



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**“ESTUDIOS SOBRE LA BETA-QUITINA Y QUITINASAS DE
TRIATÓMINOS TRANSMISORES DE LA ENFERMEDAD DE
CHAGAS”**

Tesis para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA
SALUD**

Presenta:

Biol. José Epigmenio Bautista García

Director de Tesis

Dr. José Luis Imbert-Palafox

San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo. 2015





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Of. No MCBS/2015/103
Asunto: Asignación de Jurado de Examen

Biol. José Epigmenio Bautista García
Candidato a Maestro en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Estudios sobre la beta-Quitina y Quitinasas de Triatóminos Transmisores de la Enfermedad de Chagas.", con el cual obtendrá el Grado de Maestro en Ciencias Biomédicas y de la Salud; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA

PRIMER VOCAL DR. JOSÉ LUIS IMBERT PALAFOX

SECRETARIA DRA. ARELI CRUZ CASTAÑEDA

SUPLENTE DR. ANDRÉS SALAS CASAS

SUPLENTE DR. JESÚS CARLOS RUVALCABA LEDEZMA

Handwritten signatures of the jury members in blue ink.

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.



Atentamente

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
San Agustín Tlaxiaca Hgo. a 2 de julio 2015

M.C. ESP. JOSÉ MARÍA BUSTO VILLARREAL
DIRECTOR

DRA. ARACELI ORTIZ POLO
COORDINADORA DE POSGRADO ICESA

DR. JUAN ELIEZER ZAMARRIPA CALDERÓN
COORDINADOR DEL PROGRAMA



*Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca **338501**.*

Agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) por brindarme un espacio de estudio y la oportunidad de superarme en mi formación profesional.

Le hago un extenso agradecimiento al Área Académica de Medicina del Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa) de la UAEH, por el apoyo y las facilidades brindadas en todo momento en los laboratorios de Bioquímica y Microbiología/Parasitología.

DEDICATORIA

A mis padres por brindarme su confianza, su incondicional apoyo y por creer en mí en todo momento.

A mis hermanos por su apoyo y sus consejos.

A mi nueva familia por sus ánimos, su paciencia y su confianza.

Gracias a todos por nunca dejar de creer en mí.

La majestuosidad de la naturaleza es algo tan impresionante que el hombre jamás podrá llegar a comprender gracias a sus dotes de superioridad e inteligencia.

José Epímenio Bautista García

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. José Luis Imbert Palafox por ser mi mentor y guía incondicional en este proyecto de investigación. Gracias por sus consejos, enseñanzas, por depositar su confianza en mí y sobre todo por ayudarme a crecer en lo profesional y como persona.

Agradezco profundamente a la T.L.Q. Roció Guzmán Flores y al Dr. Juan Vicente Gómez Gómez, responsables del laboratorio de Microbiología y Parasitología del Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa-UAEH) por su gran apoyo, amistad, consejos y colaboración.

Al Dr. Gabriel Betanzos Cabrera del Área Académica de Nutrición, por su colaboración y su apoyo incondicional, del cual fue de vital importancia para poder culminar este trabajo.

A la Dra. Yolanda Marmolejo del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ), responsable del laboratorio de Espectroscopia de IR. ICBI-UAEH, por facilitar los análisis de FTIR.

Al Dr. Alberto Arenas y Dr. Juan Ávila del Área Académica de Ciencias de los Materiales, ICBI-UAEH, por facilitar los análisis de Rayos-X y la Microscopia Electrónica de Barrido.

A los sinodales y revisores, de quienes he aprendido mucho y que gracias a sus observaciones, comentarios y sugerencias se ha enriquecido enormemente este trabajo: Dra. Areli Cruz Castañeda, Dr. Andrés Salas Casas y Dr. Jesús Carlos Ruvalcaba Ledezma.

A la Dra. Kayko Shirai Matsumoto responsable del laboratorio de Biopolímeros del Dpto. de Biotecnología en la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), por facilitar muestras y análisis importantes durante el desarrollo de este trabajo.

A la Biol. Rosario Tovar por su ayuda y colaboración brindada en los laboratorios de Bioquímica y Microbiología.

A mis padres y mis hermanos por depositar su confianza en mí y apoyarme en todo momento. Siempre estaré eternamente agradecido.

Hago un extenso agradecimiento de forma muy especial a mi familia Eve y Xady, por motivarme, brindarme su apoyo incondicional, por regalarme maravillosos e inolvidables momentos y sobre todo por estar conmigo en las buenas y malas.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Acercamiento a la cabeza de un triatómino.....	4
Figura 2. Estructura química de un dímero de N-acetilglucosamina.	6
Figura 3. Modelos estructurales y redes de enlaces de hidrógeno de la β -quitina dihidratada.	6
Figura 4. Exoesqueletos obtenidos de <i>Meccus longipennis</i>	33
Figura 5. Exuvias resultantes y obtenidas de los diferentes estadios ninfales de los triatóminos.....	34
Figura 6. Quitina de las exuvias de <i>Meccus longipennis</i>	34
Figura 7. Quitina de camarón.	35
Figura 8. Quitina de chapulín.....	36
Figura 9. Gráfica de FT-IR de la quitina de machos y hembras de <i>Meccus longipennis</i> quitina de camarón y quitina de hongo.	37
Figura 10. Gráfica de FT-IR de la quitina procedente de los pliegues e interpliegues tanto de machos como de hembras de <i>Meccus longipennis</i>	38
Figura 11. Difractograma de rayos X de la quitina de triatóminos..	39
Figura 12. Variedades de quitosano.....	40
Figura 13. Modelo de la molécula de clorhidrato de glucosamina (HCIGLN).....	41
Figura 14. Vista tridimensional desde el eje Z de dos moléculas de glucosamina. Se muestra la interacción de ambas moléculas mediante cinco enlaces de hidrogeno marcados en color azul cian.	42
Figura 15. Espectros de absorción en Uv-Visible del Calcofluor líquido en dilución y de la combinación Quitosano - Calcofluor.....	44
Figura 16. Espectro de emisión en 2D del Calcofluor en buffer de acetatos pH 4.5, succinato 5.5, fosfatos 7.5 y fosfatos pH 9.0.....	45
Figura 17. Espectro de excitación en 2D del Calcofluor en buffer de acetatos pH 4.5, succinato 5.5, fosfatos 7.5 y fosfatos pH 9.0.....	45
Figura 18. Espectro de emisión en 3D excitando el Calcofluor en buffer de fosfatos pH 7.5, en (A) vista lateral mostrando la intensidad y en (B) la vista desde arriba muestra el área.	46
Figura 19. Gráfica 8. Espectros por fluorescencia en 2D de la interacción entre Calcofluor y Albúmina en buffer de fosfatos pH 7.5.....	47
Figura 20. Espectros por fluorescencia en 3D de la interacción entre calcofluor y albumina en buffer de fosfatos pH 7.5.....	48
Figura 21. Espectros de fluorescencia en 2D y 3D de calcofluor y β -quitosano.....	49
Figura 22. Espectros de fluorescencia 3D de la interacción entre calcofluor y β -quitosano de triatóminos en buffer de fosfatos pH 7.5.....	50
Figura 23. Espectros de fluorescencia 3D de la interacción entre calcofluor y β -quitosano de camarón y β -quitosano de chapulín en buffer de fosfatos pH 7.5.....	51
Figura 24. Quitina coloidal de camarón y chapulín.	52
Figura 25. Cultivos bacterianos, realizados en medio mínimo líquido con quitina como fuente alterna de C y N.	53
Figura 26. PAGE-nativo.	54
Figura 27. PAGE-SDS y PAGE-QC	55
Figura 28. Digestión de quitosano y quitinasas de hongo.	56
Figura 29. Geles quitinasas.....	57
Figura 30. Geles de Poliacrilamida – quitina coloidal, en A gel nativo revelado por Coomassie – Calcofluor.....	58
Figura 31. Gel de poliacrilamida – quitina coloidal para detectar la biodegradación por quitinasas de hongos.....	59
Figura 32. Gel de poliacrilamida – quitina coloidal para la biodegradación usando quitinasas de bacterias.	60
Figura 33. Geles de poliacrilamida – quitina coloidal para la prueba de biodegradación con quitinasas de triatóminos.	61
Figura 34. Gel de poliacrilamida – quitina coloidal para detectar la biodegradación por quitinasas de triatóminos.	62
Figura 35. Fragmento de uno de los alineamientos de secuencias que codifican para quitinasas en insectos realizado con ClustalW2.....	64

Figura 36. El alineamiento inicial sometido a BoxShade Server – ExPASy, para delimitar e identificar zonas clave como sitios altamente conservados.....	65
Figura 37. Primers y enzimas de restricción.	66
Figura 38. Fragmento de alineamiento de DNA genómico y el RNA mensajero que codifican para la quitinasa.	68
Figura 39. Geles en los que se demuestra la amplificación de los fragmentos de los genes de Quitinasa, Nitroporina-II y Tiorredoxina reductasa a partir del DNA genómico de los triatóminos <i>Meccus longipennis</i>, <i>Triatoma dimidiata</i> y <i>Tiorredoxina reductasa</i>.....	70

INDICE DE TABLAS

Tabla1. Concentración y volumen empleado en la preparación de las reacciones para llevar a cabo la amplificación por PCR.....	31
Tabla2. Secuencias de quitinasas elegidas para el alineamiento múltiple.....	63
Tabla3. Cebadores diseñados para la amplificación de DNA por PCR punto final.....	67

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO	2
2.1. <i>TRIPANOSOMIASIS AMERICANA</i>	2
2.2. <i>TRITÓMINOS</i>	3
2.3. <i>QUITINA</i>	5
2.4. <i>BIODEGRADACIÓN Y QUITINASAS</i>	8
III. JUSTIFICACIÓN	10
IV. OBJETIVOS.....	11
4.1. <i>OBJETIVO GENERAL</i>	11
4.2. <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	11
V. MATERIALES Y MÉTODO	12
5.1. <i>CULTIVO DE LOS INSECTOS</i>	12
5.2. <i>OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO (TRITÓMINOS)</i>	12
5.3. <i>EXTRACCIÓN DE BETA-QUITINA A PARTIR DE TRITÓMINOS (MECCUS LONGIPENNIS)</i>	12
5.4. <i>EXTRACCIÓN DE ALFA-QUITINA A PARTIR DE CAMARÓN Y CHAPULÍN</i>	15
5.5. <i>CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE QUITINA POR FT-IR</i>	17
5.6. <i>CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO CRISTALINO MEDIANTE DIFRACCIÓN DE RAYOS X</i>	17
5.6.1. <i>Cristalografía de Rayos X de monocristales</i>	18
5.7. <i>OBTENCIÓN DE QUITOSANO A PARTIR DE QUITINA DE TRITÓMINOS, CAMARÓN Y CHAPULÍN</i>	18
5.8. <i>CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO MEDIANTE ESPECTROFOTOFUOROMETRÍA</i>	19
5.9. <i>EVIDENCIAS DE BIODEGRADACIÓN DE QUITINA POR QUITINASAS</i>	20
5.9.1. <i>Obtención de quitina coloidal</i>	20
5.9.2. <i>Detección de la actividad enzimática de quitinasas y quitosanasas</i>	21
5.9.2.1. <i>Quitinasas de origen bacteriano (control)</i>	21
5.9.2.2. <i>Quitosanasas de origen fúngico (control)</i>	22
5.9.2.3. <i>Quitinasas de triatóminos</i>	22
5.9.3. <i>Análisis de quitinasas mediante electroforesis con quitina coloidal</i>	23
5.9.3.1. <i>PAGE-SDS y PAGE-NAT</i>	23
5.9.3.2. <i>PAGE-SDS- QC y PAGE-NAT- QC</i>	24
5.10. <i>IDENTIFICACIÓN DEL GEN DE LA QUITINASA</i>	25
5.10.1. <i>Predicción de quitinasas mediante análisis In Silico</i>	25
5.10.2. <i>Diseño de Cebadores (Primers) para efectuar la amplificación del gen buscado</i>	27
5.10.3. <i>Reacción de PCR del DNA genómico de triatóminos</i>	28
5.10.3.1. <i>Extracción y purificación del DNA</i>	28
5.10.3.2. <i>Amplificación por PCR punto final en gradiente</i>	30
5.10.3.3. <i>Electroforesis en Gel de Agarosa</i>	32
VI. RESULTADOS.....	33
6.1. <i>OBTENCIÓN DEL MATERIAL</i>	33
6.2. <i>QUITINA DE TRITÓMINOS HEMBRAS Y MACHOS</i>	34
6.3. <i>QUITINA OBTENIDA A PARTIR DE CAMARÓN</i>	35
6.4. <i>QUITINA OBTENIDA DE CHAPULÍN</i>	36
6.5. <i>ANÁLISIS DE CRISTALINIDAD DE LA QUITINA POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)</i>	39
6.6. <i>QUITOSANO OBTENIDO A PARTIR DE CAMARÓN, CHAPULÍN Y TRITÓMINOS</i>	40
6.7. <i>CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X DEL MONÓMERO DE GLN OBTENIDA DE TRITÓMINOS</i>	41
6.8. <i>ANÁLISIS POR ESPECTROFOTOFUOROMETRÍA DE LA INTERACCIÓN DEL CALCOFLUOR CON QUITOSANO DE (CAMARÓN, CHAPULÍN Y TRITÓMINOS)</i>	43

6.9. ANÁLISIS DE QUITINASAS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE-SDS, PAGE-NATIVA, PAGE NATIVA-QUITINA COLOIDAL Y PAGE SDS- QUITINA COLOIDAL)	52
6.9.1. Quitina coloidal	52
6.9.2. Cultivos bacterianos	52
6.9.3. Actividad enzimática mediante electroforesis en geles.	53
6.9.3.1. Quitinasas de bacterias	53
6.9.3.2. Quitinasas de triatomas	54
6.9.3.3. Quitosanasas de hongo	55
6.9.4. Electroforesis (PAGE-Nativa)	56
6.9.5. Actividad enzimática detectada en geles PAGE-QC	57
6.9.5.1. Geles de poliacrilamida - quitina coloidal	57
6.9.5.2. PAGE Nativa - Quitina coloidal	58
6.10. ANÁLISIS IN SILICO	62
6.11. ANÁLISIS POR PCR Y ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	69
VII. DISCUSION	71
VIII. CONCLUSIÓN	75
IX. PERSPECTIVAS	76
X. BIBLIOGRAFÍA	77
XI. ANEXOS	82

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, también llamada Tripanosomiasis Americana o Tripanosomiasis del nuevo mundo, es considerada la enfermedad parasitaria de mayor importancia en Hispanoamérica [1], tanto por su morbilidad como por su impacto económico [2]. Es producida por *Trypanosoma cruzi*, un protozoo que se aloja y reproduce en los tejidos del hombre y también en mamíferos, domésticos y silvestres. Los transmisores de la enfermedad o vectores, son insectos hematófagos conocidos en Latinoamérica como: chinches, chinche besucona, asesina, barbeiro, buscona, voladora, chupadora, vinchuca, chupasangre, chipo o turicata, etc. [1-5]. Los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus*, comprenden las especies más importantes desde el punto de vista epidemiológico [6, 7].

Estas chinches son hemípteros, hematófagos de hábitos nocturnos. La diferencia más notoria entre los cinco estadios ninfales y el imago (adulto) es la presencia de un par de alas en el segundo. Entre una y otra etapa ninfal, el insecto necesita alimentarse de sangre por lo menos una vez para sufrir el proceso de ecdisis o muda, en este fenómeno “bioquímico-fisiológico” el exoesqueleto que resulta de la metamorfosis lleva el nombre de exuvia y está compuesta principalmente por el biopolímero quitina, al igual que las ninfas y los adultos [8].

La quitina es el segundo compuesto orgánico más abundante en la tierra, solo superado por la celulosa. Este polisacárido lineal le brinda rigidez a la pared celular de hongos y al exoesqueleto de gran cantidad de artrópodos incluidos los insectos [9]. El biopolímero está compuesto por el monómero N-acetilglucosamina, unido en largas cadenas que forman microfibrillas dando lugar a tres formas naturales de quitina [10].

Estos insectos transmisores poseen quitina, y son vectores de diversas enfermedades como Chagas y la enfermedad del sueño, también los mosquitos que transmiten la malaria, el dengue y encefalitis por otros artrópodos más como pulgas y piojos. Debido a ello se ha sugerido que una estrategia que inhiba la formación de quitina sería un método ideal para combatirlos [11-15].

Por lo anterior y porque también se desconocen otros aspectos básicos del polímero en estos transmisores, este trabajo tuvo como objetivo principal la caracterización de la quitina

presente en ellos y también estudiar aspectos básicos en la biosíntesis y la biodegradación de la molécula aminopolisacarida constituyente principal del exosqueleto.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Tripanosomiasis americana

La enfermedad de Chagas fue descubierta por el médico sanitarista brasileño Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, quien trabajaba en el Instituto Seroterápico Federal de Manguinhos de Rio de Janeiro, Brasil, en el año de 1909 [16]. Sus estudios sobre protozoología le ayudaron a describir un nuevo parásito, el cual denominó *Trypanosoma cruzi*, como homenaje a su maestro Oswaldo Cruz [17].

Dicho parásito es un protozoario flagelado que se encuentra exclusivamente en el continente americano y es endémico en gran parte de Centro y Sudamérica, su presencia se extiende desde el norte de Argentina hasta Texas [2]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció que la enfermedad de Chagas ocupa el primer lugar entre las enfermedades tropicales y el cuarto lugar entre las enfermedades transmisibles, solo por debajo de las infecciones respiratorias agudas, enfermedades diarreicas y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) [1, 4, 18].

Esta enfermedad puede ser transmitida por vía vectorial (de 80 a 90%), de forma transfusional (5 a 20%) y por vía congénita (0.5 a 8%). Existen otras vías de transmisión excepcionales (por trasplante de órganos, por otros vectores, por lactancia, etc.) pero aún no se determina la importancia epidemiológica en términos de salud pública [18, 19]. Debido a que hay una amplia variedad en las tasas de prevalencia, vías de transmisión, características de los parásitos, patología clínica y reservorios entre una región endémica y otra, es difícil determinar con exactitud su incidencia y prevalencia [3].

La transmisión vectorial de dicha enfermedad la realizan los triatóminos mejor conocidos como chinches, en los cuales *Trypanosoma cruzi* generalmente sufre varios ciclos de desarrollo y multiplicación dentro del tracto digestivo del insecto, antes de que las formas infectivas puedan ser transmitidas a un nuevo mamífero, por las heces u orina infectada o

por ingestión del vector [20]. En este aspecto, los ciclos de vida de los tripanosomas patogénicos son muy diferentes, ya que *Trypanosoma brucei* que ocasiona la enfermedad del sueño en África es transmitido por la saliva de la mosca Tse-Tsé; sin embargo *T. cruzi*, lo hace por vía estercorearia (heces y orina) [19, 16].

2.2. Triatóminos

Los triatóminos son artrópodos ubicados en la clase *Insecta* (insectos) y el orden *Hemíptera*, que se caracterizan por tener un cuerpo blando pero partes bucales penetrante y/o chupadora. Hemíptero significa “ala-parcial”, viene del grupo de los heteróptera (alas diferentes), la mayoría tienen alas anteriores que se conocen como hemiélitros [9]. En esta categoría encontramos a la familia *Reduviidae* la cual está conformada por 23 subfamilias y una de ellas es la de los hematófagos obligados denominada *Triatómino* (triatóminos), misma que comprende las tribus *Alberprosinini*, *Bolboderini*, *Cavernicolini*, *Rodniini* y *Triatomini*; de la primera y la tercera no se han descrito ejemplares en México [16].

Hasta el momento se conocen 50 géneros de triatóminos infectados naturalmente con *Trypanosoma cruzi*, y se han identificado más de 130 especies de chinches como vectores potenciales de dicho parásito [4]. En la República Mexicana se distribuyen un mínimo de 32 especies de triatóminos entre los que destacan por su importancia epidemiológica: *Triatoma dimidiata*, *Meccus longipennis*, *Triatoma barberi*, *Triatoma phyllosoma*, *Triatoma pallidipennis*, *Triatoma picturata* y *Rhodnius prolixus* las cuales están distribuidas en diversas entidades [21, 22]. En el estado de Hidalgo se encuentran las siguientes especies: *Triatoma dimidiata*, *Triatoma gerstaeckeri*, *Triatoma mexicana* y *Triatoma barberi* [23, 24]. Cabe destacar que *Triatoma barberi* es considerado como el vector más importante en la República Mexicana y se reconocen como habitantes domiciliarios y peri domiciliarios, es decir, se les encuentra en el interior de las casas o en la periferia de las mismas.

Se ha determinado que por el comportamiento del vector se pueden distinguir tres formas de transmisión: silvestre (en ambientes tropicales y contaminados de forma natural), doméstica (por invasión domiciliaria) y peri doméstica (acercamiento de las chinches alrededor de los domicilios pero sin entrar o invadirlos) [4]. Es decir, el riesgo de infección

aumenta cuando las condiciones ecológicas son favorables para la entrada o permanencia de los triatóminos infectados en las viviendas humanas, principalmente en el medio rural.

En el aspecto biológico, los triatóminos poseen un aparato chupador denominado probóscide, el cual está provisto de una lanceta que sirve para perforar la piel de los mamíferos (figura 1) y así poderse alimentar succionando la sangre de los mismos, además poseen un par de antenas divididas en cuatro segmentos ubicadas frente a los ojos [7]. Una forma somera para diferenciar a los tres géneros principales de vectores de la enfermedad de Chagas (*Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus*) es la distancia relativa entre las antenas y los ojos, así como la forma de la cabeza, ya que en cada género es diferente. El género *triatoma* (tres segmentos) fue creado por error en 1833 por Laporte, ya que se basó en especímenes de museo los cuales tenían rotos parte de los segmentos antenales [16].

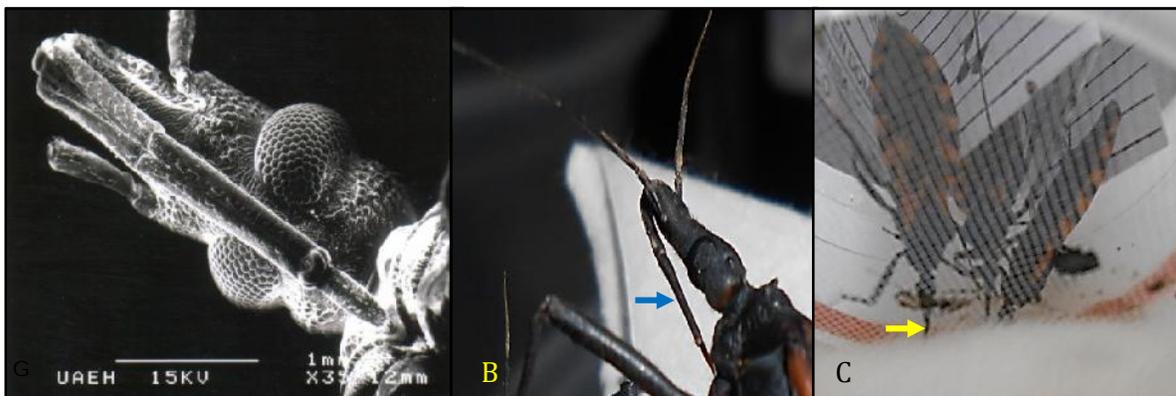


Figura 1. Acercamiento a la cabeza de un triatómino. En A y B se muestra un acercamiento a la cabeza, se señala con una flecha (color azul) la probóscide. Esta estructura le sirve para penetrar en la piel y alimentarse de sangre de cualquier mamífero como se puede observar en C.

En el ciclo de vida de los triatóminos que incluye cinco estadios ninfales y un estadio adulto, se desarrolla una metamorfosis incompleta, por ello también se les considera como hemimetábolos. Es decir que, para que puedan desarrollarse de una a otra etapa, ambos sexos necesitan alimentarse con sangre, por lo que se les denomina hematófagos obligados, cuando el insecto hembra llega a la fase adulta necesita alimentarse cada tres o cuatro semanas para sobrevivir y poder producir huevos, y desde luego también los machos; la parte importante de este comportamiento de supervivencia para la salud del ser humano que podría ser irrelevante, es que tanto las cinco ninfas como los adultos, al ingerir sangre infectada adquieren al parásito y se vuelven transmisoras [7].

Como resultado del crecimiento y desarrollo de los diferentes estadios ninfales se produce la ecdisis o muda de cutícula, y queda un residuo del exoesqueleto llamado exuvia, esta al igual que el exoesqueleto de los insectos adultos e inmaduros están compuestos principalmente por quitina, polímero que le brinda rigidez y consistencia a cada uno de los artejos y tegumentos de triatómino [12, 13].

2.3. Quitina

La quitina fue descubierta por Henri Braconnot en 1811 denominándola “fungine”; en 1823 E. Odier le dio el nombre de “Chitin”, o en español quitina, cuya etimología griega alude al significado de “túnica, envoltura” [25, 26]. Por otro lado, el producto de la digestión de quitina insoluble es el quitosano, descubierto por Rouget en 1859. Esta quitina modificada, como se llamó, se coloreaba de violeta con soluciones diluidas de yoduro y ácido [26].

Este biopolímero es un polisacárido compuesto por largas cadenas de monómeros de N-acetilglucosamina (NAG), unidos covalentemente por enlaces glucosídicos (figura 2). Las cadenas de NAG se unen entre sí por enlaces de hidrógeno, formando microfibrillas que constituyen una gran matriz [27]. La NAG es una molécula con forma de un hexágono irregular con dos extremos: uno reductor en el carbono 1 de tipo aldehído y otro no reductor en el carbono 4 de tipo alcohol, de tal manera que en una cadena siempre habrá dos extremos distintos, uno reductor y otro no reductor, además los grupos hidroxilo ($-OH$) establecen interacciones por enlaces de hidrogeno que darán origen a una estructura cristalina muy estable. En 1948, Matsushima obtuvo la primera patente por la producción de glucosamina a partir de los esqueletos del cangrejo [11, 13, 25].

Existen tres formas naturales de quitina: alfa, beta y gamma [28]. La más abundante es la alfa (α), y está constituida por cadenas antiparalelas, es decir, cada cadena dispuesta en un sentido se asocia con otra orientada en sentido contrario. En la beta (β) las cadenas se organizan paralelamente, con los grupos reductores libres de las cadenas dispuestas en el mismo extremo y los grupos no reductores en el lado opuesto. La gamma (γ), es la más rara, ya que por cada cadena dispuesta en un sentido se presentan dos orientadas en sentido opuesto [24, 27, 29]. Las tres formas de quitina se han encontrado en diferentes partes del mismo organismo, como en el caso del calamar *Loligo* cuyo pico contiene α -quitina, la

pluma contiene β -quitina y la que delinea el estómago contiene γ -quitina. Este aspecto de la naturaleza indica que las tres formas son relevantes a las diferentes funciones y no al agrupamiento animal [26].

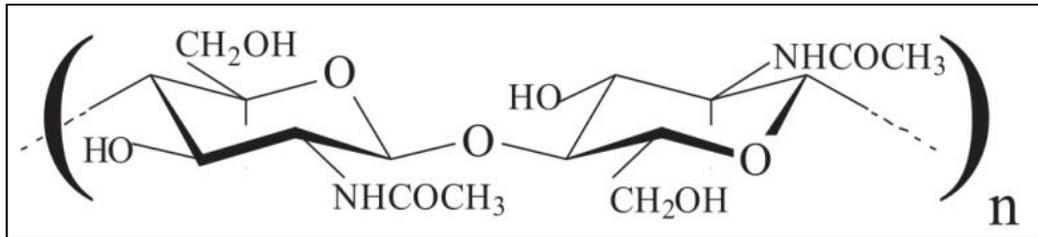


Figura 2. Estructura química de un dímero de N-acetilglucosamina. Esta cadena se une por enlaces de hidrogeno a otras conformando el biopolímero quitina [28].

La cadena de quitina puede considerarse como una hélice de N-acetil-D-glucosamina, con un número de dos residuos por vuelta. El análisis por difracción de Rayos X distingue nítidamente las tres formas, pues difieren en su estructura cristalina siendo los isómeros nativos los que confieren diferentes propiedades, por ejemplo la forma alfa es la más rígida y cumple con funciones de soporte o esqueléticas, en tanto que las otras dos al ser capaces de hidratarse desarrollan unas propiedades mecánicas similares a las del cartílago, es decir que son flexibles pero resistentes a la vez [25, 28]. La β -quitina (figura 3) puede incorporar varias pequeñas moléculas, como agua, alcoholes y aminas en su rejilla cristalina para formar complejos cristalinos (denominados cristalosolvatos) [26].

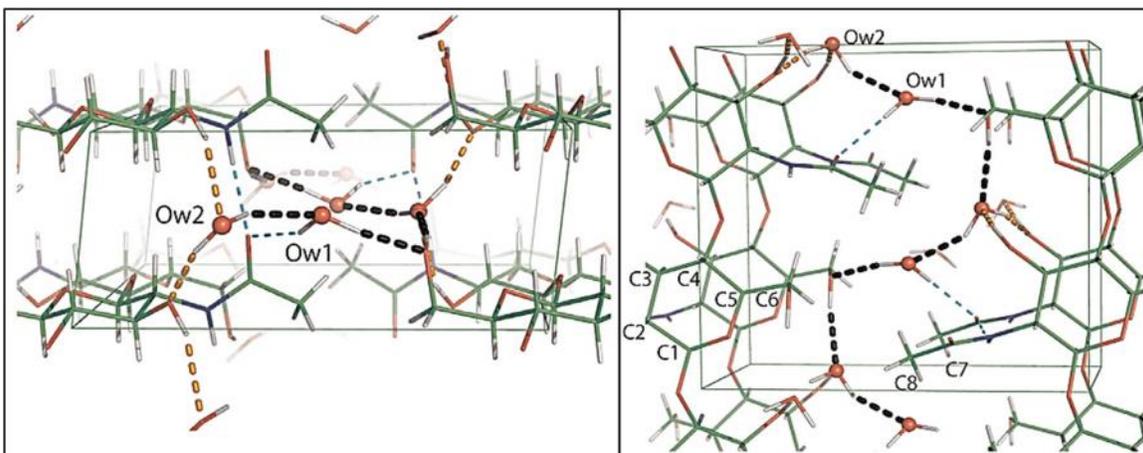


Figura 3. Modelos estructurales y redes de enlaces de hidrógeno de la β -quitina dihidratada. Vistas a lo largo de la dirección de la cadena y en el eje de proyección ab. Dos moléculas de agua por unidad de N-acetilglucosamina se localizan en la estructura y participan en los enlaces de hidrogeno, haciendo a la conformación más relajada. Un enlace de hidrogeno ausente es importante para la solvatación [30].

