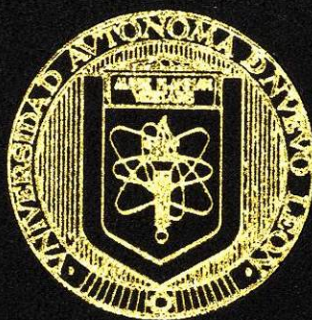


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



"CLONACION DE LA SUBUNIDAD MENOR DE  
MIRMEXINAS DEL VENENO DE LA HORMIGA  
*Pseudomyrmex triplarinus*"

PRESENTADO POR

SRITA. JANNET EDITH SALINAS HERNÁNDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR  
AL TÍTULO DE  
QUÍMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

MONTERREY, N. L.

ENERO 2002

TL  
RC933  
.S2  
2002  
c.1

CLONNACION DE LA SUBUNIDAD MENOR DE MIPRAEXINAS DEL VENENO

JESH

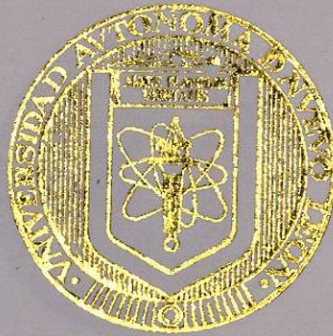
DE LA HORMIGA *Pseudomyrmex triparinus*'



1080124436

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



"CLONACION DE LA SUBUNIDAD MENOR DE  
MIRMEXINAS DEL VENENO DE LA HORMIGA  
*Pseudomyrmex triplarinus*"

PRESENTADO POR

SRITA. JANNET EDITH SALINAS HERNANDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR  
AL TITULO DE  
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

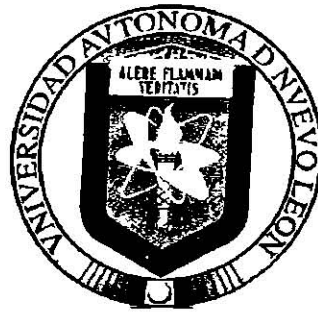
MONTERREY, N. L.

ENERO 2002



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“CLONACIÓN DE LA SUBUNIDAD MENOR DE MIRMEXINAS DEL  
VENENO DE LA HORMIGA *Pseudomyrmex triplarinus*”**

**PRESENTADO POR**

**SRITA. JANNET EDITH SALINAS HERNÁNDEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TITULO DE  
QUÍMICO BACTERIOLOGO PARASITÓLOGO**

**MONTERREY, N.L.**

**ENERO DEL 2002**

TL

RC 933

.52

2002

# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

## FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



### COMISION DE TESIS

DRA. DIANA RESENDEZ PEREZ

Director de Tesis

DRA. CRISTINA RODRIGUEZ PADILLA

Co-Director

DR. MARIO MORALES VALLARTA

Secretario

M.C. JORGE VERDUZCO MARTINEZ

Vocal

**“CLONACIÓN DE LA SUBUNIDAD MENOR DE MIRMEXINAS DEL  
VENENO DE LA HORMIGA *Pseudomyrmex triplarinus*”**

**PRESENTA**

**LA SRITA. JANNET EDITH SALINAS HERNÁNDEZ**

**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León en Monterrey; bajo la dirección de la Dra. Diana Reséndez Pérez y la Dra. Cristina Rodríguez Padilla.**



**“Todo lo puedo en Cristo que me Fortalece”**

**Filipenses 4:13**

## **DEDICATORIA**

**A DIOS POR LLENARME DE SUS BENDICIONES.**

**AL GRAN APOYO DE MIS PADRES:  
GLORIA MARGARITA HERNÁNDEZ DE SALINAS  
REYNOL SALINAS PÁEZ**

**A MIS HERMANOS:  
EIMY, BRIAN Y REYNOL SALINAS HERNÁNDEZ**

**A MIS ABUELITOS QUE SIEMPRE ME HAN MANTENIDO EN SUS  
ORACIONES:  
MARTHA PÁEZ SÁENZ  
CARLOS HERNÁNDEZ MORENO  
EN MEMORIA DE GLORIA LÓPEZ DE HERNÁNDEZ**

**A LA DRA. DIANA RESÉNDEZ CON MUCHO CARIÑO.**

**Mon amie MARCO IVÁN**

**LOS QUIERE JEANNIE**

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	iv
1.- ANTECEDENTES .....	1
2.- IMPORTANCIA .....	4
3.- HIPÓTESIS .....	6
4.- OBJETIVOS .....	6
5.- METODOLOGÍA .....	7
5.1 Caracterización morfológica de la hormiga <i>Pseudomymex triplarinus</i> .....	7
5.2 Obtención del veneno de la hormiga <i>P. triplarinus</i> .....	7
5.3 Análisis electroforético de los componentes protéicos del veneno de la hormiga <i>P. triplarinus</i> .....	8
5.4 Diseño de oligonucleótidos de las subunidades menores y PCR virtual .....	9
5.5 Obtención del DNA genómico de la hormiga <i>P. triplarinus</i> .....	15
5.6 Análisis del DNA mediante electroforesis en geles de agarosa .....	15
5.7 Amplificación mediante PCR de las subunidades menores .....	16
5.8 Clonación de los fragmentos obtenidos mediante PCR .....	17
5.9 Obtención del DNA plasmídico mediante minipreparación con lisis alcalina ..	18
5.10 Caracterización del DNA plasmídico mediante digestión con <i>EcoRI</i> .....	19
5.11 Determinación de la secuencia nucleotídica de las clonas positivas .....	19
6.- RESULTADOS .....	20
6.1 Caracterización morfológica de la hormiga <i>P. triplarinus</i> .....	20
6.2 Componentes protéicos del veneno de <i>P. triplarinus</i> .....	24
6.3 DNA genómico de <i>P. triplarinus</i> .....	25
6.4 Fragmentos amplificados mediante PCR .....	26
6.5 Fragmentos clonados en el vector pCR 2.1 .....	28

6.6 Secuencia nucleotídica de los insertos analizados .....	30
7.- DISCUSIÓN .....	34
8.- CONCLUSIONES .....	37
9.- APÉNDICE .....	38
9.1.- Preparación de soluciones .....	38
10.- LITERATURA CITADA .....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µl	Microlitros
ml	Mililitros
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilen diamino-tetra-acético
g	Gramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
TBE	Tris base-ácido bórico-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
V	Voltio
Da	Daltones
cols	Colaboradores
PSA	Persulfato de amonio
TEMED	Tetrametiletilendiamina
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
ARA	Artritis Reumatoide Activa
SDS-PAGE	Dodecil-Sulfato de Sodio Gel de Poliacrilamida
min	Minutos
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
miliQ	Ultrapurificada
dNTP	Dinucleótidos trifosfatados
mM	Milimolar
DTT	Ditiotreitol
BSA	Albúmina sérica bovina
UV	Ultravioleta
HCl	Ácido Clorhídrico
RNAasa	Enzima ribonucleasa
pH	Potencial de hidrógeno
%	Porcentaje
mg/ml	Miligramos por mililitro
h	Horas

## LISTA DE FIGURAS

1.- PCR virtual de las subunidades menores de las Mirmexinas.....	12
2. Diagrama de la Estrategia alterna .....	14
3. Observación morfológica de la hormiga de <i>Pseudomyrmex triplarinus</i> .....	21
4. Observación morfológica de la cabeza de <i>P. triplarinus</i> .....	22
5. Segmentos de la antena de <i>P. triplarinus</i> .....	23
6. Estructura de la pata de <i>P. triplarinus</i> .....	23
7. Análisis electroforético del veneno de <i>P. triplarinus</i> .....	24
8. Obtención de DNA genómico de <i>P. triplarinus</i> .....	25
9. Amplificación mediante PCR de las subunidades SS1 y SS2 de las Mirmexinas.....	26
10. Amplificación mediante el DNA sintético de la subunidad SS1 de las Mirmexinas .....	27
11. Aspectos de las clonas positivas obtenidas con el vector pCR 2.1 .....	28
12. Caracterización de los fragmentos clonados en el vector pCR 2.1 .....	29
13. Caracterización de las clonas en el gel de agarosa al 2% .....	30
14. Diagrama correspondiente a la clona número 9 del DNA sintético .....	33

## LISTA DE TABLAS

I. Uso de codones de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	9
II. Características de los oligonucleótidos diseñados .....	10
III. Uso de codones de <i>Escherichia coli</i> .....	13
IV. Programa de PCR para la amplificación de las subunidades menores .....	17
V. Resumen de los resultados de las clonas analizadas .....	32

## **AGRADECIMIENTOS**

**Agradezco principalmente a Dios por que siempre ha estado a mi lado**

**A mis Padres por su comprensión, apoyo y confianza que fueron de gran impulso para poder cumplir esta meta.**

**Agradezco en gran manera a la Dra. Diana Reséndez por la confianza depositada en mi para la realización de este proyecto, por ayudar a forjar mi carácter como un excelente profesionalista, así como transmitirme su gran experiencia y conocimiento.**

**Al M.C. Claudio Rocha le agradezco infinitamente sus valiosos comentarios, así como su asesoría en la parte teórica y práctica durante la realización de este proyecto.**

**Al Centro de Biotecnología Genómica del IPN así como a la Dra. Ana María Sifuentes por su ayuda en la secuenciación de las clonas.**

**A la Srta. Nancy Villarreal, al M.C. Jorge Verduzco Martínez, a mi Tía Silvia, y a mis Tíos Juan, Pepe, y Pablo por sus valiosos consejos y apoyo incondicional.**

**A todo el personal del Laboratorio de Inmunología y Virología en especial a los integrantes del L8 Edith, Diana, Maribel, Fermin, Efrén, Argentina y Ricardo por su disposición y apoyo continuo.**

**A mis amigos Alicia, Areli, Betty, Julio, Alejandro por siempre estar a mi lado cuando más los necesitaba.**

**A Marco Iván por su comprensión, paciencia y amor.**

## RESUMEN

Desde épocas precolombinas se conoce que algunas poblaciones indígenas usaban el veneno de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus* para aminorar los síntomas de la Artritis Reumatoide (Altman *et al.*, 1984). Diferentes grupos de investigación han probado extractos de éste veneno en pacientes con Artritis. Los resultados en todos los casos, han sido una mejoría sintomatológica propia de la Artritis Reumatoide como: el número de articulaciones afectadas, el Índice de Ritchie, la rigidez matinal y la intensidad del dolor (Astorga, 1992). La caracterización parcial de los componentes peptídicos del veneno, mostró que contiene 12 proteínas que van de 4,200 a > 100,000 Da siendo las más abundantes 4 péptidos de bajo peso molecular (Hink *et al.*, 1994). El estudio reciente de estos péptidos permitió aislar 6 isoformas denominada Mirmexinas, con tamaños muy similares que van desde 6,998 hasta 7,142 Da. El uso del veneno completo o de las Mirmexinas han inducido una mejoría generalizada en pacientes con Artritis Reumatoide y una alta actividad anti-inflamatoria en el modelo animal respectivamente, sin embargo los resultados en pacientes tratados son muy variables.

En el presente trabajo identificamos morfológicamente a la hormiga *P. triplarinus*, aislamos su DNA genómico y diseñamos los oligonucleótidos para amplificar mediante PCR la secuencia nucleotídica de la subunidad menor de las Mirmexinas. Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este proyecto nos permitieron clonar la secuencia nucleotídica que codifica a la subunidad menor SS1 de las Mirmexinas.

La obtención de la secuencia nucleotídica completa de la subunidad SS1 permitirá a mediano plazo que esta sea introducida en un vector de expresión para la producción de éste péptido en condiciones controladas en el laboratorio así mismo como su caracterización funcional en el tratamiento de Artritis Reumatoide.



