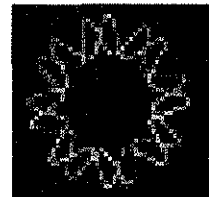




// 00551



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“EXPRESIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (NOS) EN *Anopheles albimanus* y *Anopheles pseudopunctipennis* DURANTE LA INFECCION CON *Plasmodium berghei*”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A

BIOL. ANTONIA HERRERA ORTIZ

**Director: Dr. Humberto Lanz Mendoza
Instituto Nacional de Salud Pública**



CUERNAVACA, MORELOS

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

General de Bibliotecas de la
en formato electrónico e impreso al
de mi trabajo recepcional.

Antonia Herrera Ortiz

13 NOV 02

Jubana

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Enfermedades transmitidas por vectores del Centro de Investigaciones sobre enfermedades infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública, bajo la dirección del Dr. Humberto Lanz Mendoza. El proyecto contó con financiamiento de CONACyT, número 28995-N.

**No permitas que las circunstancias te determinen.
Mejor, determinate a pesar de las circunstancias.**

DEDICATORIA

A mis padres:

Mary y Doroteo,

Con gran admiración y profundo respeto,
que me enseñaron a luchar por la vida y
sembraron en mí el deseo de superación.

A mis hermanos:

Horte, Gela, Chayo y Doro,

Siempre han sido un gran apoyo y
han estado siempre conmigo.

A Miguel:

A ti y nuestro bebé, que ambos
me han dado un fuerte impulso para concluir
este trabajo y son una gran motivación para mí.

AGRADECIMIENTOS

- A todos mis maestros del IBT que de alguna manera contribuyeron a mi formación profesional.
- Al Dr. Humberto Lanz Mendoza por su dirección para la realización de este trabajo.
- A los doctores Mario Zurita y Lourival Possani, quienes formaron parte del comité tutorial, gracias por sus atinados comentarios para el buen desarrollo del trabajo
- A Dra. Alejandra Bravo, Dr. Alejandro Zentella, Dr. Enrique Reynaud y Dr. Mario H. Rodríguez, quienes revisaron cuidadosamente este escrito y me brindaron sus comentarios y sugerencias para la mejor presentación este trabajo.
- A Jesús Martínez, Roberto Lara, Salvador Hernández y Magdalena Ku compañeros del laboratorio y que me ayudaron y enseñaron mucho sobre el trabajo de investigación.
- Al Dr. Cuauhtemoc Villareal del insectario del CIP y a Tere López del insectario del CISEI, por suministrarme mosquitos cada que los necesitaba.
- A Laurita, mi gran amiga...te agradezco todos los momentos que hemos compartido y todo el apoyo que he tenido de tu parte.
- A Daniela, amiga mia...que aunque de lejos siempre hemos estado juntas...gracias por ser mi amiga.
- A mis amigos, Maribú, Alexito, Memo, que me han apoyado

INDICE

	Abreviaturas	3
I.	Resumen.	5
II.	Introducción	6
	1. Ciclo de Vida del Parásito de la Malaria.	
	2. Ciclo Esporogónico del Parásito en el Vector.	
	3. Mecanismos de Defensa del Mosquito contra <i>Plasmodium</i> .	
	A. Mecanismos Generales.	
	B. Mecanismos Específicos.	
III.	Antecedentes.	20
	1. Óxido Nítrico Sintasa.	
	2. Óxido Nítrico Sintasa en Invertebrados.	
	3. Mecanismos de acción del Óxido Nítrico.	
	4. Óxido Nítrico y Radicales libres de oxígeno.	
IV.	Justificación.	30
V.	Hipótesis	31
VI.	Objetivos.	32
VII.	Metodología	34
	1. Mantenimiento de mosquitos.	
	2. Preparación de los oocinetos de <i>Plasmodium berghei</i> .	
	3. Cultivo de Células C6/36.	
	4. Extracción de ARN de mosquitos.	
	5. Obtención de ADN de mosquitos. RT-PCR.	
	6. Sistema RACE (rapid amplification of cDNA ends)	
	7. Clonación y secuenciación.	
	8. Cultivo de Bacterias y obtención de ADN plasmídico.	
	9. RT-PCR/ Southern	
	10. Cultivo de Intestinos	
	11. Determinación de la concentración de NO	

