

Análisis evolutivo de insectos transgénicos de la especie *Rhodnius prolixus* en el tratamiento de la enfermedad de Chagas

SERGIO HERNÁNDEZ CHARPAK Y NANCY RUIZ URIBE

Biología Sintética. Departamento de Física. Universidad de los Andes

[Fecha de entrega: Mayo 22 de 2015]

May 22, 2015

1 Introducción

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es una enfermedad parasitaria tropical causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. Afecta a mamíferos y humanos y es transmitida por un insecto triatomino del género *Rhodnius prolixus*. Ataca el sistema nervioso, el sistema digestivo y el corazón y hoy en día mueren 50 000 personas al año debido a esta enfermedad (Bonney, 2014). Dado que no existe por el momento una cura o una vacuna definitiva contra esta enfermedad, se hace necesaria la búsqueda de nuevos mecanismos de ataque contra la reproducción y diseminación del parásito. Uno de los mecanismos de prevención es la erradicación de los triatominos, sin embargo, esto es una tarea difícil debido a las consecuencias ecológicas. La biología sintética es un campo en desarrollo que brinda herramientas con prometedores resultados. Siendo el parásito *Trypanosoma cruzi* el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, se piensa que si se logra inhibir su crecimiento dentro los vectores de propagación, se podría disminuir la acción de la enfermedad. Esto se quiere lograr con la inserción de un plásmido pRrMDWK6 dentro de 3 tipos de bacterias simbioses diferentes: *Escherichia coli*, *Rhodococcus rhodnii* y *Salmonella*. La acción de este plásmido vendrá dada por la codificación de un gen VHK que producirá el

fragmento de un anticuerpo llamado rDB3, que se unirá a la progesterona presente en la superficie del parásito, inhibiendo de esta forma su crecimiento y reproducción dentro del intestino del insecto.

Se quiere realizar un análisis evolutivo de la inserción del plásmido en las 3 bacterias previamente mencionadas para conocer cuál de estas bacterias presenta un mejor fitness o adaptación al plásmido y por ende una mejor difusión de anticuerpo dentro del intestino del vector y una mejor erradicación del parásito. La transformación de bacterias para impedir el crecimiento del parásito dentro del insecto ha sido efectuado previamente y se ha confirmado su éxito. Esto ha sido posible gracias al uso de plásmidos o elementos integrativos de ADN, péptidos tripanocidas (como Cecropin A) y fragmentos de anticuerpos de cadena simple. (Beard et al., 2001) Debido a que los insectos se alimentan únicamente de sangre a lo largo de su desarrollo, su dieta es deficiente en algunas vitaminas y minerales. Es por esto que los insectos mantienen una relación de simbiosis con la bacteria *R.rhodnii* y *E.coli*. *Salmonella* aún no ha sido testeada para simbiosis pero es una potencial candidata.(Mandrioli, 2009)

Para llevar acabo la paratransgénesis es necesario que una población de microbios, de vectores y de parásitos esté disponible en el laboratorio, así como los métodos para aislar y transformar la bacteria simbiote. Así mismo, para que el método funcione adecuadamente, la transformación de las bacterias simbiotes debe resultar en mutantes estables, sin pérdida de fitness reproductivo. Los mutantes deberían tener una tasa de crecimiento similar a los no-mutantes, de tal forma que al liberarlos al ambiente no resulte en una competencia por selección natural que termine erradicando los vectores transformados.

Es por esto que es de nuestro interés realizar un modelo evolutivo que nos permita encontrar entre 3 bacterias diferentes cuál de ellas resulta teniendo una mejor adaptación a la transformación y de esta forma optimizar el proceso de paratransgénesis.

Para ello será necesario medir de manera experimental el fitness de cada una de las bacterias con y sin la inserción del plásmido. Debido a que realizar esto en clase no fue posible, fue necesario buscar y encontrar constantes que se asemejaran a una posible función de fitness de cada una de nuestras bacterias. Con la ayuda del modelo de Moran fue posible simular un escenario evolutivo de una población total de 90 vectores para cada una las bacterias,

y con ayuda del algoritmo de Gillespie se simuló la cantidad de bacterias producidas dentro de cada vector luego de la transformación. A continuación se muestra el diseño experimental, el modelo evolutivo, las consideraciones éticas y las dificultades generales de nuestro proyecto.

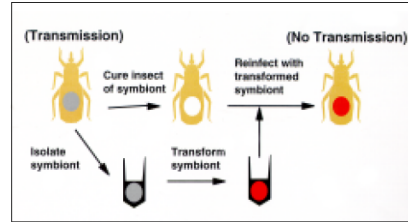


Figure 1: Idea general de la paratransgénesis

2 Protocolo y diseño experimental

2.1 Cultivo y transformación de las bacterias

Las bacterias *R.rhodnii*, *E.coli* y *Salmonella* serán crecidas en un medio Luria-Bertani que contenga el antibiótico kanamicina.