# 1. ANTECEDENTES

El veneno de insectos y algunos reptiles ha sido estudiado desde la época de los romanos para combatir enfermedades inflamatorias. Los mas estudiados han sido principalmente de insectos sociables agresivos como las abejas (Habermann,1971), avispas, abejorros y hormigas (Blum y Hermann, 1978). Existen evidencias populares desde las épocas precolombinas que algunas poblaciones indígenas usaban el veneno de la hormiga *P. triplarinus* para aminorar los síntomas de Artritis Reumatoide. Algunos nativos en Sudamérica golpeaban el árbol hospedero de la hormiga permitiendo así que las hormigas que viven en simbiosis en la cavidad medular del árbol les inyectara el veneno en la zona afectada. La hormiga *Pseudomyrmex arboris-sanctae* conocida actualmente como *Pseudomyrmex triplarinus* se asocia al árbol *Triplaris americana* conocido en Brasil como "Tachi", en Perú como "Tangarana" y en Bolivia como "Palo Santo" o "Palo diablo" debido a que las hormigas hospederas son muy agresivas con herbívoros y depredadores del árbol dejando un círculo de protección alrededor del mismo que permite la obtención de nutrientes que estimulan su crecimiento (Wheeler 1942).

*Pseudomyrmex triplarinus* pertenece a la subfamilia Pseudomirmicinae, mide de 6 - 7 mm de longitud, con el pecíolo y postpecíolo reducidos, 12 segmentos antenales, ojos grandes que ocupan aproximadamente 2/3 ó menos de longitud de la cabeza. La mandíbula casi siempre contiene un diente marginal sobre el margen basal, presenta sutura promesonotal flexible, un surco metabasitarsal ausente, patas largas y un aguijón o estilete bien desarrollado. Las hormigas soldados se diferencian ya que tienen cabezas largas y son de mayor tamaño comparadas con las obreras. La reina es una hembra ponedora de huevos que presenta alas sobre el tórax y un metanotum bien desarrollado. Los machos de ésta especie se caracterizan por tener 12 segmentos antenales, el margen posterior del esternito VIII emarginado, el margen de la mandíbula con 6-18 dientes o denticulas y rara vez adentado, el margen basal de la mandíbula es de la mitad o menos que la longitud del margen masticatorio las dos convergiendo en

ángulo hacia el diente ápico basal, cavidad metacoxal cerrada y un bien desarrollado postpecíolo (Ward 1985, 1991, 1993 y 1999).

En 1968, Holzmann un médico alemán que vivía en América del Sur usó el veneno de ésta hormiga para tratar la Artritis Reumatoide que él padecía, observando una mejoría generalizada durante el tratamiento. Este trabajo inició diversos estudios con el veneno de ésta hormiga encontrando efectos benéficos en pacientes artríticos a quienes les administró el veneno (Resultados no publicados).

Altman y cols. en 1982, de la División de Artritis de la Facultad de Medicina de la Universidad de Miami, realizaron un estudio doble ciego controlado con el veneno completo de *P. triplarinus* en 30 pacientes con Artritis Reumatoide clásica por el criterio de ARA (Ropes *et al.*, 1958). La preparación del veneno, se realizó a partir de un extracto alcohólico del veneno de la hormiga nativa el cual fue preparado por Arnold y Schultz en 1984, ellos trabajaron con 15 pacientes como control los cuales recibieron 0.1mg de histamina fosfatada mediante por vía intradérmica para estimular los efectos del veneno de la hormiga. El veneno o placebo fue administrado subcutáneamente aplicando 0.1 ml el primer día de tratamiento incrementando la dosis hasta 1ml por 5 días, posteriormente se aplicó 1ml del día 6 hasta el 14. La actividad reumatoide (medida según el criterio descrito por Lansbury en 1956 y 1958) mostró que la rigidez matutina disminuyó en un 78%, la fatiga no sufrió cambios, la fuerza de presión mejoró en un 22%, y las articulaciones sensibles al dolor disminuyeron de 24% a 3% en el índice articular de Ritchie. Esta mejoría generalizada se mantuvo por espacio de 6 meses sin embargo el factor reumatoide, y los niveles de colesterol no se modificaron (Altman *et al.*, 1982 y 1984).

Los insectos del género himenóptera se caracterizan por usar su veneno para defensa. El veneno de la hormiga *P. triplarinus* fue comparado con el de las abejas, avispas y otras hormigas encontrándose una alta actividad de fosfolipasa así como una mediana actividad hemolítica. Estas enzimas funcionan como alérgenos o como agentes citotóxicos que pueden ser letales. El veneno de *Pseudomyrmex triplarinus* presentó una actividad de fosfolipasas  $A_2$ , la cual fue

tres veces mayor que la presentada por el veneno de la hormiga *P. badius* (Schmidt *et al.*, 1986) e inclusive de la descrita en algunas abejas.

Posteriormente, Astorga y cols. en 1992 trataron a 10 pacientes con Artritis Reumatoide con una fracción parcialmente purificada del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus*. Los pacientes mostraron una mejoría estadísticamente significativa en la característica de rigidez matutina, el índice de Ritchie y en la intensidad del dolor. Las reacciones adversas se limitaron a eritema en el sitio de la inyección en todos los pacientes y solamente en uno prurito local con fiebre (Astorga, 1992).

La eficacia y seguridad del extracto del veneno parcialmente purificado se probó en 15 pacientes con artritis reumatoide activa, que tenían un tratamiento con medicamentos anti-inflamatorios y en algunos casos con metrotexate. Como resultado se encontró una mejoría significativa en el número de articulaciones afectadas como el índice de Ritchie, rigidez matinal y la intensidad del dolor. Dos pacientes experimentaron reacciones moderadas locales y no se encontraron alteraciones en las pruebas de laboratorio clínico de los pacientes durante éste estudio (Burgos y Vargas, 1993).

La caracterización parcial de componentes peptídicos del veneno de *P. triplarinus* realizada por Hink y cols. en 1994 mediante una cromatografía de baja presión mostró que contiene 12 proteínas de 4,200 a > 100,000 Da, siendo 4 proteínas las más abundantes; entre las cuales destaca una proteína de 4200 Da que posee actividad hemolítica débil, otra de 20,400 Da la cual posee actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> y dos proteínas de 24,500 y 14,100 Da que poseen actividad de fosfolipasa y actividad hemolítica directa.

Interesantemente, un estudio reciente de los péptidos de bajo peso molecular del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus* permitió aislar 6 isoformas con pesos moleculares muy similares entre 6,998 y 7,142 Da. Cada una de estas isoformas llamadas Mirmexinas son heterodímeros constituidos por una subunidad pequeña (SS1, SS2 o SS3), unida mediante puentes disulfuro a una subunidad mayor (LS1 o LS2) en diferentes combinaciones. Cuando se aplicó el veneno completo con una dosis de 12.0mg/kg mostró un 82% de actividad anti-

inflamatoria en el modelo animal de carragenina (Winter *et al.*, 1962); como las Mirmexinas representan el 44% del veneno total, se aplicó una dosis correspondiente (5.4mg/kg) que mostró un 52% actividad anti-inflamatoria, y cuando se incrementó la dosis a 9.8mg/kg se obtuvo un 90% de actividad anti-inflamatoria en el modelo animal (Pan y Hink, 2000).

Los péptidos de menor peso molecular del veneno mostraron una alta actividad anti-inflamatoria en el modelo de edema de ratas inducidas con carragenina (Winter *et al.*, 1962) así como en los pacientes tratados (Hink *et al.*, 1994). Desafortunadamente, el tratamiento clínico con estos péptidos purificados presentaron resultados no reproducibles que requieren ser confirmados para evitar los problemas técnicos que se encontraron en los pacientes tratados (R. Kinsolving comunicación personal).

## **2. IMPORTANCIA**

La Artritis Reumatoide por una enfermedad crónica, multisistémica de etiología desconocida que presenta inflamación persistente en las articulaciones con destrucción de cartílago, desgaste óseo y consecuente deformación de las articulaciones. Esta enfermedad auto inmunitaria se presenta entre los 40 y 55 años ([http://www.ser.es/pacientes/art\\_reuma.html](http://www.ser.es/pacientes/art_reuma.html)), con más frecuencia en mujeres aunque afecta también a varones produce dolor, dificultad para el movimiento y tiene una duración variable, irregular y en general larga, por lo que es una enfermedad crónica y frecuente ya que se presenta entre el 1 y 2% de la población Mexicana. Los tratamientos actuales y disponibles en Artritis Reumatoide proporcionan alivio al dolor y reducción de la inflamación así como mejoría en el desarrollo de la enfermedad, pero ninguno es curativo; todos ellos provocan importantes y variadas reacciones adversas. Por lo tanto, es de suma importancia encontrar nuevos tratamientos que ofrezcan una ayuda eficaz en los síntomas y pronóstico de esta enfermedad.

Estudios realizados en diferentes grupos de investigación han probado extractos diferentes del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus*. Los pacientes tratados mostraron en todos los casos una mejoría significativa en el número de las articulaciones afectadas, el índice de Ritchie, rigidez matinal y la intensidad del dolor. La característica más importante de éste veneno en el tratamiento de Artritis Reumatoide ha sido que produce una mejoría generalizada que en la mayoría de los casos se ha mantenido por espacio de seis hasta nueve meses, por lo que no necesita aplicarse continuamente como la mayoría de los medicamentos que se usan actualmente. Debido a lo anterior, la clonación de las secuencias nucleotídicas responsables de las subunidades menores de las Mirmexinas permitirá producir éstos péptidos en el laboratorio y a mediano plazo caracterizar su actividad funcional en el tratamiento de Artritis Reumatoide.

### **3. HIPÓTESIS**

El uso del veneno de la hormiga *P. triplarinus* así como las Mirmexinas han mostrado una mejoría generalizada en pacientes con Artritis Reumatoide y una alta actividad anti-inflamatoria en el modelo animal. Sin embargo, se ha detectado una alta variabilidad en el tratamiento administrado en ambos casos, por lo que si se diseñan oligonucleótidos específicos para las subunidades menores de las Mirmexinas se clonarán las secuencias nucleotídicas que permitan a mediano plazo producir éstos péptidos en condiciones controladas en el laboratorio.

### **4. OBJETIVOS**

- Diseño de oligonucleótidos específicos para la amplificación de las secuencias que codifican para las subunidades menores de las Mirmexinas.
- Amplificación mediante PCR de las secuencias codificantes de las subunidades menores de las Mirmexinas a partir de DNA genómico de la hormiga *P. triplarinus*.
- Clonación de las secuencias nucleotídicas de los fragmentos amplificados mediante PCR en el vector pCR 2.1.
- Determinación de la secuencia nucleotídica de los fragmentos clonados.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1 Caracterización morfológica de *P. triplarinus***

Las hormigas *Pseudomyrmex triplarinus* se colectaron en Santa Cruz, Bolivia utilizando la técnica del golpeteo del árbol hospedero *Triplaris americana* (Schultz y cols., 1984). Esta técnica consiste en golpear el árbol para estimular a las hormigas a que salieran de él. Debido a que las hormigas son muy agresivas, estas agreden inyectando su veneno a objetos como las esponjas de teflón de colores llamativos que fueron previamente colocadas alrededor del árbol. Este método permite ordeñar obtener el veneno de las hormigas libre de contaminantes tisulares. Las hormigas fueron fijadas en una solución de glicerol:ácido acético (1:4) para su transporte y posteriormente se realizó el montaje utilizando la solución de Faure's (Roberts , 1998). La caracterización morfológica se realizó mediante observación, análisis y medición de las estructuras de la hormiga en el microscopio estereoscópico con ocular graduado (Zeiss) además de un microscopio (Olympus) adaptado a una cámara digital del equipo Gel-Pro 3.1 Imager (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, U.S.A) para la obtención de las imágenes.

### **5.2 Obtención del veneno de la hormiga *P. triplarinus***

El veneno de la hormiga se extrajo de 10 esponjas de teflón a las cuales se les realizaron 8 lavados con agua destilada, en el primer lavado se aplicaron 65 ml, en el segundo lavado 40 ml, en el tercero 30 ml, en la cuarto 15 ml, en la quinto 10 ml, en la sexto 9 ml, y finalmente 8 ml. La muestra obtenida fué esterilizada mediante filtración (Millipore). El veneno estéril se concentró en una

liofilizadora  $-70^{\circ}\text{C}$  (LABCONCO, Kansas city, Missouri ) durante 9 h. y para su uso se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de agua miliQ estéril.

