

UNIVERSIDAD DE PANAMA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO
MAESTRIA EN CIAENCIAS BIOMEDICAS CON ESPECIALIZACION EN
MICROBIOLOGIA

DETECCION DE *Wolbachia* EN TRIATOMINOS MEDIANTE LA REACCION EN
CADENA DE LA POLIMERASA



PRESENTADA POR
CARMEN INIDRA ESPINO

DIRECTORA DE TESIS
DRA. NORA ORTIZ DE MORENO

PANAMA, 26 DE ABRIL DE 2007.

**UNIVERSIDAD DE PANAMA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

HOJA DE APROBACION

**DETECCION DE *Wolbachia* EN TRIATOMINOS MEDIANTE REACCION EN
CADENA DE LA POLIMERASA.**

DIRECTORA

DRA. NORA ORTIZ DE MORENO.....

Departamento de Microbiología

Universidad de Panamá

**Tesis presentada para optar por el Grado de Master en Ciencias Biomédicas con
especialidad en Microbiología.**

Por la licenciada Carmen Indira Espino Castillero

Panamá, abril de 2007

DEDICATORIA

*Con mucho cariño para mis padres, mi esposo, mi hermano, mi hija y
para el bebé que viene en camino. Porque todos ellos son mi
inspiración para seguir adelante.*

AGRADECIMIENTO

Primero que todo le agradezco a Dios por darme esta oportunidad en la vida.

A mis padres porque sin ellos no hubiese podido realizar mis estudios.

A mi esposo Luis Carlos y mi hija Marian Lucía porque me comprendieron y me prestaron parte de nuestro tiempo juntos para poder estudiar.

A mi hermano por ayudarme en todo momento.

A todos mis compañeros de trabajo por apoyarme durante el curso de mis estudios.

Al Dr. Windsor, Mabel y Edgardo del Instituto Smithsonian de investigaciones tropicales, quienes me entrenaron en la técnica y me brindaron todo su apoyo durante la ejecución del trabajo.

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, y a todo su equipo, quienes me apoyaron en mi estancia allá, especialmente al Dr. Osuna.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional, por el apoyo económico.

Y muy especialmente a mis Profesoras Nora y Argentina por haberme introducido en el mundo de los endosimbiontes.

INDICE GENERAL

INDICE DE CUADROS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE GRAFICAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCION.....	xii
CAPITULO I: GENERALIDADES DE LA INVESTIGACION.....	1
Planteamiento y estado actual del problema.....	2
Objetivos.....	4
Justificación.....	5
CAPITULO II: FUNDAMENTACION TEORICA.....	7
1. Generalidades de endosimbiontes.....	8
2. Antecedentes históricos y clasificación de <i>Wolbachia</i>	12
3. Características relevantes.....	13
a. Morfología.....	13
b. Eventos reproductivos.....	13
c. <i>Wolbachia</i> y la relación con el huésped.....	17
4. Características moleculares.....	18
5. Otros endosimbiontes.....	19
a. Endosimbiontes en Triatominos.....	19
a.1 <i>Rhodococcus rhodni</i>	19
a.2 Baterias corineriformes.....	20
6. Diagnóstico de <i>Wolbachia</i>	21
a. Diagnóstico molecular.....	22
b. Detección microscópica no específica.....	22
c. Detección microscópica específica.....	23
7. Control biológico de vectores.....	23
a. Técnica del insecto estéril (TIE).....	24
b. Técnica de Incompatibilidad citoplasmática (TIC).....	25
7.1. Control de triatominos utilizando <i>Rhodococcus rhodni</i>	26
7.2. Uso de <i>Wolbachia</i> en otros vectores.....	27
8. <i>Wolbachia</i> y filariasis.....	27
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
1. Área de estudio.....	31
2. Tipo de estudio.....	31
3. Universo de estudio, selección y tamaño de muestra, unidad de análisis y observación. Criterios de inclusión y exclusión.....	31
a. Criterios de Inclusión y Exclusión.....	32
4. Procesamiento de las Muestras.....	32
a. Materiales.....	32
b. Colecta de triatominos de campo.....	33
c. Disección de triatominos.....	35
d. Verificación de la infestación con <i>Trypanosomas</i>	39

e. Extracción de ADN.....	39
f. Reacción en Cadena de la Polimerasa.	40
g. Corrida Electroforética en gel de Agarosa.....	43
h. Cargado de las muestras en el gel de agarosa.	44
i. Criterios utilizados para la Interpretación de los resultados obtenidos en los PCR realizados.	45
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
1. Resultados.....	48
a. Resultados obtenidos de triatominos de colonias.	52
b. Resultados obtenidos de triatominos de campo.	57
Análisis de tabla simple	61
2. Discusión.....	62
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	65
ANEXOS	69
BIBLIOGRAFIA	76

INDICE DE CUADROS

Cuadro No. 1: Simbiontes en insectos	9
Cuadro No. 2: Incompatibilidad citoplasmática bidireccional (Wade 2001).....	16
Cuadro No. 3: <i>Wolbachia</i> en triatominos de colonia según sexo	52
Cuadro No. 4: Distribución según sexo de las diferentes especies de triatominos de colonia utilizadas en el estudio.	54
Cuadro No. 5: Distribución según región de los triatominos obtenidos en la colonia del ICGES.	56
Cuadro No. 6: Triatominos del ICGES obtenidos de la colonia de El Cigual según generación.	56
Cuadro No. 7: Triatominos del ICGES obtenidos de la colonia de Cerro Cama según generación.	56
Cuadro No. 8: Triatominos del ICGES obtenidos de la colonia de Chepo según generación.	57
Cuadro No. 9: Triatominos del ICGES obtenidos de la colonia de Metetí según generación.	57
Cuadro No. 10: <i>Wolbachia</i> en triatominos de campo según sexo.	58
Cuadro No. 11: Resultados de <i>Wolbachia</i> obtenidos en triatominos de campo y de colonia según sexo.	61
Cuadro No. 12: Resultados Obtenidos de Triatominos de Campo.	70
Cuadro No. 13: Resultados Obtenidos de Triatominos de Colonias.....	71

INDICE DE FIGURAS

Figura No. 1: Estructura de los ribosomas de la célula eucariota	10
Figura No. 2: Origen de la célula eucariota	11
Figura No. 3: Incompatibilidad Citoplasmática unidireccional (Wade 2001).....	16
Figura No. 4: Colecta de triatominos en la comunidad de Viento Fronto de Chilibre	34
Figura No. 5: Participación de la comunidad de Viento Fronto en la colecta de Triatominos.	35
Figura No. 6: Preparación del área de trabajo para iniciar las disecciones.....	37
Figura No. 7: Selección de los triatominos adultos para la disección	37
Figura No. 8: Separación del torax (paso No. 7 de la disección de triatominos)	38
Figura No. 9: Identificación de los diferentes órganos de los triatominos.	38
Figura No. 10: Kit de extracción de ADN utilizado.	40
Figura No. 11: Termociclador.....	43
Figura No. 12: Fuente de Poder LKB.	45
Figura No. 13: Resultados de PCR para 28S.	48
Figura No. 14: Resultados de PCR para 16s rDNA.....	49
Figura No. 15: Corrida de PCR para 28S ADNr y 16S ADNr.	50
Figura No. 16: Corrida de PCR para <i>wsp</i>	51
Figura No. 17: Corrida de PCR para <i>Trypanosoma rangeli</i>	52
Figura No. 18: Diferentes cortes de intestinos de <i>R. pallelescens</i> a diferentes aumentos en microscopía electrónica.....	73
Figura No. 19: Imágenes de microscopía electrónica realizadas a intestino y ovario de <i>Rhodnius pallelescens</i> de campo	74
Figura No. 20: Imagen de microscopía electrónica de <i>Wolbachia</i> en tejido reproductivo. (Beard et al., 1998).....	75

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica No. 1: Distribución de <i>Wolbachia</i> en triatominos de colonia según sexo.	53
Gráfica No. 2: Resultados de <i>Wolbachia</i> obtenidos en diferentes órganos de triatominos de colonias	54
Gráfica No. 3: Resultados de <i>Wolbachia</i> en las diferentes especies de triatominos de colonia.	55
Gráfica No. 4: Distribución de <i>Wolbachia</i> en triatominos de campo según sexo.	58
Gráfica No. 5: Resultados de <i>Wolbachia</i> obtenidos en diferentes órganos de triatominos de campo.	59
Gráfica No. 6: Resultados de infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Trypanosoma rangeli</i> en triatominos de campo.	60

LISTA DE ABREVIATURAS

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

IC: incompatibilidad citoplasmática.

TII: Técnica del insecto incompatible.

TIE: Técnica del insecto estéril

Wsp: *Wolbachia* surface protein.

ICGES: Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud

STRI: Smithsonian tropical research institute

ADNr: Acido dexosiribonucleico ribosomal

ARNr: Acido ribonucleico ribosomal

CIDEP: Centro de Investigaciones parasitarias de la Facultad de Medicina

RESUMEN

La *Wolbachia* es una bacteria que infecta del 20-75% de los insectos del mundo produciendo diferentes efectos en el proceso reproductivo de estos, entre los cuales podemos mencionar la incompatibilidad citoplasmática, partenogénesis, cambio de sexo y muerte de machos. En este estudio el objetivo era detectar esta bacteria en diferentes órganos de triatominos de campo y de colonia, que son vectores de la enfermedad de Chagas en Panamá. La detección de *Wolbachia* se hizo mediante la Reacción en cadena de la Polimerasa, utilizando cebadores específicos para 16S ADNr y para *wsp*, y se utilizó 28S ADNr para verificar la calidad del tejido. Nos interesó también, detectar la infección simultánea de *Wolbachia* y *Trypanosoma cruzi* y/o *Trypanosoma rangeli* en los triatominos de campo. Este estudio se realizó con el apoyo del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud y el Centro de Investigaciones Parasitarias de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá, de donde se obtuvieron los ejemplares de colonias; y con la colaboración del Instituto Smithsonian de Investigaciones tropicales y el Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada en donde se realizó la investigación. Del total de triatominos estudiados (n=73) el 64,4% resultaron positivos por *Wolbachia* y se encontraron diferencias en la infección de *Wolbachia* en triatominos de campo y los de colonia. En el caso de los triatominos de campo se obtuvo el 100% positivos mientras que en los triatominos de colonia sólo el 45,8%. Se detectó *Wolbachia* en gónadas, glándulas salivares e intestinos de los triatominos de campo y de colonia. Un 52% de los triatominos de campo, estaban infectados con *T. cruzi*, y un 24% con *T. rangeli*.

SUMMARY

The *Wolbachia* is a bacterium that infects the 20-75% of the insects of the world producing different effects in the reproductive process from these; we can mention the cytoplasmic incompatibility, parthenogenesis, change of sex and death of males. In this study the objective is to detect this bacterium in different organs of triatomines from field and colony, that are vectors of the disease of Chagas in Panama. The detection of *Wolbachia* will be done by the Polymerase Chain Reaction, using specific primers for 16S rDNA and *wsp*, the primer 28S rDNA will be used to verify the quality of the tissues to be tested. We are also interested to detect the simultaneous infection of *Wolbachia* with *Trypanosoma cruzi* and/or *Trypanosoma rangeli* in the triatomines of field. This study was made with the support of the Gorgas Commemorative Institute of Studies of the Health and the Parasitic Research center of the Faculty of Medicine of the University of Panama, from where the samples from colonies were obtained; and with the collaboration of the Smithsonian Institute of tropical research and the Institute of Biotechnology of the University of Granada in where the investigation was made. From the total of triatomines studied (n=73) the 64,4% were positive by *Wolbachia* and were differences in the infection of *Wolbachia* in triatomines of field and those of colony. In the case of the triatomines of field 100% were positives whereas in the triatomines of colony only the 45,8%. *Wolbachia* was detected in sexual tissue, salivary glands and intestines of the triatomines of field and colony. A 52% of the triatomines of field, were infected with *T. cruzi*, and a 24% with *T. rangeli*.

INTRODUCCION

Las asociaciones simbióticas han sido de gran interés entre los estudiosos de la biología, y esto se debe a que se han encontrado similitudes entre células procariotas y organelos celulares como las mitocondrias y cloroplastos, en células eucariotas (Margulis 1992; Hartman, H., and Fedorov, A., 2005). Con la aplicación de la biología molecular se han podido observar diferentes simbiontes en organismos eucariotas estableciendo una interrelación mutualista o parasitaria con su huésped, que ha llevado a estudiosos de esta rama a interesarse más en conocer los sistemas simbiote-insecto (Werren 2003)

La *Wolbachia* es una bacteria intracelular obligatoria (Makepeace et al., 2006; Werren 2003) perteneciente al género *Wolbachia*, clase alfa-proteobacteria, del orden Rickettsiales y dividida en 6 subgrupos taxonómicos de la A a la F (Baldo et al., 2005; Stouhamer et al., 1999). Se ha identificado en un 20 a 75% de la población de insectos del mundo (Baldo et al., 2005; Stouhamer et al., 1999; Van Meer et al., 1999; Werren 1997; Zimmer 2001) elevando el interés en su estudio, por los efectos que produce en los eventos reproductivos de los mismos (Wade 2001; Werren, J. and Jaenike, J., 1995) entre los que podemos mencionar: partenogénesis, feminización, muerte de machos, e incompatibilidad citoplasmática (Stouhamer et al., 1999; Sun et al., 2003; Van Meer et al., 1999; Zhou et al., 1998).

Basándose en lo expuesto y en lo encontrado por investigadores alrededor del mundo, nos interesa profundizar los estudios en esta bacteria pero aplicando esos conocimientos a una enfermedad que afecta a nuestro país como la Enfermedad de Chagas. Esta enfermedad no tiene cura y es transmitida por la picada de un triatomo hematófago de transmisión ciclopropagativa. Iniciamos la investigación detectando en los triatominos vectores de la enfermedad de Chagas un reconocimiento que se basa en la detección de *Wolbachia* en sus diferentes órganos. Para esta identificación utilizamos la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y diferentes cebadores que nos ayudaron a confirmar su presencia o ausencia.

Este trabajo se estructura en cuatro capítulos, el primero plantea las generalidades de la investigación, cuyos objetivos están dirigidos a detectar la *Wolbachia* por un método molecular en diferentes órganos de los triatominos, obtenidos del campo y de colonias de laboratorio.

El capítulo segundo hace una revisión actualizada del marco teórico que sirve de fundamento conceptual a la investigación, con detalles relacionados con los antecedentes históricos, morfología y composición, manifestaciones en los diferentes huéspedes, fenómenos reproductivos que afecta, una revisión general de los usos que se le están dando a los endosimbiontes como control de vectores, métodos de diagnóstico de la bacteria y otros endosimbiontes de triatominos.

Por su parte en el capítulo tercero, se aborda el marco metodológico de la investigación, se detalla la población en estudio, las muestras utilizadas, los métodos que se emplearon para detectar *Wolbachia* y cómo se realizaron cada una de las técnicas.

El capítulo cuarto presenta los resultados, los cuales se presentan por cada grupo estudiado por separado y luego se relacionan los grupos entre sí para efectos de comparación de resultados entre las dos poblaciones estudiadas. Estos resultados revelan datos interesantes, como por ejemplo la presencia de *Wolbachia* en varios órganos del triatomino y no sólo en las gónadas como se tenía documentado. La diferencia en la infección de los triatominos de colonia con respecto a los triatominos de campo que resultaron con 100% de positividad para *Wolbachia*. Tales resultados se presentan mediante tablas y gráficas, que permiten visualizar los resultados con mayor claridad.

Finalmente se plantean las conclusiones y recomendaciones, las primeras orientadas a destacar la presencia de la bacteria *Wolbachia* en varios órganos del triatomino, principalmente en aquellos provenientes del campo.

La información obtenida en este estudio permitirá profundizar en el tema para lograr cambios importantes en alguna etapa de la enfermedad, a nivel de transmisión o en el tratamiento y en motivación para otras investigaciones que abarquen diferentes especies de insectos, vectores de otras enfermedades que aquejan nuestro país.

CAPITULO I: GENERALIDADES DE LA INVESTIGACION

Planteamiento y estado actual del problema

Actualmente existen enfermedades que nos afectan, que son de difícil control y no cuentan con un tratamiento efectivo pese a los adelantos tecnológicos y a los hallazgos a nivel molecular de la célula biológica. Entre éstas podemos mencionar a las parasitosis como la enfermedad de Chagas y la filariasis.

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas afecta entre 16 a 18 millones de personas en Centro y Sur América y cerca de 100 millones están en riesgo de contraerla; la misma es transmitida por la picada de un triatomo, de transmisión ciclopropagativa, en quienes los cambios y la metacicloogénesis del parásito podrían estar mediados por bacterias endosimbiontes.

Producto de estudios recientes ha tomado importancia el papel que juegan los endosimbiontes bacterianos que habitan en los parásitos causantes de enfermedades y/o vectores de esos mismos parásitos. Existe la evidencia comprobada por lo menos en la filariasis causada por *Onchocerca volvulus*, que tratándola con antibióticos adecuados, la bacteria endosimbionte (*Wolbachia*) detiene su desarrollo y se disminuyen los estragos de la ceguera y más importante aún es que se detiene el desarrollo y la reproducción del mismo parásito (Punkosdy et al., 2003).

Los nuevos tratamientos para la filariasis linfática, comprueban que la reacción inflamatoria que se produce en esta enfermedad, la causa un lipopolisacárido que es la endotoxina de *Wolbachia*, y no el parásito. Estos avances en la investigación han mejorado el pronóstico de estas enfermedades.