La quitina es un material insoluble en la mayoría de los disolventes convencionales, posee excelentes propiedades mecánicas que le permiten la formación de fibras y películas biodegradables [29], entre sus principales derivados encontramos al quitosano, obtenido a través de la desacetilación máxima del biopolímero. Como la quitina y el quitosano son inocuos tanto para los organismos que los utilizan así como para el ambiente que los recibe, tienen una gran variedad de aplicaciones abarcando diversos campos [29, 31].

A la quitina se le ha prestado especial atención para su explotación y uso, en la medicina como cicatrizante y anticoagulante [31], en cromatografía como soporte e inmovilizante de enzimas [32], en farmacia como excipiente y transportador de medicamentos, en la agricultura para el mejoramiento de los productos previniendo la infección por hongos y bacterias, en la industria se está utilizando para la elaboración de telas y diferentes variedades de papel [32, 33]. Así mismo es capaz de atrapar iones metálicos de transición por quelación, intercambio iónico o enlaces covalentes coordinados y de esta manera producir complejos con iones metálicos, debido al papel de polielectrolito la quitina se ha empleado en la descontaminación de aguas industriales y para el tratamiento de efluentes [34]. Cabe mencionar también que la quitina así como el quitosano, que es más aprovechado, provienen de diversos crustáceos, en su mayoría del camarón, que posee alfa-quitina y de la cual se obtiene alfa-quitosano, sin embargo, se ha dejado de lado el aprovechamiento de este recurso proveniente de insectos de los cuales también es posible obtener alfa-quitina y alfa-quitosano de gran calidad [28, 32]. Los chapulines, los saltamontes e incluso las cucarachas pueden ser buenos prospectos para lo anterior.

La obtención de la quitina, el quitosano, n-acetilglucosamina o quitobiosa en muchas ocasiones involucra la intervención y empleo de complejos enzimáticos y generalmente son manejados a nivel industrial. En los complejos se encuentra el grupo de las enzimas quitinasas y quitosanasas, encargadas de descomponer o degradar la quitina o el quitosano en unidades más pequeñas de manera natural y sin efectos contaminantes, al contrario de como sucede cuando se obtienen de manera un tanto “artificial” usando métodos químicos, por ello a últimas fechas se les ha prestado especial atención a estas proteínas para la producción más “natural” a gran escala de estos valiosos biopolímeros.

2.4. Biodegradación y quitinasas

La biodegradación de quitina en organismos como bacterias, hongos y más abundantemente en insectos [35] la realizan las enzimas quitinasas capaces de hidrolizar la quitina hasta su monómero la N-acetilglucosamina (NAG); se encuentran clasificadas dentro de las glicosilhidrolasas, en las familias 18, 19 y 20. La familia 18 de quitinasas es un complejo enzimático clave e indispensable [26]. En los insectos, las quitinasas comparten un alto grado de homología en la secuencia de sus aminoácidos, tienen masas moleculares que oscilan entre 40 – 80 KDa, pH óptimo de 4 a 8 y puntos isoeléctricos entre 5 – 7 [27, 35]. La estructura básica y general que compone a este gran complejo y familia de enzimas está dada por tres dominios principales: 1) una región catalítica, 2) una región PEST, compuesta principalmente por Pro, Glu, Ser y Tre, y 3) una región rica en cisteína [27].

Las quitinasas también se clasifican en dos categorías de acuerdo al lugar donde se lleva a cabo la reacción de hidrólisis en el sustrato, por lo que pueden ser endoquitinasas o exoquitinasas. Las endoquitinasas se unen de manera aleatoria a sitios internos, lo cual genera polímeros de bajo peso molecular de NAG, tales como quitotetrosa, quitotriosa y diacetilquitobiosa. Las exoquitinasas se dividen en dos grupos las quitobiosidasas y las -1-4-N-glucosaminosidasas; las primeras catalizan la liberación de diacetilquitobiosa comenzando con los extremos terminales no reducidos de las microfibras de la quitina, las segundas se unen a productos oligoméricos de endoquitinasas y quitobiosidasas generando monómeros de NAG [27, 33, 35, 36].

Las quitinasas son enzimas que generalmente son producidas por organismos quitinosos, sin embargo, algunos que no están constituidos de quitina también pueden llegar a producirlas, como en el caso de diversas bacterias y algunas plantas. En estas, la enzima funciona como mecanismo de defensa contra hongos fitopatógenos [29]; y en bacterias u otros microorganismos no quitinosos, las quitinasas funcionan de manera inducible y extracelularmente digiriendo a la quitina empleándola como fuente de carbono y nitrógeno, desempeñando así un papel de biodegradación [35, 36]. En la actualidad hay un gran interés por el estudio de las quitinasas debido a sus diversas aplicaciones como biocontrol de hongos patógenos en plantas, de mosquitos, para interrumpir la muda de insectos y control de plagas, también en la producción de quitoooligosacáridos para la agricultura, producción

de enzimas micolíticas [37], recuperación de productos alternos a partir de desechos quitinosos tales como quitosano, quitina purificada y astaxantina [38].

El papel biológico de las quitinasas en organismos constituidos por quitina (como hongos y artrópodos) es la modificación o renovación de estructuras quitinosas, mediante reacciones de biosíntesis y biodegradación, permitiendo de esta manera su expansión o crecimiento [35, 37]. Un ejemplo particular son los insectos vectores de la Tripanosomiasis (triatóminos) y diversas enfermedades, los cuales están provistos de un exoesqueleto de quitina y cuyo ciclo de vida está dado por diversos estadios ninfales en los cuales es necesaria la renovación de artejos y tegumentos (exoesqueleto) mediante el fenómeno de ecdisis o muda para poder desarrollarse al aumentar de talla. En estos transmisores, el complejo enzimático de las quitinasas tiene su participación de manera crucial al permitir la generación de exuvias y probablemente la expansión corporal al momento de la alimentación [27], sin embargo, poco se sabe acerca estos complejos enzimáticos (quitosomas) ya que en la actualidad solo hay una quitinasa putativa (probable) registrada en las bases de datos bioinformáticas perteneciente a *Rhodnius prolixus*, única especie con el genoma recientemente secuenciado por completo.

III. JUSTIFICACIÓN

La Tripanosomiasis o enfermedad de Chagas es considerada como uno de los problemas de salud más importantes en Latinoamérica. Por ello la OMS cambió de estrategia en el combate de las enfermedades transmisibles hacia el eslabón constituido por los vectores [2], recomendando el estudio y conocimiento sobre estos organismos capaces de transmitir el parásito causante de dicha enfermedad, pues puede conllevar a un importante avance epidemiológico y pudiera representar una de las principales estrategias para el control de la enfermedad.

Debido a lo anterior se ha pensado en caracterizar a la quitina presente en los insectos vectores de la enfermedad de Chagas pues hasta el momento se desconoce muchos aspectos básicos, con la finalidad de poder desarrollar a futuro una estrategia de control basada en el proceso de la biodegradación de la quitina, a través de la inhibición de las enzimas quitinasas o quitosanas, es decir que podría traer consigo el diseño de un compuesto bloqueador o insecticida altamente específico y quizás eficaz para combatirlos, alterando el ciclo de vida de los triatóminos donde están estos complejos enzimáticos efectuando reacciones de biosíntesis y de biodegradación de la quitina. Estas enzimas se han clasificado como quitinasintasas (síntesis) y quitinasas (degradación). La participación de estos complejos enzimáticos son de vital importancia para el desarrollo de los triatóminos, como se mencionó antes. En ese aspecto, si se viera interrumpido alguno de estos procesos al ser inhibido o bloqueado el complejo enzimático de las quitinasas, volvería vulnerables tanto a ninfas como adultos impactando en su crecimiento, desarrollo y su exoesqueleto, lo que se reflejaría de manera negativa en los índices de ovoposición, reproducción y supervivencia, ya que también afectaría directamente las tasas de infección por vía vectorial.

IV. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo general*

- Caracterizar la quitina presente en algunas especies de triatóminos transmisores de la enfermedad de Chagas.

4.2. *Objetivos específicos*

- Identificar el tipo de quitina que constituye el exoesqueleto de los triatóminos de las especies *Triatoma dimidiata*, *Triatoma barberi* y *Meccus longipennis* empleando FTIR, difracción de rayos X, cristalografía de rayos X y espectrofotofluorometría.
- Describir algunas características bio-físico-químicas y moleculares (Peso molecular, subunidades, actividad enzimática, formas cristalinas, grado de desacetilación, etc.) tanto de la quitina como de las enzimas quitinasas presente en los triatóminos mediante cristalografía de rayos X y electroforesis en gel de poliacrilamida – quitina coloidal.
- Mediante análisis “*In silico*” buscar la presencia de genes de quitinasas empleando la información de bases de datos de otros vectores hematófagos como *Aedes*, *Rhodnius* y *Anopheles*, para diseñar los iniciadores y amplificar por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) los genes de las quitinasas en las especies de triatóminos *Triatoma dimidiata*, *Triatoma barberi* y *Meccus longipennis*.

V. MATERIALES Y MÉTODO

5.1. Cultivo de los insectos

Las especies de triatóminos *Meccus longipennis*, *Triatoma barberi* y *Triatoma dimidiata* se cultivaron en el laboratorio en recipientes de plástico a una temperatura de 25-28°C y a 55-70% de humedad relativa en una incubadora. Los insectos se alimentaron periódicamente empleando ratas, mismas que se inmovilizaron con planchas especiales y en otras ocasiones se anestesiaron para tal propósito.

5.2. Obtención y preparación del material biológico (triatóminos)

Todos los triatomas obtenidos de los cultivos (ninfas y adultos) se preservaron en etanol absoluto o al 70%. Después de sacarlos del etanol, se dejaron secar durante 3 días a 37-39°C. En seguida se separaron las ninfas de los adultos, para emplear las primeras para los ensayos de quitinasa y los segundos para el tratamiento de extracción y caracterización de quitina correspondiente a tres géneros *Meccus longipennis*, *Triatoma barberi* y *Triatoma dimidiata*.

5.3. Extracción de beta-quitina a partir de triatóminos (Meccus longipennis)

Adicionalmente otro lote de insectos adultos únicamente de *Meccus longipennis* fueron separados en hembras y machos, y después se disecaron las regiones abdominal y dorsal así como artejos, alas y cabeza. Los intestinos, órganos internos y linfa se retiraron también pero no se analizaron. Para este trabajo solo se usó la región abdominal y dorsal del exoesqueleto, las secciones dorsales se recortaron en pliegues e interpliegues para realizar una comparación entre los mismos. Antes de pesarlos, se lavaron con agua destilada y una vez secos se pesaron los sectores recortados de hembras y machos (abdomen, interpliegues y pliegues). También se procesaron las exuvias de diferentes estadios ninfales para extraer la quitina.

De los adultos empleados se separaron artejos (patas y antenas), cabeza, alas e intestinos del cuerpo o exoesqueleto, y este último fue lo que se empleó para la extracción de quitina debido a su alto contenido en biopolímero y bajo contenido en proteínas y lípidos, y fue

separado en regiones ventral y dorsal, los cuales se sometieron a lavados con agua destilada, para quitar restos de intestinos y hemolinfa, y después se dejaron secar a 37°C durante 24 h. En seguida las muestras se molieron en licuadora 3 veces con moliendas de 2 minutos cada una. De manera adicional, a todas las muestras se volvieron a trituraron en molino de discos por dos ciclos. En total se emplearon 85 hembras y 94 machos.

Inicialmente se obtuvo 50 gramos (peso total), 18.4 g de los machos y las hembras 31.5 g. Después de la disección las muestras de hembras pesaron 5.1 g y de los machos 3.1 g. Al dividir los exoesqueletos (en regiones ventrales y dorsales) y posterior a los lavados las muestras de hembras pesaron 3.4803 g y las muestras de machos pesaron 2.2404 g. Al final de las moliendas (licuadora y molino) la muestra de hembras pesó 3.0231 g y la muestra de machos 2.1435 g.

La digestión de la quitina comenzó con la desproteínización alcalina de las muestras, en matraces de 250 ml, a los cuales se agregó 125 ml de NaOH 5M, pH 12-13 durante 2 h a 63-65°C en agitación a 200 rpm. Después las muestras se lavaron cinco veces con 1 litro de agua destilada. Se emplearon tubos cónicos de 15 ml y se centrifugó en porciones de muestra, a 500 rpm durante 5 minutos, vertiendo únicamente 13 ml de muestra en cada ocasión y por tubo, para evitar derrames. Después de centrifugar, a cada tubo se le recolectó el sobrenadante cuidadosamente con una pipeta Pasteur y se filtró para facilitar su posterior recolección. En las sucesivas centrifugaciones, se obtuvieron paquetes de quitina desproteínizada en el fondo de los tubos que tenía un aspecto oscuro color marrón. Una vez separadas las proteínas, pigmentos y otros restos disueltos en el NaOH sobrenadante (el cual tomó un aspecto viscoso de color café oscuro) se recolectó y almacenó a temperatura ambiente).

Al paquete total de quitina obtenido, se le realizaron 3 lavados con agua destilada agregando entre 9-11 ml de agua destilada hasta llenar a la marca de 13 ml del tubo, evitando derrames. Después se agitaron en vortex por 30-40 segundos hasta deshacer el pellet de quitina, posteriormente se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min, después se extrajo y filtró el sobrenadante empleando maya mosquitera de calado muy fino, en el fondo se obtuvo nuevamente un paquete de quitina al cual se le quitó cuidadosamente el máximo de agua posible (esta agua tomo un color café muy oscuro). Se agregó agua

destilada, se agitó en vortex y se centrifugó nuevamente, esto se realizó 3 veces, al final del último lavado se agregó agua y se agitó en vortex por un minuto, pero en esta ocasión no se centrifugó, solo se dejó en reposo durante 18-20 h.

Pasado el tiempo de reposo (20 horas aprox.) se extrajo el máximo de agua posible, realizando seis lavados adicionales, este procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera: Se llenó con agua destilada hasta 13 ml del tubo cónico (capacidad máxima 15 ml), se agitó en vortex hasta deshacer el “pellet” (aprox. 30-40 segundos), después se centrifugó a 2000-3000 rpm durante 5 a 6 min, se quitó el máximo de agua posible empleando micropipetas y cuidando de no deshacer el “pellet”, en el último lavado se filtró el “pellet” de quitina usando maya mosquitera fina, se agregó nuevamente agua destilada limpia y se dejó sedimentar durante 12 días a temperatura ambiente.

Después de 12 días de reposo, se procedió a quitar el agua de los tubos y se obtuvo las fracciones o paquetes de quitina obtenidos previamente. Se utilizó HCl al 1M pH 2.2 para extraer los minerales de las muestras tanto de machos como de hembras. Se colocaron en un matraz Erlenmeyer y se pusieron en agitación constante (usando agitador magnético) a aproximadamente 200 rpm, entre 29 y 31°C durante dos horas y media. De manera adicional se decidió dejó 1 hora más en HCl al 1M pH 2.2 a 30-33°C para lograr una desmineralización más completa.

A continuación se realizó más lavados con agua destilada en matraz y con agitación como se describe enseguida: Se escurrió la quitina mediante maya mosquitera fina, se dejó escurriendo durante 5 min, se recolectó el HCl pues aún tenía restos de quitina ultrafina. Posteriormente se regresó la quitina escurrida al matraz y se le agregó 150 ml del agua destilada, se puso en agitación durante 3 min, pasado el tiempo se dejó sedimentar deteniendo la agitación por 2 min, luego se quitó agua por decantación y se dejó escurriendo la quitina durante 30 min empleando maya mosquitera, este procedimiento se repitió 5 veces, con lo cual se logró eliminar cualquier exceso de ácido presente.

Después de quitar el HCl con los lavados, se agregó 100 ml de etanol absoluto en un matraz y se vertió la quitina mezclando por agitación manual, se incubó a 30°C durante 24 h,

después de esto se retiró el etanol y se agregó nuevo etanol (100 ml) y se dejó durante 48 h a 37°C. Con esto se eliminaron los pigmentos presentes en la quitina.

Finalmente se retiró el etanol y se quitaron los excesos empleando maya mosquitera, una vez escurrida la quitina se puso en un vaso de precipitado (machos y hembras por separado) extendiéndola en el fondo para comenzar el proceso de secado, para lo cual se dejó de 4 a 5 días a 30°C en estufa. Al final del proceso la quitina de hembras y de machos se pesó y almacenó a temperatura ambiente en frascos ámbar identificados y tapados.

5.4. Extracción de alfa-quitina a partir de camarón y chapulín

Las extracciones se realizaron a partir de 1 kg en peso seco de camarón o de chapulín, de manera independiente, es decir, todo el procedimiento se llevó a cabo para cada muestra de manera independiente.

Las muestras (camarón y chapulín) se trituraron con mortero y se lavaron con abundante agua de la llave. En el caso de los camarones se separó el cuerpo carnoso del exoesqueleto antes de proceder con los lavados. Se dejaron reposar las muestras trituradas en un contenedor con agua durante 10 min, luego se eliminó el agua con ayuda de un colador y se volvió a dejar remojando, esto se repitió un total de 5 veces con volúmenes de 1 litro en cada lavado. Después se realizaron 3 lavados con 500 ml de agua destilada dejando 25 min de reposo entre lavado y lavado, finalmente se dejó la muestra remojando en 1 litro de agua destilada durante 24 horas a 4°C. Posteriormente se eliminó el máximo de agua y las muestras se dividieron en 7 partes iguales, a cada fracción se le hizo 3 moliendas en licuadora de 30 segundos cada una, se utilizó un bazo para papilla y 150 ml de agua destilada, al final de la molienda se dejó reposar unos minutos y se eliminó el agua por decantación.

Se vertieron las fracciones en diferentes matraces Erlenmeyer de 250 ml, se les agregó 150 ml de NaOH al 5M pH 13 y se calentaron a 61-63°C con agitación constante a 300 rpm durante 15 h en un agitador automatizado (Thermo Scientific modelo MaxQ 4450), en este paso las muestra se liberan de todas las proteínas presentes. Después del tiempo mencionado, se retiró el NaOH y se juntaron las diferentes fracciones en un contenedor grande. Se realizaron lavados usando 1 L de agua destilada y agitando con magneto en parrilla eléctrica a 950 rpm durante 30 min, después se filtró la muestra empleando un

colador metálico de calado fino y maya mosquitera ultrafina, lo atrapado en la tela se exprimió y compactó al máximo para formar una pequeña pelotita con el mínimo de agua posible, después de esto se volvió a juntar todo en el contenedor y se agregó nuevamente agua para un nuevo lavado, repitiéndose de esta manera un total de 5 veces, con lo cual se eliminó por completo cualquier resto de NaOH.

Para desmineralizar las muestras se dividieron nuevamente en 7 partes iguales en matraz Erlenmeyer de 250 ml, se agregó 100 ml de HCl 1M pH 2.2, se calentó a 30-33°C y se agitó a 300 rpm durante 6 h. Pasado este tiempo se filtró y escurrió el HCl, el cual se desechó en los residuos químicos correspondientes. Para quitar el exceso de ácido se realizaron 4 lavados con agua destilada empleando un recipiente amplio y 1 L de agua entre cada lavado de la misma manera en la que se hizo para retirar el NaOH. Luego del último lavado, la quitina se dejó en 500 ml de agua destilada durante 24 h. Después se exprimió y se dividió en porciones iguales colocándolas en matraces Erlenmeyer en los cuales se agregó 100 ml de etanol absoluto a cada fracción, se taparon y se dejaron a 29-31°C durante 24 h. Pasado este tiempo se retiró el etanol, y se lavó la quitina 3 veces con agua destilada como se describió anteriormente, al final del último lavado se dejó nuevamente en 100 ml de etanol absoluto pero en esta ocasión a 37°C durante 48 h, con lo cual se eliminó los colorantes naturales de la quitina.

Finalmente se retiró el etanol y excesos del mismo escurriendo y exprimiendo la quitina con ayuda del colador y la malla mosquitera, una vez separada se expandió en un refractario de vidrio y se dejó secar en estufa a 35°C durante 3-4 días. La quitina se sacó de la estufa completamente seca y lista para su análisis y caracterización. Para terminar la quitina de camarones y chapulines se pesó y almacenó a temperatura ambiente en frascos ámbar identificados y tapados.

Cabe destacar que al final del proceso la quitina de camarón se obtuvo con un aspecto de hojuelas blanquecinas y finas, mientras que la quitina de chapulín se obtuvo en una combinación de hojuelas y fibras color café claro, aunque al principio el aspecto fue de hojuelas gruesas en color café oscuro.

5.5. Caracterización química de quitina por FT-IR

La caracterización de quitina de camarón, chapulín, y triatóminos (hembras y machos por separado), extraídas por métodos químicos en el laboratorio como se describió previamente; así como quitina de hongo (extraída en el laboratorio de biopolímeros de la Universidad Autónoma Metropolitana campus Iztapalapa) y quitosano comercial marca KITOMED®, se realizó por Espectroscopia de Infrarrojo de la Transformada de Fourier (FT-IR). En todos los casos las muestras se obtuvieron y analizaron de forma sólida.

Cada una de las muestras se pulverizó y empacó con bromuro de potasio (KBr), para realizar las lecturas en un rango de 370 a 4000 cm^{-1} usando un cristal de Seleniuro de Zinc (ZnSe) con “Horizontal Attenuated Reflectance Transmittance”. Para ello se empleó un Espectrofotómetro GX ® Perkin-Elmer el cual se opera con el software The Spectrum v.3.02.

Posteriormente los espectros se procesaron y analizaron con el software LabCognition® Panorama Fluorescence 1.1. y Origin 9.

Estas pruebas se realizaron en el laboratorio de Espectrofotometría del Centro de Investigaciones Químicas del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (ICBI-UAEH).

5.6. Caracterización del estado cristalino mediante difracción de rayos X

La comparación y análisis de la orientación cristalográfica así como la cantidad relativa de la propiedad cristalina en muestras de beta-quitina de triatóminos (hembras y machos por separado) y de alfa-quitosano de camarón (Kitomed®) a través de un difractograma, se midió por métodos de reflexión, realizados con un Co KR de Rayos-X en un difractómetro de Rayos-X Modelo PW1710 operado a 40kV, con un tamaño de paso de 0.02 y tiempo de colección de 1 segundo a través de un ángulo 2θ en un rango de 3° - 110° . El espectro de difracción fue procesado usando el programa X'Pert High Score ver. 2.0 con referencia a la base datos Power Diffraction File ver. 4.0 2009 del Centro Internacional de datos de Difracción (Newton Square, PA).

Este análisis se realizó en el laboratorio de Rayos X del área académica de Ciencias de los Materiales del ICBI-UAEH.

5.6.1. Cristalografía de Rayos X de monocristales

A partir de ejemplares adultos de triatomas se obtuvo la quitina, después se inició la hidrólisis en un matraz redondo de 100ml con 1ml de HCl concentrado, se mantuvo el reflujo durante 80 horas con agitación constante, adicionando lentamente 1ml de ácido clorhídrico concentrado cada hora. En total el volumen de ácido fue de 80 ml. Después se cambió el refrigerante a posición de destilación para eliminar el HCl y dejar la muestra únicamente. Después se recristalizó a partir de una solución con Agua destilada – Etanol - Acetona en proporción 1:3:1, se llevó a ebullición y se le adicionó 5 gotas de HCl concentrado y 5 ml de carbón activado. Se dejó en reposo por un periodo de 30 días a 4°C y al final se obtuvieron cristales microscópicos. La difracción se efectuó con un solo cristal del tamaño adecuado, seleccionado con ayuda del microscopio, y analizado con el equipo Xcalibur, Atlas, Gemini Diffractometer. El cristal se mantuvo a 150.00 (10) K durante la obtención de los datos. Empleando el software **Olex2** [39], se resolvió la estructura con la ayuda del programa **ShelXS** [40] *Direct Methods* y se refinó con el programa **ShelXL** [41] *Refinement Package* usando *Least Squares Minimisation*.

Este análisis se realizó en colaboración con el laboratorio de Química orgánica y el laboratorio de cristalografía de Rayos X de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

5.7. Obtención de quitosano a partir de quitina de triatóminos, camarón y chapulín

Se colocó 1 g de quitina de camarón y otro de chapulín en 40 g de NaOH en lentejas y se completó a un volumen de 100 ml, para los triatóminos hembras y machos, la cantidad fue de 0.5 g de quitina en la mitad de NaOH y del volumen indicado. Todas las muestras se esterilizaron a 121°C y 15 libras de presión durante 1 h; después se separó el sobrenadante (quitosano combinado con el NaOH) y el sedimento (hojuelas de quitina). El sobrenadante mostro un pH de 12, por lo que para poder separar el quitosano del NaOH se neutralizó y sometió a diálisis contra agua destilada en membrana. El procedimiento brevemente fue, a

5 ml del sobrenadante obtenido se transfirió en la membrana de diálisis con 5 L de agua destilada y con agitación; cada 30 minutos se midió el pH, continuando los cambios de agua hasta que mostrara pH 7. Después se retiró la membrana, se vació en un vaso de precipitado y se neutralizó el pH por completo. Se dejó secar la muestra en estufa a 40°C durante 48 h y al final se recolectó el quitosano, se preparó y guardó a temperatura ambiente para su posterior análisis.

Cabe destacar que una vez neutralizada la muestra se puede observar en el interior de la membrana la aparición de pequeñas fibras y hojuelas diminutas de quitosano.

5.8. Caracterización del quitosano mediante espectrofotofluorometría

El análisis por espectrofotofluorometría, se realizó para demostrar interacción entre el fluorocromo calcofluor y el quitosano obtenido, procedente de quitina de camarón, chapulín y triatóminos (hembras y machos) así como el comercial ®KITOMED como control positivo. Como control negativo se usaron colorantes como Rodamina y Orange II, así como la proteína albúmina sérica bovina.

Se realizaron espectros de emisión y excitación en 2 dimensiones (2D Emission y 2D Excitation) a 270, 342, 432, y 550, en un rango de longitud de onda de 250 a 600 nm. Con estos espectros se seleccionaron algunas condiciones para realizar espectros de triple dimensión 3D (3D Emission/Excitation) en un rango de 250 a 550 nm.

Los espectros de las muestras de quitosano se midieron en buffer de acetatos pH 4.5, de succinato pH 5.5, de fosfatos pH 7.5, fosfatos pH 9.0 y agua destilada pH 7.

Se empleó un espectrofotómetro computarizado de ultravioleta (UV)-visible modelo 8453 (Agilent y software ChemStation v1.0.1) y un espectrofotofluorómetro RF-5301PC (Shimadzu®, con lámpara de Xenón) con capacidad gráfica (“render”) a 3D, operado con el software Lab Cognition® Panorama Fluorescence ver. 2.1.1 Online.

Para establecer las condiciones estándar de las pruebas, primero se calibró el espectro con alguna de las soluciones reguladoras o agua según el caso, el volumen final considerando para ajustar las concentraciones fue de 1 ml ya que la celda de cuarzo especial empleada

tiene una capacidad máxima de 0.8 ml (0.5x0.5mm paso de luz). Las lecturas de fluorescencia máximas del calcofluor en los buffers y agua se obtuvieron empleando únicamente 1 µl (concentración de 0.01 g/mol), 2 µl o 3 µl según la concentración a probar. El volumen de las muestras no rebasó el 10% del volumen total, como se recomienda, lo que significa agregar volúmenes de 0.5 µl de las muestras a ensayar, es decir quitosano comercial, quitosano de camarón, quitosano de chapulín y quitosano de triatóminos (hembra y macho por separado), para hacer los espectros siempre se mantuvo este orden al agregar las muestras.

Una vez obtenidos los espectros, los realizados en 2D se procesaron y analizaron con los programas Microsoft Excel 2010 y Origin 9, mientras que los realizados en 3D se analizaron con el software Panorama Fluorescence ver. 2.1.1 Offline, para reportarlos como resultados en modo Image Export-PNG por Graph 3D view y Graph Top view.

5.9. Evidencias de biodegradación de quitina por quitinasas

5.9.1. Obtención de quitina coloidal

En un tubo de vidrio de 16x150 con 5 ml de agua destilada más 5 ml de ácido fosfórico concentrado (grado reactivo al 85%) se disolvió 0.02 g de quitina en polvo (camarón o chapulín). Se mezcló con ayuda de un aplicador de madera hasta disolver y obtener una masa transparente. Se metió a refrigeración a 4°C durante 24 h. Después de este tiempo la mezcla tomó el aspecto de una masa blanquecina opaca con pH 3 a la cual se le agregó otros 15 ml de agua del grifo y se agitó en vortex (Daigger, Genie 2) a máxima velocidad (10) durante 45 seg para lavarla. Se centrifugó a 5000 rpm por 5 min y posteriormente se desechó el sobrenadante, esto se repitió 3 veces. Enseguida se hicieron otros 3 lavados con buffer de acetatos 0.5M pH 8.0 para neutralizar el pH, después se lavó un par de veces más con buffer de Tris-HCl 0.5M pH 8.8 y al final se eliminó el sobrenadante por decantación obteniéndose quitina coloidal. La quitina se resuspendió y almacenó en 20 ml de buffer de Tris-HCl 1.5M pH 8.8 para preparar los geles de poliacrilamida-Quitina Coloidal (QC).

5.9.2. Detección de la actividad enzimática de quitinasas y quitosanasas

Para detectar, comparar y evaluar cualitativamente la efectividad del aspecto bioquímico de degradación de la quitina, se emplearon extractos de diferentes bacterias, 1 hongo y exuvias de triatóminos de 4° y 5° estadio.

5.9.2.1. Quitinasas de origen bacteriano (control)

Las bacterias empleadas para determinar la presencia de quitinasas fueron: *Alcaligenes faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Aeromonas caviae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Psychrobacter phenylpyruvicus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Primero se hicieron precultivos en 3 ml de caldo Luria inoculados con 2 a 3 colonias de cada bacteria durante 24 horas; después se propagaron 100 µl del anterior cultivo, en 3 ml de **medio líquido para biodegradación (mlb)** adicionado con quitina más 100 µl de levadura líquida al 10% durante 48 horas. Se realizó un tercer cultivo en mlb, empleando 100 µl del precultivo anterior, más 0.01 g de quitina en polvo (de camarón o chapulín según el caso) y 30 µl de levadura líquida al 10%, incubándolo durante 72 h. Estos cultivos se dejaron sedimentar por 30 min, para separar el sobrenadante y el precipitado bacteriano más quitina que quedo en el fondo de los tubos.

Todos los medios preparados fueron esterilizados y almacenados en refrigeración a 4°C para su mejor conservación, junto con las cepas empleadas que se mantuvieron en mlb. Las incubaciones se realizaron a 33-35°C con agitación constante a 200 rpm.

La detección de la actividad enzimática de quitinasas mediante la técnica de electroforesis, se realizó con los sobrenadantes, para lo cual se extrajeron las proteínas precipitándolas con ácido tricloroacético (TCA).