### **5.3 Análisis electroforético de los componentes protéicos del veneno de *P. triplarinus***

Los componentes protéicos de veneno fueron visualizados mediante electroforesis SDS-PAGE utilizando la técnica descrita por Laemmli (1970). Para esto se elaboraron geles de poliacrilamida siendo el gel separador al 16.5% por lo que se preparó una mezcla de 1.7 ml de agua destilada, 1.3 ml de Tris-HCl 1.5 M pH (8.8), 2.06 ml de Acrilamida al 40%, 50  $\mu\text{l}$  de SDS al 10%, 50  $\mu\text{l}$  de PSA al 10% y 2  $\mu\text{l}$  de TEMED. La mezcla correspondiente al gel concentrador 5% contenía 2.23 ml de agua destilada, 380  $\mu\text{l}$  de Tris-HCl 1.5M pH (6.8), 375  $\mu\text{l}$  de acrilamida al 40%, 30  $\mu\text{l}$  de SDS al 10%, 30  $\mu\text{l}$  de PSA al 10% y 3  $\mu\text{l}$  de TEMED. Una vez realizadas ambas mezclas se procedió a llenar los vidrios anteriormente montados agregando primero la mezcla correspondiente del gel separador esperando un par de minutos a que polimerize para después agregar la parte correspondiente al gel concentrador y colocar los peines. Una vez polimerizado el gel se colocó dentro de la minicámara vertical de electroforesis (E-C 120 Apparatus, Holbrook, NY) cubriendo el gel con el buffer de corrida Tris-glicina 1X. La preparación de la muestra del veneno consistió en agregar proporcionalmente la misma cantidad del buffer de carga a la cantidad de la muestra. Las muestras se mezclaron por inversión para lograr homogenizarlas y posteriormente se sometieron a ebullición por 3 min. para desnaturalizar las proteínas y facilitar su migración. Una vez que se prepararon las muestras se procedió a cargar el gel corriendo inicialmente a 80V por 10 min. para que las muestras entren al gel y después subiendo el voltaje a 100V hasta el término de la corrida. Una vez concluida la electroforesis se sacó el gel con cuidado y se sumergió en la solución de teñido de azul de Coomasie durante toda la noche y posteriormente se



depositó a la solución decolorante dejándose por un par de horas hasta observar las bandas de interés. Una vez decolorado el gel se procedió a secarlo utilizando una membrana de celofan (Bio-Rad, California, U.S.A).

### 5.4 Diseño de oligonucleótidos específicos para las subunidades menores y PCR virtual.

Para el diseño de oligonucleóticos específicos se utilizó la secuencia de aminoácidos de las subunidades menores de las Mirmexinas SS1, SS2 y SS3. Estas fueron traducidas a secuencias nucleotídicas utilizando la tabla de conversión de codones más utilizados de *Drosophila melanogaster* (Tabla 1) La secuencia nucleotídica obtenida de las subunidades SS1, SS2 y SS3 se describe en el ANEXO I.

UUU 13.1 (F)	UCU 6.8 (F)	UAU 10.7 (T)	UGU 5.3 (C)
UUC 21.8 (F)	UCC 19.6 (S)	UAC 18.4 (Y)	UGC 13.3 (C)
UUA 4.3 (L)	UCA 7.6 (S)	UAA 0.8 (OCH)	UGA 0.5 (OCH)
UUG 16.2 (L)	UCG 16.6 (S)	UAG 0.6 (AMB)	UGG 9.9 (T)
CUU 9.1 (L)	CCU 6.9 (P)	CAU 10.6 (H)	CGU 8.7 (R)
CUC 13.9 (L)	CCC 17.9 (P)	CAC 16.2 (H)	CGC 17.9 (R)
CUA 8.3 (L)	CCA 13.5 (P)	CAA 15.6 (Q)	CGA 8.5 (R)
CUG 38.7 (L)	CCG 16.0 (P)	CAG 36.8 (Q)	CGG 8.3 (R)
AUU 16.5 (I)	ACU 9.5 (T)	AAU 20.8 (N)	AGU 11.5 (S)
AUC 23.0 (I)	ACC 21.4 (T)	AAC 26.1 (N)	AGC 20.4 (S)
AUA 9.3 (I)	ACA 10.7 (T)	AAA 16.5 (K)	AGA 5.1 (R)
AUG 23.5 (M)	ACG 14.4 (T)	AAG 39.5 (K)	AGG 6.4 (R)
GUU 10.9 (V)	GCU 14.5 (A)	GAU 27.6 (D)	GGU 13.3 (G)
GUC 13.9 (V)	GCC 33.6 (A)	GAC 24.7 (D)	GGC 26.6 (G)
GUA 6.3 (V)	GCA 12.8 (A)	GAA 20.9 (E)	GGA 17.8 (G)
GUG 28.1 (V)	GCG 14.0 (A)	GAG 43.0 (E)	GGG 4.7 (G)

**Tabla I. Uso de codones de *Drosophila melanogaster*.** En donde se muestra el codón, la frecuencia expresada en porcentaje y el aminoácido que codifica. Instituto de investigación de DNA Kazusa Chiba, Japón ([http:// www.kazusa.or.jp/codon/](http://www.kazusa.or.jp/codon/)).

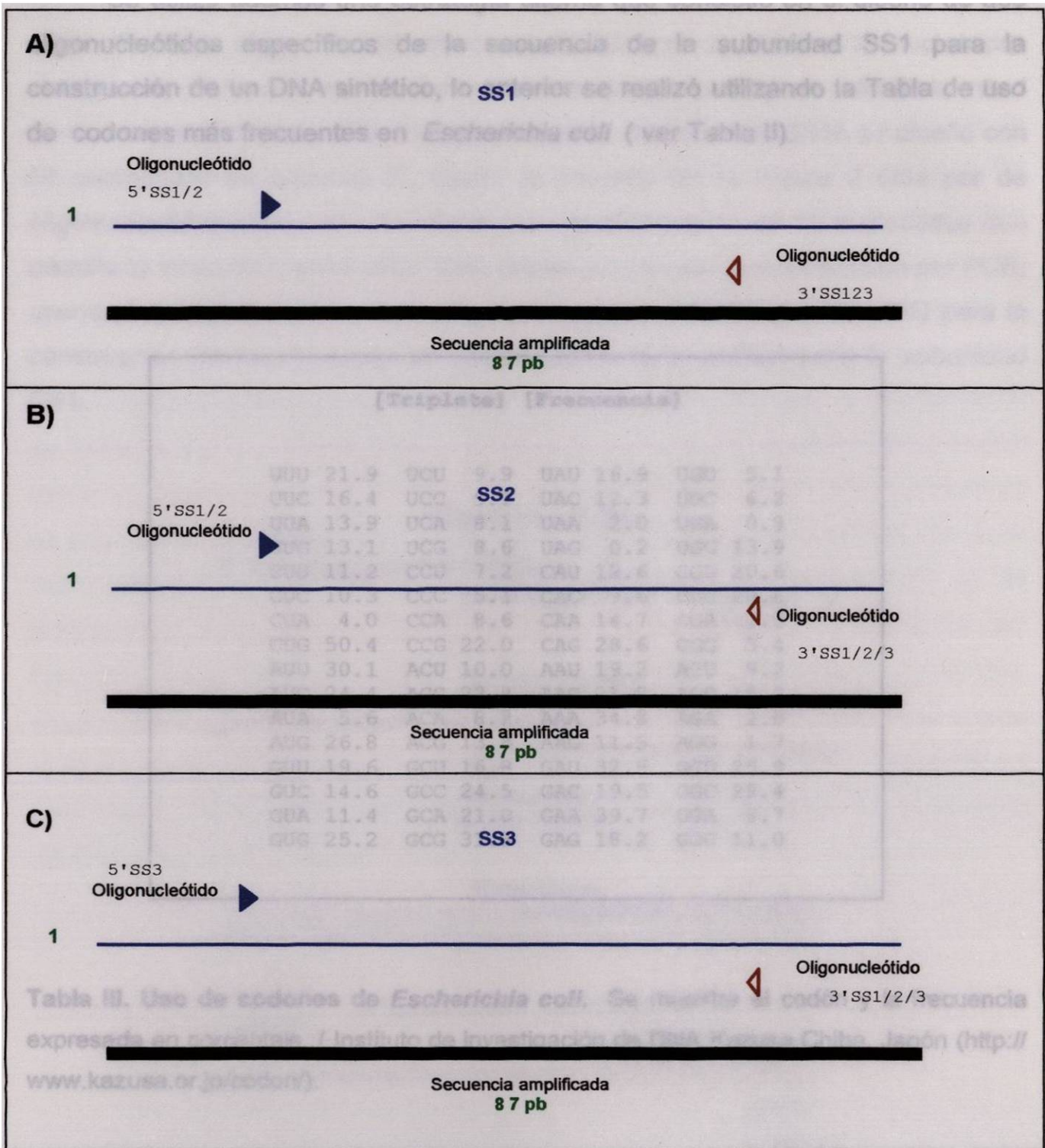
El diseño de los oligonucleótidos específicos para las subunidades se realizó utilizando las secuencias nucleotídicas 5' y 3' de las diferentes subunidades. Debido a que éstas secuencias están altamente conservadas, el mismo oligonucleótido 5' (SS1/2) fue útil para amplificar las subunidades SS1 y SS2. Lo mismo sucede en el caso del oligonucleótido del 3' (SS 1/2/3) que nos sirvió para amplificar las secuencias SS1, SS2 y SS3. Se utilizó el programa Oligo 4.0 para la determinación de la temperatura media de alineamiento (Tm) de cada uno de los oligonucleótidos. Las secuencias nucleotídicas de cada uno de los oligonucleótidos se describe en el ANEXO I y las características de los oligonucleótidos en longitud y Tms se muestran en la Tabla II.

Oligonucleótido	Longitud (nucleótidos)	Tm (°C)
5' SS1/2	19 nucleótidos	72.9
5' SS3	24 nucleótidos	71.8
3' SS1/2/3	21 nucleótidos	71.6

**Tabla II. Características de los oligonucleótidos diseñados.** Características de los oligonucleótidos diseñados para las subunidades menores de las Mirmexinas SS1, SS2 y SS3 en donde se muestra la longitud de los mismos y la Tm calculada.

Una vez obtenidos los oligonucleótidos específicos para cada una de las subunidades menores se utilizó el programa Amplify 1.2 para llevar a cabo una simulación virtual de la reacción de PCR. La Figura 1 muestra el PCR virtual en donde se observa el tamaño de los fragmentos calculados para cada una de las tres subunidades de 87 pb ( Fig. 1 A , B y C). La Figura 1 A corresponde a la amplificación de la subunidad SS1, en donde muestra que el oligonucleótido 5'

SS1/2 presenta un 100% de complementariedad y un 87% de estabilidad de complementariedad, mientras que el oligonucleótido 3'SS1/2/3 presenta un 91% de complementariedad y un 75% de estabilidad de complementariedad. La Figura 1B corresponde a la amplificación de la subunidad SS2 en donde muestra que el oligonucleótido 5' SS1/2 presenta un 100% de complementariedad y un 87% de estabilidad de complementariedad, mientras que el oligonucleótido 3'SS1/2/3 presenta un 91% de complementariedad y un 75% de estabilidad de complementariedad. Por último, se describe en la Figura 1 C la amplificación de la subunidad SS1, en donde muestra que el oligonucleótido 5' SS3 presentó un 100% de complementariedad y un 73% de estabilidad de complementariedad, mientras que el oligonucleótido 3'SS1/2/3 presentó un 91% de complementariedad y un 75% de estabilidad de complementariedad.



