

EL RETROELEMENTO *TRIATO1* EN TRIATOMINOS

Bach. Valeria Romero
Trabajo Especial II de la Licenciatura en Bioquímica

Orientador: Dr. Ruben Pérez
Sección Genética Evolutiva
Facultad de Ciencias
2011

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres, a toda mi familia, mis amigos y a Damián, por apoyarme mientras realicé mi pasantía. También a mis compañeros e integrantes de la Sección Genética Evolutiva por acompañarme y ayudarme en todo lo que aprendí, y en especial a Virginia, por transmitirme todo su conocimiento y experiencia.

En particular, quiero agradecer al Dr. Ruben Pérez por brindarme su conocimiento, y por orientarme e instruirme tanto en el trabajo de laboratorio como en la redacción de mis Trabajos Especiales.

TRIATOMINOS Y ENFERMEDAD DE CHAGAS

Los triatominos son insectos hematófagos pertenecientes a la subfamilia Triatominae (Hemíptera – Reduviidae). En Sudamérica son comúnmente conocidos como “vinchucas”, que en el idioma Quechua significa “el que se deja caer”, quizás por la forma en que estos insectos caen desde el techo sobre sus víctimas.

Estos insectos revisten importancia médica por ser vectores del parásito *Trypanosoma cruzi* (Fig. 1), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana. Esta enfermedad es exclusiva del continente americano, donde se encuentran infectadas aproximadamente 10 millones de personas y 60 millones en riesgo de infección (Schofield *et al.*, 2006). En general, la fase inicial es asintomática, aunque puede manifestarse edema en los párpados (signo de Romaña) y/o chagomas (tumorações subcutáneas). En la fase crónica, pueden observarse cardiomiopatías y megasíndromes, tales como megaesófago y megacolon (PAHO 1994).

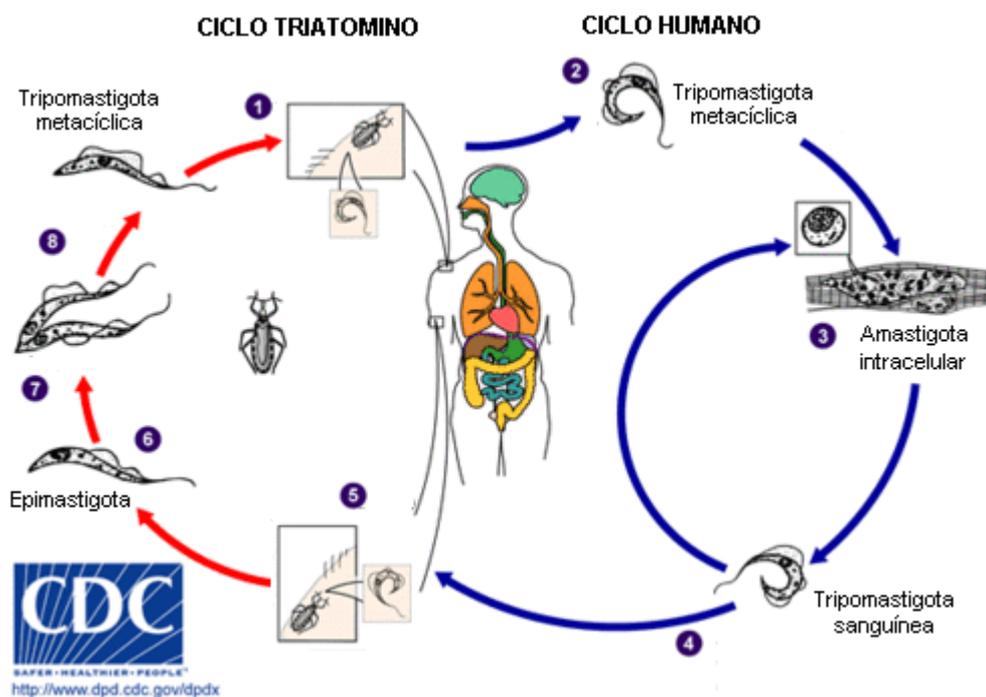


Fig. 1 – Ciclo vital de *Trypanosoma cruzi*. En color azul se muestra el ciclo en humanos: un insecto infectado defeca cerca del sitio de la picadura (1). Sus heces contienen la forma tripomastigota metacíclica (infecciosa) (2), que ingresa a través de heridas o membranas mucosas, infecta células cercanas y se diferencia en la forma amastigota intracelular (replicativa en vertebrados) (3). Ésta se multiplica y se diferencia en la forma tripomastigota sanguínea, que se libera a la sangre por la lisis de las células infectadas e infecta a más células (4). En color rojo se muestra el ciclo en triatominos: un insecto no infectado pica a un vertebrado infectado, ingiere a la forma tripomastigota sanguínea (5), la cual se diferencia en el intestino medio en la forma epimastigota (replicativa en el vector) (6). Ésta se multiplica (7) y se diferencia en tripomastigota metacíclica (8) que migrará al intestino posterior para ser excretado cuando el triatomino ahora infectado, pique a otro vertebrado (1).

Ocasionalmente la transmisión puede darse a través de alimentos contaminados, transfusiones de sangre y transplante de órganos provenientes de individuos infectados, o por infección congénita cuando la madre es portadora.

Taxonomía y ecología de triatominos

Actualmente, se identifican 140 especies de triatominos, clasificadas en 5 tribus y 15 géneros (Lent y Wygodzinky 1979; Schofield y Galvão 2009) (Tabla 1). Todas son capaces de transmitir al *Trypanosoma cruzi*, pero solo aquellas especies que se han adaptado para vivir en contacto cercano con los humanos, son epidemiológicamente importantes. Algunos triatominos viven en hábitats domésticos, dentro de las casas (intradomicilio) o en los alrededores (peridomicilio); pero la mayoría lo hace en hábitats silvestres (palmeras, rocas, cavernas, cáscara de árboles). Algunas especies pueden vivir en los dos ambientes, alternando entre ellos según las condiciones sean más favorables.

Tabla 1 – Clasificación de los Triatominae

Tribu	Género	Número de especies
Alberporseniini	Alberprosenia	2
Bolboderini	Belminus	8
	Bolbodera	1
	Microtriatoma	2
	Parabelminus	2
Cavernicolini	Cavernicola	2
Rhodniini	Psammolestes	3
	Rhodnius	16
Triatomini	Dipetalogaster	1
	Eratyrus	2
	Hermanlentia	1
	Linshcosteus	6
	Panstrongylus	13
	Paratriatoma	1
	Triatoma	80

Control de Chagas y control de triatominos

Debido a que aún no se han desarrollado vacunas contra *Trypanosoma cruzi* ni tratamiento eficaz para la fase crónica de la infección, el control de la enfermedad se basa en la erradicación del vector mediante el uso de insecticidas residuales. Este tratamiento es efectivo en países donde los triatominos son exclusivamente domésticos, ya que no pueden infestar ambientes silvestres, pero no es efectivo en países donde pueden refugiarse en hábitats silvestres y recolonizar después los domésticos.

Por este motivo es importante conocer los nichos de los triatominos (domésticos o silvestres), su distribución geográfica, sus capacidades de dispersión y recolonización, y por ende, su relevancia como vectores de la enfermedad (Carcavallo *et al.*, 1998). Tradicionalmente se utiliza la sistemática y genética poblacional para estudiar la biología de estos insectos, pero la rápida evolución de caracteres tales como el tamaño y el color, y la existencia de especies crípticas (especies extremadamente similares en morfología, fisiología y comportamiento, pero reproductivamente aisladas entre sí), dificultan la clasificación y análisis de los triatominos. Es aquí donde la citogenética y biología molecular contribuyen a su estudio, aportando conocimiento sobre su taxonomía, ecología, evolución y capacidad adaptativa.

Variabilidad genómica en triatominos

El número de cromosomas en los triatominos es poco variable (Pérez *et al.*, 2002). La mayoría de los triatominos posee el mismo número de cromosomas autosómicos (20), aunque puede variar el número de cromosomas sexuales. A pesar de la conservación del complemento cromosómico, la técnica de bandeado C revela distintos patrones de bandas entre especies, lo que indica una enorme variabilidad en la cantidad, localización y tamaño de la heterocromatina constitutiva en los triatominos. La cantidad de heterocromatina varía entre 0 y 45% del total del complemento autosómico (Panzera *et al.*, 1995; 1998), mientras que los bloques heterocromáticos pueden ser pequeños, como en especies de *Rhodnius*, o grandes, como en una especie de *Triatoma* (Panzera *et al.*, 2010). Generalmente se localizan en los telómeros, pero pueden observarse bandas intersticiales (Panzera *et al.*, 1992; 1997).

Por otro lado, mediante citometría de flujo, se encontraron variaciones en el contenido total de DNA haploide, que se correlaciona positivamente con la cantidad de heterocromatina (Panzera *et al.*, 1995). El tamaño del genoma puede variar ampliamente: 0.7 pg en especies de *Rhodnius*, 1.4 pg en *Panstrongylus*, y dentro del género *Triatoma*, desde 0.8 hasta 2.9 pg (Panzera *et al.*, 2004; 2006; 2007; Barges *et al.*, 2006).