La relación que existe entre los artrópodos y algunos de sus simbioses puede ser mutualista o parasítica. En el caso de la bacteria *Wolbachia* se ha visto que puede producir fenómenos sorprendentes en sus huéspedes. Es por esto, que nace el interés de profundizar en este campo ya que el control biológico de vectores se perfila como una de las mejores alternativas para controlar vectores que transmiten enfermedades a los humanos; existe además la posibilidad de usar estos microorganismos como vehículo de genes de interés para diferentes poblaciones de insectos. Con la presencia de los endosimbiontes en los insectos transmisores de enfermedades se podría llegar a modificar los esquemas de tratamiento de algunas enfermedades o modificar comportamientos dentro de estas poblaciones, disminuyendo así su eficacia como transmisores de patógenos.

Nuestro interés en este estudio es demostrar la presencia o ausencia de *Wolbachia* en los triatomíneos que transmiten la Enfermedad de Chagas procedentes de áreas endémicas de la enfermedad en la República de Panamá y de triatomíneos procedentes de colonias de laboratorio. Esta detección se realizó mediante técnicas de disección de diferentes órganos de los triatomíneos y aplicando la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para esto se utilizaron diferentes cebadores que incluyen: dos pares para diferentes genes de *Wolbachia* y un par para células eucariotas controlando así la calidad del tejido. Además, en los triatomíneos de campo se realizó la búsqueda de *T. cruzi* por pruebas moleculares y microscópicas directas, y de *T. rangeli* mediante PCR.

Objetivos

Objetivo general

Detectar la bacteria *Wolbachia* en diferentes órganos de triatomíneos de campo y colonias, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando dos pares de cebadores específicos.

Objetivos específicos

1. Comprobar mediante PCR la presencia de *Wolbachia* en triatomíneos de campo y de colonias de laboratorio.
2. Verificar la presencia de *Wolbachia* en diferentes órganos de los triatomíneos.
3. Determinar si existe diferencia respecto a la infección por *Wolbachia* entre los triatomíneos de campo y los de colonia.
4. Detectar la infección simultánea de *Wolbachia* y *T. cruzi* y/o *T. rangeli* en los triatomíneos de campo.

Justificación

La *Wolbachia* es una bacteria endosimbionte que infecta del 20-75% de los insectos del mundo produciéndole diferentes efectos en su proceso reproductivo, entre los cuales podemos mencionar la incompatibilidad citoplasmática, partenogénesis, cambio de sexo y muerte de los machos (Baldo et al., 2005; Stouhamer et al., 1999; Van Meer et al., 1999; Werren 2003; Zimmer 2001). Esta bacteria puede ser usada para transportar genotipos deseables en insectos que funcionan como vectores de patógenos humanos y modificar así sus habilidades para transmitirlo.

La *Wolbachia* también puede ser utilizada como una herramienta poderosa para el control de plagas bajo diferentes modalidades, como sistema de transformación, expresando genes para especies de artrópodos y nemátodos; provocando incompatibilidad citoplasmática para dirigirla a poblaciones naturales (Xi and Dobson, 2005) e induciendo esterilidad mediante incompatibilidad citoplasmática en poblaciones específicas de insectos.

En consideración a estos usos, este estudio investigó si los triatomíneos involucrados en la transmisión de la Enfermedad de Chagas, se ven afectados por la *Wolbachia*, abriendo un camino innovador en la búsqueda de técnicas para el control seguro de vectores o incluso nuevas estrategias de tratamiento para la Tripanosomiasis americana o la Enfermedad de Chagas, que es un problema de salud que afecta de 16 a 18 millones de personas en Centro y Sur América y que cerca de 100 millones están en riesgo de contraerla.

Nos interesó conocer los órganos de los triatominos infectados con *Wolbachia*, y su presencia en los triatominos infectados simultáneamente con *T. cruzi* y/o *T. rangeli*

Para investigaciones futuras será interesante conocer si la *Wolbachia* interfiere en el ciclo de vida del parásito dentro del vector o si interfiere en la transmisión del mismo al humano.

CAPITULO II: FUNDAMENTACION TEORICA

1. Generalidades de endosimbiontes

El término simbiosis fue usado por primera vez en 1879 por Antón de Bary, para referirse a dos o más especies que viven permanentemente en estrecha asociación, durante al menos una parte de su ciclo de vida, ya sea con la coexistencia de un individuo sobre el otro o uno dentro del otro (Gil et al., 2004)

Los simbioses pueden pasar de una generación a otra mediante dos estrategias generales: la transmisión horizontal (cuando se adquiere del ambiente externo) y la transmisión vertical, mediada por la herencia, casi siempre vía materna, a través del citoplasma de los huevos (Grijalva y Giraldo 2006) Existen dos tipos de simbioses, los primarios u obligados y los secundarios o facultativos. En el grupo de los primarios entran aquellos que mantienen evidencia de una asociación antigua y especializada, con claras congruencias con el de su hospedero durante largos períodos de tiempo evolutivo (Thao and Baumann 2004; Moran et al., 2005; Baumann 2005; Lo et al., 2003; Moran et al., 2003; Wu et al., 2006). En el grupo de los simbioses secundarios o facultativos se encuentran aquellos que no están regidos a órganos específicos y no son indispensables para la supervivencia de su hospedero. En esta categoría hay un grupo que se les considera patógenos, porque poseen su propia maquinaria biológica para invadir células hospederas y tejidos (Dale and Moran 2006). En el siguiente cuadro se muestran ejemplos de los simbioses más estudiados y que se consideran importantes para sus hospederos. (Cuadro No. 1)

Cuadro No. 1: Simbiontes en insectos

HOSPEDERO	SIMBIONTE	EFEECTO
AFIDO	<i>Buchnera aphidicola</i>	Confinado a células especializadas, aporta nutrientes al hospedero. Posee genoma reducido.
	<i>Hamiltonella defensa</i>	Es facultativo. Presente en muchos tejidos. Transmisión horizontal y vertical. Defiende al hospedero contra parasitoides.
Tsetse	<i>Wigglesworthia glossinidia</i>	Es obligado. Confinado en células especializadas. Aporta nutrientes y cofactores al hospedero. Posee genoma reducido.
	<i>Sodalis glossinidius</i>	Es facultativo. Presente en muchos tejidos. Transmisión vertical y horizontal. Defiende al hospedero contra parasitoides.

Las asociaciones entre seres vivos tienen antecedentes muy antiguos y en estudios realizados a lo largo de los siglos se le encuentra estrecha relación con el origen de las células eucariotas. Algunas evidencias de la relación célula procariota-célula eucariota las presenta Lynn Margullis con la primera “Teoría endosimbiótica de la célula eucarionte”. Esta teoría describe la interacción de una célula huésped procariota original

que entra en contacto estrecho con una bacteria aeróbica y esta fusión da como resultado invaginaciones de la membrana celular, lo que da origen a un organismo compuesto proeucariótico. Las bacterias evolucionan en mitocondrias y el retículo endoplásmico y la membrana nuclear se forman de las invaginaciones de la membrana, dando lugar a la célula eucariota de animales, hongos y algunos protistas (Margulis, 1993). Las mitocondrias poseen características que evidencian su origen ancestral entre las que podemos mencionar: su tamaño, las dos membranas que la rodean, el contenido de lípidos que sólo se encuentran en bacterias, se dividen por fisión binaria y poseen maquinaria genética parecida a la de las bacterias; con estas afirmaciones no hay dudas sobre el origen de las mitocondrias (Fig. No. 2) (Margulis et al., 2000; Margulis, 1992).

Los eucariontes tienen ribosomas de 80S con una subunidad de 40S y otra de 60S. La subunidad de 40S está formada por 33 proteínas y un ARN ribosómico de 18S (18S ARNr). La subunidad de 60S consiste de 49 proteínas y 3 tipos de moléculas de ARNr: 5S, 5.8S y 28S (Holley) (Fig. No. 1).

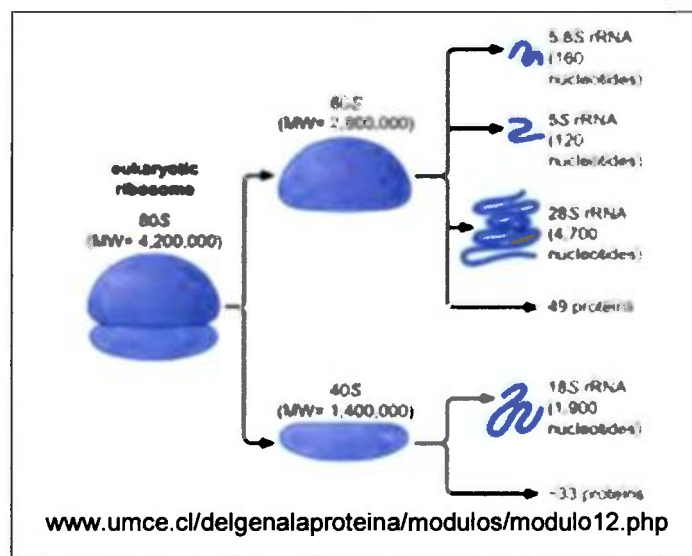


Figura No. 1: Estructura de los ribosomas de la célula eucariota.

Con la aplicación de la biología molecular se han podido observar diferentes simbioses en organismos eucariotas ya sea estableciendo una interrelación mutualista o parasitaria con su huésped, lo cual ha llevado a estudiosos de esta rama a interesarse más en conocer los sistemas simbiote-insecto (Werren, 2003)

Se han identificado diversos tipos de bacterias dentro de diferentes insectos y produciendo efectos distintos en cada uno de ellos: pueden alterar su desarrollo (Braendle et al., 2003); pueden intervenir en mecanismos nutricionales que posibilitan suplementar una dieta pobre con algún componente o la digestión de recursos alimenticios como la celulosa (Baumann 2005); alteraciones en la reproducción que pueden traducirse en eventos de especiación (Hurst and Werren 2001; Stouhamer et al., 1999); defensa contra el ataque de enemigos naturales (Scarborough et al., 2005); inmunidad (Macdonald and Monteleone 2005) y compensación por la pérdida del simbiote primario (Koga et al., 2003).

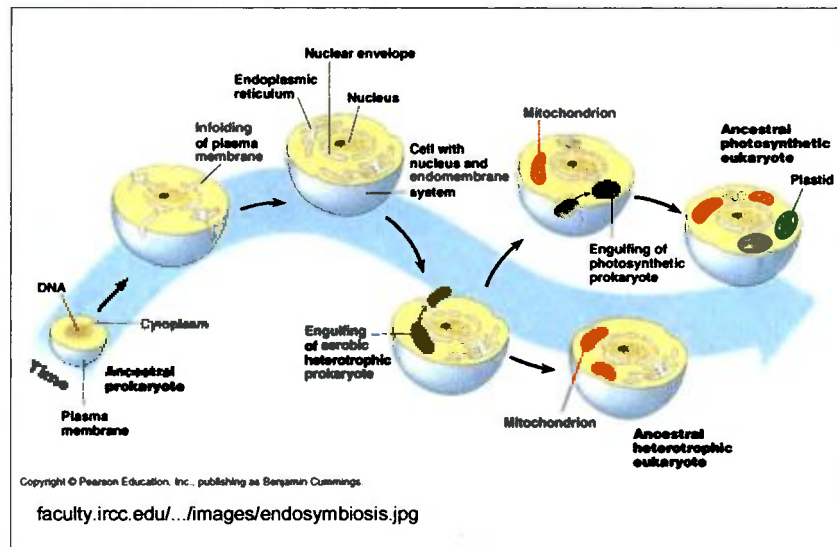


Figura No. 2: Origen de la célula eucariota.

2. Antecedentes históricos y clasificación de *Wolbachia*

La *Wolbachia* fue reportada por primera vez en 1924 por Herting y Wolbach y la nombraron *Rickettsia sin nombre* (Fenollar et al., 2003; Stouhamer et al., 1999; Zimmer 2001), por su parecido a los miembros del grupo de las Rickettsias y fue encontrada en ovarios del mosquito *Culex pipiens*; en 1936 fue formalmente llamada por Herting, *Wolbachia pipientis* en honor a su colega Wolbach (Punkosdy et al., 2003). Cuando se encontró por primera vez en *C pipiens* no se reportaron síntomas patológicos obvios (Hertig and Wolbach, 1924; Herting, 1936) En 1971 Yen y Barr comienzan a observar incompatibilidad citoplasmática en mosquitos y descubrieron que lo causaba *W pipientis*, y el interés aumentó luego que se observara este fenómeno en otros insectos (Fenollar et al., 2003; Stouhamer et al., 1999; Sylvain et al., 2001). Para 1980 Werren describía la *Wolbachia* como un montón de bacterias que viven sólo en un grupo de insectos (Werren 1995)

En los setentas, se identificaron estructuras parecidas a bacterias dentro de nemátodos filariales mediante microscopía electrónica (McLaren et al., 1975; Kozek, 1977; Kozek and Marroquin, 1977) Después, estas estructuras bacterianas fueron identificadas y clasificadas dentro del género *Wolbachia*, el cual había sido identificado con anterioridad en artrópodos. La *Wolbachia* encontrada en artrópodos y en las filarias, presenta variaciones considerables (Taylor et al., 2005)

Por sus características similares a la de las rickettsias se clasificó en la familia de las *Rickettsias*, tribu *Wolbachieae* y luego con la secuenciación del gen 16S ADNr se

modificó su clasificación (Fenollar et al., 2003; Stouhamer et al., 1999) Actualmente pertenece al género *Wolbachia*, clase alfa-proteobacteria, del orden *Rickettsiales* y dividida en 6 subgrupos taxonómicos de la A a la F, basados principalmente en los genes 16S ADNr y el *ftsZ*; encontrándose los subgrupos A y B principalmente en artrópodos, el C, y D en nemátodos filariales (Baldo et al., 2005; Stouhamer et al., 1999) el E recientemente encontrado en *Collembola*, que es un grupo de insectos primitivos y el F en termitas y *Mansonella* (Baldo et al., 2005)

3. Características relevantes.

a. Morfología

Herting ha descrito la *Wolbachia* como una bacteria con características generales similares a las Rickettsias (Stouhamer et al., 1999; Xi and Dobson 2005) Es una bacteria dimórfica, pequeña, en forma de bacilo irregular de más o menos 0.3 a 1.3µm de largo y formas cocoides de 0.25 a 0.5 µm de diámetro. Pueden existir también en formas más grandes de hasta 1 a 1.8 µm de diámetro y conteniendo muchas de las formas más pequeñas. La *W pipientis* al entrar en la célula huésped queda envuelta en una vacuola, y dicho mecanismo está descrito en otras bacterias intracelulares (Stouhamer et al., 1999)

b. Eventos reproductivos

Wolbachia tiene tropismo por el tejido reproductivo de los insectos, pero algunos afirman que la infección puede encontrarse en otros órganos (Stouhamer et al., 1999), ésta se transmite verticalmente (Ahrens and Shoemaker 2005; Baldo et al., 2005; Fenollar et al., 2003; Frank 1997; Jeyaprakash and Hoy 2000; Kondo et al., 2002; Miller and Riegler

2006; Stouhamer et al., 1999; Sun et al., 2003; Sylvain et al., 2001; Xi and Dobson 2005; Zhou et al., 1998) Algunos investigadores han descrito la forma de transmisión horizontal ya que se ha detectado una misma cepa de la bacteria en artrópodos de distintas especies (Miller and Riegler, 2006; Stouthamer et al., 1999; Van Meer et al., 1999) y esto lo hace para explorar nuevos ambientes celulares por mecanismos que aún no están claros (Ahrens and Shoemaker, 2005; Baldo et al., 2005) La transmisión horizontal de genes entre cepas de *Wolbachia* altamente divergentes puede estar dada por un fago llamado fago WO aislado de la cepa wKue (Masui et al., 2001)

El hecho de que se herede maternalmente por infección de los oocistos mantiene una alta incidencia de la infección en los artrópodos. También es cierto que hay algunos factores que impiden la dispersión de esta bacteria sin necesidad de manipular el ciclo reproductivo del huésped, entre los cuales podemos mencionar: la imperfección de la herencia materna debido a exposiciones altas de temperatura o a antibióticos de ocurrencia natural o a factores genéticos del huésped que puedan interferir en el desarrollo de la infección, disminución de la capacidad de fertilización de las hembras infectadas y de este modo podría disminuir o perderse la población actual de la bacteria (Stouhamer et al., 1999)

La *Wolbachia* es capaz de provocar diversos fenómenos reproductivos en el huésped.