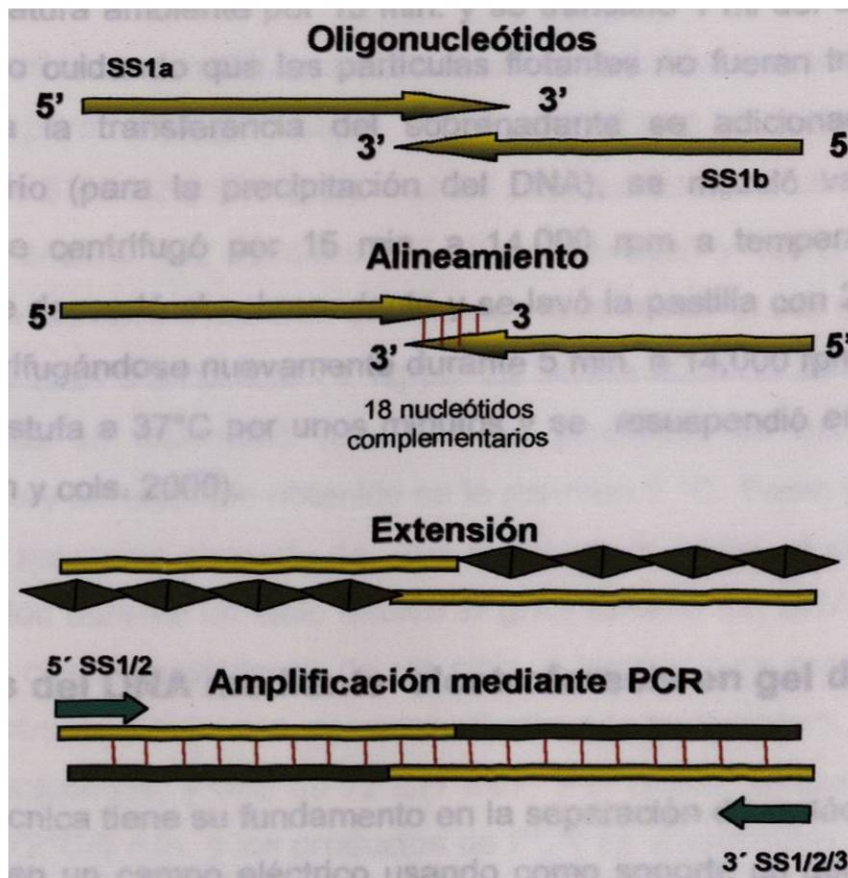
**Figura 1. PCR virtual de las subunidades menores de las Mirmexinas.** En este diagrama se presenta el resultado de la simulación virtual de PCR utilizando los oligonucleótidos 5' SS1/2, 5' SS3 y 3' SS1/2/3. SS1 (A), SS2 (B) y SS3 (C).

Se utilizó además una estrategia alterna que consistió en el diseño de dos oligonucleótidos específicos de la secuencia de la subunidad SS1 para la construcción de un DNA sintético, lo anterior se realizó utilizando la Tabla de uso de codones más frecuentes en *Escherichia coli* ( ver Tabla II).

[Triplete]		[Frecuencia]					
UUU	21.9	UCU	9.9	UAU	16.9	UGU	5.1
UUC	16.4	UCC	9.1	UAC	12.3	UGC	6.2
UUA	13.9	UCA	8.1	UAA	2.0	UGA	0.9
UUG	13.1	UCG	8.6	UAG	0.2	UGG	13.9
CUU	11.2	CCU	7.2	CAU	12.6	CGU	20.6
CUC	10.3	CCC	5.1	CAC	9.6	CGC	20.6
CUA	4.0	CCA	8.6	CAA	14.7	CGA	3.5
CUG	50.4	CCG	22.0	CAG	28.6	CGG	5.4
AUU	30.1	ACU	10.0	AAU	19.2	AGU	9.2
AUC	24.4	ACC	22.8	AAC	21.8	AGC	15.3
AUA	5.6	ACA	8.2	AAA	34.8	AGA	2.8
AUG	26.8	ACG	13.8	AAG	11.5	AGG	1.7
GUU	19.6	GCU	16.8	GAU	32.6	GGU	25.9
GUC	14.6	GCC	24.5	GAC	19.5	GGC	28.4
GUA	11.4	GCA	21.0	GAA	39.7	GGA	8.7
GUG	25.2	GCG	31.8	GAG	18.2	GGG	11.0

**Tabla III. Uso de codones de *Escherichia coli*.** Se muestra el codón y la frecuencia expresada en porcentaje. ( Instituto de investigación de DNA Kazusa Chiba, Japón (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)).

El primer oligonucleótido denominado SS1a se diseñó con 71 nucleótidos del extremo 5', lo que corresponde aproximadamente a un poco más de la mitad de la secuencia total de SS1. El oligonucleótido denominado SS1b se diseñó con 54 nucleótidos de extremo 3'. Como se muestra en la Figura 2 éste par de oligonucleótidos contienen una secuencia complementaria de 18 nucleótidos que permite la alineación entre ellos. Esta estrategia permite la amplificación por PCR, usando los oligonucleótidos previamente descritos (5' SS1/2 y 3' SS1/2/3) para la construcción de la secuencia de DNA sintética que codifica para la subunidad SS1.



**Figura 2. Diagrama de la estrategia alternativa.** En este diagrama se presenta de manera resumida la estrategia de construcción del DNA sintético de la subunidad SS1.

## **5.5 Obtención del DNA genómico de la hormiga *P. triplarinus***

Para la obtención de DNA genómico de *P. triplarinus* se utilizó la técnica de precipitación con cloruro de litio, la cual consistió en macerar con 200  $\mu$ l del buffer A, con 0.0072 g de la hormiga. Lo anterior se realizó usando un émbolo de plástico estéril, se adicionaron otros 200  $\mu$ l del buffer A y se continuó macerando por un par de minutos hasta que sólo quedaron las cutículas. La muestra se incubó a 65°C por 30 min., se adicionaron 800  $\mu$ l del buffer B y se mezcló por inversión varias veces incubándose durante 1 h a 4°C. (Este buffer permite la precipitación de proteínas así como la precipitación específica de RNA), se centrifugó a 14,000 rpm a temperatura ambiente por 15 min. y se transfirió 1 ml del sobrenadante en un tubo nuevo cuidando que las partículas flotantes no fueran transferidas. Una vez realizada la transferencia del sobrenadante se adicionaron 500  $\mu$ l de isopropanol frío (para la precipitación del DNA), se mezcló varias veces por inversión y se centrifugó por 15 min. a 14,000 rpm a temperatura ambiente. Finalmente se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 200  $\mu$ l de etanol al 70 % centrifugándose nuevamente durante 5 min. a 14,000 rpm., la pastilla se secó en la estufa a 37°C por unos minutos y se resuspendió en 25  $\mu$ l de agua miliQ (Sullivan y cols. 2000).

## **5.6 Análisis del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa**

Esta técnica tiene su fundamento en la separación de moléculas basada en su movilidad en un campo eléctrico usando como soporte un gel de agarosa en una solución amortiguadora de TBE 1X. Una vez polimerizado se depositó en una cámara de electroforesis, cubriéndolo con TBE 1 X. (Sealey, P.G y Southern, 1982).

Para la preparación de las muestra se tomaron 5  $\mu\text{l}$  del DNA obtenido y se mezclaron con 1  $\mu\text{l}$  de jugo azul 6X. Las muestras se depositaron en el gel se realizó la electroforesis a 80 V aproximadamente durante 10 min. para permitir la entrada de las muestras y después se incrementó a 100 V durante una hora. Los geles fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio (2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) durante 10 min. y el DNA se visualizó en un transiluminador de luz UV (Dinco & Rhenium Industries Ltd. Hi-Tech Technologies) usando un fotodocumentador con el programa Gel-PRO 3.1. para documentar las imágenes.

## **5.7 Amplificación mediante PCR de las subunidades menores**

Para realizar la amplificación se preparó un cocktail que contenía 2.5  $\mu\text{l}$  del buffer B 10X para PCR (Promega), 1.5  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 0.25  $\mu\text{l}$  de dNTPs, 1  $\mu\text{l}$  del oligonucleótido 5'SS1/2 ( 100 ng/ $\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  del oligonucleótido 3'SS1/2/3 (100 ng/ $\mu\text{l}$ ), 0.25  $\mu\text{l}$  de la enzima Taq polimerasa 5 U/ $\mu\text{l}$  (Promega) y 16.5  $\mu\text{l}$  de agua miliQ. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$  a la que se le agregó la cantidad de DNA a amplificar ( 2 ng/ $\mu\text{l}$ ). La temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos se determinó mediante un promedio de las Tms de cada oligonucleótido y al resultado obtenido se le restaron 5 °C. Como podemos ver en la Tabla III el programa consiste de una temperatura inicial desnaturalizante de 94°C /5 minutos durante un ciclo debido al gran tamaño del DNA genómico. Los siguientes 30 ciclos consistieron de un ciclo a temperatura desnaturalizante de 94°C/1 min., otro de 67°C/1min. correspondiente a la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos, y otro de 72°C/1 min. Por último, aplicamos un ciclo de extensión de 72°C/5 min. y los productos de PCR se visualizaron mediante geles de agarosa al 2%.



Temperatura (°C)	Tiempo (min.)	N° de Ciclos
94	5	1
94	1	30
67	1	30
72	1	30
72	5	1

**Tabla IV. Programa de PCR para la amplificación de las subunidades menores.** Se muestra el programa de PCR empleado con las temperaturas usadas, el tiempo en min. y el número de ciclos.

## **5.8 Clonación de los fragmentos obtenidos mediante PCR**

Para la clonación de los fragmentos amplificados se utilizaron las reacciones de PCRs recién preparadas. La ligación se realizó en un tubo eppendorf donde se colocaron 4  $\mu$ l del producto de PCR (aproximadamente 50 ng/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l de solución salina (NaCl 1.2M, MgCl<sub>2</sub> 0.06M), 1  $\mu$ l del vector pCR 2.1-TOPO (10 ng) el cual se encuentra unido covalentemente a la topoisomerasa (Invitrogen). La reacción se mezcló suavemente y posteriormente se incubó por 30 min. a temperatura ambiente. Una vez concluido el tiempo de incubación, se colocó el tubo en hielo para iniciar el proceso de transformación, el cual consistió

en descongelar una alícuota de *Escherichia coli* calcio competentes a la que se agregaron 2  $\mu\text{l}$  de la ligación y se mezcló suavemente dándole golpecillos e incubándolo en hielo por 30 min. Posteriormente se aplicó el choque térmico a las células por 30 seg. a 42°C e inmediatamente se colocó en hielo. El periodo de recuperación consistió en agregar 250  $\mu\text{l}$  del medio de SOC a temperatura ambiente e incubar durante 1 h. 37°C con agitación a 200 rpm. Después, se sembraron 50  $\mu\text{l}$  de las células transformadas en placas de LB conteniendo X-Gal (40 mg/ml) y 100  $\mu\text{g}$  de ampicilina. Estas se dejaron incubar toda la noche a 37°C y al siguiente día se seleccionaron 10 colonias blancas para el análisis de DNA mediante la técnica de minipreparación por lisis alcalina, (las colonias azules se descartaron ya que no contenían inserto).

## **5.9 Obtención del DNA plasmídico mediante minipreparación con lisis alcalina**

De las colonias obtenidas en las placas que de LB + Ampicilina se seleccionaron solamente las colonias blancas y se colocaron individualmente en un tubo de ensaye conteniendo 3 ml de LB con 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de ampicilina. Los tubos se dejaron crecer toda la noche mediante agitación a 37°C, al día siguiente se tomaron 1.5 ml del cultivo en un tubo eppendorf centrifugándose por 2 min a 14,000 rpm, se descartó el sobrenadante y se recuperó la pastilla, la cual se resuspendió en 150  $\mu\text{l}$  de la solución I. Esta se incubó durante 5 min. a temperatura ambiente y se agregaron 150  $\mu\text{l}$  de la solución II, mezclándose por inversión, y después se agregaron 150  $\mu\text{l}$  de la solución III incubándose durante 5 min. a -20°C. Posteriormente se centrifugó durante 5 min. a 14,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga agregándole 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol al 100% mezclándolo por inversión e incubando por 10 minutos a -20°C. Se centrifugó la muestra por 5 min. a 14,000 rpm, descartando el sobrenadante, se lavó la pastilla obtenida con 400  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% mediante

agitación con vórtex y posteriormente se centrifugó la muestra por 5 min. a 14,000 rpm dejando secar la pastilla a temperatura ambiente para finalmente resuspender en 20  $\mu$ l de agua miliQ con RNAasa (10 mg/ ml).