2.2 Construcción del plásmido pRrMDWK6

La expresión y secreción del anticuerpo rDB3 es controlada por un gen derivado del bacilo *Mycobacterium kansasii* ($Mk\alpha$). El protocolo para la extracción de este gen está disponible en Matsuo et al., 1990. $Mk\alpha$ será amplificado usando los siguientes primers de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): **5'-GC TCT AGA GTT AAC TAT TCT TTG TAC GCG-3'**(sentido 5'-3') y **5'-GC GAA CGC TCC CGC GGT CGC-3'**(sentido 3'-5'). El 1er primer será incorporado al sitio de restricción de la enzima Xba1 5' y el 2do primer será incorporado al sitio de restricción de la enzima Sac II. El gen que codificará para el anticuerpo DB3 será amplificado utilizando los siguientes primers: **5'-GC ACC GCG GGA GCC CAG GTG AAA CTG CTC-3'** (sentido 5'-3') y **5'-CCT CGA TTG CGG CCG CTT AAC-3'**(sentido 3'-5'). El 1er primer se incluirá en un sitio SacII donde será posible ligarlo con la secuencia $Mk\alpha$. El fragmento reverso

será clonado en el fragmento XbaI. El complejo MkaDB3Vh/K será clonado en un sitio XbaI del plásmido. Se clonará también un gen de resistencia a la kanamicina como un fragmento Bam HI y de esta forma se construirá el plásmido final. En la siguiente imagen es posible ver el plásmido con todas las enzimas de los restricción y los diferentes genes. (Durvasula et al., 1999)

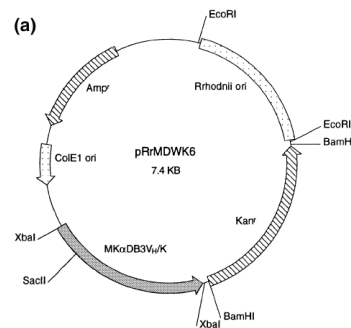


Figure 2: Plásmido de inserción. Origen de replicación de *R. rhodnii*: Rhodnii ori; Kan: gen de resistencia de kanamicina, cassette de secreción y expresión de MkaDB3VH/K, rDB3; Origen de replicación para *E. coli*: ColE1 ori, gen de resistencia: Ampicilina. (Durvasula et al., 1999)

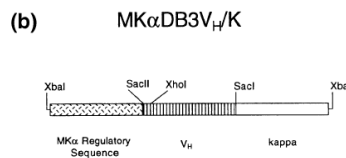


Figure 3: Cassete de expresión y secreción MkaDB3VH/K, rDB3. (Durvasula et al., 1999)

El objetivo de usar el promotor y el péptido de señal de *Mycobacterium kansasii* es el de producir el fragmento de un anticuerpo de cadena libre (rDB3) que se unirá posteriormente a la progesterona presente en la superficie corporal del parásito *Trypanosoma cruzi* y de esa forma inhibir su crecimiento. Varios estudios demuestran que el fragmento del anticuerpo puede ser expresado y no será degradado en el tracto digestivo del parásito

y permanece funcional. (Beard et al., 2001)

rDB3 es un anticuerpo murino monoclonal cuya función es la adherirse a la progesterona con una afinidad de ($K \sim 10^9 M^{-1}$). Este anticuerpo ha podido producirse sin problema en *E.coli* y *R.rhodnii* (He et al., 1995). Sin embargo es necesario confirmar la producción del mismo en el espacio periplásmico de *Salmonella*.

Pese a que los insectos tienen alguna capacidad de reconocer anticuerpos externos a ellos, su sistema de detección no es tan sofisticado como el de los mamíferos. Así que la producción de un anticuerpo que no les pertenece a ellos no genera necesariamente una respuesta del sistema inmune del individuo, permitiendo así que el gen se exprese libremente.

2.3 Transformación de los vectores

Colonias de *R.prolixus* serán mantenidas a 26 grados y a una humedad relativa de 75% en un insectario, si el experimento se decide hacer en el campus universitario, los insectos podrían ser solicitados al CIMPAT. Se tomarán dos grupos de 45 individuos cada uno, el primer grupo será de control y en este se insertarán bacterias que no tengan el plásmido o que no estén genéticamente modificadas mientras que en el otro grupo se insertarán las bacterias que codifican para la producción del anticuerpo.(Durvasula et al., 1999). Los vectores de control tendrán una sepa de bacteria que no exhiba resistencia a la kanamicina. Los vectores serán alimentados con sangre infectada durante períodos de 1 mes y en cada etapa de desarrollo se tomarán 9 insectos de cada uno de los grupos y se tomará el contenido de sus intestinos para realizar el conteo de bacterias y de parásitos. De la misma forma después de cada de alimentación sanguínea se contará el número de vectores que sobreviven con cada una de las bacterias transformadas.

2.3.1 Introducción de las bacterias en los vectores

Los simbioses pueden ser introducidos en *R.prolixus* mediante alimentación con sangre.Las bacterias que crecen en medio pueden ser añadidas a sangre de conejo que después puede ser proveída a los insectos por medio de un aparato para alimentación especial, o bien, por medio de cropofagia (Beard et al., 2001)

2.3.2 Genes marcadores:

El gen de resistencia de kanamicina (kanamycin resistance gene) es usado para marcar los vectores genéticamente modificados en presencia del antibiótico kanamicina y es eficiente al matar los vectores que no lo están. La ventaja de este gen es que puede ser usado tanto en *R.rhodnii* como en *E.coli* (Beard et al., 2001) Al final de cada generación de insectos se tendrá el número de colonias de bacterias y de vectores que sobrevivieron a la ingesta de sangre contaminada con *T.cruzi* con la ayuda del marcador.