Las bacterias que crecieron en la quitina y mostraron presencia de quitinasas, se emplearon en subsecuentes cultivos como controles positivos, en los análisis electroforéticos y la prueba de biodegradación en Quitina Coloidal, para tener un parámetro de comparación cualitativa de la actividad biodegradable de la quitina.

5.9.2.2. Quitosanasas de origen fúngico (control)

La detección de la actividad enzimática de quitosanasas, se hizo mediante el cultivo de un hongo. Primero se disolvió 1 g del quitosano Kitomed® en 10 ml de agua destilada más ácido acético al 0.05%, a esta concentración la densidad del polímero no permite que el líquido se derrame al inclinarlo manteniéndose como un gel-sólido, pues permanece la superficie perpendicular al tubo al inclinarlo. Este hongo creció durante una semana, de manera fortuita, en el tubo que contenía el quitosano líquido preparado en el laboratorio. Inicialmente el micelio permaneció sobre la superficie y conforme transcurrieron otros siete días se fue sumergiendo digiriendo al polímero que de gel se convirtió en líquido. Después que se resembro en quitosano recién preparado, se incubó a 30°C y se visualizó nuevo micelio en la superficie a los 3 días, así que siguió la incubación por otros 3 días. Después se observó que el quitosano perdió su viscosidad y se volvió líquido como el agua, probablemente por la actividad de quitosanasas liberadas por el hongo, biodegradando el quitosano. Se volvió a pasar al hongo a nuevo quitosano líquido, se incubo igual que antes, y el sobrenadante se trató para precipitar las proteínas con TCA, y después se analizó por electroforesis y la prueba de biodegradación en quitina coloidal.

Cabe destacar que la caracterización e identificación del hongo no se realizó.

5.9.2.3. Quitinasas de triatóminos

Las quitinasas se detectaron a partir de exuvias provenientes de ninfas de 4° y 5° estadio. Para obtenerlas, se trituraron manualmente 25 exuvias de 4° (0.1446g) y 25 exuvias de 5° (cantidad similar), en un mortero con aproximadamente 1 g de Silica Gel Aldrich®Chemical Co. Inc. (grado 12, 28-200 mesh), hasta pulverizarla tomando una coloración en tono arena.

Para analizar las proteínas de las exuvias, se pesaron 200 µg del polvo obtenido y se le agregó 100 µl de buffer de carga (nativo o desnaturizante según el caso), después se agitó en vortex a velocidad media hasta mezclar por completo, se hirvieron por 5 minutos y en seguida se centrifugaron a 2000 rpm durante 2 min. El sobrenadante que contenía las

proteínas (quitinasas) presentes en las exuvias se analizó por electroforesis y la prueba de biodegradación en PAGE-Quitina coloidal.

5.9.3. Análisis de quitinasas mediante electroforesis con quitina coloidal

Para confirmar la naturaleza proteica de las enzimas quitinasas y quitosanasas investigadas, primeramente se realizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) al 10% y 12% en forma desnaturizante (SDS) y nativa (NAT), estos geles fueron revelados mediante la tinción por Coomasie. Posteriormente para detectar la actividad de biodegradación de las enzimas se realizaron PAGE-SDS y PAGE-NAT con Quitina-Coloidal (QC) y los geles fueron revelados por tinción con Coomasie, Plata y Calcofluor como se describe en los siguientes apartados.

5.9.3.1. PAGE-SDS y PAGE-NAT

Se realizó PAGE-SDS para determinar las posibles bandas de proteínas y/o enzimas desnaturizadas presentes en nuestras muestras. Para ello se empleó un total de 45 µl de cada muestra en buffer de carga desnaturizante para verterlo en los pozos del gel y marcadores de peso molecular cuyo rango es de 24 KDa a 130 KDa. Los geles separadores se prepararon al 10% y 12%, con un grosor de 1.5 mm y una altura de 6.5 cm, mientras que los geles concentradores se prepararon al 3% de 1.5 mm de grosor y 2.5 cm de altura. Después de la corrida, se fijan en una solución de ácido acético al 10%, se tiñen y revelan con azul de Coomasie.

Por otro lado también se realizó PAGE-NAT para comparar con los resultados de PAGE-SDS y verificar la obtención de bandas correspondientes a las enzimas sin desnaturizar (quitinasas y quitosanasas) presentes en nuestras diferentes muestras. Estos geles se prepararon con las características y condiciones antes mencionadas en los PAGE-SDS, diferenciándose de manera general en que no se le adiciona agentes desnaturizantes, se tiñeron y revelaron con azul de Coomasie y Nitrato de Plata. En ambos casos se realizó el registro fotográfico mediante un Transiluminador, las fotografías se analizaron de manera digital en PC.

5.9.3.2. PAGE-SDS- QC y PAGE-NAT- QC

Los geles por PAGE de la sección anterior se repitieron empleando una combinación de poliacrilamida al 10% y 12% con quitina coloidal de camarón o chapulín al 0.01% para los separadores, y para los geles concentradores se prepararon de manera convencional al 3%, 1.5 cm de grosor y 2.5 cm de altura sin agregarles quitina coloidal.

Los geles desnaturalizantes (SDS) se fijaron en solución de ácido acético al 10% y se revelaron con azul de Coomasie. Se destiñeron con solución de ácido acético-metanol y/o en agua caliente para el lavado.

Por otro lado los geles nativos se prepararon por duplicado en cada ocasión ya que fueron revelados por solución de Calcofluor- Coomasie y por tinción de Plata. Una vez que pasó el tiempo de corrida se lavaron por 30 seg con agua destilada en agitación constante a 50 rpm, se metieron en un recipiente con tapa y se le agregó a cada gel 20ml de buffer de Acetatos-Tritón X-100 al 1% 0.1M pH 5.0 cuidando de cubrir ligeramente la superficie y evitando que flotarán, con la finalidad de mantenerlos fijos a la base del recipiente, enseguida se incubaron a 31-33°C durante periodos de 15 a 30 días. Cabe destacar que diariamente se revisó el recipiente para agregar (cuando fuera necesario) un poco de buffer adicional para recuperar el evaporado.

Después de la incubación, los geles se fijaron con solución de ácido acético durante 30 min en agitación constante a 200 rpm, después se lavaron 3 veces con 35 ml de agua destilada por 1 min en cada ocasión, se tiñeron en primera instancia con 30 ml de solución Calcofluor durante 17 min sin agitación, luego se volvió a teñir pero esta vez en 35 ml de azul de Coomasie (para quitina coloidal) durante 24 h a 100 rpm.

Los geles que se revelaron por tinción con Plata, después de ser incubados se lavaron por 30 seg con 35 ml de agua destilada y luego se fijaron con solución de glutaraldehído al 10% durante 40 min en agitación constante a 150 rpm. Después se retiró el glutaraldehído y se lavó por tres ocasiones con agua destilada, luego se dejó en 50 ml de agua destilada durante 24 h en reposo. Pasado este tiempo se desechó el agua y se agregó solución de Nitrato de

plata durante 11 min manteniendo el recipiente tapado y en agitación a 200 rpm. Finalmente se reveló con solución de Formaldehído-Ácido Cítrico durante 15 min.

5.10. Identificación del gen de la quitinasa

5.10.1. Predicción de quitinasas mediante análisis In Silico

Se realizó un análisis *In silico* mediante herramientas bioinformáticas con el objetivo de detectar la presencia del gen codificante de la(s) enzima(s) quitinasa(s) en los triatóminos *M. longipennis*, *T. dimidiata* y *T. barberi*.

Se hizo la búsqueda con el término “Chitinase Triatomines” en las bases de datos de proteínas de NCBI [42], EMBL-EBI [43], UniProtKB-ExPASy [44], VECTOR BASE [45] y RCSB-PDB [46]. De las secuencias encontradas se tomó la que correspondió al triatómino *Rhodnius prolixus* (ya que fue la única existente del grupo de los triatóminos) para realizar un análisis por BLAST-NCBI [47], el cual se realizó en ExPASy-SIB [48], en la sección de Proteomics - Blast, ahí señalo la dirección de la página de UNIPROT JOBS [49] perteneciente al dominio EBI (European Bioinformatic Institute). Al obtener los resultados se rastreó el gen codificante y expresado (*CDS) con el cual se obtuvo el sitio de ensamble al transcriptoma (Transcriptome Shotgun Assembly - TSA) mediante una secuencia de expresión o RNA mensajero (mRNA).

Ya con la secuencia codificante (mRNA) se procedió a hacer la traducción de bases nitrogenadas a proteína (obteniendo la secuencia de aminoácidos) mediante la herramienta TRANSLATE TOOLS [50] en la sección *Genomics* de ExPASy, esta herramienta bioinformática usa el código ORF (Open Ready Frame) el cual hace un censo de las posibles combinaciones resultantes de los codones proporcionados por la secuencia que conforma al mRNA. De las probables combinaciones obtenidas se eligió la traducción con el codón de inicio (MET-AUG) hasta obtener la secuencia final con un codón de término o paro (UAA, UAG o UGA). Se copió la secuencia de aminoácidos en formato FASTA y se realizó un BLAST en ExPASy y otro en Vector Base.

De los resultados del BLAST se copiaron las secuencias con un porcentaje de identidad de 75-100% y se procedió a realizar un alineamiento de secuencias múltiples usando el

programa CLUSTAL W2 [51], en total se alinearon 5 secuencias de organismos diferentes, seleccionadas en función del grado de identidad o parecido (*Rhodnius prolixus*, *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Bombix mori* y *Culex quinquefasciatus*). Finalmente el alineamiento se editó y detalló con la herramienta BOXSHADE SERVER [52] en donde se programaron estos parámetros de salida Input: ALN y output: RTF_new: con este procedimiento se obtuvo un alineamiento de secuencias y en donde se diferenció mediante cajas iluminadas los aminoácidos similares en color negro y los aminoácidos de la misma familia en color gris, de esta manera se distinguen sitios altamente conservados o posibles dominios de unión o sitios catalíticos en común entre las secuencias analizadas.

De manera complementaria también se realizó un rastreo del gen completo de la quitinasa en el genoma de *Rhodnius prolixus* (liberado en agosto del 2014 con número de acceso al GeneBank - ACPB00000000.2, para 2015 se actualizó la base de datos con número de acceso ACPB00000000.3), para lo cual se realizó lo siguiente:

- Se buscó en las bases de datos (NCBI, Vector Base y EMBL) la existencia del genoma completo del triatómino *Rhodnius prolixus*.
- Una vez encontrado el genoma se procedió a realizar un BLAST empleando la secuencia de mRNA (TSA sequence) en la base de datos donde se ubicó el genoma.
- Con el BLAST se encontró el gen correspondiente a la quitinasa (Contig. and whole genome shotgun sequence) y se obtuvo información adicional como: contig. 18.1, longitud del gen 1420pb, DNA lineal, numero de acceso ACPB02000025, locus KQ034056 y clasificación del organismo Reduviidae; Triatominae; *Rhodnius prolixus*.
- En la base de datos Vector Base se siguió la siguiente ruta hasta comprobar la autenticidad del gen encontrado: Genomes – *Rhodnius prolixus* – Genebank WGS – ACPB02 – NCBI – WGS – ACPB02 0000001/ACPB02 058559 - ACPB00000000.2/*Rhodnius prolixus* – (En la lista Contigs.) buscar el #25 - Contig. 18.1 (1420 pb) Shotgun Assembly Sequences Genome – FASTA.
- Con la secuencia copiada en formato FASTA se realizó un alineamiento con ClustalW2 (49) entre el gen encontrado (secuencia de DNA genómico) y el mRNA que codifica para la quitinasa.

Esta estrategia de búsqueda se realizó también para encontrar el gen correspondiente de dos proteínas empleadas como controles positivos, en la subsecuente amplificación, estas fueron thiorredoxin reductase (tiorredoxina reductasa) y salivary nitroforina-II (nitroforina-II).

5.10.2. Diseño de Cebadores (Primers) para efectuar la amplificación del gen buscado

Se diseñaron tres pares de cebadores, oligonucleótidos o iniciadores a partir de DNA genómico y un par a partir de mRNA; los primeros se emplearon en la amplificación por PCR, los segundos serán usados en la continuación del presente proyecto, en donde se pretende después de amplificar por RT-PCR, clonar y expresar la proteína (quitinasa).

El diseño de “iniciadores” a partir de DNA genómico se llevó a cabo con ayuda del software Oligo Explorer v.1.2 para lo cual una vez importada la secuencia del gen (DNA genómico) se ubicó una zona intermedia en la que existiera abundante guanina (G) y citosina (C), de ahí se eligió un total de 25 bases lo cual fue el tamaño o longitud del oligo sentido, después de la base 25 se avanzó aproximadamente 200 bases en el caso de la nitroforina-II, 400 bases para quitinasa y 600 bases para tiorredoxina reductasa en sentido 5' a 3' respectivamente, esto determinó casi por completo la longitud total del amplicón o de la sección del gen a amplificar, finalmente se seleccionó otros 23 pares adicionales como parte del oligo antisentido, sin embargo estos oligos al ser complementarios fueron traducidos e invertidos de atrás para adelante para lograr que la amplificación se realice de manera adecuada (5'- 3'). Posteriormente se efectuó un análisis a cada uno de los iniciadores obtenidos con la finalidad de evaluar algunas características químicas deseadas para una correcta amplificación, para ello se usó los servidores NEB Tm Calc [53], Tm Calc [54], Oligo Calc [55] y el software Oligo Analyzer v. 1.2. En cada evaluación se buscó encontrar una combinación en la que se obtuviera una temperatura de fusión **básica de alineamiento** (Tm) de 60-63°C para todos los oligos (sentido y antisentido), una diferencia entre oligos complementarios de solo 1°C, 55% de GC como mínimo, cero alineamientos a ninguna temperatura entre oligos complementarios o entre sí mismos y finalmente una longitud entre 20-25 bases. Finalmente se agruparon y nombraron mediante una abreviatura

que los identificó de manera muy particular para que el fabricante mantuviera el nombre en las etiquetas y así evitar cualquier confusión.

Para el diseño de los iniciadores para RT-PCR se empleó como base la secuencia de mRNA correspondiente al gen de la quitinasa rastreada en la base de datos NCBI y con ayuda del programa Oligo Explorer v. 1.2.

Primeramente se tomaron las primeras 17 bases de la secuencia (mRNA) como oligo sentido y las últimas 17 bases como oligo antisentido, al igual que los iniciadores anteriores se les evaluó el porcentaje de GC mayor a 45%, la Tm básica entre 50-53 y el nulo alineamiento entre sí. Además se les agregó de 5 a 6 G o C al inicio de cada oligo para ayudar a la fijación de las enzimas, así como una secuencia correspondiente a una enzima de restricción para su uso con el plásmido a utilizar (Pgex-6a-1). Las enzimas que se emplearan son ECOR1 para el iniciador sentido y SAL1 para el iniciador antisentido, quedando en la siguiente forma la estructura de los oligos; secuencia de enzima - GC's - secuencia oligo. Adicionalmente se realizó un análisis para verificar que las enzimas corten en el lugar correcto en sentido 5'– 3', para ello se usó el servidor NEB Cutter (56). Por último se nombraron mediante alguna abreviatura particular para evitar confusiones futuras.

5.10.3. Reacción de PCR del DNA genómico de triatóminos

Mediante la amplificación por PCR a partir de DNA genómico, se verificó la presencia del gen codificante para la enzima quitinasa, tomando como modelo o base el gen de la Quitinasa en el genoma del triatómino *Rhodnius prolixus* (proporcionado por el servidor *VECTOR BASE* [45]). Además se agregó un par de controles positivos de dos proteínas conocidas en insectos (Nitroforina-II y Tiorredoxina reductasa), con la finalidad de verificar el producto de amplificación por PCR. Las etapas fueron las siguientes:

5.10.3.1. Extracción y purificación del DNA

Primeramente se extrajo DNA genómico a partir de huevos de las tres especies de triatóminos (*M. longipennis*, *T. dimidiata* y *T. barberi*) los cuales fueron colectados durante

el periodo de cultivo de los insectos y conservados en regulador PBS 1X pH 7.4 en tubos Eppendorf a -20°C.

Después de descongelar las muestras completamente, se trituraron de 15-20 huevos mecánicamente con ayuda de agujas nuevas y esteriles marca PrecisionGlide® BD&Co. de calibre 16G x 1^{1/2}., 18G x 1^{1/2} y 20G x 1^{1/2} reventando y triturando por punción y presión; luego se mezcló suavemente la muestras con una micropipeta para 200 µl y puntas amarillas durante 3 o 4 veces para homogenizar completamente. Enseguida se agregó 50 µl de PBS 1X nuevo y se mezcló nuevamente, se transfirió la muestra a un tubo Eppendorf nuevo de 2 ml para su posterior extracción con un kit de extracción de DNA genómico (AXIGEN® AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit, Corning Life Sciences Co. Ltd.).

Siguiendo el protocolo de extracción de DNA recomendado por el fabricante, para la extracción de DNA genómico se colectó 350 µl de muestra, en las muestras que no se logró el volumen deseado se completó con un poco de PBS 1X pH 7.4, después se agregó 0.9 µl de RNasa A y se mezcló por inversión con las manos de manera suave por 30-40 seg hasta homogenizar completamente. Antes de iniciar el proceso de extracción se metió a incubar el “buffer” de elución o eluyente a 56°C, ya que al finalizar la técnica se ocupó a esta temperatura.

Se agregó en orden 20 µl de Proteinasa K y 150ul de Buffer C-L, se mezcló rápidamente en vortex a velocidad media durante 1min, posteriormente se metió a incubar a 56°C por 15 min. Se centrifugó por 10-15 seg a 8000g para remover posibles residuos en la tapa del tubo. Enseguida se agregó 350ul de buffer P-D y se mezcló en vortex a máxima velocidad por 30-35 seg, se centrifugó a 12000g por 10 min a temperatura ambiente. Al salir del proceso de centrifugado las muestras se separaron en dos fases casi del mismo tamaño, una transparente (al fondo) y una blanquecina opaca (superficie), se dejaron por 1 min a temperatura ambiente y en otro tubo nuevo se separó la fase clara de cada una de las muestras. Se centrifugó nuevamente a 12000g por 10 min a temperatura ambiente. Ahora se volvió a encontrar nuevamente dos fases pero en esta ocasión solo se tuvo una fase opaca pequeña en la superficie del tubo la cual se extrajo cuidadosamente para evitar mezclar o extraer parte de la fase clara. A este punto se ha extraído y separado el DNA (fase clara) de

otras biomoléculas como lípidos, carbohidratos o algunas proteínas (fase opaca blanquecina).

En seguida de la extracción, se continuó con la purificación del DNA genómico, en donde primero se vertió la fase clara obtenida en pasos anteriores en una columna Miniprep previamente armada y se centrifugó a 12000g por 1 min. Se desechó el líquido filtrado que se obtuvo y se agregó a la columna 500 µl de buffer de lavado W1, se centrifugó a 12000g por 1 min, se desechó el líquido filtrado y ahora se agregó 700 µl de buffer de lavado W2, después se centrifugó a 12000g por 1 min. Se tiró el líquido obtenido y se dio un segundo lavado con 700 µl de buffer W2 con la finalidad de obtener un lavado completo removiendo sales para evitar problemas en las reacciones enzimáticas subsecuentes. Se desechó el líquido obtenido y se centrifugó nuevamente a 12000g por 1min. Finalmente se transfirió la columna a un tubo nuevo de 1.5 ml y se agregó 85 µl del eluyente (incubado a 56°C al inicio del procedimiento) en el centro de la membrana cuidando de no tocarla con la punta de la micropipeta evitando romperla o contaminarla, se dejó incubar a temperatura ambiente por 1min y enseguida se centrifugó a 12000g por 1 min. De manera adicional se agregó otros 25 µl de eluyente a la columna y se centrifugó nuevamente para obtener DNA que hubiese quedado en la membrana.

El DNA genómico extraído se dividió en alícuotas de trabajo de 5 µl en tubos para PCR de 100 µl y se guardaron a -20°C. Para comprobar integridad y extracción de DNA se corrió un gel de agarosa al 1% usando una alícuota de 5 µl de cada DNA genómico extraído. Con el propósito de verificar la purificación del DNA se realizó una lectura de absorbancia en espectrofotómetro de UV-Visible a 260nm y 280nm, la absorbancia de la lectura a 260nm se dividió entre la obtenida a 280nm, si el resultado es 1.8 el DNA se considera que está puro y limpio.

5.10.3.2. Amplificación por PCR punto final en gradiente

Se realizó amplificaciones por triplicado de DNA genómico mediante PCR punto final en gradiente, empleando un Termociclador (TECHNE TC-512, modelo FTC51H2D, serie 1444421-1) con los siguientes parámetros: Desnaturalización inicial a 94°C por 5 min,

desnaturalización cíclica a 94°C por 1 min, alineamiento a temperaturas en gradiente (54.5°C, 57.5°C, 58.1°C, 59.4°C, 60.3°C, 62.4°C, 63.2°C, 64.9°C y 66.3°C) por 1 min, renaturalización cíclica a 72°C por 1min, extensión final a 72°C por 4:30 min, 35 ciclos totales y refrigeración a 4°C al finalizar los ciclos por tiempo indefinido.

Las mezclas de reacciones se prepararon como se muestra en la tabla 1, las cuales se vertieron en tubos Eppendorf para PCR nuevos y estériles de 100 µl. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

Tabla 1. Concentración y volumen empleado en la preparación de las reacciones para llevar a cabo la amplificación por PCR				
Orden	Compuesto	Concentración inicial	Volumen para la reacción	Concentración final
1.-	Buffer PCR (- MgCl ₂)	10X	2.5 µl	1X
2.-	MgCl ₂	50mM	0.75µl	1.5mM
3.-	Primer 1	200mM	1 µl	200uM
4.-	Primer 1	200mM	1 µl	200uM
5.-	dNTP's	10mM	0.5 µl	0.2uM
6.-	Taq Pol DNA	5U / µl	0.5 µl	2.5U
7.-	DNA muestra	--	1 µl	--
8.-	H ₂ O nucleasas free	--	17.75ml	--
	Volumen final		25ml	
**Todos los reactivos empleados fueron a partir de kits para biología molecular marca Thermo Scientific®, enunciados a continuación: dNTP's Kit, Taq Pol Platinum Kit, Primers sintetizados por el Instituto de Biotecnología (IBT)-UNAM en Cuernavaca, Morelos.				

Una vez preparadas las reacciones y etiquetadas debidamente se metieron al termociclador en orden según correspondiera la temperatura. Se cerró y se inició el programa establecido previamente. Después del tiempo de amplificación se sacaron las muestras para su inmediato análisis por gel de agarosa.

5.10.3.3. Electroforesis en Gel de Agarosa

Una vez terminada la amplificación las muestras se mantuvieron a 4°C en hielo o en refrigeración para el análisis por electroforesis en gel de agarosa. Los geles fueron al 2% con de 0.85 cm de grosor, 6.5 cm de largo, 4 cm de ancho, pozos con capacidad máxima de 35 µl y 1 µl de bromuro de etidio como agente revelador.

Una vez preparados los geles se acomodaron en las cámaras electroforéticas y se agregó buffer TAE 1X (Tris base- Ácido acético- EDTA) hasta cubrir unos milímetros la superficie del gel. Se preparó cada una de las muestras mezclándolas cuidadosamente con 2µl de azul de bromofenol y después se depositaron cuidadosamente en los pozos. El corrimiento se efectuó con ayuda de una fuente de poder que se programó a 95 volts durante 35-40 min. Cuando las muestras avanzaron hasta un 90% de la longitud los geles se detuvo la fuente y se sacaron cuidadosamente de las cámaras. Después se observaron los geles mediante un Transiluminador de UV (modelo M26, UVP Bioimaging System, EpiChemi3 DarkRoom, serie 033055-003) y se fotodocumentó para su posterior análisis.

VI. RESULTADOS

6.1. Obtención del material

Se partió aproximadamente de 5 g de adultos de triatóminos de las especies *Triatoma dimidiata*, *Triatoma barberi* y *Meccus longipennis* se separó dorso y abdomen, además se clasificaron como hembras y machos en cada especie (figura 4).

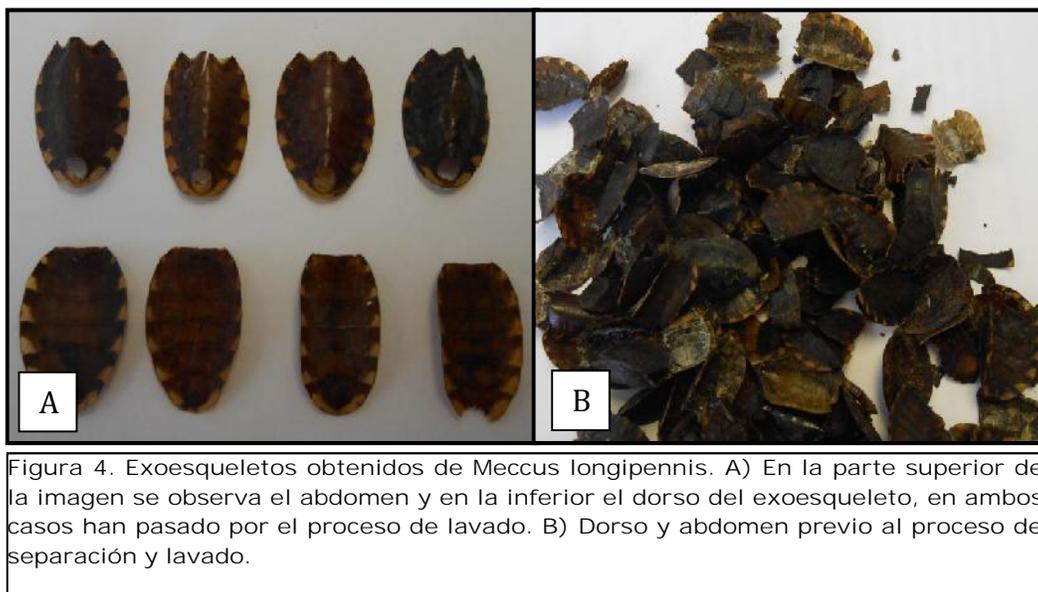


Figura 4. Exoesqueletos obtenidos de *Meccus longipennis*. A) En la parte superior de la imagen se observa el abdomen y en la inferior el dorso del exoesqueleto, en ambos casos han pasado por el proceso de lavado. B) Dorso y abdomen previo al proceso de separación y lavado.

También se recuperaron las exuvias resultantes de los diferentes estadios ninfales, las cuales se clasificaron por estadio y en primera instancia fueron guardadas en cajas Petri. En la figura 5 pude observarse la diferencia de tamaño entre las exuvias de los estadios 1°- 3° con respecto a las de 4° y 5°, puede apreciarse el incremento de tamaño paulatino a causa de la ingesta de alimento, así mismo se distingue la diferencia de coloración entre estadios, ya que en los primeros se nota un color grisáceo, mientras que en las últimas se puede ver en los bordes del dorso el patrón de colores anaranjado-amarillo más definido y característico de los triatóminos.

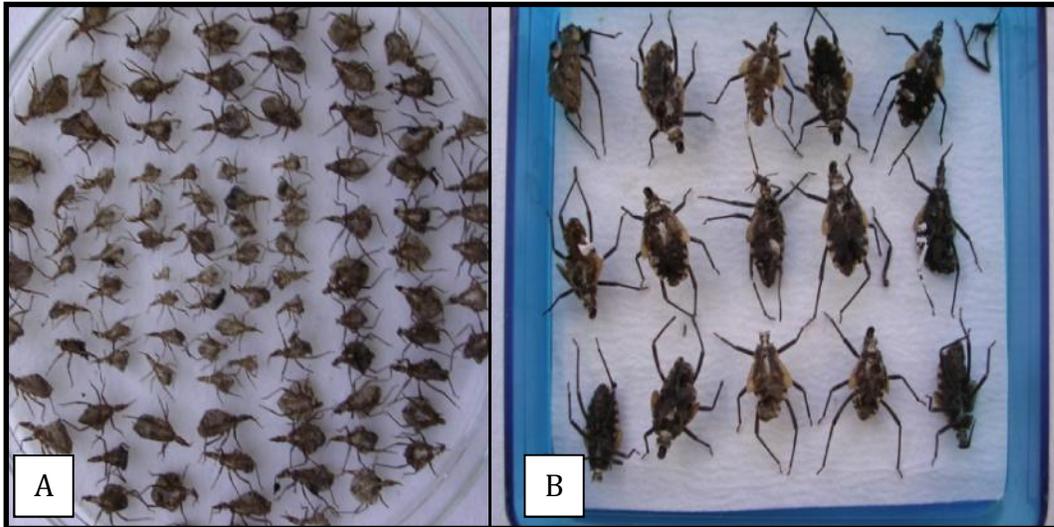


Figura 5. Exuvias resultantes y obtenidas de los diferentes estadios ninfales de los triatóminos. A) Primeros 3 estadios. B) 4° y 5° estadio.

6.2. Quitina de triatóminos hembras y machos

Se procesó y obtuvo la quitina de los triatóminos de la especie *Meccus longipennis* separando la procedente de exuvias de hembras y machos ver figura 6.

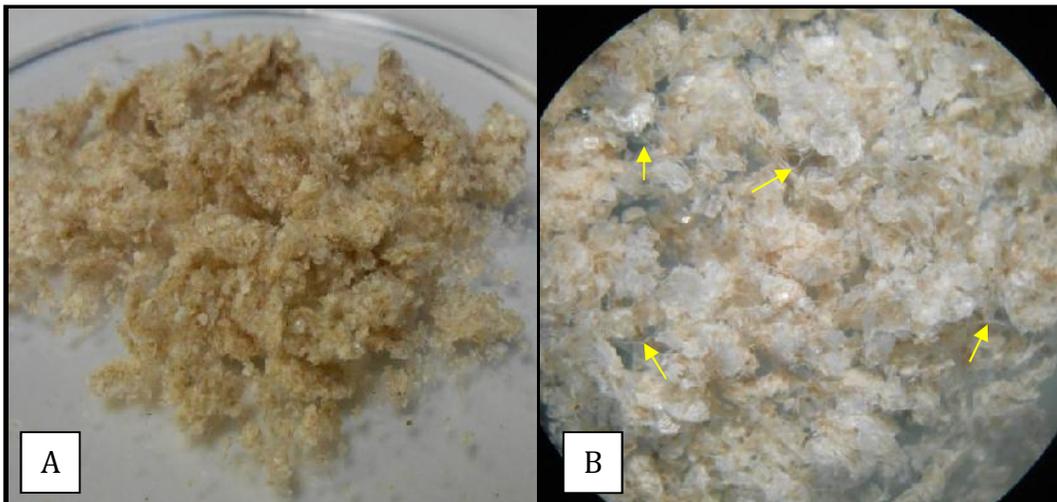


Figura 6. Quitina de las exuvias de *Meccus longipennis*. A) Quitina obtenida de exuvias y adultos de la especie *Meccus longipennis*. B) Acercamiento con el microscopio estereoscópico, donde se aprecia abundantes hojuelas en color café claro y blanco además de fibras grisáceas (flechas amarillas).

