II) e inusuales con alta proporción de aminoácidos específicos (grupo III) (Fig. 10) (Rivas *et al.*, 2006).

Los PAMs se median a través de vías de señalización tanto en vertebrados como invertebrados y emplean reguladores de la transcripción similares a la familia de Rel/NF- $\kappa$ B (del inglés, *nuclear factor kappa beta*) (Meister *et al.*, 2000). Por ejemplo, en los vertebrados, la síntesis de PAMs es constitutiva o se puede inducir por respuestas inflamatorias mediadas por citocinas y macromoléculas microbianas (Diamond, *et al.*, 1996), por otro lado, en invertebrados, se caracterizan por su rápida síntesis y secreción hacia la hemolinfa después de una infección microbiana, los genes se encuentran activos principalmente en el cuerpo gordo y en los hemocitos (Kaneko *et al.*, 2007).

Las defensinas son una familia de PAMs de tipo catiónico (tienen carga positiva a un pH fisiológico) se distinguen por tener seis residuos de cisteína conservados que están unidos en tres pares de puentes disulfuro (Cys<sup>I</sup>-Cys<sup>IV</sup>, Cys<sup>II</sup>-Cys<sup>V</sup> y Cys<sup>III</sup>-Cys<sup>VI</sup>) y forman un patrón consenso de plegado que consiste en el motivo de hoja  $\beta$ -hélice estabilizada con cisteína (CS $\alpha\beta$ ) que es el sitio activo del dominio para la actividad antimicrobiana, además de que es uno de los péptidos antimicrobianos que se sintetizan a través de la vía IMD (Ganz y Lehrer, 1995). Al igual que otras especies de triatomos e insectos, las defensinas de *T. pallidipennis* conservan este patrón de formación de puentes disulfuro dándole estabilidad a la molécula (Diaz *et al.*, 2018).

Los transcritos responsables de traducir y producir este tipo de PAMs varían en tamaño, pero en promedio tienen una longitud de 650 pares de bases, mientras que los transcritos de *T. pallidipennis* tienen una longitud de 400 pares de bases. La síntesis de las defensinas es esencial para la defensa inmune de los insectos; en *T. pallidipennis* se han identificado dos tipos de defensinas; de tipo 1 y de tipo 4 (Fig. 11) (Diaz *et al.*, 2016).





### **1.7 Vías inmunes generadoras de PAMs en insectos**

La activación de las vías inmunes comienza a partir de un proceso de reconocimiento donde los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés) son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs por sus siglas en inglés) que están presentes en células del sistema inmune. El proceso de reconocimiento desencadena la activación de las vías de señalización e inicia la síntesis de moléculas efectoras a partir de los receptores que intervienen en la respuesta inmune humoral (Larsen *et al.*, 2019).

Las vías inmunes de señalización poseen la función de traducir señales o estímulos externos en acciones dentro de la célula que activan la respuesta inmune, como por ejemplo la activación de genes que codifican proteínas vinculadas con los sistemas de defensa del hospedado (Larsen *et al.*, 2019).

### **1.8 La vía de inmunodeficiencia (IMD)**

Para la activación de esta vía el receptor PGRP-LC reconoce peptidoglicanos bacterianos (Kurata, 2014), una vez que se activa, PGRP-LC fosforila a la molécula IMD (*immune deficiency*, por sus siglas en inglés) que, por medio de interacciones, reconoce a FADD (*Fas-associated protein with death domain*, por sus siglas en inglés) y DREDD (*Death related ced-3/Nedd2-like caspase*, por sus siglas en inglés), este trímero desencadena una serie de reacciones que involucran reguladores positivos y negativos que desembocaran en la activación y traslocación del factor de transcripción RELISH hacia el núcleo que activa la síntesis de PAMs como la defensina para contrarrestar la presencia de microorganismos invasores (Fig. 12).



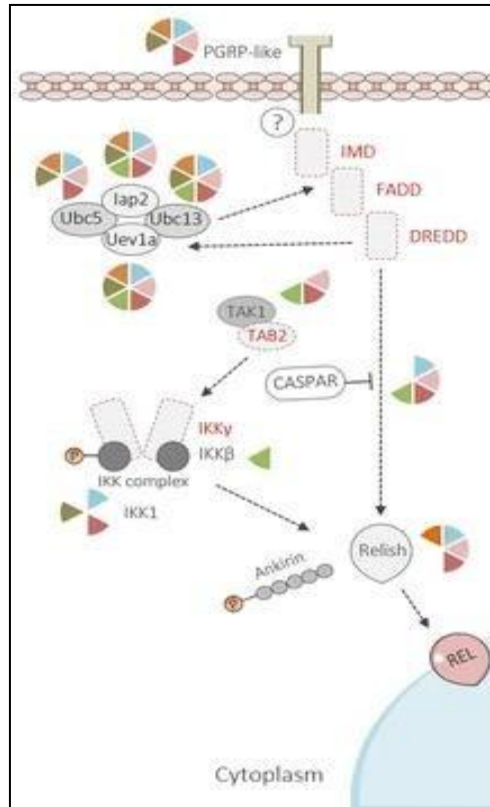


Figura 12. Vía de inmunodeficiencia en triatóminos.

(Tomada de Zumaya et al., 2017)

### 1.9 Proteína de Reconocimiento de Peptidoglicano, isoforma Ic (PGRP-LC)

Se han descrito distintas isoformas de la molécula PGRP en los insectos entre ellas S1, SC2, LA, LB, LD, LDa, LDb, LDc, LE y LC y se les ha demostrado una función específica a cada una. Las moléculas PGRP se clasifican de dos formas, la forma corta (S) y la forma larga (L). PGRP de forma corta (S) son generalmente cortos en longitud, contienen un péptido señal y son proteínas secretoras, por otro lado, PGRP de forma larga (L) son generalmente más largos, sin un péptido señal, pero con un dominio transmembranaral, son en su mayoría intracelulares o proteínas de membrana ligadas que no se secretan (Diarski,2004).

La isoforma que funciona como receptora de los peptidoglicanos es la isoforma PGRP-LC que se ha descrito en aproximadamente 15 insectos entre los que se encuentran *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster*, *Culex pipiens*, *Tenebrio mollitor*, *Glossina morsitans* entre otros (Vector base.org; Wang y Beerntsen, 2015). Esta molécula de alrededor de 446 aminoácidos (dependiendo la especie de insecto)

tiene un peso aproximado de 48.8 kDa. La secuencia aminoacídica contiene un dominio N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (del aminoácido 222 al aminoácido 352) (Fig. 13) y la secuencia nucleotídica genómica está constituida por seis exones y cinco intrones. El receptor PGRP-LC está involucrado en la respuesta inmune contra bacterias Gram negativas que contienen peptidoglicano tipo DAP (ácido diaminopimélico) a través de la vía de inmunodeficiencia IMD. (Choe *et al.*, 2002; Gottar *et al.*, 2002; Ramet *et al.*, 2002).

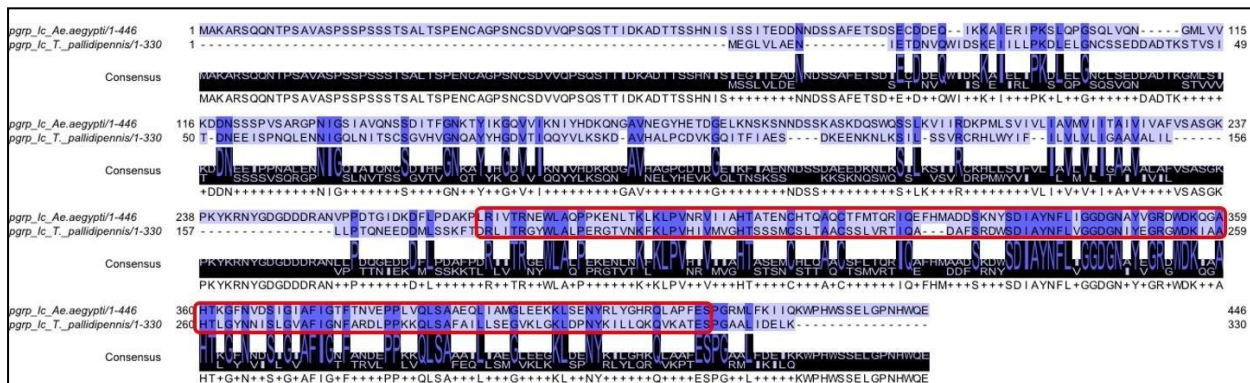


Figura 13. Alineamiento de secuencia aminoacídica de la proteína PGRP-LC de *Ae. aegypti* y *T. pallidipennis*. En rojo se muestra la secuencia correspondiente al dominio N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa.

El receptor PGRP-LC reconoce y se une al peptidoglicano de ciertos patógenos como las bacterias (Werner *et al.*, 2000; Royet y Dziarski, 2007). Enlazándose a los peptidoglicanos que son polímeros de N-acetil glucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos por péptidos cortos, que incluyen dos tipos, el tipo Lys y el tipo DAP; el tipo Lys se encuentra en la pared celular de las bacterias Grampositivas, mientras que tipo DAP se encuentra generalmente en las bacterias Gramnegativas y ciertos bacilos Grampositivos (Guan y Mariuzza, 2007; Royet y Dziarski, 2007).