2.4 Reconocimiento del anticuerpo por medio de la técnica de Western Blot

La técnica de Western Blot (o Inmunoblot) es ampliamente usada para reconocer proteínas en una muestra de tejido. Se usa la electroforesis en geles de poliacrilamida para separar proteínas nativas en su estructura terciaria o ya denaturadas. Para saber si después de la transformación los insectos modificados están produciendo el anticuerpo rDB3, se tomará una muestra del tejido del intestino y se analizará la presencia del anticuerpo por medio de esta técnica. Para el Western Blot se usará 1 μg de proteína y se usará una solución diluida de 1:1000 partes de fosfatasa alcalina conjugada con un anticuerpo IgG para reconocer el anticuerpo rDB3. (Durvasula et al., 1999). Se utilizará un marcador de peso molecular similar al peso del anticuerpo rDB3 para confirmar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida si se está produciendo efectivamente el anticuerpo. Se espera obtener algo de la siguiente forma:

2.5 Test para simbiosis de la bacteria *Salmonella*

Se ha encontrado información relevante sobre la simbiosis de *R.rhodnii* y *E.coli* (Dionisio et al., 2005). Sin embargo es necesario confirmar si la bacteria *Salmonella* es un simbiote adecuado para *R.prolixus*. Para confirmar esto se pueden realizar experimentos en los que se infectan los vectores con la bacteria y mirar si la población de vectores disminuye o crece de manera significativa.

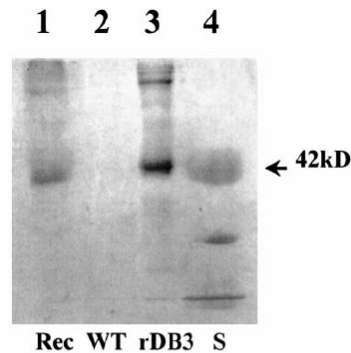


Fig. 2. Western blot. Lane 1, protein extract from culture supernatant of *R. rhodii* genetically transformed with pRMDWK6 (Rec). Lane 2, protein extract from culture supernatant of untransformed *R. rhodii* (WT). Lane 3, recombinant DB3 antibody fragment from *E. coli* (rDB3). Lane 4, molecular weight standards (S). Genetically altered *R. rhodii* secrete a protein similar in size to the recombinant DB3 antibody fragment from *E. coli*, which is recognized by the anti-mouse IgG antibody.

Figure 4: Electroforesis en gel de poliacrilamida. Reconocimiento del anticuerpo rDB3

3 Modelo evolutivo

3.1 Escogencia de las constantes

Nuestro modelo evolutivo consiste en comparar las poblaciones de vectores sobrevivientes genéticamente modificados con las 3 diferentes bacterias para al final concluir cuál de las bacterias es más eficiente a la hora de producir el anticuerpo necesario para reducir las poblaciones de *T. cruzi*. Sin embargo, es necesario realizar varios experimentos en los que se pueda medir el fitness de las bacterias de manera precisa. Después de una intensa búsqueda sólo fue posible encontrar los fitness de *E. coli* y *Salmonella* en presencia de plásmidos. En el artículo de Dionisio et al., (2005) se efectuaron varios experimentos en los que se medía el fitness de bacterias de *E. coli* en presencia y ausencia del plásmido R1. El valor para el fitness escogido fue de 2.051 ± 0.087 .

Para la bacteria *Salmonella* se encontró la siguiente información obtenida de Dionisio et al., (2005): "We observed that the *Salmonella* cells bearing the evolved plasmid have a significantly higher fitness (1.558 ± 0.059 , nZ3) than *Salmonella* cells without the R1 plasmid (1.000 ± 0.074 , nZ3; two-tailed t-test, p-value Z=0.007)." Gracias a esta información fue posible para nosotros cuantificar en iPython mediante el algoritmo de Gillespie de la tarea 3 el número de vectores que se producen a lo largo de un lapso de un tiempo según

sus fitness. Para la bacteria *R.rhodnii* no ha sido posible encontrar fitness con o sin plásmido. Sin embargo, ha sido posible encontrar el numero de colonias sobrevivientes después de varias de generaciones, con o sin el plásmido, dentro de los vectores *R. prolixus*. Esta información fue obtenida de Durvasula et al., (1999), se tiene para las ninfas de 2nda, 3era, 4ta y 5ta generación y para los adultos, un total de colonias resistentes a la kanamicina de 1.19, 5.95, 14.4, 40.1 y 457.6 colonias respectivamente con sus respectivas incertidumbres. Se puede observar que a medida que aumentan las generaciones también aumenta el número de colonias significativamente, por lo cual se puede inferir que el fitness es mayor a 1. El valor que hemos escogido de manera aleatoria teniendo en cuenta el orden de magnitud de este tipo de constantes es de 1.2.

3.2 Algoritmo de Gillespie para modelar el crecimiento poblacional de bacterias

El algoritmo de Gillespie se utilizó para realizar un primer acercamiento a modelar el crecimiento poblacional de bacterias. El modelo al ser simplista, no aporta mucha más información que los datos de entrada (los fitness).

El código implementado en IPython se puede observar en http://nbviewer.ipython.org/github/sercharpak/Biologia_Sintetica_Proyecto/blob/master/IPython/Modelo_Evolutivo_1.0.ipynb.

A continuación podemos observar los resultados obtenidos para 100 corridas con 10^5 puntos cada una.