Estas variaciones no ocurren únicamente entre especies poco relacionadas, sino que también se observan entre grupos de especies (complejos y subcomplejos) que comparten un ancestro común (grupo monofilético). Uno de los ejemplos más notorios lo constituye el subcomplejo *Infestans*, integrado por *Triatoma infestans*, *T. delpontei* y *T. platensis*. Estas especies están muy emparentadas, pero difieren muchísimo en su cantidad de DNA y patrones heterocromáticos (Panzera *et al.*, 1995).

La especie *Triatoma infestans*, el vector más importante de Sudamérica, presenta incluso un interesante polimorfismo en las bandas C de distintas poblaciones, asociado a la variación en su tamaño genómico (Panzera *et al.*, 2004). La población “no Andina”, localizada en Argentina, Paraguay, Brasil, Uruguay y Chaco Boliviano (Fig. 2a), es exclusivamente doméstica. La población “Andina”, localizada en las regiones andinas de Bolivia y Perú (Fig. 2A), puede ser doméstica o silvestre, y presenta 50% más de heterocromatina y 35% más de DNA total que la población “no Andina” (Panzera *et al.*, 2004). También se observaron diferencias en la localización y tamaño de bloques heterocromáticos (Fig. 2B) (Panzera *et al.*, 2010). Estudios basados en marcadores mitocondriales y nucleares también sustentan esta división (Monteiro *et al.*, 1999; Barges *et al.*, 2006; Piccinali *et al.*, 2009).

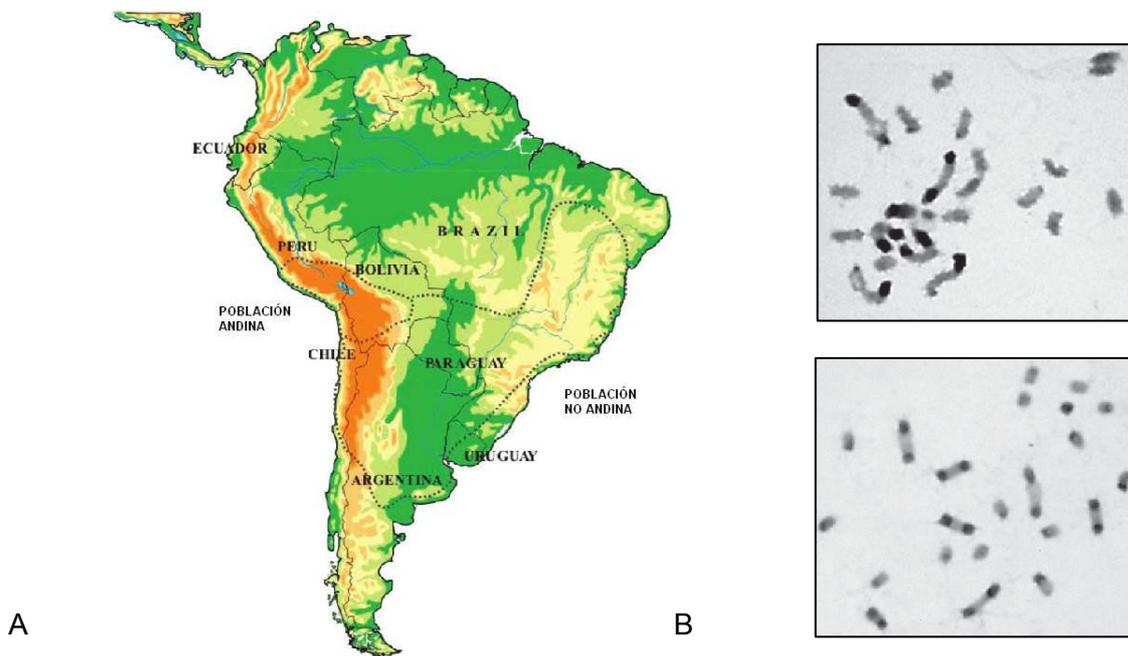


Fig. 2 – Poblaciones “Andina” y “no Andina” de *Triatoma infestans*. A: localización geográfica de ambas poblaciones (modificado de (Panzera *et al.*, 2004). B: variaciones en la cantidad de bloques heterocromáticos: imagen superior, población “no Andina” (bloques en algunos cromosomas), imagen inferior, población “Andina” (bloques en la mayoría) (de Panzera *et al.*, 2010).

Estas variaciones genómicas podrían estar asociadas con la capacidad de *Triatoma infestans* de adaptarse a nuevas condiciones ambientales. La menor cantidad o pérdida de DNA/heterocromatina en la población “no Andina” puede relacionarse con su rápida expansión geográfica y adaptación a ambientes domésticos, pero también con su aparentemente incapacidad de reinfestar ambientes silvestres (Panzera *et al.*, 2004).

TRIATOMINOS Y ELEMENTOS TRANSPONIBLES

Las diferencias en la cantidad de DNA y en los patrones de heterocromatina entre poblaciones de una misma especie, o entre especies evolutivamente cercanas, generalmente se deben a diferencias en la frecuencia y tipo de secuencias repetidas (Gregory 2005). Entre estas secuencias repetidas, se encuentran los elementos transponibles (Ets), secuencias repetidas dispersas que tienen la capacidad de cambiar su localización en el genoma de sus huéspedes. Su movilización suele tener importantes consecuencias para el huésped: cambios en la expresión génica; reordenamientos cromosómicos; generación de nuevos genes y funciones. También pueden intervenir en la evolución de las especies al actuar como mecanismos de aislamiento reproductivo y adaptación (Mackay 1989; Capy 1998).

Existen diversos trabajos sobre el papel de los Ets en la formación de la heterocromatina. Dorer y Henikoff (1994) y Fanti y colaboradores (1998) demostraron que el silenciamiento de genes puede ser inducido por Ets. Dimitri y colaboradores (1997) y Dimitri y Junakovic (1999) evidenciaron que los Ets contribuyeron a cambios en la cantidad y distribución de la heterocromatina. Steinemann y Steinemann (2005) sugirieron que, durante la evolución del cromosoma Y, la acumulación de Ets (especialmente retroelementos) remodeló la estructura de la eucromatina del cromosoma ancestral para convertirla en heterocromatina.

Estudios realizados hasta ahora sugieren que la variación en heterocromatina podría deberse, al menos en parte, a la amplificación o actividad diferencial de Ets. En base a esto, se comenzó el estudio de los Ets en los triatominos con el objetivo de relacionar la variación citogenética con cambios en secuencias específicas del genoma de estas especies. Los estudios se centraron en retroelementos LTR, pues son muy dispersos entre los distintos organismos.

Retroelementos LTR

Los retroelementos LTR son una clase de Ets, que utilizan un intermediario RNA para movilizarse dentro del genoma. Se caracterizan por poseer repetidos terminales directos en sus extremos o LTRs (Long Terminal Repeats), que flanquean dos o tres marcos de lectura abierto u ORFs (Open Reading Frames) (Fig. 3).



Fig. 3 – Organización general de un Retroelemento LTR.

Ambos LTRs contienen todos los elementos regulatorios en cis requeridos para la transcripción y poliadenilación: el LTR 5' contiene un promotor (TATA box) que inicia la transcripción del retroelemento, y el LTR 3' posee la señal de poliadenilación AAUAAA. Río abajo del LTR 5' se encuentra el sitio de unión al cebador o PBS (Primer Binding Site), y río arriba del 3', el tracto polipurínico o PPT (Poly Purinic Tract) (Morgante *et al.*, 2002).

Los retroelementos LTR poseen dos o tres ORFs: *Gag*, *Pol*, y eventualmente, *Env*, que codifican las proteínas necesarias para la movilización del retroelemento (Fig. 4). El ORF *Gag* codifica proteínas estructurales: la proteína de matriz (MA), cápside (CP) y nucleocápside (NC). El ORF *Pol* codifica proteínas para la transposición: proteasa (PR), retrotranscriptasa (RT), RNasa H (RNH) e integrasa (IN). El ORF *Env* codifica una glicoproteína de envoltura que, en una infección de un retrovirus de vertebrados, permitiría la entrada a la célula.

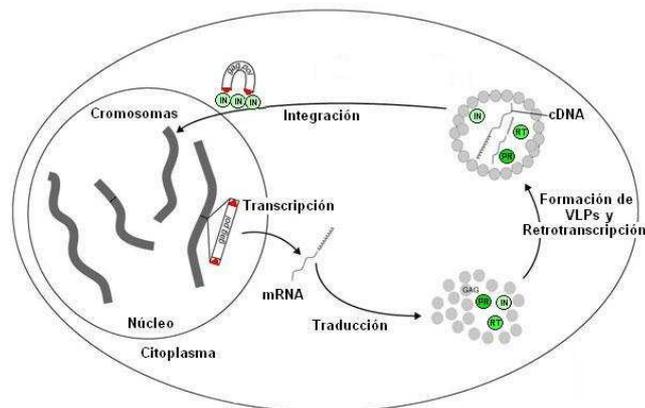


Fig. 4 - El retroelemento LTR es transcrito en mRNA que codifica todas las proteínas requeridas para su transposición (estructurales y de replicación). Posteriormente se forma una partícula tipo virus que contiene al mRNA, y dentro de la cual, sucede la retrotranscripción en cDNA. Éste se dirige hacia el núcleo y se inserta en el genoma celular (modificado de Havecker *et al.*, 2004).