Estos tipos de peptidoglicano son reconocidos por PGRP-LC, que iniciarán la respuesta inmune contra los patógenos.

## 2. ANTECEDENTES

Aunque las vías inmunes se han descrito en diversos insectos de interés agrícola y transmisoras de enfermedades como *T. molitor*, *Tribolium castaneum*, *Apis mellifera*, *A. aegypti* y *A. gambiae* han sido poco estudiadas en hemípteros (Cao *et al.*, 2019; Amaro *et al.*, 2017) que son los responsables de transmitir la enfermedad de Chagas, la mayoría de los estudios se han realizado en la especie *Rhodnius prolixus*, principal transmisor de la enfermedad de Chagas en Sudamérica. Mientras que en especies como *Triatoma dimidiata*, *Triatoma infestans*, *Triatoma barberi* y *T. pallidipennis* que se encuentran en nuestro país los estudios son a la fecha muy pocos. Interesantemente, moléculas como FADD e Imd aparentemente no se encuentran en los hemípteros (Zumaya *et al.*, 2017), lo que hace más intrigante la activación y síntesis de péptidos antimicrobianos en estas especies. Otra observación interesante se deriva del hecho que los receptores PGRP y TOLL juegan un papel esencial en estas vías, estudios en otros modelos de insectos como *D. melanogaster*, *Ae. aegypti*, *An. gambiae*, *T. molitor* y *A. mellifera* demuestran que mutando e inhibiendo la expresión de PGRP y factores de transcripción como Relish, la generación de defensinas y prolixinas disminuye considerablemente lo que sugiere que la activación de las vías es específica. Los trabajos en *T. pallidipennis* han reportado los tipos de defensinas que tiene este vector (Díaz *et al.*, 2016) así como en la activación de la respuesta celular contra microorganismos (Flores *et al.*, 2016).

Un estudio en mosquitos de la especie *A. aegypti* demostró que el silenciamiento de *pgrp-lc* después de un reto bacteriano con *Escherichia coli* (Gramnegativa) y *Micrococcus luteus* (Grampositiva), disminuyó la expresión de PAMs, así como la supervivencia de los insectos, lo que confirma que este receptor está involucrado en la respuesta antibacteriana (Wang y Beerntsen, 2015).

### 3. JUSTIFICACIÓN

En *T. pallidipennis*, los estudios sobre la activación de las vías inmunes a través de receptores como PGRP-LC, la generación de PAMs a través del reconocimiento de bacterias y su especificidad en respuesta a la presencia de *T. cruzi* es aún a la fecha, escasa. Aunque se ha reportado la presencia de la mayoría de las moléculas que intervienen en las vías inmunes como IMD y Toll en este importante insecto, aún no se ha estudiado la función y la participación de cada una de ellas. Por lo que, es necesario conocer estos mecanismos inmunes para generar conocimiento básico que ayude a implementar y proponer nuevas estrategias que ayuden a combatir la transmisión de la enfermedad de Chagas.

### 4. HIPÓTESIS

La inhibición de la expresión del receptor PGRP-LC disminuye la capacidad de producción de *defensina* en *T. pallidipennis*, después de un reto bacteriano.

### 5. OBJETIVOS

#### 5.1 Objetivo general

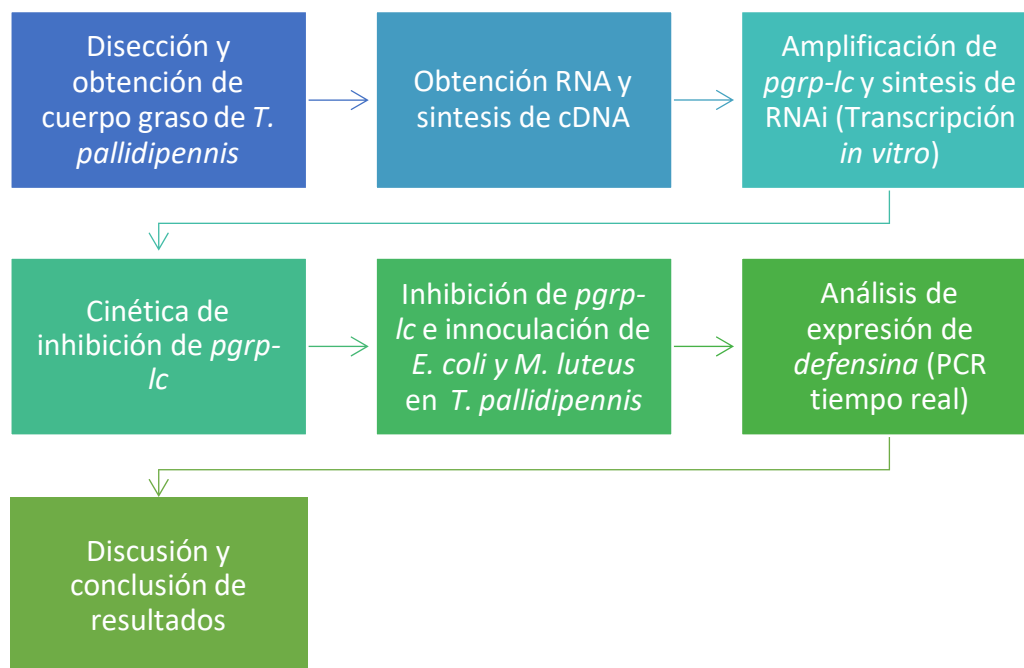
Analizar la participación del receptor *pgrp-lc* en la generación de *defensina* después de retos con bacterias Gram positivas y Gram negativas en *T. pallidipennis*.

#### 5.2 Objetivos específicos

Evaluar la inhibición y expresión de *pgrp-lc* en chinches de *T. pallidipennis*

Cuantificar y comparar la expresión de *defensina* en chinches de *T. pallidipennis* deficientes de *pgrp-lc* después un reto bacteriano.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 7. METODOLOGIA

### 7.1 Obtención de chinches *Triatoma pallidipennis*

Los ejemplares de *T. pallidipennis* que se trabajaron en este proyecto fueron de quinto estadio de desarrollo y se obtuvieron del insectario del Instituto Nacional de Salud Pública. Las chinches se mantuvieron en incubadoras en condiciones controladas a temperatura de 27°C y humedad relativa de 60% con periodos de 12 horas luz/oscuridad.

Las chinches de quinto estadio se alimentaron con sangre de conejo utilizando alimentadores artificiales que posteriormente se mantuvieron en las condiciones arriba mencionadas.

## 7.2 Obtención del cuerpo graso

Cada chinche se disecó utilizando un microscopio estereoscópico y pinzas de disección. Las chinches se anestesiaron para que permanecieran inmóviles y se pudieran manipular incubándolas por 10 minutos a 4°C en una charola con hielo, posteriormente se sujetaron con las pinzas y, empleando una tijera de disección se hizo un corte alrededor del tejido que une la parte ventral con la dorsal (conexivo) y con las pinzas se separaron ambas cutículas cuidadosamente exponiendo los órganos internos de la chinche. El cuerpo graso se separó y se colectó en tubos Eppendorf de 1.5 ml estériles que contuvieron 250 µl de trizol. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento (Fig. 14).



Figura 14. Órganos internos de *T. pallidipennis*, la zona marcada con la flecha representa el tejido de cuerpo graso

## 7.3 Obtención del RNA total de cuerpo graso

Las muestras previamente almacenadas a -20°C se descongelaron y se homogenizaron utilizando un biovortex dando 3 pulsos de 1 minuto y descansos de 30 segundos, las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos, inmediatamente se le agregaron 50 µl de cloroformo y se agitaron generosamente por 15 segundos, cada muestra se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Pasado el tiempo de incubación las muestras se centrifugaron a 11,000 rpm por 10 minutos. Después de este proceso se generaron 3 fases (fase acuosa, interfase y fase orgánica), se obtuvo cuidadosamente la fase acuosa (fase superior) que contiene el RNA total. Esta fase se colectó en tubos nuevos y se le agregaron 125 µl de isopropanol, posteriormente se

incubaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. Las muestras se centrifugaron a 11,000 rpm por 30 minutos, esta centrifugación generó un pellet o botón en el fondo del tubo que contiene el RNA total. El sobrenadante se eliminó y a cada tubo con muestra se le agregaron 600  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% diluido en agua con dietilpircarbonato (agua DEPC). Las muestras nuevamente se centrifugaron por 10 minutos a 11,000 rpm. Pasado el tiempo de centrifugación, a cada muestra se le decantó cuidadosamente el sobrenadante y el lavado con etanol al 70% se repitió nuevamente. Después del segundo lavado las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente entre 5 y 10 minutos para permitir la evaporación del exceso de alcohol, y el pellet se resuspendió en 20  $\mu\text{l}$  en agua DEPC.