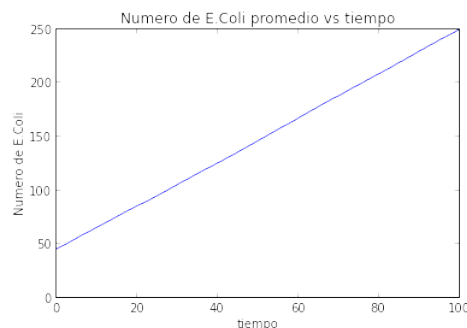


Figure 5: Crecimiento de E.Coli

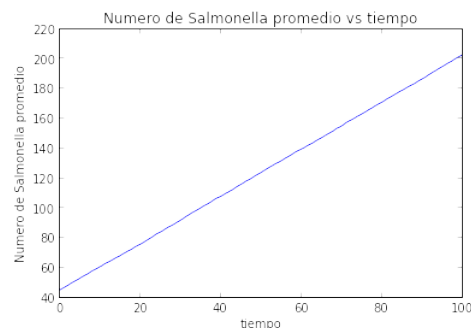


Figure 6: Crecimiento de Salmonella

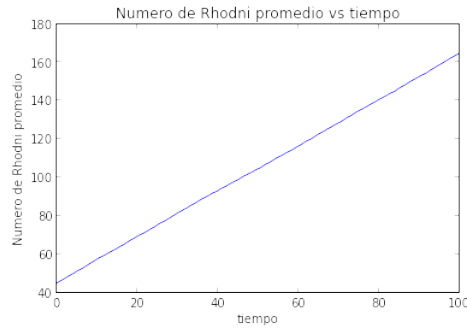


Figure 7: Crecimiento de E.Coli

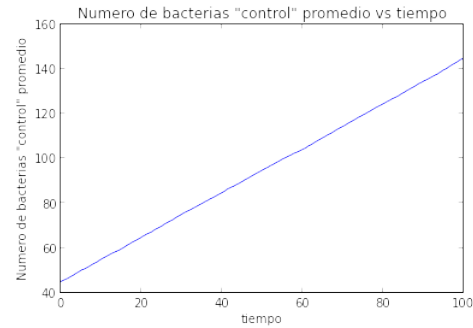


Figure 8: Crecimiento con fitness de 1

Podemos observar un comportamiento netamente lineal. No se llega a un estado estable ya que no hay ninguna restricción.

Se puede observar a continuación como los crecimientos se encuentran en el mismo orden que los fitness utilizados. De mayor a menor, E.coli, Salmonella, R.Rhodnii, y el control con fitness de 1.

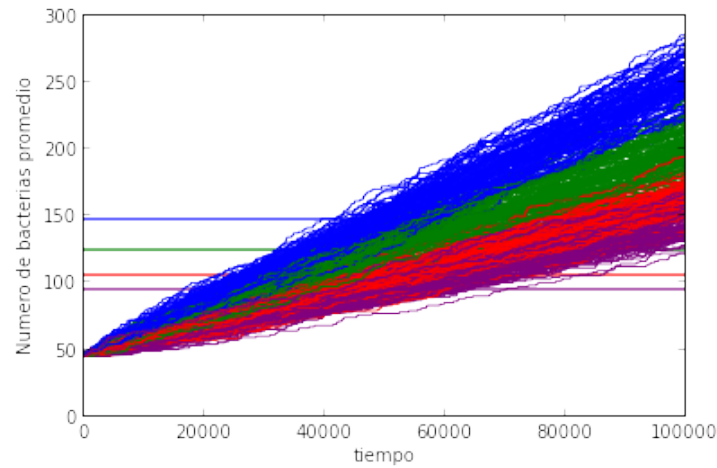


Figure 9: Diferentes crecimientos para las diferentes bacterias

Los ruidos obtenidos crecen exponencialmente, pero luego se estabilizan todos alrededor del mismo valor 0.07 – 0.08.

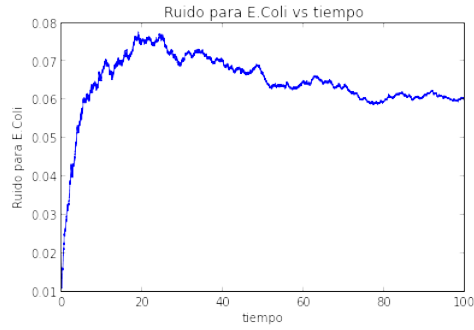


Figure 10: Ruido de E.Coli

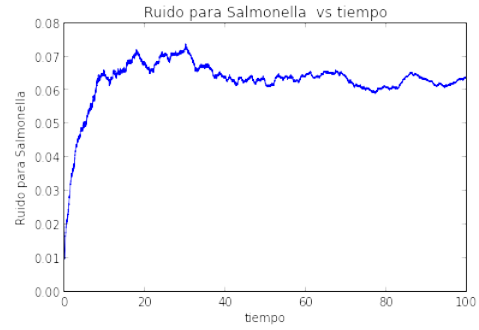


Figure 11: Ruido de Salmonella



Figure 12: Ruido de R.Rhodni

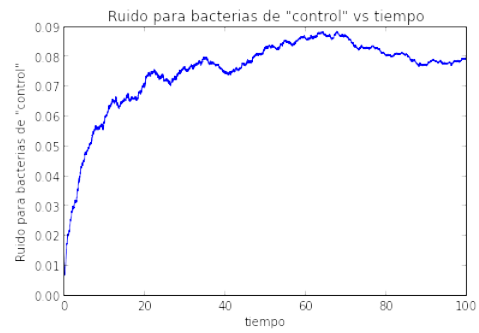


Figure 13: Ruido del control con fitness de 1

Y las distribuciones para el último estado para cada una de las bacterias son igualmente muy similares. Parecen corresponder a grandes rasgos a una distribución gaussiana.