VIII.	Resultados.....	45
	1. Amplificación de un fragmento de ADN de NOS de <i>Anopheles pseudopunctipennis</i> .	
	2. Obtención y clonación de los extremos 5' y 3' del cDNA de NOS de <i>Anopheles pseudopunctipennis</i> .	
	3. Análisis de la expresión de NOS durante los distintos estadios del ciclo de vida de <i>Anopheles pseudopunctipennis</i> .	
	4. Expresión de nos en el intestino de <i>Anopheles pseudopunctipennis</i> .	
	5. Producción de óxido nítrico en cultivo de intestino de <i>Anopheles pseudopunctipennis</i> estimulados con <i>P. berghei</i> .	
	6. Producción de óxido nítrico en cultivo de intestino de <i>Anopheles pseudopunctipennis</i> estimulados con bacterias y levaduras.	
	7. Inducción de la expresión y actividad de NOS por L-DOPA.	
IX.	Discusión.....	68
X.	Conclusiones.....	76
XI.	Perspectivas.....	78
XII.	Bibliografía.....	80

ABREVIATURAS

- Ag-STAT: STAT de *Anopheles gambiae*
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- cDNA: ADN copia
- cGMP: Guanosin monofosfato cíclico.
- dATP: Desoxi-adenina trifosfato.
- dCTP: Desoxi-citocina trifosfato.
- dGTP: Desoxi-guanina trifosfato.
- dTTP: Desoxi-timina trifosfano.
- DFH: 1-acetil-2 fenilhidracina
- DNasa I: Desoxirribonucleasa I.
- FAD: Flavin adenin dinucleótido.
- FMN: Flavin mononucleótido.
- FO: Fenoloxidasa.
- GGBP: Proteína de unión a bacterias Gram negativas
- HpRT: Hipoxantina ribosil transferasa.
- ICHIT: Proteína putativa de unión a quitina.
- IGALE20: Lectina gal putativa
- IFN- γ : Interferon γ .
- IL: Interleucina.
- ISPL5: Proteasa de serina.
- L-DOPA: Dihidroxifenilalanina.
- LPS: Lipopolisacárido.
- MP: Membrana peritrófica.
- NADPH: Dinucleótido de nicotin-adenina-fosfato reducido.
- NF- κ B: Factor nuclear- κ B.
- NOS: Óxido nítrico sintasa.
- NO: Óxido nítrico.
- OMS: Organización mundial de la salud.
- Pb: Pares de bases.

- PBS: Solución amortiguadora salina de fosfatos.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- PFO: Profenoloxidasa.
- P.M.: Peso molecular.
- PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoruro.
- RACE: Amplificación rápida de los extremos del cDNA.
- RNIs: Reactivos intermediarios de nitrógeno.
- ROIs: Reactivos intermediarios de oxígeno.
- RT-PCR: Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa.
- SSA: Secretaría de salud y asistencia.
- STAT: Transductor de señales y activador de la transcripción.
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral α .
- TGF- β : Factor de crecimiento tumoral.
- TLCK: N α -Tosil-lisina-clorometilcetona.
- UNICEF: "United Nations Children's Fund".

I. RESUMEN

En este trabajo se caracterizó la óxido nítrico sintasa (NOS) en *Anopheles pseudopunctipennis*, un transmisor importante de la malaria en México, así mismo se evaluó la producción de óxido nítrico (NO) en respuesta a oocinetos de *P. berghei*, levaduras y dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Se sabe que los mosquitos son capaces de responder a la presencia de microorganismos, tales como bacterias y parásitos (*Plasmodium*) mediante la expresión de diversos genes, marcadores de la respuesta inmune, los cuales incluyen componentes anti-microbianos (defensinas), proteasas (ISP13 e ISPL5), receptores de reconocimiento (GNBP, IGALE20, ICHIT), factores de transcripción (Ag-STAT y Gambif1) y enzimas, entre ellas la óxido nítrico sintasa (NOS).

El mosquito *An. pseudopunctipennis* expresa la enzima NOS, y la secuencia del cDNA muestra una identidad de más del 80% con la NOS de *An. stephensi*, y *An. gambiae*, así como alta identidad con otras NOS de invertebrados y vertebrados reportadas. La cinética de expresión de NOS muestra que ésta sólo se expresa en los adultos y que la flora intestinal induce su expresión, ya que cuando los mosquitos son alimentados con antibióticos se inhibe la expresión de NOS. Los ensayos *in vitro*, con cultivos de intestinos indicaron que la actividad de la enzima se induce con la presencia de oocinetos de *P. berghei* y levaduras en el medio, sin embargo no se induce respuesta con bacterias Gram negativas, tales como *Klebsiella pneumoniae*. Es probable que la L-DOPA regula de alguna manera a la NOS, pues la producción de NO se incrementa de manera dosis-dependiente con la adición de L-DOPA al medio de cultivo.