El retroelemento LTR es transcrito por la RNA polimerasa II DNA dependiente celular, que reconoce el TATA box localizado en el LTR 5'. El gen *Gag* se expresa mediante un mRNA monocistrónico, mientras que el gen *Pol* requiere un mRNA policistrónico que incluye la secuencia codificante de *Gag*, a través de la supresión del codón de terminación o por desplazamiento ribosómico. El mRNA *Env* es monocistrónico, y se forma por la remoción de las regiones codificantes de *Gag* y *Pol* del transcripto primario.

Las poliproteínas Gag y Gag – Pol se autoensamblan en el citoplasma para formar partículas tipo virus o VLPs (Virus-Like Particles), que no brotan (tal vez por la ausencia de una señal en el dominio matriz) (Ribet *et al.*, 2007). Posteriormente las poliproteínas Gag y Gag – Pol son clivadas en sus proteínas individuales funcionales por la proteasa. En aquellos retroelementos LTR que expresan la proteína Env, ésta es procesada por enzimas celulares y expuesta en la superficie de la membrana plasmática.

Dentro de la partícula ensamblada, el mRNA es retrotranscrito a cDNA por la retrotranscriptasa (Mellor *et al.*, 1985), que utiliza como cebador a un tRNA celular. Luego, la acción de la RNasa H permite la transferencia del DNA recién sintetizado a otro molde RNA para que se complete la síntesis de la hebra negativa, y genera los cebadores para la síntesis de la hebra positiva. Finalmente, se obtiene un cDNA doble hebra.

El cDNA generado en la retrotranscripción se encuentra dentro un complejo de preintegración derivado de la VLP. La entrada al núcleo puede requerir la ruptura de la membrana nuclear durante la mitosis, o una señal de localización nuclear en el complejo de preintegración durante la interfase (Moore *et al.*, 1998). En genomas compactos como el de levadura, la inserción parece ser sitio – específica (Sandmeyer *et al.*, 1990; Voytas y Boeke 1993; Kinsey y Sandmeyer 1995; Zou *et al.*, 1996), mientras que en genomas con mayor proporción de secuencias intragénicas (*Drosophila*, mamíferos), la inserción sería azarosa (Labrador y Corces 1997).

Los retroelementos LTR pueden agruparse en tres familias en base a la similitud de la secuencia nucleotídica del dominio retrotranscriptasa: Ty1/Copia, Ty3/Gypsy y Bel/Pao. Estas familias contienen a los retrotransposones LTR y a los retrovirus endógenos de invertebrados. También se pueden encontrar diferencias en el orden del ORF *Pol*: en Ty1/Copia el orden es PR – IN – RT – RNH, mientras que en Ty3/Gypsy y Bel/Pao es PR – RT – RNH – IN (Fig. 5).

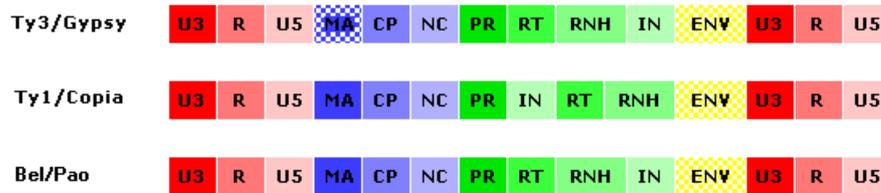


Fig. 5 – Estructura de las familias de retroelementos LTR. Las tres familias pueden contener el ORF *Env*, alteraciones en el orden del ORF *Pol*, y en el caso de Ty3/Gypsy, algunos elementos pueden no contener el dominio matriz dentro del ORF *Gag*.

Existen nuevos elementos transponibles que no pueden clasificarse con los criterios actuales. Por ejemplo, el retrotransposón Gmr1 del pez *Gadus morhua*, sería miembro de la familia Ty3/Gypsy por la similitud de la secuencia de su retrotranscriptasa, pero el orden de los dominios del ORF *Pol* corresponde al de la familia Ty1/Copia (Butler *et al.*, 2001).

Retroelementos en triatominos

Para comenzar el estudio de retroelementos LTR en triatominos, se seleccionó la especie *Triatoma infestans*, porque exhibe el polimorfismo más importante en cantidad y localización de bloques heterocromáticos (Panzera *et al.*, 1992; 2004; 2010).

El estudio se basó en el gen de la enzima retrotranscriptasa, porque se encuentra en una amplia variedad de Ets: retrotransposones LTR y no LTR, intrones del grupo II, virus RNA hebra positiva, hepadnavirus, caulimovirus y Retroviridae. Aunque la secuencia nucleotídica del gen no es muy conservada entre los diversos Ets, la enzima posee la tasa relativa más baja de cambio (McClure 1991) y una gran conservación aminoacídica propiciada por la degeneración del código genético, indicando una alta conservación funcional. Se han identificado siete regiones aminoacídicas conservadas, que estarían involucradas en la actividad enzimática, e incluso se corresponderían con los centros catalíticos (Xiong y Eickbush 1990) (Fig. 6). Probablemente sea una proteína muy antigua, de cuya secuencia ancestral habrían derivado la mayoría de las actuales.



Fig. 6 – Alineamiento múltiple de los dominios conservados de la retrotranscriptasa de los prototipos de cada una de las familias de retroelementos LTR. Residuos aminoacídicos idénticos y similares químicamente están sombreados en negro y en gris respectivamente. Los números entre los bloques corresponden al número de aminoácidos variables.

Mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction), se amplificaron los primeros cinco dominios conservados de la retrotranscriptasa, en individuos de *Triatoma infestans*. Se utilizaron cebadores degenerados, diseñados en base a las secuencias aminoacídicas de motivos localizados en los extremos amino y carboxi terminal (Flavell *et al.*, 1992).

El producto de PCR fue clonado y secuenciado. Posee un tamaño adecuado de 577 pb y su traducción conceptual permitió identificar un ORF intacto. Mediante análisis filogenéticos de la secuencia aminoacídica de la retrotranscriptasa se determinó que el retroelemento en cuestión pertenece a la familia Pao/BEL de los retroelementos LTR. Posteriormente en la Sección se diseñaron cebadores específicos para la especie *Triatoma infestans* que fueron utilizados en este trabajo (Fig. 7). Este elemento transponible, representa el primer retrotransposón LTR identificado en triatominos, y fue designado como *Triato1* (Rose 2003).



Fig. 7 – Secuencia nucleotídica parcial de la retrotranscriptasa de *Triato1* en *Triatoma infestans*. En color azul se muestran los cebadores degenerados que amplificaban una región de 577 pb, y en color rojo se muestran los cebadores específicos que amplifican una región de 504 pb. Debajo de la secuencia nucleotídica se indica la secuencia aminoacídica según la traducción conceptual realizada para el tercer marco de lectura.

Análisis de hibridización de fluorescencia *in situ* o FISH (Fluorescence *in situ* Hybridisation) (datos no publicados) y la detección de transcritos codificantes para el dominio retrotranscriptasa (Romero *et al.*, 2005), sugieren que *Triato1* se localizaría en la heterocromatina y sería activo. Esto es sustentado por reportes previos de retroelementos LTR potencialmente activos en la heterocromatina de *Drosophila melanogaster*, pertenecientes también a la familia Pao/BEL (Kogan *et al.*, 2003; Marsano *et al.*, 2004).

La caracterización de *Triato1* en distintas especies y poblaciones de triatominos podría contribuir a la taxonomía de estos insectos, así como también al estudio de su evolución genómica y especiación. En este Trabajo Especial II se continuó con el trabajo sobre este retroelemento.

OBJETIVOS



Objetivo general

- Analizar la presencia y distribución del elemento transponible *Triato1* en distintas especies de triatominos.

Objetivos específicos

- Estudiar la presencia y distribución de *Triato1* en los triatominos, mediante la amplificación parcial del dominio retrotranscriptasa con cebadores específicos para *Triatoma infestans*.
- Confirmar la presencia de *Triato1* y observar su localización en el genoma de diferentes especies de triatominos, utilizándolo como sonda en análisis de Southern Blot.
- Clonar y secuenciar el dominio retrotranscriptasa de *Triato1* en *Triatoma rubrovaria*, para su comparación con secuencias de otras especies del género *Triatoma*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de DNA genómico.

Se extrajo DNA genómico a partir de músculo de patas de insectos adultos del género *Triatoma* (*T. infestans*, *T. brasiliensis*, *T. carcavalloii*, *T. delpontei*, *T. nitida*, *T. platensis*, *T. rubrovaria*, *T. sordida*), *Mepraia* (*M. spinolai* y *M. gajardoii*), y de las especies *Panstrongylus chinai* y *Rhodnius prolixus*. El protocolo utilizado se encuentra en un anexo al final de este trabajo.

Nota: los individuos de *T. infestans* pertenecían a poblaciones no andinas.

PCR con primers específicos

El volumen de reacción fue de 10ul y contenía buffer de reacción 10x (200 mM Tris HCl pH 8.4; 500 mM KCl), 5 mM MgCl₂, 0.5 mM mix de dNTPs, 0.3 uM de cada primer específico, 0.5 U Taq polimerasa, y aprox. 10 ng de DNA. Se utilizó un termociclador Perkin Elmer 2400. El producto de PCR tendrá un tamaño de 504 pb.

