



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Primer registro de *Wolbachia* sp. en piojos y pulgas
asociados con mamíferos del estado de Hidalgo, México.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

MARIO MATA GALINDO



DIRECTORA:

DRA. INGEBORG BECKER FAUSER

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Mata

Galindo

Mario

0445534157247

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

311037667

2. Datos del tutor

Dra.

Ingeborg Dorothea

Becker

Fausser

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Roxana

Acosta

Gutiérrez

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Luis Felipe

Jiménez

García

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Daniel Sokani

Sánchez

Montes

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Isabel Cristina

Cañeda

Guzmán

7. Datos del trabajo escrito

Primer registro de *Wolbachia* sp. en piojos y pulgas asociados con mamíferos del estado de Hidalgo, México

40p

2018

Agradecimientos

A la Biól. Ali Zeltzin Lira Olguin y al Dr. César Antonio Ríos Muñoz por su apoyo en la colecta de los mamíferos.

A la Dra. Livia Socorro León Paniagua, al Dr. Lázaro Guevara López y al Biol. Martín Yair Cabrera Garrido por su apoyo en la identificación de mamíferos.

A la Dra. Roxana Acosta Gutiérrez por su apoyo técnico en la identificación de las pulgas recolectadas.

A la M en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar por su apoyo técnico en la secuenciación de los productos de PCR.

Al Dr. Daniel Sokani Sánchez Montes por su apoyo y dirección en la estandarización de las actividades de biología molecular (extracción, PCR, electroforesis) y el análisis para la identificación molecular (edición y alineamiento de secuencias con el programa MEGA 6.0).

Al Biól. Pablo Francisco Colunga Salas por su apoyo en los análisis de sistemática molecular.

A la Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fausser jefa del Centro de Medicina Tropical en la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM por su apoyo en la elaboración de esta tesis.

A los programas PAPIIT IN217515 y CONACyT 221405

Dedicatoria

A mi familia quienes siempre me han brindado su apoyo, su cariño, comprensión y por darme las bases necesaria para que sea esta persona, que ahora esta logrando titularse.

A mi mamá quien ha estado conmigo siempre en las buenas y en las malas, cuando llego cansado, ella esta ahí para animarme, muchas gracias mamá porque sin ti que estas batallando siempre a mi lado, acompañándome a todos lados, tratando siempre de entenderme y haciendo hasta lo imposible por mi, no lo habría conseguido.

A mi papá quien me ha enseñado que las mejores cosas siempre se consiguen con esfuerzo y dedicación y una que otra risa. Gracias por enseñarme todo, por interesarte en todo lo que hago, por mandarme tantas notas relacionadas con la biología, no necesito hacerte inmortal para mi eres inmortal.

A mi hermana (Chavis) quien siempre esta apoyándome, distrayendome y sacando momentos descabellados y aunque a veces peleemos siempre estamos el uno con el otro.

Gracias porque a pesar de que no les agradezca ni les diga que los quiero, cada esfuerzo que hago, cada logro, es mi forma de agradecerles, de decirles miren lo que logre gracias a

ustedes y que sepan que cada logro esta dedicado a ustedes quienes jamas me han dejado de apoyar.

A todas mis tias quienes me brindan siempre su apoyo, su cariño y siempre están ahí cuando las necesito, además de que las sonrisas no nos hacen falta en las reuniones familiares.

A mi primo Daniel quien me ha enseñado que no importan las circunstancias, con buena actitud y esfuerzo siempre se consigue lo que se busca. Gracias por estar siempre para mi y por tantos momentos juntos desde pequeños.

A mi abuelita que siempre ha estado conmigo ayudandome y apoyándome desde que era un niño, dándome todo su conocimiento y cariño, quien me enseñó que no importa lo que suceda siempre hay que esforzarnos para seguir adelante y divirtiendome nos (Te quiero mucho abuelita).

A Sokani el mejor Dr., profesor y amigo, gracias por confiar en mi, en nosotros (Melissa, Kevin y yo) porque aunque solo eramos unos pequeños párvulos de 4 semestre nos diste la oportunidad de adentrarnos a este mundo tan maravilloso que es la parasitología y las enfermedades tropicales. Gracias por confiar en mi para ser uno de tus primeros tesisistas.

A Pablo, Fanny, Yoko, Lucia y Sokani por los mejores comentarios para mejorar mi tesis, por los buenos consejos, por ser buenos amigos y por las mejores reuniones para discutir artículos (sigan divirtiendose), muchas gracias.

Al Dr. Luis Felipe, a la Dra. Lourdes y al Dr.Sokani por enamorarme de la Biología Molecular y por darme los fundamentos teóricos y prácticos para seguir por este camino de la maravillosa biología molecular.

A mis amigos Ale, Isai, José, Manuel, Mauricio (si alguien se me paso no es que lo haya olvidado)

A el Dr. (Kevin) por tantas locuras, aventuras y momentos divertidos.

A Melissa quien ha sido fundamental en mi camino, porque sin su apoyo diario, sin su cariño y sus conocimientos no estaría aquí, gracias por acompañarme cada día, por tantas sonrisas, tantas locuras y por estar conmigo en las buenas y en las malas.

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1 Generalidades de <i>Wolbachia</i>	3
2.2 Taxonomía de <i>Wolbachia</i>	5
2.3 Vía de Transmisión de <i>Wolbachia</i>	5
2.4 Interacciones con el Hospedero	7
2.5 Muerte de los machos	7
2.6 Feminización	7
2.7 Inducción a la partenogénesis	8
2.8 Incompatibilidad citoplásmica (CI)	8
2.9 <i>Wolbachia</i> como control biológico	9
3. Antecedentes de <i>Wolbachia</i>	10
4. Hipótesis	14
5. Objetivo general:	14
5.1 Objetivos particulares:	14
6. Área de Estudio	14
7. Material y Método	15
7.1 Trabajo de Campo	15
7.1.1 Colecta de Mamíferos	15
7.1.2 Colecta de Ectoparásitos	15
7.1.3 Preservación de Ectoparásitos	16
7.1.4 Identificación Morfológica de los Mamíferos	16
7.2 Trabajo de Laboratorio	16
7.2.1 Identificación Morfológica de los Ectoparásitos	16
7.2.2 Extracción de DNA de pulgas y piojos	17
7.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	17
7.2.4 Electroforesis	18
7.2.5 Secuenciación	19
7.2.6 Análisis de datos	19
8. Resultados	20

8.1 Especies de Ectoparasitos encontrados	20
8.2 Deteccion de DNA de <i>Wolbachia</i>	22
8.3 Análisis Filogénético	23
9. Discusión	25
10. Conclusiones	28
11. Referencias:	29
12. Anexos	34
12.1 Anexo A Extracción de ADN de Piojos y Pulgas.	34
12.2 Anexo B cuadro de hospederos.	36

1. Resumen

El género *Wolbachia* está integrado por bacterias intracelulares obligadas de transmisión vertical, consideradas como endosimbiontes que infectan a artrópodos y nemátodos, dentro de los cuales se localizan principalmente en las gónadas y son capaces de inducir alteraciones en la reproducción de sus hospedadores como partenogénesis, muerte de la prole masculina, feminización e incompatibilidad citoplásmica, por lo que se consideran parásitos reproductivos. Recientes estudios indican que la infección por *Wolbachia* está presente en el 70% de las especies de insectos. *Wolbachia* elimina patógenos de su hospedero mediante la competencia por recursos, preactivación del sistema inmune, la inducción de la cascada fenoloxidasa y la inducción de micro-RNAs dependientes de vías del sistema inmune, adicionalmente, en los insectos se ha observado un fenómeno de interferencia, el cual impide la replicación de bacterias y virus dentro de las células de los mismos, gracias a este fenómeno ha sido propuesto como biocontrol de diversas enfermedades principalmente virales (e.g. virus del Zika, *Drosophila C virus* etc.). El presente estudio se llevo a cabo en dos localidades (Rancho Santa Elena y Rancho Cruxtitla) en estado de Hidalgo. Dado que *Wolbachia* ocasiona un fenómeno de interferencia con otros grupos patógenos Rickettsiales y que en ambas localidades existen reportes previos de una baja prevalencia de *Rickettsia* en piojos y pulgas, se espera identificar una elevada diversidad de linajes de *Wolbachia*, por lo cual objetivo del trabajo fue identificar la presencia de *Wolbachia* en piojos y pulgas asociados con mamíferos pequeños del estado de Hidalgo, México, mediante la identificación morfológica de las especies de piojos y pulgas recolectados, la estandarización de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la

Polimerasa) para la detección de *Wolbachia*, el análisis de las muestras recolectadas para la detección de *Wolbachia* y la identificación de las cepas de *Wolbachia* mediante secuenciación.

Los resultados de la identificación morfológica de los piojos y pulgas dieron nuevos registros geográficos para el piojo (*Polyplax spinulosa*) y de las pulgas (*Ctenophthalmus tecpin* y *Peromyscopsylla hesperomys adelpha*). Las pruebas de PCR dieron resultados positivos en 2 especies de pulgas recolectadas (*Ctenophthalmus tecpin* y *Peromyscopsylla hesperomys adelpha*) y posteriormente en el análisis filogenético se identificaron 4 grupos genéticos.

2. Introducción

Wolbachia es miembro del orden Rickettsiales, un grupo diverso de bacterias intracelulares que comprende especies con relaciones parasitarias, mutualistas y comensales con sus huéspedes, sin embargo, *Wolbachia* ha atraído un interés considerable en la última década principalmente debido a su gran abundancia, efectos fascinantes en los huéspedes, que van desde la manipulación reproductiva hasta el mutualismo, y posibles aplicaciones en el control de vectores de plagas y enfermedades.

La clasificación de *Wolbachia* ha sido un desafío para los investigadores puesto que no se sabe si todas las bacterias dentro del clado de *Wolbachia* deberían recibir la designación *Wolbachia pipientis* o si se debe aplicar una nomenclatura diferente. A pesar de este dilema, se ha convenido que se refiera a la bacteria como *Wolbachia*, con designaciones de cepas que se basan en la identificación del hospedero.