## **5.10 Caracterización del DNA plasmídico mediante digestión con *EcoRI***

Una vez obtenido el DNA se realizaron digestiones con la enzima *EcoRI* para liberar el inserto, para esto se tomaron 3  $\mu$ l del DNA (aproximadamente 100 ng/ $\mu$ l) obtenido y se le agregaron 7  $\mu$ l del cocktail que contenía 1  $\mu$ l de buffer 1X para la enzima de corte *EcoRI*, 0.3  $\mu$ l *EcoRI* 20 U/ $\mu$ l y 5.7  $\mu$ l del agua miliQ. La reacción se incubó durante 4 h a 37°C y se agregaron 2  $\mu$ l de jugo azul 6X para detener la reacción. Posteriormente, los productos obtenidos de la digestión se analizaron en un gel agarosa al 2% utilizando además marcadores específicos de peso molecular.

## **5.11 Determinación de la secuencia nucleotídica de las clonas positivas**

Para obtener la secuencia nucleotídica de las clonas positivas se prepararon 2  $\mu$ g del DNA mediante la técnica de minipreparación con lisis alcalina (Sambrook, *et al.*, 1989). El DNA fue purificado utilizando columnas de Qiagen. Para la secuenciación se utilizaron los oligonucleótidos (Reverse 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3' y Forward 5' G TAA AAC GAC GGC CAG 3') derivados del fago M13 marcados con un cromóforo IR-800 que es detectado por luz infrarroja utilizando la técnica descrita por Sanger en 1977. Se utilizó el secuenciador "DNA Sequencer Long reader 4200 Licor IR2 semiautomático" (LI-COR).

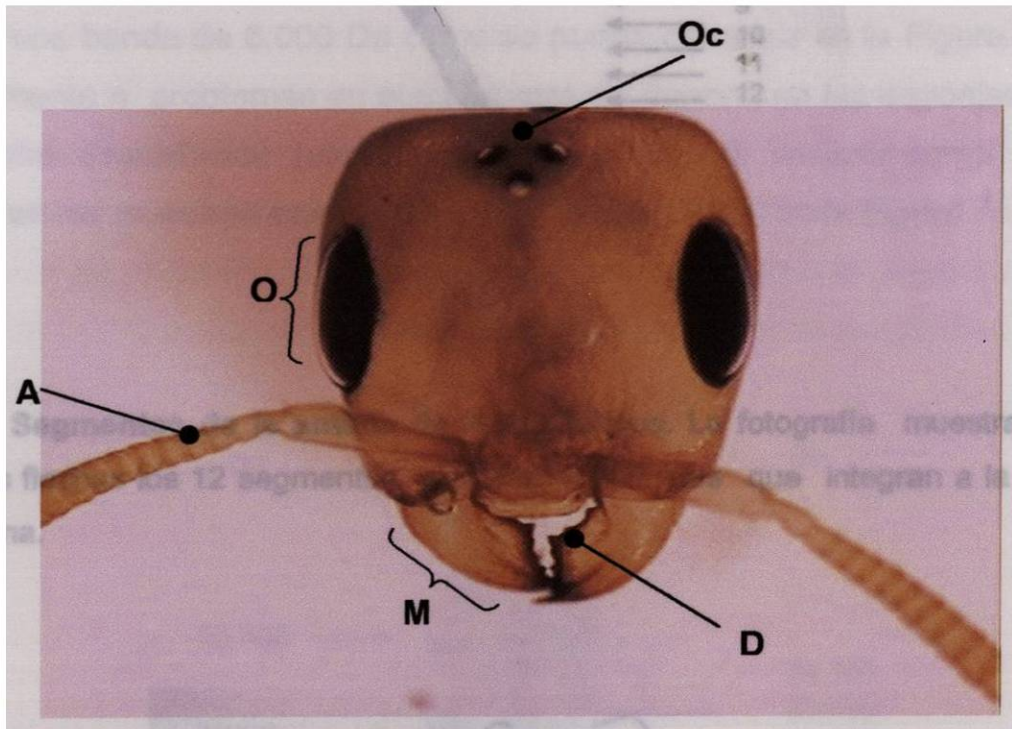
## 6. RESULTADOS

### 6.1 Caracterización morfológica de la hormiga *P. triplarinus*

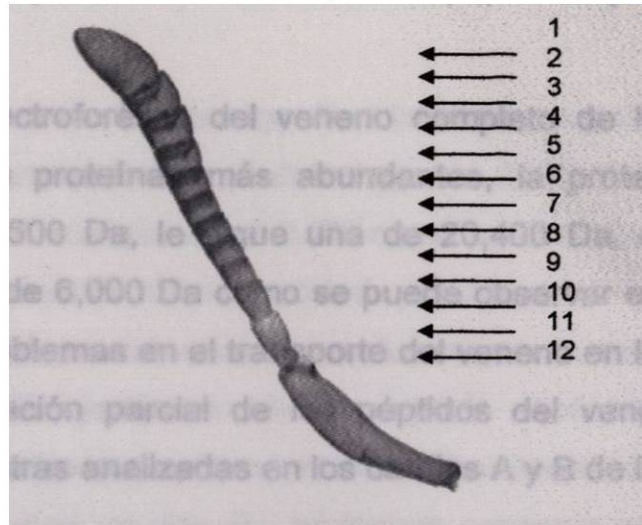
Las hormigas colectadas en Santa Cruz, Bolivia fueron analizadas confirmandose así que efectivamente pertenecían al género y especie *Pseudomyrmex triplarinus*. Lo anterior, se logró mediante la disección, montaje, medición y observación de las características morfológicas que presentaban varios especímenes. La clasificación se llevó mediante la utilización de las claves taxonómicas descritas por Ward, P.S, en 1999. La Figura 3 muestra el cuerpo completo de un espécimen de *P. triplarinus* en el que se puede observar la cabeza, tórax, abdomen, la presencia de ojos grandes ovalados, 12 segmentos que conforman las antenas, un postpecíolo bien desarrollado y el aguijón ó estilete característico. La Figura 4 muestra la cabeza de la hormiga en la que podemos observar la mandíbula integrada por 7 dientes o dentículas, ojos grandes ovalados con una longitud de 0.5 mm y correspondiendo aproximadamente 1/3 menos de la longitud de la cabeza que mide 1.5 mm de largo. También observamos los ocelos característicos localizados en la parte superior de la cabeza de esta especie. La antena presenta 12 segmentos característicos (ver Figura 5) y los componentes anatómicos de las patas muestran los segmentos tarsales, tibia, fémur y coxa. (Figura 6).



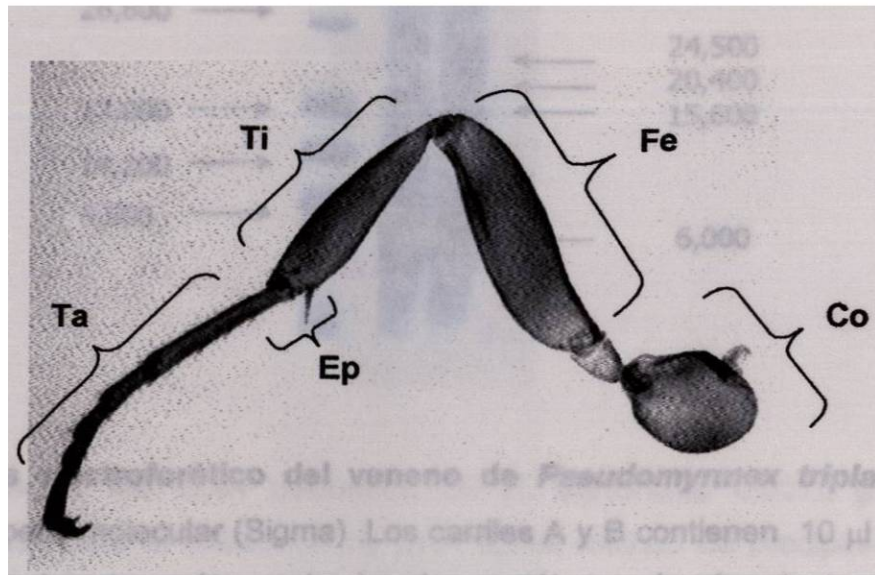
**Figura 3. Morfología de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus*.** Las hormigas se fijaron en una solución de glicerol:ácido acético (1:4) para su transporte y montaje en la solución de Faure's (Roberts D. B, 1998). La caracterización morfológica se realizó mediante observación y análisis de las estructuras de la hormiga en el microscopio estereoscópico usando las claves taxonómicas (Ward, P.S, 1999). Las imágenes se fotodocumentaron utilizando el programa Gel-Pro 3.1. Se indican estructuras como antena (A), ojo (O) , peciolo (P) y postpeciolo (Pp).



**Figura 4. Observación morfológica de la cabeza de *Pseudomyrmex triplarinus*. Las diferentes estructuras fueron disectadas de la hormiga y montadas en solución de Faure's para su observación y análisis. Se observan los ojos (o), grandes y ovalados, los ocelos (Oc) característicos en esta especie localizados en la región frontal superior, las antenas (A), la mandíbula (M) y los dientes (D).**



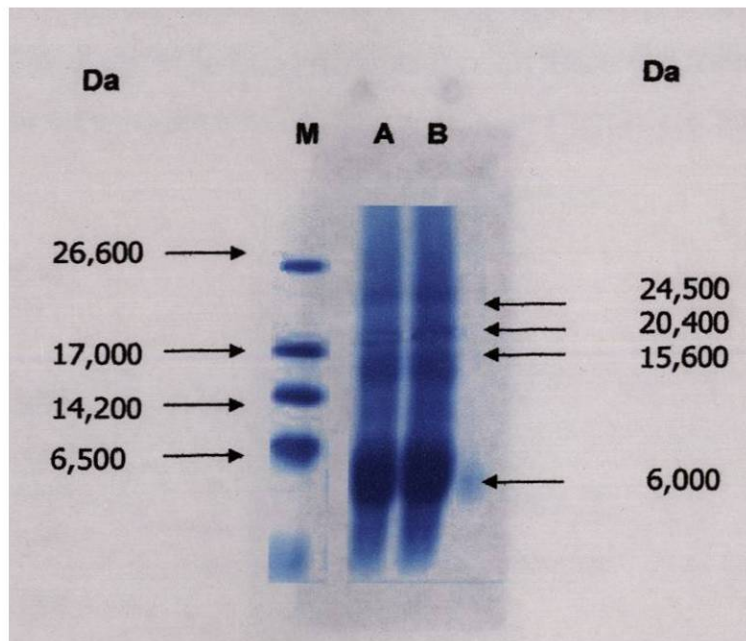
**Figura 5. Segmentos de la antena de *P. triplarinus*.** La fotografía muestra por cada una de las flechas los 12 segmentos claramente definidos que integran a la estructura de la antena.



**Figura 6. Estructura de la pata de *P. triplarinus*.** Se muestran las regiones que conforman la pata de la hormiga los segmentos tarsales (Ta), tibia (Ti), fémur (Fe), coxa (Co), y espuela pectinada (Ep) .

## 6.2 Componentes protéicos del veneno de *P. triplarinus*

El análisis electroforético del veneno completo de la hormiga mostró la presencia de cuatro proteínas más abundantes, la proteína de mayor peso molecular es de 24,500 Da, le sigue una de 20,400 Da, otra de 15,600 Da y presenta una banda de 6,000 Da como se puede observar en la Figura 7. Debido probablemente a problemas en el transporte del veneno en las esponjas de teflón se encontró degradación parcial de los péptidos del veneno como se puede observar en las muestras analizadas en los carriles A y B de la Figura 7.