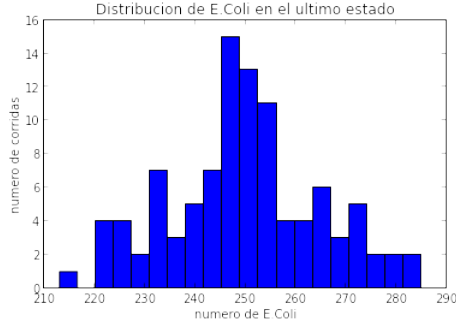


Figure 14: Distribución de E.Coli para el último estado

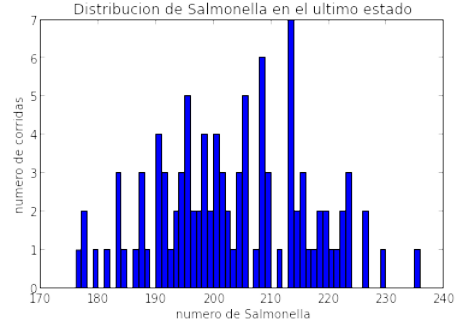


Figure 15: Distribución de Salmonella para el último estado

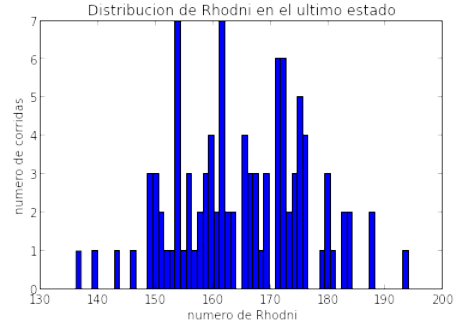


Figure 16: Distribución de R.Rhodnii para el último estado

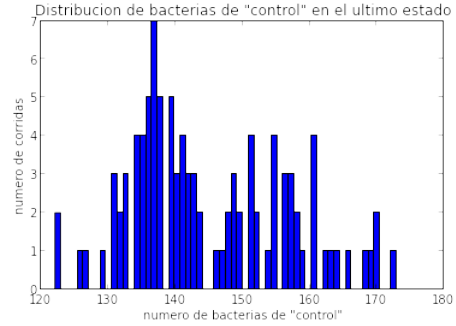


Figure 17: Distribución de control con fitness de 1 para el último estado

3.3 Modelo de Moran para simular evolución bajo fitness relativo

El proceso de Moran es un proceso de muerte-nacimiento que describe selección natural en poblaciones finitas. Para una población de tamaño N , en este caso 90, la población se divide en dos tipos: población transformada (A) y población no transformada (B). El número de individuos de A con i y el número de los individuos de B se denota por $N-i$. Se denota como f_A y f_B los fitness de cada una de las poblaciones.(Harper,2013)

Se describen así las siguientes probabilidades de transición para el crec-

imiento, disminución y el estancamiento:

$$T_{i \rightarrow i+1} = \frac{if_A(i)(1 - \mu_{AB}(i)) + (N - i)f_B(i)\mu_{BA}(N - i)}{if_A(i) + (N - i)f_B(i)} \frac{N - i}{N}$$

$$T_{i \rightarrow i-1} = \frac{if_A(i)\mu_{AB}(i) + (N - i)f_B(i)(1 - \mu_{BA}(N - i))}{if_A(i) + (N - i)f_B(i)} \frac{i}{N}$$

$$T_{i \rightarrow i} = 1 - T_{i \rightarrow i+1} - T_{i \rightarrow i-1}$$

Con μ_{AB} y μ_{BA} las probabilidades de mutación que dependerán del estado, entre otras cosas.

El repositorio que contiene todo el código implementado en Mathematica se puede acceder en https://github.com/sercharpak/Biologia_Sintetica_Proyecto. Por simplicidad se implementó un modelo de fitness relativo (A con fitness dado y B con fitness de 1). A continuación se muestran las imágenes obtenidas después de graficar una población total de N=90 vectores con cada una de las bacterias.

Para E.coli se tiene:

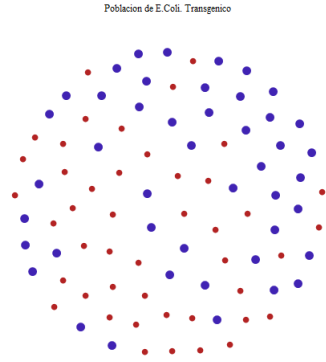


Figure 18: Generación #0. Rojo= Población B. Azul= Población A

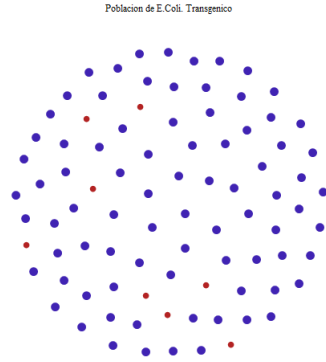


Figure 19: Generación #339. Rojo= Población B. Azul= Población A

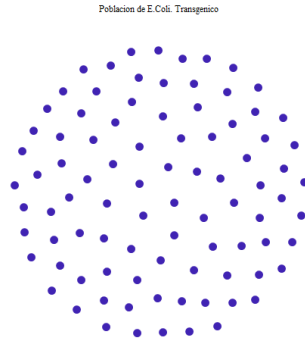


Figure 20: Generación #576. Rojo= Población B. Azul= Población A

Se puede observar que a medida que pasan las generaciones va dominando la población de color azul, es decir, las bacterias transformadas con el plásmido. Esto se debe a que el fitness de estas últimas es mayor al fitness de las bacterias sin transformar.