2.1 Generalidades de *Wolbachia*

Wolbachia pipientis (Alphaproteobacteria: Rickettsiales: Rickettsiaceae) es una bacteria considerada como un simbiote intracelular de transmisión vertical responsable de una de las principales infecciones que afecta a una amplia gama de artrópodos. Estas bacterias se encuentran en la mayoría de los tejidos, aunque se concentra principalmente en glándulas salivales, intestino, ovarios y testículos (Dobson et al., 1999) (Figura 1). Otros hospederos de *Wolbachia* son nematodos filariales a los cuales infecta los cordones laterales y las células reproductivas de las hembras (Jeyaprakash y Hoy 2000)(Figura 1). Algunos estiman

que el 70% de las especies de insectos, el 45% de las especies de ácaros, el 35% de las especies de isópodos terrestres y el 47% de los nemátodos filariales se encuentran infectados con esta bacteria (Cordaux et al., 2012; Werren et al., 2008; Zug y Hammerstein, 2012; Wiwatanaratanabutr, 2013). Algunas cepas de *Wolbachia* generan alteraciones reproductivas y fisiológicas en sus hospedadores dentro de las cuales se encuentran la feminización, inducción a partenogénesis, muerte a machos, incompatibilidad citoplasmática y fecundidad (Werren et al., 2008).

Wolbachia se observó por primera vez en las células reproductivas de los mosquitos *Culex pipiens* (Hertig y Wolbach 1924). La bacteria recibió su nombre oficial de *Wolbachia pipientis* y se describió formalmente doce años más tarde (Hertig 1936). Hasta la fecha *Wolbachia pipientis* es la única especie reconocida del género *Wolbachia*, perteneciente a la familia Anaplasmataceae, orden Rickettsiales y clase alfa-proteobacterias (Riegler y O'Neill 2006).

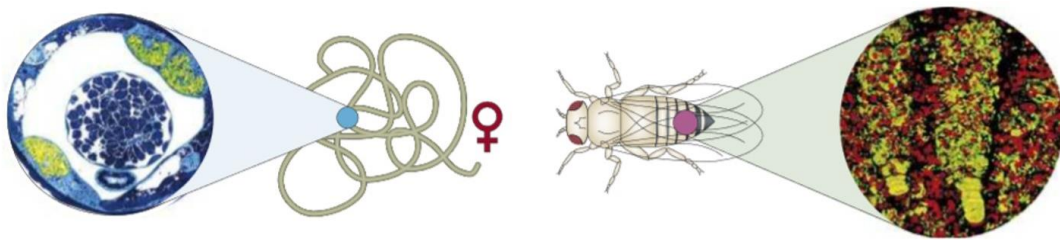


Figura 1.- **Localización de *Wolbachia* en nemátodos filariales e insectos:** Se muestra una sección transversal de un macho de nematodo filarial (*Onchocerca ochengi*) que contiene *Wolbachia*, la cual se ve de color amarillo y llena tres de las cuatro células sincitiales de los cordones laterales. *Wolbachia* (amarillo) también se muestran dentro de los ovarios de una hembra de *Drosophila simulans*. Tomado y modificado de Werren, et al., 2008.

2.2 Taxonomía de *Wolbachia*

La taxonomía de *Wolbachia* ha sido poco estudiada, existiendo actualmente una propuesta realizada por el grupo de Ramírez y colaboradores en 2015, en donde clasifican a *Wolbachia* dentro de seis supergrupos filogenéticos (Figura 2), que van de la A hasta la F. El supergrupo A corresponde a “*Candidatus Wolbachia bourtzisii*” que es endosimbionte de artrópodos del orden Hemiptera en particular a especies de la familia Dactylopiidae, el grupo Ba “*Candidatus Wolbachia pipientis*” que es endosimbionte de artrópodos del orden Diptera, el grupo C conformado por dos especies “*Candidatus Wolbachia onchocericola*” asociada con nemátodos del género *Onchocerca*, y “*Candidatus Wolbachia blaxteri*” que se asocia con *Dirofilaria immitis*. El grupo D está constituido de igual manera por dos especies: “*Candidatus Wolbachia brugii*” que se localiza en nemátodos de los géneros *Brugia* y *Wuchereria* y “*Candidatus Wolbachia taylori*” en nematodos del género *Litomosoides*; el grupo E cuenta con una especie “*Candidatus Wolbachia collembolica*” que es endosimbionte de artrópodos del orden Collembola y finalmente el grupo F integrado por una sola especie “*Candidatus Wolbachia multihospitum*”, endosimbionte de tres especies *Cimex lectularius*, *Osmia caerulea* y *Mengenilla moldrzyki* de los grupos Hemiptera, Hymenoptera y Strepsiptera respectivamente (Ramírez et al., 2015).

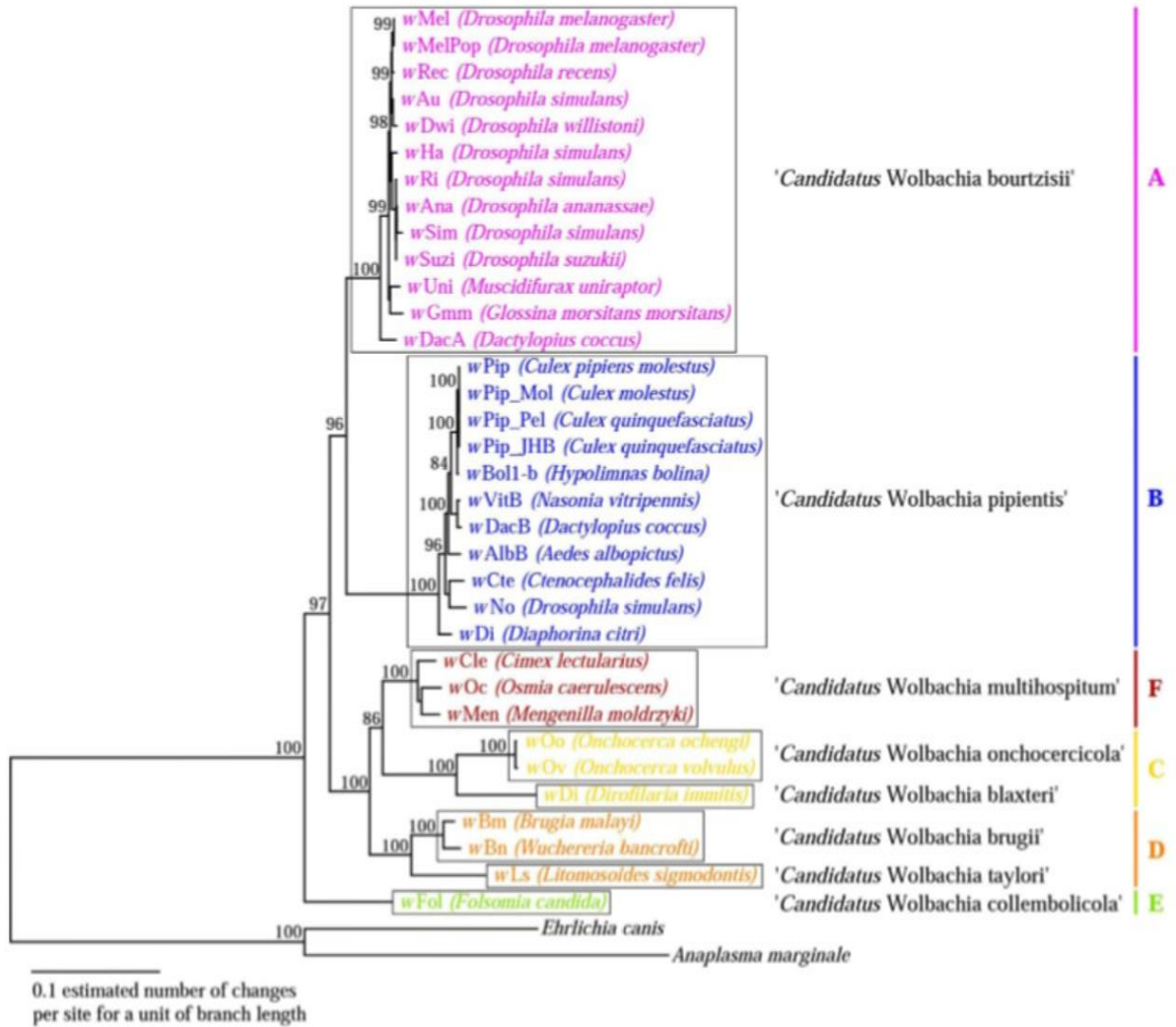


Figura 2.- **Árbol filogenómico de *Wolbachia***: Muestra relaciones evolutivas entre cepas de *Wolbachia*, basadas en un alineamiento concatenado de 31 proteínas y analizadas con el modelo de sustitución JTT. Los hospederos para cada cepa están indicados entre paréntesis. Las cepas incluidas en las nuevas designaciones para cada nombre de especie están enmarcadas en recuadros grises. Los nombres de las especies propuestas se muestran al lado de las casillas. Los supergrupos se muestran a la derecha con letras de la A a la E. Los números en los puntos de ramificación representan valores de soporte bootstrap basados en 1000 réplicas. La barra de escala representa la cantidad estimada de cambios de aminoácidos por sitio para una unidad de longitud de rama. Tomado y Modificado de Ramírez et al., 2015

2.3 Vía de Transmisión de *Wolbachia*

Wolbachia se transmite de manera vertical a través del citoplasma del óvulo en todos los grupos de hospederos con los que se asocia (Jeyaprakash y Hoy 2000) (Figura 3). En general se reconoce la existencia de cuatro formas particulares de transmisión, los cuales

son dependientes completamente del linaje de *Wolbachia* para ambos sexos de los progenitores.