#### **7.4 Cuantificación y análisis de integridad del RNA total**

De las muestras resuspendidas en 20  $\mu\text{l}$  de agua DEPC, se usaron 2  $\mu\text{l}$  de RNA de cada una y se cuantificaron por espectrofotometría utilizando un nanofotometro (Implen NP80). De acuerdo con las lecturas obtenidas de la cuantificación se preparó un gel de agarosa al 2% en solución amortiguadora TAE 1X (Tris-acetato-EDTA) más agua DEPC agregando al gel de agarosa la solución teñidora Green safe Premium. En cada carril/pozo, se cargó el equivalente a 400 ng de RNA. La electroforesis se corrió a 95 volts por 50 minutos y el gel se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta. La integridad se registró tomando fotografías del gel.

#### **7.5 Tratamiento del RNA con DNAsa**

Para eliminar la posible contaminación de DNA genómico de cada muestra de RNA, cada una se trató con la enzima DNAsa. A 10 microgramos de RNA total de cada muestra se le agregaron 5 unidades de DNAsa con su correspondiente buffer; cada muestra se homogenizó cuidadosamente y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, posteriormente, a cada muestra se le agregaron 2  $\mu\text{l}$  de EDTA (50 mM) y se incubaron a  $70^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos para inactivar la DNAsa. Las muestras se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## 7.6 Síntesis de DNA complementario

Para este procedimiento, 4 microgramos de RNA total previamente tratados con DNAsa de cada muestra se utilizaron para la síntesis del DNA complementario. Para realizar la síntesis de cDNA se llevó a cabo la siguiente reacción:

Reactivos	Cantidad
1.- Agua DEPC	Ajustar a 20/40 µl
2.- Buffer de enzima Reverso Transcriptasa	10x
3.- Oligo dt	50 ng
4.- Inhibidores de RNAsas	20 U
5.- RT	200 U
6.- dNTP's	0.5 mM
7.- RNA total	4 microgramos

Tabla 1. Reactivos para realizar la síntesis de cDNA

Cada reacción se incubó por 1.5 horas a 37°C, terminado este periodo las muestras se incubaron a 70°C por 15 minutos para inhibir la actividad de la reverso transcriptasa. Las muestras de cDNA se almacenaron a -20°C hasta su uso.

## 7.7 Estandarización de las condiciones de amplificación del receptor *pgrp-lc*

La secuencia para el diseño de oligonucleótidos forward y reverse que nos amplificaron distintos productos de *pgrp-lc* fue tomada del transcriptoma publicado de *T. pallidipennis* (TPAL\_isotig03340) y fueron proporcionados por nuestro grupo de investigación.

Para amplificar el receptor *pgrp-lc* se diseñaron los siguientes oligonucleótidos:

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Pares de bases
pgrp-lc T.pal For:	5' CCC ACC ATA ACA ATA TGA ACT G 3'	548 pb
pgrp-lc T.pal Rev:	5' GCG GAA AAC ATT GAA ACT GAC AA 3'	

Tabla 2. Oligonucleótidos para la amplificación del receptor pgrp-lc de *T. pallidipennis*



Para sintetizar el RNA de doble cadena se diseñaron los oligonucleótidos:

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Pares de bases
pgrp-lc T. pal_RNAi_F	5'GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CCC CAC CAT AAC AAT ATG AAC TG 3'	593 pb
pgrp-lc T. pal_RNAi_R	5'GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGC GGA AAA CAT TGA AAC TGA CAA 3'	

Tabla 3. Oligonucleótidos para sintetizar RNAdc contra pgrp-lc de *T. pallidipennis*

Para realizar el análisis por qPCR, se diseñaron los oligonucleótidos:

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Pares de bases
pgrp-lc T. pal For	5' TTA AAG CTG CTC CTG GAC T 3'	148 pb
pgrp-lc T. pal Rev	5' TTT GCG AGA GAT TTG CCA C 3'	

Tabla 4. Oligonucleótidos para el análisis por qPCR

Se realizaron reacciones de PCR punto final utilizando los oligonucleótidos pgrp-lc T.pal For y pgrp-lc T.pal Rev (548 pb), a una concentración de 2.5 pmol, temperatura de alineamiento (gradiente de temperatura de 52 a 64°C), cloruro de magnesio (50 mM) y una concentración de cDNA molde de 50 ng para optimizar la amplificación de los productos. Los productos de cada ensayo se analizaron haciendo electroforesis en geles de agarosa al 1.5% a un voltaje de 90 volts durante 1 hora. Cada gel se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

El fragmento de 540 pb obtenido se usó como DNA molde para amplificar un segundo producto de *pgrp-lc* empleando los oligonucleótidos pgrp-lc T. pal\_RNAi\_F y pgrp-lc T. pal\_RNAi\_R que generaron un fragmento de 593 pares de bases. Este segundo producto género en sus extremos la secuencia GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG que sirvió para generar RNA de doble cadena específico de *pgrp-lc*.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Número de ciclos	Grados C°	Tiempo
1er ciclo	95°C	3 min
2do ciclo (rep 35 ciclos)	95°C	40 seg
3er ciclo (rep 35 ciclos)	56°C	45 seg
4to ciclo (rep 35 ciclos)	72°C	30 seg
5to ciclo	72°C	5 min

Tabla 5. Condiciones para PCR punto final

### 7.8 Transcripción *in vitro* del *pgrp-1c*

La transcripción *in vitro* se realizó una vez que se obtuvo el producto correspondiente a 593 pares de bases. Para esto, la secuencia 5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG sirvió para que la enzima T7\_RNA\_polimerasa reconociera esta secuencia y comenzara el proceso de síntesis/transcripción.

La reacción de transcripción se hizo de la siguiente manera:

cDNA molde	2 µg
Mezcla de NTP's (dATP, dCTP, dGTP, dUTP, 2 mM cada uno)	8 µl
Mezcla de T7 RNA polimerasa/Inhibidor de RNAsas	2 µl
Buffer de transcripción 5X	4 µl
H <sub>2</sub> O-DEPC completar volumen de reacción	30 µl

Tabla 6. Reactivos para la transcripción *in vitro*

La reacción se mezcló suavemente y se incubó a 37°C por 18 horas, inmediatamente después a la reacción se le agregaron 5 unidades (2µl) de DNAsa y se incubó a 37°C por 15 minutos. Para finalizar, se agregó 1 µl (5mili molar) de EDTA para inactivar las enzimas DNAsa y T7 RNA polimerasa.

El producto de RNA de doble cadena se visualizó en un gel de agarosa al 2% realizando la electroforesis a 80 volts por 1 hora.

### 7.9 Cinética de Inhibición de *pgrp-lc*

El RNA de doble cadena (RNAdc *pgrp-lc*) producido por la transcripción *in vitro* se utilizó para inocular chinches de la especie *T. pallidipennis* de quinto estadio. Se utilizaron 2 µg de RNAdc para cada chinche. El RNA se diluyó en 10 µl de agua DEPC y, empleando una jeringa estéril, se inocularon intracelómicamente.

Se hicieron dos grupos de 12 chinches (uno experimental y uno como grupo control), un grupo se inoculó con RNAdc *pgrp-lc* y otro grupo con RNAi irrelevante (producto plasmídico incluido en el kit de transcripción) que se usó como grupo control, posteriormente se obtuvo el cuerpo graso de 3 chinches a los 4, 7, 11, y 15 días postinoculación, este experimento se repitió dos veces.

La obtención de RNA total y síntesis de cDNA de estas muestras se realizó como previamente se ha descrito.

### 7.10 Análisis de la inhibición del receptor *pgrp-lc* en muestras de cuerpo graso de *T. pallidipennis* inoculadas con RNA de doble cadena

El cDNA sintetizado de las muestras de cuerpo graso de las chinches inoculadas con RNA de doble cadena sirvió para validar la inhibición de la expresión de *pgrp-lc* utilizando los oligonucleótidos *pgrp-lc* T. pal For y *pgrp-lc* T. pal Rev que amplifican un producto de 148 pb.

La reacción de PCR tiempo real se realizó de la siguiente manera:

Syber Green mix 2x	5 µl
Oligo "5 forward PGRP-LC"	1 µl (1.5 pico mol)
Oligo "3 reverse PGRP-LC"	1 µl (1.5 pico mol)
cDNA	3 µl (1:5)

Tabla 7. Reactivos para realizar el análisis por qPCR

Estas reacciones se incubaron en el equipo de tiempo real “Rotorgene” (Qiagen) en las siguientes condiciones:

1er ciclo	2 minutos a 50°C
2do ciclo	5 minutos a 95°C
3er ciclo	20 segundos a 95°C (se repite por 40 ciclos)
4to ciclo	1 minuto a 64°C (se repite por 40 ciclos)
5to ciclo	5 minutos a 60-95°C (rampa curva melt)

Tabla 8. Condiciones para el qPCR

Como gen endógeno se utilizó un fragmento del gen de  $\beta$ -actina de *T. pallidipennis*. Los análisis de expresión diferencial se realizaron aplicando la formula delta-delta ct\* que compara la expresión relativa de un transcrito contra la expresión de un transcrito endógeno ( $\beta$ -actina) del mismo grupo y, posteriormente se comparará la expresión del transcrito de interés entre los grupos.

$$* \Delta CT (\text{muestra}) = CT (\text{gen experimental}) - Ct (\text{gen actina})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{tejido experimental}) - \Delta Ct (\text{tejido control})$$

### 7.11 Análisis de la participación de *pgrp-lc* en la expresión de péptidos antimicrobianos después de un reto bacteriano

Una vez que se definió el tiempo al que se disminuyó la expresión de *pgrp-lc* se programó un experimento para analizar el transcrito del péptido antimicrobiano *defensina* en chinches *T. pallidipennis* inhibidas en *pgrp-lc* y después de retos bacterianos con *M. luteus* y *E. coli*.