Primer forward (TriatoF): 5' CACGGGCCTCACTAAATA 3'

Primer reverse (TriatoR): 5' CATGGTCTTGAACGAGCT 3'

Las condiciones fueron las siguientes: desnaturalización (94°C – 5'); 35 ciclos (94°C – 30", 48°C – 30", 72°C – 60"); extensión final (72°C – 7'). Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa 0.8%, y se purificaron con el QIAQuick Gel Extraction Kit (QIAGEN), según las indicaciones del mismo.

Southern Blot

Para el Souther Blot se utilizó un procedimiento estándar (Sambrook *et al.*, 1989), el cual se puede consultar en el anexo.

Se digirieron 3 ug de DNA genómico de cuatro especies de triatominos (*T. infestans*, *T. delpontei*, *T. rubrovaria* y *M. spinolai*) en dos ensayos de restricción: uno con 30u de PstI (20 minutos, 37°C), y otro con 30u de PstI (20 minutos a 37°C)+20u de EcoRI (over night, 37°C).

Nota: la secuencia parcial de la retrotranscriptasa de *Triato1* no posee sitios de reconocimiento para PstI y EcoRI.

Las digestiones se sometieron a una electroforesis donde se incluyó un marcador de peso molecular (Gene Ruler 1Kb DNA ladder, Fermentas) y un producto de PCR de *T. infestans* con los cebadores específicos como control positivo.

La sonda marcada con fluoresceína fue sintetizada con el kit Gene Images Random Prime Labelling Module (Amersham), a partir de un amplicón clonado de la especie *Triatoma platensis*. Este amplicón se obtuvo por la escisión del inserto de un vector de clonación, con la enzima EcoR I (ver antecedentes). La señal de hibridización fue detectada mediante anticuerpos anti-fluoresceína conjugados con una fosfatasa alcalina del kit Gene Images CDP-Star Detection Module (Amersham).

Clonación

Para clonar *Triato1* en *T. rubrovaria*, se utilizó el InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas), que permite ligar el producto de PCR a un vector de clonación, y preparar y transformar bacterias competentes (anexo).

El DNA plasmídico de las colonias blancas, transformadas con el vector recombinante, fue extraído, cuantificado y confirmado con los cebadores específicos de *Triato1*.

Secuenciación

Los DNAs plasmídicos de aquellas colonias que amplificaron un producto del tamaño esperado, fueron enviadas para su secuenciación automática (ATGen) con el primer pUC/M13 F del vector.

Primer forward (pUC/M13 F): 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación parcial del dominio retrotranscriptasa con cebadores específicos

En el presente trabajo, se emplearon por primera vez los cebadores específicos para *Triatoma infestans* (diseñados en la Sección Genética Evolutiva), y se ajustaron las condiciones para amplificar parcialmente a *Triato1*.

Mediante electroforesis en gel de agarosa se constató que todos los DNAs genómicos extraídos presentaban buenas calidades, sin evidencia de proteínas ni RNAs.

En varias de las especies se obtuvo un producto de amplificación del tamaño esperado (504 pb), excepto en *T. nitida*, *R. prolixus* y *P. chinai* donde no se amplificó. En la Fig. 10 se observan los productos de amplificación de algunas de las especies estudiadas.

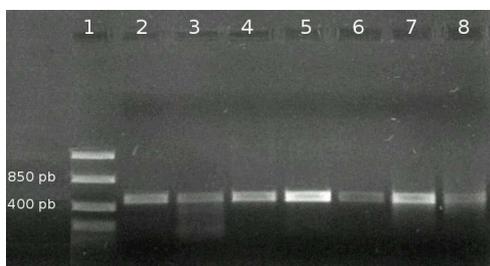


Fig. 10 – Amplificación del dominio retrotranscriptasa en distintas especies de triatominos. Carriles: 1 – FastRuler™ Low Range DNA Ladder (Fermentas); 2 – *T. infestans*; 3 – *T. delponteí*; 4 – *T. platensis*; 5 – *T. brasiliensis*; 6 – *T. sordida*; 7 – *T. carcavalloí*; 8 – *T. rubrovaria*

La amplificación con cebadores específicos para *Triatoma infestans* indica que los sitios de unión a los cebadores son conservados, así como el tamaño del dominio amplificado.

En el caso de las especies donde no se obtuvo amplificación, se descarta que el responsable fuese el DNA molde, debido la calidad del mismo fue constatada por amplificación con cebadores específicos para secuencias ribosomales.

En la Tabla 2 se describe la distribución geográfica de las especies estudiadas en este trabajo. La amplificación de *Triato1* en especies del género *Triatoma* de América del Sur, pero no en especies del Norte o de los géneros *Rhodnius* y *Panstrongylus*, podría deberse a que era ancestral a todos los triatominos y se perdió en algunos linajes, o que es exclusivo de especies sudamericanas del género *Triatoma* (Grupo Infestans). La segunda opción es la mejor sustentada por diversos trabajos que sugieren que las especies del sur y del norte evolucionaron independiente (Panzera *et al.*, 1998; Bargues *et al.*, 2000; Dujardin *et al.*, 2000). No obstante, la no amplificación de *Triato1* no significa que no se encuentre en las especies estudiadas, sino que la secuencia de unión a los cebadores específicos pudo divergir lo suficiente como para no amplificar.

Tabla 2. Especies utilizadas (Schofield y Galvão 2009)

Tribu	Género	Grupo	Distr. geográfica	Complejo	Subcomplejo	Especies	
Triatomini	Triatoma	Rubrofasciata	América del Norte Viejo Mundo	Protracta		Nitida	
		Infestans			América del Sur	Infestans	Brasiliensis
			Infestans				infestans delpontei platensis
			Rubrovaria				carcavalloi rubrovaria
			Sordida				Sordida
Mepraia	gajardoi spinolai						
	Panstrongylus		América del Sur			Chinai	
Rhodniini	Rhodnius		América del Sur	Prolixus		Prolixus	

Southern Blot de *Triato1* en triatominos

En la Fig. 11 se visualiza la hibridación de la sonda (*Triato1*) en ambos ensayos de restricción para cada especie, principalmente en un fragmento de 4.7 Kb para la digestión con Pst I y en un fragmento de 4.1 Kb para Pst I + EcoR I.

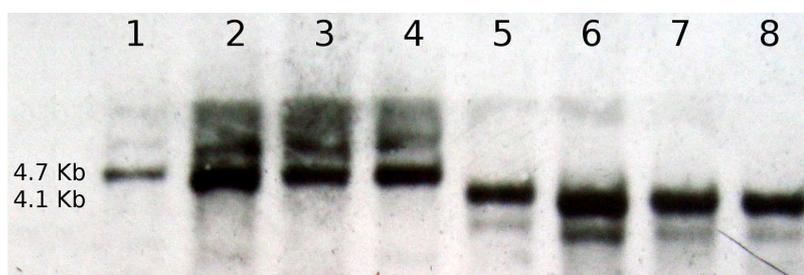


Fig. 11 – Southern Blot de DNAs genómicos digeridos con enzimas de restricción. Carriles: 1 – *T. infestans* con Pst I; 2 – *T. delponteii* con Pst I; 3 – *T. rubrovaria* con Pst I; 4 – *M. spinolai* con Pst I; 5 – *T. infestans* con Pst I + EcoR I; 6 – *T. delponteii* con Pst I + EcoR I; 7 – *T. rubrovaria* con Pst I + EcoR I; 8 – *M. spinolai* con Pst I + EcoR I.

El mismo patrón de hibridación para las cuatro especies, en cada ensayo, sugiere la existencia de varias copias de *Triato1* en el genoma. El hecho de que se observe una banda principal en un fragmento del mismo tamaño, puede ser porque *Triato1* se integra en una región específica que posee uno o ambos sitios de restricción, o porque los sitios de corte están dentro del elemento. Independientemente de la razón, el resultado sugiere que el elemento transponible ha conservado su secuencia o localización. Esta conservación podría ser posible si *Triato1* fuese un elemento activo, como ha sido previamente sugerido por la identificación de un ORF intacto para la retrotranscriptasa y detección de transcritos en *Triatoma infestans* (Romero *et al.*, 2005).

Diferencias en la cantidad de DNA entre especies cercanas, pueden deberse a diferencias en la frecuencia de Ets, constituyentes de la heterocromatina (Gregory 2005). Por este motivo se esperaba patrones de hibridación diferentes entre especies con variabilidad heterocromática, al menos entre *T. infestans* y *T. delponteii* que pertenecen al subcomplejo Infestans (Panzera *et al.*, 1995). Posiblemente la conservación de los sitios de integración y/o restricción, y la existencia de sitios hotspots para la inserción de Ets (Lansman 1987), no permiten observar estas diferencias. Tampoco se puede descartar que las diferencias entre las especies sean causadas por variaciones del número de elementos, ya que esto no puede ser observado claramente en el Southern. En este caso se requeriría cuantificar el número de copias del elemento mediante otras técnicas, por ej. PCR en tiempo real. Esta misma técnica podría utilizarse para cuantificar la expresión de los elementos y evaluar si existen diferencias entre las especies o poblaciones.

Otra alternativa es que otros Ets en el genoma de triatominos sean los responsables de las variaciones genómicas entre las especies. Recientemente se identificaron ESTs (Expressed Sequence Tag) de *Triatoma infestans*, cuyos productos de traducción son similares a secuencias aminoacídicas de la retrotranscriptasa de distintas especies de *Drosophila*, lo cual apoya la expresión de al menos este dominio (Ribeiro *et al.*, 2008). Ninguno de estos ESTs tiene similitud con las secuencias de retrotranscriptasa aquí reportadas, lo que podría significar la presencia de otros elementos transponibles en el genoma de *Triatoma infestans* y posiblemente otros triatominos.