Para R.rhodnii:

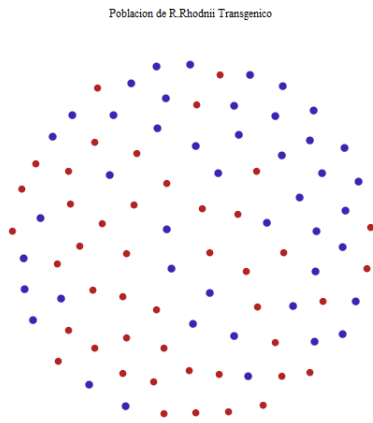


Figure 21: Generación #0. Rojo= Población B. Azul= Población A

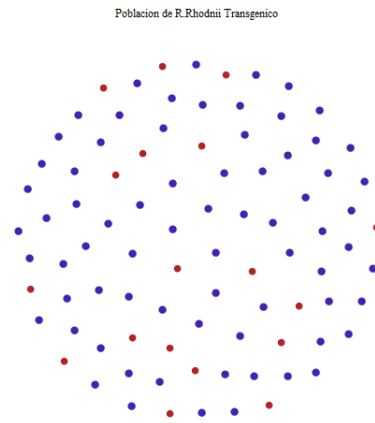


Figure 22: Generación #477. Rojo= Población B. Azul= Población A

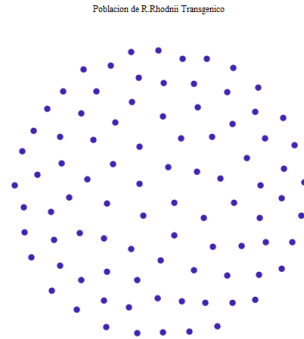


Figure 23: Generación #947. Rojo= Población B. Azul= Población A

Se puede realizar la misma observación con *R.Rhodni*. Sin embargo se puede observar que el número de generaciones necesarias para que toda la población sea de un mismo tipo es mucho mayor (casi el doble).

Para Salmonella:

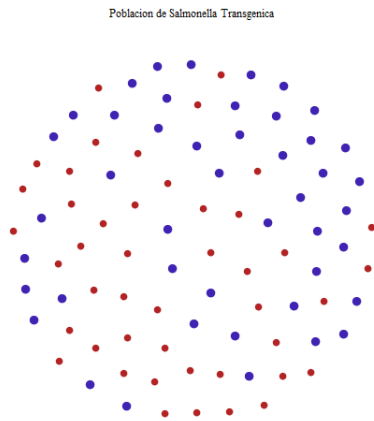


Figure 24: Generación #0. Rojo= Población B. Azul= Población A

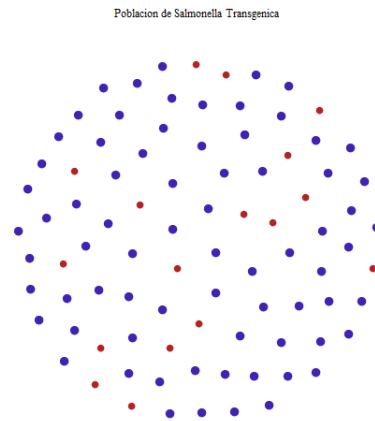


Figure 25: Generación #496. Rojo= Población B. Azul= Población A

Se puede observar el mismo comportamiento, y se puede notar que el número de generaciones necesarias para que toda la población sea de un mismo tipo se encuentra entre el de *E.Coli* y el de *R.Rhodni*, al igual que

los fitness escogidos.

Se obtienen las siguientes gráficas de crecimiento poblacional:

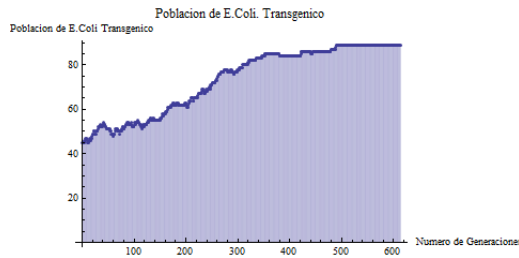


Figure 26: Población de E.coli trans-
formada

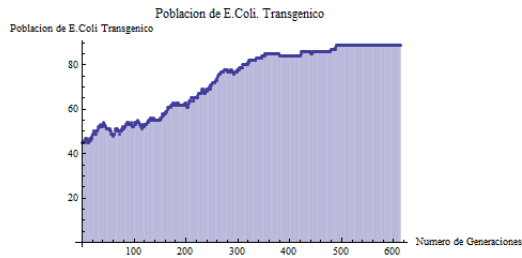


Figure 27: Población de Salmonella
transformada

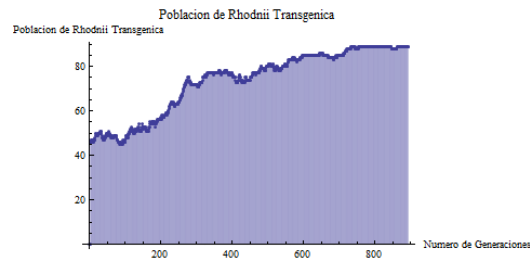


Figure 28: Población de R.rhodnii transformada

4 Consideraciones éticas

La manipulación genética de insectos que transmiten enfermedades es una potencial alternativa para la eliminación de enfermedades peligrosas que afectan la salud humana. Productos de expresión de genes insertados que puedan bloquear o eliminar la producción de patógenos dentro de los vectores de transmisión puede ser una herramienta valiosa en el control de estas enfermedades. Sin embargo es necesario tener en cuenta las consecuencias ecológicas, éticas y ambientales de la introducción de organismos genéticamente modificados en el ambiente.

4.1 Transferencia horizontal de genes

La THG es un importante proceso a nivel biológico que suele darse particularmente en la evolución de las bacterias y es importante en el proceso de resistencia a antibióticos y regulación virulenta. En el libro *Pathogenesis of Leishmaniasis* se generó un modelo matemático que predice la TGH entre una *R.rhodnii* y *G.rubropertincus* genéticamente modificadas. El modelo predice una frecuencia de TGH de menos de 1.14×10^{-16} por 100.000 generaciones a un nivel de certeza del 99%. Esto significa que la frecuencia de TGH es menor a un estimado de 10^{-1} por gen por 1000 generaciones. Lo cual sugiere que la probabilidad de que estos eventos ocurran es muy poca.