La quitina se guardó a temperatura ambiente y en un lugar seco. En un acercamiento al microscopio estereoscópico puede notarse que se obtuvo pequeñas hojuelas blanquecinas así como fibras en color café claro. De los 3.0231 g de muestra inicial de hembras se obtuvo un total de 1.2105 g de quitina y de los 2.1435 g de machos se extrajo 1.0859 g de quitina. De manera general se puede decir que el rendimiento la quitina de triatóminos fue de 40-50%, ya que en hembras fue de un 40-45% mientras que en los machos fue de 45-50%.

6.3. Quitina obtenida a partir de camarón

Se logró obtener un total de 10 g de quina ya procesada y seca, la cual se extrajo a partir de la cubierta (exoesqueleto) de camarón, misma que fue separada antes de iniciar el proceso de extracción. De igual manera se guardó a temperatura ambiente y en un lugar seco. La figura 7 se muestra la quitina extraída, en donde se puede ver el color blanco de las hojuelas las cuales están compuestas por múltiples laminillas translucidas de quitina.

El rendimiento general de la quitina de camarón fue de 1-3%, esto debido a que el exoesqueleto constituye solo una pequeña parte del total del cuerpo del camarón aproximadamente el 30%, mientras que el cuerpo carnoso, cabeza y artejos (patas) componen el resto del cuerpo (70% aproximadamente).

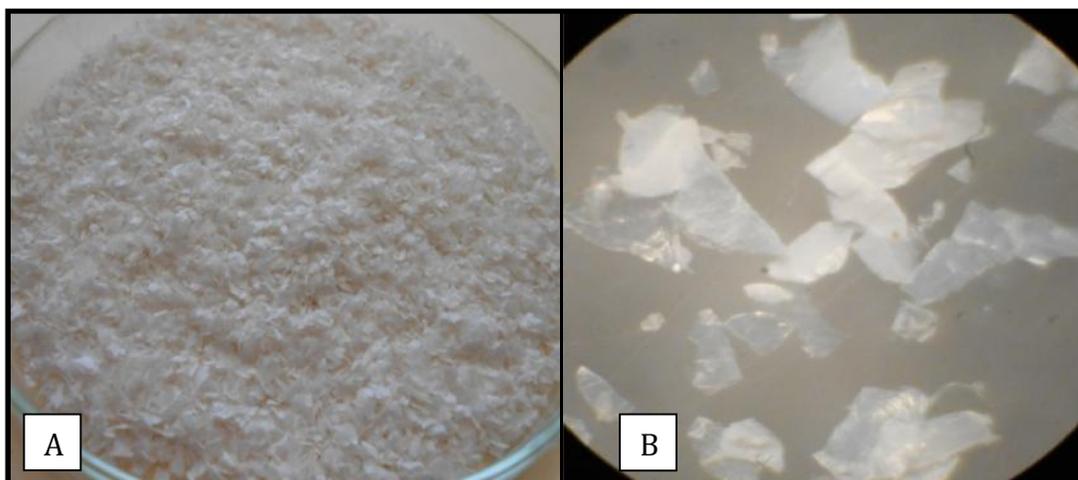


Figura 7. Quitina de camarón. A) Quitina obtenida a partir del exoesqueleto de camarón. B) Nótese un acercamiento con el microscopio estereoscópico, en el que podemos ver las hojuelas resultantes de color blanquecino translucido.

6.4. Quitina obtenida de chapulín

En la figura 8 (A) se muestra la quitina extraída del exoesqueleto de chapulín en donde se aprecia con aumento en microscopio estereoscópico la coloración café claro de pequeñas fibras y gránulos después del proceso de secado. En total se obtuvo 50 g y a diferencia de la quitina de camarón esta tuvo un mayor rendimiento que fue de 5-10%, esto se debe posiblemente a que una buena parte del cuerpo está compuesto por un exoesqueleto de quitina aproximadamente el 50%. Con respecto a la quitina de triatóminos el rendimiento fue menor cuando menos un 30%.

La quitina extraída se fraccionó en tubos cónicos de 50 ml y se guardó a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco.

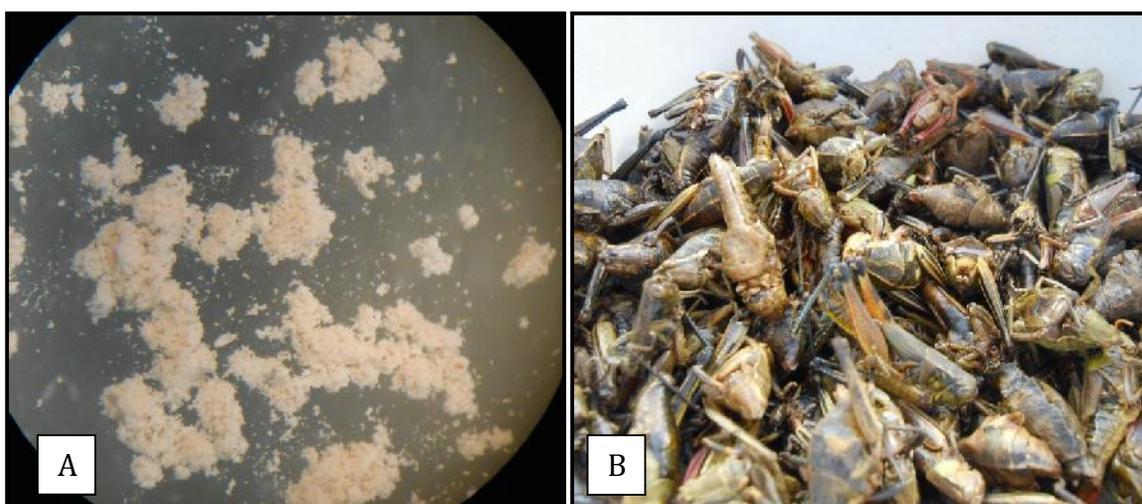


Figura 8. Quitina de chapulín. A) se aprecia un aumento de la quitina obtenida a partir del exoesqueleto de chapulín, en B) se muestran los exoesqueletos después del proceso de lavado y secado.

6.5 Espectroscopia FT-IR

Las diferentes muestras de quitina obtenidas se analizaron mediante análisis por FT-IR contribuyendo a la caracterización de las mismas.

La gráfica 1 muestra una comparación entre los espectros FT-IR de la quitina de triatóminos (de hembras), quitina de camarón, quitina de hongo y quitina de chapulín. Los picos característicos para identificar a la quitina de manera general están dados a las siguientes longitudes de onda: $\sim 3450\text{ cm}^{-1}$ que indican la presencia de los grupos hidroxilo ($-\text{OH}$), $\sim 2800\text{ cm}^{-1}$ presencia de grupos alifáticos (CH_3), $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ la presencia del grupo

amino (tijeeteo del enlace N-H) y la presencia de abundantes puentes de hidrogeno, ~ 1385 cm^{-1} la unión C-N y ~ 1060 cm^{-1} la interacción C-O-C, mismos que se han señalado en cada uno de los espectros de la gráfica, los cuales corresponden a los diversos tipos de quitina, sin embargo, también pueden apreciarse diferencias notables entre las mismas, sugiriendo que se trata de tres tipos diferentes de quitina, independientemente del grado de desacetilación de cada una el cual se distingue a ~ 1290 cm^{-1} mediante la unión C-C y la presencia o abundancia del doble enlace C=O (tensión del grupo carbonilo). Por otro lado puede notarse en las muestras de triatóminos (espectros morado) una mayor definición del pico a ~ 1385 cm^{-1} (unión C-N) y la presencia muy marcada de otro a una longitud de ~ 1500 cm^{-1} mismo que indica la torsión del CH₃ y la flexión del -OH, la cual distingue la quitina de las otras dos debido a que las cadenas que componen a este tipo de quitina se organizan paralelamente, donde los grupos reductores libres de ambas cadenas están dirigidas en el mismo sentido y así mismo ambos grupos no reductores están en el lado opuesto, permitiendo por un lado la flexión continua perpendicular del -OH y la tensión asimétrica mediante un movimiento en torsión o “twisting” del grupo CH₃.

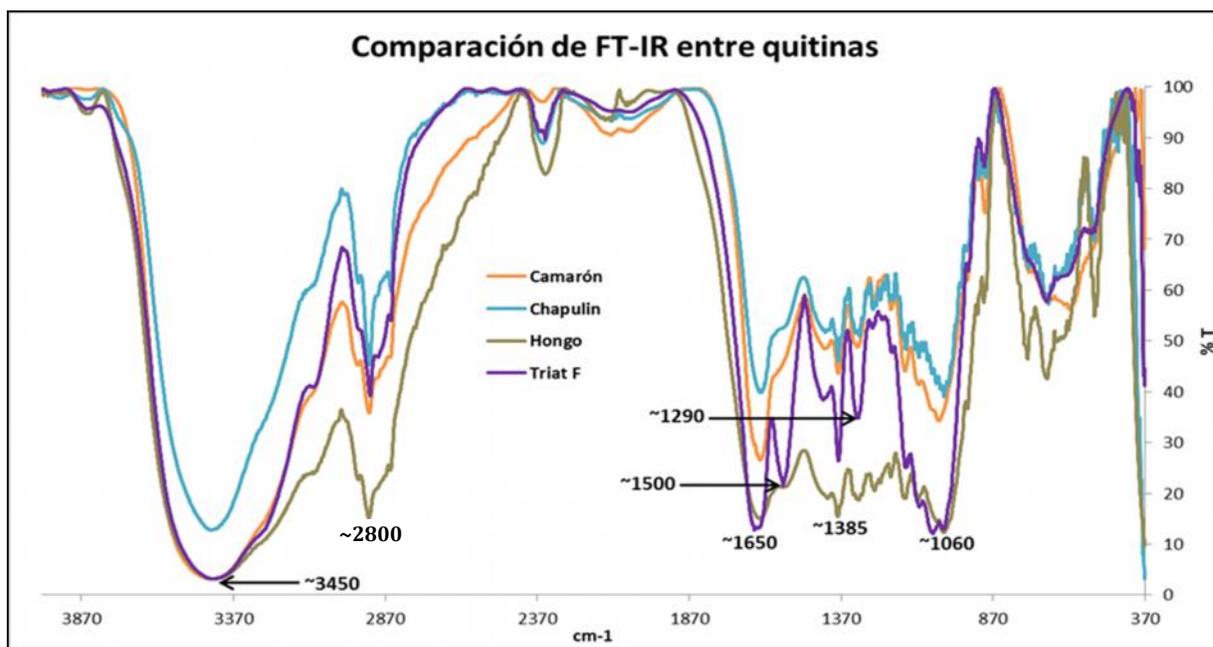


Figura 9. Gráfica de FT-IR de la quitina de machos y hembras de *Meccus longipennis* quitina de camarón y quitina de hongo. Puede notarse las principales diferencias a ~ 1500 cm^{-1} y a ~ 1385 cm^{-1} entre las diferentes muestras. Los picos a ~ 3450 cm^{-1} , ~ 1650 cm^{-1} , ~ 1385 cm^{-1} y ~ 1060 cm^{-1} , indican la presencia de (-OH), grupo amino (tijeeteo del N-H y puentes de hidrógeno), unión C-N y la presencia del enlace C-O-C. En la quitina de triatóminos puede notarse mayor definición de los picos a ~ 1385 cm^{-1} (unión C-N), ~ 1290 cm^{-1} (unión C-C y doble enlace C=O) y la presencia del otro a una longitud de ~ 1500 cm^{-1} (torsión del CH₃ y flexión del -OH).

En la gráfica 2 se muestra una comparación entre la quitina de hembras y machos de los triatóminos de la especie *Meccus longipennis*. Para construir dicha gráfica se emplearon los datos obtenidos del análisis de las muestras de pliegues e interpliegues de los adultos, donde puede notarse una diferencia significativa en el porcentaje de transmitancia (%T) en las longitudes de onda a 1370 cm^{-1} , 1495 cm^{-1} , y 1610 cm^{-1} en gran medida entre interpliegues y en menor proporción entre pliegues. En los interpliegues de hembras (espectro anaranjado) fue notable la diferencia en los máximos antes mencionados con respecto a los demás, así mismo los pliegues (hembras y machos) mostraron de manera contrastante los valores más bajos, cabe destacar que en dichos puntos se evidencia el grado de desacetilación de las muestras, de tal manera que los pliegues de hembras (espectro morado) poseen un bajo grado de desacetilación, mientras que los interpliegues de hembras (espectro anaranjado) tiene un grado muy alto de desacetilación.

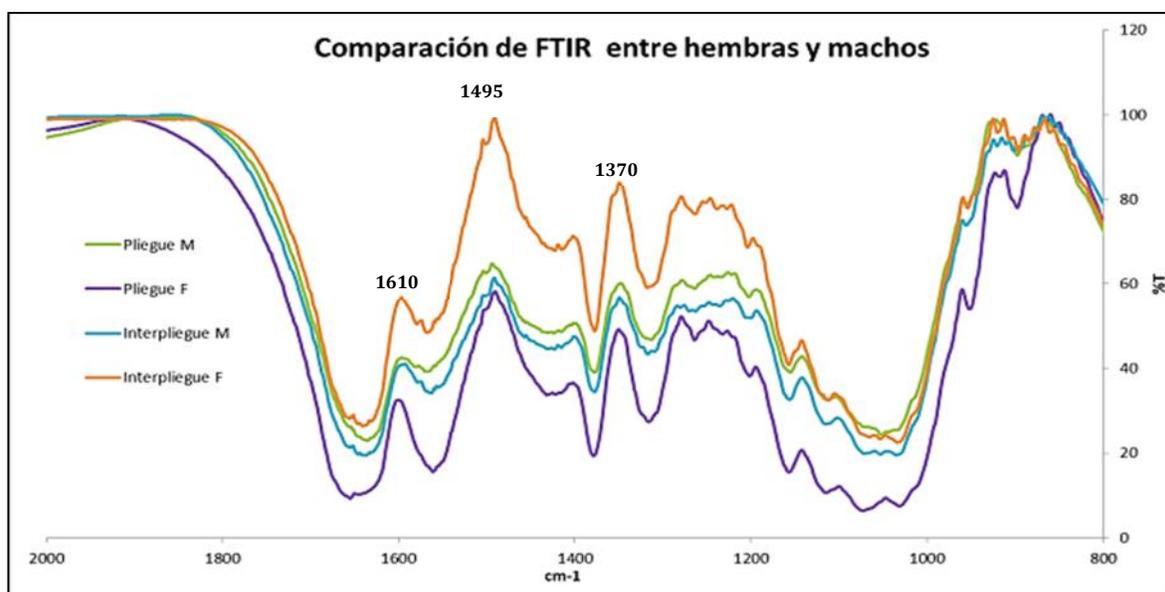


Figura 10. Gráfica de FT-IR de la quitina procedente de los pliegues e interpliegues tanto de machos como de hembras de *Meccus longipennis*. Se indica el porcentaje de desacetilación a 1495 cm^{-1} , el cual fue mayor en interpliegues de hembras mostrado en color anaranjado.

6.5. Análisis de cristalinidad de la quitina por difracción de rayos X (DRX)

Al investigar la cristalinidad de la quitina, misma que refleja la estructura y arreglo molecular, comparando las muestras de hembras y de machos de *Meccus longipennis* con el control positivo proveniente de camarón (quitosano comercial KitoMed® AltaKitin S.A) se encontraron las fases cristalinas a $2\theta = 11.21^\circ$, 15.15° , 22.54° , 26.49° , 29.88° y 44.97° mostradas en el difractograma de la gráfica 3. Como se aprecia, la intensidad en los espectros de machos y hembras es similar, independientemente de la cantidad de muestra que se obtuvo, puede notarse, además, una variación en la intensidad de la muestra de machos y hembras respecto al quitosano, sobretodo en la fase cristalina 22.54° y 26.49° debido probablemente a que el quitosano al ser una molécula pequeña derivada de la α -quitina no presenta algunas de las fases cristalinas [28, 34]. Esto resalta la diferencia entre α -quitina y β -quitina, pues se confirma que ambas moléculas tienen un arreglo cristalino diferente.

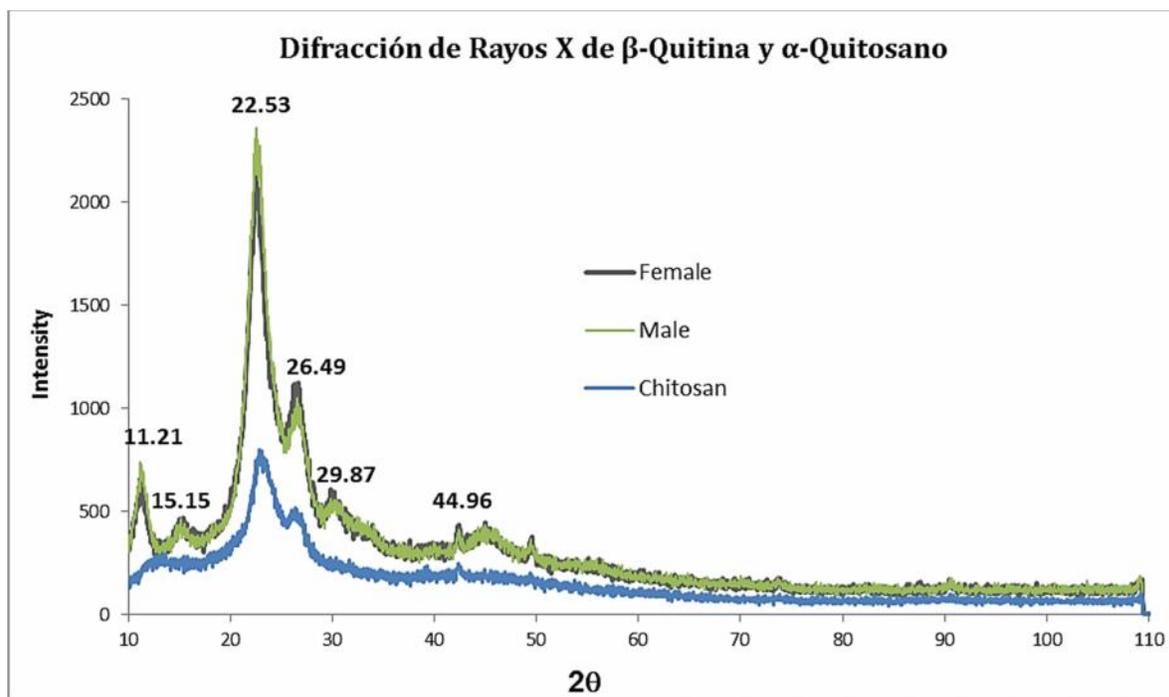


Figura 11. Difractograma de rayos X de la quitina de triatóminos. En color verde se ve el espectro de la quitina de machos, en gris el de las hembras y en color azul se ve espectro de quitosano comercial KitoMed®. Se señalan las fases cristalinas a $2\theta = 11.21^\circ$, 15.15° , 22.54° , 26.49° , 29.88° y 44.97° .

6.6. Quitosano obtenido a partir de camarón, chapulín y triatóminos

El quitosano que se obtuvo de las quitinas de triatóminos, camarón y chapulín, una vez digerida en solución de NAOH al 40% se sometió a esterilización a 121°C, 15 lb de presión durante una hora, se muestra en la figura 9 mediante el microscopio estereoscópico se puede apreciar la formación de pequeñas partículas (semejantes a polvo) de color café claro de la quitina de los insectos (triatóminos y chapulines) en comparación con las hojuelas del quitosano de camarón las cuales fueron de color blanco. Se pudo observar también que el tamaño de partícula del quitosano obtenido por esterilización, fue mucho más pequeño que el del quitosano comercial KitoMed®.

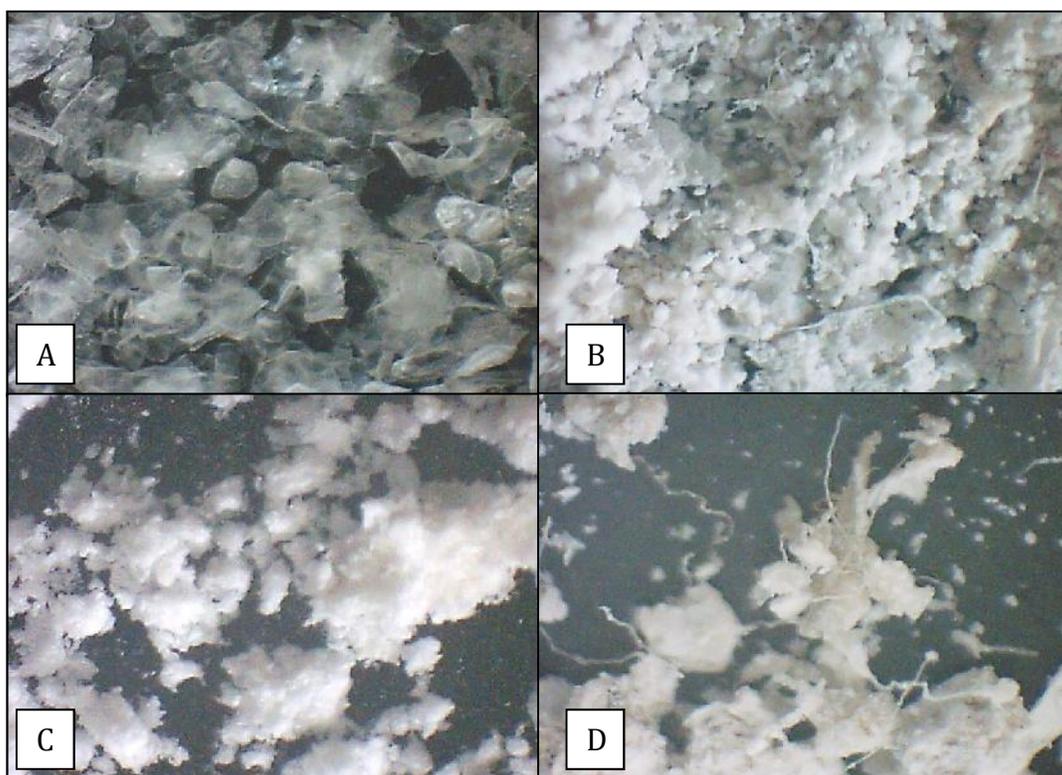


Figura 12. Variedades de quitosano. En A fotografía de Quitosano de camarón comercial KitoMed®, (B) Quitosano de chapulín, (C) quitosano de triatóminos hembras y (D) quitosano de triatóminos machos, las muestras se observaron con microscopio estereoscópico.

6.7. Cristalografía de rayos X del monómero de GLN obtenida de triatóminos

Después de la intensa y constante digestión de la quitina de triatóminos, y del secado y evaporación de algunas semanas, se obtuvieron pequeños microcristales, uno de los cuales se analizó por cristalografía de Rayos X dando por resultado una molécula simple monomérica de clorhidrato de glucosamina (HClGLN). En la figura 10 se muestra un modelo en 3 dimensiones de la molécula, diseñado con el software Mercury ver. 3.5.1 (<http://www.ccdc.cam.ac.uk/mercury/>) con el cual se detectó y midió los átomos, ángulos y distancias de los enlaces identificando al compuesto puro cristalizado. Se puede observar marcado en color rojo el oxígeno (O), en blanco el hidrogeno (H), en gris el carbono (C) y en azul el nitrógeno (N), también hay en color verde un átomo de Cloro (Cl) debido a que la disolución y cristalización fue hecha en HCl.

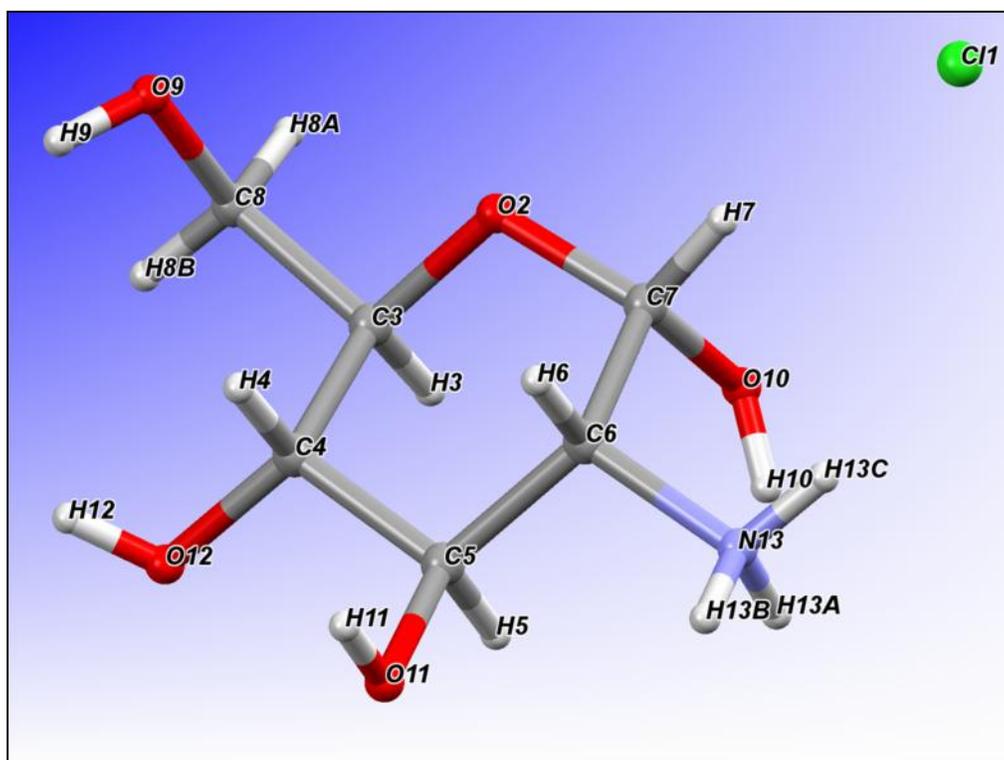


Figura 13. Modelo de la molécula de clorhidrato de glucosamina (HClGLN). Se aprecia la conformación tridimensional de la molécula.

En la figura 11, se puede observar un dímero del clorhidrato de glucosamina observado desde el eje Z del cristal, se aprecia en color azul (cian) los puentes de hidrogeno mediante

los cuales interaccionan ambas moléculas para unirse y de esta manera formar largas cadenas hasta dar origen a un cristal más grande y complejo similar al quitosano, y en una proporción mucho mayor a la quitina. En resumen los datos del cristal fueron: (C₆H₁₄ClNO₅), *M* = 215.63, monoclinico, *a* = 7.1081(4) Å, *b* = 9.1876(3) Å, *c* = 7.7252(4) Å, β = 112.651(6)°, *V* = 465.59(4) Å³, *T* = 150.00(10), grupo espacial P21 (no. 4), *Z* = 2, μ (Cu K α) = 3.643, 4737 reflexiones medidas, 1850 unique (*R*_{int} = 0.0333) el cual fue usado en todos los cálculos. El final *wR*₂ fue 0.0933 (todos los datos) and *R*₁ fue 0.0364 (*I* > 2 σ (*I*)), el resto de los datos cristalográficos se muestran en el anexo A.

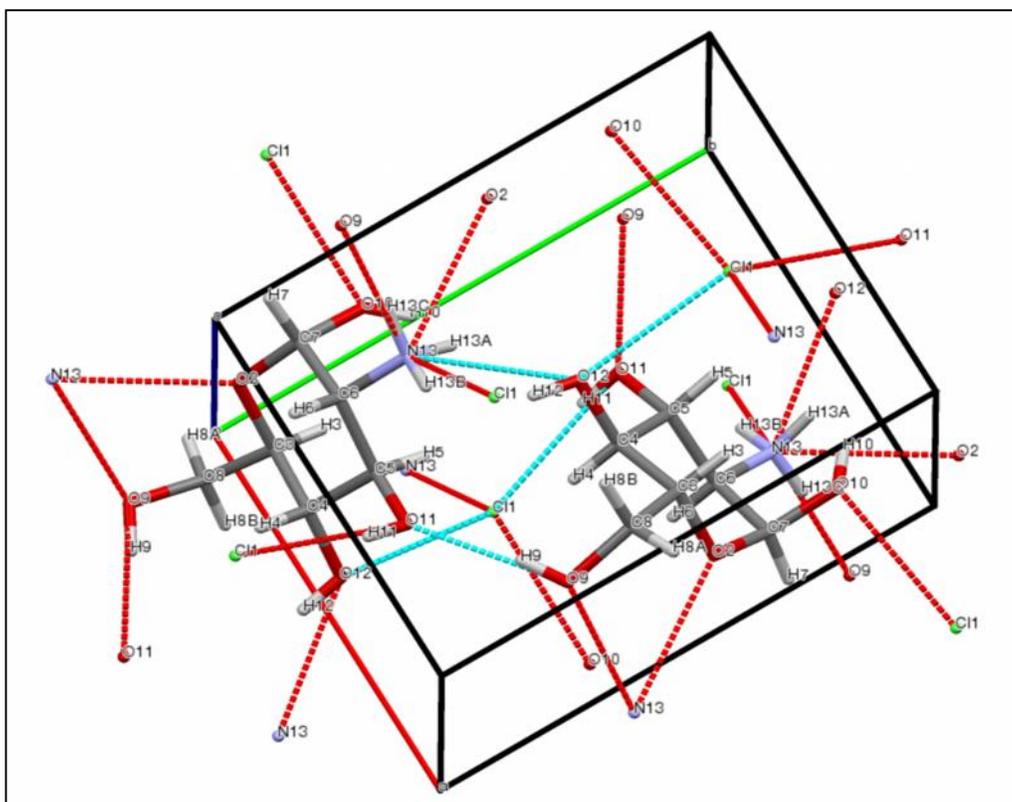


Figura 14. Vista tridimensional desde el eje Z de dos moléculas de glucosamina. Se muestra la interacción de ambas moléculas mediante cinco enlaces de hidrogeno marcados en color azul cian.

6.8. Análisis por espectrofotofluorometría de la interacción del calcofluor con quitosano de (camarón, chapulín y triatóminos)

En esta parte de la tesis se presentan los resultados de la interacción molecular del quitosano con un fluorocromo denominado Calcofluor, empleado específicamente para identificar al producto de la digestión de la quitina denominado quitosano. Para tales propósitos se usó un espectrofotofluorómetro el cual es un equipo muy sensible con capacidad de detectar la interacción de moléculas que se encuentran en una concentración del orden de 10-12 nM, es decir de 10,000 a 20,000 moléculas por mililitro.