La enzima NOS se expresa en *An. pseudopunctipennis* y parece tener un papel biológico importante en la respuesta inmune del mosquito ya que su actividad se incrementa por la presencia del parásito de la malaria *P. berghei*, así como por levaduras. Por otra parte la L-DOPA o alguno de los productos de la oxidación de esta, podría jugar un papel relevante en el mecanismo de activación de la NOS.

II. INTRODUCCIÓN

La malaria es un importante problema de salud pública alrededor del mundo. Se estima que se presentan de 300 a 500 millones de casos clínicos cada año y que más de un millón de personas mueren a causa de esta enfermedad (Anon, 1994; Collins y Paskewitz, 1995). La gran mayoría de estos casos son niños, especialmente de zonas rurales con difícil acceso a centros de salud, la UNICEF reconoce que la malaria es una de las 5 principales causas de muerte en niños menores de 5 años (OMS, 1998). Otros grupos de alto riesgo son mujeres embarazadas, viajeros no inmunes y personal que labora en áreas endémicas (OMS, 1998). Esta enfermedad es causada por la infección por protozoarios parásitos obligados del género *Plasmodium*, siendo *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae* los agentes causales en humanos. De estos, *P. falciparum* es el que presenta mayor número de casos de infección y en su mayoría es letal (Hoffman et al., 1997).

El parásito de la malaria es transmitido de una persona a otra por mosquitos anofelinos. Existen cerca de 380 especies de mosquitos *Anopheles*, pero solamente 60 son capaces de transmitir la enfermedad (OMS, 2000).

En México, esta enfermedad también constituye un importante problema de salud pública. En el año 2000, se presentaron 2818 casos de malaria y en el 2001 se presentaron más de 1800 (SSA, 2001). En nuestro país, *Plasmodium vivax* y *P. falciparum* son los parásitos causantes de la enfermedad y los mosquitos *Anopheles albimanus* y *Anopheles pseudopunctipennis* son los principales transmisores del parásito (Chan et al., 1994).

Debido al impacto a nivel salud y económico que representa la malaria en el mundo y en particular en nuestro país, se han aplicado diferentes programas de control de vectores usando insecticidas. Sin embargo, el rápido aumento de resistencia a los insecticidas químicos y el daño causado en el ambiente por los mismos ha reducido su efectividad. Actualmente, se están buscando alternativas para sustituir a los insecticidas químicos, entre ellas se encuentran las vacunas antipaludismo, sin embargo, todas las vacunas hasta ahora probadas han demostrado un efecto protector limitado (Philips, 2001). Así mismo, se están desarrollando estrategias que permiten la manipulación genética y producción de mosquitos transgénicos resistentes a la transmisión de la malaria (Collins y Besansky, 1994). Por lo tanto resulta necesario brindar más atención para investigar y entender la compleja relación

entre el parásito y el vector, que en consecuencia determina la transmisión de la enfermedad (Collins y Paskewitz, 1995; Nigama et al., 1996).

En los últimos años, se ha observado un creciente interés por el estudio de la respuesta inmune en insectos y en particular en mosquitos transmisores de enfermedades como una estrategia para el desarrollo de nuevos métodos de control (Chan et al., 1994; Collins y Paskewitz, 1995). Los mosquitos presentan diversos mecanismos que les permiten responder de forma activa a ataques microbianos (Dimopoulos et al., 1997). Se ha considerado que la maduración del parásito dentro del vector requiere de la resistencia a los mecanismos de defensa del insecto, lo cual teóricamente puede deberse a que el parásito se vuelve insensible a la respuesta inmune del vector; o evade o suprime su sistema inmune. Se desconoce cuál de estas posibilidades es la que opera, aunque en cepas de mosquitos resistentes se ha observado que los sistemas de defensa se pueden activar más rápidamente (Dimopoulos et al., 1997). Recientemente se han obtenido progresos importantes en la identificación de marcadores moleculares de la respuesta inmune de mosquitos. Sin embargo, existe un total desconocimiento sobre los mecanismos de reconocimiento de antígenos parasitarios, así como de las moléculas efectoras de la resistencia (Collins y Paskewitz, 1995; Dimopoulos et al., 1997).

1. CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO DE LA MALARIA.

Una de las dificultades para el estudio de la malaria se puede apreciar cuando se observa la complejidad del ciclo de vida del parásito causante de ésta. El parásito de la malaria es un organismo extraordinariamente complejo, su ciclo de vida se presenta en múltiples etapas tanto en el hospedero vertebrado, por ejemplo, el hombre, como en el invertebrado (el mosquito).