Se hicieron dos grupos de 36 chinches, grupo 1: inoculadas con RNA doble cadena *anti-pgrp-lc*, grupo 2: inoculadas con RNA doble cadena control irrelevante, cada uno de esos se dividirá en 3 grupos (grupo control inoculado con PBS, grupo inoculado con *E. coli*, grupo inoculado con *M. luteus*). El grupo 1 y 2 se inocularon con 2 microgramos de RNA de doble cadena correspondiente. Las chinches se mantuvieron en condiciones de insectario. Al día en que se determinó que la expresión de *pgrp-lc* disminuyó

significativamente se inocularon  $1 \times 10^6$  de bacterias y se mantuvieron por 24 horas en incubación.

Después de este tiempo, las chinches se disectaron para obtener el cuerpo graso de donde se obtuvo el RNA total, se realizó la síntesis de cDNA y se analizó la expresión del transcrito del péptido *defensina* en ensayos de q-PCR. El análisis se realizó aplicando la formula delta delta -ct.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Extracción y cuantificación de RNA total de *Triatoma pallidipennis*

De la extracción de cuerpo graso, se realizó la extracción de RNA total que se utilizó para realizar la síntesis de cDNA y hacer la amplificación del transcrito receptor *pgrp-lc* de *T. pallidipennis*.

La integridad del RNA obtenido se visualizó en un gel de agarosa al 2% (Fig 15).

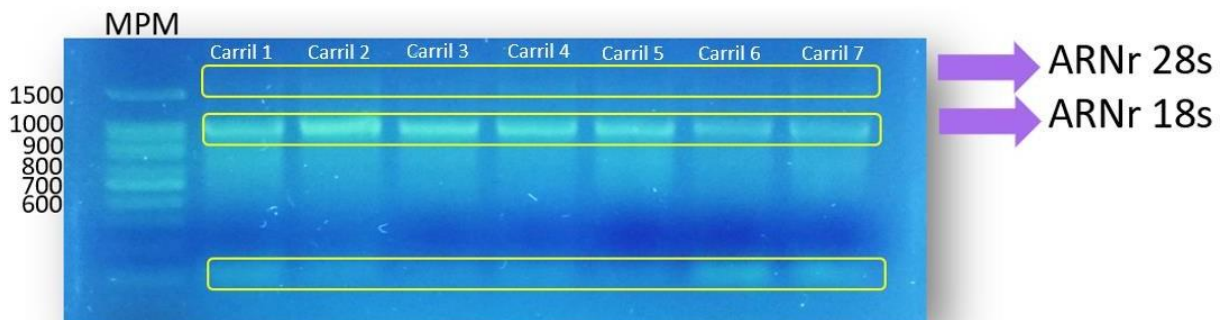


Figura 15. ARN total extraído del cuerpo graso de ejemplares de *T. pallidipennis*, se observó en un gel de agarosa al 2%.

De la cuantificación se realizó la síntesis de cDNA, y se amplificó el producto de 148 pares de bases (pb) de *pgrp-lc* que se visualizó en un gel de agarosa para comprobar la integridad y funcionalidad del cDNA sintetizado (Fig. 16).

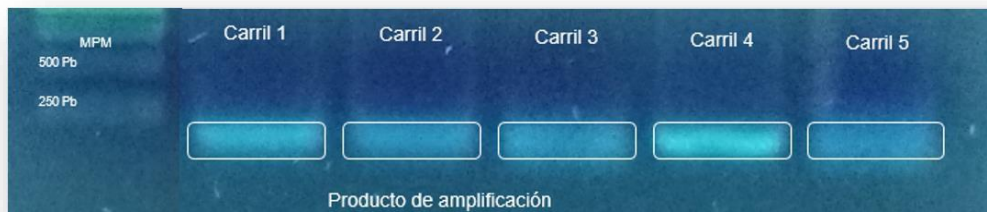


Figura 16. Producto de PCR de *pgrp-lc* de 148 pb (carriles 1 al 5) utilizando el cDNA sintetizado.

8.2

### **Estandarización de condiciones para la amplificación del receptor *pgrp-lc* de *Triatoma pallidipennis***

Al realizar el PCR de gradiente utilizando diferentes temperaturas de alineamiento se observó que el fragmento de 548 pb amplificó en todas las temperaturas utilizadas, sin embargo, los mejores resultados de amplificación fueron a 56°C (Fig. 17, carril 3). Por lo que para realizar el PCR que amplifica un fragmento de 548 pb que sirvió como “plantilla/DNA molde” se utilizó esta temperatura de alineamiento. Estandarizada la amplificación de este producto, se realizaron varias reacciones de amplificación a volúmenes finales de 50 µl de las que se purificó el fragmento (Fig.18).

La amplificación del fragmento de 593 pb con la secuencia “GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG” en los extremos se obtuvo (Fig. 19). Este producto sirvió como “plantilla/DNA molde” para llevar a cabo la transcripción *in vitro* de RNA de doble cadena *anti-pgrp-lc*.

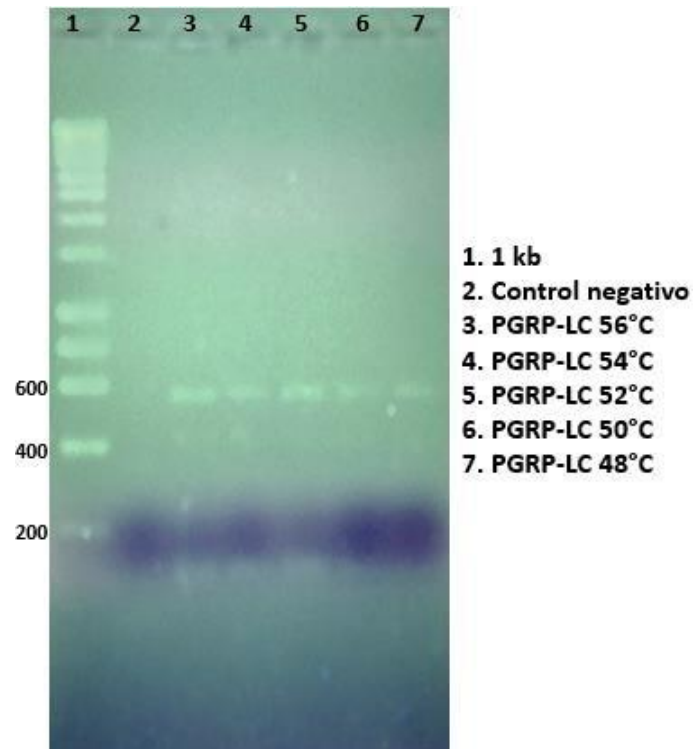


Figura 17. PCR de gradiente de un fragmento de *pgrp-lc* de 548 pb, se visualizó en un gel de agarosa al 1.5 %.

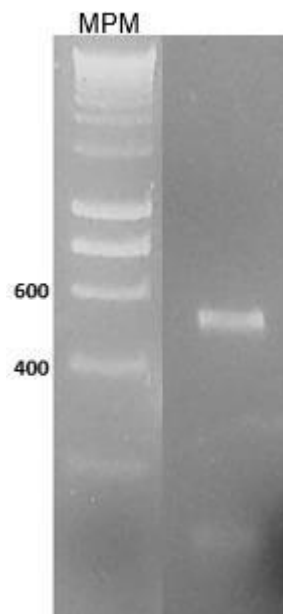


Figura 18. Banda de *pgrp-lc*, fragmento de 548 pb



Figura 19. Amplificación de *pgrp-lc* con oligonucleótidos con secuencia que reconoce la RNA polimerasa T7, fragmento de 593 pb

### 8.3 Transcripción *in vitro* de RNA de doble cadena de *pgrp-lc* de *Triatoma pallidipennis*

El fragmento de 593 pb de *pgrp-lc*, se utilizó para la transcripción *in vitro* que sirvió para inhibir esta molécula. El resultado de la transcripción se comprobó haciendo una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a un voltaje de 80 volts (Fig. 20).

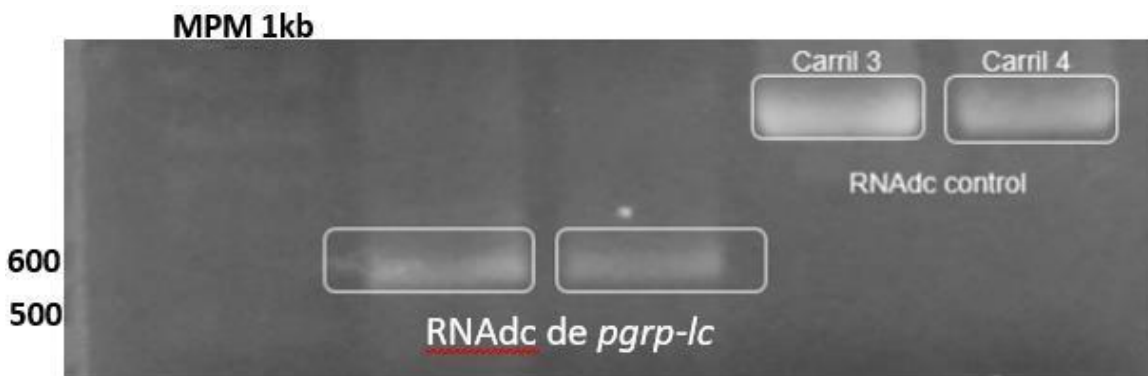


Figura 20. Transcripción *in vitro* para generar RNAdc de *pgrp-lc* utilizando oligonucleótidos con secuencia extra para la enzima T7 RNA polimerasa.