Para poder realizar las determinaciones antes mencionadas fue necesario estandarizar algunas condiciones. Una de ellas se muestra en la gráfica 4, donde se analiza el comportamiento lineal de la absorción del fluorocromo Calcofluor (0.0109 $\mu\text{moles}/\mu\text{l}$) en espectros UV-visible. Al emplear concentraciones variables del calcofluor en 1 ml de agua destilada a pH 7.0 se conoce la concentración molar que es adecuada para emplear en los ensayos. Es decir que es suficiente emplear una concentración de calcofluor de 0.02 a 0.12 μmoles por ml para obtener valores de absorción que se encuentren o correspondan a una línea recta y por tanto son exactos.

La interacción del quitosano con el calcofluor que se observa en el espectro de absorción, indica un incremento considerable que llega a un punto máximo, también se acentúan otros máximos que apenas son notables cuando no hay interacción a 635 nm y 656 nm, incrementando la absorbancia de 0.218 a 1.09. También hay un cambio o modificación en el espectro entre 365 nm y 400 nm donde se forma una pequeña meseta (línea anaranjada) indicando posiblemente la saturación del sistema o los puntos máximos de absorción del calcofluor mediante espectrofotometría.

Cabe destacar que la sensibilidad de la espectrofotometría de UV-visible es baja en este tipo de experimentos (interacción con fluorocromos) además de que solamente podremos ver el incremento y modificación del espectro de absorción en forma lineal (2D) dejando inadvertido las posibles modificaciones en un tercer plano (3D), sin embargo nos da indicios y encamina sobre los posibles resultados a obtener con una técnica más sensible como lo es la espectrofotofluorometría.

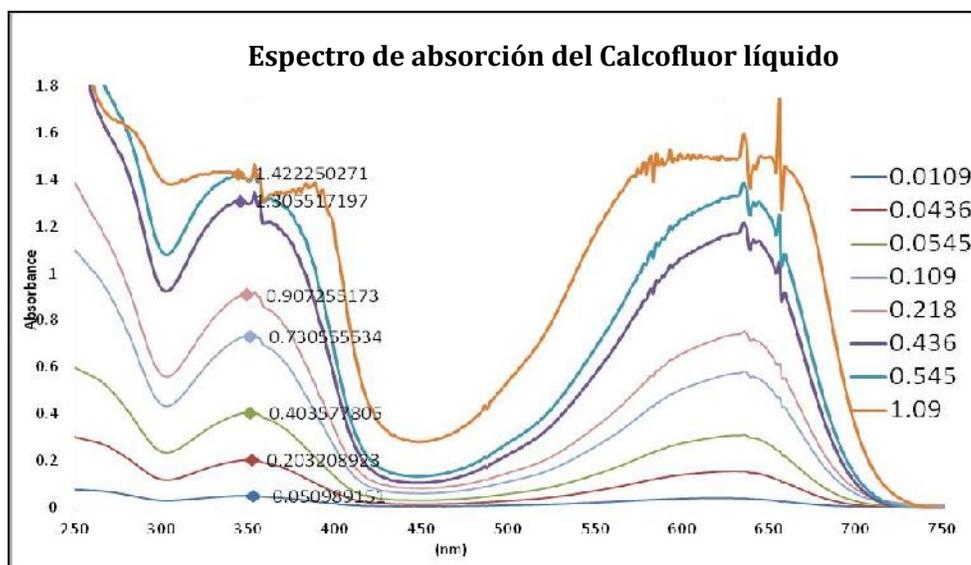


Figura 15. Espectros de absorción en Uv-Visible del Calcofluor líquido en dilución y de la combinación Quitosano - Calcofluor.

En seguida fue necesario determinar los máximos de absorción y excitación del fluorocromo (y el quitosano); en la gráfica 5, se observa el espectro de emisión por fluorescencia en 2D del calcofluor donde se determinó el pH óptimo de absorción y excitación, para lo cual se empleó buffer de acetatos pH 4.5 (línea cian), succinatos pH 5.5 (línea roja), fosfatos pH 7.5 (línea verde) y fosfatos pH 9.0 (línea purpura). El máximo de absorción común ya caracterizado del calcofluor a 350 nm se señala en la gráfica; notándose que en el medio ácido de acetatos (línea cian) el espectro se desplaza hacia el rojo (red shift) pues el máximo de absorción ahora es de 350 nm a 379 nm, y la emisión medida en Unidades Arbitrarias de Fluorescencia (UAF) pasa de 380 a 200. A pH alcalino (7.5) el calcofluor tiene un incremento de su emisión (UAF) con respecto al pH 7.0 y/o ácido pero no hay desplazamiento de la banda a 350 nm, todo esto indica que la fluorescencia del calcofluor se ve afectada por el pH del medio.

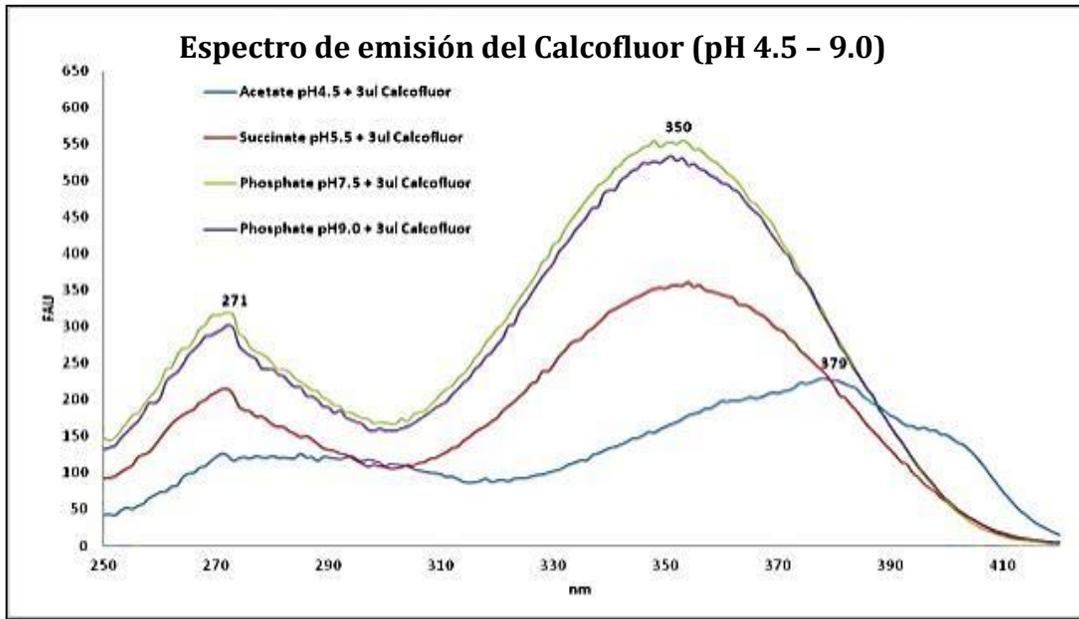


Figura 16. Espectro de emisión en 2D del Calcofluor en buffer de acetatos pH 4.5, succinato 5.5, fosfatos 7.5 y fosfatos pH 9.0.

El espectro de excitación del calcofluor tiene una señal a 432nm, en la gráfica 6 se muestran las curvas a diferentes pH, y se observa la influencia de los protones (H^+) en la fluorescencia, pues a pH ácido la excitación es de 100 UAF mientras que a pH alcalino es de 500 UAF, es decir que la acidez o alcalinidad determina la intensidad de la fluorescencia del fluorocromo, y sugiere un pH óptimo.

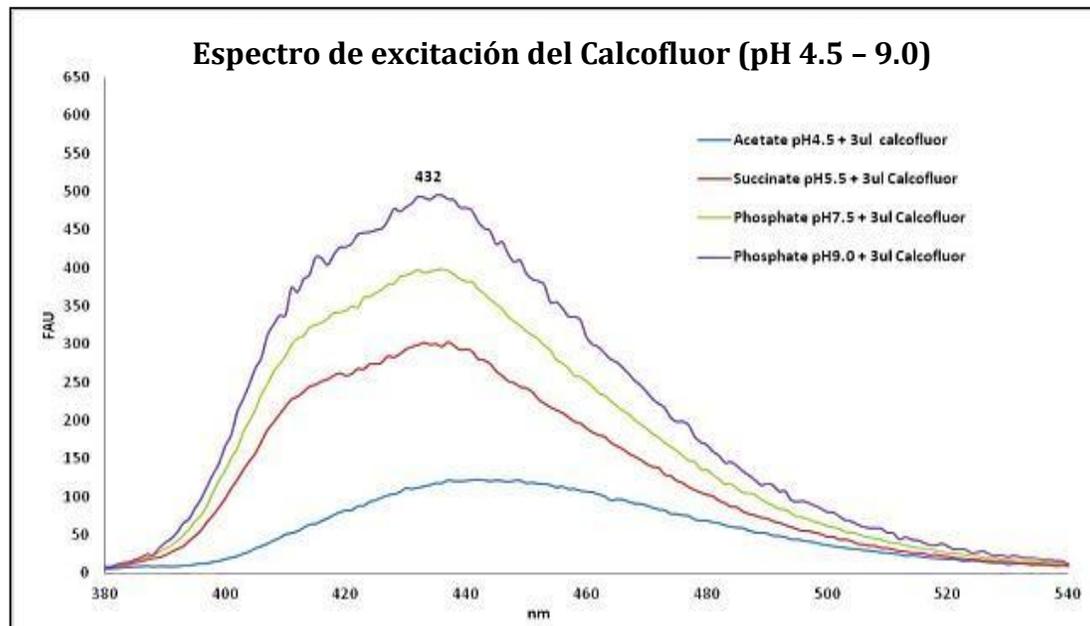


Figura 17. Espectro de excitación en 2D del Calcofluor en buffer de acetatos pH 4.5, succinato 5.5, fosfatos 7.5 y fosfatos pH 9.0.

La gráfica 7 (A) muestra el espectro de emisión en 3D excitando el calcofluor, con el valor máximo característico a 350 nm; la misma gráfica vista desde arriba (top view) en (B), indica el área que abarcó la emisión y la ubicación más precisa a 345nm cruzando con 435nm con intensidad 315 UAF. Cabe aclarar que la serie de máximos que cruzan el área, son los valores de la energía de excitación que corresponden a los máximos de emisión, los cuales también forman una diagonal en la vista desde arriba en B, por lo que no deben ser tomados en cuenta. Para esta gráfica se empleó 3ul de Calcofluor (0.0327 μ moles) en buffer de fosfatos pH 7.5 tomando como referencia los espectros previos obtenidos en la gráfica 3 y 4, que indican el pH óptimo en que se encuentra la mejor intensidad de emisión y excitación de fluorescencia del Calcofluor.

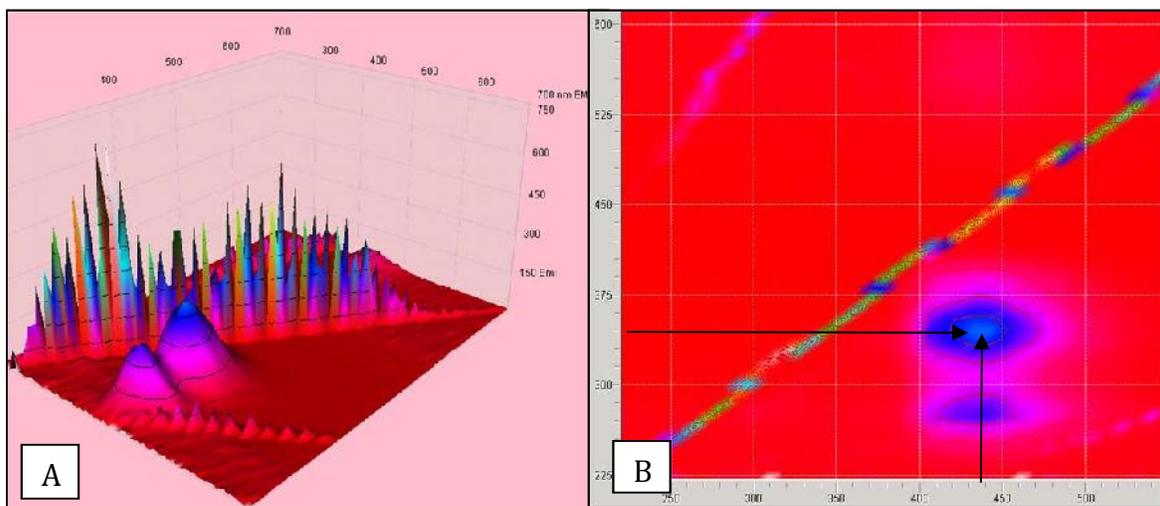


Figura 18. Espectro de emisión en 3D excitando el Calcofluor en buffer de fosfatos pH 7.5, en (A) vista lateral mostrando la intensidad y en (B) la vista desde arriba muestra el área.

La gráfica 8 muestra los espectros de emisión y excitación en 2D, de la interacción entre un testigo positivo como la proteína albumina sérica bovina y el calcofluor en buffer de fosfatos pH 7.5. En A, el máximo de emisión a 350nm, (el calcofluor solo emite a 350nm de 670-700 UAF), aumenta a medida que se incrementa la cantidad de proteína. Un

resultado similar se aprecia en B, en los espectros de excitación, pues a 431nm el calcofluor tuvo un valor de excitación cercano a 700 UAF al ser combinado con incrementos de la proteína albumina.

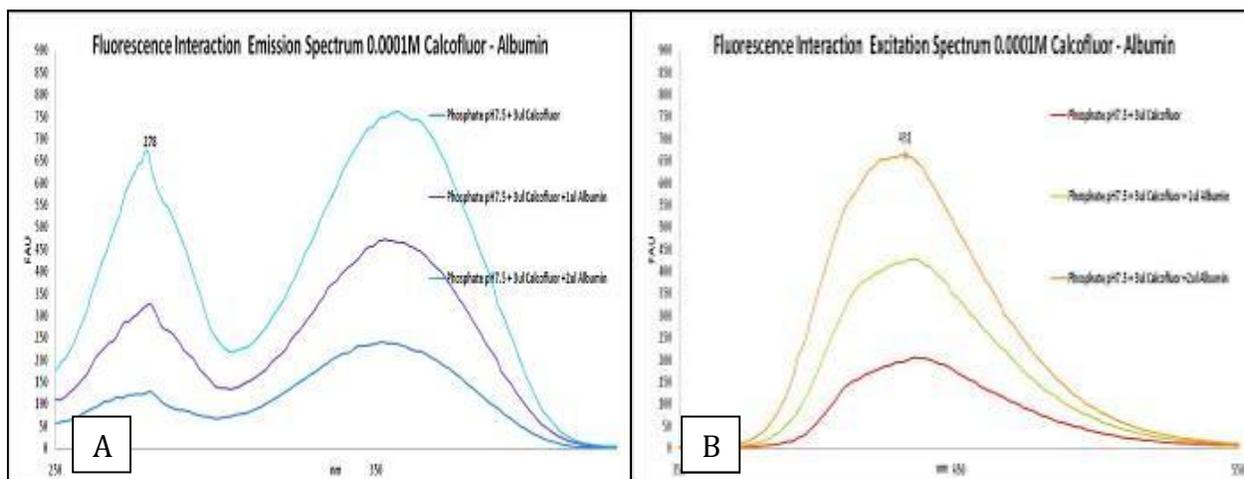


Figura 19. Gráfica 8. Espectros por fluorescencia en 2D de la interacción entre Calcofluor y Albúmina en buffer de fosfatos pH 7.5. (A) Espectro de emisión con puntos de incidencia a 350 nm. (B) Espectro de excitación a 431 nm, en ambos casos se agregó el espectro del calcofluor como control positivo y punto de comparación.

Un resultado similar se puede apreciar en la gráfica 9 (A), donde además de la banda conocida del calcofluor se puede ver uno más a 350nm de la albumina, en la vista desde arriba (B) se ve más claramente este segundo pico con emisión de 360 a 350nm. La aparición de este segundo pico es producto de la interacción entre el calcofluor y la albumina en buffer de fosfatos pH 7.5. Por otra parte en C se puede apreciar el espectro de excitación de la albumina (5g/dl) sola para lo cual se empleó 3ul de una dilución 1:100 equivalente a (0.5mg/ml) la cual muestra un valor máximo a 270nm con intensidad de 480-600 UAF, visto también desde arriba en D. Es decir en (C y D) la proteína no interactúa con alguna otra molécula, mientras que en A y B la albúmina interactúa con el calcofluor.

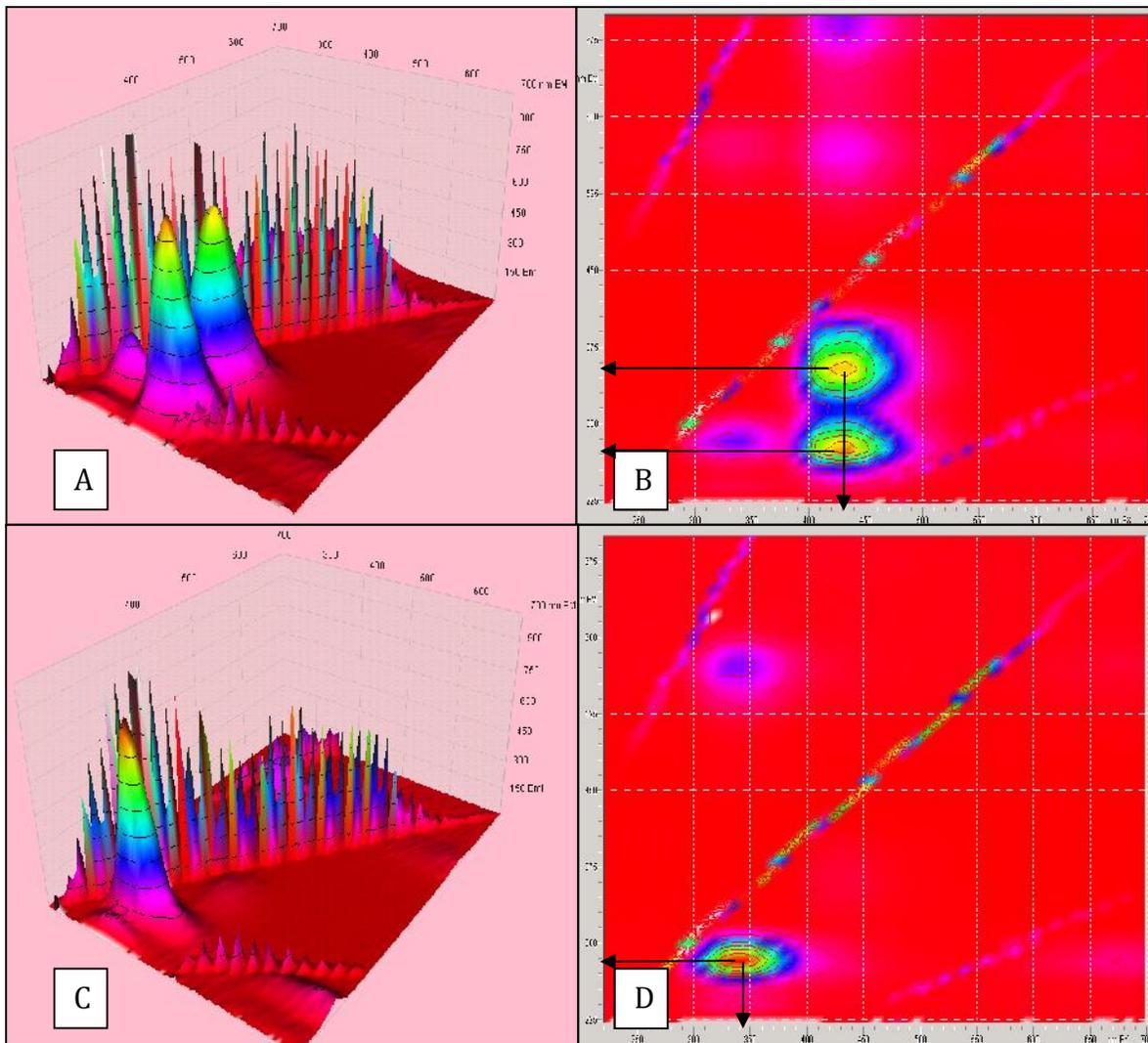


Figura 20. Espectros por fluorescencia en 3D de la interacción entre calcofluor y albumina en buffer de fosfatos pH 7.5. (A) Espectro de emisión de fluorescencia en 3D, esta vista se muestra desde arriba (top view) en (B). En C podemos apreciar el espectro de excitación solo de la albumina en buffer de fosfatos pH 7.5 con una concentración de 0.05 mg/ml, podemos apreciar a 270 nm un pico con un máximo de ~780 UAF, en D se muestra este mismo espectro visto desde arriba.

En la gráfica 10 (A) se muestra los espectros de excitación que tiene el calcofluor cuando interactúa con α -quitosano KitoMed® en diferentes buffers (acetatos pH 4.5, succinato pH 5.5 y fosfatos pH 7.5), se puede notar que a pH 4.5 no hay modificación al espectro del calcofluor lo que indica que probablemente no se está llevando a cabo ninguna interacción, ya que el quitosano por sí solo no presenta espectro de fluorescencia. En B se muestra el espectro 2D del calcofluor interactuando con α -quitosano en aumento gradual de 1 μ l, 3 μ l, 5 μ l, y 10 μ l de α -quitosano KitoMed®, se agregó el espectro del calcofluor como control.

Se observa el incremento de la fluorescencia desde 400 hasta 1,000 UAF cuando se añade el α -quitosano. Es decir hay un incremento de cinco veces la fluorescencia del calcofluor.

Los espectros en 3D se muestran en C donde se puede ver la aparición de dos picos a 380nm con valor de superior a 900 UAF, al observar la gráfica 3D desde arriba (D) se puede comprobar la existencia de dos áreas, evidencia clara de algún tipo de interacción entre el quitosano y el calcofluor. En este ensayo específicamente se emplearon 3ul de calcofluor y 3ul de α -quitosano KitoMed® de camarón en buffer de fosfatos pH 7.5.

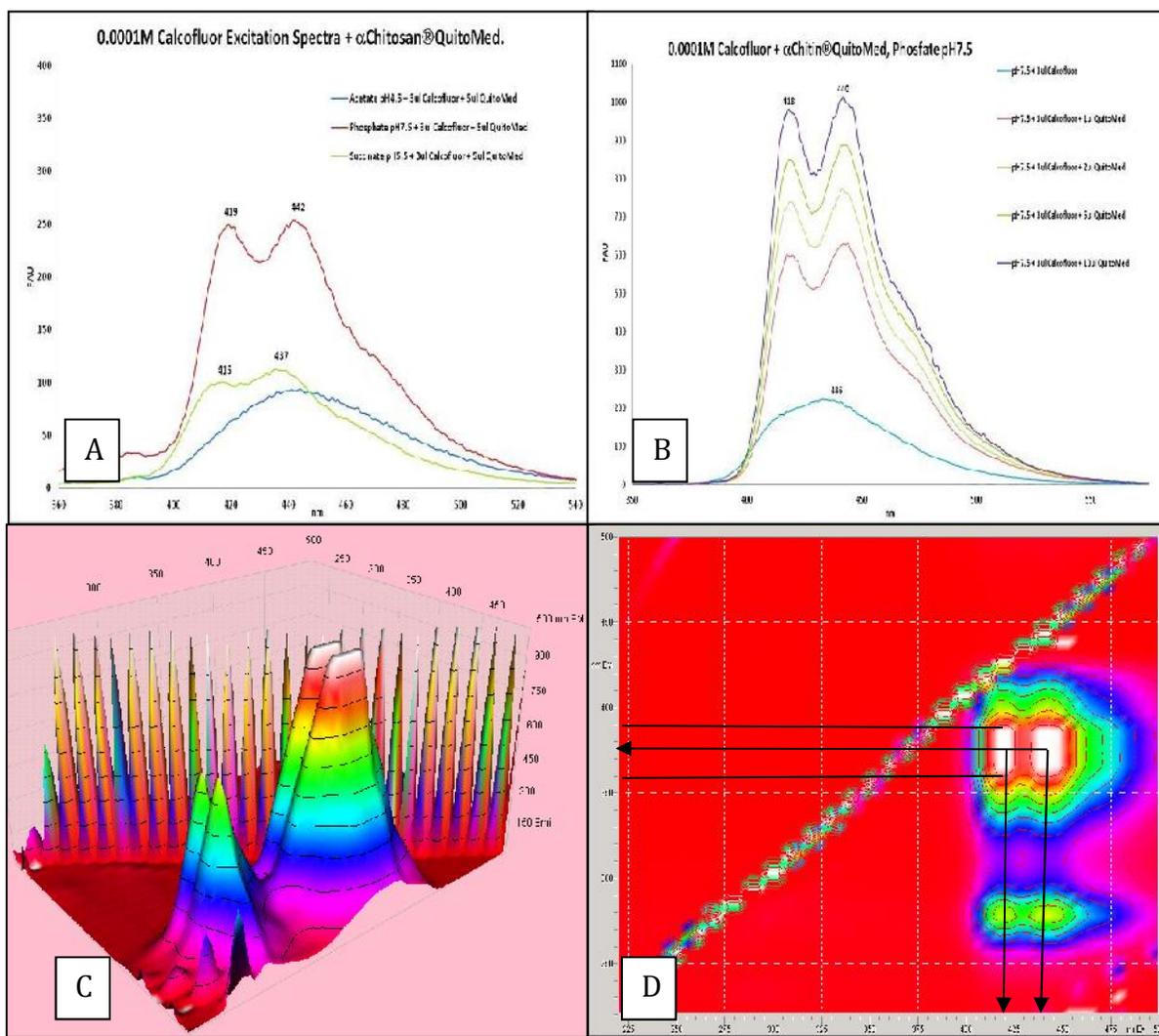


Figura 21. Espectros de fluorescencia en 2D y 3D de calcofluor y α -quitosano. (A) La interacción entre Calcofluor y α -quitosano KitoMed® de camarón se midió en diferentes pH, en (B) se midió la interacción con aumento gradual de α -quitosano. Es interesante mencionar que la distancia que separa ambos máximos promedia de 17 a 22nm. En C se puede ver la producción de cuatro señales, los dos más altos a 380nm debido a la interacción molecular y los otros dos a 271nm (debido al "Efecto Raleigh" o de dispersión de la luz), en D la vista por arriba de C muestra un área de excitación.

digestión con NaOH al 40%, esterilización y diálisis. El espectro A corresponde al β -quitosano de hembras mientras que en C se presenta el espectro del β -quitosano de machos, en B y D se muestra la vista desde arriba de los espectros anteriores. Puede notarse que en ambos espectros A y C, se localiza solo una señal, no doble como en α -quitina, con más UAF que el calcofluor solo y 345nm cruzando con 435nm y aparentemente en el mismo sitio del calcofluor, como se ha mostrado en gráficas anteriores características y distintivos del fluorocromo, lo que nos indica que también hay algún tipo de interacción que favorece el incremento de la fluorescencia. Los ensayos se realizaron de manera similar empleando 3ul de Calcofluor y 3ul de β -quitosano de triatóminos en buffer de fosfatos pH 7.5.

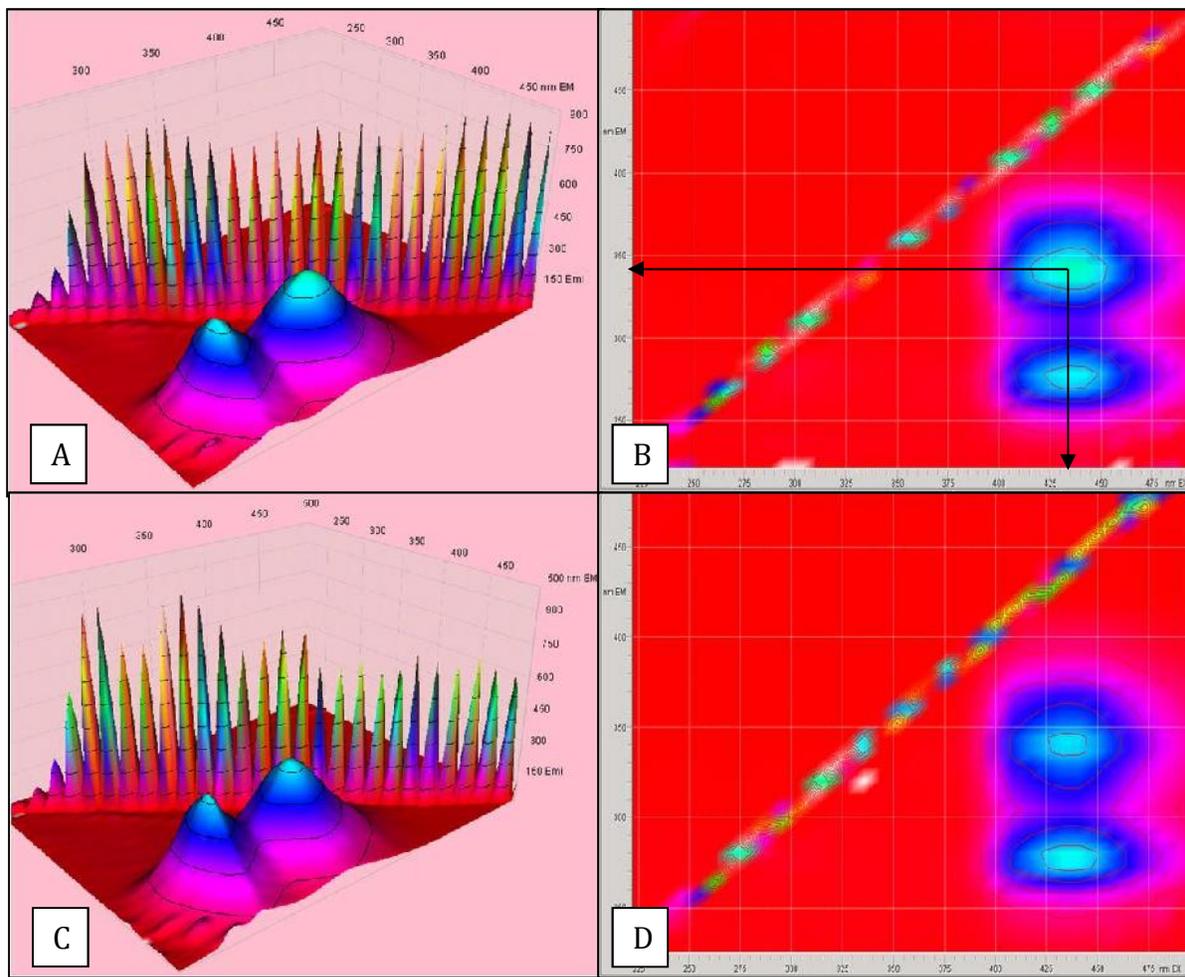


Figura 22. Espectros de fluorescencia 3D de la interacción entre calcofluor y β -quitosano de triatóminos en buffer de fosfatos pH 7.5. (A y C) se muestra la interacción del calcofluor con β -quitosano de triatóminos hembras y de machos. En B y D se muestran las vistas desde arriba. Se observa que el polímero de los insectos tiene solo una señal en el cruce de 345nm y 435nm.