La infección por *Plasmodium* en el humano comienza cuando un mosquito *Anopheles* se alimenta e inyecta los esporozoítos infectivos en la sangre circulante. En minutos, los esporozoítos invaden las células hepáticas y mediante multiplicación asexual produce miles de merozoítos. Cuando los hepatocitos invadidos se rompen, los merozoítos son liberados a la circulación periférica. Los merozoítos invaden a los eritrocitos, donde nuevamente se multiplican produciendo más merozoítos. Algunos merozoítos no se dividen, sino se diferencian en las formas sexuales, macrogametocitos (hembras) y

microgametocitos (machos) (Figura 1). Estas formas sexuales son tomadas por otro mosquito cuando éste se alimenta, de modo que en el intestino del mosquito se lleva a cabo el ciclo sexual o esporogónico del parásito (Miller et al., 2002).

2. CICLO ESPOROGÓNICO DEL PARÁSITO EN EL VECTOR.

Los gametocitos masculinos y femeninos son ingeridos con la sangre por el mosquito. En el intestino, los gametocitos intracelulares emergen de los eritrocitos infectados, para formar gametos extracelulares. En los primeros minutos, el gameto masculino fertiliza al gameto femenino y forman un cigoto. En las siguientes 15 a 30 h, el cigoto (no móvil) se diferencia en oocineto. El oocineto presenta gran movilidad, lo que le permite llegar a la pared del intestino. Para continuar su desarrollo, el oocineto debe cruzar la membrana peritrófica y el epitelio intestinal. El oocineto penetra a través o entre las células epiteliales y se deposita entre las células epiteliales del intestino y la membrana basal. En este punto, el complejo apical, citoesqueleto y otras estructuras del oocineto son reabsorbidas y el parásito adquiere una forma esférica, transformándose en un ooquiste. El ooquiste crece rápidamente y se rodea por una pared de material extracelular compuesto de proteínas fibrosas, probablemente producidas y secretadas por el parásito. Un ooquiste maduro puede medir 80 μm , siendo casi visible a simple vista. De cada ooquiste de *P. falciparum* se pueden desarrollar 1000 esporozoítos. Después de 12 a 15 días postingestión, numerosos esporozoítos emergen del ooquiste maduro y son liberados al hemocele. Los esporozoítos migran hacia la glándula salival, pasan a través de las células secretoras y se acumulan en los ductos salivares. Aquí permanecen hasta que son inyectados en el hospedero vertebrado durante la alimentación sanguínea (Figura 2) (Beier, 1998; Knewll, 1991; Shahabuddin y Kaslow, 1994).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

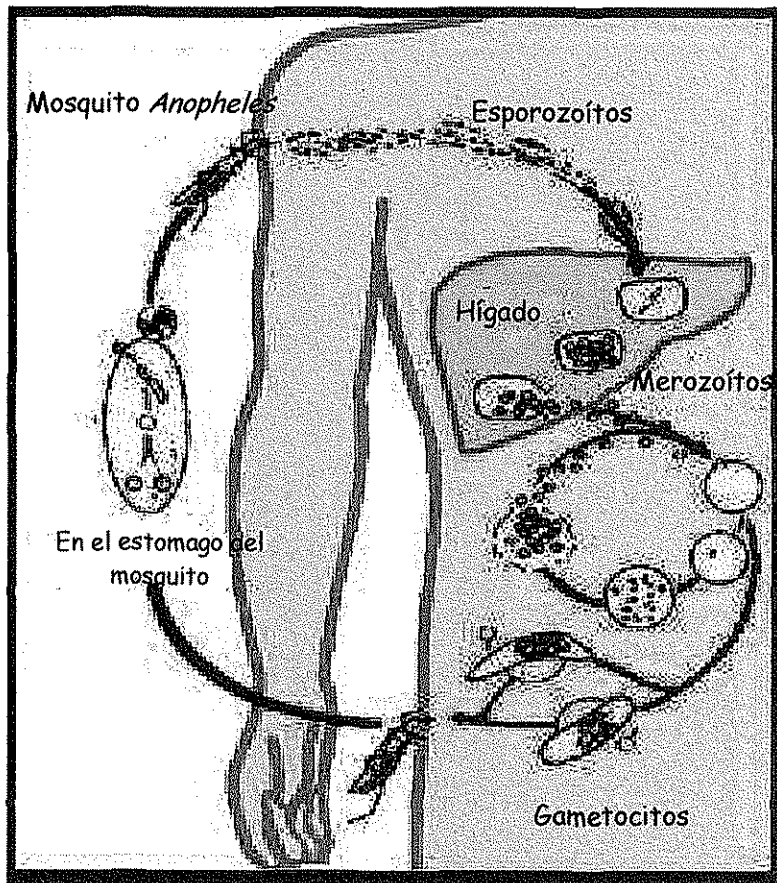


Figura 1. Ciclo de vida del Parásito *Plasmodium* en el humano.