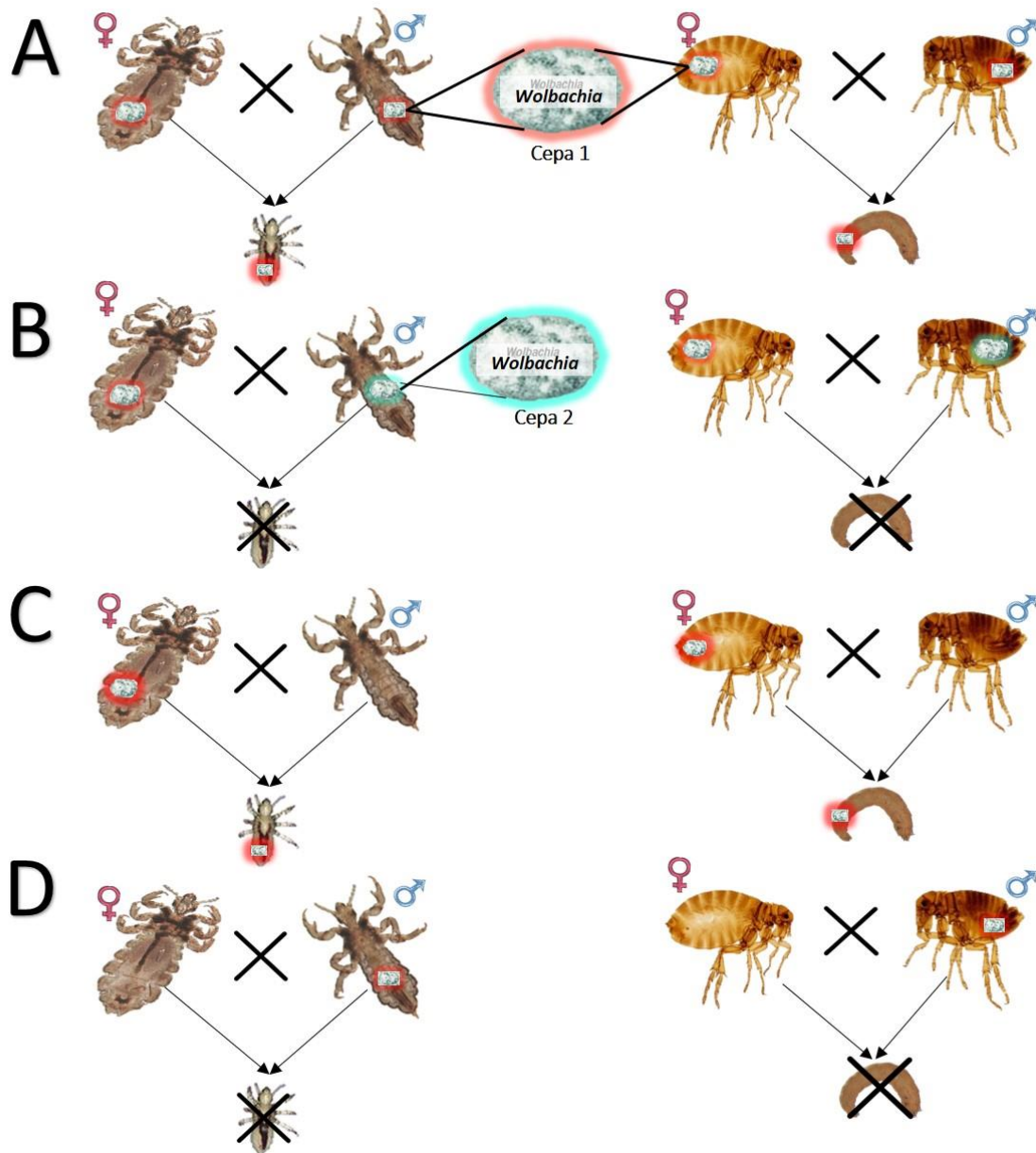


Figura 3.- **Vía de Transmisión de *Wolbachia*:** Se muestra los cuatro casos de transmisión horizontal. A.- ambos hospederos poseen la misma cepa de *Wolbachia* y su descendencia es viable. B.- Ambos hospederos cuentan con cepas diferentes de *Wolbachia*, lo que da por resultado una progenie no viable, ya que no se da el rescate citoplasmico. C.- Solo la hembra posee *Wolbachia*, al estar en el citoplasma de los ovulos, la descendencia es viable y posee *Wolbachia*. D.- Cuando solo el macho posee *Wolbachia* la progenie no es viable ya que no se puede dar el rescate citoplasmico, por lo tanto no hay descendencia.

2.4 Interacciones con el Hospedero

Una característica clave de *Wolbachia* es su capacidad de manipular los procesos celulares y reproductivos de los hospederos. Hasta el momento se han descrito cuatro mecanismos, tres de los cuales son perjudiciales para los machos: la muerte de los machos, la feminización, la inducción de la partenogénesis y la incompatibilidad citoplásmica (Werren 2008).

2.5 Muerte de los machos

La muerte de los machos inducida por *Wolbachia* (Figura 4) se ha descrito en cuatro órdenes diferentes de artrópodos: Coleópteros (Fialho et al., 2000), Dípteros (Dyer et al., 2004), Lepidópteros (Jiggins et al., 2001) y Pseudoscorpiones (Zeh et al., 2005). En cada infección descrita, la muerte de los machos producida por *Wolbachia* ocurren principalmente durante la embriogénesis, lo que puede dar más alimento a la progenie femenina (Charlat et al., 2007 y Hornett et al., 2006).

2.6 Feminización

La feminización inducida por *Wolbachia* (Figura 4) se describió por primera vez en los isópodos, y se describió más recientemente en los insectos, en los que se produce a través de diferentes mecanismos. En varias especies de isópodos del orden Oniscidea se ha demostrado que *Wolbachia* prolifera dentro de la glándula androgénica, lo que conduce a la hipertrofia de la glándula androgénica y la inhibición de la función. En consecuencia, los machos genéticos se desarrollan como hembras (Vandekerckhove et al., 2003). Por el contrario en los insectos el mecanismo de feminización es incierto, sin embargo *Wolbachia* parece interferir con la vía de la determinación del sexo y debe actuar continuamente

durante el desarrollo para una feminización completa (Hiroki et al., 2002 y Negri et al., 2008).

2.7 Inducción a la partenogénesis

La partenogénesis inducida por *Wolbachia* (Figura 4). es poco común hasta ahora sólo se ha documentado en especies con desarrollo arrenotoco (en las cuales los machos se desarrollan a partir de huevos no fertilizados), como ácaros e himenópteros. En lugar de producir crías machos a partir de huevos no fertilizados, las hembras infectadas producen hijas (partenogénesis telitoca, las hembras se desarrollan a partir de huevos no fertilizados), que a diferencia de los machos son capaces de transmitir las bacterias a sus descendientes. Al igual que CI, *Wolbachia* causa la interrupción del ciclo celular durante el desarrollo embrionario temprano, lo que resulta en desarrollo diploide en huevos no fertilizados (Stouthamer et al., 1990, Weeks et al., 2001 y Arakaki et al., 2001)

2.8 Incompatibilidad citoplásmica (CI)

El CI es la alteración reproductiva más común causada por *Wolbachia* y ha sido descrito en varios órdenes de arácnidos, isópodos e insectos (Figura 4). El esperma de los machos infectados con la bacteria es incompatible con los huevos de hembras que no tienen la misma cepa de *Wolbachia*. El fenómeno comprende dos componentes distintos: modificaciones inducidas por *Wolbachia* en los espermatozoides durante la espermatogénesis y el rescate de esta modificación en embriones infectados con la misma cepa. Si el esperma es modificado, pero la cepa de *Wolbachia* apropiada no está presente en el embrión en desarrollo, el desarrollo embrionario se interrumpe (Werren 1997).

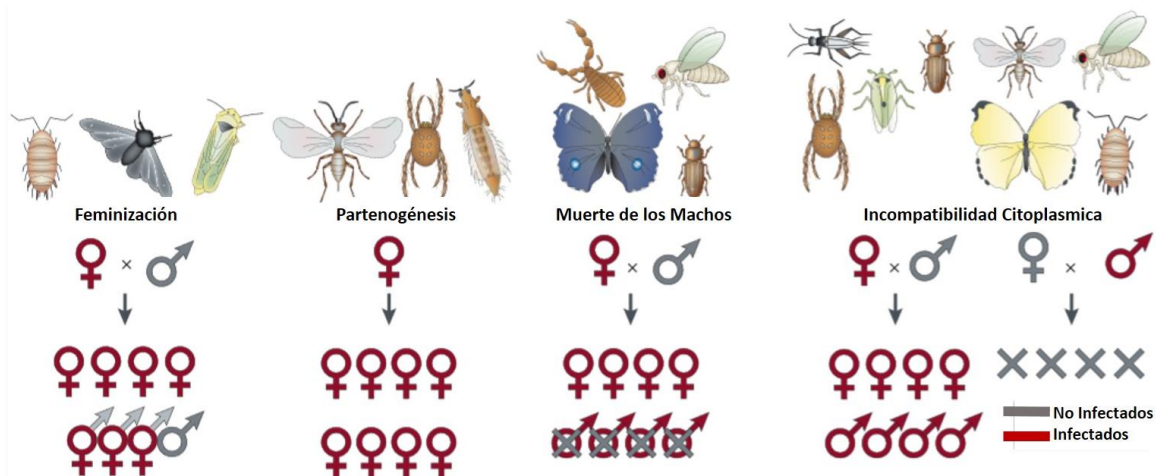


Figura 4. **Interacciones entre el hospedero y *Wolbachia*:** *Wolbachia* causa cuatro fenotipos reproductivos distintos en una gama de órdenes de artrópodos. La feminización resulta que machos genéticos se desarrollan como hembras (en los órdenes Hemiptera, Isopoda y Lepidoptera). La inducción de partenogénesis elimina a los machos de la reproducción (en los órdenes de Acari, Hymenoptera y Thysanoptera). La muerte de los machos que elimina a los machos infectados con la ventaja de que sobrevivan las hembras infectadas (en los órdenes de Coleópteros, Dípteros, Lepidópteros y Pseudoscorpiones). La incompatibilidad citoplasmática impide que los machos infectados se apareen con éxito con las hembras que carecen de los mismos tipos de *Wolbachia* (en los órdenes Acari, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Isopoda, Lepidoptera y Orthoptera). Tomado y modificado de Werren, et al., 2008.

2.9 *Wolbachia* como control biológico

Wolbachia ha sido estudiada y probada como medida de control de enfermedades emergentes en diferentes países por su actividad contra diversos patógenos como arbovirus, erlichias y rickettsias entre otros; se ha reportado que puede ser un posible control de tipo biológico ya que provee protección a los diferentes artrópodos, dentro de los cuales los grupos potenciales para este tipo de control biológico son los vectores (mosquitos, pulgas, piojos y garrapatas) esto debido a que *Wolbachia* utiliza diferentes mecanismos para eliminar patógenos de su hospedero, los cuales son: la competencia por recursos, preactivación del sistema inmune, la inducción de la cascada fenoloxidasa y la inducción de micro-RNAs dependientes de vías del sistema inmune, estos mecanismos han sido bien estudiados como parte de la respuesta inmune de los artrópodos, sin embargo aún no está

claro cómo es que *Wolbachia* modula la respuesta inmune de su hospedero (Kamtchum et al., 2017).