En la gráfica 12 se muestra los controles correspondientes a los espectros de β -quitosano de camarón (A) y β -quitosano de chapulín (C) extraído en el laboratorio mediante digestión de la quitina de ambos organismos por NaOH al 40%, en esterilización y diálisis. En B y D se muestra las vista desde arriba de cada espectro y se observan los cuatros valores máximos, dos de ellos son característicos de la interacción Calcofluor – β -quitosano a 380nm. En ambos casos se empleó buffer de fosfatos 7.5, 3ul de calcofluor y 3ul de β -quitosano. Cabe aclarar que la serie de señales en forma de picos que se ve atrás y enfrente del espectro 3D en A corresponde a los incremento lineal (nm x nm) de la longitud de onda de la excitación y respectivamente a los máximos de fluorescencia emitidos y con que se construye las gráficas, no deben ser tomados en cuenta para el análisis.

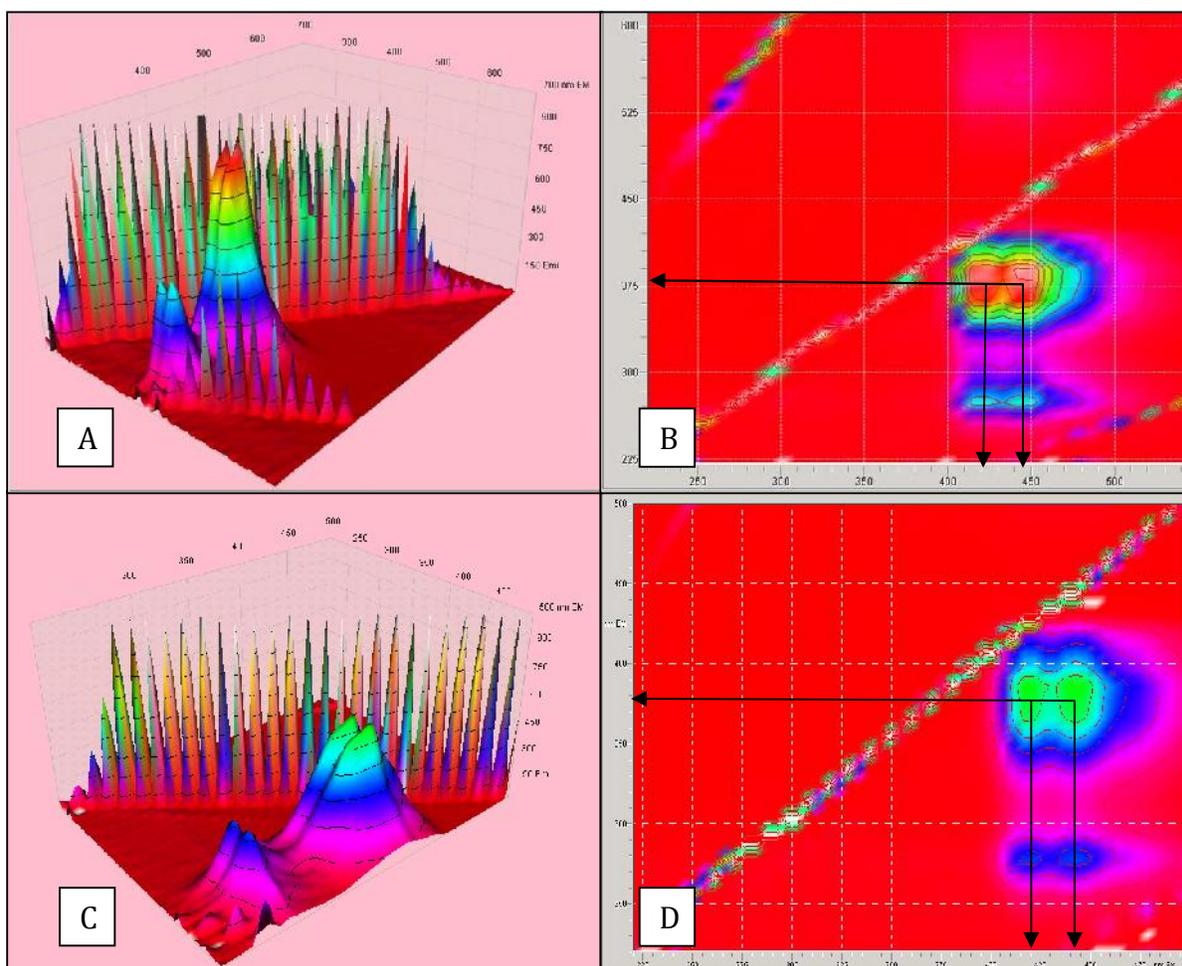


Figura 23. Espectros de fluorescencia 3D de la interacción entre calcofluor y β -quitosano de camarón y β -quitosano de chapulín en buffer de fosfatos pH 7.5. (A) La interacción del calcofluor con β -quitosano de camarón y β -quitosano de chapulín (B) tiene diferentes valores, probablemente por el origen de la quitina. En C y D se muestran las vistas desde arriba.

6.9. Análisis de quitinasas por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS, PAGE-nativa, PAGE nativa-quitina coloidal y PAGE SDS- quitina coloidal)

6.9.1. Quitina coloidal

Se obtuvo quitina coloidal a partir de quitina de camarón y chapulín, al final del proceso tomaron un aspecto gelatinoso, por una parte la quitina coloidal de camarón tomó un color blanquecino, mientras que la quitina de chapulín se coloreo en tono café claro. En la figura 12 se muestra la quitina coloidal empleada para los geles PAGE-quitina coloidal.

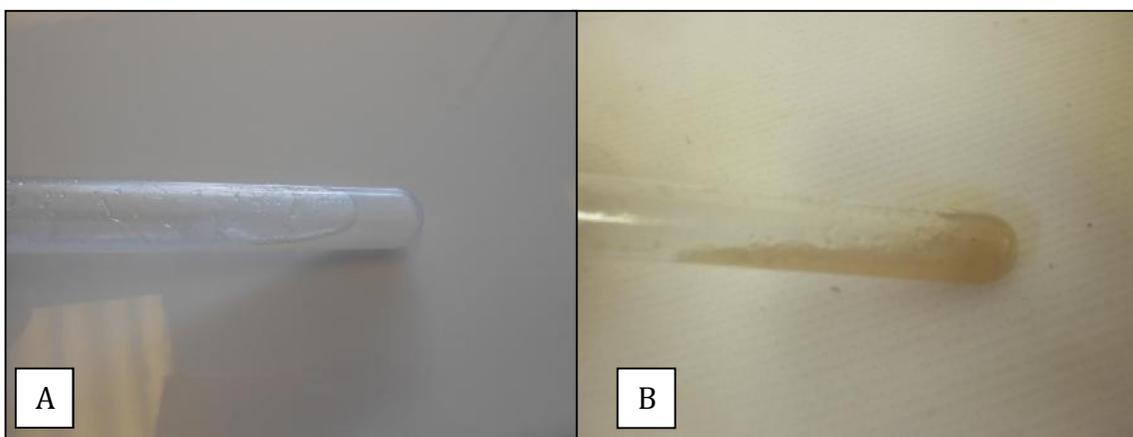


Figura 24. Quitina coloidal de camarón y chapulín. En A se muestra la quitina coloidal obtenida a partir de alfa-quitina de camarón, cuyo aspecto es viscoso y de color blanquecino, en B podemos observar quitina coloidal obtenida de -quitina de chapulín, la cual tiene un color café claro, aspecto gelatinoso y un granulado más grande que la de camarón.

6.9.2. Cultivos bacterianos

Se realizaron 8 cultivos bacterianos en medio mínimo de biodegradación (mlb) adicionado con quitina de camarón, como fuente de carbono y nitrógeno, para inducir la producción de quitinasas y con el fin también de poder emplearlas como una referencia positiva en subsecuentes experimentos (figura 13). Las bacterias que crecieron empleando como sustrato la quitina, de manera satisfactoria y repetida en los cultivos, fueron cinco (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Citrobacter freundii*, *Alcaligenes faecalis*, *Aeromonas caviae* y *Escherichia coli*). A partir de estos se separaron los restos de quitina con las bacterias (letra “a”) y el sobrenadante (letra “b”) para analizarlos por PAGE-nativo.

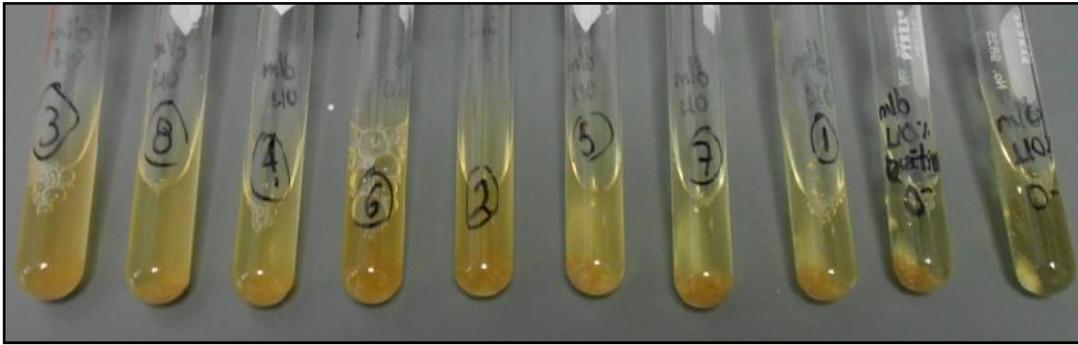


Figura 25. Cultivos bacterianos, realizados en medio mínimo líquido con quitina como fuente alterna de C y N. Las numeración indica las cepas empleadas: 1) *Psychrobacter phenylpyruvicus*, 2) *Alcaligenes faecalis*, 3) *Aeromonas caviae*, 4) *Citrobacter freundii*, 5) *Pseudomonas aeruginosa*, 6) *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, 7) *Staphylococcus aureus* y 8) *Escherichia coli*. Los dos tubos restantes, que permanecen transparentes o sin crecimiento junto al tubo 1, son el medio solo y con quitina pero sin inocular.

6.9.3. Actividad enzimática mediante electroforesis en geles.

Se demostró la actividad de enzimas quitinasas de triatóminos, presentes en exuvias de 4° y 5° estadio y de quitinasas de bacterias, así también la actividad de quitosanasas de un hongo, y con los tres tipos de muestras se hicieron los ensayos de biodegradación de quitina. En los apartados siguientes se describen los ensayos con cada enzima.

6.9.3.1. Quitinasas de bacterias

En la figura 14 (A) se muestra un gel nativo al 12%; en este gel se pusieron los precipitados de cuatro bacterias (2a, 4a, 6a y 8a), cuatro sobrenadantes (2b, 4b, 6b y 8b) y marcadores de peso molecular (M). Los números corresponden a (1) *Psychrobacter phenylpyruvicus*, (2) *Alcaligenes faecalis*, (3) *Aeromonas caviae*, (4) *Citrobacter freundii*, (5) *Pseudomonas aeruginosa*, (6) *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, (7) *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (8). En el gel puede notarse la presencia de una proteína con un peso aproximado de 70 KDa; que podría corresponder a una quitinasa en las bacterias 2, 4 y 6. Además esa misma proteína está en el sobrenadante del cultivo 6b, sugiriendo quizás que se trata de la misma enzima pero excretada por la bacteria. Por otro lado en la figura 14 (B) se presenta otro PAGE-nativo al 12% con las muestras 5 y 7 (crecimiento ausente) y las muestras 1 y 3 (crecimiento positivo), sin embargo, en ninguna se encontró la proteína de 70 KDa. Debido a estos resultados, se decidió emplear únicamente a las bacterias 2, 4 y 6, las cuales

muestran la presencia de una probable quitinasa empleada para digerir la quitina de camarón.

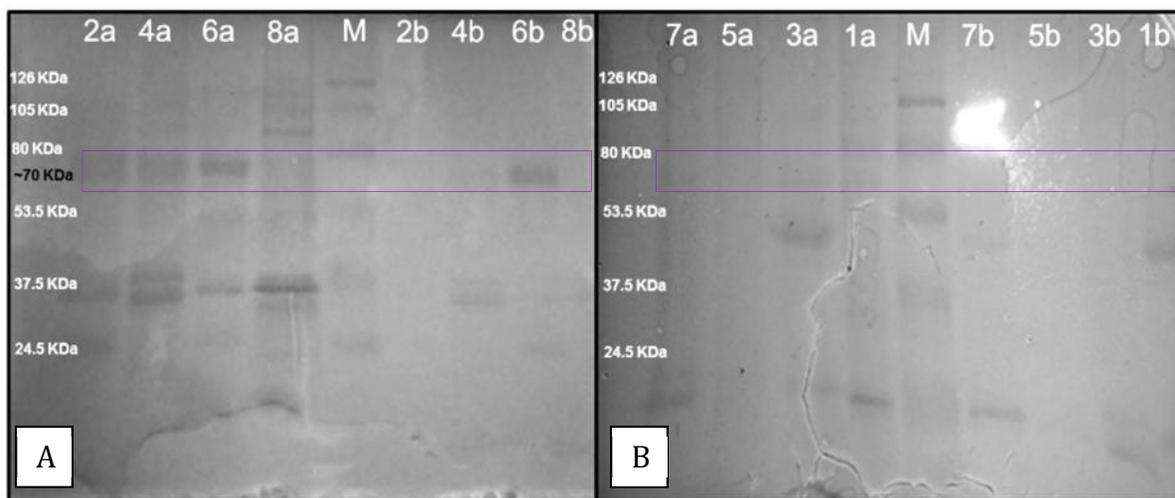


Figura 26. PAGE-nativo. En A) se indican en el recuadro las bandas teñidas por Coomassie que indican la presencia de una proteína en los carriles 2a, 4a, 6a (bacterias) y 6b (sobrenadante) con peso molecular aproximado de 70 KDa, la cual probablemente es de una quitinasa. En B) un gel similar con las muestras sin crecimiento (5 y 7), más las muestras 1 y 3 con crecimiento pero sin detectar la proteína.

6.9.3.2. Quitinasas de triatomas

Con la finalidad de encontrar las enzimas quitinasas que se supuso están presentes en las exuvias o exoesqueletos de las ninfas de los triatóminos *Meccus longipennis*, se realizaron varios PAGE-nativo con Quitina Coloidal (PAGE-QC). Para ello se pulverizaron exuvias con silica, y se almacenaron a temperatura ambiente hasta el momento de emplearlas en la electroforesis. En cada ensayo se empleó una cantidad determinada en miligramos del pulverizado, después se disolvió en determinados microlitros de buffer de muestra desnaturizante o nativo en volumen suficiente para disolver y extraer las quitinasas, se hirvieron durante 5 minutos para poner determinados microlitros por pozo y al final separarlas mediante PAGE, tal y como se describe en la sección 5.9.2.3 de Materiales y Método.

En la figura 15, las muestras corresponden a: (M) marcadores de peso molecular, (A1 y B1) exuvias de 4° y 5° estadio en condiciones nativas, (A2 y B2) exuvias de 4° y 5° estadio en condición desnaturizante. En A se presenta un PAGE-SDS al 12% sin quitina coloidal

como control, está teñido por Coomasie y se observa la banda con peso molecular aproximado a los 65 KDa, la cual podría ser de la quitinasa de *Meccus longipennis*, la literatura menciona que el peso molecular de estas enzimas en insectos oscila entre 60 y 80 KDa [26, 33, 34]. En (B) se presentan dos geles PAGE al 12% - QC 0.01% (nativo y desnaturalizante) con muestras de exuvias similares a (A), y también teñidos por el mismo método. Estos geles, posterior al corrimiento electroforético, fueron incubados a distintos tiempos y pH, en buffer de acetatos (pH 5.5) y buffer de fosfatos (pH 6.5), en ambos puede distinguirse una banda similar, con un peso aproximado de 65 KDa, que podría ser la correspondiente a la quitinasa de estos triatóminos.

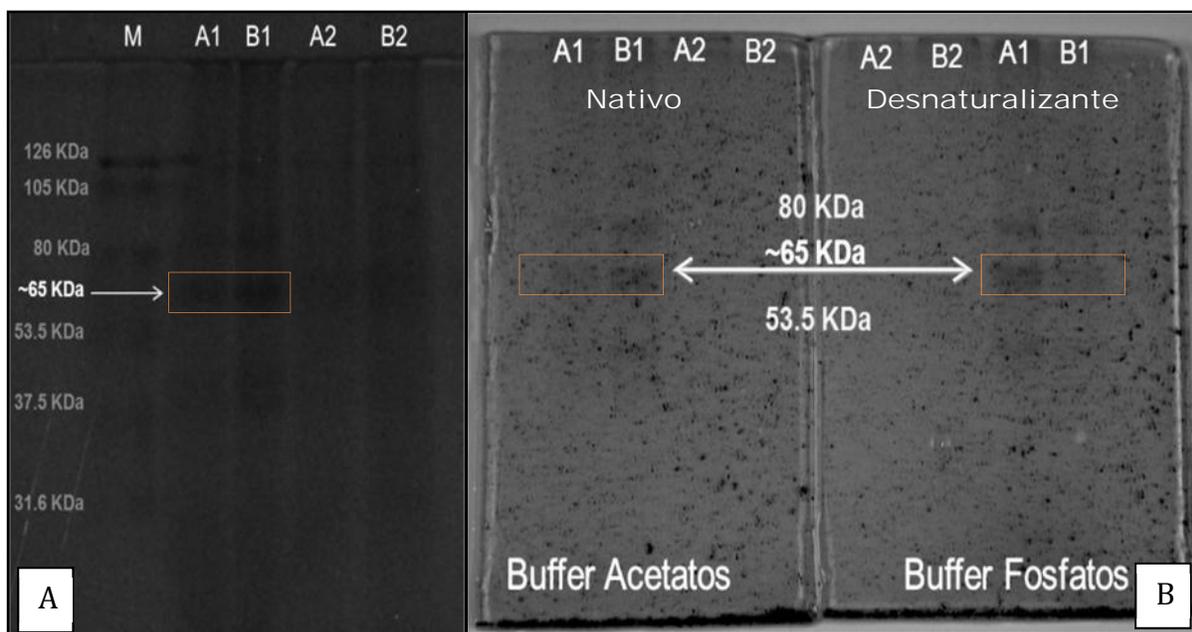


Figura 27. PAGE-SDS y PAGE-QC En A se muestra un PAGE-SDS al 12% y sin quitina coloidal, la flecha señala el sitio donde podría estar la enzima quitinasa proveniente de exuvias de *Meccus longipennis*, determinada por las banda de pesos moleculares, con peso aproximado de 65 KDa. En B se muestran dos geles PAGE-QC que fueron incubados a distintos tiempos y pH, con una banda similar de peso de 65 KDa.

6.9.3.3. Quitosanasas de hongo

En la figura 16 (A) se muestran dos tubos únicamente con alfa-quitosano puro (Kitomed®) disuelto en agua y ácido acético (0.05%) antes y después de ser digerido durante una semana por un cultivo de un hongo (señalados con una flecha amarilla) y del cual posteriormente se obtuvo el sobrenadante para analizarlo mediante PAGE, buscando las enzimas excretadas. En B se muestra el PAGE-SDS al 12% con las muestras siguientes:

(T1) Tubo 1, (T2) Tubo 2, (T3) Tubo 1, (4°) exuvias cuarto estadio, (5°) exuvias de quinto estadio y (M) marcador de peso molecular. De la misma manera que anteriormente, se pueden ver tres bandas a la misma altura probablemente quitosanasas solubles presentes en los cultivos, con peso molecular entre 77-80 KDa, también se notan las bandas oscuras de las exuvias. El gel se tiñó con nitrato de plata ya que la sensibilidad de la técnica permite detectar muy bajas concentraciones de proteínas (quitosanasas), en contraste se puede notar que las muestras de exuvias tuvieron una gran cantidad de proteínas que hicieron que se saturara con el revelado, imposibilitando ver bandas definidas como las anteriores. En el último carril de izquierda a derecha se muestra el marcador de peso molecular que va de 126 KDa a 31.6 KDa en orden descendente.

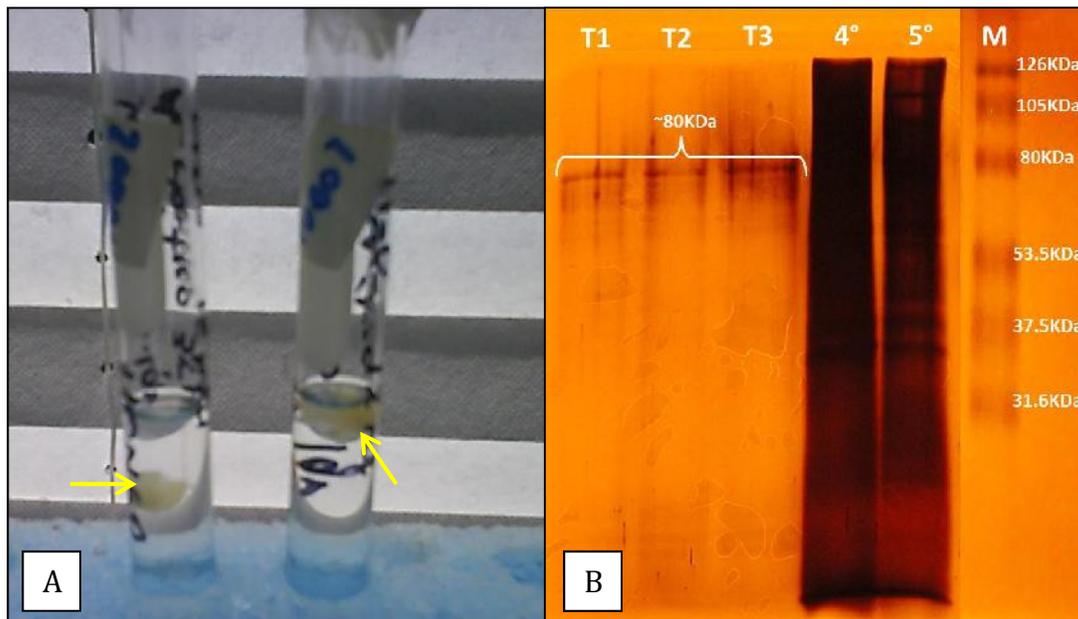


Figura 28. Digestión de quitosano y quitosanasas de hongo. En A se muestra los cultivos de hongo en tubo para demostrar la digestión de quitosano. En B, PAGE-SDS revelado por tinción de Plata, se puede ver las tres bandas de las quitosanasas excretadas por los hongos con un peso aproximado de 80 KDa, los marcadores de peso molecular se ubican a la derecha.

6.9.4. Electroforesis (PAGE-Nativa)

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida de quitinasas aisladas de los cultivos de bacterias, hongos y de exuvias de triatóminos, en A de la figura 17 se presenta un PAGE-Nativo al 12% revelado por tinción con azul Coomassie de las quitinasas de las bacterias *Alcaligenes faecalis* (2a), *Citrobacter freundii* (4a), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (6a) y

como control negativo *Aeromonas caviae* (3a), las bandas correspondientes están señaladas con un rectángulo amarillo a 70 KDa aproximadamente. En este mismo gel en el lado derecho del marcador (M) también podemos ver las quitinasas de *Meccus longipennis* obtenidas de las exuvias de 4° y 5° estadio. Por otro lado en B se muestra un gel Nativo al 12% teñido con nitrato de plata de las quitosanasas de hongos señaladas aproximadamente a 80 KDa. El marcador de peso molecular usado en ambos casos fue de 126 KDa a 31.6 KDa en orden descendente.

Con estos datos corroboramos la producción y el aislamiento correcto de las enzimas empleadas para los experimento de biodegradación en los geles de quitina coloidal.

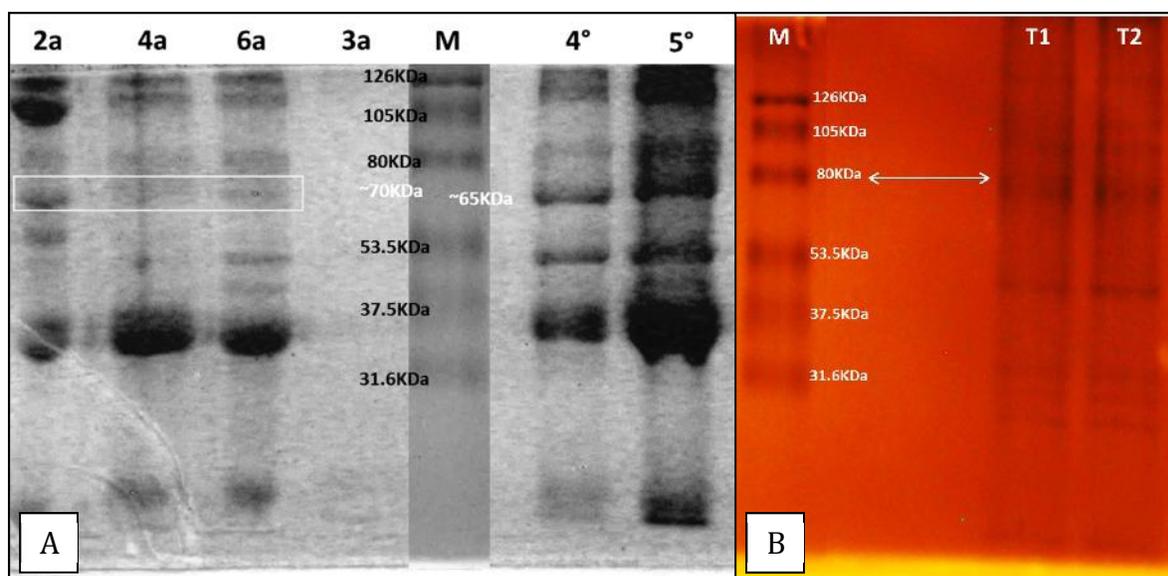


Figura 29. Geles quitinasas. En A se muestra un gel nativo teñido con azul de Coomasie, al centro se encuentra el marcador (M), señaladas con un cuadro amarillo a 70 KDa aprox. vemos las bandas de las quitinasas de las bacterias *A. faecalis* (2a), *C. freundii* (4a) y *P. pseudoalcaligenes* (6a) más un control negativo de *A. caviae* (3a), del lado derecho del marcador tenemos las quitinasas de triatóminos a 65 KDa aprox. En B se muestra otro gel nativo revelado con nitrato de plata, a 80 KDa se ven las bandas correspondientes a las quitosanasas de hongos.

6.9.5. Actividad enzimática detectada en geles PAGE-QC

6.9.5.1. Geles de poliacrilamida - quitina coloidal

En la figura 18 se muestran dos geles de poliacrilamida - quitina coloidal, uno nativo teñido por Coomasie - Calcofluor en color azul (A) y otro desnaturalizante teñido por nitrato de

plata en color amarillo (B) ambos al 12%, puede notarse las partículas de la quitina coloidal en ambos pero principalmente en A. En ambos geles no se cargaron muestras pero si pasaron por el proceso de electroforesis (2 horas de voltaje, 30 días de incubación pH 5.6 a 30 - 33°C, fijado por 30 min en ácido acético al 10% o glutaraldehído al 10%, lavados con agua destilada, tinción por Coomasie - Calcofluor o nitrato de plata, los geles se emplearon con fines comparativos y se demuestra que no se modifica la consistencia ni la ubicación de las partículas (quitina coloidal) o algún otro aspecto relacionado con los geles o la técnica.

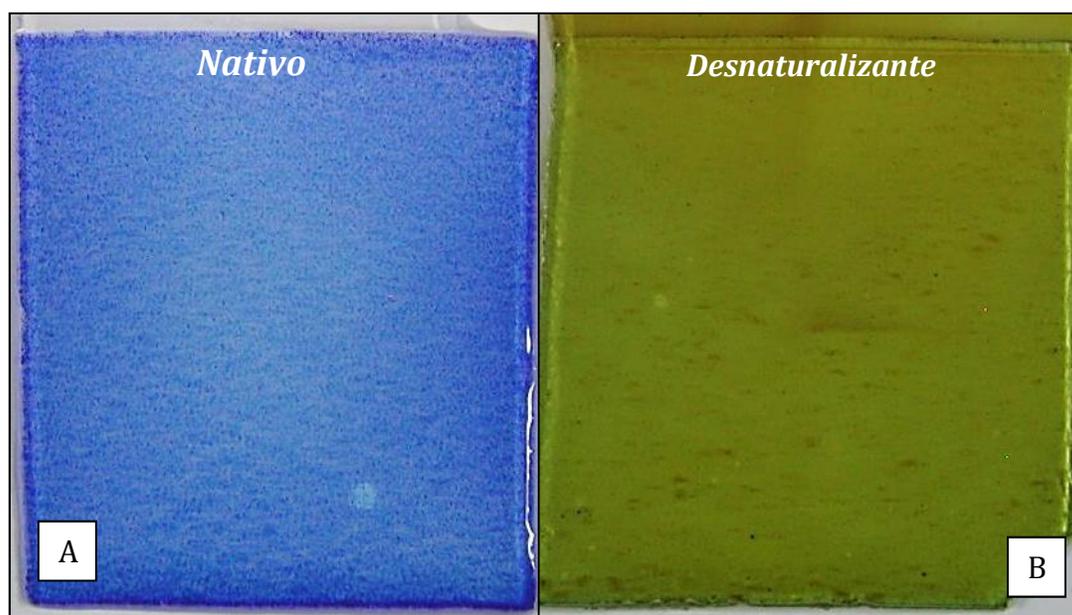


Figura 30. Geles de Poliacrilamida – quitina coloidal, en A gel nativo revelado por Coomasie – Calcofluor. Se observan claramente las partículas de la quitina, en B gel desnaturalizante teñido por nitrato de plata, en este caso las partículas son menos visibles debido a que la técnica es para revelar proteínas no polisacáridos. La electroforesis se efectuó con los geles pero sin muestras.

6.9.5.2. PAGE Nativa - Quitina coloidal

Los ensayos de biodegradación de quitina coloidal de camarón al 0.01% en geles de poliacrilamida al 10% y 12% se implementaron para detectar la presencia de quitinasas en bacterias, triatóminos y hongos, los cuales después de realizar la electroforesis se incubaron a pH, tiempo y temperatura apropiados. Puede mencionarse que el origen de la enzima quitinasa detectada determinó la actividad de biodegradación obtenida.

El gel de la figura 19 muestra la biodegradación por quitosanasas de hongos, este ensayo se

consideró como un control positivo, en él se detectaron enzimas de tres cultivos diferentes, tubo 1 (T1), tubo 2 (T2) y tubo 3 (T3), para el ensayo se montaron las muestras con un carril de separación para poder obtener una zona más definida entre ellas. Se puede observar con círculos azules, la zona de degradación por las enzimas, siendo la muestra T2 donde se observó un área más grande de aclaramiento y disminución de las hojuelas de quitina. El gel se preparó al 10% de acrilamida para recorrer un poco las bandas hacia abajo y de esta manera poder apreciar mejor la zona de degradación. Después de 15 días de incubación, se tiñó y reveló con nitrato de plata debido a la sensibilidad de la técnica para detectar pequeñas cantidades de proteínas. A la derecha podemos ver el marcador (albumina 60 KDa) por duplicado, y en esos carriles se ve que no hubo cambio de la quitina.