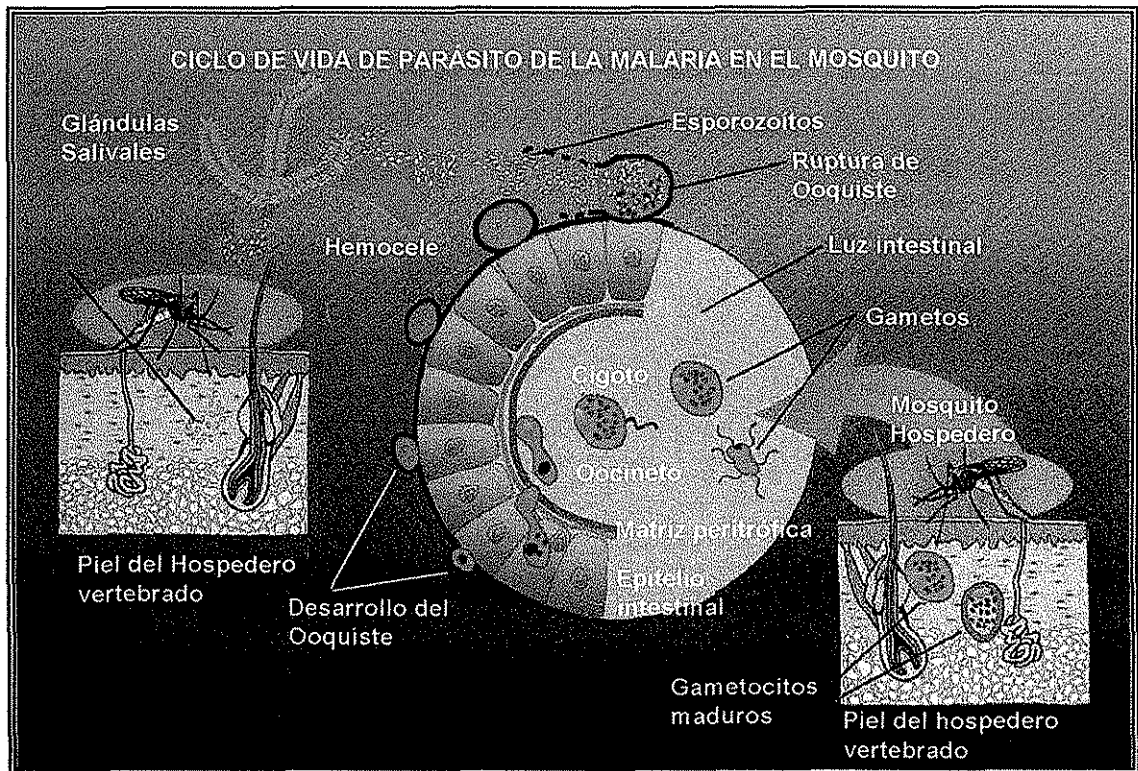


Figura 2. Representación esquemática del ciclo esporogónico del parásito *Plasmodium* en el intestino del mosquito *Anopheles*.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

3. MECANISMOS DE DEFENSA DEL MOSQUITO CONTRA *Plasmodium*.

En la mayoría de las especies de mosquitos anofelinos no se desarrolla el ciclo completo del parásito, de modo que existen especies susceptibles, resistentes y refractarias a la transmisión de la enfermedad. Se ha definido como especie susceptible aquella que es capaz de permitir el desarrollo del protozoo hasta el estadio infectivo. Una especie resistente es aquella que destruye al parásito mediante la activación de una respuesta inmune, mientras que una especie refractaria es una en la cual existe incompatibilidad fisiológica entre el parásito y el vector potencial, de modo que aunque el parásito penetra y se establece en el tejido apropiado, simplemente no se desarrolla (Christensen y Severson 1993)

Los insectos presentan varios mecanismos de barreras para la infección, y se clasifican en generales y específicas. Los mecanismos generales pueden bloquear infecciones oportunistas e incluyen rasgos anatómicos (por ejemplo, la cutícula) así como procesos fisiológicos (formación de matriz peritrófica) y síntesis de proteasas digestivas en el intestino. Los mecanismos específicos se refieren al sistema inmune innato de los insectos (Richman y Kafatos 1996).