#### 8.4 Cinética de inhibición del receptor *pgrp-lc* de *Triatoma pallidipennis*

De los grupos de chinches inhibidas a los 10 días post alimentación con RNAi *anti-pgrp-lc* y con RNAi irrelevante, se realizó una cinética de inhibición, en la cual se disectaron las chinches y se obtuvo el cuerpo graso a los 4, 7, 11 y 15 días.

En la cinética se observó una inhibición progresiva del transcrito de *pgrp-lc* desde el cuarto día de la inoculación de RNA de doble cadena *anti-pgrp-lc* (65%), sin embargo, fue al día 15 post inoculación que se observa una mayor inhibición cercana al 90% (Fig. 21).

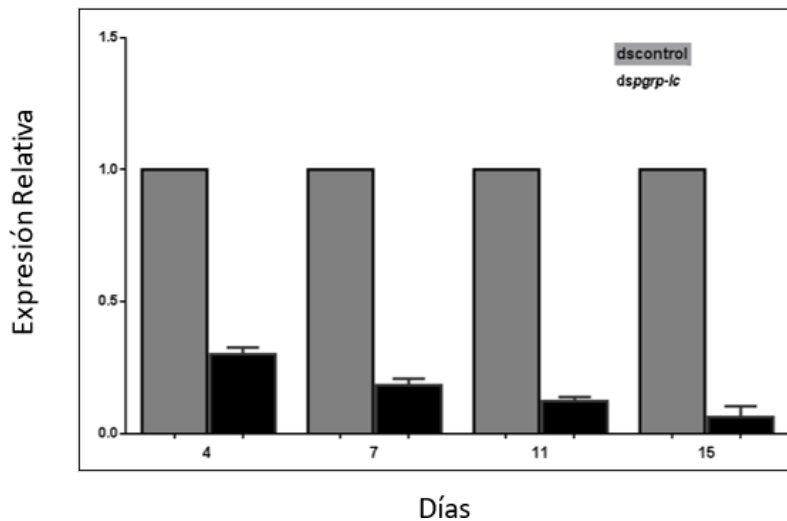


Figura 21. Cinética de inhibición del receptor *pgrp-lc*, se observó que había menos transcritos en el grupo de chinches que se disectó a los 15 días.

#### 8.5 Extracción y cuantificación de RNA total de chinches de quinto estadio de *Triatoma pallidipennis* interferidas con RNAi de *pgrp-lc* y RNAi irrelevante, retadas con PBS, *E. coli* y *M. luteus*

Una vez confirmada la mayor inhibición de los transcritos de *pgrp-lc*, se realizaron experimentos para analizar si la ausencia de *pgrp-lc* tenía algún efecto en la producción de los transcritos de *defensina*. Por lo que, 15 días posteriores a la inoculación del RNAi (*anti-pgrp-lc*), las chinches se dividieron en tres grupos de 6 insectos cada uno, los cuales se inocularon con bacterias *E. coli* (Gram negativa) o *M. luteus* (Gram positiva) y PBS, 24 hrs después se disectaron, se extrajo el cuerpo graso y posteriormente se hizo la extracción de RNA total, siguiendo la metodología antes mencionada. Además, se analizó y corroboró nuevamente la inhibición de *pgrp-lc*.

El RNA total extraído de chinches de quinto estadio de *T. pallidipennis* se visualizó en una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Carril 1 al 7 (Fig. 22)). Se lograron reconocer el RNAr 28s y el RNAr 18s, lo cual nos indica que el RNA extraído está integro, este mismo se utilizó para sintetizar cDNA que posteriormente se utilizó para los ensayos de q-PCR con la metodología anteriormente mencionada.

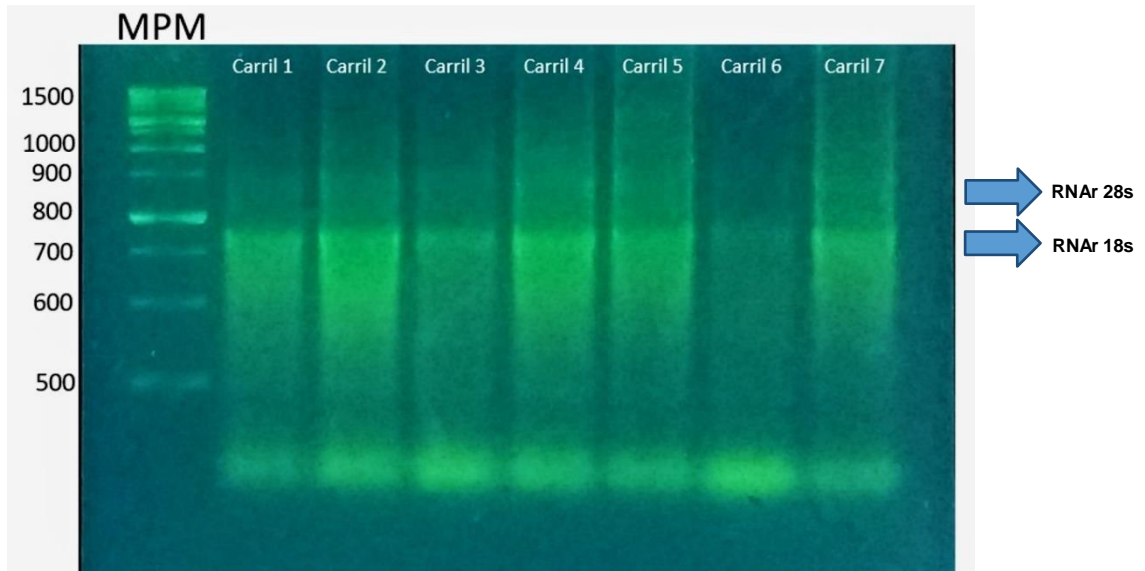


Figura 22. RNA total de chinches de quinto estadio de *T. pallidipennis* con RNAi de *pgrp-lc*.

## 8.6 Análisis de la participación de *pgrp-lc* en la expresión de *defensina* después de un reto bacteriano

En la figura 23, se muestra la expresión de *pgrp-lc* en chinches inoculadas con RNAi irrelevante; en el grupo retado con *E. coli* la expresión fue 16.17 veces mayor que en el grupo control (RNAi irrelevante), mientras que en el grupo retado con *M. luteus* la expresión fue de 5.7 veces más, en el cual comprobamos que el modelo clásico, que como bacteria Gram negativa es la dinámica normal que sigue la participación predominante de la vía IMD y por último en la barra *M. luteus*, se demostró que con *M. luteus* hay también un incremento de los transcritos de *defensina*, aunque es evidente que no de la misma manera que en *E. coli*, por lo tanto en esta gráfica obtenemos un comportamiento normal del receptor *pgrp-lc*.

La expresión de *pgrp-lc* después de inocular RNAi *anti-pgrp-lc* y retar con ambos tipos de bacterias, disminuyó importantemente a pesar del estímulo bacteriano cuyos valores

fueron 1.3 veces después del reto con *E. coli* y 0.8 veces después del reto con *M. luteus* (Fig. 24). Estos resultados corroboraron y confirmaron la inhibición de la expresión de *pgrp-lc* por lo que en estos mismos grupos de chinches se procedió a analizar la expresión de los transcritos de *defensina*.

De manera interesante, la expresión de *defensina* en los grupos donde no se inhibió *pgrp-lc*, los valores de expresión fueron superiores a 5 veces que el grupo control (7.4 en el grupo inoculado con *E. coli* y 5.8 en el grupo inoculado con *M. luteus*) (Fig. 25), sin embargo, en los grupos inhibidos en *pgrp-lc*, la expresión de *defensina* disminuyó a 1.9 veces en *E. coli* y 1.4 veces en *M. luteus* con respecto al control (Fig. 26).