La intensidad de la infección por *Wolbachia* está influenciada por varios factores, entre ellos: la cepa de *Wolbachia*, la especie del hospedero, temperatura y la densidad de las crías de los hospederos (Wiwatanaratnabutr y Kittayapong, 2006; 2009).

La infección por *Wolbachia*, la diversidad y la distribución han sido estudiados en muchos artrópodos, como los isópodos (Cordaux et al., 2012), grillos (Jeong et al., 2012), moscas de la fruta (O ' Neill et al., 1992), copépodos (Wiwatanaratnabutr, 2013), en insectos con potencial de ser vectores como pulgas (Jeyaprakash and Hoy, 2000), garrapatas (Noda et al., 1997) ; piojos (Kyei et al., 2005) y nematodos filariales (Werren et al.,2008).

3. Antecedentes de *Wolbachia*

El primer registro de *Wolbachia* en México fue en el 2008 al estudiar dos poblaciones de una especie del orden Hymenoptera en Xalapa, Veracruz y en Georgia Estados Unidos, en este estudio se detectó la presencia de *Wolbachia* en ambas poblaciones. Posteriormente, en 2011 se realizó un estudio en dos especies de insectos (*Diaphorina citri* del orden Hemiptera y *Tamarixia radiata* del orden Hymenoptera) que se recolectaron en varios estados del país, en ese mismo año se buscó la presencia de *Wolbachia* en *Anastrepha striata* y *A. ludens* del orden Diptera en Tapachula, Chiapas, en el cual se detectó únicamente en *A. ludens*, en la cual implican a *Wolbachia* como un método de control de plagas (Lule-Chávez et al. 2011).

En el año 2012 se realizó un estudio en *Lutzomyia cruciata*, principal vector de *Leishmania*, en el cual no se detectó la presencia de ADN de *Leishmania*, sin embargo se

detectó la presencia de ADN de *Wolbachia* en un grupo de *L. cruciata* colectadas y se registró por primera vez la infección natural con *Wolbachia* en una población silvestre de *L. cruciata* y este resultó de gran interés para el desarrollo de estrategias que permitan el manejo de *Wolbachia* para el control genético de los vectores de la leishmaniasis. En 2015 Ramírez-Puebla et al. realizaron un acercamiento a la filogenia de *Wolbachia*, ya que existe un gran problema al clasificar esta especie porque solo se reconoce una especie “*Wolbachia pipientis*” descubierta por Hertig y Wolbach en 1924 y las subsecuentes *Wolbachias* identificadas se clasifican como cepas. Esto es de gran interés ya que los clados de la filogenia se agrupan en 6 grupos de la A – F dependiendo de los hospederos en los que se encuentran (figura. 2). Estos grupos se propusieron como candidatos para formar diferentes especies dentro del genero *Wolbachia*. Se revelaron 2 genomas de *Candidatus Wolbachia bourtzisii* wDacA y *Candidatus Wolbachia pipientis* provenientes de una población de cochinillas (*Dactylopius coccus*) (Ramírez-Puebla et al., 2016).

En el 2017 se publicaron dos artículos en México relacionados con *Wolbachia* el primero fue un estudio en donde se analizaron 1,030 hembras de *Anastrepha serpentina* para identificar la prevalencia de *Wolbachia* en los estados de Chiapas, Hidalgo, Michoacán, Veracruz, Morelos, Campeche y Oaxaca y se obtuvo que el 15% de las moscas colectadas en la región Tuxtla Chico, Chiapas tienen una prevalencia de 3.75%, sin embargo, se requiere de mayor esfuerzo de muestreo para identificar con precisión la prevalencia de *Wolbachia* dentro de las poblaciones de *A. serpentina* (Morán-Aceves et. al., 2017) y el segundo estudio se centro en identificar mediante biología molecular a los diversos patógenos que tienen los ectoparásitos (pulgas, piojos o garrapatas) recolectados del refugio para perros en Gomez Palacio, estado de Durango, México de cien perros de diferentes

razas y edades, desde 1 mes a 10 años en el cual solo una pulga de *Ctenocephalides felis* fue positiva a *Wolbachia pipientis* con un 99% de identidad. Este es el primer trabajo en México en donde se identificó a *Wolbachia* en ectoparásitos de importancia médico-veterinaria en animales domésticos, sin embargo, es importante la identificación de esta bacteria ya que por su efecto protector contra organismos patógenos dentro del hospedero puede disminuir la transmisión de patógenos de vectores a diversos hospederos vertebrados, incluido el ser humano (Morán-Aceves et. al., 2017).

Cuadro 1.- Estudios de *Wolbachia* en México.

Especie de patógeno	Vector/ Hospedero	Localidad	Municipio/ Estado	Año	Referencia
<i>Wolbachia</i>	<i>Melittobia digitata</i> Dahms	México/ Georgia	Xalapa/Veracruz Athens	2008	(Copeland et al., 2008)
<i>Wolbachia</i>	<i>Diaphorina citri</i> / <i>Tamarixia radiata</i>	México	Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Coahuila, Colima, Michoacán, Nuevo León, Quintana Roo, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán	2011	(Lule-Chávez et al., 2011)
<i>Wolbachia</i>	<i>Anastrepha striata</i> / <i>A. ludens</i>	México	Tapachula, Chiapas	2011	(Martínez et al., 2011)
<i>Wolbachia</i>	<i>Lutzomyia cruciata</i>	México	Chiapas	2012	(Mikery-Pacheco et al., 2012)
Candidatus (<i>Wolbachia bourtzisii</i> , <i>Wolbachia onchocercicola</i> , <i>Wolbachia blaxteri</i> , <i>Wolbachia brugii</i> , <i>Wolbachia taylori</i> , <i>Wolbachia collemboicicola</i> y <i>Wolbachia multihospitum</i>)		México		2015	(Ramírez-Puebla et al., 2015)
Candidatus <i>Wolbachia bourtzisii</i> wDacA, Candidatus <i>Wolbachia pipientis</i> wDacB	<i>Dactylopius coccus</i>	México	Morelos, Tlaxcala, Estado de México, Querétaro, Hidalgo, Oaxaca,	2016	(Ramírez-Puebla et al., 2016)
<i>Wolbachia</i>	<i>Anastrepha serpentina</i>	México	Chiapas, Hidalgo, Michoacan, Veracruz, Morelos, Campeche y Oaxaca.	2017	(Morán-Aceves et. al., 2017)
<i>Wolbachia</i>	<i>Heterodoxus spiniger</i> , <i>Ctenocephalides felis</i>	México	Durango	2017	(González-Alvarez et. al., 2017)

4. Hipótesis

Debido a que los miembros del género *Wolbachia* generan un fenómeno de interferencia con otros grupos patógenos de Rickettsiales y en la localidad analizada existen reportes previos de una baja prevalencia *Rickettsia* en piojos y pulgas, se espera identificar una elevada diversidad de linajes de *Wolbachia* en el área de estudio.

5. Objetivo general:

- Identificar la presencia de *Wolbachia* en piojos y pulgas asociados con mamíferos pequeños del Estado de Hidalgo

5.1 Objetivos particulares:

- Identificar morfológicamente los piojos y pulgas recolectados.
- Estandarización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Wolbachia* sp. mediante el uso de los cebadores wsp81f (Forward) y wsp691r (Reverse).
- Analizar las muestras recolectadas para la detección de *Wolbachia* sp.
- Identificar las cepas de *Wolbachia* mediante secuenciación.

6. Área de Estudio

El presente estudio se realizó en temporada de lluvia durante los meses de agosto a septiembre de 2015 en dos ranchos privados en el estado de Hidalgo. El primero fue en el Rancho Santa Elena que se encuentra ubicado en una región montañosa al norte de la Ciudad de México, en el municipio de Huasca de Ocampo, en el suroeste del Estado de

Hidalgo (20° 21' N, 98° 38' O), es una propiedad privada que favorece el ecoturismo y la reintroducción de venados, la vegetación es principalmente bosque de pino encino (INEGI, 2000) y es una localidad conservada. El segundo fue el Rancho Cruxtitla que se encuentra ubicado en el municipio de Mineral del monte que se localiza en el Estado de Hidalgo (20° 08' N, 98° 40' O), es una localidad fragmentada, con vegetación de bosque de pino (INEGI, 2000), las principales actividades son ganadería y agricultura.

7. Material y Método

7.1 Trabajo de Campo

7.1.1 Colecta de Mamíferos

Para ambas localidades se colocaron tres transectos de 40 trampas Sherman alejadas entre sí por cinco metros, durante tres noches efectivas. Las trampas fueron puestas en lugares con cobertura vegetal, y se utilizó un cebo de avena con vainilla (Romero-Almaraz et al., 2007). Las trampas se revisaron cada mañana y los ejemplares recuperados fueron individualizados en bolsas y se sacrificaron mediante inyección vía intraperitoneal de pentobarbital sódico y colocados en una cámara letal de CO₂

7.1.2 Colecta de Ectoparásitos

Para la colecta de ectoparásitos los hospederos se cepillaron contra pelo para recuperar los ectoparásitos. Adicionalmente se realizó una inspección visual de los mamíferos bajo un microscopio estereoscópico, recuperar los ectoparásitos restantes.

7.1.3 Preservación de Ectoparásitos

Para la preservación de los ectoparásitos se utilizaron tubos eppendorf® de 1.5 ml, etiquetados correctamente con la localidad, el hospedero en el que se colectó y un número de identificación. Los ectoparásitos fueron fijados con etanol al 100% y mantenidos en refrigeración a una temperatura de a -20°C hasta su procesamiento.

7.1.4 Identificación Morfológica de los Mamíferos

Los mamíferos recolectados se identificaron usando literatura especializada como Álvarez-Castañeda et al. (2017) y posteriormente se taxidermizaron y fueron depositados en el Museo de Zoología Alfonso L. Herrera de la Facultad de Ciencias de la UNAM, bajo el catálogo LRR 1-41.

7.2 Trabajo de Laboratorio

7.2.1 Identificación Morfológica de los Ectoparásitos

Para la identificación de los ectoparásitos estos fueron montados en laminillas mediante la técnica de Wirth y Marston (1968) y Kim et al. (1986). Se realizó una incisión en el abdomen con una aguja entomológica y los ejemplares se colocaron en una solución de KOH al 10% durante 72 horas para aclararlos. Se lavaron con agua destilada por 30 minutos y se trasladaron a ácido acético glacial al 10% durante 10 minutos. Se realizaron cambios en alcoholes graduales para deshidratarlos comenzando con alcohol al 40%, 70% y

96% durante 30 minutos en cada alcohol. Posteriormente, se colocaron en aceite de clavo durante 24 horas y se montaron con bálsamo de Canadá entre cubre y portaobjetos. Finalmente, se dejaron secar en una plancha durante semana o hasta que las preparaciones quedaron completamente secas. Las especies fueron identificadas utilizando claves especializadas como Kim et al.(1986) para piojos y Acosta y Morrone (2003), Hastriter (2004), Hopkins y Rothschild (1956, 1962, 1966), Linardi y Guimarães (2000), Stark (1958), Traub (1950) y Traub et al. (1983) para pulgas.