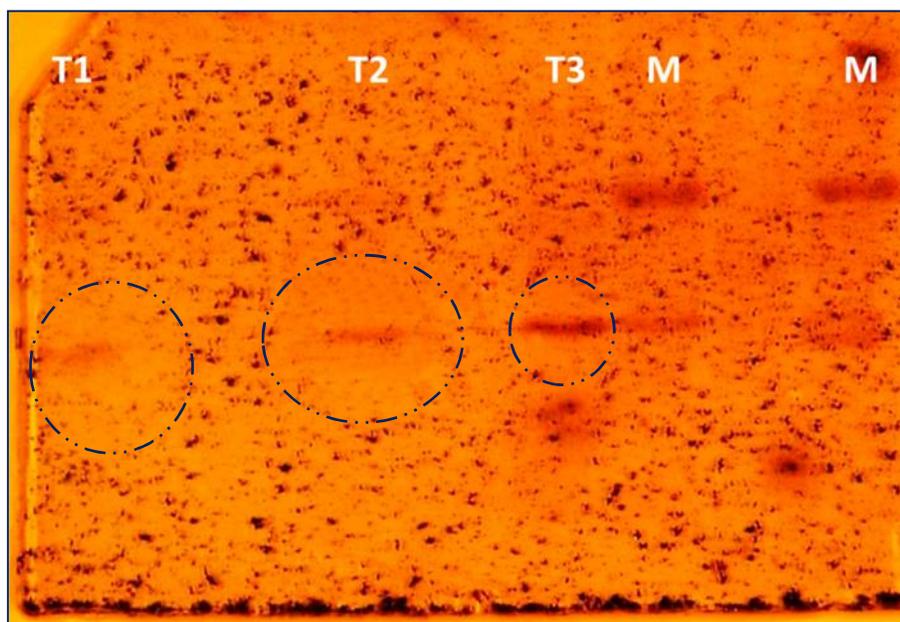


Figura 31. Gel de poliacrilamida – quitina coloidal para detectar la biodegradación por quitosanasas de hongos. A la derecha podemos ver los marcadores (M), y a la izquierda las quitosanasas de tres diferentes cultivos. El círculo azul y punteado marca la zona de degradación.

La biodegradación por quitinasas de bacterias se muestra en la figura 20, en un gel PAGE-QC al 12% del cual se incubó durante 15 días, se tiñó y reveló por el método de tinción de Calcofluor – Coomassie, empleando quitinasas de *Alcaligenes faecalis* (2a), *Citrobacter freundii* (4a) y *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (6a) como controles positivos adicionales a los de hongo. Las muestras se montaron con un carril de separación entre ellas para poder

notar mejor la zona de degradación. En los extremos se observan un par de bandas correspondientes al marcador de albumina. También se logra ver una zona clara donde se difundieron las enzimas presentes degradando la quitina, señalado con un ovalo punteado color amarillo, a diferencia de lo observado con las enzimas de hongos, aquí la disminución de quitina fue más notoria.

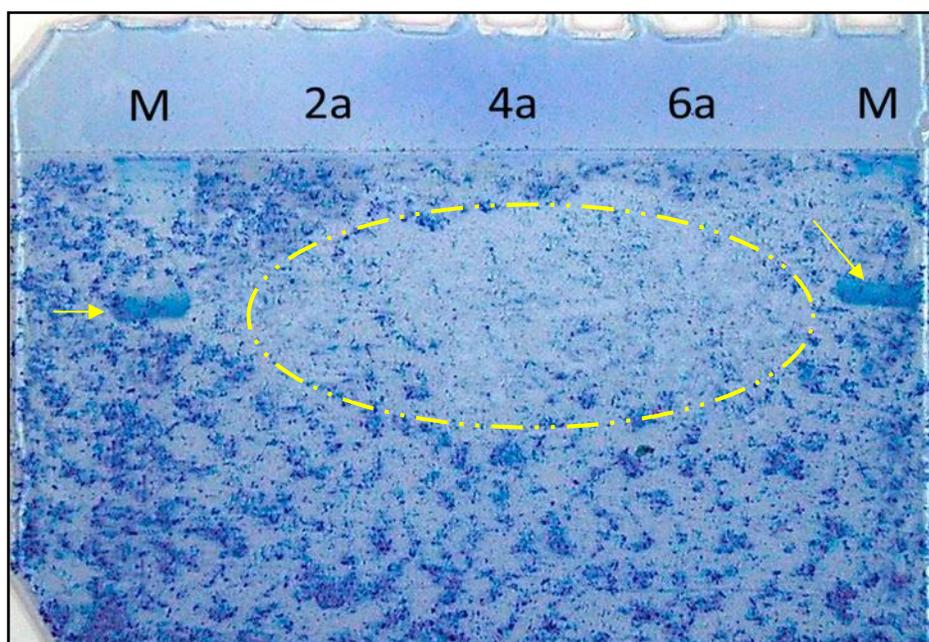


Figura 32. Gel de poliacrilamida – quitina coloidal para la biodegradación usando quitinasas de bacterias. Se colocó un marcador (flechas amarillas) en los extremos y las muestras 2a (*Alcaligenes faecalis*), 4a (*Citrobacter freundii*) y 6a (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*). Puede notarse el área de degradación por acción enzimática (ovalo amarillo) como zona clara y con disminución de quitina.

En la figura 21, se muestran dos gels correspondientes a la prueba de biodegradación por quitinasas de triatóminos. En A podemos apreciar después de incubarlo durante 5 días, cada muestra se puso en dos carriles (quitinasas de exuvias de 4° y 5° estadio), se puede notar en primera instancia el marcador de peso molecular y algunas bandas correspondientes a las enzimas, también podemos ver el granulado de la quitina el cual disminuyó su tamaño en el centro y alrededor de las bandas de las muestras. Por otra parte en B se muestra un gel similar que se incubó durante 15 días, puede verse que no hubo bandas después del revelado excepto el del marcador, también se ve la disminución de los gránulos de quitina por acción de las enzimas presentes las cuales se dispersaron o difundieron en varias zonas

del gel, a pesar de que las muestras se montaron de la misma forma que en A. Ambos geles se hicieron al 12% de acrilamida, se tiñeron y revelaron por el método Calcofluor – Coomasie, en los dos se usó albumina sérica bovina (0.5ug/μl) colocada en los extremos como marcador.

Con los resultados obtenidos se puede decir de manera general que la biodegradación por quitinasas de triatóminos fue mayor al de quitosanasas de hongo y quitinasas de bacterias, pues como se puede ver en la figura 21 (B) la disminución de los gránulos de quitina presentes en el gel a los 15 días fue más notable que en los otros (de bacterias y hongos).

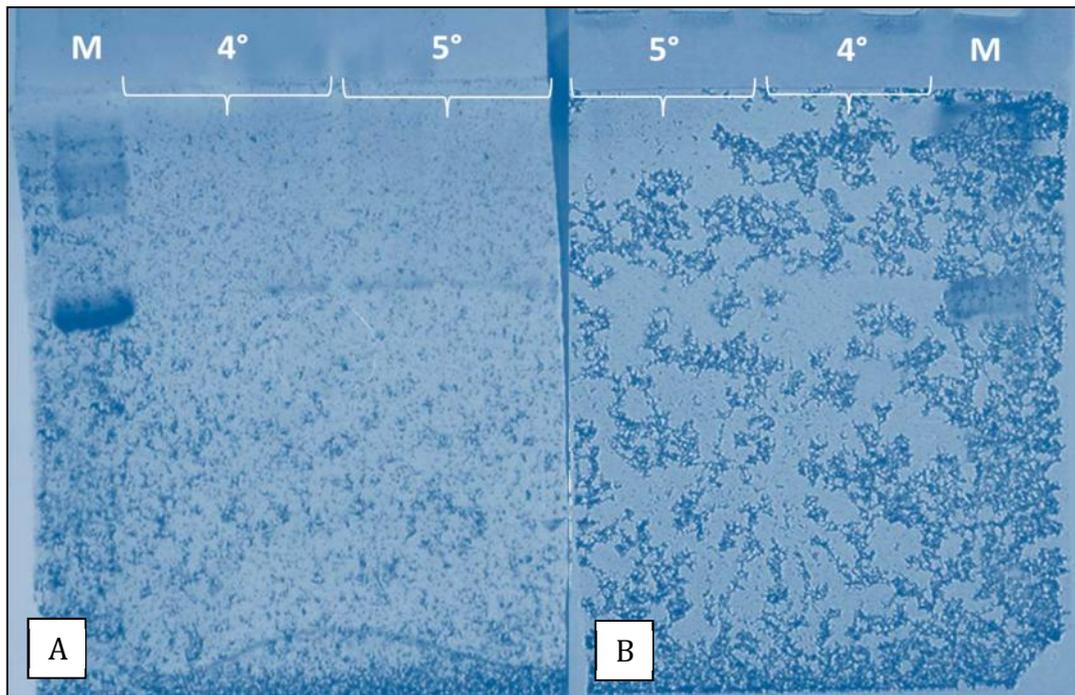


Figura 33. Geles de poliacrilamida – quitina coloidal para la prueba de biodegradación con quitinasas de triatóminos. En A el gel se incubó durante 5 días y después se reveló, mientras que en B un gel similar al primero pero incubado durante 15 días. En ambos casos dos carriles son de la misma muestra (4° y 5°) y en los extremos el marcador de peso molecular.

La figura 22, muestra otro gel de biodegradación preparado al 10% de poliacrilamida para detectar la actividad de quitinasas de triatóminos con un tiempo de incubación de 25 días, en este ensayo se puede ver como las enzimas degradaron la quitina de manera muy clara después de difundirse casi en la totalidad del gel, además debe notarse que la banda (flecha amarilla) correspondiente al marcador no se difundió de la misma manera que las enzimas. Se cargó tres carriles con quitinasas de 5° estadio en la izquierda, seguido del marcador (M)

de albumina y a la derecha se pusieron tres carriles de quitinasas de 4° estadio, el primer y último carril no tuvieron muestra.

Este resultado y el anterior (figura 21) nos indican que las quitinasas de triatóminos tienen la capacidad de biodegradar el polímero en su forma alfa (quitina de camarón). Se puede señalar que las quitinasas de triatóminos al parecer mostraron una mayor actividad de degradación en comparación con las enzimas de hongos y bacterias, pues se aprecia que la disminución de los gránulos de quitina fue más notoria.

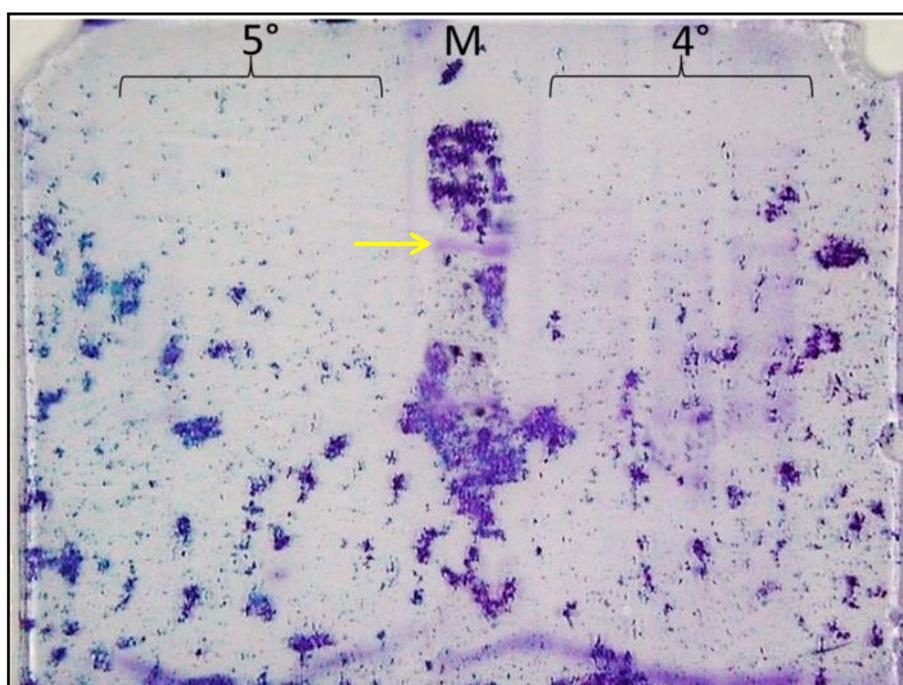


Figura 34. Gel de poliacrilamida – quitina coloidal para detectar la biodegradación por quitinasas de triatóminos. En tres carriles se pusieron quitinasas de 5° (izq.) y tres de 4° (der.), puede notarse que después de 25 días la degradación de la quitina es más notoria que en los gels anteriores, y que las enzimas se difundieron en casi la totalidad del gel. En el centro se ven las bandas del marcador.

6.10. Análisis *In silico*

Mediante una búsqueda de quitinasas de triatóminos en las bases de datos gratuitas y disponibles en internet (NCBI [42], EMBL-EBI [43], UniProtKB-ExPASy [44], VECTOR BASE [45] y RCSB-PDB [46]), se encontró únicamente la secuencia [R4G8S4_RHOPR] de una quitinasa putativa de 431 aminoácidos (aa) perteneciente al triatómino *Rhodnius*

prolixus, de las especies *Meccus longipennis*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma barberi* no se encontró registro alguno, por lo anterior y porque el genoma completo *R. prolixus* fue liberado recientemente se trabajó y usó a esta especie como referencia.

Con la secuencia encontrada se hizo el análisis correspondiente como se describe en la sección 5.10 de los *Materiales y Métodos*, se encontró el gen o secuencia codificante (*CDS) con lo cual se obtuvo el sitio de ensamble del transcriptoma (Transcriptome Shotgun Assembly o TSA) en forma de secuencia de expresión o RNA mensajero el cual fue de 1296 pares de bases (pb) registrado como RP-13146 y cuyo código de identificación en NCBI-GeneBank [42] es GAHY01000467.1, se tradujo con TRANSLATE TOOLS [50] y después mediante un Blast en NCBI [47] y BLAST-Vector Base [42] se encontraron secuencias homologas que codifican para quitinasas de las cuales se eligieron cinco cuyo porcentaje de identidad, longitud de aminoácidos y las especies a la que pertenecen se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de quitinasas elegidas para el alineamiento múltiple					
Especie	Código de registro	Base de datos	% de identidad	Tamaño (aa)	Nombre común
<i>Rhodnius prolixus</i>	R4G8S4_RHOPR	Vector Base	96	431	Chinche, Barbeiro
<i>Aedes aegypti</i>	Q17JL7_AEDAE	UniProtKB	88	441	Mosquito del Dengue
<i>Culex quinquefasciatus</i>	B0W7I9_CULQU	UniProtKB	81	440	Mosquito
<i>Bombyx mori</i>	IDGFL_BOMMO	UniProtKB	79	433	Palomilla blanca
<i>Anopheles gambiae</i>	A0NF62_ANOGA	Vector Base	75	439	Mosquito de la Malaria

Con las secuencias obtenidas se realizó un alineamiento múltiples utilizando CLUSTALW2 [51] del EBI (European Institute of Bioinformatics), en la figura 23 se muestra un

fragmento de este resultado comprendido entre el aminoácido 186 y el 431 de la secuencia de *R. prolixus*, los asteriscos (*) indican que en dicha posición los aminoácidos son 100% idénticos, los dos puntos (:) son posiciones en las que se han realizado sustituciones conservativas con aminoácidos de la misma familia, el punto (.) indica sustituciones menos conservativas y los guiones o gaps (-) indican espacios que el programa introduce para poder alinear de manera correcta cuando el número de aminoácidos o bases es dispar. Podemos observar que existe un buen porcentaje de residuos de aminoácidos altamente conservados entre las secuencias, sin embargo para poder delimitar los sitios de interés se empleó otra herramienta tal y como se describe en párrafos subsecuentes.



Figura 35. Fragmento de uno de los alineamientos de secuencias que codifican para quitinasas en insectos realizado con ClustalW2. Los asteriscos (*) indican aminoácidos idénticos, los dos puntos (:) sustituciones conservativas, el punto (.) sustituciones poco conservativas, los guiones (-) indican espacios. Los aminoácidos de la misma familia están del mismo color, el alineamiento está delimitado del aminoácido 186 al 431 de la secuencia de *Rhodnius prolixus*.

Para un mejor análisis de los sitios conservados en el alineamiento, se empleó el programa BOXSHADE SERVER [52] empleando cajas iluminadas en color negro y gris como se muestra en la figura 24 donde se puede notar algunas similitudes entre secuencias, lo que nos indica que existe cierto grado de conservación en algunas regiones de las quitinasas de estos insectos a través de la evolución, los cuales podrían tratarse de sitios catalíticos o sitios de unión, se delimitan con recuadros en color rosa los lugares de mayor interés por notarse altamente conservados.

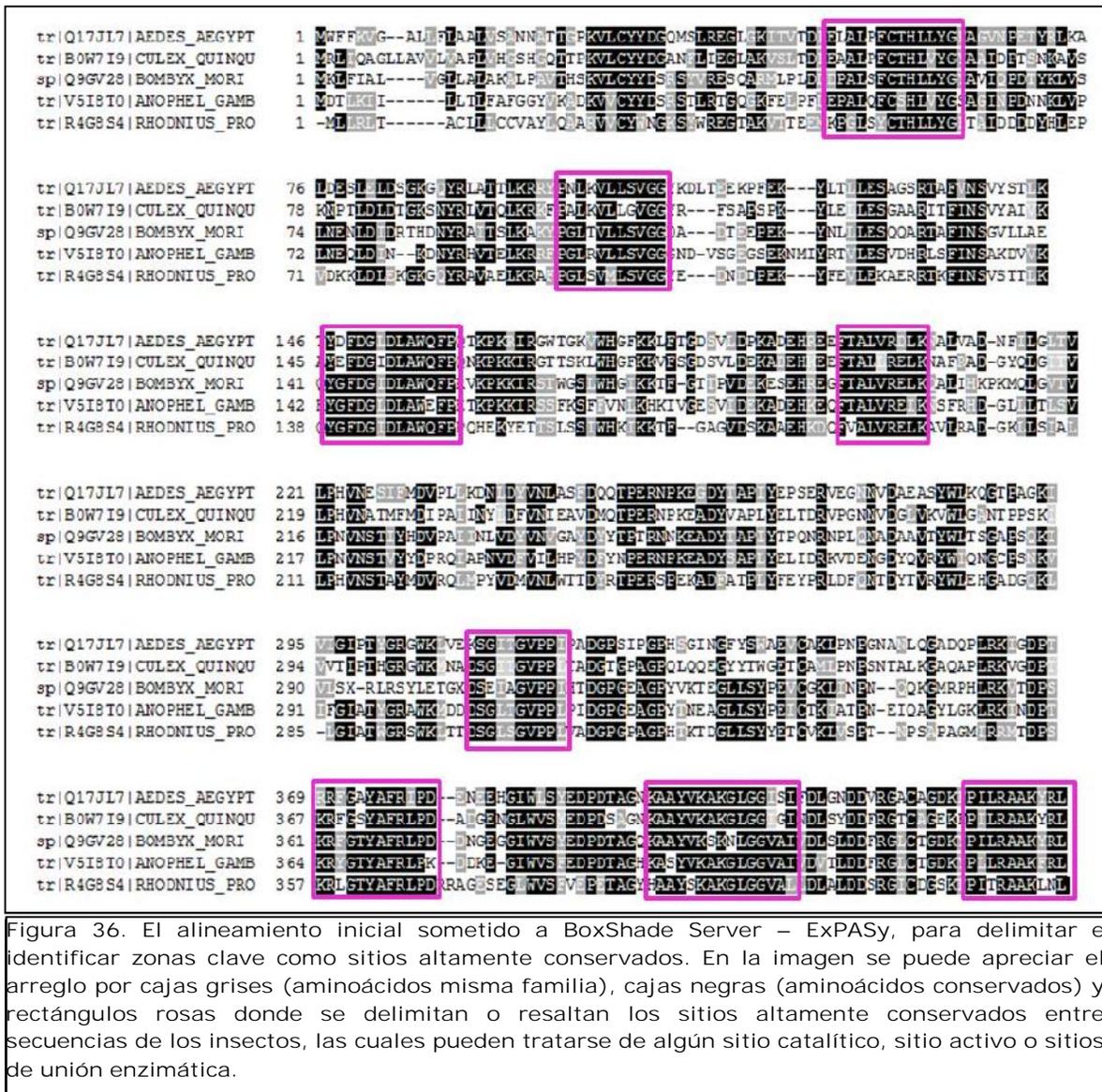
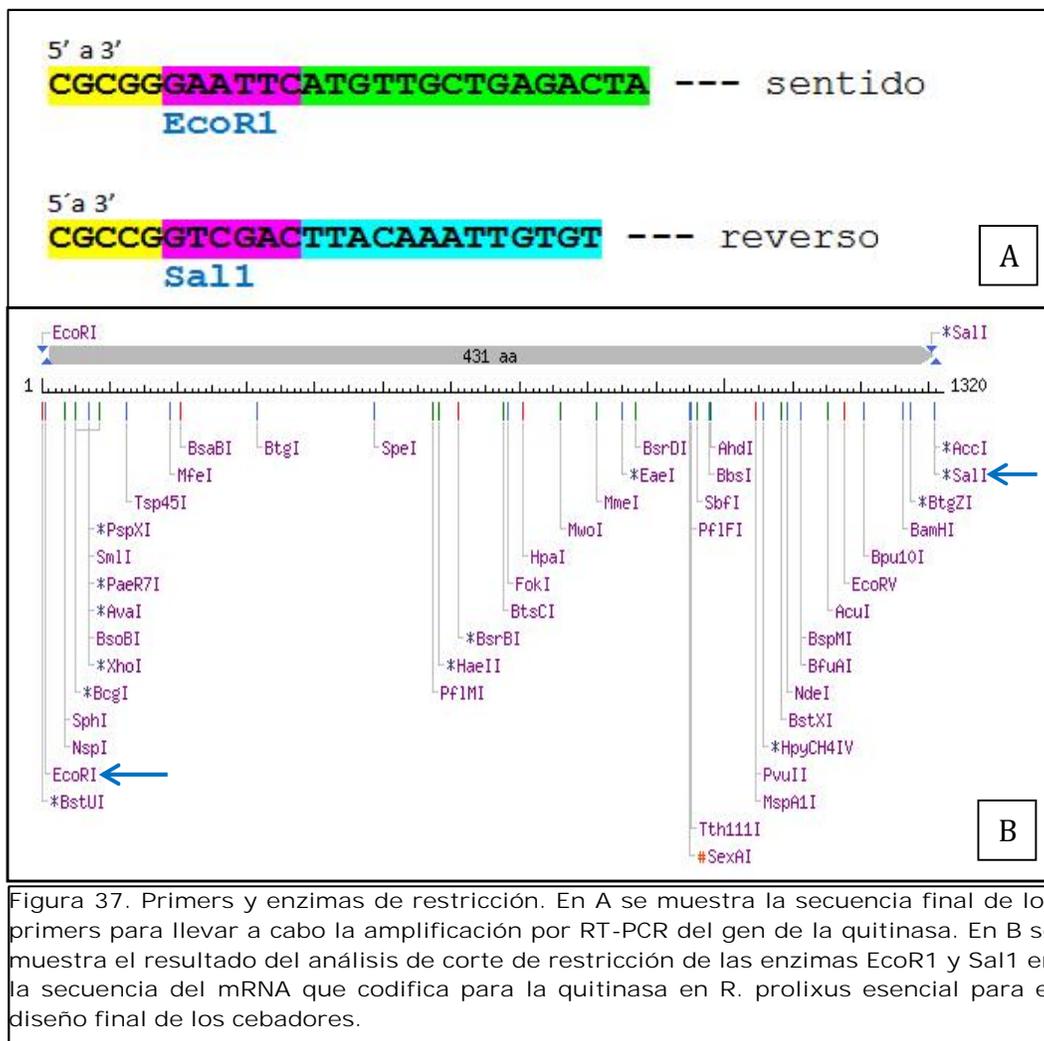


Figura 36. El alineamiento inicial sometido a BoxShade Server – ExpAsy, para delimitar e identificar zonas clave como sitios altamente conservados. En la imagen se puede apreciar el arreglo por cajas grises (aminoácidos misma familia), cajas negras (aminoácidos conservados) y rectángulos rosas donde se delimitan o resaltan los sitios altamente conservados entre secuencias de los insectos, las cuales pueden tratarse de algún sitio catalítico, sitio activo o sitios de unión enzimática.

Con la secuencia codificante (cDNA), se realizó el diseño de primers o cebadores para la amplificación por RT-PCR en estudios posteriores a este, cuya finalidad será expresar y clonar las proteínas (quitinasas) empleado el plásmido P_{gex-6a-1}. Para el diseño se empleó el software Oligo Explorer v. 1.2 como se describe en la sección 5.10.2 de la Metodología. Los iniciadores construidos se muestran en la figura 25 (A), en color amarillo se señala una secuencia de GC para dar estabilidad a la enzima de restricción (amarillo), seguido se ve una secuencia de corte para una enzima de restricción (rosa) y finalmente la secuencia del oligo (en azul y verde). Después se procedió a realizar un análisis de la secuencia con

ayuda de la herramienta NEB Cutter [56] para corroborar que las enzimas de restricción corten correctamente en el plásmido, como se puede ver en B las enzimas EcoR1 y Sal1 (señaladas con una flecha azul) cortan de manera correcta al inicio la secuencia (mRNA) en los extremos 5' y 3' respectivamente, con esta última prueba se culminó de manera satisfactoria el diseño completo de los cebadores.



En cuanto al diseño de primers para la PCR punto final, se hicieron en total tres pares, uno para el gen de la quitinasa, uno para el gen de la nitroporina-II y uno más para la tiorredoxina reductasa, estos últimos dos como controles positivos para la amplificación, ya que son proteínas presentes en todos los insectos. Se tomó como base el genoma de *R.*

prolixus, liberado en agosto del 2014 en Vector Base, en donde se realizó un rastreo de las secuencias (fragmentos de DNA) que codifican para las proteínas antes mencionadas. En la tabla 3 se muestra la secuencia de los oligos, la abreviatura designada, el número de bases, porcentaje de Guanina - Citosina (GC), y cuatro temperaturas calculadas.

Tabla 3. Cebadores diseñados para la amplificación de DNA por PCR punto final							
Nombre	Secuencia	# Bases	°Tm1	°Tm2	°Tm3	°Tm4	%GC
QuitFw	GATGGAGGGGAGGCACACTT	20	62.16	64	62	62.5	60
QuitRv	GTGAAGATGTACCAGGCAGGCT	22	61.37	63	61	61.3	55
NitrFw	CTGGCCACCTCATGTACCTCTAGA	24	62.48	64	62	64.2	54
NitrRv	CACTGTACACGGATTGCCCA	20	62.77	64	62	63.7	60
ThioFw	CAGGCACAACAGACAGGAAGATT	23	61.38	63	61	62.3	50
ThioRv	CACTGTACACGGATTGCCCA	20	61.35	63	61	61.9	55

Quit=Quitina, Nitr=Nitroporina-II, Thio=Thiorredoxina reductasa, Fw=Sentido y Rv=Antisentido.
Tm1= NEBCalc, Tm2=OligoAnalyzer, Tm3=TmCalc y Tm4=OligoCalc.

La secuencia de la quitinasa se encontró ubicada dentro del genoma de *R. prolixus* en el sitio Contig18.1 (whole genome shotgun sequence), con el registro en GenBank: ACPB02000025.1, cuyo tamaño es de 1420pb. En la figura 26, se muestra un alineamiento entre el mRNA y la sección del genoma que codifica para la quitinasa, puede apreciarse además algunos espacios (gaps) correspondientes a los intrones (regiones no codificantes), así mismo se señala en color rosa las bases del primer sentido, en color azul el primer antisentido y en color gris el amplicón, su extensión total sumó 403pb. Se eligió esta sección del gen (DNA genómico) debido al alto contenido en Guanina y Citosina, ya que un buen porcentaje de estas bases nitrogenadas en los oligos favorece una unión más estable.

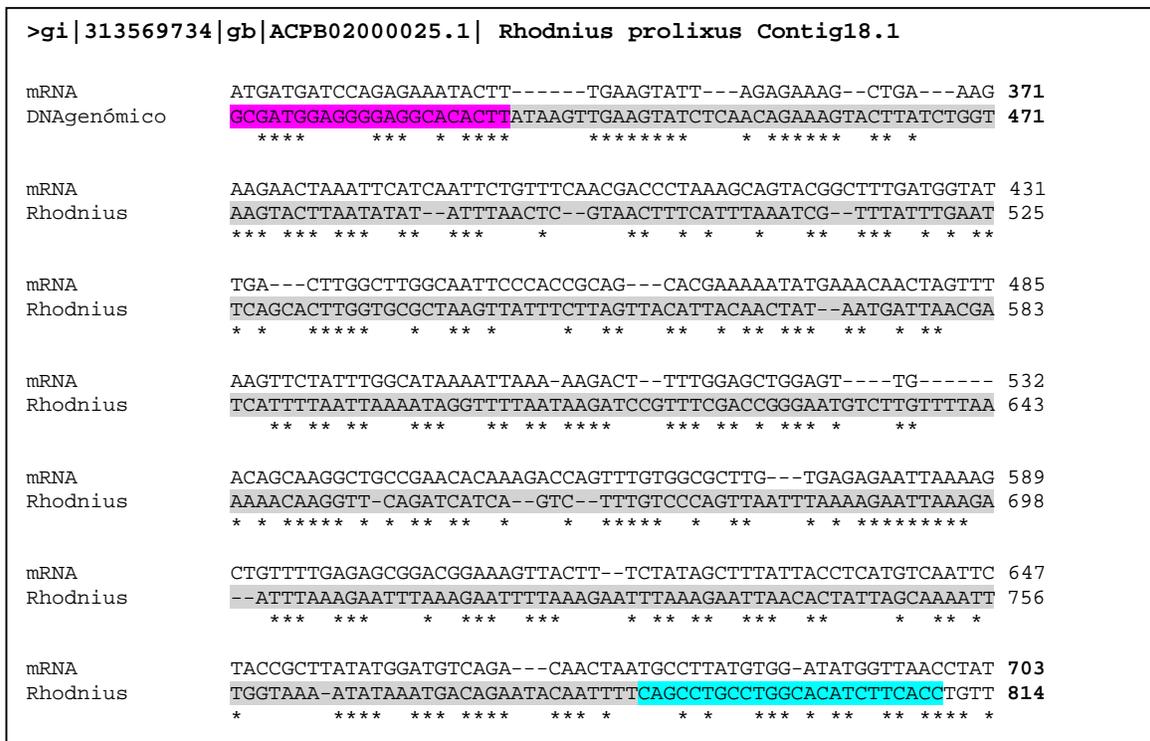


Figura 38. Fragmento de alineamiento de DNA genómico y el RNA mensajero que codifican para la quitinasa. Se muestra un fragmento del alineamiento entre el DNA genómico y el RNA mensajero que codifican para la quitinasa, en color rosa se muestra el cebador sentido, en color gris la secuencia a amplificar (amplicón) y en color azul el cebador antisentido. El alineamiento se recortó entre la base 412 y la 814 del DNA genómico.