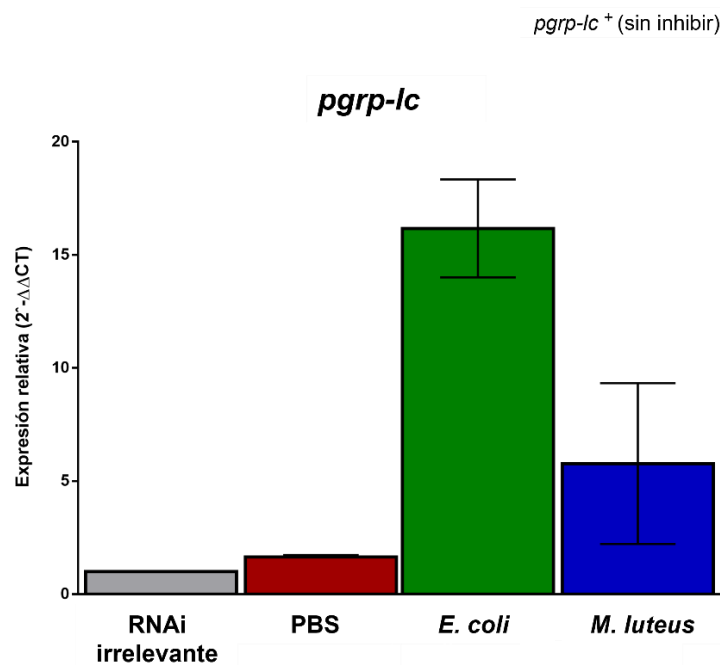


Figura 23. Expresión relativa de *pgrp-lc* en chinches de quinto estadio de *T. pallidipennis*, ante retos bacterianos, PBS, *E. coli* (Gram negativa) y *M. luteus* (Gram positiva) inhibidas con RNAi irrelevante. La mayor expresión se observó en grupo de chinches inoculadas con *E. coli*.

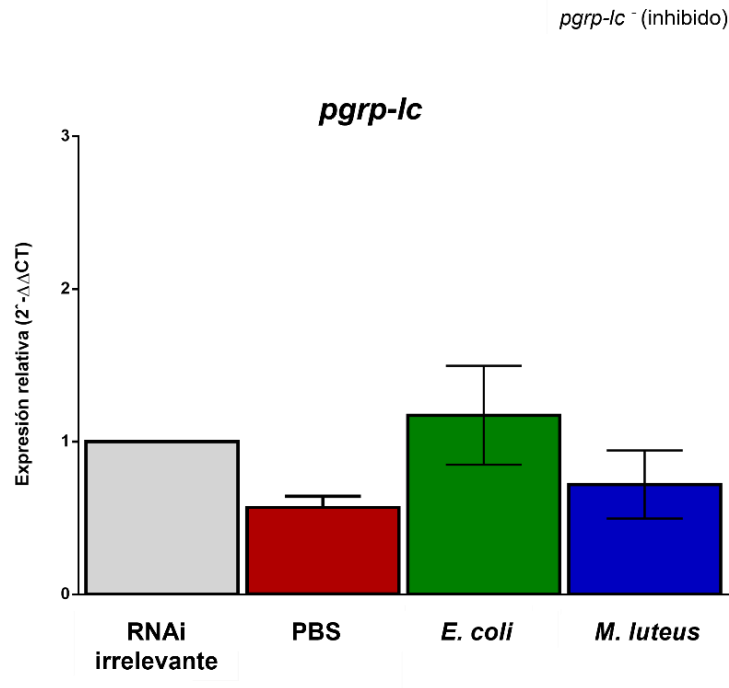


Figura 24. Expresión relativa de *pgrp-lc* en chinchones de quinto estadio de *T. pallidipennis* inoculadas con RNAi *anti-pgrp-lc* después de retos bacterianos con PBS, *E. coli* (Gram negativa), *M. luteus* (Gram positiva). La expresión del transcrito disminuyó a valores similares que el grupo control.

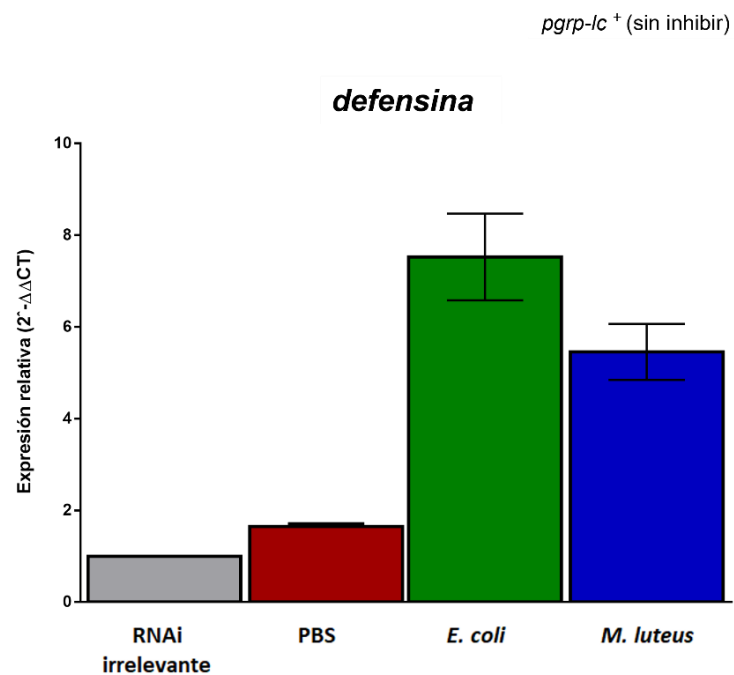


Figura 25. Expresión relativa de *defensina* en chinchones no inoculadas con RNAi *anti-pgrp-lc*. La expresión del transcrito mostró valores superiores a 5 veces más que el grupo control. Grupo inoculado con *E. coli* (7.4), grupo inoculado con *M. luteus* (5.8).

*pgrp-lc*<sup>-</sup> (inhibido)

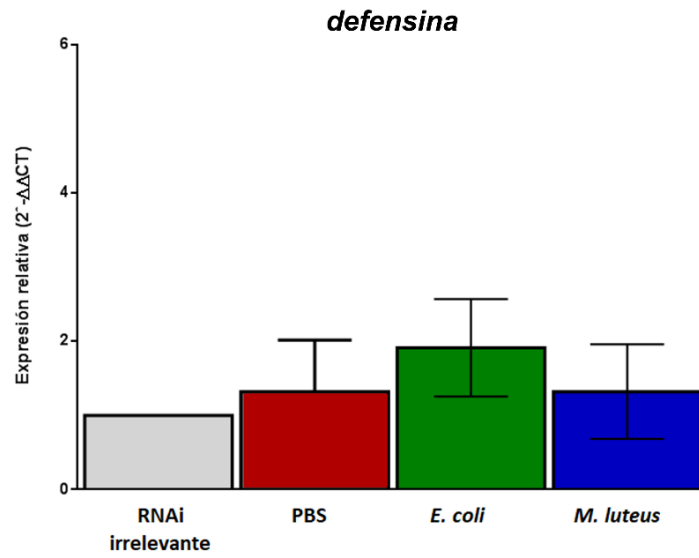


Figura 26. Expresión relativa de *defensina* en chinches inoculadas con RNAi *anti-pgrp-lc*. La expresión del transcrito disminuyó a valores similares que el grupo control. Solo el grupo inoculado con *E. coli* mostró un valor cercano a 2 (1.9).

## 9. Discusión

La generación de péptidos antimicrobianos como defensina, se produce por las vías de señalización IMD y Toll en la respuesta inmune humoral de los insectos, tanto hemimetábolos como holometábolos; la cual es primordial para la activación de los diversos componentes de la respuesta inmunitaria innata, lo que es esencial para los insectos hemimetábolos como *T. pallidipennis*, vector importante de *T. cruzi*, parásito causante de la enfermedad de Chagas.

En este estudio se logró generar RNAi para el silenciamiento del gen receptor PGRP-LC de *T. pallidipennis*, lo cual afectó significativamente la supervivencia (datos no presentados) de los ejemplares de estudio, esto coincide con un estudio hecho en *A. aegypti* (Wang y Beerntsen, 2015) en el cual utilizan el mismo método de silenciamiento de genes por RNA de interferencia.

En general se ha reportado que la respuesta inmune humoral, es activada a través de la vías IMD y Toll, sin embargo se habían hallado diferencias marcadas puesto que, actuaban individualmente y ante diferentes estímulos, lo que en estudios hechos en 2007 por Takahiro y colaboradores, encontraron que ambas vías pueden activarse simultáneamente cuando la respuesta inmune innata es estimulada, este resultado coincide con los obtenidos, puesto que efectivamente la vía IMD tiene una preferencia de activación ante las bacterias Gram negativas, las cuales contienen peptidoglicano de tipo DAP (ácido diamino-pimelico), sin embargo hayamos en nuestros resultados que la vía IMD, no solo se activa ante la presencia de bacterias Gram negativas como *E. coli*, sino también está puede actuar en presencia de bacterias Gram positivas como *M. luteus*.

En este estudio observamos que al igual que en *D. melanogaster*, *pgrp-lc* reconoce el peptidoglicano de las bacterias y activa la producción del péptido antimicrobiano defensina a través de la vía IMD (Myllymäkki, *et al.* 2019).

De los resultados obtenidos en este trabajo podemos mencionar que en *T. pallidipennis*, *pgrp-lc* regula la expresión y síntesis de transcritos de *defensina*, ya que observamos que al inhibir la expresión del receptor *pgrp-lc* la *defensina* disminuye considerablemente. Además, los resultados indican que, al igual que en otros insectos como *D. melanogaster* y *Ae. aegypti*, la vía IMD activada por *pgrp-lc*, regula la expresión de *defensina* después de que el insecto es estimulado por la presencia de una bacteria Gram negativa como *E. coli*, pero disminuye su expresión cuando el receptor *pgrp-lc* es inhibido.