7.2.2 Extracción de DNA de pulgas y piojos

Se eliminó el alcohol de las muestras para poder realizar la extracción del DNA de los piojos y pulgas, a los cuales se le realizó un corte en el área ventral para que las enzimas del Kit comercial (DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN, USA) puedan degradar el tejido de los ectoparásitos y así extraer el DNA de los mismos (protocolo completo Anexo A).

7.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Una vez extraído el DNA se amplificó un fragmento de 600 pb el gen *wsp* que codifica la principal proteína de superficie de *Wolbachia* utilizando los oligonucleótidos propuestos por Zhou et al., 1998.

Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')
wsp81f (Forward)	5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3'
wsp691r (Reverse)	5'-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3'

La preparación de la mezcla de reacción se llevó a cabo en una campana de PCR para evitar la contaminación, por lo cual se esterilizó utilizando rayos UV durante 30 minutos. La mezcla de reacción se preparó en varios tubos Eppendorf con 5 µl de DNA, 12.5 µl de GoTaq® Green Mix Master (Promega) (solución premezclada, que contiene derivado de bacterias TaqDNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y buffer de reacción a concentraciones óptimas para la amplificación eficiente de plantillas de ADN por PCR.), 1 µl de cada oligonucleótido y 5.5 µl de agua, obteniendo un volumen final de 25 µl en cada tubo Eppendorf. Posteriormente, las muestras fueron cargadas en un termociclador (Eppendorf), en el cual se utilizó una temperatura de 94°C para la desnaturalización por 60 segundos, una temperatura de 55°C para la alineación por 60 segundos y una temperatura de 72°C para la elongación por 60 segundos, el cual se repitió 35 veces y así llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa.

$$\begin{array}{c}
 95^{\circ}\text{C}-2' \left[\begin{array}{c} 94^{\circ}\text{C}-1' \\ 55^{\circ}\text{C}-1' \\ 72^{\circ}\text{C}-1' \end{array} \right] 35x \\
 72^{\circ}\text{C}-1'
 \end{array}$$

Finalmente, los productos de PCR fueron almacenados a -20°C hasta su uso para la electroforesis.

7.2.4 Electroforesis

La electroforesis se realizó sobre geles de agarosa al 2%, y se les agregó 1.5 µl del fluorocromo Sayto 60 y se dejaron solidificar. Se colocó 2 µl de marcador de peso

molecular LMW en el primer pozo del gel y en los demás se colocaron los productos de PCR dejando los últimos pozos para las muestra positiva y negativa para *Wolbachia*, una vez terminada la electroforesis se compararon el tamaño de banda con el marcador de peso molecular en un fotodocumentador Odissey para identificar los ejemplares positivos (figura. 5).

7.2.5 Secuenciación

Las muestras positivas fueron cargadas en una placa de PCR y se enviaron a secuenciar a la Unidad de Secuenciación del Laboratorio de la Biodiversidad y la Salud en el Instituto de Biología de la UNAM acargo de la M en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar.

7.2.6 Análisis de datos

Una vez obtenidas las secuencias positivas, se compararon con otras secuencias de *Wolbachia* disponibles en Genbank (Benson et al., 2005), en el cual se realizaron alineamientos locales mediante el uso del algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1990). Posteriormente, se hizo un alineamiento global, con las secuencias generadas en este trabajo y las secuencias de referencia obtenidas de Genbank, con la ayuda del Software Mega 6.0 (Tamura, 2013) utilizando el algoritmo Clustal W y seleccionando el mejor modelo de sustitución con base al BIC (Bayesian Information Criterion) de más bajo puntaje. Además, la reconstrucción filogenética se realizó utilizando Maximum Likelihood y el soporte de las ramas se evaluó utilizando 10,000 réplicas de bootstrap (Figura. 6).

8. Resultados

8.1 Especies de Ectoparasitos encontrados

Se identificaron 43 mamíferos de cinco especies (28 *Peromyscus beatae*, 2 *Reithrodontomys sumichrasti*, 8 *Mus musculus*, 4 *Rattus norvegicus* y 1 *Sorex ventralis*) de los cuales se recuperaron 43 pulgas (15 ♀, 24 ♂, 8 indeterminadas) de cuatro especies (3 *Ctenophthalmus tecpin*, 3 *Jellisonia breviloba breviloba*, 7 *Peromyscopsylla hesperomys adelpha*, y 30 *Plusaetis mathesoni*) y 176 piojos (60 ♀, 39 ♂, 73 ninfas) de dos especies (4 *Hoplopleura reithrodontomydis* y 172 *Polyplax spinulosa*). No se recuperaron pulgas o piojos en *Mus musculus* y *Sorex veraecrucis* (Cuadro 2). Las especies *Mus musculus* y *Sorex ventralis* no se muestran en el cuadro 2 debido a que no se encontraron piojos o pulgas en ellos, sin embargo el cuadro completo se encuentra en el anexo B.

Cuadro 2.- Prevalencia de *Wolbachia* en piojos y pulgas de mamíferos pequeños de Hidalgo México.

Ectoparásitos Colectados					
<i>Peromyscus beatae</i> (Cricetidae) (28)					
Familia	Especie	EA	EI	%	BAD
Ceratophyllidae	<i>Jellisonia breviloba</i>	3	0	0	ND
	<i>Plusaetis mathesoni</i>	30	0	0	ND
Hystrichopsyllidae	<i>Ctenophthalmus teczpin</i>	3	2	66	<i>W. pipientis</i> (88%)
Leptopsyllidae	<i>Peromyscopsylla</i>	7	5	71.42	<i>W. pipientis</i> (98%)
	<i>hesperomys adelpha</i>				
<i>Reithrodontomys sumichrasti</i> (Cricetidae) (2)					
Familia	Especie	EA	EI	%	BAD
Hoplopleuridae	<i>Hoplopleura</i>	4	0	0	ND
	<i>reithrodontomydis</i>				
<i>Rattus norvegicus</i> (Muridae) (4)					
Familia	Especie	EA	EI	%	BAD
Polyplacidae	<i>Polyplax spinulosa</i>	172	0	0	ND

Hc: Hospederos colectados; EA: Abundancia de Ectoparásitos; EI: Ectoparásitos infectados; NR: No Recuperado; ND: Nodetectado; %; Prevalencia; BAD: Agentes bacteriano detectado.

Acorde con los parámetros ecológicos establecidos por Bush et al. (1997), la prevalencia se define como el porcentaje de huéspedes infectados/infestados por una especie de parásito.

8.2 Detección de DNA de *Wolbachia*

Se detectó la presencia de DNA de *Wolbachia* (Figura 5) en 2 especies de pulgas [(*Ctenophthalmus tecpin* (2/3=66%) y *Peromyscopsylla hesperomys adelpha* (5/7=71.42%)] de las 4 especies colectadas. En las dos especies de piojos no se detectó DNA de *Wolbachia* (Cuadro 2).

Las secuencias de *Ctenophthalmus tecpin* y *Peromyscopsylla hesperomys adelpha* tuvieron una homología de 88% y 98% respectivamente con *Wolbachia pipientis* (Cuadro 2).

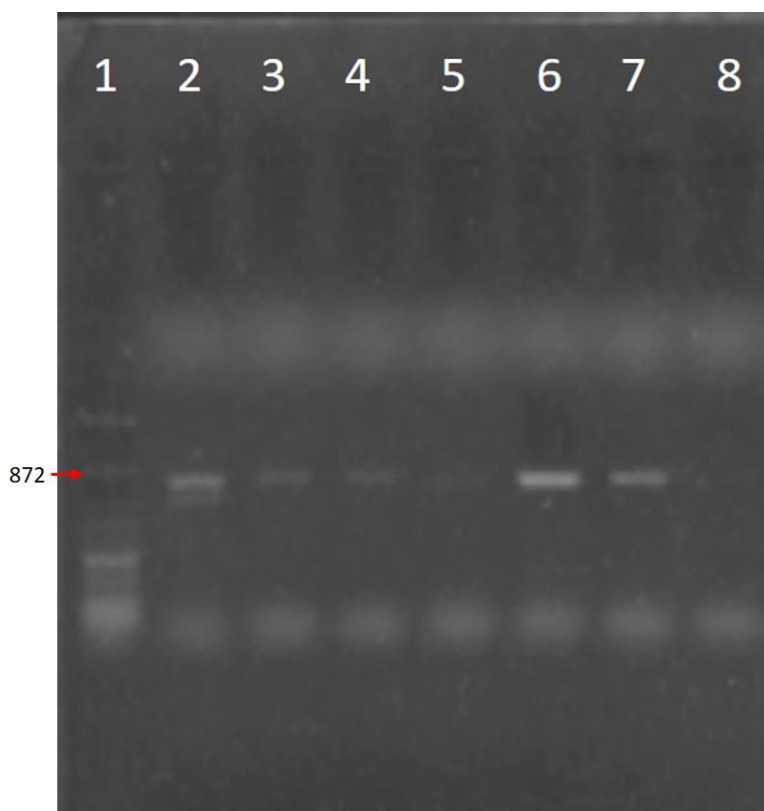


Figura 5.- **Electroforesis de los productos de PCR:** Carril 1: Marcador de peso molecular Φ X174; Carril 8: Control negativo (ddH₂O); Carril 3-7 Muestras positivas; Carril 2: C(+).

8.3 Análisis Filogénético

El análisis filogénético de Máxima Verosimilitud reveló que existen cuatro grupos genéticos. En el primero de ellos se encuentran todas las secuencias de endosimbiontes de *Wolbachia* obtenidas de GenBank, adicionalmente se agrupan tres secuencias positivas provenientes de pulgas, dos de *Ctenophthalmus tectpin* y una de *Peromyscopsylla hesperomys adelpha*.

Los tres grupos genéticos restantes están conformados por secuencias de *Wolbachia* obtenidas de una especie de pulga (*Peromyscopsylla hesperomys adelpha*).