Entre los fenómenos que produce, podemos mencionar:

- Partenogénesis, es donde hembras vírgenes infectadas pueden reproducirse sin ser fertilizadas por un macho (Stouhamer et al., 1999; Sun et al., 2003; Van Meer et al., 1999; Zhou et al., 1998)

- Feminización, es donde los machos infectados pueden reproducirse como hembras (Stouhamer et al., 1999; Sun et al., 2003; Van Meer et al., 1999; Zhou et al., 1998)
- Muerte de machos, ocurre cuando todos los embriones machos que vienen infectados mueren y sobreviven los embriones hembras. (Stouhamer et al., 1999; Sun et al., 2003; Van Meer et al., 1999; Zhou et al., 1998; Zimmer, 2001)
- Incompatibilidad citoplasmática unidireccional, en donde un macho infectado se aparea con una hembra no infectada y la progenie muere (Fig. No. 2); bidireccional es el caso en el que ambos están infectados pero con cepas diferentes (Ahrens and Shoemaker, 2005; Bourtzis et al., 1998; Dobson et al., 2002; Miller and Riegler, 2006; Stouhamer et al., 1999; Sylvain et al., 2001; Van Meer et al., 1999; Zhou et al., 1998)

En el caso de incompatibilidad citoplasmática hay algunos factores que influyen en la transmisión de la *Wolbachia* como la temperatura, la exposición a antibióticos naturales, la calidad de la alimentación, y la densidad larval (Werren 1997)

Los fenómenos reproductivos en los que interviene la *Wolbachia* no han sido resueltos a nivel molecular. Numerosos estudios genéticos, citogenéticos y celulares indican que *Wolbachia* de alguna forma modifica los cromosomas paternos durante la espermatogénesis (espermias maduros no contienen la bacteria), de esta manera influyen su comportamiento durante la primera división mitótica resultando en la pérdida de la sincronización mitótica (Breeuwer and Werren, 1990; O'Neill and Karr, 1990; Reed and Werren, 1995; Callaini et al., 1997; Tram and Sullivan, 2002) Varios

estudios moleculares están en progreso para identificar las proteínas de la bacteria y/o proteínas originarias del huésped que están involucradas en la IC (Sasaki et al., 1998; Harris and Varig, 2001; Tram and Sullivan, 2002; Tram et al., 2003; Iturbe-Ormaetxe et al., 2005; Sinkins et al., 2005)

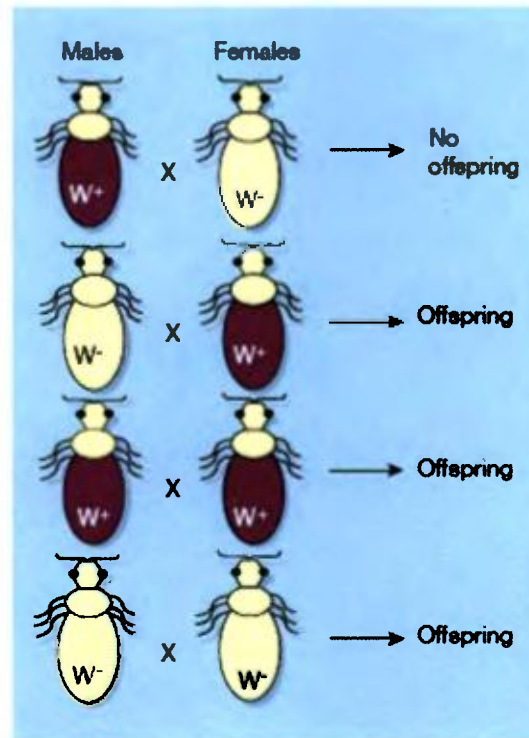


Figura No. 3: Incompatibilidad Citoplasmática unidireccional (Wade 2001).

Cuadro No. 2: Incompatibilidad citoplasmática bidireccional (Wade 2001).

Macho	Hembra	Fertilización
Infectado con <i>Wolbachia</i> cepa A	Infectado con <i>Wolbachia</i> Cepa A	Sí
Infectado con <i>Wolbachia</i> Cepa A	Infectado con <i>Wolbachia</i> cepa B	No

c. *Wolbachia* y la relación con el huésped

Se pensó que *Wolbachia* así como otros endosimbiontes obligados estuviera allí para proveer a los huéspedes de amino ácidos que éste no pudiese sintetizar. Pero al secuenciar el genoma de ambas *Wolbachia* la mutualista *wBm* (aislada de *Brugia malayi*) y la parasitaria *wMel* (aislada de *Drosophila melanogaster*), se observó que son incapaces de sintetizar amino ácidos y los obtienen de sus huéspedes para suplir sus propios requerimientos metabólicos (Zientz et al., 2004)

Wolbachia adquiere amino ácidos, carbohidratos, y lípidos de su huésped. Los amino ácidos juegan un papel importante en el metabolismo de *Wolbachia*, ya que muchos de sus requerimientos metabólicos son tomados del catabolismo de proteínas del huésped y de amino ácidos liberados, y esto se evidencia por la gran cantidad de proteasas, peptidasas y de transportadores de amino ácidos codificados por el genoma del *wMel* (Wu et al., 2004; Foster et al., 2005) una vez que estén importados, los aminoácidos pueden ser catabolizados para los requerimientos energéticos (síntesis de ATP) o biosíntesis de otros amino ácidos, así como síntesis de proteínas.

A pesar de que *Wolbachia* requiere una serie de pasos para sintetizar lípidos y conformar su pared celular, el principal componente lipídico encontrado en las proteobacterias es el lípido A, que no puede ser sintetizado (Wu et al., 2004)

wMel codifica una lipasa GDSL (GDSL-like lipase) que parece ser secretada y que permite a la *Wolbachia* adquirir colesterol de su huésped catabolizando moléculas

lipídicas de éste (Wu et al., 2004; Foster et al., 2005) Lipasas similares son codificadas por otras bacterias intracelulares y son usadas para desintoxicar compuestos citotóxicos derivados del huésped (Flieger et al., 2002) De esta manera el GDSL like lipase puede jugar un papel similar en el mantenimiento de la infección con *wMel* por la desintoxicación de compuestos citotóxicos derivados del huésped.

wMel no es capaz de sintetizar o metabolizar una gama de amino ácidos esenciales, carbohidratos, o lípidos. En cambio, a través de la secreción de enzimas catabólicas y numerosos transportadores, estos metabolitos esenciales son adquiridos activamente del huésped (Bourtzis and Miller, 2003)

4. Características moleculares

Para conocer más acerca de la filogenia, se han realizado diversos estudios utilizando el *wsp* que codifica para la proteína WSP (*Wolbachia* Surface Protein) y con el cual se han hecho las subdivisiones microtaxonómicas de los principales grupos A y B para los artrópodos. En base a estos estudios se sabe que la *Wolbachia* es una bacteria muy antigua y numerosas mutaciones del *mtADN* se han acumulado desde la más reciente invasión de *Wolbachia* (Ahrens and Shoemaker, 2005) *Wolbachia* tiene la capacidad de arrastrar su genoma o adquirir DNA foráneos y generar variaciones genéticas para actuar sobre la selección natural (Tamas et al., 2002)

Antes de la secuenciación del genoma *wMel*, se usaban diferentes marcadores genéticos como el *16S ADNr*, *ftsZ*, *dnaA*, y el gene *wsp* que se usaban para distinguir entre varias cepas de *Wolbachia* (Holden et al., 1993; Bourtzis et al., 1994; Braig et al., 1998; Zhou et

al., 1998; Jeyaprakash y Hoy, 2000) La *wMel* tiene alto contenido de bases A+T, no tiene plásmido extracromosómico y tiene un tamaño de 1.26 Mb y es bastante pequeña si se compara con bacterias de vida libre (Wernegreen, 2002; Dufresne et al., 2005) *wMel* contiene su propia maquinaria reparadora de ADN y gran cantidad de ADN repetitivo. (Wu et al., 2004) La secuenciación del genoma de *wMel* reveló que más del 14% de los cromosomas están hechos por simples ADN repetitivos, elementos transposables, que no son más que elementos genéticos movibles capaces de replicarse dentro del genoma del huésped y secuencias de profagos (Wu et al., 2004)

5. Otros endosimbiontes

Se ha estimado que el 10% de los insectos contienen microorganismos intracelulares simbióticos, pero hasta el momento sólo cinco se han podido aislar en cultivos in vitro, entre estos tenemos a: *Sodalis glossinidius* (Welburn et al., 1987); *Wolbachia pipientis* (O'Neill et al., 1997); *Candidatus Arsenophonus triatominarum* (Hypsa and Dale, 1997); *Candidatus Consessoris aphidicola* y *Candidatus Adiaceo* (Darby et al., 2005)

a. Endosimbiontes en Triatominos

a.1 *Rhodococcus rhodnii*

Es el simbiote de triatominos más estudiado. *R. rhodnii* es una bacteria del tipo actinomicete nocardioforme que según la tinción de Gram es clasificada como un cocobacilo pleomórfico Gram positivo. Esta bacteria ha sido muy estudiada como simbiote de triatominos. Además del *R. rhodnii*, se han encontrado otros actinomicetes como simbiotes de triatominos, entre los que podemos mencionar a *R. tuatoma*, que se

puede encontrar junto con *R rhodnii* en el intestino de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma sp.* También se han encontrado bacterias del tipo actinomicetes en *Triatoma infestans*, *T. sordida* y *Panstrongylus megistus*, todas estas bacterias que se encuentran como simbiontes en este grupo de insectos artrópodos, le suplen nutrientes, amino ácidos, vitaminas y ácidos nucleicos que éstos no pueden adquirir de su dieta (Baines, 1956)

Rhodococcus no se transmite genéticamente a su progenie sino por coprofagia (Baines, 1956) y la función de la bacteria, específicamente el *R rhodnii*, es suplir al triatomino las vitaminas que éste no puede tomar de la sangre del mamífero al que pica, y hasta ahora las que se han identificado por diversos ensayos de laboratorio están la tiamina, piridoxina, pantotenato de calcio y nicotidamina (Baines, 1956; Beard et al., 1998).

R rhodnii reside extracelularmente en el intestino del *Rhodnius* en cercana proximidad al *T cruzi*, (Durvasula et al., 1997) es por esto que los estudios realizados con este simbionte se fundamentan en tratar de llevar algunos genes de interés para que afecte al *Trypanosoma*.

a.2 Bacterias corineriformes

En *Triatoma dimidiata* se han encontrado otros simbiontes que han sido menos estudiados, pero que son otro tipo de bacterias corineriformes entre las cuales se menciona a *Gordonia rubropertinctus* y a *Gordonia terrae* (Beard et al., 2002)

Con la mosca Tse Tse transmisor de la tripanosomiasis africana, también se han realizado estos estudios pero la flora normal microbiana de ésta difiere de la de los insectos transmisores de la Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas. En la mosca Tse Tse se han encontrado dos microorganismos muy relacionados a *Escherichia coli* en el

intestino de la mosca; y se transmiten vía materna a la progenie (Aksoy et al., 2001) Entre estas tenemos a *Wigglesworthia*, que se encuentra en células epiteliales especializadas llamadas bacteriocitos, y *Sodalis* que vive intra y extracelular y se encuentra en el intestino medio, músculo, grasa, hemolinfa, glándulas salivares, y otras glándulas (Aksoy, 1995; Grijalva y Giraldo, 2006)

6. Diagnóstico de *Wolbachia*.

La *Wolbachia* puede ser diagnosticada recurriendo a diferentes metodologías como, por ejemplo, cultivo de células en línea celular de *Aedes albopictus*, usando pruebas moleculares dirigidas a identificar diferentes genes como el *wsp*, 16S ADNr, *fts*, mediante la técnica de PCR. La microscopía electrónica con marcadores fluorescentes también puede ser utilizada, y algunas pruebas de detección de anticuerpos anti IgG de *Wolbachia* que han sido utilizados para verificar si existen anticuerpos en las personas con filariasis. La *Wolbachia* es una bacteria intracelular obligatoria y esto la convierte en un microorganismo difícil de cultivar en medios con bajos requerimientos nutricionales. El cultivo en medios celulares es lo que se recomienda, y para su detección se pueden utilizar diferentes técnicas tales como: diagnóstico molecular, observación microscópica y diagnóstico microscópico.

Otras técnicas usadas en la búsqueda e identificación de estos endosimbiontes son los isótopos, metagenómica, fingerprinting, que ofrecen la oportunidad de estudiar la

filogenética y la diversidad funcional de la comunidad de microorganismos que son complejos y difíciles de cultivar (Tyson et al., 2004; Dumont and Murrell, 2005)

a. Diagnóstico molecular.

Afortunadamente existen numerosas técnicas diagnósticas publicadas que son muy útiles para la detección de bacterias cultivadas en líneas celulares. Si no se tiene idea de cual es la bacteria se pueden utilizar cebadores universales para el grupo de eubacterias (Chen et al., 1996) o si se conoce la bacteria o se tiene sospecha de su presencia entonces recurrir a cebadores específicos. La técnica de PCR es muy efectiva para la detección temprana del microorganismo en el cultivo cuando el número de estos es bajo y son difíciles de detectar en el cultivo por otros métodos. El PCR también tiene una desventaja al utilizarlo para detectar simbioses en cultivos celulares, porque no se puede distinguir si el ADN detectado es del simbiote vivo (que haya crecido en el cultivo) o si pertenece al inóculo inicial de simbioses.

b. Detección microscópica no específica

La microscopía es útil cuando el simbiote produce efecto citopático visible, y se puede detectar y caracterizar la morfología de los microorganismos en asociación con la línea celular, pero no se puede usar para detectar viabilidad del microorganismo. Para visualizar los efectos se utilizan técnicas de tinción como la de Jiménez, tinciones fluorescentes específicas para ácidos nucleicos (ej. propidium de yodo, 4'6'-diamidino-

2-fenilindol- DAPI), microscopía electrónica de transmisión, y microscopía electrónica de barrido.

c. Detección microscópica específica.

Anticuerpos monoclonales específicos para la proteína WSP, producidos en *E. coli*, ha sido exitoso para la detección e identificación de *Wolbachia* (Zabalou et al., 2004), pero esta metodología no ha sido aplicada a otros simbioses.

La hibridación in situ (Amann et al., 1990) utiliza datos secuenciados para generar sondas para la detección de células individuales o en grupos que tienen la misma secuencia de nucleótidos. Como el blanco para la sonda específica es ARNr, la hibridación in situ provee información sobre la viabilidad de la célula (Zarda et al., 1991)

La hibridación fluorescente in situ (FISH) ha sido utilizada ampliamente para describir los simbioses de insectos, el tropismo tisular y morfologías (Fukatsu et al., 1998; Darby et al., 2001; Moran et al., 2005) y demostrar el éxito de los cultivos de simbioses (Darby et al., 2005)

7. Control biológico de vectores.

Aplicando los simbioses al mundo moderno y conociendo todos los efectos que pueden producir en sus diferentes hospederos, estos pueden ser utilizados en medicina, agricultura y veterinaria.

Existen algunos simbioses que pueden enfermar a su hospedero causándoles la muerte, o disminuyendo su número en una localidad determinada, o expresando genes que evitan

que se propague una enfermedad específica. Aquellos que le causan daño al hospedero sin causarle daño al medio ambiente se consideran candidatos para control biológico de vectores. Ejemplo de este tipo de microorganismo tenemos a *Bacillus thuringiensis*, que se utiliza mundialmente por su acción entomopatógena producida por unas proteínas cristalinas que lesionan el intestino de sus hospederos, con lo cual se produce un desbalance iónico que suele ser mortal (Gill et al. 1992)

En la actualidad existe una resistencia en el uso de pesticidas por los numerosos problemas de salud que esto conlleva. Es por eso que se están implementando nuevas alternativas entre las cuales podemos mencionar, la técnica del insecto estéril, y la de incompatibilidad citoplasmática.

a. Técnica del insecto estéril (TIE)

Esta técnica se basa en la inducción de mutaciones letales dominantes en la célula germinal del insecto que luego va a ser liberado en una población de insectos en particular de campo específico (Dyck et al., 2005) El insecto estéril se puede obtener por radiación o quimioesterilizantes. (Breeland et al., 1974) La TIE, está en etapa experimental, pero se tienen buenas expectativas al respecto, tanto para el control de vectores de enfermedades infecciosas como para pestes que afectan la agricultura. Actualmente, se están liberando en Panamá el gusano barrenador (*Cochliomyia hominivorax*) estéril para prevenir la reinvasión de esta peste de Sur América (Matlock, 2005)

b. Técnica de Incompatibilidad citoplasmática (TIC)

La disminución de la fertilidad en una población y por lo tanto el potencial reproductivo, puede llegar a reducir el número de vectores en una población. Cuando se perturba la fertilidad de una población, se entiende mejor la dinámica de la misma en el campo (Weidhaas et al., 1972)

La IC puede ser unidireccional o bidireccional y resulta en la mortalidad de los embriones, y cruces entre insectos con diferente estatus de infección por *Wolbachia*. La infección por *Wolbachia* puede diseminarse y persistir en la naturaleza reemplazando poblaciones de no infectados porque las hembras infectadas pueden aparearse con machos infectados y no infectados, mientras que las hembras no infectadas sólo pueden aparearse con machos no infectados (Turelli and Hoffmann, 1991) La distribución de IC dentro de la filogenia general de *Wolbachia* sugiere que IC es una propiedad ancestral de *Wolbachia* (Werren and Jaenike, 1995; Zhou et al., 1998).

El primer ensayo piloto utilizando la técnica del Insecto Incompatible (TII), fue realizada en 1960 para controlar al vector de filariasis *Culex pipiens* (Laven, 1967) La TII también se ha probado contra pestes agrícolas, como la polilla de la almendra *Cadra (Ephestia) cautella* (Brower, 1979)

Existen varios factores que han sido identificados y que pueden afectar la expresión de la IC en el huésped, estos incluyen: edad del macho, temperatura, historial de apareamiento, competencia espermática, otros factores, como la presencia de antibióticos,

especialmente tetraciclinas, niveles de nutrición y la reducción en los niveles de expresión de incompatibilidad citoplasmática. (Clancy and Hoffmann, 1998)

7.1. Control de triatominos utilizando *Rhodococcus rhodni*

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es causada por un parásito llamado *T. cruzi* y es transmitido a los humanos a través de la picada de un insecto de la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*, frecuentemente llamado reduvido, triatomino o chinche besucón (Beard et al., 2002)

En este campo se ha trabajado aislando *Rhodococcus* del intestino de *Rhodnius*, luego se le ha incorporado un gen específico que codifica para la secreción de L-cecropina A que es un péptido residual compuesto por 37 amino ácidos más una Glicina que le proporciona un carbono terminal la cual precede a una amida, este péptido ya estudiado es un eficiente formador de poro y se aísla de hemolinfa de varios insectos y de animales vertebrados (Durvasula et al., 1997) Basado en estos estudios se han producido colonias de *Rhodnius* paratransgénicos con las modificaciones hechas al genoma del *Rhodococcus* para que exprese el gen para la secreción de L-cecropina A, y se han encontrado resultados sorprendentes ya que este péptido formador de poro tiene una alta actividad lítica contra el *T. cruzi* y no tiene efectos letales para el tejido del *Rhodnius*. Consecuentemente, estos resultados sugieren que la cecropina A podría ser usada potencialmente como un péptido antitripanosoma puede ser expresado en un sistema paratransgénico (Beard et al., 2002). Se probó la resistencia del *Rhodnius* infectado con el *Rhodococcus* modificado genéticamente para adquirir la infección por *T. cruzi*, el 70% de los *Rhodnius* probados no adquirieron la infección (Beard et al., 1998) Esta información

de insectos paratransgénicos como pesticidas microbianos ha sido probada en laboratorios y ha funcionado muy bien, pero la aplicación de la misma está muy lejos de ser aplicada ya que falta mucho por estudiar acerca de las repercusiones que éstos microorganismos modificados genéticamente puedan tener para el ambiente y para los seres humanos. En la práctica es bastante difícil transmitir en masa e este microorganismo modificado ya que la vía de transmisión e infestación sería la vía oral. Existen varias propuestas que han sido probadas pero no se han obtenido buenos resultados porque si ya existe el *Rhodococcus* no modificado dentro de una población silvestre de *Rhodnius*, se mezclan las dos y sobrevive una; no hay pruebas de que siempre la que sobreviva sea la cepa modificada ya que depende mucho de la dosis infectante.