Secuenciación de *Triato1* en *Triatoma rubrovaria*

Se recurrió a la clonación con plásmidos como paso previo a la secuenciación, para producir clones (o colonias bacterianas) portadores de una única secuencia de *Triato1*. Esto evita la secuenciación de la mezcla de variantes del retrotransposón, que se obtendría si se secuenciara directamente un producto de PCR.

Los DNAs plasmídicos extraídos de 8 colonias blancas (con plásmido recombinante) y una azul (con plásmido recircularizado), fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa para cuantificar. El PCR screening con los cebadores de *Triato1* reveló que solamente una colonia (col16) portaba el inserto de interés.

La secuencia del dominio retrotranscriptasa de la colonia 16 de *T. rubrovaria* se alineó con las de *T. infestans*, *T. delpontei*, *T. platensis* y *T. brasiliensis* (Fig. 12); que fueron previamente secuenciadas a partir del producto de amplificación con cebadores degenerados. Estas especies, incluyendo a *T. rubrovaria*, pertenecen al complejo Infestans (Tabla 2).

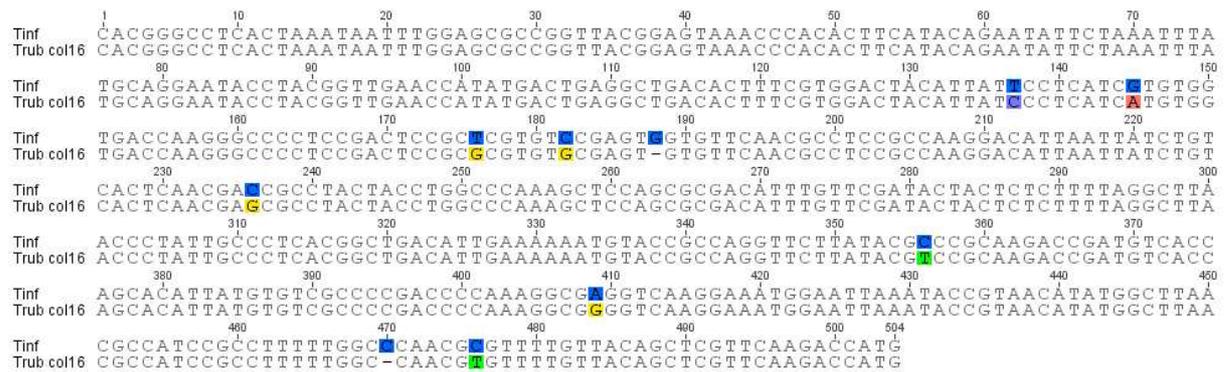
	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Tinf	CA	CGGGCC	CTCACTAAATAATTTGGAGCGCGGGTTACGGAGTAAACCACACTTCATA	CAGAAATATTCTAAATTTATG	CAGGAATACCTACGGTTGAA	CCA					
col16 Trub	CA	CGGGCC	CTCACTAAATAATTTGGAGCGCGGGTTACGGAGTAAACCACACTTCATA	CAGAAATATTCTAAATTTATG	CAGGAATACCTACGGTTGAA	CCA					
Tdpt	CA	CGGGCC	CTCACTAAATAATTTGGAGCGCGGGTTACGGAGTAAACCACACTTCATA	CAGAAATATTCTAAATTTATG	CAGGAATACCTACGGTTGAA	CCA					
Tpla	CA	CGGGCC	CTCACTAAATAATTTGGAGCGCGGGTTACGGAGTAAACCACACTTCATA	CAGAAATATTCTAAATTTATG	CAGGAATACCTACGGTTGAA	CCA					
Tbra	CA	CGGGCC	CTCACTAAATAATTTGGAGCGCGGGTTACGGAGTAAACCACACTTCATA	CAGAAATATTCTAAATTTATG	CAGGAATACCTACGGTTGAA	CCA					
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
Tinf	TATGACTGAGGCTGACA	CTTTCGTGGA	CTACATTATT	CCTCATC	GTGTTGAC	CAAAGGGCCCTCCGACTCCGCTCGTCT	CGAGTGGT	GTTCAACGCCT			
col16 Trub	TATGACTGAGGCTGACA	CTTTCGTGGA	CTACATTATT	CCTCATC	GTGTTGAC	CAAAGGGCCCTCCGACTCCGCTCGTCT	CGAGTGGT	GTTCAACGCCT			
Tdpt	TATGACTGAGGCTGACA	CTTTCGTGGA	CTACATTATT	CCTCATC	GTGTTGAC	CAAAGGGCCCTCCGACTCCGCTCGTCT	CGAGTGGT	GTTCAACGCCT			
Tpla	TATGACTGAGGCTGACA	CTTTCGTGGA	CTACATTATT	CCTCATC	GTGTTGAC	CAAAGGGCCCTCCGACTCCGCTCGTCT	CGAGTGGT	GTTCAACGCCT			
Tbra	TATGACTGAGGCTGACA	CTTTCGTGGA	CTACATTATT	CCTCATC	GTGTTGAC	CAAAGGGCCCTCCGACTCCGCTCGTCT	CGAGTGGT	GTTCAACGCCT			
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
Tinf	CCGCCAAGGACATTAATTA	CTGTCTCACTCAA	CGACCGCTACTACTCTGGCCCA	AAGCTCCAGCGCGACATTTG	TCGATACTACTCTCTTTTAGG	CTTAA					
col16 Trub	CCGCCAAGGACATTAATTA	CTGTCTCACTCAA	CGACCGCTACTACTCTGGCCCA	AAGCTCCAGCGCGACATTTG	TCGATACTACTCTCTTTTAGG	CTTAA					
Tdpt	CCGCCAAGGACATTAATTA	CTGTCTCACTCAA	CGACCGCTACTACTCTGGCCCA	AAGCTCCAGCGCGACATTTG	TCGATACTACTCTCTTTTAGG	CTTAA					
Tpla	CCGCCAAGGACATTAATTA	CTGTCTCACTCAA	CGACCGCTACTACTCTGGCCCA	AAGCTCCAGCGCGACATTTG	TCGATACTACTCTCTTTTAGG	CTTAA					
Tbra	CCGCCAAGGACATTAATTA	CTGTCTCACTCAA	CGACCGCTACTACTCTGGCCCA	AAGCTCCAGCGCGACATTTG	TCGATACTACTCTCTTTTAGG	CTTAA					
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
Tinf	CCTATTGCCCTCACGGCTGACATTG	AAAAAATGTACCGCCAGGTTCTT	TATACG	CCGCAAGACCGATGT	CACCA	GCACATTATG	TGTCGCCCCGACCCCAA				
col16 Trub	CCTATTGCCCTCACGGCTGACATTG	AAAAAATGTACCGCCAGGTTCTT	TATACG	CCGCAAGACCGATGT	CACCA	GCACATTATG	TGTCGCCCCGACCCCAA				
Tdpt	CCTATTGCCCTCACGGCTGACATTG	AAAAAATGTACCGCCAGGTTCTT	TATACG	CCGCAAGACCGATGT	CACCA	GCACATTATG	TGTCGCCCCGACCCCAA				
Tpla	CCTATTGCCCTCACGGCTGACATTG	AAAAAATGTACCGCCAGGTTCTT	TATACG	CCGCAAGACCGATGT	CACCA	GCACATTATG	TGTCGCCCCGACCCCAA				
Tbra	CCTATTGCCCTCACGGCTGACATTG	AAAAAATGTACCGCCAGGTTCTT	TATACG	CCGCAAGACCGATGT	CACCA	GCACATTATG	TGTCGCCCCGACCCCAA				
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
Tinf	AGGCGAGG	TCAAGGAAATGGAATTA	AAATACCGT	AA	CATATGGCTTAA	C	GCCATCCGCTTTT	TGGCCCAACG	GT	TTTGTACAGCTCGTTCAAGACCATG	
col16 Trub	AGGCGAGG	TCAAGGAAATGGAATTA	AAATACCGT	AA	CATATGGCTTAA	C	GCCATCCGCTTTT	TGGCCCAACG	GT	TTTGTACAGCTCGTTCAAGACCATG	
Tdpt	AGGCGAGG	TCAAGGAAATGGAATTA	AAATACCGT	AA	CATATGGCTTAA	C	GCCATCCGCTTTT	TGGCCCAACG	GT	TTTGTACAGCTCGTTCAAGACCATG	
Tpla	AGGCGAGG	TCAAGGAAATGGAATTA	AAATACCGT	AA	CATATGGCTTAA	C	GCCATCCGCTTTT	TGGCCCAACG	GT	TTTGTACAGCTCGTTCAAGACCATG	
Tbra	AGGCGAGG	TCAAGGAAATGGAATTA	AAATACCGT	AA	CATATGGCTTAA	C	GCCATCCGCTTTT	TGGCCCAACG	GT	TTTGTACAGCTCGTTCAAGACCATG	

Fig 12 – Alineamiento de la secuencia nucleotídica del dominio retrotranscriptasa de *T. infestans* (Tinf), *T. delpontei* (Tdpt), *T. platensis* (Tpla), *T. brasiliensis* (Tbra), *T. rubrovaria* (col16 Trub). En colores pueden verse los polimorfismos entre las secuencias. La numeración corresponde a las posiciones de los nucleótidos en la secuencia de *T. infestans*. (Software Geneious 5.1.6; demo).