Todas las pulgas positivas para *Wolbachia* fueron colectadas en 6 individuos diferentes de una sola especie de roedor, *Peromyscus beatae* (Figura 6).

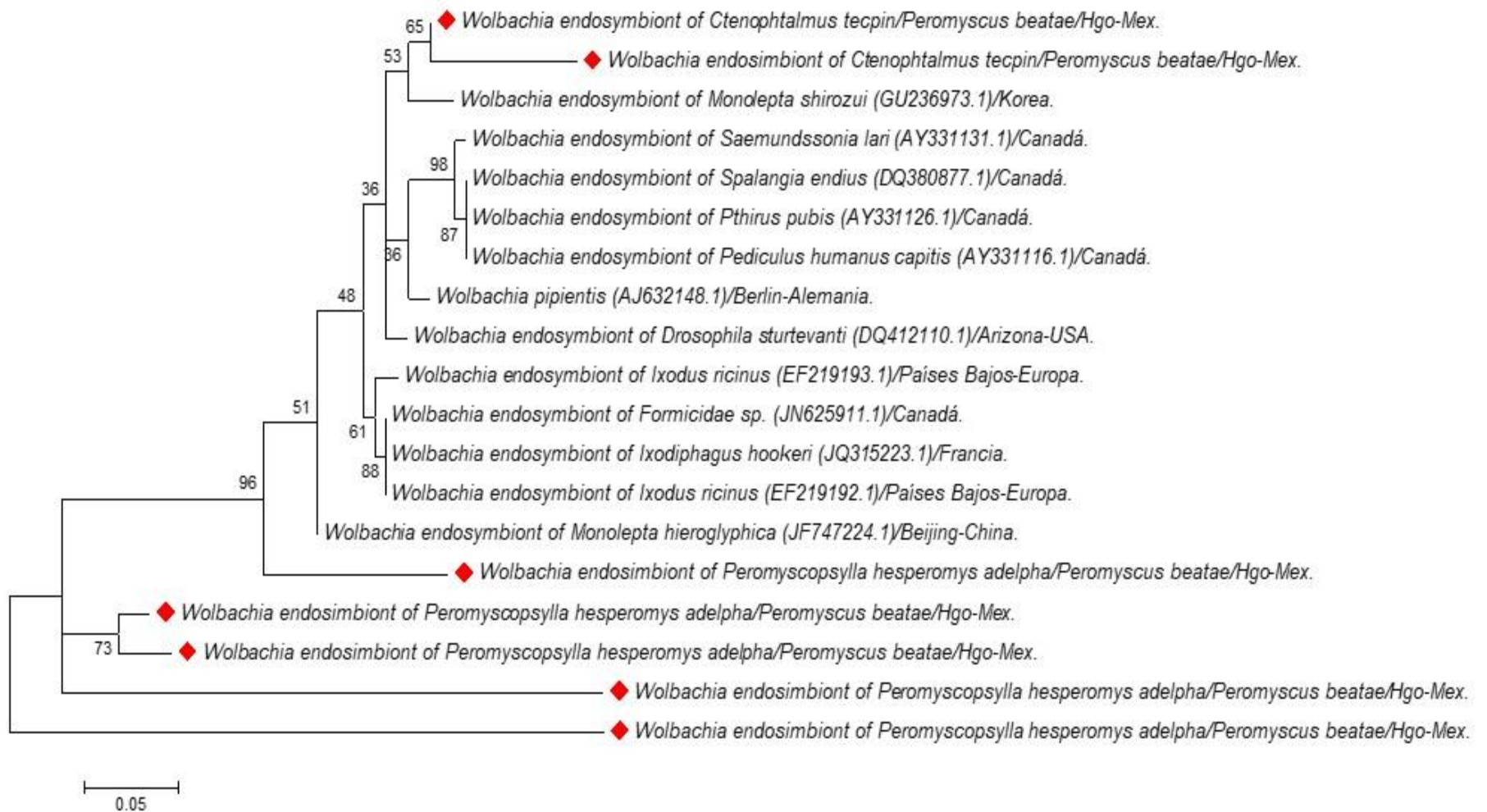


Figura 6.- **Árbol filogenético de máxima verosimilitud (ML) generado con el gen *wsp* de varios miembros del género *Wolbachia*.** El modelo de sustitución de nucleótidos fue el Modelo de tres parámetros Tamura (T92) con distribución Gamma discreta (+ G) los valores de Bootstrap superiores a 50 se indican en los nodos. El **♦** representa las secuencias obtenidas durante este trabajo.

9. Discusión

México tiene una gran diversidad de insectos, se estima que existen cerca de 97,462 especies (SEMARNAT 2012), de las cuales cerca de 386 especies son del Orden Phthiraptera, de las cuales 44 especies son piojos chupadores y 342 especies de piojos masticadores (Sánchez-Montes et al., 2013; 2018), y cerca de 172 especies son del Orden Siphonaptera (Acosta-Gutierrez, 2013). Estos son insectos de importancia médica-veterinaria ya que actúan como vectores de patógenos (como rickettsias y bartonellas), las cuales causan enfermedades emergentes y reemergentes, que representan un gran problema en la población humana. Por tal motivo resulta fundamental el monitoreo de estos vectores así como los endosimbiontes (como *Wolbachia*) que pueden fungir como controles biológicos que desplacen a estos patógenos, sin embargo hace falta una mayor fuerza de muestreo respecto a ectoparásitos ya que su registro a pesar de ser basto no sabemos mucho a cerca de su distribución.

Es la primera vez que se registran las especies de pulgas *Ctenophthalmus tecpin* y *Peromyscopsylla hesperomys adelpha* y la especie de piojo (*Polyplax spinulosa*) en el estado de Hidalgo, ya solo se tiene registro de *Ctenophthalmus tecpin* en los estados de San Luis Potosí, Veracruz, Puebla, Guerrero y Oaxaca (Salceda-Sánchez et al., 2006), de *Peromyscopsylla hesperomys adelpha* en Michoacán, Estado de México y Nuevo León (Acosta-Gutierrez et al., 2006) y de *Polyplax spinulosa* en el Estado de México y Yucatán (Sánchez-Montes et al., 2013) contribuyendo a nuevos registros de estos vectores.

Este es el primer trabajo en donde se ve incriminado a *Wolbachia* en poblaciones de piojos y pulgas de mamíferos silvestres en Hidalgo, en donde previamente se identificó tifo murino en baja prevalencia, por lo cual la presencia de *Wolbachia* es un factor importante en la ecología de las bacterias patógenas que están en circulación en las poblaciones de ectoparásitos principalmente en pulgas. Con el análisis molecular y la reconstrucción filogenética se identificaron cinco clados de los cuales el clado más lejano es el que se encontró en la pulga *Ctenophthalmus tecpin* mientras que los otros cuatro clados más cercanos pertenecen a la especie *Peromyscopsylla hesperomys adelpha* esto habla de que podría existir especificidad a nivel de género con el hospedero ya que cada cepa de *Wolbachia* que se encuentre como endosimbionte en un género de insecto será diferente, con base en esto se esperaría que las siete especies restantes del género *Ctenophthalmus* y la especie restante del género *Peromyscopsylla* tendrían el endosimbionte por su cercanía filogenética con las especies antes mencionadas, ya que, al ser de transmisión vertical es posible que el ancestro en común de los géneros antes mencionados tuviese el endosimbionte *Wolbachia*. Dado que en estudios previos no se detectó la presencia de agentes rickettsiales en piojos y pulgas, se optó por buscar *Wolbachia* en las mismas muestras de ectoparásitos debido al fenómeno de interferencia y eliminación de patógenos del hospedero y se encontró que las prevalencias de *Wolbachia* son elevadas (66% para *Ctenophthalmus tecpin* y 71.42% para *Ctenophthalmus tecpin*) por lo cual es posible pensar que este género bacteriano está interfiriendo en la transmisión de patógenos principalmente rickettsiales.

Wolbachia es una bacteria endosimbionte con potencial de biocontrol, el cual mediante la manipulación del sistema inmune de su hospedero le provee de protección contra diversos

virus y bacterias (Kamtchum et al., 2016). Esta bacteria tiene el beneficio de ser más benigna para el medio ambiente que los enfoques basados en insecticidas y potencialmente más rentable, además del efecto protector contra otros patógenos algunas cepas de *Wolbachia* ayudan a reducir la vida útil de los vectores de importancia epidemiológica y por lo tanto el potencial de disminuir la transmisión de la enfermedad, esto se ha demostrado principalmente en mosquito *Culex pipiens* (Yen y Barr, 1973), *C. quinquefasciatus*, *Aedes fluviatilis* (Moreira et al., 2009) y *A. albopictus* (Sinkins et al., 1995). Así como y en la mosca de la fruta *Drosophila* (Min y Benzer, 1997). Sin embargo, aún no se ha probado en ectoparásitos del Orden Phthiraptera y del Orden Siphonaptera, vectores importantes de enfermedades como tifo murino, rickettsiosis o bartonelosis con cuadros de fiebre de origen desconocido que afecta a el sector rural principalmente.

Este trabajo es un acercamiento importante para seguir estudiando las poblaciones de vectores en poblaciones silvestres, ya que, gracias a esto podremos implementar programas para el control de enfermedades emergentes desde los vectores y así reducir el riesgo para las poblaciones rurales, mediante el desarrollo de cepas como wMelpop que aumenta la mortalidad de huevos, acortamiento de la vida de los insectos (Ritchie et al., 2015). Adicionalmente resulta prioritario identificar los mecanismos en los cuales *Wolbachia* interviene dentro de su hospedero y así poder extrapolar esos mecanismos a otros endosimbiontes e incluso directamente a los vectores gracias a la ingeniería genética y biotecnología, proporcionando así un control eficaz de diversas enfermedades producidas por bacterias, virus, hongos y protozoarios (Werren, et al., 2008).

10. Conclusiones

- ❖ Nuevos registros geográficos del piojo (*Polyplax spinulosa*) y de las pulgas (*Ctenophthalmus tecpin* y *Peromyscopsylla hesperomys adelpha*).
- ❖ Primer registro de *Wolbachia* en ectoparásitos asociados con fauna silvestre en México.
- ❖ Primer registro de *Wolbachia* en pulgas del estado de Hidalgo, México.
- ❖ Se encontraron cinco linajes de *Wolbachia* asociados a dos géneros de pulgas (*Peromyscopsylla* y *Ctenophthalmus*).