A. MECANISMOS GENERALES:

1. Membrana peritrófica

La ingestión de sangre induce la producción de una capa que recubre al intestino, conocida como membrana peritrófica (MP), la cual es generada por las células epiteliales del intestino. La MP está compuesta principalmente de quitina (polímeros de N-acetilglucosamina) y representa una barrera que el parásito debe atravesar para alcanzar el epitelio intestinal (Berner et al., 1983). Para escapar de la MP, *P. gallinaceum* secreta una quitinasa, enzima que hidroliza la quitina, y cuando ésta es inhibida se bloquea completamente la formación de ooquistes, debido a que el parásito es incapaz de invadir el epitelio intestinal (Huber et al., 1991). La quitinasa producida por oocinetos en cultivo es inactiva y sólo puede ser activada por la acción proteolítica de extractos del intestino del vector (Shahabuddin et al., 1994). Por otra parte, aunque la MP constituye una barrera física para el *Plasmodium*, no es el mecanismo refractario más importante en los mosquitos

Anopheles contra el parásito, pues la ausencia de MP en *An. gambiae* no incrementa el número de ooquistes, además en *An. stephensi*, el cual es completamente refractario a *P. gallinaceum*, se ha observado que este permanece libre de ooquistes cuando se le reta con oocinetos en ausencia de MP (Shahabuddin et al., 1995).

2. Epitelio Intestinal.

El epitelio del intestino consiste de tres tipos celulares: células digestivas columnares, células endocrinas en forma de cono y células regenerativas (Shahabuddin et al., 1995; Paskewitz et al., 1988). Las células digestivas producen y guardan enzimas digestivas en vesículas secretoras que son liberadas en la luz del intestino para la digestión de azúcares y sangre, tales como tripsinas. La actividad proteolítica alcanza su pico máximo al momento en que el parásito está listo para cruzar el epitelio intestinal, por lo que, el oocineto se enfrenta un microambiente muy destructivo (Barillas-Mury et al., 1991; Hagedorn, 1996; Noriega et al., 1994; Noriega et al., 1996). La actividad de algunas tripsinas, como la tardía coincide con el desarrollo de oocinetos maduros. Por lo tanto, los oocinetos deben ser resistentes a esta tripsina tardía y probablemente también a otras proteasas para poder invadir el epitelio del intestino y continuar su desarrollo (Noriega et al., 1994).

Además, recientemente se demostró que la invasión de las células intestinales por los oocinetos provoca severos cambios en estas células, incluyendo la producción de la enzima óxido nítrico sintasa, sugiriendo que al momento en que el parásito entra se produce una gran cantidad de óxido nítrico, una molécula citotóxica cuando se encuentra en altas concentraciones y de la cual el parásito tiene que escapar, moviéndose en el intestino de una célula a otra (Han et al., 2000).

Por otra parte, se desconoce el mecanismo por el cual el oocineto reconoce a las células del epitelio intestinal. Se ha sugerido que el oocineto presenta lectinas en su superficie que le permiten reconocer azúcares en la superficie de las células epiteliales (Billingsley y Sinden, 1997), pero la complejidad de carbohidratos presentes en la superficie del epitelio hace que su análisis sea muy complicado.

B. MECANISMOS ESPECÍFICOS:

Los insectos han desarrollado una serie de mecanismos inmunes a través de un sistema de defensa muy efectivo, involucrando componentes tanto celulares como humorales (Dimopoulos et al., 1999). En el sistema inmune innato de los invertebrados pueden distinguirse tres tipos diferentes de respuesta, todas consisten de reacciones reguladas en cascada. Primero, cascadas proteolíticas, las cuales provocan una coagulación localizada de la hemolinfa y activación del sistema de la fenoloxidasa, para la encapsulación melanótica de microorganismos (Nigam et al., 1996; Vernick et al., 1995). Segundo, la inducción de síntesis de péptidos anti-microbianos por el cuerpo graso en respuesta a la presencia de microorganismos (Hultmark, 1993; Hoffman, 1995; Gillespie et al., 1997). Tercero, reacciones de defensa celular que incluye fagocitosis y formación de nódulos y cápsulas, algunas veces acompañada por la melanización de los microorganismos (Hernández et al., 1999; Dimopoulos et al., 2001). Las dos primeras forman parte de la respuesta inmune humoral y la tercera es la respuesta inmune celular.