Otro dato muy interesante, fue el hecho de que no solo la expresión de *defensina* disminuyó cuando las chinches fueron retadas con *E. coli*, sino que la expresión de *defensina* disminuyó mucho más en el grupo de chinches retados con *M. luteus*.

Aunque *M. luteus* (bacteria Gram positiva) activa de manera principal la vía Toll por sus receptores tipo Toll, los resultados aquí mostrados podrían indicar algún tipo de actividad por esta vía que generan *defensina*, pero más aún, confirman la mayor producción de *defensina* por la vía IMD y la participación de *pgrp-lc* en su producción.

El hecho que de la expresión de *defensina* en el grupo de chinches retadas con *E. coli* e inhibidas en *pgrp-lc* (Fig. 26) no fuera igual o menor a 1 como en el grupo control podría deberse a que la inhibición de *pgrp-lc* no fue total, como se observa en la figura 21.

Probablemente utilizando mayor cantidad de RNA de doble cadena (RNAi) (mayor a 2 microgramos como fue en este trabajo) podría ayudar a inhibir *pgrp-lc* en su totalidad.

Por otro lado, podemos mencionar que la estandarización para la generación de RNA de doble cadena mediante la técnica de transcripción *in vitro* resultó ser exitosa, ya que la producción de RNA por cada ensayo, fue de mayor a 20 µg, cantidades suficiente para inocular al menos 10 chinches. Esta técnica es la primera vez que se realiza en nuestro grupo de trabajo y con la cual ya se busca inhibir otros transcritos involucrados en las vías IMD y Toll de *T. pallidipennis*.

## 10. Conclusiones

1. El receptor *pgrp-lc* se amplificó de manera exitosa de muestras de cuerpo graso de *T. pallidipennis*.
2. La inhibición de *pgrp-lc* se produjo con mayor intensidad a los 15 después de inocular RNA de doble cadena *anti-pgrp-lc*.
3. Se confirmó la participación de *pgrp-lc* en la regulación y síntesis de defensina.
4. La producción de defensina se activa principalmente por la vía IMD.



## 11. Perspectivas

Los resultados obtenidos, son de gran relevancia para continuar comprendiendo los mecanismos inmunes que los insectos utilizan para defenderse de microorganismos invasores. En este sentido, los resultados con relación a la expresión de la defensina podrían estar indicando que además de sintetizarse a través de la vía IMD en respuesta contra bacterias Gram positivas como *E. coli*, también se está produciendo contra bacterias Gram positivas como *M. luteus*, lo cual podría indicar que, así como en insectos holometábolos como *D. melanogaster* podría haber una activación de las vías Toll e IMD de manera simultánea. Sin embargo, hacen falta más estudios que sustenten el mecanismo de respuesta inmune humoral a través de las vías IMD y Toll. Por lo que se realizarán más experimentos que enriquezcan este trabajo:

- Analizar la expresión de genes involucrados en las vías IMD y Toll por medio de qPCR para saber los niveles de expresión de cada uno de ellos después de realizar retos bacterianos y proponer qué participación podrían tener en mecanismos inmunes
- Realizar ensayos de interferencia del receptor de la vía Toll (receptor Toll) y de los factores de transcripción tipo Relish.
- Realizar experimentos de Wéstern blot para corroborar y validar los resultados obtenidos en este trabajo a nivel proteico después del silenciamiento de *pgrp-lc*.

## 12. REFERENCIAS

1. Amaro, G. O., González, A. O., González, F. J. y Granados, J. A. (2017). Péptidos antimicrobianos producidos por coleópteros: una alternativa médica. *Artrópodos y salud*, 7 (1), 38 – 43.
2. Azambuja, P., Ratcliffe, N. A. y García, E. S. (2005). *Towards an understanding of the interactions of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli within the reduviid insect host Rhodnius prolixus*. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 77, 392-404.
3. Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J., y Hoffmann, D. (1999). *Antimicrobial peptides in insects; structure and function*, *Developmental & Comparative Immunology*, 23, Issues 4–5, 329 – 344. Doi: 10.1016/s0145-305, (99)00015-4.
4. Cao, Y., Xu, K., Zhu, X., Bai, Y., Yang, W. y Li, C. (2019). *Role of modified atmosphere in pest control and mechanism of its effect on insects*. *Frontiers in physiology*, 1 - 8. doi: 10.3389/fphys.2019.00206
5. Choe, K. M., Werner, T., Stoven, S., Hultmark, D. y Anderson, K. V. (2002). *Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in Drosophila*. *Science*, 296, 359 – 362.
6. Diamond, G., Russell, J. P. y Bevins, C. L. (1996). *Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide challenged tracheal epithelial cells*. *Proc Natl Acad. Sci*, 93, 5156 – 5160.
7. Diaz, P., Santacruz, E., Martínez, I., de la Torre, P., Laclette, J. P. y Espinoza, B. (2016). Identificación de dos defensinas en el genoma de *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) y una lisozima en su hemolinfa. Instituto de investigaciones biomédicas, *Entomología mexicana*, 3, 805 – 809.
8. Diaz, P., Sepulveda, O., Martínez, I. y Espinoza, B. (2018). *Variability of defensin genes from a Mexican endemic Triatominae: Triatoma (Meccus) pallidipennis (Hemiptera: Reduviidae)*. Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, *Bioscience Reports*, 38 (5). doi: <https://doi.org/10.1042/BRS20180988>
9. Dirección general de epidemiología (2019). Recuperado de: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia>.
10. Dutra, W. O., Rocha, M. O. C. y Teixeira, M. M. (2005). The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends in parasitology*, 21 (12), 581 – 587. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.09.007>

11. Dziarski, R. (2004). *Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs)*. *Mol Immunol* 40: 877 – 886.
12. Flores, A. L., Bucio, M. I., Cabrera, M., Córdoba, A. y Salazar, P. M. (2016). *Survival and immune response of the Chagas vector Meccus pallidipennis (hemipteran: Reduviidae) against two entomopathogenic fungi, Metarhizium anisopliae and Isaria fumosorosea*. *Parasites and vectors*, 24 (9), doi: 10.1186/s13071-016-1453-1
13. Ganz, T. y Lehrer, R. I. (1995). Defensinas. *Farmacología y terapéutica*, 66 (2), 191 – 205.
14. García, E. S., Castro, D. P., Figueiredo, M. B. y Azambuja, P. (2010). *Immune homeostasis microorganisms in the guts of triatomines (Reduviidae)*. *A review. Memorias do Instituto Oswaldo*, 105, 605 – 610.
15. Gottar, M., Gobert, V., Michel, T., Belvin, M., Duyk, G., Hoffmann, J. A., Ferrandon, D. y Royet, J. (2002). *The Drosophila immune response against gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein*. *Nature*, 416, 640 – 644.
16. Guan, R. y Mariuzza, R. A. (2007). *Peptidogoglycan recognition proteins of the innate immune system*. *Trends Microbiol*, 15, 127 – 134.
17. Kaneko, Y., Furukawa, S., Tanaka, H. y Yamakawa, M. (2007). *Expression of antimicrobial peptide genes encoding enbocin and gloverin isoforms in the silkworm, Bombyx mori*. *Biosci Biotechnology Biochem*, 71, 2233-2241.
18. Kleino, A. y Silverman, N. (2014). *The Drosophila Imd pathway in the activation of the humoral immune response*. *Developmental & comparative immunology*, 42 (1), 25 – 35.
19. Kurata, S. (2014). *Peptoglycan recognition proteins in Drosophila immunity*. *Dev Comp Immunol*, 42 (1), 36 – 41.
20. Larsen, A., Guzmán, E. y Reynaldi, F. J. (2019). Bases del sistema inmune de la abeja melífera (*Apis mellifera*). *Rev. Mex. Cienc. Pecu.*, 10 (3), 705 – 728.
21. Meister, M., Hetru, C. y Hoffman, J. A. (2000). *The antimicrobial host defenses of Drosophila*. In: Du Pasquier L, LitmanGW, editors. *Current topics in microbiology and immunity. Origin and evolutions of the vertebrate immune system*, 248, 17 – 36.
22. Montiel, G. y Díaz, G. (2002). Respuesta inmune de las células del hospedero a la infección por *Trypanosoma cruzi*. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 37(1-2), 57-63. Retrieved October 20, 2021