Para el caso de los genes control, se ubicó primeramente el gen expresado o secuencia codificante (*CDS) en el GenBank, y se encontró el TSA de la tiorredoxina reductasa en *R. prolixus* con el número de referencia GAHY01001460.1 correspondiente a una proteína de 594aa, de manera similar a lo hecho con la quitinasa, se realizó una traducción a bases nitrogenadas (mRNA) y después se hizo un BLAST para encontrar dentro del genoma el sitio del gen que codifica para dicha proteína (whole genome shotgun sequence), la ubicación encontrada fue el sitio Contig17666.46, locus ACPB02029304 con un tamaño de 14188 pb, de esta secuencia se eligió un sitio intermedio con alto contenido en GC (Guanina-Citosina), por lo que el amplicón quedó establecido de 672 pb.

Finalmente la nitroporina-II se encontró con el registro AAB09588.1 en el GeneBank, una proteína cuyo tamaño es de 202 aa y su secuencia codificante (CDS) o mRNA tiene el registro U70582.1 con una longitud de 609pb. Se ubicó en el sitio Contig16100.1, Locus ACPB02021385, con un tamaño de 28066 pb en el genoma de *R. prolixus*, el amplicón final sumó 220 pb, el cual amplifica una sección intermedia del gen completo.

6.11. Análisis por PCR y electroforesis en geles de agarosa

Se realizó la extracción de DNA genómico a partir de 15 huevos de los triatóminos *M. longipennis*, *T. dimidiata* y *T. Barberi*. Se amplificó el fragmento de 400 pb del gen de la quitinasa por PCR, después las muestras se pusieron en los pozos de geles de agarosa al 2%, se efectuó la corrida electroforética y se revelaron con bromuro de etidio. Finalmente se observaron con un Transiluminador de UV marca Ultralu-Lum®, Inc., Modelo UC48000 y se realizó el registro fotográfico con un Fotodocumentador Ultra CAM® Digital Imaging, Modelo MEB-15.

Para poder lograr una buena amplificación, de manera inicial se hicieron pruebas en gradiente hasta determinar la temperatura de alineamiento ($^{\circ}$ Tm) adecuada para cada juego de oligos (tal como se describe en la sección 5.10.3.2 de los *Materiales y Métodos*), una vez establecidas las temperaturas de trabajo óptimas, se realizaron las amplificaciones por duplicado de cada fragmento de gen, se montaron y corrieron en geles bajo condiciones que se explican en el apartado 5.10.3.3.

En la figura 27 se muestran los geles resultantes del DNA amplificado, fragmentos de quitinasa (QUIT), nitroporina-II (NITR) y tiorredoxina reductasa (THIO). Se arreglaron en geles separados para cada especie, además se agregó una alícuota de 5 μ l del DNA molde purificado, un control negativo de mix para PCR y oligos pero sin DNA molde (C), y un marcador de pares de bases (M) de referencia que va de 2200 pb a 100 pb en orden descendente. Puede observarse en cada gel a una altura aproximada de 400 pb las bandas correspondientes al fragmento del gen de la quitinasa, presente en los tres triatóminos así como los otros dos genes que se emplearon como controles positivos. Este resultado es un indicio de la presencia del gen que codifica para la producción de la enzima quitinasa en las tres especies; hasta el momento no existe un resultado similar en las bases de datos disponibles en la web pero complementa los resultados presentados en este trabajo.

Cabe destacar que en los tres casos se puede observar algunas bandas al final de cada gel, que corresponden al excedente de iniciadores en cada reacción, también se puede ver la

ausencia de bandas en los controles negativos lo que confirma que no hubo contaminación en las reacciones por DNA externo.

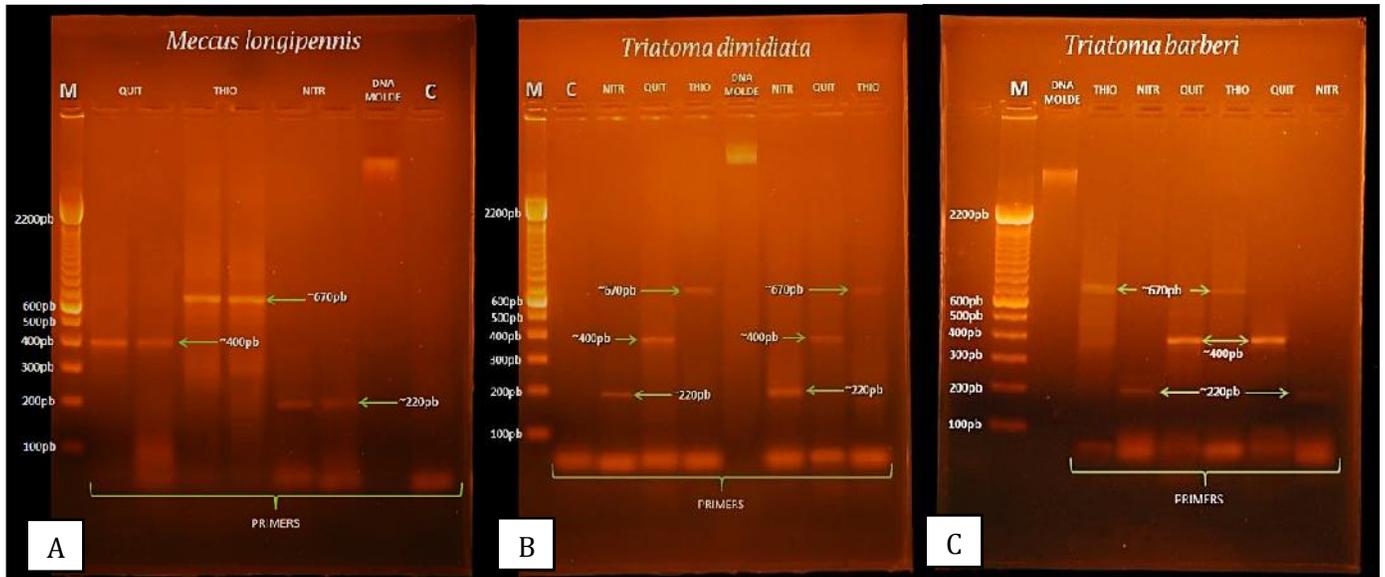


Figura 39. Geles en los que se demuestra la amplificación de los fragmentos de los genes de Quitinasa, Nitroporina-II y Tiorredoxina reductasa a partir del DNA genómico de los triatóminos *Meccus longipennis*, *Triatoma dimidiata* y *Tiorredoxina reductasa*. Se presentan tres geles en los que se demuestra la amplificación de los fragmentos de los genes de Quitinasa (400pb), Nitroporina-II (670pb) y Tiorredoxina reductasa (220pb) a partir del DNA genómico de los triatóminos *Meccus longipennis* (A), *Triatoma dimidiata* (B) y *Triatoma barberi* (C). Los carriles se señalan con QUIT (quitinasa), THIO (tiorredoxina), NITR (nitroporina), M (marcador) y C (control negativo), además en cada gel se incluyó el DNA de cada especie purificado y empleado para la amplificación.

VII. DISCUSION

Los triatóminos, transmisores de la enfermedad de Chagas, contienen un metabolismo de formación y degradación de la quitina y probablemente incluye el quitosano. Hay pocos trabajos describiendo aspectos básicos de este polímero en estos vectores, debido a ello la identificación, aislamiento y caracterización de la macromolécula es importante [32, 36].

En el presente trabajo se demuestra que la quitina constituyente del exoesqueleto de los triatóminos transmisores de la enfermedad de Chagas de la especie *Meccus longipennis*, es de tipo beta (β-Quitina), caracterizada mediante el espectro de FTIR en el cual los principales máximos están dados a $\sim 1290\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1385\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1500\text{ cm}^{-1}$, que evidencian el grado de desacetilación complementando con los máximos que indican la existencia de uniones C-N, la flexión perpendicular de los grupos hidroxilo y la torsión del grupo CH_3 , debido a la disposición paralela de las cadenas de N-acetilglucosamina [26, 57].

Complementan estos resultados, la difracción de Rayos X la cual compara las fases cristalinas de la quitina de triatóminos de la especie *M. longipennis* (machos y hembras) con β-quitosano procedente de β-quitina de camarón, cabe mencionar que independientemente de que el quitosano sea una molécula pequeña con respecto a la quitina, su arreglo molecular obedece a otro orden (otra estructura o arreglo molecular) diferente de la β-quitina, esto se aprecia en las fases $2\theta = 11.21^\circ$, 15.15° , 29.88° y 44.97° tal como se menciona en Zhang *et al.*, 2005 y Mogilevskaya *et al.*, 2006. La β-quitina es un polisacárido rígido debido a su arreglo de cadenas en disposición antiparalela, en donde se establecen fuertes enlaces o puentes de hidrogeno al interior, que a su vez forman laminillas muy compactas y duras. Para terminar esta parte, los resultados de cristalografía del producto de la extensa degradación química al que se sometió la β-quitina de los triatóminos, identificó de manera inequívoca a la unidad monomérica del biopolímero, constituida por la molécula de la N-glucosamina (GLN) y a la vez se logró establecer una metodología de purificación química.

El arreglo molecular de este biopolímero está directamente relacionado con el grado de flexibilidad y resistencia a la deformación [59-61], es así que la β-quitina al estar constituida por cadenas paralelas de NAG posee una estructura bastante rígida y poco

flexible, ejemplo de ello es el exoesqueleto de animales como el camarón, los cangrejos, chapulines, etc., mientras que la α -quitina al estar formada de cadenas paralelas de NAG con un menor número de enlaces de hidrogeno y grupos no reductores en posiciones opuestas es menos dura y más flexible [62, 63]. Este polímero como el principal constituyente del exoesqueleto de los triatóminos, insectos hematófagos transmisores de la enfermedad de Chagas permite el aumento de volumen y flexibiliza el abdomen para poder ingerir el máximo posible de sangre. Adicionalmente, en este trabajo se descubrieron algunas diferencias entre hembras y machos de la especie *M. longipennis*, ya que las pruebas mediante FTIR indican que los interpliegues de las hembras poseen quitina con alto grado de desacetilación con respecto al de los machos, observado a valores de transmitancia de $\sim 1370\text{ cm}^{-1}$, 1490 cm^{-1} y 1610 cm^{-1} , bandas donde se evidencia la desacetilación de la quitina determinado por la cantidad los enlaces C=O, de los grupos CH₃ y puentes de Hidrógeno. Una explicación posible para estos datos, aclarando que no existe dimorfismo sexual en los triatóminos y que los machos y las hembras adultos siempre son del mismo tamaño, es que probablemente las hembras necesitan incrementar más su tamaño al ser las portadoras de los huevos necesarios para la preservación y proliferación de la especie.

Otros resultados innovadores que complementaron la caracterización de la quitina, fueron los obtenidos con el β -quitosano (partiendo de α -quitina de triatóminos) comparados con el α -quitosano (partiendo de α -quitina de camarón y chapulín), diferenciado ambas moléculas mediante espectrofotofluorometría al interaccionar con el fluorocromo Calcofluor; substancia que se reporta con una interacción específica con polisacáridos unidos por enlaces de tipo β -(1 \rightarrow 4) (quitina y quitosano) y β -(1 \rightarrow 3) a través del establecimiento de enlaces o puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo libres [64-66]. Se ha reportado que el espectro de emisión de fluorescencia característico del Calcofluor tiene solo un máximo de absorción reportado a 353 nm y tomando en cuenta que el quitosano por sí solo no florece en la longitud de onda del ultravioleta, pero si al mezclarlos ambos, pues se observó que la interacción con el β -quitosano produce la aparición de una doble señal y además se intensificó la emisión y por otro lado cuando se mezcla el calcofluor con α -quitosano se observa solo un ensanchamiento de la señal en el máximo de 353 nm así como el

incremento de la fluorescencia, es decir que la interacción entre el calcofluor con cada una de las dos moléculas es diferente, el tipo de polímero (alfa o beta) determinó el espectro, esta conjetura surge de que los parámetros de fluorescencia tales como la intensidad y la posición de los máximos de emisión son muy sensibles a las modificaciones que ocurren en el microambiente del fluoróforo. Cabe mencionar que en los espectros de fluorescencia se puede notar la aparición de una o dos señales adicionales aproximadamente a 270 nm, que pertenecen al efecto de dispersión de la luz al hacer una medición denominado efecto Rayleigh [65], por lo que no deben ser tomados en consideración para los análisis, este fenómeno se debe al esparcimiento de la luz visible o alguna otra radiación electromagnética por partículas cuyo tamaño es menor que la longitud de onda de los fotones dispersados cuando la luz viaja a través de sólidos o fluidos transparentes [64-66].

Con la finalidad de describir algunas de las características bioquímicas de las quitinasas o al algún complejo enzimático (“quitosoma”) presente en las exuvias de los triatóminos *M. longipennis*, se hizo un análisis cualitativo de la actividad enzimática evaluando la degradación de gránulos del biopolímero en geles de Poliacrilamida-Quitina coloidal. Después de varios días de incubación se determinó que la temperatura, el pH, los lavados, las soluciones de fijado y los colorantes no afectan o modifican el tamaño y disposición de los gránulos de quitina en los geles control, pero si cuando está presente la actividad enzimática de las quitinasas. Con base en lo anterior y los resultados obtenidos en este trabajo, es posible señalar que en las proteínas remanentes y extraídas de las exuvias está presente una actividad enzimática que efectuó la biodegradación del polímero -quitina. Por lo anterior, se puede mencionar que estas moléculas proteicas están disponibles en todo momento en el exoesqueleto de los vectores y su actividad se activa e intensifica en medida de lo necesario, ya sea para poder incrementar de tamaño degradando su cubierta inicial o ya sea para permitir la ecdisis, metamorfosis o mudas de los insectos.

Finalmente los resultados del análisis *In silico*, permitió tener una idea más clara del papel tan importante de estas enzimas y sobre las semejanzas genéticas entre las enzimas quitinasas de cuatro vectores transmisores de enfermedades de mucha importancia: *Aedes aegypti* (vector del Dengue), *Anopheles gambiae* (vector de la Malaria), *Culex quinquefasciatus* (vector de la Filariasis) y *Rhodnius prolixus* (como representante de los Vectores de la Tripanosomiasis americana), al encontrar sitios altamente conservados en

algunas regiones de dichas enzimas, los mismos que podrían tratarse de sitios catalíticos o de unión con posible trascendencia evolutiva y que podrían constituirse en blancos o sitios de control o regulación de insecticidas.

Con respecto los resultados de la amplificación parcial de gen de la quitinasa en las tres especies de triatóminos estudiados, podemos decir que se tienen los primeros indicios sobre la presencia del gen en el DNA genómico que codifica para la producción de la enzima quitinasa en tres de las cinco especies más importantes de los vectores endémicos en México; hasta el momento no existen referencias o registros de ello en las bases de datos disponibles en la web. Esta última parte fue la más determinante del estudio que complementa los resultados de la actividad enzimática y la caracterización del biopolímero presentados en este trabajo, lo anterior pone en evidencia la existencia de un probable metabolismo de biodegradación del exoesqueleto de los triatóminos que sería compartido.

VIII. CONCLUSIÓN

Los análisis por FT-IR, DDRX, cristalografía de Rayos X y espectrofotofluorometría de la quitina de triatóminos nos ha proporcionado la información necesaria con la que deducimos que el tipo de quitina presente en los triatóminos es de tipo beta (β), diferenciándose de la quitina de camarón y chapulín que pertenece al tipo alfa (α).

Se hace una contribución importante al conocimiento sobre estos vectores de la enfermedad de Chagas que hasta el momento se desconocida.

Se encontró que el producto de la biodegradación de la β -quitina es el β -quitosano, proceso que probablemente implica a una enzima o un complejo enzimático de tipo quitinasa (quitosoma) y que está presente en todo momento en el exoesqueleto de estos insectos.

Se hace una contribución relevante al sumar una evidencia más sobre la presencia de genes que codifican para la quitinasa en las especies *Triatoma dimidiata*, *Triatoma barberi* y *Meccus longipennis*, vectores de gran importancia en el estado de Hidalgo y el País.

IX. PERSPECTIVAS

Finalmente las perspectivas de este proyecto y por lo tanto el siguiente paso a seguir, es la amplificación por RT-PCR a partir de mRNA, clonar, expresar, extraer, purificar y por ultimo secuenciar las proteínas (enzimas quitinasas) para conocer y revelar la secuencia de aminoácidos exacta que componen a estas biomoléculas. Además estos hallazgos pueden aplicarse para determinar la probable ruta metabólica sobre la biodegradación de la quitina, paso indispensable para poder encaminar la investigación hacia el diseño o extracción de algún posible inhibidor (natural o sintético), y de esta manera combatir no solo a los triatóminos vectores, sino también a otros vectores hematófagos de importantes enfermedades como el Dengue, Malaria, Enfermedad del Sueño, etc.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Miles M. The discovery of Chagas disease: progress a prejudice. *Infect Dis Clin.* 2004; 18: 247-260.
2. Organización Mundial de la Salud. Las condiciones de la salud en las Américas. *Publicación Científica*, 1990; 524 (1): 450.
3. Organización Mundial de la Salud. Control de la enfermedad de Chagas. Serie de Informes técnicos, 1991. Informe de un comité de expertos de la OMS, 101 p.
4. Oliveira AM. Uso de nuevas herramientas para el control de triatóminos en diferentes situaciones entomológicas en el continente americano. *Sociedad Brasileña de Medicina Tropical* 1997; 30 (1): 41-46.
5. Salazar-Schettino PM, Haro-Arteaga I, Cabrera-Bravo M. Tres especies de triatóminos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en México. *MEDICINA* 2005; 65: 63-69.
6. Miles, M. Feliciangeli D y Rojas A. American Tripanosomiasis (Chagas disease) and the role of molecular epidemiology in guiding strategies, *B M J* 2003; 326: 1448-1448.
7. Buscaglia, C y Di Noia J, *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas disease. *Microbes and Infection* 2003; 5: 419-427.
8. Fonseca S, Romanha A. Characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro, 1990. 94 (1): 177-180.
9. Ruiz-Herrera, J. The Chitin. *Scientific American* 1993; 15 (4): 42-49.
10. Carcavallo RU, Girón I y Jurberg J. Atlas of Chagas Disease Vector in America, Vol I, II, III. Editorial Fiocruz. 2000.
11. Mansur JF, Figueira-Mansur J, Santos AS, Santos-Junior H, Ramos IB, Neves MM, Machado EA, Kaiser CR, Muthukrishnan S, Masuda H, Vasconcellos AMH, Melo ACA y Moreira MF. The effect of lufenuron, a chitin synthesis inhibitor, on oogenesis of *Rhodnius prolixus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2010. 98: 59-67.
12. Imbert-Palafox JL, De la Cruz-Pantoja MM y Becerril-Flores MA. Análisis de proteínas de respuesta inmune de *Triatoma longipennis* infectadas con *Trypanosoma cruzi* mediante electroforesis. *Entomología mexicana* 2008. 7: 854-859.
13. Moreira MF, Dos Santos AS, Marotta HR, Mansur JF, Ramos IB, Machado EA, Souza GHMF, Evelin MN, Káiser CR, Kramer KJ, Muthukrishnan S y Vasconcellos AMH. A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggshells, eggs and ovaries. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2007. 37: 1249-1261.
14. Melo CB, Mendonga-Lopes D, Feder D, Uzeda CD, Carneiro RM, Rocha MA y Gonzales MS. *Memb Inst Oswaldo Cruz* 2008. 103 (7): 839-842.

15. Hogenkamp DG, Arakane Y, Zimoch L, Merzendorfer H, Kramer KJ, Beeman RW, Kanost MR, Specht CA y Muthukrishnan S. Chitin synthase genes in *Manduca sexta*: characterization of a gut-specific transcript and differential tissue expression of alternately spliced mRNAs during development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2005. 35: 529-540.
16. Villagrán-Herrera, ME y Diego-Cabrera, JA. La enfermedad de Chagas en estado de Querétaro, México: Aspectos Sociosanitarios. Querétaro. Ediciones UAQ. 2008.
17. Tay J, Schenone H, Sanchez J y Robert L. Estado actual de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Biol Chil Parasitología* 1983. 47: 43-53.
18. Organización Panamericana de la salud, Situación de los bancos de sangre en América Latina: marcadores serológicos para enfermedades transmisibles a donantes de sangre. *Boletín epidemiológico*. 1996. 19: 11-13.
19. Sosa-Jerad F. Electrocardiographic findings in Mexican Chagas subjects living in high and low endemic regions of *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003. 98 (5): 605-610.
20. Guzmán E. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*, *Rev. Biomed* 1999. 10 (3): 177-184.
21. Dumontiel E. Update on Chagas disease in Mexico. *Salud Pública Mex* 1999. 41 (5):359.
22. Cruz-Reyes A. y Pickering-López JM. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years, a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006. 101 (4):345-354.
23. Vidal-Acosta V, Ibañez-Bernal S y Martínez-Campos C. Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. *Salud Pública Mex* 2000. 42 (6):496-503.
24. Escorza A, Salazar PM y Cabrera M. Various Species of Triatomine Vectors of *T. cruzi* in Hidalgo, Mexico. 2002. 618-622.
25. Einbu A. Characterisation of Chitin and a Study of its Acid-Catalysed Hydrolysis. Thesis for the degree of philosophiae doctor. Norwegian University of Science and Technology (NTNU). Faculty of Natural Sciences and Technology. Department of Biotechnology. Trondheim, Norway. April 2007: 74 p. ©Aslak Einbu. ISBN 978-82-471-1643-2 (electronic ver.).
26. Muzarelli R. A. A.1997. Chitin. University of Ancoma, Italy. Pergagnon press. Ltd. Oxford, England. 730 p.
27. Merzendorfer H y Zimoch L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *The Journal of Experimental Biology* 2003. 206: 4393-4412.
28. Battisti MV y Campana SP. Obtención y caracterización de quitina e quitosanos de cascás de *Macrobrachium rosenbergii*. *Quim Nova* 2008. 31(8): 2014-2019.

29. Nava-Arenas I, Cruz-Camarillo R y Cruz-Avelizapa LI. Demostración de quitina desacetilasa en *Bacillus thuringiensis*. Tesis. IPN. México, D.F. Enero 2009.
30. Nagahama H, Kashiki T, New N, Jayakumar R, Furuike T y Tamura H.. Preparation of biodegradable chitin/gelatin membranes with GlcNac for tissue engineering applications. *Carbohydr Polym* 2008. doi: 10.1016/j.carbpol.2007.12.011.
31. Sawada D, Nishiyama Y, Langan P, Forsyth V T, Kimura S y Wada M. Water in Crystalline Fibers of Dihydrate -Chitin Results in Unexpected Absence of Intramolecular Hydrogen Bonding. *PLoS ONE* 2012. 7 (6): e39376. doi:10.1371/journal.pone.0039376
32. Krajewska B. Application of chitin and chitosan materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb Technol* 2004. 35: 126-139.
33. Chen J, Wang Q, Hua Z y Du G. Reserch and applications of biotechnology in textile industries in China. *Enzyme Microb Technol* 2007. 40: 1651-1655.
34. Yeul V.S, y Rayulu S.S. Unprecedented chitin and chitosan. A chemical overview. *J Polym Environ* 2013. 21: 606 - 614.
35. Felse P.A. y Panda T. Production of microbial chitinases – a revisit. *Bioprocess Engineering* 2000. 23: 127 - 134.
36. Gooday W.G. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. *Biodegradation*1990. 1: 177 - 190.
37. Gohel V, Vyas P y Chatpar HS. Activity staining method of chitinase on chitin agar plate through polyacrylamide gel electrophoresis. *Afr J Biotechnol* 2005. 4 (1): 87 - 90.
38. Fortuna-González J.M. Caracterización bioquímica y molecular de quitinasas en cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis*. Tesis. IPN-CBG. 2009Reynosa, Tamaulipas. México.
39. Dolomanov O. V., L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard and H. Puschmann, **OLEX2**: a complete structure solution, refinement and analysis program. *J Appl Cryst* 2009. 42: 339-341.
40. Sheldrick, GM. **SHELXS**. *Acta Cryst* 2008. A64: 112-122.
41. Sheldrick, G.M **SHELXL**. *Acta Cryst* 2008. A64: 112-122.
42. **NCBI** (National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, BethesdaMD, USA. 2015). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
43. **EMBL-EBI** (The European Bioinformatics Institute from European Molecular Biology Laboratory, Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SD, UK. 2015). <http://www.ebi.ac.uk/>
44. **UniProtKB** (UniProt Knowledgebase from The Universal Protein Resource, in a collaboration between EMBL-EBI, SIB and PIR, 2015) <http://www.uniprot.org/>
45. **VECTOR BASE** (Bioinformatics Resource for Invertebrate Vectors of Human Pathogens) (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Contract No. HHSN272201400029C, University of Notre Dame) <https://www.vectorbase.org/>

46. **RCSB-PDB** (Protein Data Bank from Research Collaboratory for Structural Bioinformatics) (H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Research*, 28: 235-242. 2000) www.rcsb.org
47. **BLAST** – NCBI (Basic Local Alignment Search Tool - Assembled Genomes) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (2015)
48. **ExPASy-SIB** (Expert Protein Analysis System from Swiss Institute of Bioinformatics, SIB WEB TEAM) Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechi R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, and Stockinger H. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, *Nucleic Acids Res*, 40(W1):W597-W603, 2012. <http://www.expasy.org/>
49. **UNIPROT JOBS** (The Universal Protein Resource) <http://www.uniprot.org/>
50. TRANSLATE TOOLS - ExPASy <http://web.expasy.org/translate/> (2015)
51. CLUSTAL W2 (Multiple Sequence Alignment) – EMBL-EBI <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> (2015)
52. BOXSHADE SERVER (Pretty Printing and Shading of Multiple-Alignment files) http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html
53. **NEB Tm Calculator** v. 1.7.4 (NEW ENGLAND BIOLABS® Inc. by Thermo Fisher Scientific) <http://tmcalculator.neb.com/#/> (2015)
54. **Tm Calculator** (A&B, applied biosystems) <http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/> (2015)
55. **Oligo Calc** v. 3.26 (Oligonucleotide Properties Calculator) (Kibbe WA. 'OligoCalc. *Nucleic Acids Res*. 35. Copyright (c) Northwestern University, 2007) <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>
56. **NEB Cutter** v. 2.0 (NEW ENGLAND BIOLABS® Inc. by Thermo Fisher Scientific) (Vincze, T., Posfai, J. and Roberts, R.J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes *Nucleic Acids Res*. 31: 3688-3691. 2003) <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>
57. Mogilevskaya EL, Akopova TA, Zelenetskii AN y Ozerin AN. The Crystal Structure of Chitin and Chitosan. *Polymer Science Ser A*. 2006. 48 (2): 116 – 123.
58. Zhang Y, Xue C, Xue Y y Gao R. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydrate Research* 2005. 340: 1914–1917.
59. Muhammad-Yusof N. L. B., Yong-Lim L. y Khor E. Flexible chitin films: structural studies. *Carbohydrate Research* 2004. 339: 2701–2711.
60. Ming-Tsung Y, Joan-Hwa Y y Jeng-Leun M. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*. 200975: 15–21.
61. Imbert-Palafox. JL, Bautista García JE, Marmolejo SY, Gonzales CM, Becerril-Flores MA, Cruz-Castañeda A y Salas-Casas A. Beta-Chitin, beta-Chitosan and

- Chitosan Binding Protein in Triatomines Transmitters of Chagas Disease. *Journal of Chitin and Chitosan Science* 2014. 1: 1–7.
62. Paulino, AT, Simionato JI, García JC y Nozaki J. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm chrysalides. *Carbohydrate Polymers* 2006.64: 98–103.
63. Lavall, RL, Odilio BG, Sergio P y Campana-Filho. Beta-Chitin from the pens of *Loligo* sp.: Extraction and characterization. *Bioresource Technology* 2007. 98: 2465–2472.
64. Albani, JR y Plancke YD. Interaction between calcofluor white and carbohydrates of alfa-1-acid glycoprotein. *Carbohydrate Research* 1998. 314: 169 – 175.
65. Albani, JR, Sillen A, Plancke YD, Coddeville B y Engelborghs Y. Interaction between carbohydrate residues of alfa1-acid glycoprotein (orosomuroid) and saturating concentrations of Calcofluor White. A fluorescence study. *Carbohydrate Research* 2000. 327: 333 – 340.
66. Plášek, J y Hošková B. Solvatochromic Effect in the Optical Spectra of Calcofluor and its Relation to Fluorescent Staining of Yeast Cell Walls. *Journal of Fluorescence* 2009. © Springer Science & Business Media. doi.: 10.1007/s10895-009-0563-yOriginal Paper.

XI. ANEXOS

ANEXO A

Datos del cristal y cálculos de refinamiento estructural	
Código de Identificación	CC2_A_Cu
Fórmula Empírica	C6H14ClNO5
Peso Formula	215.63
Temperatura/Kelvin	150.00(10)
Sistema de Cristal	monoclínico
Grupo Espacial	P21
a/Å (Angstroms 10⁻⁸cm)	7.1081(4)
b/Å	9.1876(3)
c/Å	7.7252(4)
∠° (Ángulo)	90
∠°	112.651(6)
∠°	90
Volumen /Å³	465.59(4)
Z	2
calcg/cm³	1.538
μ/mm-1	3.643
F(000)	228.0
Tamaño de Cristal /mm³	0.2881 × 0.1701 × 0.1307
Radiación	CuK (λ = 1.54184)
Rango 2 colección datos ∠°	12.416 to 148.954
Rango de Index	-8 h 8, -11 k 11, -9 l 9
Reflexiones colectadas	4697
Reflexiones Independientes	1817 [Rint = 0.0331, Rsigma = 0.0400]
Data/restraints/parameters	1817/1/124
Goodness-of-fit on F²	1.071
Final R indexes [I>=2 (I)]	R1 = 0.0361, wR2 = 0.0897
Final R indexes [all data]	R1 = 0.0389, wR2 = 0.0920
Largest diff. peak/hole / e Å⁻³	0.46/-0.36
Flack parameter	0.030(11)