7.2. Uso de *Wolbachia* en otros vectores

Inoculación de cepa de *Wolbachia* wAlbB, que es natural de *Aedes albopictus*, y su establecimiento en *Aedes aegypti* principal vector del virus Dengue (Xi et al., 2005) Se demostró la habilidad de *Wolbachia* para diseminarse en *A. aegypti*, experimento importante en las estrategias de reemplazo de poblaciones, en donde poblaciones naturales de *A. aegypti* se reemplazan por poblaciones modificadas refractarias a la transmisión de Dengue (Xi et al., 2005)

8. *Wolbachia* y filariasis

Las filarias son parásitos del grupo de los nemátodos, el hombre se infecta a través de la picada de un mosquito, y luego que el parásito entra produce la enfermedad. La

característica sobresaliente de estos nemátodos es la simbiosis mutualista que tienen con la bacteria *Wolbachia*. Esta relación simbiótica ha permitido que se enfoque el tratamiento de una manera diferente utilizando como blanco del tratamiento la bacteria endosimbionte que posee el parásito.

La *Wolbachia* en el nemátodo adulto está localizada en las células hipodérmicas de los cordones laterales y en las hembras está en los ovarios, oocistos y en los embriones en estado de desarrollo dentro del útero. La bacteria no se ha encontrado en el aparato reproductor del macho. Esto sugiere que la bacteria se transmite verticalmente a través del citoplasma del huevo y no a través del espermatozoide (Kozek, 1977; Taylor et al., 1999) La bacteria expresa un crecimiento dinámico de su población en diferentes estadios del ciclo de vida de la filaria.

Mientras el número de bacterias permanece constante en las microfilarias y en los estadios presentes en el mosquito (L2 y L3), en la primera semana de infección en el mamífero, el número de bacterias aumenta dramáticamente y el ratio ADN bacteriano/ADN del nemátodo es el más alto en todo el ciclo de vida. La rápida multiplicación continúa hasta el estadio L4, lo que hace que el principal período donde se encuentra el número más alto de bacterias sea el primer mes de la infección en el huésped definitivo. En las hembras, el número de bacterias aumenta a medida que el nematodo madura y mientras el ovario y los estadios larvales se infectan (McGarry et al., 2004)

Se ha evidenciado la dependencia de *Wolbachia* en este grupo de nemátodos utilizando tetraciclina que es un antibiótico activo contra las rickettsias. Este antibiótico produce efectos marcados en las filarias que tienen *Wolbachia*, y sin efectos en las filarias que no

están infectadas como por ejemplo *Acanthocheilonema viteae* (Hoerauf et al., 1999; McCall et al., 1999) Los efectos van desde una esterilización permanente de la hembra adulta (Hoerauf et al., 2000) hasta la letalidad del gusano adulto seguido de un tratamiento sostenido (Langworthy et al., 2000; Taylor et al., 2005) Estas observaciones implican que la bacteria provee distintos factores, aún no identificados, que son esenciales para la embriogénesis de las filarias y la viabilidad del gusano adulto. Se cree que la *Wolbachia* aislada de *Brugia malayi* (*wBm*) provee cofactores esenciales como heme y riboflavina a su huésped filárico *Brugia malayi* (Foster et al., 2005)

Recientes ensayos en humanos con doxiciclina evidencia esterilización a largo plazo de *O. volvulus* y efectos microfilaricidas contra *W. bancrofti* (Hoerauf et al., 2001; Hoerauf et al., 2003; Taylor et al., 2005), usando un tratamiento de 6 a 8 semanas con doxiciclina. El tratamiento con doxiciclina por períodos de tiempo relativamente largos reduce la transmisión del nemátodo y elimina los estadios patogénicos de la oncocercosis (microfilarias) y de la filariasis linfática (adultos). La doxiciclina no se recomienda para niños menores de 9 años y para mujeres embarazadas o que amamantan, por eso existe la necesidad de identificar otros antibióticos efectivos contra *Wolbachia*.

CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

1. Área de estudio

Estudiamos triatominos procedentes del Insectario del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES), mantenidos en colonias y clasificados según región geográfica y según generación a la cual pertenecen; al igual que del Centro de Investigaciones Parasitarias de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá (CIDEP), además de triatominos obtenidos en colectas de campo de las regiones en donde la enfermedad del Chagas prevalece (regiones de Panamá Este). Para realizar el estudio nos entrenamos en el STRI que nos enseñó la técnica y nos proporcionaron la secuencia de cebadores que están utilizando ellos en su búsqueda de *Wolbachia* e nivel mundial.

2. Tipo de estudio

El estudio fue descriptivo.

3. Universo de estudio, selección y tamaño de muestra, unidad de análisis y observación. Criterios de inclusión y exclusión.

Utilizamos 73 Triatominos obtenidos de la siguiente manera:

- 30 Triatominos del Insectario del Instituto ICGES
- 18 Triatominos del CIDEP
- 25 Triatominos de colecta de campo en diferentes regiones del país, obteniéndose dos especies *Rhodnius pallescens* y *Panstrongylus geniculatus*

Las especies de colonia analizadas fueron *R pallescens*, *R prolixus*, *R nasutus*, *R pictipes*, *T. dimidiata* y *P. geniculatus*

A todos los triatominos se les realizó disección para extraerle los órganos a analizar.

a. Criterios de Inclusión y Exclusión.

Los triatominos utilizados en este estudio fueron adultos o ninfas de 5º estadio, se preservaron vivos y luego se congelaron hasta el momento de la disección.

Aquellos triatominos que se recibieron muertos o en condiciones desfavorables, fueron descartados del estudio. También se descartó un triatomo de la especie *T dimidiata*

4. Procesamiento de las Muestras.

a. Materiales

Para realizar la investigación utilizamos los siguientes materiales:

- pinzas entomológicas de disección
- estereoscopio
- etanol al 95%
- mechero de alcohol o incinerador bacteriológico
- agua destilada estéril
- tubos ependorf de 0.2ml, 0.5ml, 1.5ml
- papel parafilm
- kit de extracción de **Qiagen** (DNeasy Tissue cat. No. 69506, California, USA)

- agarosa de grado molecular
- Taq polimerasa (Biotaq DNA Polymerasa cat No. BIO-21040, de Bioline)
- DNTP's 25mM de Biotool
- TBE 1x
- Cebadores específicos (thermo electron corporation) para 28S ADNr (28sF3633 5'TAC CGT GAG GGA AAG TTG AAA y 28sR4076 5'AGA CTC CTT GGT CCG TGT TT)
- Cebadores específicos (thermo electron corporation) para 16S ADNr para *Wolbachia* (WspecF 5'CAT ACC TAT TCG AAG GGA TAG y WspecR 5'AGC TTC GAG TGA AAC CAA TTC)
- Cebadores específicos (thermo electron corporation) *Wolbachia* wsp (wsp81F 5'TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC y wsp691R 5'AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA)
- Cebadores específicos (thermo electron corporation) *Trypanosoma rangeli* TrF3 5'CCC CAT ACA AAA CAC CCT T y TrF8 5'TGG AAT GAC GGT GCG GCG AC (Chiurillo et al., 2003)

b. Colecta de Triatominos de Campo.

La colecta fue realizada en la comunidad de Viento Fronto de Chilibre y de las comunidades de Loma del Río y Santa Clara de Arraiján por personal idóneo para esta tarea. El procedimiento realizado consistió en cortar palmas reales para obtener los

ejemplares. Todos los triatominos colectados fueron revisados por la Magíster Argentina Ying (Entomóloga) quien confirmó las especies.



Figura No. 4: Colecta de triatominos en la comunidad de Viento Fronto de Chilibre



Figura No. 5: Participación de la comunidad de Viento Fronto en la colecta de Triatominos.

c. Disección de Triatominos

1. Preparamos todo el material necesario para la disección. Los triatominos deben estar congelados y permanecer fríos durante todo el proceso.
2. Se encendió el mechero
3. Se colocó hielo en un recipiente sobre la base del estereoscopio
4. Se puso un cuadrado de parafilm 60 x 60cm sobre el pad para luego colocar el triatomo a disecar
5. El triatomo congelado se colocó sobre el dorso, y se le agregó un poquito de agua para hacer más cómodo el procedimiento

6. Las pinzas se esterilizaron con el calor del mechero y luego se enfriaron con agua destilada estéril.
7. Se separó el tórax del cuerpo con las pinzas, y se extrajeron las glándulas salivares que se colocaron en un tubo ependorf de 0.5ml, al cual se le agregó 1 gota de etanol al 95%
8. Se identificaron el tubo digestivo, ovarios o testículos y se procedió de igual forma que en el punto 7
9. Una vez se que se extrajeron los órganos, guardamos el resto del triatomino en un tubo ependorf de 1.0ml y se llenó de etanol al 95% para estudios posteriores.
10. Los tubos de cada triatomino se rotularon con la misma serie de números y cada órgano se guardó en un tubo diferente.
11. Una vez terminado el proceso se esterilizaron las pinzas en el mechero nuevamente y se sumerjieron en etanol al 70% para continuar con el siguiente triatomino.
12. Se limpió el área y se guardaron los instrumentos de trabajo limpios.



Figura No. 6: Preparación del área de trabajo para iniciar las disecciones.



Figura No. 7: Selección de los triatominos adultos para la disección



Figura No. 8: Separación del torax (paso No. 7 de la disección de triatominos)



Figura No. 9: Identificación de los diferentes órganos de los triatominos.

d. Verificación de la infestación con Trypanosomas

Los triatominos de campo, se transportaron vivos al laboratorio, se les presionó la parte posterior del cuerpo para que defecaran y se tomó una muestra en un portaobjetos, luego de colocarle un cubreobjeto se observó la muestra al microscopio para verificar la presencia de parásitos en las heces. Aquellos triatominos que no se les observó microscópicamente la infección por tripanosomas se les hizo detección de *T. cruzi* mediante PCR. Estos triatominos a los que se les hizo detección de *T. cruzi* por PCR, fueron utilizados en el estudio *DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN PCR DUPLEX PARA LA DETECCIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE Trypanosoma cruzi y Trypanosoma rangeli EN TRIATOMINOS Y MUESTRAS CLÍNICAS PROCEDENTES DE LA COMUNIDAD VIENTO FRONTO CHILIBRE Panamá - 2006*. En este estudio los autores utilizaron los cebadores específicos para *T. cruzi* F3CRU3 5'-cgacgttcagegaatgaatc-3' y B3CRU3 5'-cctccgtagaagtggtagct-3' (Rodríguez y Rivas 2007). Los resultados de este estudio son datos aún no publicados, pero fueron presentados como tesis para obtener el título de Licenciatura en Tecnología Médica en la Universidad de Panamá, en febrero de 2007.

e.Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se siguieron las instrucciones específicas indicadas en el inserto del reactivo de extracción QIAGEN DNeasy tissue kit, cat. No. 69506, CA, USA.

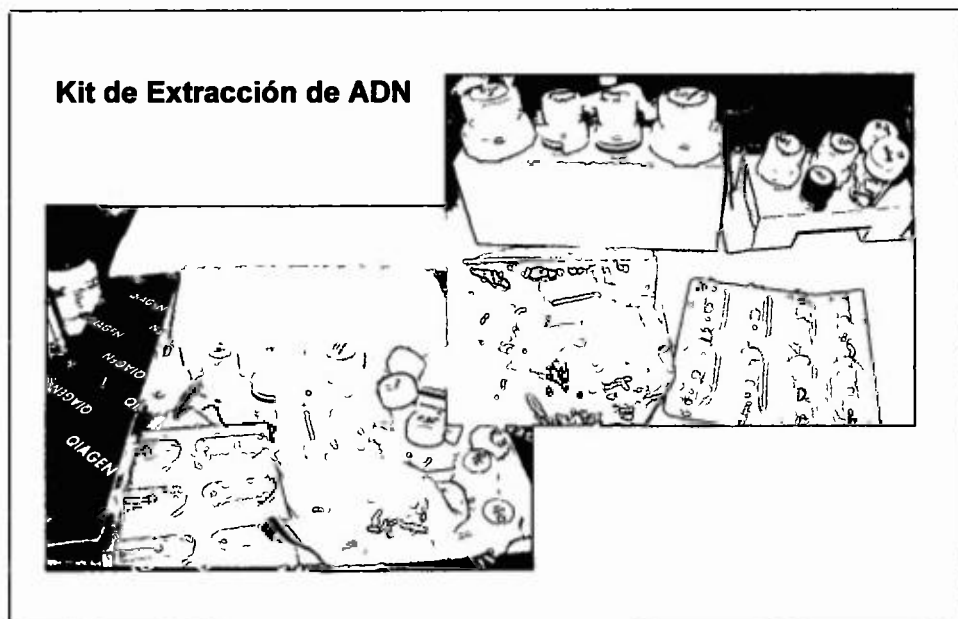


Figura No. 10: Kit de extracción de ADN utilizado.

f. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

La técnica de PCR se realizó en un Termociclador (Techgene, Techne, Cambridge, UK)

(Figura No. 11)

Los cebadores utilizados fueron referidos por el Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales y adquiridos en Thermo Electron Corporation.

Para realizar la PCR, se utilizó un volumen total de 10ul para la reacción, que guarda las siguientes relaciones:

Cantidades utilizadas por muestra para los PCR de 16S ADN_r, *wsp*, y 28S ADN_r.

Reactivo	Cantidad utilizada
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂) 50mM	0.5ul
Buffer de PCR 10x	1ul
DNTP's	0.08ul
Primer forward 10mM	0.5ul
Primer Reverse 10mM	0.5ul
DMSO 5%	0.4ul
H ₂ O grado molecular	Resto para completar 10ul
Taq Polimerasa	0.1ul

Para la reacción se utilizó 1ul del ADN de la muestra más 9ul de la mezcla preparada.

Una vez preparada la muestra se llevaban al termociclador y se iniciaba el proceso detallado a continuación.

Para la PCR del 28s D2 se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación:

- Desnaturalización a 94°C por 2 minutos,
- seguido de 38 ciclos de 30 segundos cada uno a 94°C,
- anidamiento a 58°C por 50 segundos,
- un período de extensión de 1 minuto y medio a 72°C
- luego una extensión final a 72°C por 10 minutos
- con una finalización mantenida a 4°C.

Para la PCR del **16S ADNr Wspec** se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación:

- Desnaturalización a 94°C por 2 minutos
- seguido de 38 ciclos de 30 segundos cada uno a 94°C
- anidamiento a 55°C por 45 segundos
- un período de extensión de 1 minuto y medio a 72°C
- luego una extensión final a 72°C por 10 minutos
- con una finalización mantenida a 4°C

Para la PCR de *Wolbachia wsp* se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación:

- Desnaturalización a 94°C por 2 minutos
- seguido de 38 ciclos de 1 minuto cada uno a 94°C
- anidamiento a 55°C por 1 minuto
- un período de extensión de 1 minuto a 72°C
- una extensión final a 72°C por 10 minutos
- con una finalización mantenida a 4°C

Cantidades utilizadas para PCR de *Trypanosoma rangeli*, para un volumen final de 10ul por reacción.

Reactivo	Cantidad utilizada
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂) 50mM	0.6ul
Buffer de PCR 10x	1ul
DNTP's	0.08ul
Primer forward 10mM	0.4ul

Primer Reverse 10mM	0.4ul
H2O grado molecular	Resto para completar 10ul
Taq Polimerasa	0.2ul

Para la PCR de *T. rangeli* se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación:

- Desnaturalización a 94°C por 4 minutos
- seguido de 35 ciclos de 1 minuto cada uno a 94°C
- anidamiento a 55°C por 30 segundos
- un período de extensión de 40 segundos a 72°C
- una segunda incubación de 1 minuto a 55°C
- extensión final por 10 minutos a 72°C,
- temperatura de finalización de 4°C.



Figura No. 11: Termociclador

Corrida Electroforética en gel de Agarosa.

Para visualizar los resultados de las amplificaciones se preparaba un gel de agarosa al 2% con TBE 1x, y se le agregaba 2ul de Bromuro de etidio, luego se vertía sobre el plato de la cámara de electroforesis con un peine de 10 hoyos colocado previamente y se esperaba su solidificación, por lo menos 30 minutos, para luego llevarlo a la cámara y colocarlo dentro con el buffer TBE 1x, y una vez que estuviese totalmente cubierta se empezaban a cargar las muestras en los pozos.

g. Cargado de las muestras en el gel de agarosa.

Para cargar las muestras, se utilizó naranja de acridina 2X, se colocaba 1ul dentro del tubo ependorf con la muestra ya amplificada, se mezclaba bien y se colocaban 10ul en los pocillos del gel. Luego se cerraba bien la cámara y se programaba para correr por 40 minutos a 100 voltios, utilizando una fuente de poder LKB 2303 Multidrive XL (Laboratory Equipment Bought, USA) (Figura No.12)

Para todas las corridas se cargaba, un control negativo (ADN negativo para *Wolbachia*), un control positivo (ADN positivo por *Wolbachia*, y para 28s) y un control de master mix (que es master mix sólo), también se corría un marcador de peso molecular para comparar el tamaño de la banda obtenida.