4.2 Consecuencias ecológicas y regulación

Pueden existir varias consecuencias ecológicas a la hora de liberar organismos genéticamente modificados al ambiente. En particular, si los vectores con bacterias modificadas son liberados y presentan cambios negativos en el fitness, es posible que estos organismos tengan menos posibilidad de sobrevivir y por ende se extingan más fácil dentro de la población, llevando a una disminución significativa de estos triatominos en su ambiente. Esto sin duda conlleva a consecuencias graves en la cadena trófica y ecología de otros animales.

Si la liberación de los vectores se realiza en áreas donde habitan humanos, es necesario primero hacer pruebas y experimentos con humanos y esto necesitaría una aprobación especial de la entidad que regula este tipo de trámites. Así mismo, para poder liberar organismos modificados, se necesita el permiso de las autoridades de las comunidades afectadas.

La autoridad encargada de regular la investigación y esparcimiento de organismos genéticamente modificados en Colombia aún no existe (véase Tarea 3). Es posible que este tipo de cuestiones estén relacionadas con el Ministerio de Medio Ambiente o el Instituto Nacional de Salud, pero hasta el momento no se ha encontrado una legislación o proyecto de ley claro que tenga que ver con este tema.

5 Dificultades generales

5.1 Evolución del proyecto

A lo largo de este proyecto se experimentaron diversas dificultades desde su inicio. El tema escogido es de gran relevancia debido a la gran cantidad de víctimas de la enfermedad de Chagas. Esto nos impulsó a lanzarnos en este tema. En un comienzo se aspiró en estudiar una droga que afecta de manera agresiva a *T.Cruzi*.

Sin embargo, en la **primera retroalimentación**, se nos informó que era de poco interés para el contexto del curso debido a su costo y su poca viabilidad. El principal consejo era centrarse en los vectores de *T.Cruzi* e inhibir el crecimiento de este dentro de ellos. Decidimos entonces centrarnos en el anticuerpo Rdb3 que, al atarse a la progesterona, inhibe el crecimiento de *T.cruzi* dentro de los vectores. En este instante identificamos de manera exitosa los diferentes elementos necesarios para el proyecto.

Luego de la **segunda retroalimentación**, se nos informó que el modelo era demasiado simplista y era mejor hacer un análisis de la difusión de nuestra bacteria y de el anticuerpo rdb3 dentro del vector.

En la **tercera retroalimentación**, caímos en cuenta que nuestro análisis de difusión no tenía aplicación en este caso ya que ambos parásito y bacteria se encuentran en el mismo lugar dentro del vector. Evolucionamos así al proyecto actual: Análisis evolutivo de bacterias transgénicas para escoger la mejor bacteria entre *R.Rhodnii*, *E.Coli* y *Salmonella Enterica*.

5.2 Constantes

La búsqueda de constantes y datos en la literatura fue exhaustiva. Debido a la necesidad de trabajo experimental para obtener dichas constantes, estas son extremadamente escasas en la literatura. Esto tuvo como consecuencia que se usaran valores de fitness de *E.Coli* y *Salmonella* con otro plásmido, R1 y no pRrMDWK6 y que se estimara un valor para el fitness de *R.Rhodnii* con base a una observación de evolución de poblaciones. Por lo tanto utilizar estas constantes aumenta la incertidumbre de nuestro modelo de manera importante.

5.3 Modelo

El modelo de evolución población utilizado fue simplificado debido a la falta de conocimiento en el tema de parte nuestra. Por ello se realizó un análisis simplista con base al algoritmo de Gillepsie desarrollado en el curso. Sin embargo el análisis en ambos modelos fue superficial y no se pudieron complicar de manera satisfactoria, debido a la falta como de tiempo como de conocimiento en el tema.

6 Conclusiones

La volatilidad que se tuvo a lo largo del semestre hizo que sólo hasta el final del semestre se encontrará un tema innovador. Luego las diferentes dificultades experimentadas, tanto en la búsqueda de las constantes como en la comprensión del modelo, hicieron que el desarrollo del proyecto fuera lento y con gran incertidumbre en lo que concierne su relevancia. Se debió haber replanteado el proyecto con más firmeza con mucha más anterioridad para evitar los inconvenientes experimentados.

A pesar de las dificultades, se adquirió conocimiento significativo en la metodología de proyecto, búsqueda de información e implementación de diferentes modelos en diferentes lenguajes. En efecto se tiene familiaridad con el algoritmo de Gillepsie (implementado en Python y C) y el modelo de Moran (implementado en Mathematica). Este conocimiento adquirido tendrá gran relevancia en nuestros siguientes proyectos.

Es posible concluir que la bacteria que presentó el mayor fitness y por ende la que mejor pudo adaptarse a la inserción del plásmido para la eliminación de bacterias fue E.Coli, seguida de Salmonella y finalmente R.rhodnii. En la siguiente gráfica es posible ver el crecimiento de bacterias dentro de vectores de la especie R.prolixus. Los colores azul, verde, rojo y morado representan respectivamente E.coli, Salmonella, R.rhodnii, y una bacteria con fitness igual a 1.