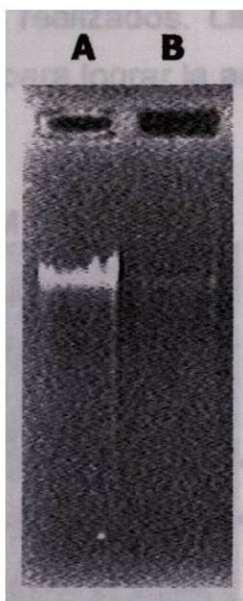


**Figura 7. Análisis electroforético del veneno de *Pseudomyrmex triplarinus*. M = Marcador de bajo peso molecular (Sigma) .Los carriles A y B contienen 10  $\mu$ l (A) y 15  $\mu$ l del veneno (B). Se detectaron las cuatro bandas protéicas más abundantes del veneno siendo la de menor peso molecular la más prominente (6,000 Da).**



### 6.3 Análisis del DNA genómico de *P. triplarinus*

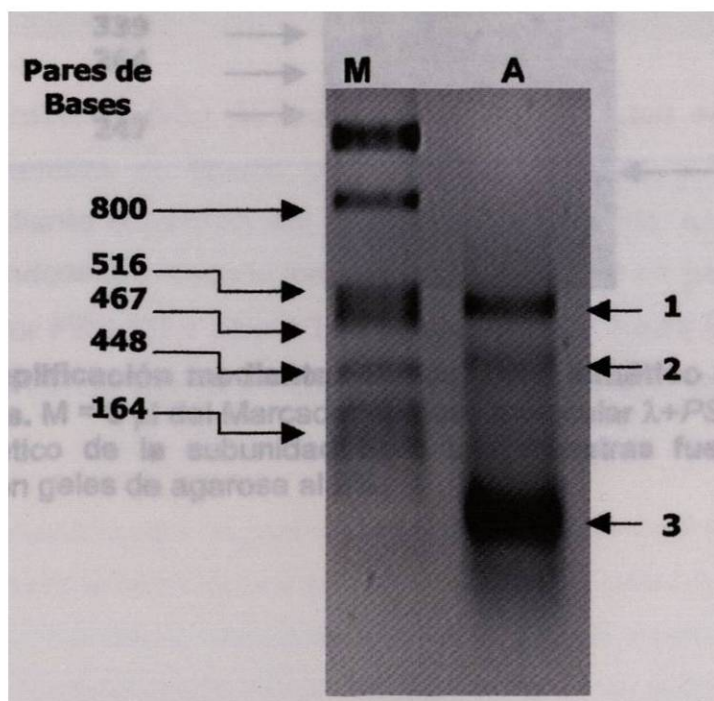
El DNA genómico de la hormiga *P. triplarinus* obtenido por el método de precipitación con Cloruro de litio (Sullivan y cols.,2000) fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% como se observa en la Figura 8. Los DNA obtenidos mostraron buena calidad prácticamente sin degradación. La concentración del DNA en todos los casos fué menor cuando se comparó con el testigo positivo (DNA genómico de *Drosophila melanogaster*). Lo anterior, probablemente es debido a que la extracción del material biológico de la hormiga presentó mayor dificultad ya que *P. triplarinus* presenta un exoesqueleto muy duro en comparación con la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*).



**Figura 8.** Obtención del DNA genómico de *P. triplarinus* 0.0072 g de material biológico fué usado para la extracción de DNA por el método de precipitación de LiCl<sub>2</sub> (Sullivan y cols., 2000). Los DNAs obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. A) 5µl del DNA de *D. melanogaster* y B) 5µl del DNA de la hormiga *P. triplarinus*.

## 6.4 Fragmentos amplificados mediante PCR

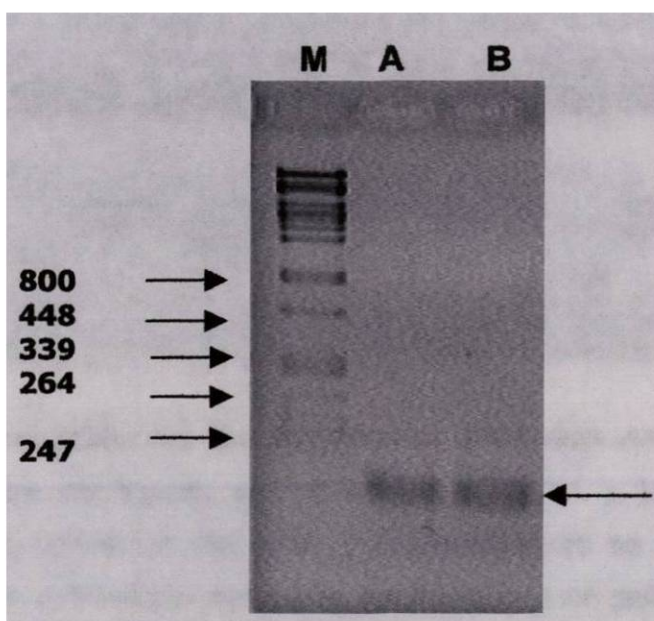
El DNA genómico de *P. triplarinus* fue amplificado mediante PCR utilizando los oligonucleótidos que previamente diseñamos para las subunidades de la SS1, SS2 y SS3. Los resultados mostraron 3 bandas de amplificación, una 516 pb (flecha 1) otra de 448 pb (flecha 2) y una banda menor de 100 pb (flecha 3) como se observa en la Figura 10 carril A. Los resultados anteriores corresponden solamente a la amplificación correspondiente a las subunidades SS1 y SS2 a las cuales se les realizó gradiente para poder identificar bien la temperatura de amplificación y una vez identificado se diseño el programa de PCR. Para la amplificación de la subunidad SS3 se realizaron gradientes de temperatura para lograr establecer las condiciones óptimas de amplificación, sin embargo no se obtuvo éxito con los experimentos realizados. La falta de material biológico no permitió diseñar más experimentos para lograr la amplificación de la SS3.



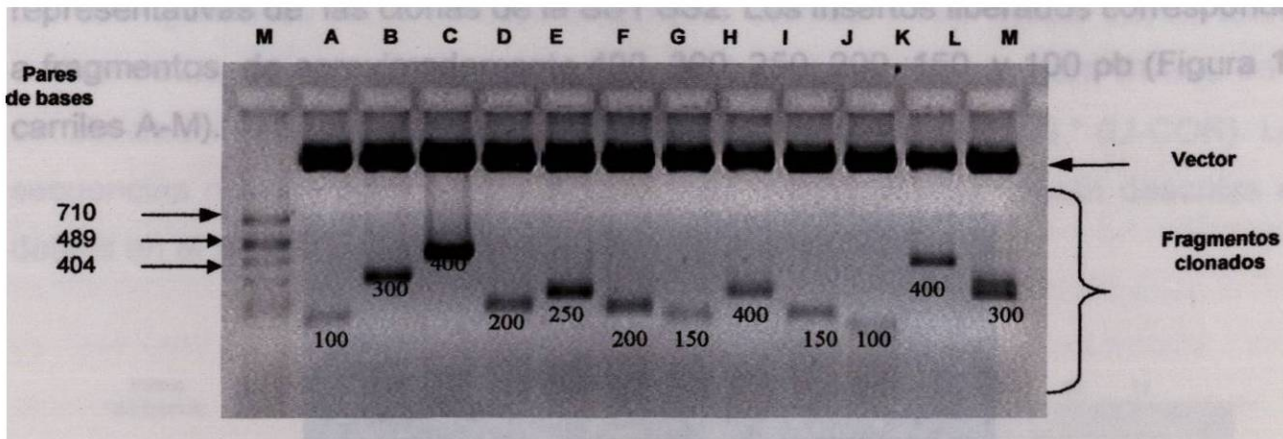
**Figura 9. Amplificación mediante PCR de las subunidades SS1 y SS2 de las Mirmexinas. M = 8  $\mu$ l del Marcador de peso molecular  $\lambda$ +PST / A = 5  $\mu$ l del producto de**

PCR de las subunidades SS1 y SS2. Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

En la estrategia alternativa una vez que se realizó el alineamiento de los oligonucleótidos SS1a y SS1b se llevó a cabo la pre-polimerización de estos para así obtener nuestro DNA sintético y una vez polimerizado se realizó el PCR utilizando los oligonucleótidos 5'SS1/2 y 3'SS1/2/3 en donde se obtuvo como resultado un fragmento aproximado de 100 pb como se había predecido. (Figura 11A y B)



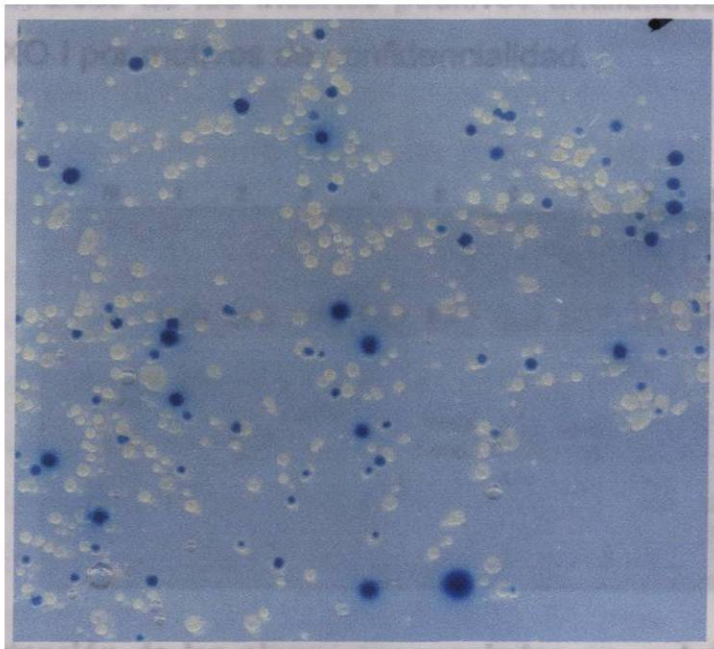
**Figura 10. Amplificación mediante PCR del DNA sintético de la subunidad SS1 de las Mirmexinas. M = 8  $\mu$ l del Marcador de peso molecular  $\lambda$ +PST I, A y B = 5  $\mu$ l del PCR del DNA sintético de la subunidad SS1. Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.**



**Figura 12. Caracterización de los fragmentos clonados en el vector pCR 2.1** Los fragmentos obtenidos se ligaron con el vector pCR 2.1 y las clonas resultantes se analizaron mediante obtención del DNA y posteriormente se digirieron con la enzima *EcoRI* observándose el resultado mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%. M = 8µl del marcador PBS SK + *Msp I*. Los carriles de la A hasta la M muestran el resultado de 12 de las 49 clonas que se analizaron así como el tamaño de los fragmentos liberados.

## 6.5 Fragmentos clonados en el vector pCR 2.1

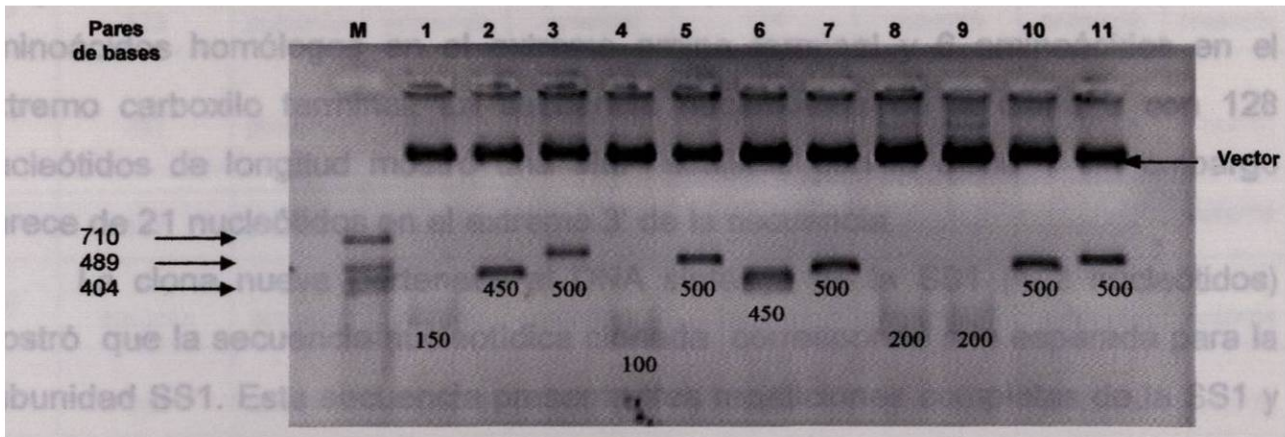
Los productos de PCR obtenidos se clonaron en el vector pCR 2.1 (Invitrogen). Se obtuvieron un total de 49 clonas blancas (probablemente inserto) Figura 11 las cuales 41 clonas pertenecían a los fragmentos obtenidos de la amplificación de la subunidad SS1 y SS2, las 8 restantes eran del DNA sintético de la SS1. Estas clonas fueron analizadas mediante obtención del DNA plasmídico y digestión con la enzima *EcoRI*. En la Figura 12 se muestran 12 preparaciones representativas de las clonas de la SS1 SS2. Los insertos liberados corresponden a fragmentos de aproximadamente 400, 300, 250, 200, 150 y 100 pb (Figura 12, carriles A-M).