11. Referencias:

- Acosta-Gutiérrez R. y J. J. Morrone L. (2003). **Clave ilustrada para la identificación de los taxones supraespecíficos de Siphonaptera de México**. Acta Zoológica Mexicana, Nueva Serie 89: 39–53.
- Acosta-Gutiérrez R, Fernández, J. A., y Falcón-Ordaz, J. (2006). **New records of mammal fleas (Siphonaptera) in northern and central Mexico**. Entomological News, 117(1): 69-72.
- Acosta-Gutiérrez R. (2013) **Biodiversidad de Siphonaptera en México**. Revista Mexicana de Biodiversidad, Supl. 85: S345-S352.
- Altschul SF., Gish W., Miller W., Myers EW. y Lipman DJ. (1990). **Basic local alignment search tool**. Journal of Molecular Biology 215: 403-410.
- Álvarez-Castañeda Sergio Ticul, Álvarez Ticul y González-Ruiz Noé. (2017). **Guía para la identificación de los mamíferos de México**. Baltimore (Md.). Johns Hopkins university press.
- Anuario Estadístico Hidalgo Edición (2000) [Gobierno del Estado de Hidalgo (Secretaría de Desarrollo Social) – INEGI].
- Arakaki, N., Miyoshi, T. y Noda H. (2001). **Wolbachia mediated parthenogenesis in the predatory thrips Frankliniopsis vespiformis (Thysanoptera: Insecta)**. Proceedings of the. Royal Society of London. Series B.268: 1011–1016.
- Benson DA., Karsch MI., Lipman DJ., Ostell J. y Wheeler DL. (2005). **GenBank**. Nucleic Acids Research, 33: D34-38
- Bush AO., Lafferty KD. y Lotz JM. (1997). **Parasitology meets ecology on its own terms**. Journal of Parasitology 83: 575-583.
- Charlat, S., Reuter M., Dyson EA., Hornet EA., Duploux A., Davies N., Roderick GK., Wedell N. y Hurst GD. (2007). **Male-killing bacteria trigger a cycle of increasing male fatigue and female promiscuity**. Current Biology. 17: 273–277.
- Copeland Claudia S., Matthews Robert W., González Jorge M., Aluja Martin, y Sivinski John. (2008). **Wolbachia in two populations of Melittobia digitata Dahms (Hymenoptera: Eulophidae)**. Neotropical Entomology, 37(6): 633-640.
- Cordaux R., Pichon Samuel, Afia Hatira Houda Ben, Doublet Vincent, Grève Pierre, Marcadé, Braquart-Varnier Christine, Souty-Grosset Catherine, Charfi-Cheikhrouha Faouzia y Bouchon Didier. (2012) **Widespread Wolbachia infection in terrestrial isopods and other crustaceans** Zookeys, 176: 123–131.
- Coordinación de Información y Servicios Externos, Conabio, Semarnat. México. 2012.
- Dobson S.L., Bourtzis K., Braig H.R., Jones B.F., Zhou W., Rousset F., O'Neill S.L. (1999). **Wolbachia infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues**. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 29: 153–160.
- Dyer K. A., y Jaenike J. (2004). **Evolutionarily stable infection by a male-killing endosymbiont in Drosophila innubila: molecular evidence from the host and parasite genomes**. Genetics 168: 1443–1455.
- Fialho R. F. y Stevens, L. (2000). **Male-killing Wolbachia in a flour beetle**. Proceedings of the. Royal Society of London. Series B.267: 1469–1473.

- González-Álvarez Vicente Homero, Fernández de Mera Isabel G., Cabezas-Cruz Alejandro, de la Fuente José, Ortega-Morales Aldo I. y Almazán Consuelo. (2017). **Molecular survey of Rickettsial organisms in ectoparasites from a dog shelter in Northern Mexico.** Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports. 10: 143-148.
- Hastriter, M. W. 2004. **Revision of the flea genus *Jellisonia* Traub, 1944 (Siphonaptera: Ceratohpyllidae).** Annals of the Carnegie Museum 73:213-238.
- Hertig M., Wolbach S.B.(1924). **Studies on rickettsia-like microorganisms in insects.** Journal of Medical Research.44: 329–374.
- Hertig M. (1936). **The rickettsia *Wolbachia pipientis* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquitos *Culex pipiens*.** Parasitology, 28: 453–486.
- Hiroki, M., Kato, Y., Kamito, T. & Miura, K.(2002). **Feminization of genetic males by a symbiotic bacterium in a butterfly, *Eurema hecabe* (Lepidoptera: Pieridae).** Naturwissenschaften 89: 167–170.
- Hopkins, G. H. & M. Rothschild. (1956). **An illustrated catalogue of the Rothschild collection of fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History) II. Coptosyllidae, Vermipsyllidae, Stephanocircidae, Ischnopsyllidae, Hypsophthalmidae and Xiphiosyllidae [Macropsyllidae].** British Museum (N.H.): 445.
- Hopkins, G. H. & M. Rothschild. (1962). **An illustrated catalogue of the Rothschild collection of fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History) III. Hystrichopsyllidae (Acedestiinae, Anomiopsyllinae, Hystrichopsyllinae, Neopsyllinae, Rhadinopsyllinae and Stenoponiinae).** British Museum (N.H.): 560.
- Hopkins, G. H. & M. Rothschild. (1966). **An illustrated catalogue of the Rothschild collection of fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History) IV. Hystrichopsyllidae (Cetnophthalmidae, Dinopsyllinae, Doratopsyllinae and Listropsyllinae).** British Museum (N.H.): 549.
- Hornett, E. A., Charlat S., Duploux Anne MR., Davies Neil, K. Roderick George, Wedell Nina y Hurst Gregory D. D. (2006). **Evolution of male-killer suppression in a natural population.** PLoS Biol. 4: e283.
- Jeong G., Ahn J., Jang Y. (2012). ***Wolbachia* infection in the *Loxoblemmus* complex (Orthoptera: Gryllidae) in Korea.** Journal of Asia-Pacific Entomology. 15: 563–566.
- Jeyaprakash, A. and Hoy, M. (2000). **Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species.** Insect Molecular Biology, 9(4): 393-405.
- Jiggins, F. M., Hurst, G. D., Schulenburg, J. H. & Majerus, M. E. (2001). **Two male-killing *Wolbachia* strains coexist within a population of the butterfly *Acraea encedon*.** Heredity 86: 161–166.
- Kamtchum Tatuene Joseph, L. Makepeace Benjamin, Benjamin Laura. Baylis Matthew y Solomon Tom. (2017). **The potential role of *Wolbachia* in controlling the transmission of emerging human arboviral infections.** Current Opinion in Infectious Diseases. 30(1): 108–116.
- Kim KC, Pratt HD y CJ Stojanovich (1986) **The sucking lice of North America: an illustrated manual for identification.** The Pennsylvania State University Press, University Park and London, 241.

- Kyei-Poku G. K., Colwell D. D., Coghlin P., Benkel B., Floate K. D. (2005). **On the ubiquity and phylogeny of *Wolbachia* in lice.** *Molecular Ecology*. 14: 285–294.
- Linardi M. P. y L. R. Guimarães. 2000. **Sifonápteros do Brasil.** Museu de Zoologia, São Paulo. 291.
- Lule-Chávez Amalia Nadin, González-Hernández Alejandro, Basurto-Ríos Regina e Ibarra Jorge E. (2011). **Detection Of The Endosymbiont *Wolbachia* In Mexican Populations Of *Diaphorina Citri* And *Tamarixia Radiata*.** 2° Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México.
- Martínez H., Toledo J., Liedo P., Mateos M. (2012). **Survey of heritable endosymbionts in southern Mexico populations of the fruit fly species *Anastrepha striata* and *A. ludens*.** *Current Microbiology*. 65(6):711-8.
- Mikery-Pacheco, Oscar, Marina-Fernández, Carlos, Ibáñez-Bernal, Sergio, Sánchez-Guillen, Daniel, Y Castillo-Vera, Alfredo. (2012). **Infeción natural de *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) con *Wolbachia* en cafetales de Chiapas, México.** *Acta zoológica mexicana*, 28(2), 401-413.
- Min KT, Benzer S. (1997). ***Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94(20):10792-6.
- Morán-Aceves Brenda M, Martínez-Montoya Humberto, Torres-De los Santos Rodolfo, Guillén-Navarro G. Karina, Oropeza-Cabrera Azucena y Toledo Jorge. (2017). **Prevalencia De *Wolbachia* En Hembras De *Anastrepha Serpentina* Wied. (Diptera: Tephritidae) De México.** *Entomología mexicana*. 4: 138–143.
- Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, van den Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL. (2009). **A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*.** *Cell*. 139(7):1268-78.
- Negri, I., Pellicchia, M., Mazzoglio, P. J., Patetta, A. & Alma, A. (2008). **Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/XO sex determination system.** *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*. 273: 2409–2416.
- Noda H., Munderloh U. G. & Kurtti T. J. (1997). **Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals.** *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3926–3932.
- O'Neill S.L., Giordane R., Colbert A.M.E. (1992). **16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with CI in insects** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89: 2699–2702.
- Ramírez-Puebla ST, Servín-Garcidueñas LE, Ormeño-Orrillo E, Vera-Ponce de León A, Rosenblueth M., Delaye L, Martínez J., Martínez-Romero E. (2015). **Species in *Wolbachia*? Proposal for the designation of 'Candidatus *Wolbachia bourtzisii*', 'Candidatus *Wolbachia onchocercicola*', 'Candidatus *Wolbachia blaxteri*', 'Candidatus *Wolbachia brugii*', 'Candidatus *Wolbachia taylori*', 'Candidatus *Wolbachia collembolicola*' and 'Candidatus *Wolbachia multihospitum*' for the different species within *Wolbachia* supergroups.** *Systematic and Applied Microbiology*. 38(6):390-9.