23. Moreno, M. (2017). El eficaz sistema inmune de los insectos. *Ciencia y desarrollo*, 36 (239), 26 - 31.
24. Myllymäky, H., Valanne, S. y Rämetsä, M. (2019). The *Drosophila* Imd Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*, 192, 3455-3462. Doi: 10.4049/jimmunol.1303309.
25. Olivarez, L. (2007). Influencia de bacterias simbiotas del tracto intestinal de triatominos sobre la virulencia de *Trypanosoma cruzi* [Trabajo de investigación para obtener el título de médico cirujano, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo].
26. Programa de acción específico. (2018). Prevención y control de la Enfermedad de Chagas 2013 – 2018. *Programa sectorial de salud*. Recuperado de: [http://www.cenaprece.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE\\_PrevenccionControlEnfermedadChagas2013\\_2018.pdf](http://www.cenaprece.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE_PrevenccionControlEnfermedadChagas2013_2018.pdf)
27. Ramet, M., Manfrulli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B. y Ezekowitz, R.A. (2002). *Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a Drosophila receptor for E. coli*. *Nature*, 416, 644 - 648.
28. Rivas, B., Sada, E., Hernández, R. y Tsutsumi, V. (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Publica Méx*, 48 (1), 62 – 71.
29. Rodríguez, J., Calderón, C., Montilla, M., Nicholls, R. S., Pavía, P. y Puerta, C. J. (2007). Estandarización de una prueba de pcr-rflp para la identificación de *Rhodococcus rhodnii* en insectos triatominos. *Universitas scientiarum*, 12 (3), 11 - 22.
30. Rojo, J., González, J. F., Ruiz, C. y Salazar, P. M. (2018). Enfermedad de Chagas en México. *Gaceta médica de México*, 154, 605 – 612. doi: 10.24875/GMM.18004515
31. Royet, J. y Dziarski, R. (2007). *Peptidoglycan recognition proteins, pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defenses*. *Nat Rev Microbiol*, 5: 264 - 277.
32. Salazar, P. M., Cabrera, M. y de Haro, Irene. (2005). Tres especies de triatominos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en México. *Medicina*, 65 (1), 63 – 69.
33. Salazar, M. P., Bucio, M. I., Ruiz, A. L., Rodas, A., Guevara, Y., Monroy, M. C., Rojas, G. E., Vences, M. O., Martínez, J. A., Torres, E., Cabrera, M. (2010). Revisión de 13 especies de la familia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectores de la enfermedad de Chagas, en México. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 1 (1), 57 – 80.

34. Tay, J., Calderón, L., García, J. A., Romero, R., Ruiz, D. y Sánchez, J. T. (2008). Estudios del ciclo biológico de *Triatoma pallidipennis* (Stat 1872). *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 51 (2), 56 – 59.
35. Tay, J., Gutiérrez, M., López, R., Manjarrez y M. E., Molina, J. (2003). *Microbiología y parasitología médicas* (3ª ed.).
36. Téllez, G. y Castaño, J. C. (2010). Péptidos Antimicrobianos. *Grupo de inmunología molecular, Universidad del Quindío*, 14 (1), 55 – 67.
37. Vilcinskis, A. (Ed.). (2010). *Insect biotechnology* (vol. 2). Springer Science & Business Media.
38. Villaruel, R., Corrales, M., Huizar, R., Islas, A. y Sánchez, T. (2004). Péptidos naturales antimicrobianos: escudo esencial de la respuesta inmune. *Investigación en salud*, 6 (3), 170 – 179.
39. Wang, S. y Beerntsen, B. T. (2015). *Functional implications of the peprifoglycan recognition proteins in the immunity of the yellow fever mosquito, Aedes aegypti*. *Insect molecular biology*, 24 (3), 293 – 310.
40. Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H. y Hultmark, D. (2000). *A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13772 – 13777.
41. OMS. (2019). *La enfermedad de Chagas (trpanosomiasis americana)*. Recuperado de: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
42. Zumaya, F. A., Henry, M., Lavore, A., Martínez, J. y Rivera, R. (2017). *Comparative genomics analysis of triatomines reveals common first line and inducible immunity-related genes and the absence of Imd canonical components among hemimetabolous arthropods*. *Parasites & Vectors*, 11 (48), 1 – 16.

### 13. APÉNDICE

#### **Buffer Fosfato Salino (PBS)**

Cantidades para preparar 1 litro

NaCl	8gr
KCl	0.2 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhidro)	1.44 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 gr

Agua Milli Q

En un recipiente colocar agua Milli Q para disolver todos los reactivos, dejar en agitación por 15 minutos para después aforar a 1 litro y medir el pH a 7.4.

#### **Buffer de corrida para electroforesis de ácidos nucleicos**

Buffer de corrida 50 x (cantidades para preparar un litro de buffer)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biología

Programa Educativo de Calidad *Acreditado* por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Morelos a 15 de junio de 2023

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **ANA PAOLA MORALES GARCÍA**, con el título del trabajo: **PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR pgrp-lc DE *Triatoma pallidipennis* EN LA PRODUCCIÓN DE DEFENSINA DESPUÉS DE UN RETO BACTERIANO.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 26° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**A T E N T A M E N T E**  
***Por una humanidad culta***

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: M. EN C. LAURA PATRICIA LINA GARCIA

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: DR. ALEXIS JOAVANY RODRÍGUEZ SOLIS

\_\_\_\_\_

VOCAL: DR. ALEJANDRO ALVARADO DELGADO

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DR. CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: BIÓL. LILIA JUÁREZ PALMA

\_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**ALEJANDRO ALVARADO DELGADO | Fecha:2023-06-15 13:00:12 | Firmante**

VNP81GkyiiEox4rlmj6OdZpwW3jv2HZX2/4udtJ/qc5z18HGGg6a4+Y7JeN7PGF1Z1hb56jKvWWwyYMvlfrmsfJfhsxtysHEt56SuNPOX48YY+yMJfv3PzyLsMtkgtbotZ2IWMgKq4LefAwAQesf2nZSUIhsZCaG1EYn8Ib9yYRY1j62kJux331BPj7cH4HoEEE8uohgibXPDYTVsAY2CiaBsGOqCT4ySWF9X1lxl/5shTI5/ufHspv36IE0XFHx6NtS1u2TMNbo+Kvs3/QIJ  
Dn4bpcLUEWfU8cMg6w5B6nzyvwVIM7yZY2eDkeHljgleie+Xwr5tbxYhnOBwA==

**ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS | Fecha:2023-06-15 13:21:45 | Firmante**

SJCs5JrmZxuSvb1GKkU+ivhm6ctco6qOIFECz6lib4cyAnGPABAASVa+mcTcPhGcOs1YFSygzvBNjbWbpfUCYhilG86CShqbPK1Fd9EJ8shVGjsN3j07a9pAdPrDBI0tBJ4TiJAnuuFdszJlihaGqj1n+hFFcOqNtbAAPcwpOj+73D+yE2fJp6NgvMLMzD55zDlu0w7JjQNYsInvuticY8sfgilqlZWb9S1SvghTQaBsQOdo911QoyZa+a44N2Yq/crJrW5Rafqngq55gQc3tYgwtnglGHD9UWrmuNYKK1oF6FY/YOM+GLKojhNgHfBIXoB0A9tFOkQLRQRDw==

**LILIA JUÁREZ PALMA | Fecha:2023-06-15 16:11:29 | Firmante**

nh1d1E3/YKXLSlJLa+4wbltYEhgbWq+6DsbvGx6UMg4UT3tcUBn/svELIEbdXW+RDzb6vGvaJLoKSnwMaz2h1GjRISnZ96lx4dXmpXIDun6HdPkUGK5m3j3BK9nBngjMVujEMqRdD0iH6Dccs3+Avzj+A9lksFVll/3VJXen0TKLzd/1fyrnii3Ois7o2yHXpTHmVAnBCRBEFm1oc0ng7olvQwBw8l/+uN90i6nZwgnNKajO0aSXNofByvmD7X1pkwTqxxjZHXPFkFum9TKXiC+uVFXMg9a2rBf5DYQH8IPVSO+ioCwpNK9SN38O9ANI+qIUSMfeuaAHRK6A==

**LAURA PATRICIA LINA GARCIA | Fecha:2023-06-16 12:47:26 | Firmante**

IAoWrmMtVsF37RHc5rKUFdzd1CpNHRI4IQtXQnDRtBpZTPaF7yXygcgutKGIspi25UWh66dRLUx3UeFoPW5bcpXd+82XyfZq+dz+NdUMmfNYtHvB1ApAV6TRw6PDznQNLwey4ge90PJMmu6OORcy5z6WhJbl5SpCXRHK6LegDDfV0CXfTMF7ClKdA/8vzZ2llxpKEq7HrulyOdZkNNJqWADmGREouUHjb/O0QZLPuzeQk2S9FUh25yRXCeapIHp4SW8HK1elsQC9vFzHJHpZfsYGX8limWkFWK6jRl148wLx9MLBExpbrGfdUNqjy7TR4aS9viVXtmGfFGSoja==

**CUAUHTEMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA | Fecha:2023-06-19 12:26:56 | Firmante**

mpCPj5/P7uGVLenkTjijB1ft5d3vFS+wAxxgWQWjSKq+CnRMtUBIFgNwMzk8JdnKvHULznvZD+h6X4QMeGWe86VQfuZxah9hr4+IAPmM1uabAB893fetDO13qzh4GlnBHfytSv5rAwR90u47IAGAGIMc9lu+7V0qfHiQNm0ntgM3xkb7nFdFeyl8YkdxloF/fAG+IZ3RQRsJTF7yq5mtFxySBHTJO3Z+396njLcGxg/L3UT7EH43bHDlZLSzJ7mdwyUPJSMUDcazuY3IMG5JIL74mfykyOy4Kjjnr1glSDRRoqrqtkv1iCvOB1fogfmFEmsaH29aSy+TyGlioQQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



wWtrJqCgn

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ONwTgKt6tXWEAubExePOuQ07EKWjrUcT>