1. Respuesta inmune celular.

Este tipo de respuesta es mediada por hemocitos, los cuales se localizan en la hemolinfa del sistema circulatorio abierto de los mosquitos y adheridos a diferentes tejidos como intestino, cuerpo graso y corazón (Dimopoulos et al., 2001). Los mosquitos presentan varios tipos de hemocitos, en *An. albimanus* se encontraron tres tipos principales: prohemocitos, plasmacitos y células granulares. Estos últimos, al parecer son importantes en la defensa contra agentes extraños, pues las células granulares presentan fenoloxidasa y probablemente actividad lisosomal, mientras que los plasmacitos muestran capacidad fagocítica (Hernández et al., 1999).

La fagocitosis se ha descrito en diferentes insectos y se ha visto que están involucrados varios tipos de hemocitos en la internalización de microorganismos patógenos y partículas foráneas (Dimopoulos et al., 2001). En *Drosophila*, se encontró un receptor fagocítico, croquemort, el cual parece estar involucrado en la fagocitosis de cuerpos apoptóticos (Franc et al., 1996). De manera interesante, en *An. gambiae* el homólogo de Croquemort ya fue reportado (Dimopoulos et al., 2000).

La melanización en el hemocele sin la participación de hemocitos se ha observado en ciertos dípteros, por lo que Götz sostiene que dado que los mosquitos (y en general todos los dípteros) son organismos muy pequeños carecen de suficiente número de hemocitos para poder montar una respuesta inmune basada en células (Götz, 1986). Sin embargo, existen suficientes evidencias que apuntan a lo contrario. Christensen y cols. (1989, 1993) demostraron que existe un incremento significativo en las poblaciones de hemocitos de *Aedes aegypti* durante la respuesta inmune contra microfilarias. Recientemente, se ha observado una intensa formación de nódulos contra bacterias en mosquitos *An. albimanus* y en larvas de *Ae. aegypti* (Hernández, 1999). En otros insectos, tales como *Periplaneta americana*, concomitante con el incremento del número de hemocitos en mosquitos, se observó la proliferación de hemocitos una hora después de la inyección de *Enterobacter cloacae*, respuesta que continuó por varias semanas (Ryan y Karp, 1993).

Se han realizado pocos estudios sobre los mecanismos de defensa celulares de los mosquitos contra *Plasmodium*. Weathersby y Mc Call (1968) encontraron que gametocitos de *P. gallinaceum* inyectados en el hemocele de los mosquitos *Culex pipiens* y *Ae. aegypti* fueron activamente fagocitados por las células sanguíneas, pero no observaron diferencias significativas entre las cepas resistentes y susceptibles de mosquitos. Así mismo, Scalzo-Lichfouse y cols. (1990) observaron que las infecciones con *Plasmodium* inducen una respuesta celular en el mosquito, pero el sistema inmune no parece reconocer al parásito. Por otra parte se ha observado que los esporozoítos de *P. vivax* no inducen una respuesta inmune celular en *An. albimanus* (Hernández et al, 2000). Estos resultados sugieren que el parásito permanece "invisible" dentro del hospedero. La respuesta inmune celular del mosquito durante la infección por el parásito no ha sido estudiada suficientemente, debido a la dificultad para obtener suficientes hemocitos y la carencia de técnicas para evaluar su inmunocompetencia. Actualmente, el establecimiento y uso de líneas celulares con características de hemocitos ha facilitado el estudio de la respuesta celular (Müller et al., 1999)

2. Respuesta inmune humoral.

En los mecanismos de defensa humorales encontramos: encapsulamiento humoral y el sistema de la profenoloxidasa (PFO), así como la producción de factores anti-

microbianos y la expresión de genes considerados marcadores de la respuesta inmune de los mosquitos.