**Figura 11. Aspecto de las clonas positivas obtenidas con el vector pCR 2.1.** En esta imagen se observa la morfología y el color en donde resaltan las clonas blancas positivas, en comparación con las clonas azules que no contienen inserto.

## 6.6 Secuencias nucleotídicas de los insertos analizados

Para la determinación de la secuencia nucleotídica de los 49 insertos positivos se seleccionaron 7 clonas de las subunidades SS1 y SS2 y una clona del DNA sintético de la subunidad SS1. El criterio de selección usado fué el tamaño de los fragmentos obtenidos. Como se esperaba un fragmento de 87 pb seleccionamos las clonas con insertos de aproximadamente 100, 400 y 500 pb ó tamaños muy cercanos, ya que muy probablemente podrían amplificarse intrones del DNA genómico de la hormiga (Figura 13 carriles 1-11). Estas clonas fueron secuenciadas usando el oligonucleótido del fago M13 marcado con IR-800 en el secuenciador semiautomático "DNA Sequencer Long reader 4200 " (LI-COR). Las secuencias nucleotídicas de los insertos positivos analizados están descritas en detalle en el ANEXO I por motivos de confidencialidad.



**Figura 13 Caracterización de las clonas secuenciadas en gel de agarosa al 2%.** El DNA de las clonas seleccionadas se preparó mediante minipreparación y se digirió con la enzima *EcoRI*. Aquí se observan los fragmentos de restricción correspondientes a las clonas que se analizaron mediante secuenciación. M = 8  $\mu$ l del marcador PBS SK + *MspI*. Los carriles de 1 al 11 muestran el tamaño de los fragmentos correspondientes a las clonas secuenciadas. De todas las clonas la única que pertenece al DNA sintético es la clona del carril número 7.

El análisis de las secuencias nucleotídicas consistió en identificar si la secuencia contaba con los sitios 5' *EcoRI* donde fue clonado en el vector, las secuencias del vector pCR 2.1, el oligonucleótido 5'SS1/2, el inserto de interés, y el oligonucleótido 3'SS1/2/3. Una vez encontrados los elementos mencionados, se procedió a identificar el inserto clonado entre los oligonucleótidos para verificar si contenía la secuencia codificante para las subunidades SS1 o SS2. La Tabla V, nos muestra un resumen de las características encontradas en las nueve secuencias nucleotídicas analizadas. Algunas de estas solamente presentaban dos o tres elementos que debería tener la secuencia por lo que están incompletas (clonas 2-8) Tabla V. De las nueve secuenciadas solamente 2 clonas presentaron todas las características esperadas:

La clona número 1 de 150 nucleótidos presenta una similitud de 19 nucleótidos al extremo 5' y 21 nucleótidos en el extremo 3'. La secuencia nucleotídica interna de 110 nucleótidos no corresponde a lo esperado para la SS1 ya que esta secuencia codificaría para una proteína de 50 aminoácidos con 6 aminoácidos homólogos en el extremo amino terminal y 6 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal. La secuencia nucleotídica de la clona 3 con 128 nucleótidos de longitud mostró una alta similitud con la clona 1 sin embargo carece de 21 nucleótidos en el extremo 3' de la secuencia.

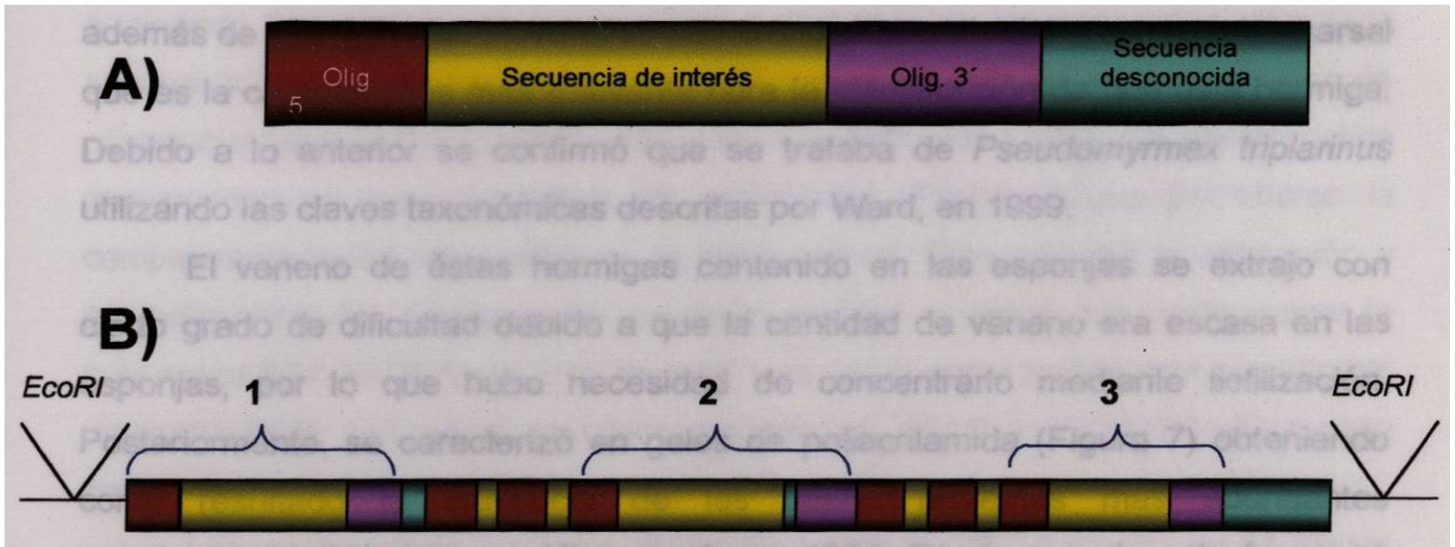
La clona nueve pertenece al DNA sintético de la SS1 (402 nucleótidos) mostró que la secuencia nucleotídica clonada corresponde a la esperada para la subunidad SS1. Esta secuencia presenta tres repeticiones completas de la SS1 y cuatro secuencias repetidas del oligonucleótido 5' más 7 nucleótidos de la secuencia de interés como se observa en la Figura 14 A. La primera secuencia (1) presentó un cambio del nucleótido de adenina a timina en la posición 59 (Figura 14 B), la segunda secuencia (2) es idéntica a la secuencia nucleotídica esperada para la subunidad SS1(Figura 14 B) y la última repetición de la secuencia nucleotídica número tres resultó truncada en 6 nucleótidos al extremo 3' ( Figura 14 B).

# Clona	Longitud del. Inserto (nucleótidos)	Sitio <i>EcoRI</i> 5'	Secuencia del vector 5'	Secuencia del oligo 5' SS1/2	Secuencia interés (nucleótidos)	Secuencia del oligo 3' SS1/2	Secuencia del vector 3'	Sitio <i>EcoR</i> 3'
1	150	presente	presente	presente	110	presente	presente	presente
2	99	presente	presente	ausente	57	Se repite 2 veces	ausente	ausente
3	128	presente	presente	presente	108	ausente	presente	presente
4	117	presente	presente	presente	33	Se repite 6 veces	presente	ausente
5	128	presente	presente	ausente	114	ausente	presente	presente
6	281	presente	presente	Se repite 5 veces	ausente	Se repite 5 veces	ausente	presente
7	154	presente	presente	presente	No determinado	ausente	ausente	ausente
8	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
9	402	presente	presente	presente	340	presente	presente	ausente

**Tabla V. Resumen de los resultados de las clonas analizadas.** En este resumen se muestra cada una de las clonas analizadas en sus secuencias nucleotídicas con las características respectivas encontradas en las secuencias.



## Características de la secuencia



### Secuencia del DNA sintético

**Figura 14. Diagrama correspondiente a la clona número 9 del DNA sintético.** A) El diagrama ejemplifica el patrón de la secuencia que mostró la clona del DNA sintético repetido tres veces. La región 1 representa la primer secuencia analizada que corresponde a la SS1 (secuencia de interés) la cual posee un cambio de nucleótido de adenina a timina de la secuencia original. La región 2 es la secuencia nucleotídica idéntica a la esperada para la subunidad SS1. La región 3 corresponde a una secuencia truncada de la SS1.

## 7.- DISCUSIÓN

El análisis y observación de la morfología de la hormiga colectada en Santa Cruz, Bolivia (Figura 3) efectivamente pertenece al género esperado debido a que presenta el pecíolo y postpecíolo característico del género *Pseudomyrmex* además de ojos grandes y ovalados así como la ausencia del surco metabasitarsal que es la característica más relevante para la identificación de que ésta hormiga. Debido a lo anterior se confirmó que se trataba de *Pseudomyrmex triplarinus* utilizando las claves taxonómicas descritas por Ward, en 1999.

El veneno de éstas hormigas contenido en las esponjas se extrajo con cierto grado de dificultad debido a que la cantidad de veneno era escasa en las esponjas, por lo que hubo necesidad de concentrarlo mediante liofilización. Posteriormente, se caracterizó en geles de poliacrilamida (Figura 7) obteniendo como resultado la presencia de las cuatro proteínas más abundantes anteriormente descritas por Hink y cols en 1994. Por lo que de esta forma se confirmó que efectivamente el veneno obtenido corresponde a la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus*.

La extracción del DNA genómico de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus* analizado en geles de agarosa al 0.8% mostró buena calidad electroforética comparado con el de *Drosophila melanogaster* (Figura 8). La cantidad de DNA que se obtuvo fue baja debido a que se utilizó poca cantidad del material biológico de la hormiga y que ésta hormiga presenta un exoesqueleto muy duro lo cual dificultó el proceso de extracción y no se disponía de más material biológico para realizar más extracciones adicionales.

Una vez que se obtuvo el DNA genómico de *Pseudomyrmex triplarinus* se realizó una amplificación mediante PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados para las tres subunidades SS1, SS2 y SS3. De las tres subunidades solamente se logró amplificar una utilizando los oligonucleótidos diseñados para ambas subunidades SS1 y SS2. La secuencia de la subunidad SS3 no se logró amplificar aunque se realizaron dos gradientes de temperatura para determinar cuales podrían ser las condiciones óptimas para la amplificación. Los resultados

obtenidos correspondientes a la amplificación de las subunidades SS1 y SS2 mostraron la presencia de tres fragmentos de aproximadamente 516, 448 y 100 pb, los cuales presentaban una clara resolución y abundancia en su análisis mediante electroforesis en geles de agarosa (Figura 9). Las diferencias de tamaño mostradas sugieren que estas secuencias pudieran codificar para intrones originando fragmentos con mayor número de bases de las esperadas, ya que la secuencia de interés correspondía a 87 pb. A la par se diseñó un par de oligonucleótidos largos correspondientes a la subunidad SS1. La característica que poseen es que comparten 18 nucleótidos (Figura 2) que permitieron la complementariedad entre ellos en la parte central. Esto permitió la alineación y pre-polimerización dando como resultado un DNA sintético que codifica para la subunidad SS1. El DNA sintético de la SS1 se utilizó como molde para amplificarlo mediante PCR utilizando los oligonucleótidos 5' SS1/2 y 3' SS1/2/3 obteniendo como resultado un fragmento de 87 pb como se esperaba.