Figura No. 12: Fuente de Poder LKB.

h. Criterios utilizados para la Interpretación de los resultados obtenidos en los PCR realizados.

Para la interpretación de los resultados se utilizó un marcador de peso molecular de 1000 pares de base. El tamaño obtenido en el PCR para 28S ADNr fue de 443pb, para el 16S ADNr fue de 438pb, para el *wsp* fue de 500pb y para *T. rangeli* fue de 170pb. Para considerar un resultado positivo para *Wolbachia* se tomaron en cuenta estos criterios:

Si el PCR es positivo para Wspec (16S ADNr) y positivo para 28s D2, se considera positivo para *Wolbachia*

Si es positivo para Wspec (16S ADNr) y negativo para 28s D2, se considera positivo para *Wolbachia*

Si es negativo para Wspec (16S ADNr) y positivo para 28s D2, se considera negativo para *Wolbachia*

Si es negativo para Wspec (16S ADNr) y negativo para 28s D2, se debe variar la concentración de ADN (2-5 veces por encima o por debajo de la concentración inicial utilizada) si continúa negativo para ambos se debe descartar la muestra.

Si probando diferentes concentraciones del ADN aparece negativo para Wspec (16S ADNr) y positivo para 28s D2, se debe hacer una PCR para el gen *wsp*, y si este sale positivo, se considera positivo para *Wolbachia*.

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Resultados.

Los resultados de la investigación se basaron en los datos obtenidos de los diferentes PCR realizados. A todas las muestras se le realizó la detección por PCR del gen 28S ADN_r para comprobar que el tejido a utilizar estuviera en condiciones favorables. Una vez se realizara el primer PCR (28s) se continuó con los siguientes. Todos los datos obtenidos a lo largo de la investigación eran tabulados en una base de datos. (Anexo No. 1 y 2)

En las siguientes figuras se muestran los PCR realizados con los diferentes cebadores.

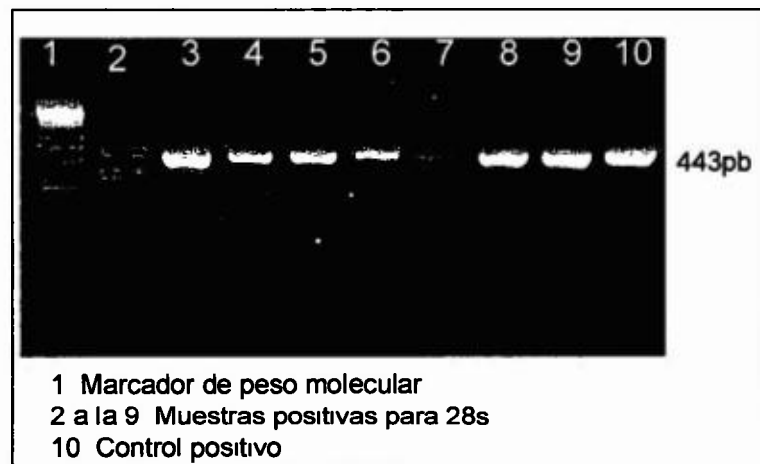


Figura No. 13: Resultados de PCR para 28S.

En la Figura No.13 y 15 el tamaño de la banda obtenida en este PCR es de 443pb. El 100% de los tejidos a utilizar en la investigación resultaron positivos para el gen 28s ADNr. Esta detección se hizo en triatominos de campo y de colonia, y en cada órgano que se iba a utilizar en el estudio (gónadas, glándulas salivares e intestinos).

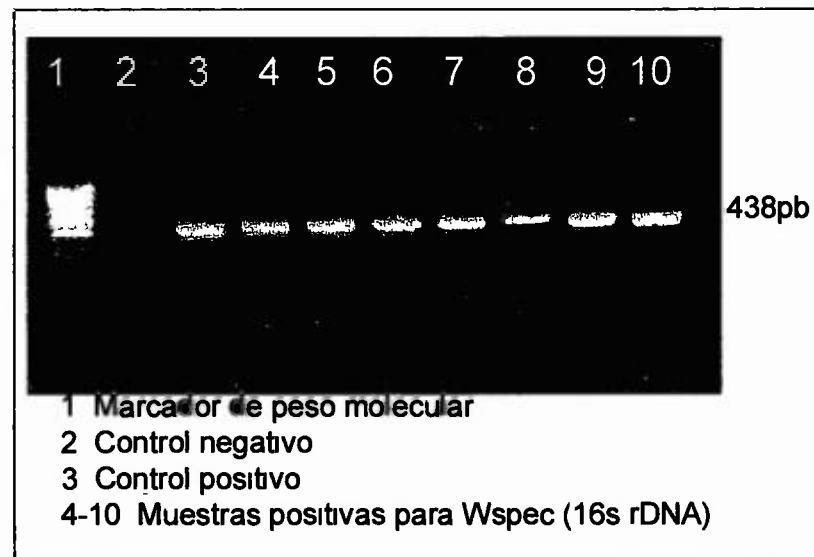


Figura No. 14: Resultados de PCR para 16s rDNA.

Luego de realizar el PCR para el gen 28s, se inició con la detección de *Wolbachia* utilizando el primer par de cebadores para el gen 16s rDNA. (Ver figura No. 14 y 15) El tamaño de la banda obtenida en los PCR realizados para detectar el gen 16S ADNr es de 438pb.

A todos los triatominos de campo y de colonia se les realizó esta prueba como primera alternativa. El número de muestras positivas utilizando esta técnica fue 47 de un total de 73, obteniendo así un 64.38%, de los cuales 21 (44.68%) ejemplares fueron machos y 25

(53.19%) ejemplares hembras. El 100% de los triatominos de campo y el 45.83% de los de colonia resultaron positivos para el gen 16S ADNr.

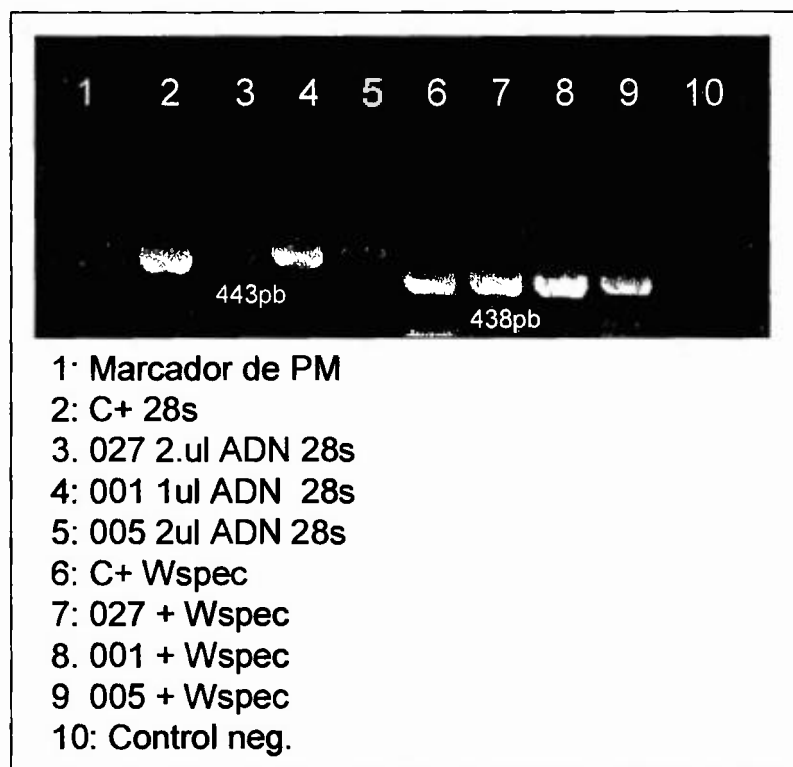


Figura No. 15: Corrida de PCR para 28S ADNr y 16S ADNr.

En la figura No. 15 se muestra la diferencia en el tamaño de las bandas para ambos PCR 28s y 16s rDNA.

Una vez obtenidos los resultados de estos dos PCR se utilizaba otro par de cebadores para confirmar todos aquellos resultados negativos en la detección del gen 16S ADNr. La prueba confirmatoria que se realizó consiste en detectar el gen que codifica para la proteína WSP de *Wolbachia* y el tamaño de la banda obtenida es de 500pb como se muestra en la Figura No. 16. De los PCR realizados para confirmar los resultados negativos por 16S ADNr, se obtuvieron 3 muestras positivas por wsp.

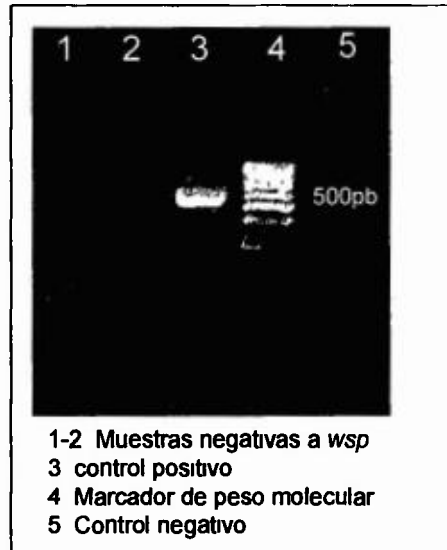


Figura No. 16: Corrida de PCR para *wsp*

Además de la detección de *Wolbachia*, se realizó la detección de *T cruzi* y *T rangeli*. La detección de *T cruzi* se realizó mediante PCR (Rodríguez y Rivas, 2007) y mediante técnica de microscopía directa. Para la detección de *T rangeli* se utilizaron cebadores específicos para la región subtelomérica del parásito, y como muestra se utilizaron glándulas salivares de los triatominos colectados en el campo. El 24 % de los triatominos de campo resultaron positivos para *T rangeli* y el 52% resultó positivos para *T cruzi*. El tamaño de la banda obtenida para la detección de *T rangeli*, con estos cebadores es de 170pb como se muestra en la Figura No. 17.

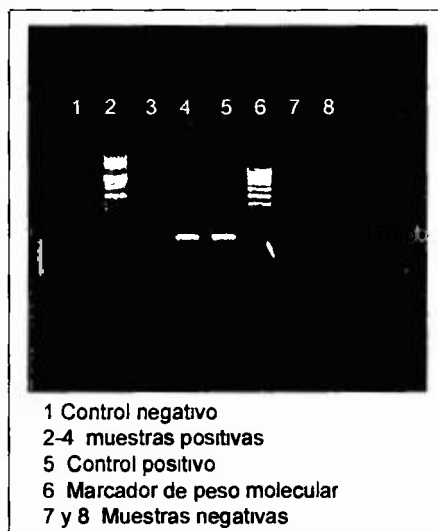


Figura No. 17: Corrida de PCR para *Trypanosoma rangeli*.

Una vez obtenidos los datos mediante todas las técnicas descritas arriba, se tabularon y se obtuvieron los siguientes resultados para triatomino de colonias y de campo.

a. Resultados obtenidos de triatomino de colonias.

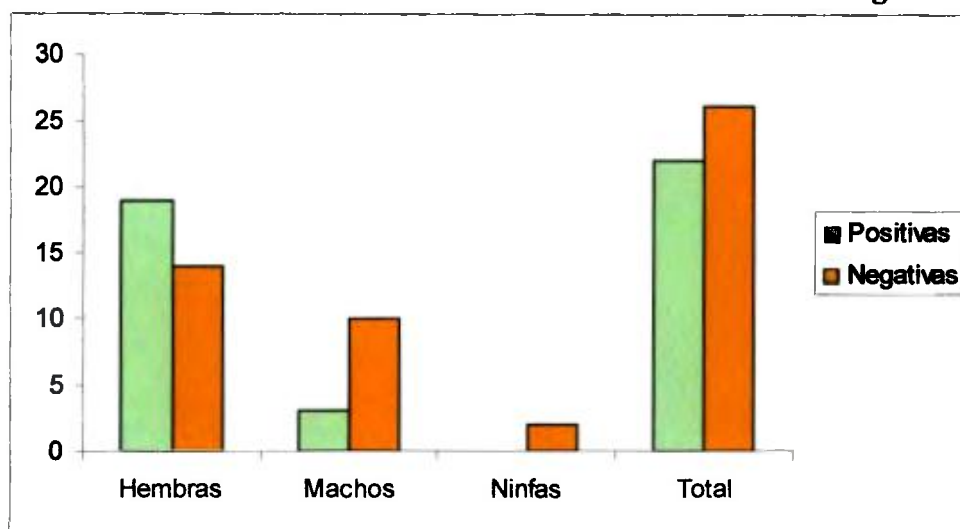
Cuadro No. 3: *Wolbachia* en triatomino de colonia según sexo

Sexo	Positivas	Total	%
Hembras	19	33	57.58
Machos	3	13	23.08
Ninfas	0	2	0.00
Total	22	48	45.83

Fuente. Detección de *Wolbachia* en triatomino mediante PCR.

En el cuadro No. 3 y la Gráfica No 1, observamos que en la población estudiada predominaron las hembras y que el 57.58% del total de hembras estudiadas resultaron positivas por *Wolbachia*. En el caso de la población de machos, el 23.08% resultaron positivos.

Gráfica No. 1: Distribución de *Wolbachia* en triatominos de colonia según sexo.

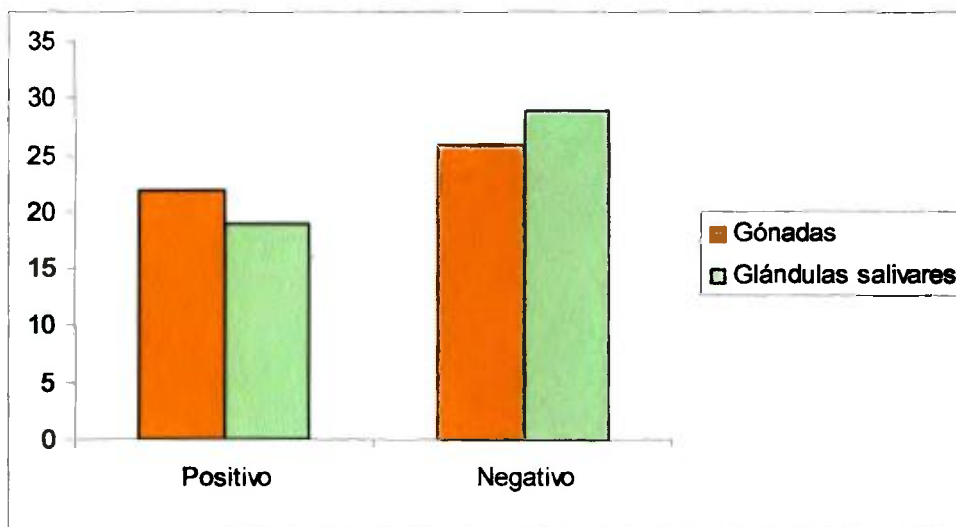


Fuente: Detección de *Wolbachia* en triatominos mediante PCR.

A todos los triatominos se les realizó PCR para la detección de *Wolbachia* en gónadas y glándulas salivares y como se obtuvieron resultados positivos en ambos órganos se tomó la decisión de intentar con los intestinos de aquellos que sabíamos que estaban positivos en gónadas.

Como se muestra en la gráfica No. 2, en ambos órganos representados se obtuvieron resultados positivos lo que representa el 45.83% en gónadas y el 39.58% en glándulas salivares. De 22 ejemplares con gónadas positivas que se obtuvieron, se hizo PCR para detectar *Wolbachia* en intestinos de estos mismos y se obtuvieron 18 muestras positivas lo que representa el 37.5% del total de ejemplares de colonias utilizados y el 81.8% del total de muestras con gónadas positivas por *Wolbachia*.

Gráfica No. 2: Resultados de *Wolbachia* obtenidos en diferentes órganos de triatominos de colonias



Fuente: Detección de *Wolbachia* en triatominos mediante PCR.

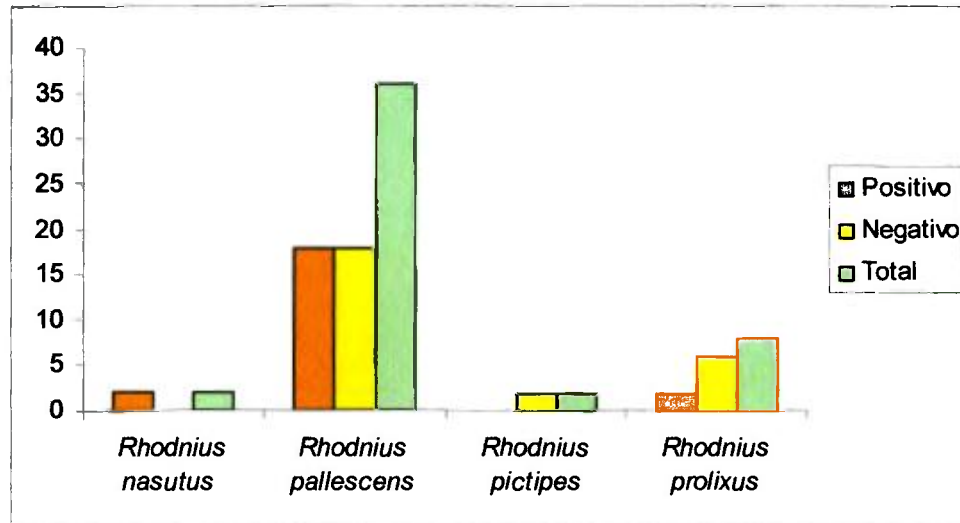
La especie de triatomo que más nos interesa estudiar es *Rhodnius pallescens*, por ser el principal vector de la enfermedad de Chagas en Panamá, pero sin embargo se utilizaron triatomos de otras especies disponibles para ampliar el estudio y conocer el estado de la infección de *Wolbachia* en estos. (Ver cuadro No. 4 y Gráfica No. 3)

Cuadro No. 4: Distribución según sexo de las diferentes especies de triatomos de colonia utilizadas en el estudio.