A través del alineamiento, se puede observar una importante conservación nucleotídica del dominio retrotranscriptasa en triatomíneos, lo que se podía sospechar con la amplificación en las distintas especies con cebadores específicos. Este nivel de conservación puede ser resultado de algún posible evento de transferencia horizontal entre las especies (Silva et al., 2004), o de la baja tasa de cambio que presenta la enzima retrotranscriptasa (McClure 1988).

Respecto a la secuencia de *T. infestans*, la de *T. rubrovaria* presenta 8 sustituciones nucleotídicas (5 transiciones, 3 transversiones), y dos deleciones que provocan desplazamientos en el marco de lectura y codones stop prematuros (Fig. 13). Las sustituciones que preceden a las deleciones, son todas sinónimas. El hecho de que el marco de lectura esté alterado por deleciones sugiere que el elemento no es activo en esta especie, lo cual es interesante porque *Triatoma rubrovaria* no tiene heterocromatina autónoma (Panzeria *et al.*, 1995; 1998)

A



B

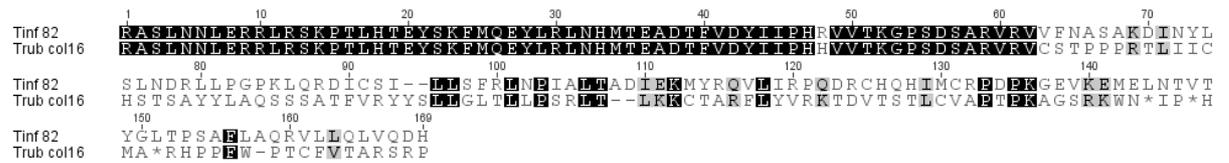


Fig. 13 – Alineamientos de la secuencia de la retrotranscriptasa de Triato1, para las especies *T. infestans* y *T. rubrovaria*. A: alineamiento nucleotídico del gen retrotranscriptasa; en colores se distinguen las sustituciones e inserciones/deleciones nucleotídicas. B: alineamiento de la traducción conceptual; sombreado en negro se resaltan los aminoácidos conservados.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- Diversas especies de triatominos, particularmente aquellas dentro del Grupo *Infestans*, contienen al retrotransposón LTR *Triato1*.
- La aparente ausencia de *Triato1* en otras especies puede ser porque no se encuentra, o porque su secuencia divergió lo suficiente para no ser amplificado.
- Los análisis de Southern Blot muestran que existen varias copias *Triato1* y que conservaron su secuencia o localización genómica.
- Alineamientos de las secuencias nucleotídicas del dominio retrotranscriptasa en *Triatoma rubrovaria* sugiere una conservación relativamente alta, aunque la presencia de codones stop o deleciones en el marco de lectura indican que existen copias defectuosas.

La presencia de *Triato1* en las especies donde fue identificado, así como su aparente ausencia en otras, permitiría su utilización como marcador molecular interespecífico en triatominos. Para esto es importante determinar su secuencia completa y analizar su variabilidad en un mayor número de especies, incluyendo más géneros de Triatominae.

Por otro lado, la comparación de su expresión y número de copias en poblaciones “Andina” y “no Andina” de *Triatoma infestans*, podrían asociar su expansión o actividad transposicional con diferencias en el tamaño genómico observado en dichas poblaciones. En las poblaciones “Andinas” donde es mayor el porcentaje de heterocromatina, se esperaría que *Triato1* fuese un elemento capaz de transponerse, o que al menos tuviese un mayor número de copias. La amplificación y secuenciación de *Triato1*, y cuantificación del número de copias permitiría conocer o al menos estimar el rol de este retroelemento en la evolución y especiación de los triatominos.

ANEXO: PROTOCOLOS

Extracción de DNA genómico.

1. Con la ayuda de una tijera se disgregó la pata de un triatomino en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, que contenía buffer de lisis (100 mM EDTA pH 8.0; 10 mM Tris-Cl pH 8.0; 100 mM NaCl). Para estar en buenas condiciones, el músculo debe ser blando y de color blanco.
2. Se completó el buffer de lisis con la adición de SDS 10 % y proteinasa K. Se incubó a 55°C durante 4 hs.
3. Se realizaron dos extracciones con fenol:cloroformo:isoamil y una con cloroformo, cada una seguida por una centrifugación a 13000 rpm durante 5 minutos y recuperación de la fase superior.
4. Se precipitó el DNA con 0.1 volumen de acetato de sodio 3 Mm (pH 5.2) y 2.5 volúmenes de etanol 100 %, a -20°C toda la noche.
5. Se centrifugó a 12000 rpm por 15' y se descartó el sobrenadante.
6. El pellet se lavó con etanol 70 %, seguido de una centrifugación a 12.000 rpm por 15 minutos y descarte del sobrenadante.
7. Se secó el pellet y se resuspendió en H₂O libre de DNAsa.

Los DNA genómicos fueron cuantificados mediante electroforesis en gel de agarosa, con la ayuda de un marcador de peso molecular.

Southern Blot

I – Restricción de DNA genómico y electroforesis.

Se digirieron 3 ug de DNA genómico de cuatro especies de triatominos (*T. infestans*, *T. delponteii*, *T. rubrovaria* y *M. spinolai*) en dos ensayos de restricción: uno con 30u de PstI (20 minutos, 37°C), y otro con 30u de PstI (20 minutos a 37°C)+20u de EcoRI (over night, 37°C).

Nota: la secuencia parcial de la retrotranscriptasa de *Triato1* no posee sitios de reconocimiento para PstI y EcoRI.

Los fragmentos generados fueron separados en una electroforesis en gel de agarosa 1.3 %. a 40 V durante toda la noche. Se incluyeron un marcador de peso molecular (Gene Ruler 1Kb DNA ladder, Fermentas) y un producto de PCR de *T. infestans* con los primers específicos (control +).

II – Tratamiento del gel

El DNA fue desnaturalizado in situ, mediante depurinización (0.2 N HCl), desnaturalización (0.4 N NaOH, 1 M NaCl), y neutralización (1 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.4).

III – Tratamiento de la membrana y transferencia

Como soporte sólido en la transferencia, se utilizó una membrana de nylon Hybond™ N+ (Amersham), cuya carga positiva favorece la unión de los ácidos nucleicos. Se cortó un trozo de membrana con las mismas dimensiones del gel, y posteriormente se humedeció en buffer salino de citrato de sodio o SSC 10x (0.15 M Na3citrate, 1.5 M NaCl).

La transferencia de los ácidos nucleicos desde el gel de agarosa hacia la membrana de nylon ocurre por capilaridad: se armó un dispositivo (Fig. 8) donde el gel y la membrana se saturaron en la solución de transferencia (SSC) a una concentración 10x, y papel Watman por encima de ellos, saturado con una solución 5x. Encima del papel Watman, se colocaron toallas absorbentes secas. La transferencia duró toda la noche.



Fig. 8 – Dispositivo para Southern Blot.

Al día siguiente, se desarmó cuidadosamente el dispositivo, y con un lápiz se marcaron los pocillos del gel en la membrana como punto de referencia de la migración de los fragmentos. La transferencia total de los ácidos nucleicos hacia la membrana fue confirmada por observación del gel en UV. Para fijar el DNA transferido a la membrana, se lo unió covalentemente a la misma, a través de la exposición a UV.

IV – Prehibridación

Se prehumedeció la membrana en SSC 5x, se enrolló y colocó en un tubo de hibridación, con los DNAs mirando hacia adentro, evitándose la formación de burbujas entre la membrana y la pared del tubo. Se descartó el SSC y se adicionó el buffer de hibridación (0.5 M NaCl, 5% m/v + agente bloqueante (Kit Gene Images Random Primer Labelling Module, Amersham)). La prehibridación se llevó a cabo a 42°C con constante agitación por 30 minutos.

V – Marcaje de la sonda

A través del kit Gene Images Random Prime Labelling Module (Amersham), que contiene el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, se sintetizó la sonda a partir de un amplicón clonado. Éste, correspondiente a la especie *Triatoma platensis*, se obtuvo por la escisión del inserto de un vector de clonación, con la enzima EcoR I (ver antecedentes).

En esta reacción de polimerización, se incorpora Fluoresceína – 11 – dUTP (FI-dUTP) en vez de dTTP, de tal forma que la sonda se sintetiza ya marcada con fluoresceína. La sonda se desnaturalizó y se utilizó directamente para la hibridación. Se incubó a 42°C ON.

VI – Posthibridación

Se descartó el buffer de hibridación, se adicionó SSC 5x y se agitó por 5 minutos. Se descartó el SSC 5x y se adicionó buffer primario (SDS 10% + SSC 20x) precalentado a 50°C.

Se transfirió la membrana a un recipiente con buffer secundario (SSC 2x) en exceso y se incubó con agitación constante a temperatura ambiente durante 5 minutos.

VII – Generación de señal y detección

La señal de hibridación fue detectada mediante anticuerpos anti-fluoresceína conjugados con una fosfatasa alcalina del kit Gene Images CDP-Star Detection Module (Amersham). Se mezclaron los reactivos de detección (reactivos 1 y 2) en cantidades iguales y se los incubó con la membrana a temperatura ambiente durante 1 minuto. Luego se drenó el exceso de la mezcla colocando la membrana sobre papel filtro, y se envolvió la misma en SaranWrap, con cuidado de no dejar burbujas.