- Ramírez-Puebla Shamayim T, Ormeño-Orrillo Ernesto, Vera-Ponce de León Arturo, Lozano Luis, Sanchez-Flores Alejandro, Rosenblueth Mónica y Martínez-Romero Esperanza. (2016). **Genomes of *Candidatus Wolbachia bourtzisii* wDacA and *Candidatus Wolbachia pipientis* wDacB from the cochineal insect *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Dactylopiidae)**. *G3: Genes Genomes Genetics*. 6(10): 3343-3349.
- Riegler M., O'Neill, S.L. (2006) **The genus *Wolbachia***. M.M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, Schleifer K.H., Stackebrandt E. (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. Vol. 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclass (3rd ed.), Springer, New York, NY. 547–561.
- Ritchie Scott A., Townsend Michael, Paton Chris J., Callahan Ashley G. y Hoffmann Ary A. (2015). **Application of wMelPop *Wolbachia* Strain to Crash Local Populations of *Aedes aegypti***. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 9:e0003930.
- Romero-Almaraz ML, Sánchez-Hernández C, García-Estrada C y RD Owen (2007) *Mamíferos pequeños. Manual de técnicas de captura, preparación, preservación y estudio*. Las prensas de Ciencias. México, D. F. 201.
- Sanchez-Montes, S., Guzman-Cornejo, C., Leon-Paniagua, L., & Rivas, G. (2013). **A checklist of sucking lice (Insecta: Phthiraptera: Anoplura) associated with Mexican wild mammals, including geographical records and a host-parasite list**. *Zootaxa*, 3722(2), 183-203.
- Sánchez-Montes Sokani, Colunga-Salas Pablo, Álvarez-Castillo Lucia, Guzmán-Cornejo Carmen, y Montiel-Parra Griselda. (2018). **Chewing lice (Insecta: Phthiraptera) associated with vertebrates in Mexico**. *Zootaxa*, 4372(1), 1-109.
- Salceda-Sánchez Beatriz, Michael W. Hastriter. (2006): **A list of the fleas (Siphonaptera) of Mexico with new host and distribution records**. *Zootaxa* 1296: 29-43.
- Sinkins SP, Braig HR, O'Neill SL. (1995). ***Wolbachia pipientis*: bacterial density and unidirectional cytoplasmic incompatibility between infected populations of *Aedes albopictus***. *Experimental Parasitology*. 81(3):284-91.
- Stark, H. E. 1958. **The Siphonaptera of Utah**. U. S. Department of Health, Education, and Welfare, Atlanta, Georgia. 239 p.
- Stouthamer R., Luck, R. F. & Hamilton, W. D. (1990). **Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87: 2424–2427.
- Stouthamer R., Breeuwer J.A.J., Hurst G.D.D. (1999). ***Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction**. *Annual Review of Microbiology*. 53: 71–102.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. (2013). **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0**. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.
- Teixeira L, Ferreira A, Ashburner M. (2008). **The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster***. *PLOS Biology*. 6: 2753–2763.
- Traub, R. 1950. **Siphonaptera of Central America and Mexico: A morphological study of the aedeagus with descriptions of new genera and species**. *Fieldiana Zoology* 1:1-127.
- Traub, R. 1985. **Coevolution of fleas and mammals**. In *Coevolution of parasitic arthropods and mammals*, K. C. Kim (ed.). Wiley-Inter-Science, New York. 295-437.

- Vandekerckhove Tom, Watteyne Stefanie, Bonne Wendy, Vanacker Danny, Devaere Stijn, Rumes Bob, Jean-Pierre Maelfait, Gillis Monique, Swings Jean, Braig HR. y Mertens Johan. (2003). **Evolutionary trends in feminization and intersexuality in woodlice (Crustacea, Isopoda) infected with *Wolbachia pipientis* (a-Proteobacteria)**. Belgian Journal Of Zoology.133: 61–69.
- Weeks, A. R. & Breeuwer, J. A. (2001). ***Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites**. Proceedings of the. Royal Society of London. Series B. 268: 2245–2251.
- Werren, J., Zhang, W. & Guo, L. (1995). **Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods**. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, 261, 55–63.
- Werren, J. (1997). **Biology of *Wolbachia***. Annual Review of Entomology, 42, 587–609.
- Werren, J., Baldo, L. & Clark, M. (2008). ***Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology**. Nature Reviews Microbiology, 6, 741–751.
- Wirth WW y N Marston (1968) **A method for mounting small insects on microscope slides in Canada balsam**. Annals of Entomology Society of America 61:783-784.
- Wiwatanaratnabutr I., Kittayapong P. (2006). **Effects of temephos and temperature on *Wolbachia* load and life history traits of *Aedes albopictus***. Medical and Veterinary Entomology. 20: 300–307.
- Wiwatanaratnabutr I., Kittayapong P. **Effects of crowding and temperature on *Wolbachia* infection density among life cycle stages of *Aedes albopictus***. Journal of Invertebrate Pathology. 102 (2009), pp. 220–224.
- Wiwatanaratnabutr I. (2013). **Distribution, diversity and density of *Wolbachial* infections in cladocerans and copepods from Thailand**. Journal of Invertebrate Pathology.114: 341–345.
- Yen JH, Barr AR. (1973). **The etiological agent of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens***. Journal of Invertebrate Pathology. 22(2):242-50.
- Zeh, D. W., Zeh, J. A. & Bonilla, M. M. (2005). ***Wolbachia*, sex ratio bias and apparent male killing in the harlequin beetle riding pseudoscorpion**. Heredity 95: 41–49.
- Zhou W, Rousset F, O’Neil S. (1998). **Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences**. Proceedings. Biological Sciences. 265:509–515.
- Zug R., Hammerstein P. (2012). **Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected**. PLoS One, 7: 38544.

12. Anexos

12.1 Anexo A Extracción de ADN de Piojos y Pulgas.

La extracción de ADN se llevará a cabo mediante el uso del Kit “DNeasy Blood & Tissue Kit” de Qiagen, implementado el protocolo “Purification of Total DNA from Insects (Spin-Column Protocol)” con la siguientes modificaciones.

- 1) Se deberán utilizar ejemplares preservados en alcohol al 100%, los cuales deberán ser secados con papel absorbente para retirar el exceso de alcohol (para evitar una posible interferencia con la reacción en cadena de la polimerasa).
 - 1.1 Para los ejemplares adultos se realizará una incisión en posición ventral por debajo del tercer par de patas (deberán utilizarse navajas de bisturí nuevas para cada ejemplar o tijeras rectas, estas últimas deberán esterilizarse después de realizar un corte sumergiéndolas en una solución de cloro al 5% y posteriormente en alcohol al 70%)
 - 1.2 En el caso de ninfas y larvas se realizará una pequeña abertura en la base del abdomen y en los estigmas abdominales respectivamente con ayuda de una aguja estéril.
- 2) Se colocará al ejemplar en un tubo eppendoff de 1.5 ml y se adicionarán 180 µl de Buffer ATL y 20 µl de Proteinasa K. La mezcla deberá mezclarse con ayuda del vórtex durante 15 segundos.
- 3) La muestra deberá incubarse a una temperatura de 56°C durante 24 horas para que el Buffer de Lisis y la Proteinasa degraden el tejido blando. Se recomienda vortexear el tubo cada 30 minutos durante las primeras dos horas.
- 4) Pasadas las 24 horas se observará al ejemplar (en caso que aún se presente gran cantidad de tejido blando deberán adicionarse otros 180 µl de Buffer ATL y 20 µl de Proteinasa K y dejarse incubando durante otras 24 horas) y se homogenizará la solución con ayuda del vórtex (durante 15 segundos).
- 5) Se adicionarán 200 µl del Buffer AL y 200 µl de Etanol Absoluto Grado Biología Molecular. **En caso de formarse un precipitado blanco, el tubo deberá vortexearse hasta que quede completamente disgregado.**

- 6) Se recuperará la solución (aproximadamente 850 μ l) y se depositará en una columna DNeasy, la cual se centrifugará a 8,000 rpm durante un minuto, descartando el sobrenadante y el tubo de colecta.
- 7) Se ajustará un nuevo tubo de colecta a la columna y se adicionarán 500 μ l del Buffer AW1, centrifugando por un minuto a 8,000 rpm y descartando nuevamente tanto el sobrenadante como el tubo de colecta.
- 8) Se ajustará un nuevo tubo de colecta y se adicionarán 500 μ l del Buffer AW2, centrifugando por tres minutos a 14,000 rpm para lavar la membrana DNeasy.
- 9) Finalmente se colocará la columna a un tubo eppendorf de 1.5 ml (no incluido en el Kit, el cual deberá ser nuevo, libre de nucleasas y dnasas) pipeteando directamente sobre la membrana DNeasy:

9.1 100 μ l del Buffer AE en el caso de adultos

9.2 50 μ l del Buffer AE para larvas y ninfas.

- 10) El tubo se incubará a temperatura ambiente durante tres minutos y se centrifugará a 8,000 rpm durante un minuto, desechando la columna y rotulando el tubo eppendorf con el código completo del ejemplar y se congelará a una temperatura de -20°C hasta su uso.

12.2 Anexo B cuadro de hospederos.

Cuadro en el que se muestran todas las especies de Mamíferos recolectados, así mismo se encuentran los piojos y pulgas colectados en cada especie de mamífero.

<i>Hospedero</i>			<i>Ectoparásito</i>					
<i>Familia</i>	<i>Especie</i>	<i>Hc</i>	<i>Familia</i>	<i>Especie</i>	<i>EA</i>	<i>EI</i>	<i>%</i>	<i>BAD</i>
<i>Cricetidae</i>	<i>Peromyscus beatae</i>	26	<i>Ceratophyllidae</i>	<i>Jellisonia</i>	3	0	0	ND
				<i>breviloba</i>				
				<i>breviloba</i>				
			<i>Plusaetis mathesoni</i>	30	0	0	ND	
			<i>Hystrichopsyllidae</i>	<i>Ctenophthalmus tecipin</i>	3	2	66	W. <i>pipientis</i> (88%)
<i>Leptopsyllidae</i>	<i>Peromyscopsylla hesperomys adelpha</i>	7	5	71.42	W. <i>pipientis</i> (98%)			
	<i>Reithrodontomys sumichrasti</i>	2	<i>Hoplopleuridae</i>	<i>Hoplopleura reithrodontomydis</i>	4	0	0	ND
<i>Muridae</i>	<i>Mus musculus</i>	8	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	<i>Rattus norvegicus</i>	4	<i>Polyplacidae</i>	<i>Polyplax spinulosa</i>	172	0	0	ND
<i>Soricidae</i>	<i>Sorex ventralis</i>	1	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Hc: Hospederos colectados; EA: Abundancia de Ectoparásitos; EI: Ectoparásitos infectados; NR: No Recuperado; ND: Nodetectado; %; Prevalencia; BAD: Agentes bacteriano detectado.

Acorde con los parámetros ecológicos establecidos por Bush et al. (1997), la prevalencia se define como el porcentaje de huéspedes infectados/infestados por una especie de parásito.