Sexo	Especies				TOTAL
	<i>Rhodnius nasutus</i>	<i>Rhodnius pallescens</i>	<i>Rhodnius pictipes</i>	<i>Rhodnius prolixus</i>	
Hembras	1	25	2	5	33
Machos	1	9	0	3	13
Ninfas	0	2	0	0	2
TOTAL	2	36	2	8	48

Fuente: Detección de *Wolbachia* en triatomos mediante PCR.

Gráfica No. 3: Resultados de *Wolbachia* en las diferentes especies de triatominos de colonia.



Fuente: Detección de *Wolbachia* en triatominos mediante PCR

En la gráfica No. 3 Podemos observar que las especies de *R. nasutus*, *R. pallescens* y *R. prolixus* resultaron positivas por *Wolbachia*, sin embargo en la especie de *R. pictipes* no se obtuvieron casos positivos.

La especie mayor estudiada fue *R. pallescens* con resultados que sobresalen porque obtuvimos 50% de positividad del total de ejemplares estudiados de esta especie. En el caso de *R. prolixus* se obtuvieron dos ejemplares positivos lo que corresponde al 25% de los ejemplares estudiados.

Los triatominos obtenidos de las colonias del ICGES, se les anotó la información acerca de su procedencia original y la generación a la que pertenecían. (Ver Tabla No. 5) Tabulando los datos encontramos resultados interesantes relacionados con las generaciones. (Ver tablas No.6 y 7)

Cuadro No. 5: Distribución según región de los tritominos obtenidos en la colonia del ICGES.

LOCALIDAD	Frecuencia	Positivos
Cerro Cama	4	4
Chepo	10	0
El Cigual	6	6
Metetí	4	0
Ñajú	2	0
Santa Rita	2	0
Villa Grecia	2	2
Total	30	12

Fuente Detección de *Wolbachia* en triatomos mediante PCR.

Cuadro No. 6: Triatomos del ICGES obtenidos de la colonia de El Cigual según generación.

Generación	Cantidad	Resultado de <i>Wolbachia</i>
Cuarta	1	Positivo
Quinta	3	Positivo
Sexta	2	Positivo

Fuente Detección de *Wolbachia* en triatomos mediante PCR.

Cuadro No. 7: Triatomos del ICGES obtenidos de la colonia de Cerro Cama según generación.

Generación	Cantidad	Resultado de <i>Wolbachia</i>
Tercera	2	Positivo
Quinta	2	Positivo

Fuente: Detección de *Wolbachia* en triatomos mediante PCR.

En estas dos regiones pudimos observar que en las generaciones estudiadas se mantuvo la infección.

De las regiones de Chepo y Metetí también se lograron obtener ejemplares de diferentes generaciones pero todos resultaron negativos a la infección por *Wolbachia*. (Cuadro No. 8 y 9)

Cuadro No. 8: Triatominos del ICGES obtenidos de la colonia de Chepo según generación.

Generación	Cantidad	Resultado de <i>Wolbachia</i>
Tercera	2	Negativo
Cuarta	3	Negativo
Quinta	5	Negativo

Fuente: Detección de *Wolbachia* en triatominos mediante PCR.

Cuadro No. 9: Triatominos del ICGES obtenidos de la colonia de Metetí según generación.

Generación	Cantidad	Resultado de <i>Wolbachia</i>
Cuarta	2	Negativo
Quinta	2	Negativo

Fuente: Detección de *Wolbachia* en triatominos mediante PCR.

b. Resultados obtenidos de triatominos de campo.

En los triatominos de campo encontramos que el 100% resultó positivo para *Wolbachia*.

Brevemente detallaremos a continuación los resultados obtenidos con estos ejemplares y todos los aspectos que se evaluaron en ellos.

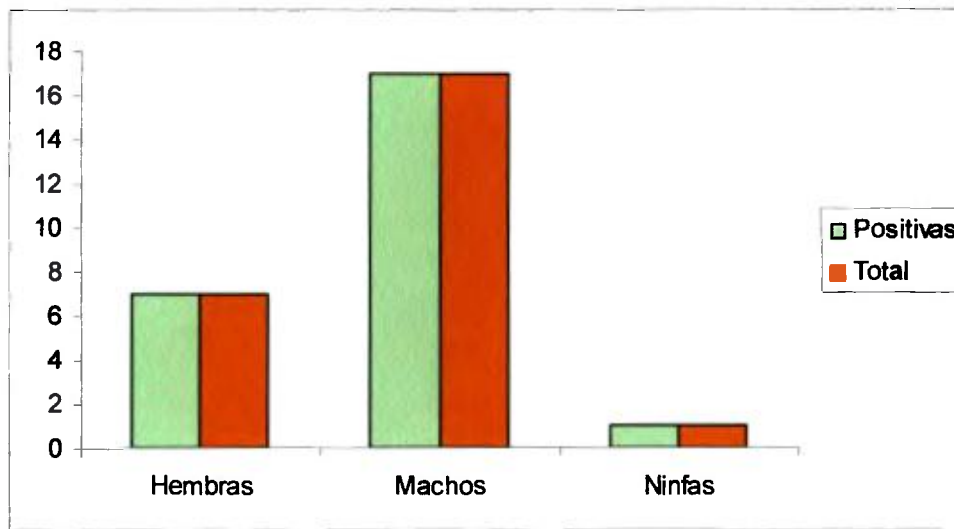
En la población de triatominos de campo estudiada predominaron los machos sobre las hembras. (Cuadro No. 10 y Gráfica No. 11)

Cuadro No. 10: *Wolbachia* en triatominos de campo según sexo.

Sexo	Positivas	Total	%
Hembras	7	7	100
Machos	17	17	100
Ninfas	1	1	100
Total	25	25	100

Fuente: Detección de *Wolbachia* en triatominos mediante PCR.

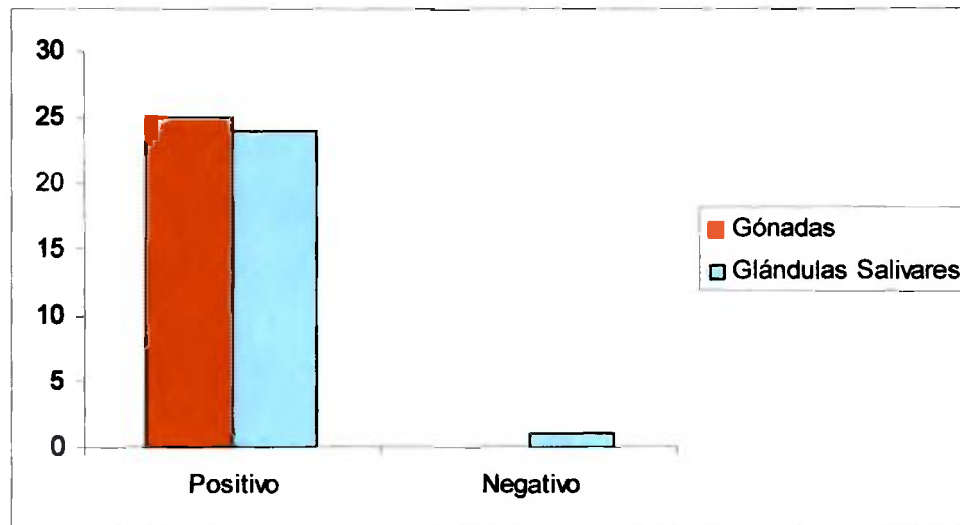
Gráfica No. 4: Distribución de *Wolbachia* en triatominos de campo según sexo.



Fuente: Detección de *Wolbachia* en triatominos mediante PCR.

En cuanto a los órganos estudiados en estos triatominos de campo encontramos que de los triatominos positivos para *Wolbachia* en gónadas el 96% dio positivo en glándulas salivares. En el caso de los triatominos de campo no se les hizo la detección en intestinos. (Gráfica No. 12)

Gráfica No. 5: Resultados de *Wolbachia* obtenidos en diferentes órganos de triatominos de campo.

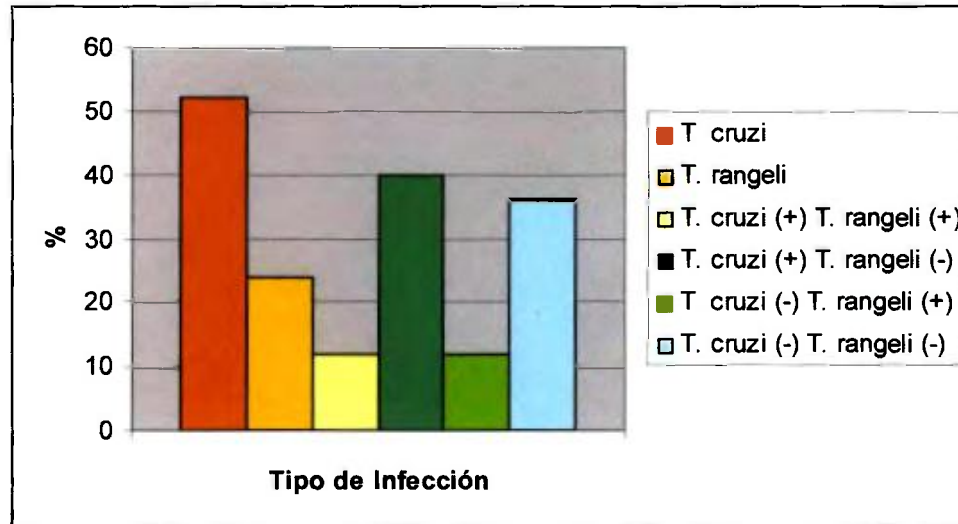


Fuente: Detección de *Wolbachia* en triatominos mediante PCR.

Para nuestro estudio era importante saber si coexistía la infección de *Wolbachia* con *T. cruzi* y/o *T. rangeli*.

Del total de triatominos de campo al 52% se le detectó infección por *T. cruzi*, el 24% infección por *T. rangeli* y un 12% tenían ambos parásitos. Un 36% de los triatominos no presentaron infección por tripanosomas pero si por *Wolbachia*. En la gráfica No. 13 se presentan los tipos de infección que pudimos detectar en este grupo.

Gráfica No. 6: Resultados de infección por *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* en triatominos de campo.



Fuente: Detección de *Wolbachia* en triatominos mediante PCR.

La especie que predominó en esta etapa de la investigación fue *R. pallescens* ya que en las colectas realizadas hubo mayor cantidad de ésta. En una de las colectas se obtuvo un triatomo de la especie *P.s geniculatus* el cual se incluyó en el estudio y resultó positivo con *Wolbachia* y con *T. cruzi*.

Con los datos obtenidos de triatominos de campo y de colonia se aplicó la prueba estadística de Chi cuadrado. Para calcularla se utilizó el programa Epi Info versión 3.2.2 para hacer la comparación válida de significancia estadística. En el análisis a continuación, utilizamos como referencia las muestras positivas de ambas procedencias según sexo. Para este análisis se utilizó un alfa (α) de 0.05 que indica 95% de confianza para dos grados de libertad. Para que el resultado fuera significativo nuestro valor de chi

cuadrado debió dar > de 5.99 y el resultado obtenido en nuestra comparación fue de 16.2130.

Cuadro No. 11: Resultados de *Wolbachia* obtenidos en triatominos de campo y de colonia según sexo.

PROCEDENCIA TRIATOMINO			
Sexo	Campo	Colonia	TOTAL
Hembra	7	19	26
% Fila	26.9	73.1	100.0
% Columna	28.0	86.4	55.3
Macho	17	3	20
% Fila	85.0	15.0	100.0
% Columna	68.0	13.6	42.6
Ninfa	1	0	1
% Fila	100.0	0.0	100.0
% Columna	4.0	0.0	2.1
TOTAL	25	22	47
% Fila	53.2	46.8	100.0
% Columna	100.0	100.0	100.0

Análisis de tabla simple

Chi cuadrado gl

16.2130 2

2. Discusión

En nuestro estudio pudimos confirmar la presencia de *Wolbachia* mediante PCR en los triatomíneos de campo y de colonia en un valor que coincide con los resultados obtenidos en estudios en donde se afirma la presencia de *Wolbachia* en el 20 al 75% de los insectos alrededor del mundo (Baldo et al., 2005; Stouhamer et al., 1999; Van Meer et al., 1999; Werren 2003; Zimmer 2001).

Está documentado (Stouhamer et al., 1999) que hay algunos factores a los que se exponen los insectos que pueden modificar la dispersión o presencia de la *Wolbachia* en ellos, lo que puede haber ocurrido en los resultados positivos obtenidos con los triatomíneos de campo. Entre estos factores podemos mencionar, la imperfección de la herencia materna debido a exposición a altas temperaturas, antibióticos de ocurrencia natural o factores genéticos del huésped. Con estos resultados sería conveniente verificar si los triatomíneos al ser extraídos de su hábitat natural y criados en laboratorios, pueden exponerse a factores que impiden el desarrollo o dispersión de la *Wolbachia* dado que en la naturaleza existen condiciones más óptimas para el insecto que favorecen la conservación de la misma.

El hecho de que la *Wolbachia* se transmite verticalmente por infección de oocistos, hace que se mantenga una alta incidencia de la infección en los artrópodos, principalmente en las hembras (Stouhamer et al., 1999), lo que fue confirmado en nuestro estudio.

Werren y Windsor recomiendan el uso de dos pares de cebadores, el que detecta el gen 16S ADN_r y un segundo más específico para el gen *wsp* que detecta falsos negativos lo cual fue confirmado en nuestro estudio en tres muestras.

Se ha documentado que *Wolbachia* ostenta tropismo por el tejido reproductivo de los insectos, pero otros autores afirman que la infección puede encontrarse en otros órganos (Stouhamer et al., 1999). En este estudio también demostramos su presencia en las glándulas salivares e intestinos de los triatomíneos estudiados. Estos hallazgos nos permitieron observar en microscopía electrónica características morfológicas descritas para esta bacteria (Beard et al., 1998) en un triatomíneo de campo cuyas muestras se enviaron al Centro de Instrumentación de la Universidad de Granada (Anexo No. 4 Fig. No. 18, 19, 20)

Con el hallazgo de *Wolbachia* en intestinos y su presencia significativa en los triatomíneos de campo, principalmente en *R. pallens*, sería conveniente confirmar en estudios posteriores si *Wolbachia* tiene alguna relación con la eficiencia de este insecto en la transmisión del parásito.

Para nuestro estudio era importante confirmar la coexistencia de la infección de *Wolbachia* con *T. cruzi* y/o *T. rangeli*, pero ello sólo fue demostrado en la mitad de la población de triatomíneos de campo estudiada. No confirmamos si triatomíneos de campo negativos por *Wolbachia* estaban infectados por tripanosomas porque todos fueron positivos por la bacteria.

Fue interesante confirmar la transmisión vertical de *Wolbachia* en ejemplares de diferentes generaciones de las colonias de triatomíneos estudiadas, como lo describen otros autores (Ahrens and Shoemaker 2005; Baldo et al., 2005; Fenollar et al., 2003; Frank 1997; Jeyaprakash and Hoy 2000; Kondo et al., 2002; Millar and Riegler 2006; Stouhamer et al., 1999; Sun et al., 2003; Sylvain et al., 2001; Xi and Dobson 2005; Zhou et al., 1998).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- ❖ Se demuestra por primera vez la presencia de *Wolbachia* en diferentes órganos de triatominos.
- ❖ Se confirma que los cebadores utilizados en este estudio son efectivos para la detección de *Wolbachia*. El primero, utilizado para tamizaje dirigido a detectar el gen 16S ADN_r, y el segundo para detectar falsos negativos, dirigido al gen *wsp*.
- ❖ Entre los órganos en donde se detectó la *Wolbachia* además de las gónadas, fueron: glándulas salivares e intestinos.
- ❖ Existe diferencia en la infección por *Wolbachia* entre los triatominos de campo y de colonia.
- ❖ Un 52% de los triatominos de campo, estaban infectados con *T. cruzi*, y un 24% con *T. rangeli*. No estuvo a nuestro alcance determinar si en triatominos con ausencia de *Wolbachia* había presencia de los parásitos *T. cruzi* y/o *T. rangeli*.

RECOMENDACIONES

Dado el hecho que ya se hizo la detección de *Wolbachia* en *R. pallescens* de Panamá, nos surgen algunas interrogantes que sería interesante se pudieran dilucidar con estudios posteriores más profundos, y poder llegar a tomar decisiones en cuanto a el efectivo control de vectores en la naturaleza y tratamiento de la enfermedad. Entre las interrogantes que surgen y lo que recomendamos está:

- Estudiar si la presencia de la *Wolbachia* en el intestino del *Rhodnius* es necesaria para la supervivencia y desarrollo del parásito en el vector. Si se llega a encontrar relación podría convertirse en un blanco importante para el desarrollo de una estrategia biológica para controlar el vector.
- Sería interesante conocer si en el momento de la picada y entrada del parásito en el hombre también puede entrar la *Wolbachia* y producir inflamación como en el caso de las filarias. En el momento que esto se defina se podría estar hablando de cambios en los esquemas de tratamiento para disminuir el efecto inflamatorio que se produce.
- Relacionado con todo esto es necesario continuar la búsqueda de *Wolbachia* en el *T. cruzi* ya que esto podía estar ligado a la infectividad del parásito una vez infecte el huésped.
- Iniciar la identificación de los tipos de cepas de *Wolbachia* que predominan en Panamá.

- Buscar la *Wolbachia* en *Triatoma dimidiata* porque es otro vector importante de la enfermedad de Chagas en Panamá.