Se apagó la luz y se colocó la membrana dentro de un cassette con la cara conteniendo el DNA fijado hacia arriba. Encima se colocó una placa radiográfica y se expuso por 2 hs. Posteriormente, se pasó la placa por revelador y fijador.

Los reactivos de detección utilizan la fosfatasa unida a la sonda marcada (a través del anticuerpo anti-fluoresceína) para catalizar la descomposición del sustrato dioxetano, generando la señal que impactará en la placa radiográfica.

Clonación

Para clonar *Triato1* en *T. rubrovaria*, se utilizó el InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas), que permite ligar el producto de PCR a un vector de clonación, y preparar y transformar bacterias competentes.

Para la ligación, el kit provee de un vector linealizado (pTZ57R/T) que posee un dT adicional en cada extremo 3' del mismo. Debido a que la Taq DNA polimerasa utilizada para amplificar *Triato1* adiciona un dA en cada extremo 3' del amplicón, a través de su actividad transferasa terminal, se favorece la ligación y se previene la recircularización del vector.

Para la preparación y transformación de células competentes, el kit provee un Medio C que permite preparar bacterias competentes de forma química, y de la solución T, para la transformación. Tanto la composición del Medio C como de la solución T, no son proporcionadas por el proveedor.

I – Ligación

El volumen de reacción fue de 30 ul, y contenía 90 ng de producto de PCR sin purificar de *Triatoma rubrovaria* (cantidad recomendada por el fabricante para un fragmento de 500 pb); 165 ng vector pTZ57R/T; buffer de ligación 5x, 5 u de T4 DNA ligasa, y cantidad suficiente de agua. Se incubó a temperatura ambiente (22°C) por una hora.

II – Transformación

Día 1

Se inoculó una colonia de *Escherichia coli* XL1-Blue no competentes provenientes de una placa LB agar con tetraciclina (30 ug/ul), en Medio C (kit), y se incubó a 37°C durante toda la noche, con agitación.

Día 2

1. Para formar la solución T, se mezclaron los componentes (A) y (B), en volúmenes iguales.
2. Se subcultivaron las colonias del día 1 en Medio C precalentado a 37°C, y se incubaron a 37°C durante 20 min, con agitación.
3. Se centrifugó 1 min y se descartó el sobrenadante.
4. El pellet celular fue resuspendido en 150 ul de solución T, y se incubó en hielo por 5 min.
5. Se centrifugó 1 min y se descartó el sobrenadante.
6. El pellet se resuspendió en 60 ul de solución T, y se incubó en hielo por 5 min.
7. Se dispusieron 2.5 ul de la reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga, y se dejó enfriar en hielo por 2 min.
8. Al tubo de microcentrífuga se agregaron 50 ul de las células competentes preparadas con la solución T. Se incubó en hielo por 5 min.
9. Las células se plaquearon inmediatamente en placas de LB agar calentadas a 37°C, con ampicilina (100 ug/ul), y XGal () e IPTG (). Se incubaron toda la noche a 37°C.

III – Identificación de colonias con vectores recombinantes

El vector pTZ57R/T posee un gen de resistencia al antibiótico ampicilina y un gen lacZ que codifica para la enzima β -galactosidasa, pero que es defectivo en su porción 3' (enzima truncada). Las bacterias *E. coli* XL1-Blue son sensibles a la ampicilina y poseen el mismo gen lacZ pero defectivo en su porción 5' (un codón AUG interno permite traducir el extremo carboxilo).

La enzima β -galactosidasa cataliza la hidrólisis del X-gal presente en las placas en productos que forman un precipitado azul. Los fragmentos amino y carboxilo no tienen actividad por sí mismos, pero pueden α -complementarse en una bacteria transformada para dar lugar a la proteína funcional. IPTG es un inductor de la producción de β -galactosidasa que inhibe al represor lac.

Dentro del gen lacZ del vector, se encuentra el "polylinker", una secuencia introducida artificialmente que posee sitios de restricción para varias enzimas. En esta región el vector está clivado para una eventual ligación del producto de PCR. Este "polylinker" no altera el marco de lectura del gen lacZ ni tampoco la actividad potencial del fragmento enzimático.

Las bacterias que no fueron transformadas no crecerán en las placas con ampicilina, pues no adquirieron el gen de resistencia localizado en el vector. Las bacterias transformadas crecerán, pudiendo haber incorporado el vector recircularizado (solo vector) o el recombinante (vector + producto PCR). Esto se resuelve a través de la actividad de la β -galactosidasa (Fig. 9)

Aquellas bacterias que incorporaron el vector recircularizado producen la enzima funcional por α -complementación y degradan al X-gal, coloreándose de azul. Aquellas bacterias que incorporaron el vector recombinante, no expresan la enzima porque el producto de PCR interrumpe al gen lacZ del vector, no degradan al X-gal y quedan blancas.

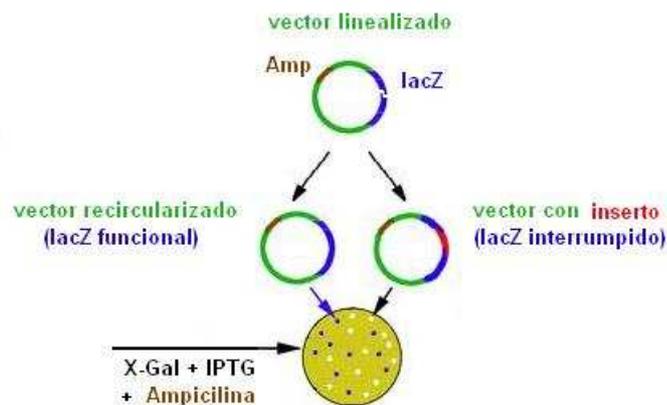


Fig. 9 – Identificación de clones recombinantes.

IV – Minipreps

Para extraer el DNA plasmídico se inocularon colonias blancas y una colonia azul (control negativo) en medio LB líquido con ampicilina. Se incubaron durante toda la noche a 37°C con agitación. Se utilizó un protocolo de extracción de plásmidos en escala pequeña (Sambrook *et al.*, 1989) que posee los siguientes pasos:

1. Se centrifugó el cultivo líquido a 14000 rpm durante 30 seg, se descartó el sobrenadante y se secó el pellet.
2. Se resuspendió el pellet en solución I (10 mM EDTA; 25 mM Tris; 50 mM glucosa).
3. Se agregó solución II recién preparada (2 mM NaOH; 1 % SDS), y se colocó en hielo para evitar la actividad de DNAsas.
4. Se agregó solución III fría (3 M KAc; 2 M ácido acético glacial) y se colocó en hielo por 3-5 min.
5. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min y se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo.
6. Se agregó RNAsa para una concentración final 450 ug/ul y se incubó a 37°C durante 30 min.
7. Se realizaron dos extracciones con fenol:cloroformo:isoamil y una con cloroformo, cada una seguida por una centrifugación a 13000 rpm durante 5 minutos y recuperación de la fase superior.
8. Se precipitó el DNA con 2 volúmenes de etanol 100% frío, a temperatura ambiente por 5 min.
9. Se centrifugó a 14000 rpm por 15 min y se descartó el sobrenadante.
10. El pellet se lavó con etanol 70%, se centrifugó a 14000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante.
11. Se secó el pellet y se resuspendió en H₂O libre de DNAsa

Los DNA plasmídicos fueron cuantificados mediante electroforesis en gel de agarosa, con la ayuda de un marcador de peso molecular para cuantificar.

V – Confirmación por PCR

Una vez cuantificados los minipreps, se procedió a la confirmación de plásmidos recombinantes mediante PCR con los primers específicos de *Triato1*, utilizando las mismas condiciones de amplificación del DNA genómico. Se utilizaron 8 colonias blancas y una colonia azul como control negativo. Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa 0.8%.