Los productos de PCR clonados con el vector pCR 2.1 mostraron 41 clonas positivas para la subunidad SS1 y 8 clonas para el DNA sintético de la SS1. Todas ellas eran blancas, lo cual nos indicaba que se trataba de clonas positivas (Figura 11). Al liberar el inserto mediante digestión con la enzima *EcoRI* todas las clonas analizadas mostraron fragmentos de distintos tamaños que se encuentran en el rango de 100 a 500 pb (equivalentes a los tamaños obtenidos mediante PCR). Las diferencias de tamaño presentadas por estos insertos se explicaría debido a que los oligonucleótidos hubieran detectado regiones complementarias de secuencias en diferentes partes del genoma de la hormiga lo que nos indicaría que pudieran existir diferentes genes que codifican para estas subunidades. Las secuencias codificantes de estos pueden ser procesados de diferentes manera por ejemplo la eliminación de posibles intrones o la modificación post-traducciona de los péptidos, lo que explicaría que los péptidos de las subunidades menores no incluyan el aminoácido metionina al inicio de la cadena. De las clonas positivas secuenciadas: en la clona número uno se identificaron los fragmentos que se esperaban encontrar, es decir, los sitios de restricción para la enzima *EcoRI* tanto en el extremo 5' como para el extremo 3', también se encontraron los

oligonucleótidos de los extremos 5' y del 3' y una secuencia intermedia de 110 nucleótidos. En el análisis de esta secuencia se realizó una búsqueda de secuencias complementaria en el banco de genes National Center for Biotechnology Information (NCBI) con la idea de determinar si estas secuencias pudieran tener similitud con algún gene conocido. Como resultado de esta búsqueda se localizaron varias secuencias que coincidieron con la secuencia (detalles ANEXO I), del gene del exoesqueleto de *Drosophila melanogaster* con un 60 % de similitud en la región del extremo 5' de la secuencia clonada. Esta secuencia además, se analizó en relación a los aminoácidos que codificaría en los tres marcos de lectura posibles, tratando de encontrar una similitud con los aminoácidos descritos para la subunidad SS1 (Pan y Hink, 2000 ). Sin embargo no pudimos encontrar ninguna secuencia correspondiente a la subunidad SS1 (solamente los 12 aminoácidos del extremo 5' y 3' respectivamente). Por otro lado, tenemos pendiente de secuenciar 32 clonas de entre las cuales seguramente alguna de ellas contendrá la información relevante.

Las clonas número 2 a la 8 no presentaron todas las secuencias marcadoras básicas, en algunas falta el sitio *EcoRI* o el oligonucleótido ya sea el 5' o 3', y en algunos de los casos no se pudo identificar ningún elemento por lo que resulta imposible delimitar la secuencia de interés. (Tabla V).

Con respecto a la secuencia de la clona número nueve contiene la secuencia nucleotídica esperada de la subunidad SS1, sin embargo como se muestra en la Figura 14 presenta algunas repeticiones. No existe una explicación clara que nos permita saber porque presentó este patrón de repetición simultanea de la secuencia con dos secuencias completas de SS1 y una truncada en seis nucleótidos. Estos resultados deberán ser confirmados con el análisis de mayor número de clonas positivas correspondientes al DNA sintético que están disponibles actualmente para su análisis.

## 8.- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permitieron concluir lo siguiente:

- Identificar la identidad taxonómica de la hormiga de *Pseudomyrmex tnplannus* colectada en Santa Cruz, Bolivia.
- Verificar electroforéticamente los componentes protéicos del veneno de la hormiga *P. triplarinus*.
- Amplificar mediante PCR la secuencia que codifica para la subunidad menor SS1 de las Mirmexinas del veneno de la hormiga *P. triplarinus*.
- Clonar la secuencia nucleotídica que codifica a la subunidad menor SS1 en el vector pCR 2.1
- Confirmar la secuencia nucleotídica para la subunidad SS1 de las Mirmexinas.

La clonación de la secuencia nucleotídica que codifica para la subunidad menor SS1 mediante el PCR abre la posibilidad a mediano plazo para producir éste péptido en condiciones controladas en el laboratorio así como para caracterizar su actividad funcional en el tratamiento de Artritis Reumatoide.

## 9. APÉNDICE

### 9.1 Preparación de Soluciones

#### Preparación de 500 ml de SDS 10%

Pesar 50 g de SDS y disolver en 450 ml de agua destilada, calentar a 68°C para una mejor disolución de los componentes ajustar el pH a 7.2 agregando unas gotas de HCl concentrado. Ajustar el volumen a 500 ml.

#### Tris-Glicina 5X

Pesar 15.1 g de Tris-base, disolver en 500 ml de H<sub>2</sub>O d, agregar 94 g de Glicina, agregar 50 ml de SDS 10%.

#### Tris-HCl pH 6.8, 1.5 M

Pesar 36.33 g de Tris base en 100 ml de H<sub>2</sub>O d ajustar el pH 6.8 con HCl concentrado y aforar a 200 ml con H<sub>2</sub>O d. Esterilizar mediante la autoclave.

#### Tris-HCl pH 8.8, 1.5 M

Pesar 36.33 g de Tris base en 100 ml de H<sub>2</sub>O d ajustar el pH 8.8 con HCl concentrado y aforar a 200 ml con H<sub>2</sub>O d. Esterilizar mediante la autoclave.

#### Buffer A

		De stock (para 10 mL)
Tris HCl (pH 7.5)	0.1 M	1 mL (1M)
EDTA	01. M	2 ml (0.5M)
NaCl <sub>2</sub>	0.1 M	0.058 g
SDS	0.5 %	0.05 g

#### Buffer B

		Del stock (para 14 mL)
KOAc 5 M	4 mL	[ 4.9 g en 10 mL ( 5M ) ]
LiCl <sub>2</sub>	10 ml	[ 2.54 g en 10 mL ( 6 M ) ]

### Solución I

50 mM glucosa  
25 mM Tris-Cl (pH 8.0)  
10 mM EDTA (pH 8.0)

### Solución II

0.2 N NaOH  
1 % SDS

### Solución III

5 M Acetato de Potasio	60 ml
Ac. Acético Glacial	11.5 ml
H <sub>2</sub> O	28.5 ml

### Medio LB (Luria-Bertani)

Para 1 L.:

Triptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	10 g

### Preparación de PSA 10%

Pesar 10 g de PSA y aforar a 100 ml con agua destilada.

### Buffer de carga 2 X

Tris-HCl 100mM pH 6.8,  
1% SDS,  
4% 2- Mercaptoetanol,  
0.02% de Azul G Brillante,  
24% Glicerol

### TBE 5X (1 L)

Tris Base	54.0 g
Ácido Bórico	27.5 g
0.5 EDTA (pH 8.0)	20 ml

### Jugo azul 6X

0.25% Azul de Bromofenol  
0.25% Xilencianol  
30% Glicerol en agua.

### Medio SOC

1 % triptona  
0.5 % extracto de levadura  
1 % NaCl  
20 mM de glucosa

### Solución decolorante

Metanol	400 ml	200 ml
Ac. Acético	70 ml	35 ml
Aforar con H <sub>2</sub> O d	1 L	500 ml

### Azul de Coomasie Brillant

Brillant Blue	1.25 g	0.625 g
Metanol	227 ml	113.5 ml
Ac. Acético	46 ml	23 ml
Aforar con H <sub>2</sub> O d	500 ml	250 ml



## 10. LITERATURA CITADA

1. Altman, R.D., Schultz, D.R., Brown, H.E., and Collins, B.(1982). Pseudomyrmex-derived Venom polysaccharide in therapy of rheumatoid arthritis. 8th Pan American Cong. Rheumatol. (Abst.)
2. Altman, R.D., Schultz, D.R., Collins-Yudiskas, B., Aldrich, J., and Brown, H.E.(1984) The effects of a partially purified fraction of ant venom in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* pp 27, 277-285.
3. Astorga, G.P. (1992) Efecto del veneno de la hormiga en pacientes con artritis reumatoide VII Natl. Portuguese Congr. Rheumatology, Lisbon, Portugal.
4. Blum, M. S., and Hermann, H. R. (1978). Venoms and venom apparatuses of Formicidae: Myrmeciinaes, Ponerinae, Dorylinae, Pseudomyrmecinae, Myrmicinae, and Formicinae. In *Hand book of Experimental Pharmacology*, Vol. 48, Chap. 25, S. Bettini (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 801-859.
5. Burgos and Vargas, (1993) The effect of ant extract of the venom of *Pseudomyrmex triplarinus* in active Rheumatoid arthritis. Fifth Interscience World Conference on inflammation, Antirheumatics Analgesics, Immunomodelators. Geneve(Switzerland) Palexpo 25-28 April
6. Habermann, E., (1971). Some general rules governing fate and action of polypeptide and protein drugs, as derived from investigations with staphylococcal alpha-toxin, tetanus toxin, and so-called crotoxin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmakol.*;269(2):124-35.

7. Hink, W. F. Jaworski D.C, and Pappas, P.W., (1994) Partial Biochemical Characterization of venom from the ant *Pseudomyrmex triplarinus*. *Toxicon*, 32, pp 763-772.
8. Holzmann. G. (1981). United States Patent 4, 247, 540.
9. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
10. Landsbury, J., (1958) Report of a three- year study on the systemic and articular indexes in rheumatoid arthritis: theoretical and clinical consideration. *Arthritis Rheum* 1:505-522.
11. Pan, J and Hink., W.F (2000) Isolation and characterization of myrmexins, six isoforms of venom proteins with anti-inflammatory activity from the tropical ant *Pseudomyrmex triplarinus*. *Toxicon* 38, pp 1403-1413.
12. Roberts D. B, (1998) *Drosophila a practical approach*. Second Edition, Oxford University Press, United States, pp 198.
13. Ropes, M. S., Bennett, G. A., Cobbs, S., Jacox, R., and Jessar, R. A. (1958). Revision of diagnostic criteria for rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 18: 49-53.
14. Sambrook J. Fritsch E. F. Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, United States of America pp E.5 – 11.28.
15. Sealey, P.G. and Southern, E. M. (1982) Electrophoresis of DNA, in *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach* (Rickwood, D. and Hames B. D., eds.) IRL Oxford, UK, pp 39-76.

16. Sanger, F.S. Nicklen y A. Coulson, (1977) DNA Sequencing with chain terminating inhibitor, Proceedings of the National Academy of Science, Estados Unidos, Volumen.74, pp 5463-5467.
17. Schmidt, J.O., Blum, M. S and Overal, W.L (1986) Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. Toxicon, pp 29, 907-921.
18. Schultz, D.R and Arnold, P. I. (1984) Immunochemical and clinical studies of venom from ant *Pseudomyrmex* sp. In: Handbook of Natural Toxins, Vol.2, Insect Poisons, Allergens and Other Invertebrate Venoms, pp. 243-290 (TU. A. T., Ed). New York: Marcel Dekker.
19. Sullivan, W., M. Ashburner, R. Scott Hawley (2000) *Drosophila* Protocols, Quick Genomic DNA Prep, Cold Spring Harbor Laboratory Pres., N.Y. pp 431.
20. Ward, P.S. (1985) The Nearctic species of the genus *Pseudomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Quaestiones Entomologicae* 21: 209-246.
21. Ward, P.S. (1991) Phylogenetic analysis of pseudomyrmecine ants associated with domatia-bearing plants. Pp. 335-352 in Huxley, C.R., Cutler, D.F. (eds.) Ant-plant interactions. Oxford University Press, xviii + 601pp.
22. Ward, P.S. (1993) Systematic studies on *Pseudomyrmex* acacia-ants (Hymenoptera: Formicidae: Pseudomyrmecinae). *J. Hym. Res.* 2: 117-168.
23. Ward, P.S. (1999) Systematics, biogeography and host plant associations of the *Pseudomyrmex viduus* group (Hymenoptera: Formicidae), *Triplaris* – and *Tachigali* – inhabiting ants. *Zoological Journal of the Linnean Society* 126: 451-540).

24. Wheeler, W. M. (1942) Studies of neotropical ant – plants and their ants. Harvard Bull. Mus. Comp. Zool. 90:41-65.
25. Winter, C.A., Risley, E.A., and Nuss, G.W. (1962) Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Exptl. Biol.* 111, 544-546.