Es necesario ahondar más en el tema de las simbiosis con *Wolbachia* en insectos transmisores de enfermedades importantes en nuestro país como la enfermedad de Chagas, la leishmaniasis, el Dengue y la Malaria. Y lo consideramos importante porque cada día que pasa nos damos cuenta que las mismas enfermedades que nos han acosado siempre, todavía están allí, y en el caso de la enfermedad de Chagas no existe la cura ni el tratamiento efectivo.

ANEXOS

ANEXO NO. 1

Cuadro No. 12: Resultados Obtenidos de Triatominos de Campo.

Número	Especie	Sexo	Resultado		Resultados para <i>Wolbachia</i>	
			<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>	Gónadas	Glándulas salivares
21	<i>Rhodnius pallescens</i>	Ninfa	pos	Neg	Pos	Pos
22	<i>Rhodnius pallescens</i>	M	pos	Pos	Pos	Pos
23	<i>Rhodnius pallescens</i>	M	neg	Pos	Pos	Pos
24	<i>Rhodnius pallescens</i>	M	pos	Pos	Pos	Pos
25	<i>Rhodnius pallescens</i>	M	neg	Neg	Pos	Pos
26	<i>Rhodnius pallescens</i>	H	pos	Neg	Pos	Pos
27	<i>Rhodnius pallescens</i>	M	pos	Neg	Pos	Pos
28	<i>Rhodnius pallescens</i>	M	pos	Neg	Pos	Pos
29	<i>Rhodnius pallescens</i>	H	pos	Neg	Pos	Pos
30	<i>Rhodnius pallescens</i>	M	pos	Neg	Pos	Pos
31	<i>Rhodnius pallescens</i>	M	neg	Neg	Pos	Pos
32	<i>Rhodnius pallescens</i>	M	neg	Neg	Pos	Pos
33	<i>Rhodnius pallescens</i>	M	neg	Neg	Pos	Pos
34	<i>Rhodnius pallescens</i>	M	pos	Neg	Pos	Pos
35	<i>Rhodnius pallescens</i>	M	neg	Neg	Pos	Pos
36	<i>Rhodnius pallescens</i>	M	pos	Neg	Pos	Pos
68	<i>Panstrongylus geniculatus</i>	M	pos	Neg	Pos	Pos
71	<i>Rhodnius pallescens</i>	H	pos	Neg	Pos	Pos
72	<i>Rhodnius pallescens</i>	H	neg	Neg	Pos	Pos
73	<i>Rhodnius pallescens</i>	M	pos	Pos	Pos	Pos
74	<i>Rhodnius pallescens</i>	M	neg	Neg	Pos	Pos
75	<i>Rhodnius pallescens</i>	M	neg	Neg	Pos	Pos
76	<i>Rhodnius pallescens</i>	M	neg	Pos	Pos	Neg
78	<i>Rhodnius pallescens</i>	H	neg	Neg	Pos	Pos
82	<i>Rhodnius pallescens</i>	H	neg	Pos	Pos	Pos
	n= 25	M 18 H 6 N 1	Pos 13 Neg 12	Pos 6 Neg 19	Pos 25	Pos 23 Neg 1

ANEXO No. 2

Cuadro No. 13: Resultados Obtenidos de Triatominos de Colonias

Número	Especie	Sexo	Resultados de <i>Wolbachia</i>			Generación
			Gónadas	Glándulas Salivares	Intestinos	
1	Rhodnius pallescens	H	Pos	Pos	Pos	ND
2	Rhodnius pallescens	H	Pos	Pos	Pos	ND
3	Rhodnius pallescens	H	Pos	Pos	Pos	ND
4	Rhodnius pallescens	H	Pos	Neg	Pos	ND
5	Rhodnius pallescens	M	Pos	Pos	Pos	ND
6	Rhodnius pallescens	H	Neg	Neg		4°
7	Rhodnius pallescens	H	Neg	Neg		4°
8	Rhodnius pallescens	M	Pos	Pos	Pos	5°
9	Rhodnius pallescens	M	Neg	Neg		6°
10	Rhodnius pallescens	H	Neg	Neg		6°
11	Rhodnius pallescens	M	Neg	Neg		6°
12	Rhodnius pallescens	M	Neg	Neg		4°
13	Rhodnius pallescens	M	Neg	Neg		4°
14	Rhodnius pallescens	H	Pos	Pos	Pos	5°
15	Rhodnius pallescens	H	Pos	Pos	Pos	5°
16	Rhodnius pallescens	H	Pos	Pos	Neg	5°
17	Rhodnius pallescens	H	Pos	Pos	Pos	5°
18	Rhodnius pallescens	H	Pos	Pos	Pos	4°
19	Rhodnius pallescens	H	Neg	Neg		4°
20	Rhodnius pallescens	H	Neg	Neg		4°
37	Rhodnius pallescens	M	Neg	Neg		5°
38	Rhodnius pallescens	H	Neg	Neg		5°
39	Rhodnius pallescens	H	Neg	Neg		6°
40	Rhodnius pallescens	M	Neg	Neg		6°
41	Rhodnius pallescens	NINFA	Neg	Neg		4°
42	Rhodnius pallescens	NINFA	Neg	Neg		4°
43	Rhodnius pallescens	H	Pos	Pos	Pos	4°
44	Rhodnius pallescens	H	Pos	Pos	Pos	4°
45	Rhodnius pallescens	M	Neg	Neg		3°
46	Rhodnius pallescens	H	Neg	Neg		4°
47	Rhodnius pallescens	H	Neg	Neg		3°
48	Rhodnius pallescens	H	Pos	Pos	Pos	6°
49	Rhodnius pallescens	H	Pos	Pos	Pos	6°
50	Rhodnius pallescens	H	Pos	Pos		3°
51	Rhodnius pallescens	H	Pos	Neg	Pos	3°
52	Rhodnius prolixus	H	Pos	Neg		ND
53	Rhodnius prolixus	M	Neg	Neg		ND
54	Rhodnius prolixus	H	Neg	Neg		ND
55	Rhodnius prolixus	H	Neg	Neg		ND

56	Rhodnius prolixus	H	Pos	Neg	Pos	ND
57	Rhodnius prolixus	M	Neg	Neg		ND
58	Rhodnius prolixus	M	Neg	Neg		ND
59	Rhodnius prolixus	H	Neg	Neg		ND
60	Rhodnius nasatus	M	Pos	Pos		ND
61	Rhodnius nasatus	H	Pos	Pos		ND
77	Rhodnius pallescens	H	Pos	Pos		ND
79	Rhodnius pictipes	H	Neg	Neg	Pos	ND
80	Rhodnius pictipes	H	Neg	Pos	Pos	ND
	n 48		Pos 22 Neg 26	Pos 19 Neg 27	18 Pos *	

Abreviaturas.

Pos.: positivos a *Wolbachia* o Tripanosomas según sea el caso

Neg.: negativos a *Wolbachia* o Tripanosomas según sea el caso

ND: no determinado

En intestinos sólo se le hizo la detección a los que previamente habían salido positivos por *Wolbachia* en gónadas.

H: hembra

M: macho

ANEXO NO. 3

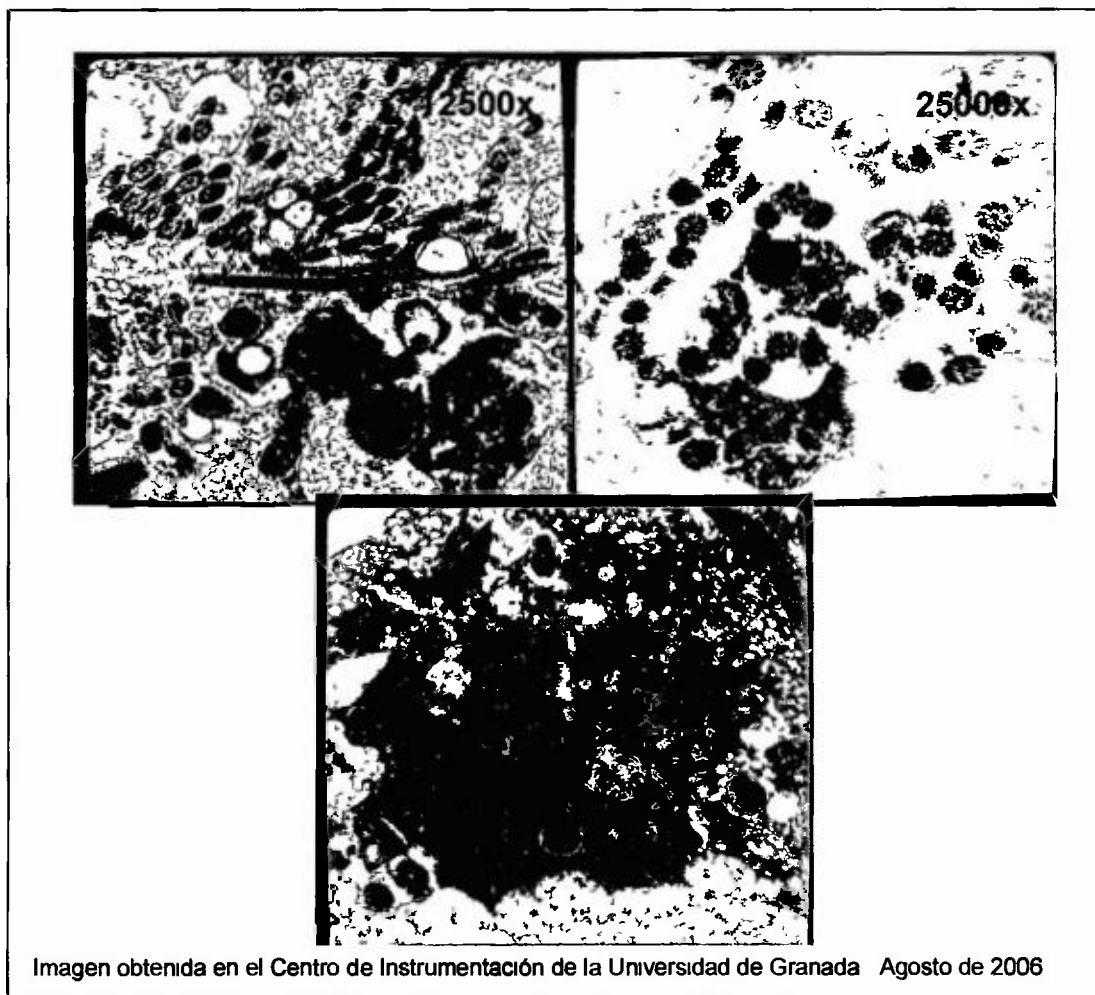


Figura No. 18: Diferentes cortes de intestinos de *R. pallescens* a diferentes aumentos en microscopía electrónica

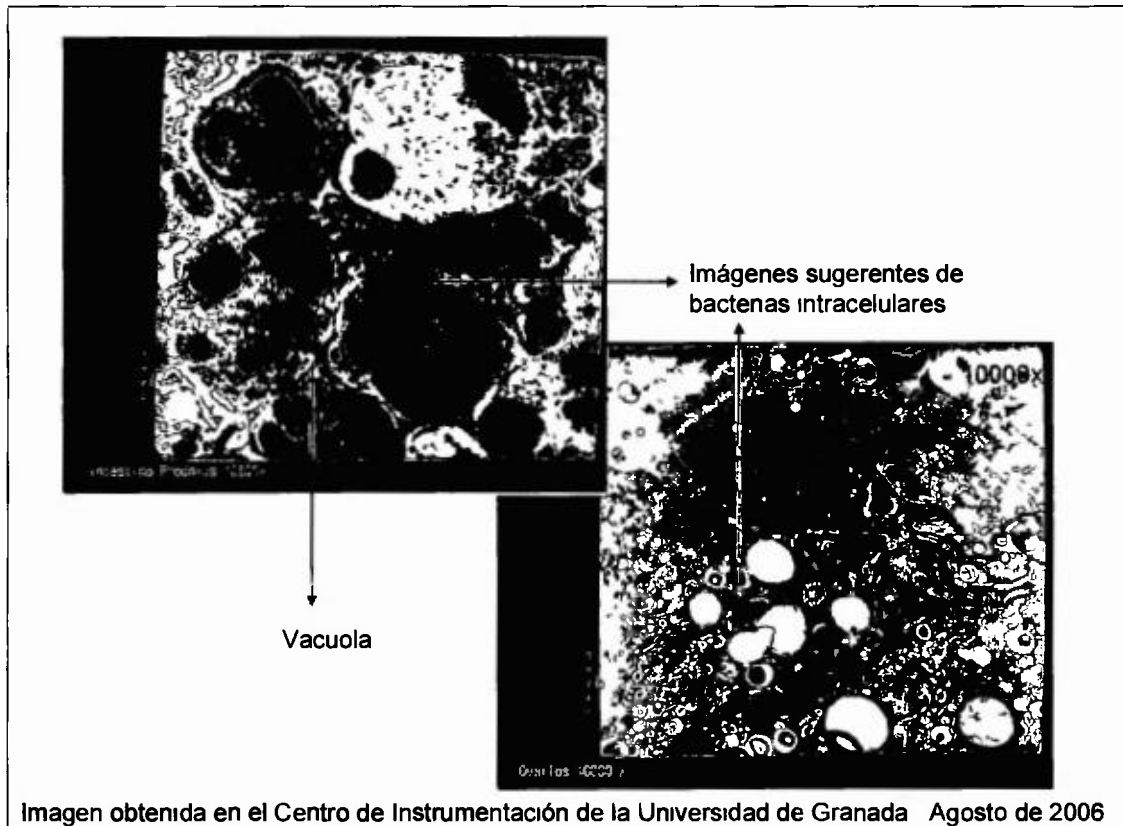


Figura No. 19: Imágenes de microscopía electrónica realizadas a intestino y ovario de *Rhodnius pallescens* de campo



Figura No. 20: Imagen de microscopía electrónica de *Wolbachia* en tejido reproductivo. (Beard et al., 1998)

BIBLIOGRAFIA

- Ahrens, M. y Shoemaker, D. (2005). Evolutionary history of *Wolbachia* infections in the fire ant *Solenopsis invicta*. *BMC Evolutionary Biology*, **5**: 35.
- Aksoy, S., Maudlin, I., Dale, C., Robinson, A. y O'Neill, S. (2001). Prospects for control of African Trypanosomiasis by Tsetse vector manipulation. *TRENDS in Parasitology*, **17**(1):29-35.
- Aksoy, S. (1995). *Wigglesworthia* gen. nov. and *Wigglesworthia glossinidia* sp. nov., taxa consisting of the mycetocyte associated, primary endosymbionts of tsetse flies. *Int J Sys Bacteriol.* **45**:848-51.
- Amann, R., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. y Stahl, D.A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1919-1925.
- Baines, S. (1956). The role of the symbiotic bacteria in the nutrition of *Rhodnius prolixus* (hemiptera). Department of Bacteriology, University of Birmingham. 533-541.
- Baldo, L., Lo, N. y Werren, J. (2005). Mosaic Nature of the *Wolbachia* Surface Protein. *Journal of Bacteriology* **187**(15): 5406-5418.
- Baumann, P. (2005). Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology.* **59**:155-189.
- Beard, B., Cordon-Rosales, C. y Durvasula, R. (2002). Bacterial Symbionts of the Triatominae and their potential use in Control of Chagas disease transmission. *Annu Rev Entomol* **47**:123-141.
- Beard, Ch., Durvasula, R. y Richards, F. (1998). Bacterial Symbiosis in arthropods and the Control of Disease Transmission. *Emerging Infectious Diseases* **4**(4):581-291.
- Bourtzis, K. y Miller, T. (2003). Insect Symbiosis. *CRC Press*, Boca Ratón.
- Bourtzis, K., Dobson, S.L., Braig, H.R. y O'Neill, S.L. (1998). Rescuing *Wolbachia* have been overlooked. *Nature* **391**:852-853.
- Bourtzis, K., Nirgianaki, A., Onyango, P. y Savakis, C. (1994). A prokaryotic dnaA sequence in *Drosophila melanogaster*: *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility among laboratory strains. *Insect Mol Biol.* **3**:131-142.

- Braendle, C., Miura, T., Bickel, R., Shingleton, A.W., Kambhampati, S., et al. (2003) Developmental Origin and Evolution of Bacteriocytes in the Aphid–*Buchnera* Symbiosis. *PLoS Biol* 1(1): e21.
- Braig, H.R., Zhou, W., Dobson, S.L. y O'Neill, S.L. (1998). Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J Bacteriol.* 180:2373-2378.
- Breeland, S.G., Jeffrey, G.M., Lofgren, C.S. y Weidhaas, D.E. (1974). Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador. I. Characteristics of the test site and the natural population. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 23:274-281.
- Brewer, J.A.J. y Werren, J.H. (1990). Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature* 346:558-560.
- Brower, J.H. (1979). Suppression of laboratory populations of *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera, Pyralidae) by release of males with cytoplasmic incompatibility. *J Stored. Prod. Res* 15:1-4.
- Callaini, G., Dallai, R. y Riparbelli, M.G. (1997). *Wolbachia* induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *J. Cell Sci.* 110:271-280.
- Clancy, D.J. y Hoffmann, A.A. (1998). Environmental effects on cytoplasmic incompatibility and bacterial load in *Wolbachia* infected *Drosophila simulans*. *Entomol Exp Appl.* 86:13-24.
- Chen, D.Q., Campbell, B.C. y Purcell, A.H. (1996). A new Rickettsia from herbivorous insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Curr Microbiol* 33:123-128.
- Chiurillo, MA., Crisante, G., Rojas, A., Peralta, A., Dias, M., Guevara, P., Añez, N. y Ramírez, JL. (2003). Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* Infection by Duplex PCR Assay Based on Telomeric Sequences. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(5):775-779.
- Dale, C. y Moren, N.A. (2006). Molecular interactions between bacterial symbionts and their host. *Cell* 126:453-465.
- Darby, A.C., Chandler, S.M., Welburn, S.C. y Douglas, A.E. (2005). Aphid symbiotic bacteria cultured in insect cell lines. *Appl Environ. Microbiol.* 71:4833-4839.