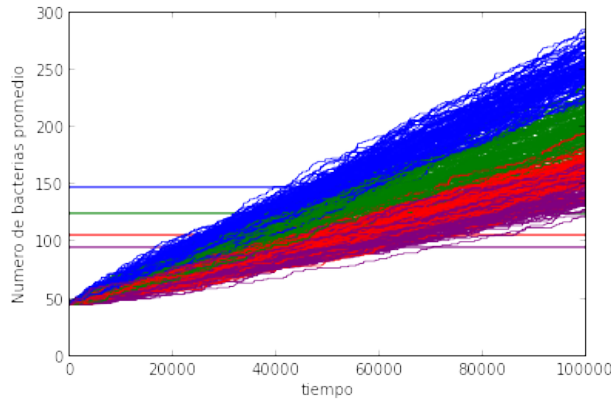


Figure 29: Población de *R.rhodnii* transformada

Finalmente, nos sorprendimos al encontrar que los fitness encontrados mejoraban al instertarles el plásmido (*E.Coli* y *Salmonella* con *R1* y *R.Rhodnii* observando las poblaciones). Esto puede va de cierta manera en contra del sentido común que sería que estos fitness deberían ser menores a 1 ya que producir el anticuerpo tiene cierto costo energético. Aunque esto involucra resultados muy interesantes, la única manera de conocer dichos fitness es realizar un trabajo experimental.

7 Referencias

- Beard, C. (1998, December). Bacterial Symbiosis in Arthropods and the Control of Disease Transmission. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4), 581–591. Retrieved 2015-05-22TZ, from <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no4/beard.htm> doi: 10.3201/eid0404.980408
- Beard, C. B., Cordon-Rosales, C., & Durvasula, R. V. (2002, January). Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annual Review of Entomology*, 47(1), 123–141. Retrieved 2015-05-22TZ, from <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.ento.47.091201.145144> doi: 10.1146/annurev.ento.47.091201.145144
- Benedict, M. Q., & C.A.B. International (Eds.). (2014). *Transgenic insects: techniques and applications* (No. 3). Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI.

- Dionisio, F., Conceição, I. C., Marques, A. C. R., Fernandes, L., & Gordo, I. (2005, June). The evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness. *Biology Letters*, 1(2), 250–252. doi: 10.1098/rsbl.2004.0275
- Dotson, E. M., Plikaytis, B., Shinnick, T. M., Durvasula, R. V., & Beard, C. B. (2003, July). Transformation of *Rhodococcus rhodnii*, a symbiont of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*, with integrative elements of the L1 mycobacteriophage. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 3(2), 103–109.
- Durvasula, R. V., Gumbs, A., Panackal, A., Kruglov, O., Taneja, J., Kang, A. S., ... Beard, C. B. (1999, June). Expression of a functional antibody fragment in the gut of *Rhodnius prolixus* via transgenic bacterial symbiont *Rhodococcus rhodnii*. *Medical and Veterinary Entomology*, 13(2), 115–119. Retrieved 2015-05-22TZ, from <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2915.1999.00175.x> doi: 10.1046/j.1365-2915.1999.00175.x
- Durvasula, R. V., Kroger, A., Goodwin, M., Panackal, A., Kruglov, O., Taneja, J., ... Cordon-Rosales, C. (1999, November). Strategy for Introduction of Foreign Genes into Field Populations of Chagas Disease Vectors. *Annals of the Entomological Society of America*, 92(6), 937–943. Retrieved 2015-05-22TZ, from <http://aesa.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/aesa/92.6.937> doi: 10.1093/aesa/92.6.937
- Durvasula, R. V., Sundaram, R. K., Kirsch, P., Hurwitz, I., Crawford, C. V., Dotson, E., & Beard, C. B. (2008, May). Genetic transformation of a *Corynebacterium* symbiont from the Chagas disease vector *Triatoma infestans*. *Experimental Parasitology*, 119(1), 94–98. Retrieved 2015-05-22TZ, from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489408000039> doi: 10.1016/j.exppara.2007.12.020
- Eichler, S., & Schaub, G. A. (2002, January). Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Experimental Parasitology*, 100(1), 17–27. doi: 10.1006/expr.2001.4653
- He, M., Hamon, M., Liu, H., Kang, A., & Taussig, M. J. (1995, October). Functional expression of a single-chain anti-progesterone antibody fragment in the cytoplasm of a mutant *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 23(19), 4009–4010.
- He, M., Kang, A. S., Hamon, M., Humphreys, A. S., Gani, M., & Taussig, M. J. (1995, April). Characterization of a progesterone-binding,

- three-domain antibody fragment (VH/K) expressed in *Escherichia coli*. *Immunology*, 84(4), 662–668.
- Hurwitz, I., Fieck, A., Read, A., Hillesland, H., Klein, N., Kang, A., & Durvasula, R. (2011). Paratransgenic control of vector borne diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 7(9), 1334–1344.
- Lenski, R. E., Mongold, J. A., Sniegowski, P. D., Travisano, M., Vasi, F., Gerrish, P. J., & Schmidt, T. M. (1998, January). Evolution of competitive fitness in experimental populations of *E. coli*: what makes one genotype a better competitor than another? *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73(1), 35–47.
- Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A., Tasaka, H., Terasaka, K., Tot-suka, M., ... Yamada, T. (1990, December). Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria. *Infection and Immunity*, 58(12), 4049–4054.
- Moran, N. A., Degnan, P. H., Santos, S. R., Dunbar, H. E., & Ochman, H. (2005, November). The players in a mutualistic symbiosis: Insects, bacteria, viruses, and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(47), 16919–16926. Retrieved 2015-05-22TZ, from <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0507029102> doi: 10.1073/pnas.0507029102
- Pontes, M. H., & Dale, C. (2006, September). Culture and manipulation of insect facultative symbionts. *Trends in Microbiology*, 14(9), 406–412. Retrieved 2015-05-22TZ, from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X06001727> doi: 10.1016/j.tim.2006.07.004
- Satoskar, A. R., & Durvasula, R. (Eds.). (2014). *Pathogenesis of Leishmaniasis: new developments in research*. New York: Springer.