BIBLIOGRAFÍA

- Bargues MD, Marcilla A, Ramsey JM, Dujardin JP, Schofield CJ and Mas-Coma S 2000. Nuclear rDNA-based Molecular Clock of the Evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), Vectors of Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95(4): 567-573.
- Bargues MD, Kiisiowicz DR, Panzera F, Noireau F, Marcilla A, Pérez R, Rojas MG, O'Connor JE, Gonzalez-Candelas F, Galvão C, Jurberg J, Carcavallo RU, Dujardin JP and Mas-Coma S 2006. Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. *Infect Genet Evol* 6: 46-62.
- Butler M, Goodwin T and Poulter R 2001. An unusual vertebrate LTR retrotransposon from the cod *Gadus morhua*. *Mol Biol Evol* 18(3): 443-447.
- Capy P 1998. Evolutionary biology. A plastic genome. *Nature* 396(6711): 522-523.
- Carcavallo RU, Galindez Giron I, Jurberg J and Lent H 1998. Bibliographic checklist of the American Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas*. Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil. 1: 15-52.
- Dimitri P 1997. Constitutive heterochromatin and transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 100(1-3): 85-93.
- Dimitri P and Junakovic N 1999. Revising the selfish DNA hypothesis: new evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin. *Trends Genet* 15(4): 123-124.
- Dorer DR and Henikoff S 1994. Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell* 77(7): 993-1002.
- Dujardin JP, Schofield CJ and Panzera F 2000. Les Vecteurs de la Maladie de Chagas. *Recherches Taxinomiques, biologiques et Génétiques*. C. d. S. N. e. M. Académie Royale des Sciences d'Outre Mer, N.S. 24: 162.
- Fanti L, Dorer DR, Berloco M, Henikoff S and Pimpinelli S 1998. Heterochromatin protein 1 binds transgene arrays. *Chromosoma* 107(5): 286-292.
- Flavell AJ, Dunbar E, Anderson R, Pearce SR, Hartley R and Kumar A 1992. Ty1-Copia group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. *Nucleic Acids Res* 20: 3639-3644.
- Gregory TR (2005). *The Evolution of the Genome*. San Diego, Elsevier Academic Press.
- Havecker ER, Gao X and Voytas DF 2004. The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biology* 5(6): 225.
- Kinsey PT and Sandmeyer SB 1995. Ty3 transposes in mating populations of yeast: a novel transposition assay for Ty3. *Genetics* 139(1): 81-94.
- Kogan GL, Tulin AV, Aravin AA, Abramov YA, Kalmykova AI, Maisonhaute C and Gvozdev VA 2003. The GATE retrotransposon in *Drosophila melanogaster*: mobility in heterochromatin and aspects of its expression in germline tissues. *Mol Genet Genomics* 269(2): 234-242.
- Labrador M and Corces VG 1997. Transposable element-host interactions: regulation of insertion and excision. *Annu Rev Genet* 31: 381-404.
- Lansman RA 1987. Evolution of P transposable elements: sequences of *Drosophila nebulosa* P elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 491-495.
- Lent H and Wygodzinky P 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 163: 123-520.
- Mackay TF 1989. Transposable elements and fitness in *Drosophila melanogaster*. *Genome* 31(284-295).
- Marsano RM, Marconi S, Moschetti R, Barsanti P, Caggese C and Caizzi R 2004. MAX, a novel retrotransposon of the BEL-Pao family, is nested within the Bari1 cluster at the heterochromatic h39 region of chromosome 2 in *Drosophila melanogaster*. *Mol Genet Genomics* 270(6): 477-484.
- McClure MA 1991. Evolution of retrotransposons by acquisition or deletion of retrovirus-like genes. *Mol Biol Evol* 8(6): 835-856.
- Mellor J, Malim MH, Gull K, Tuite MF, McCready S, Dibbayawan T, Kingsman SM and Kingsman AJ 1985. Reverse transcriptase activity and Ty RNA are associated with virus-like particles in yeast. *Nature* 318(6046): 583-586.
- Monteiro FA, Pérez R, Panzera F, Dujardin JP, Galvão C, Rocha D, Noireau F, Schofield CJ and Beard CB 1999. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 229-238.
- Moore SP, Rinckel LA and Garfinkel DJ 1998. A Ty1 integrase nuclear localization signal required for retrotransposition. *Mol Cell Biol* 18(2): 1105-1114.
- Morgante M, Polcristi A, Vitacolonna N and Zuccolo A 2002. Automated search for LTR retrotransposons. *AI*IA Notizie* 4: 50-52.
- PAHO (1994). *Pan-American Health Organization: Chagas disease and the nervous system*. Washington, DC, PAHO.
- Panzera F, Alvarez F, Sanchez-Rufas J, Pérez R, Suja JA, Scvortzoff E, Estramil E, Dujardin J and Salvatella R 1992. C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera-Reduviidae). *Genome* 35: 1068-1074.
- Panzera F, Pérez R, Panzera Y, Alvarez F, Scvortzoff E and Salvatella R 1995. Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of triatomines (Hemiptera-Reduviidae). *Chromosome Res* 3(143-150).

- Panzerá F, Hornos S, Pereira J, Cestau R, Canale D, Diotaiuti L, Dujardin JP and Pérez R 1997. Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera-Reduviidae). *Am J Trop Med Hyg* 27: 732-779.
- Panzerá F, Scvortzoff E, Pérez R, Panzerá Y, Hornos S, Cestau R, Nicolini P, Delegado V, Alvarez F, Mazzella MC, Cossio G, Martínez M and Salvatella R 1998. Cytogenetics of Triatomines. Atlas of Chagas' Disease vectors in the Americas. R. U. Carcavallo, I. Galíndez Girón and J. Jurberg. Rio de Janeiro, Fiocruz.
- Panzerá F, Dujardin JP, Nicolini P, Caraccio MN, Rose V, Tellez T, Bermudez H, Bargues MD, Mas-Coma S, O'Connor JE and Pérez R 2004. Genomic changes of Chagas disease vector, South America. *Emerg Infect Dis* 10(3): 438-446.
- Panzerá F, Ferrandis I, Ramsey JM, Ordoñez R, Salazar-Schettino PM, Cabrera M, Monroy C, Bargues MD, Mas-Coma S, O'Connor JE, Angulo VM, Jaramillo-Ocampo N, Cordón-Rosales C, Gómez D and Pérez R 2006. Chromosomal variation and genome size support existence of cryptic species of *Triatoma dimidiata* with different epidemiological importance as Chagas Disease vectors. *Trop Med Intern Health* 11(1092-1103).
- Panzerá F, Ferrandis I, Ramsey JM, Salazar-Schettino PM, Cabrera M, Monroy C, Bargues MD, Mas-Coma S, O'Connor JE, Angulo VM, Jaramillo-Ocampo N and Pérez R 2007. Genome size determination in Chagas Disease transmitting bugs (Hemiptera-Triatominae) by flow cytometry. *Am J Trop Med Hyg* 76(3): 516-521.
- Panzerá F, Pérez R, Panzerá Y, Ferrandis I, Ferreiro MJ and Calleros L 2010. Cytogenetics and Genome Evolution in the Subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Cytogenetic Genome Res* 128: 77-87.
- Pérez R, Hernández M, Caraccio MN, Rose V, Valente SA, da Costa Valente V, Mejía JM, Angulo VM, Ramírez CM, Roldán J, Vargas F, Wolff M and Panzerá F 2002. Chromosomal evolution trends of the genus *Panstrongylus* (Hemiptera-Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Infect Genet Evol* 2(47-56).
- Piccinalli RV, Marcet PL, Noireau F, Kitron U, Gurtler RE and Dotson EM 2009. Molecular population genetics and phylogeography of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in South America. *J Med Entomol* 46: 796-809.
- Ribeiro J, Assumpção T, Francischetti I, Andersen J, Schwarz A and Santana J 2008. An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Insect Biochem Mol Biol* 32(2): 231-323.
- Ribet D, Harper F, Dewannieux M, Pierron G and Heidmann T 2007. Murine MusD retrotransposon: structure and molecular evolution of an "intracellularized" retrovirus. *J Virol* 81(4): 1888-1898.
- Romero V, González E, Panzerá Y, Basmadjian Y, Oviedo C, Calleros L, Panzerá F and Pérez R (2005). Distribución del retrotransposón *Triato1* en especies de Triatominos y su expresión en *Triatoma infestans* (Hemiptera-Reduviidae). XI Jornadas SUB, IV Jornadas SBBM. Minas, Lavalleja.
- Rose V (2003). Evidencias de Retrotransposones en los Triatominos, Pasantía en Genética. Universidad de la República. Facultad de Ciencias. Montevideo, Uruguay.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T 1989. Analysis and Cloning of Eukaryotic Genomic DNA. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2: 9.31-39.51.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T 1989. Plasmid Vectors. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 1: 1.25-21.28.
- Sandmeyer SB, Hansen LJ and Chalker DL 1990. Integration specificity of retrotransposons and retroviruses. *Annu Rev Genet* 24: 491-518.
- Schofield CJ, Jannin J and Salvatella R 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 22: 583-588.
- Schofield CJ and Galvão C 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110(2-3): 88-100.
- Steinemann S and Steinemann M 2005. Retroelements: tools for sex chromosome evolution. *Cytogenet Genome Res* 110(1-4): 134-143.
- Voytas DF and Boeke JD 1993. Yeast retrotransposons and tRNAs. *Trends Genet* 9(12): 421-427.
- Xiong Y and Eickbush TH 1990. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J* 9(10): 3353-3362.
- Zou S, Ke N, Kim JM and Voytas DF 1996. The *Saccharomyces* retrotransposon Ty5 integrates preferentially into regions of silent chromatin at the telomeres and mating loci. *Genes Dev* 10(5): 634-645.

TABLA DE CONTENIDO

Agradecimientos.....	3
Triatominos y enfermedad de chagas.....	4
Taxonomía y ecología de triatominos.....	5
Control de Chagas y control de triatominos.....	5
Variabilidad genómica en triatominos.....	6
Triatominos y elementos transponibles.....	8
Retroelementos LTR.....	8
Retroelementos en triatominos.....	10
Objetivo general.....	13
Objetivos específicos.....	13
Materiales y métodos.....	14
Extracción de DNA genómico.....	14
PCR con primers específicos.....	14
Clonación.....	15
Secuenciación.....	15
Resultados y discusión.....	16
Amplificación parcial del dominio retrotranscriptasa con cebadores específicos.....	16
Southern Blot de <i>Triato1</i> en triatominos.....	18
Secuenciación de <i>Triato1</i> en <i>Triatoma rubrovaria</i>	19
Conclusiones y perspectivas.....	21
Anexo: Protocolos.....	22
Bibliografía.....	28
Tabla de contenido.....	30