- Darby, A.C., Birkle, L.M., Turner, S.L. y Douglas, A.E. (2001). An aphid borne bacterium allied to the secondary symbionts of whitefly. *FEMS Microbiol.* **71**:43-50.
- Dobson, S.L., Marsland, E.J. y Rattanadechakul, W. (2002). Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive. *Genetics* **160**:1087-1094.
- Dufresne, A., Garczarek, L. y Partensky, F. (2005). Accelerated evolution associated with genome reduction in a free-living prokaryote. *Genome Biol.* **6**:R14.
- Dumont, M.G. y Murrell, J.C. (2005). Stable isotope probing-linking microbial identity to function. *Nature Rev Microbiol.* **3**:499-504.
- Durvasula, R., Gums, A., Panackal, A., Kruglov, O., Aksoy, S., Merrifield, B., Richards, F., Beard, C. (1997). Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *PNAS.* **94**:3274-3278.
- Dyck, V.A., Hendrichs, J. y Robinson, A.S. (2005). Sterile Insect Technique. Principles and Practice. In *Area-Wide Integrated pest Management*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Fenollar, F., La Scola, B., Inokuma, H., Dumler, S., Taylor, M. y Raoult, D. (2003). Culture and Phenotypic Characterization of a *Wolbachia pipiensis* Isolate. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(12): 5434-5441.
- Flieger, A., Neumeister, B. y Cianciotto, N.P. (2002). Characterization of the gene encoding the major secreted lysophospholipase A of *Legionella pneumophila* and its role in detoxification of lysophosphatidylcholine. *Infect. Immun.* **70**:6094-6106.
- Frank, Steven. (1997). Cytoplasmic Incompatibility and Population Structure. *J. Theor. Biol.* **184**: 327-330.
- Foster, J., Ganatra, M., Kamal, I., Ware, J., Makarova, K., Ivanova, N., Bhattacharyya, A., Kapatral, V., Kumar, S., Posfai, J., Vincze, T., Ingram, J., Moran, L., Lapidus, A., Omelchenko, M., Kyrpides, N., Ghedin, E., Wang, S., Goltsman, E., Joukov, V., Ostrovskaya, O., Tsukerman, K., Mazur, M., Comb, D., Koonin, E. y Slatko, B. (2005). The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biol.* **3**:e121.
- Fujii, Y., Kubo, T., Ishikawa, H. y Sasaki, T. (2004). Isolation and characterization of the bacteriophage Wo from *Wolbachia*, an arthropod endosymbiont. *Biochem. Biophys Res Commun* **317**:1183-1188.

- Fukatsu, T.; Watanabe, K. y Sekiguchi, Y. (1998). Specific detection of intracellular symbiotic bacteria of aphids by oligonucleotide probed in situ hybridization. *Appl Ento Zool* **33**:461-472.
- Gavotte, L., Vavre, F., Ravallec, M., Stothamer, R. y Bouletreau, M. (2004). Diversity, distribution and specificity of WO phage infection in *Wolbachia* of four insect species. *Insect Mol. Biol.* **13**:147-153.
- Gill, R., Latorre, A. y Moya, A. (2004). Bacterial endosymbionts of insects: insights from comparative genomics. *Environmental Microbiology* **6**(11):1109-1122.
- Gill, S.S., Cowles, E.A. y Pietrantonio, P.V. (1992). The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology.* **37**:615-636.
- Grijalva, O. y Giraldo, I. (2006). Simbiosis bacteriana en insectos. *Boletín del Museo de entomología de la Universidad de El Valle* **7**:24-40.
- Hartman, H. y Fedorav, A. (2002). The origin of the eukaryotic cell: a genomic investigation. *Proc Natl Acad Sci.* **99**:1420-1425.
- Hertig, M. (1936). The rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology* **28**:453-486.
- Hertig, M. y Wolbach, S.B. (1924). Studies on Rickettsia-like microorganisms in insects. *J. Med. Res.* **44**:329-374.
- Hoerauf, A., Marfo-Debrekyei, Y., Adjei, O., Debrah, A., Fischer, K. y Mand, S. (2003). Loss of worm nests after treatment of *Wuchereria bancrofti* with doxycycline for six weeks suggests a macrofilaricidal effect. *Am J Trp Med Hyg.* **69**:249.
- Hoerauf, A., Mand, S., Adjei, O., Fleischer, B. y Buttner, D.W. (2001). Depletion of *Wolbachia* endobacteria in *Onchocerca volvulus* by doxycycline and microfilaridemia after ivermectin treatment. *Lancet* **357**:1415-1416.
- Hoerauf, A., Volkmann, L., Hamelmann, C., Adjei, O., Autenrieth, I.B., Fleischer, B. y Buttner, D. (2000). Endosymbiotic bacteria in worms targets for a novel chemotherapy in filariasis *Lancet* **355**:1242-1243.
- Hoerauf, A., Nissen-Pahle, K., Schmetz, C., Henkle-Durhsen, K., Blaxter, M.L., Buttner, D.W., et al. (1999). Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *J. clin. Invest.* **103**:11-18

- Holden, P.R., Jones, P. y Brookfield, J.F. (1993). Evidence for a *Wolbachia* symbiont in *Drosophila melanogaster*. *Genet Res.* **62**:23-29.
- Holley R. Procesos genéticos de la síntesis de proteínas: traducción. [en línea] Marzo 2007. Disponible en <http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Traduccion/traduccion.htm>.
- Hurst, G.D.D. y Werren, J.H (2001). The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution. *Nat Rev.* **2**:597-606.
- Hypsa, V. y Dale, C. (1997). In vitro culture and phylogenetic analysis of “*Candidatus Arsenophonus triatominarum*”, an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. *Int J. Syst. Bacteriol* **47**:1140-1144.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Burke, G.R., Riegler, M. y O'Neill, S.L. (2000). Distribution, gene expression and motif variability of ankyrin domain genes in *Wolbachia pipientis*. *J Bacteriol.* **187**:5136-5145.
- Jeyaprakash, A. y Hoy, M.A. (2000). Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol Biol.* **9**:393-405.
- Kidwell, M.G. y Lisch, D.R. (2001). Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution.* **55**:1-24.
- Koga, R., Tsuchida, T. y Fukatsu, T. (2003). Changing patterns in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* **270**:2543-2550.
- Kondo, N., Nikoh, N., Ijichi, N., Shimada, M. y Fukatsu, T. (2002). Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *PNAS* **99**(22): 14280-14285.
- Kozek, W.J. (1977). Transovarially-transmitted intracellular microorganisms in adult and larval stages of *Brugia malayi*. *J Parasitol.* **63**:992-1000.
- Kozek, W.J. y Marroquin, H.F. (1977). Intracytoplasmatic bacteria in *Onchocerca volvulus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**:663-678.
- Langworthy, N.G., Renz, A., Mackenstedt, U., Henkle-Duhrsen, K., de Bronsvort, M.B., Tanya, V.N., Donnelly, M.J. y Trees, A.J. (2000). Macrofilariocidal activity of tetracycline against the filarial nematode *Onchocerca ochengi*: elimination of

Wolbachia precedes worm death and suggests a dependent relationship. *Proc. Biol. Sci.* **267**:1063-1069.

- Lo, N., Bandi, C., Watanabe, H., Nalepa, C. y Beninati, T. (2003). Evidence for cocladogenesis between diverse dictyopteran lineages and their intracellular endosymbionts. *Molecular Biology and Evolution.* **20**:907-913.
- Makepeace, B., Rodgers, L. y Trees, A. (2006). Rate of Elimination of *Wolbachia pipientis* by Doxycycline in Vitro Increases following drug Withdrawl. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**(3), 922-927.
- Matlock, R. (2005). A reaction diffusion model of the screwworm barrier in Panama. In *Enabling Technologies for the Expansion of SIT for Old and New World Screwworm, 3rd Research Coordination Meeting*. Montevideo, 30 June -3 July, 2005. IEA-314-D4-RC851.3.
- McCall, J.W., Jun, J.J. y Bandi, C. (1999). *Wolbachia* and the antifilarial properties of tetracycline. An untold history. *Ital. J Zool.* **66**:7-10.
- McGarry, H.F., Egerton, G.L. y Taylor, M.J. (2004). Population dynamics of *Wolbachia* bacterial endosymbionts in *Brugia malayi*. *Mol Biochem Parasitol.* **135**:57-67.
- McLaren, D.J., Wormas, M.J., Laurence, B.R., and Simpson, M.G. (1975). Microorganisms in filarial larvae (nematode). *Trans. R Soc Trop Med Hyg.* **69**:509-514.
- Margulis, L.; Dolan, M.; Guerrero, R. (2000). The chimeric eukaryote: origin of the nucleus from the karyomastigont in amitochondriate protist. *Proc. Natl. Sci USA* **97**:6954-6959.
- Margulis L. (1992). Biodiversity: Molecular biological domains, symbiosis and kingdom origins. *Biosystems* **27**:39-51
- Masui, S., Kuroiwa, H., Sasaki, T., Inui, M., Kuroiwa, T. y Ishikawa, H. (2001). Bacteriophage WO and virus-like particles in *Wolbachia*, an endosymbiont of arthropods. *Biochem Biophys Res Commun.* **283**:1099-1104.
- Miller, W. y Riegler, M. (2006). Evolutionary Dynamics of wAu-Like *Wolbachia* Variants in Neotropical *Drosophila spp* *Applied and Environmental Microbiology* **72**(1): 826-835.
- Moran, N.A.; Russell, J.A.; Koga, R. y Fukatsu, T. (2005). Evolutionary relationships of three new species of enterobacteriaceae living as symbionts of aphids and other insects. *Appl Environ Microbiol.* **71**:3302-3310.

- Moran, N.A.; Plague, G.; Sandstrom, J. y Wilcox, J. (2003). A genomic perspective on nutrient-provisioning by bacterial symbionts of insects. *Proceedings of the National Academy of sciences of the USA* **100**:14543-14548.
- O'Neill, S.L.; Pettigrew, M.M.; Sinkins, S.P.; Braig, H.R.; Andreadis, T.G. y Tesh, R.B. (1997). In vitro cultivation of *Wolbachia pipientis* in *Aedes albopictus* cell line. *Insect Mol Biol* **6**:33-39.
- O'Neill, S.L. y Karr, T.L. (1990). Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature* **348**:178-180.
- Punkosdy, G., Addis, D. y Lammie, P. (2003). Characterization of antibody responses to *Wolbachia* Surface Protein in Humans with Lymphatic Filariasis. *Infection and Immunity* **71**(9): 5104-5114.
- Reed, K.M. y Werren, J.H. (1995). Induction of paternal genome loss by the paternal sex ratio chromosome and cytoplasmic incompatibility bacteria (*Wolbachia*): a comparative study of early embryonic events. *Mol Reprod Dev.* **40**:408-418.
- Rodríguez, C. y Rivas, F. (2006). Diseño y evaluación de un PCR duplex para la detección y diferenciación de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* en triatomos y muestras clínicas procedentes de la comunidad de Viento Fronto de Chilibre. Panamá 2006. Tesis de licenciatura inédita. Universidad de Panamá, Facultad de Medicina, Panamá.
- Scarborough, C.L., Ferrari, J. y Godfray, H.C. (2005). *Aphid* protected from pathogen by endosymbiont. *Science* **310**(5755):1781.
- Sasaki, T., Braig, H.R. y O'Neill, S.L. (1998). Analysis of *Wolbachia* protein synthesis in *Drosophila* in vivo. *Insect. Mol Biol.* **7**:101-105.
- Sinkins, S.P., Walker, T., Lynd, A.R., Steven, A.R., Makepeace, B.L, Godfray, H.C.J. y Parkhill, J. (2005). *Wolbachia* variability and host effects on crossing type on *Culex* mosquitoes. *Nature* **436**:257-260.
- Stouhamer, R., Breeuwer, J.A.J. y Hurts, G.D.D. (1999). *Wolbachia pipientis*: Microbial Manipulator of arthropod reproduction. *Annu. Rev Microbiol.* **53**: 71-102.
- Sun, L., Riegler, M. y O'Neill, S. (2003). Development of a Physical and Genetic Map of the Virulent *Wolbachia* Strain wMelPop. *Journal of Bacteriology* **185**(24): 7077-7084.

- Sylvain, Ch., Bourtzis, K. y Mercot, H. (2001). *Wolbachia*-Induced Cytoplasmic Incompatibility. *Symbiosis* 623-644.
- Tamas, I., Klasson, L., Canback, B., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Wernegreen, J.J., Sandstrom, J.P., Moran, N.A. y Andersson, S.G. (2002). 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science* 296:2376-2379.
- Taylor, M.J., Bandi, C. y Hoerauf, A. (2005). *Wolbachia* bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Adv Parasitol.* 60:245-284.
- Taylor, M.J., Bandi, C., Hoerauf, A.M. y Lazdins, J. (2000). *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes: a target for control? *Parasitol Today* 16:179-180.
- Taylor, M.J., Bilo, K., Cross, H.F., Archer, J.P. y Underwood, A.P. (1999). 16S rDNA phylogeny and ultrastructure characterization of *Wolbachia* intracellular bacteria of the filarial nematodes *Brugia malayi*, *B. pahangi*, and *Wuchereria bancrofti*. *Exp Parasitol.* 91:356-361.
- Tayson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Richardson, P.M., Solovyev, V.V., Rubin, E.M., Rokhsar, D.S. y Banfield, J.F. (2004). Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428:37-43.
- Thao, M.L.L. y Baumann, P. (2004). Evolutionary relationship of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their host. *Applied and Environmental Microbiology* 70(6):3401-3406.
- Tram, U., Ferree, P.A. y Sullivan, W. (2003). Identification of *Wolbachia* host interacting factors through cytological analysis. *Microbes Infection* 5:999-1011.
- Tram, U. y Sullivan, W. (2002). Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia* induced cytoplasmic incompatibility. *Science* 296:1124-1126.
- Turelli, M. y Hoffmann, A.A. (1991). Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. *Nature* 353:440-442.
- Van Meer, M.M.M., Witteveldt, J. y Stouthamer, R. (1999). Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect Molecular Biology* 83: 399-408.
- Wade, M. (2001). Infectious speciation. *Nature*, 409, 675-677.

- Weidhaas, D.E., LaBrecque, G.C., Lofgren, C.S. y Schmidt, C.H. (1972). Insect sterility in population dynamics research. *Bull World Health Org.* **47**:309-315.
- Welburn, S.C. Maudlin, I. y Ellis, D.S. (1987). In vitro cultivation of rickettsia-like organisms from *Glossina spp.* *Am. Trop Med. Parasitol.* **81**:331-335.
- Wernegreen, J.J. (2002). Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nat Rev Genet.* **3**:850-861.
- Werren, John. (2003). Invasion of the gender benders by manipulating sex and reproduction in their hosts, many parasites improve their own odds of survival and may shape the evolution of sex itself-microorganisms that change sex of host. *Natural History.*
- Werren, J. (1997). Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol.* **42**:587-609.
- Werren, J., Windsor, D. y Guo, L. (1995). Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proceedings Biological Sciences.* **262**:197-204.
- Werren, J.H., Zhang, W., y L.R. Guo. (1995). Evolution and phylogeny of *Wolbachia* bacteria: reproductive parasites of arthropods. *Proc Royal Soc London B.* **261**:55-71.
- Werren, J. y Jaenike, J. (1995). *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mycophagous *Drosophila* and their relatives. *Heredity* **75**:320-326.
- Wright, J.D., Sjostrand, F.S., Portaro, J.K. y Barr, A.R. (1978). The ultrastructure of the rickettsia-like organism *Wolbachia pipientis* and associated virus-like bodies in the mosquito *Culex pipiens*. *J Ultrastruct Res.* **63**:79-85.
- Wu, D., Daugherty, S.C., Van Aken, S.E., Pai, G.H., Watkins, K.L., Tran, P.L. Moran, N.A. y Eisen, J.A. (2006). Metabolic complementarity and genomics of the dual symbiosis of sharpshooters. *PLoS, Biology, Public Library of Science Biology,* **4**(6):1079-1092.
- Wu, M., Sun, L.V., Vamathevan, J., Riegler, M., Deboy, R., Brownlie, J.C., McGraw, E.A., Martin, W., Esser, C., Ahmadinejad, N., Wiegand, C., Madupu, R., Beanan, M.J., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Mohamoud, Y., Lee, P., Berry, K., Young, M.B., Utterback, T., Weidman, J., Nierman, W.C., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Tettelin, H., O'Neill, S.L. y Eisen, J.A. (2004). Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biol.* **2**:E69.

- Xi, Z. y Dobson, S. (2005). Characterization of *Wolbachia* Transfection Efficiency by using Microinjection Cytoplasm and Embryo homogenate. *Applied and environmental Microbiology* **71**(6): 3199-3204.
- Zabalou, S., Riegler, M., Theodorakopoulou, M., Stauffer, C., Savakis, C. y Bourtzis, K. (2004). *Wolbachia* induced cytoplasmic incompatibility as a mean for insect pest population control. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* **101**:15042-15045.
- Zarda, B., Amann, R., Wallner, G. y Schleifer, K.H. (1991). Identification of single bacterial-cells using digoxigenin-labeled, ribosomal-RNA-targeted oligonucleotides. *J. Gen Microbiol* **137**:2823-2830.
- Zhou, W., Rousset, F. y O'Neill, S. (1998). Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc Biol Sci.* **265**:509-515.
- Zientz, E., Dandekar, T. y Gross, R. (2004). Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. *Microbiol Mol Biol. Rev.* **68**:745-770.
- Zimmer, C. (2001). *Wolbachia*: a tale of Sex and Survival. *Science*, may 11.