3. Encapsulamiento humoral. El encapsulamiento humoral se ha reportado principalmente en dípteros y hemípteros. Se ha sugerido que este tipo de encapsulamiento ocurre en insectos con pocas células circulantes. Este tipo de encapsulamiento se caracteriza por ser rápido (en ocasiones comienza a los pocos minutos después de la invasión del hemocele). El material de este tipo de cápsulas, la melanina, es muy resistente y se cree que está constituido por un complejo de proteínas con polifenoles, comparable al de la cutícula esclerotizada de insectos (Hopkins y Kramer, 1992). La melanización depende del sistema de la PFO (Dunn, 1986; Nigam et al., 1996; Götz, 1986). Las múltiples funciones de las cascadas de melanización se reflejan en la cantidad de genes de PFO presentes en insectos. En *An. gambiae* se han identificado 6 genes diferentes de PFO en donde además, todos tienen patrones diferentes de expresión (Müller et al., 1999; Lee et al., 1998)

El sistema de la PFO es un complejo de enzimas y factores asociados encontrados primordialmente en la hemolinfa. Así mismo, se puede localizar en la epidermis y el intestino de los insectos, el cual después de su activación puede generar proteínas mediadoras de la respuesta inmune y la formación final de melanina (Nigam et al., 1996; Götz, 1986). La PFO inactiva puede convertirse en fenoloxidasa (FO) por la acción de serina-proteasas, las cuales a su vez son activadas por componentes de la pared celular de microorganismos como el β -1,3 glucano, el lipopolisacárido (LPS) y el péptidoglicano (Lanz et al., 1993). Además, esta activación es dependiente de calcio. La fenoloxidasa convierte compuestos fenólicos en quinonas, las cuales son muy activas y se pueden unir a grupos aminos terciarios de proteínas. Esto promueve el entrecruzamiento de las cadenas de proteínas y la formación de una red de macromoléculas muy resistente. Las quinonas se pueden polimerizar y formar melanina, la cual es extremadamente fuerte e incluso resistente a ácidos y a tratamientos enzimáticos (Hopkins y Kramer, 1992). Ratcliffe y cols. (1984) reportaron que la activación del sistema de la PFO *in vitro* incrementa la eficiencia de la fagocitosis de bacterias por monocapas de hemocitos. Sin embargo, en el mismo estudio se observó que algunos compuestos que no inducen la activación del sistema de PFO también estimulan la fagocitosis. De la misma forma, factores generados durante la

activación del sistema parecen estimular a los hemocitos y si bien el sistema de la PFO no tiene participación directa en la destrucción del invasor, es probable que participe como un sistema amplificador de la respuesta celular (parecido en cierto modo a la vía alterna del complemento de mamíferos) (Nigam et al., 1996).

El encapsulamiento de *Plasmodium* en *A. gambiae* ocurre en el epitelio intestinal y aparentemente en ausencia de hemocitos (Vernick et al., 1995). Estudios por microscopía electrónica demostraron que el encapsulamiento ocurre alrededor del ooquiste mientras éste continúa vivo. Posteriormente, el ooquiste comienza a desintegrarse y es infiltrado por melanina (Vernick et al., 1995). No obstante, la melanización del parásito no siempre ocurre y en *An. albimanus* no se ha observado la presencia de ésta contra *P. vivax* en cepas resistentes (Rodríguez, M.H. comunicación personal), sin embargo este fenómeno si se presenta contra *P. berghei*. Además de la melanización, otros mecanismos pueden ser responsables de la destrucción del parásito. Recientemente Nappi y cols. (1995) demostraron que mosquitas *Drosophila* mutantes en los genes *sod* o *cat*, que no expresan superóxido dismutasa y catalasa, pueden encapsular al parasitoide *Leptolilia*. Sin embargo, el parasitoide encapsulado se desarrolla normalmente. Estos datos sugieren la participación de radicales libres en la destrucción de parásitos.

a. Producción de Péptidos Anti-microbianos.

Uno de los mecanismos de defensa de los insectos mejor caracterizado contra los micro-organismos invasores es la producción de péptidos anti-microbianos. Dentro de las primeras horas después de la infección con bacterias, los insectos producen una batería de péptidos anti-bacterianos que se acumulan en la hemolinfa. Estos pueden ser clasificados de manera general en: cecropinas, defensinas, atacinas, sarcotoxinas, dipterocinas, coleopterocinas, abaecinas y apidecinas (Hultmark, 1993; Hoffman, 1995; Gillespie et al., 1997). Excepto por la lisozima, la cual está muy relacionada con las lisozimas tipo C de vertebrados, estas moléculas son compuestos relativamente nuevos, descubiertos por primera vez en insectos. En la mayoría de los casos el mecanismo de acción de los péptidos anti-microbianos se ejerce a través de un mecanismo similar a detergentes, comprometiendo la integridad de la membrana celular (Dimopoulos et al., 2001).

Entre los factores anti-microbianos más notables, se encuentran las cecropinas, una familia de péptidos de 35-39 aminoácidos (Hultmark, 1993). A concentraciones

micromolares son capaces de matar y lisar a la mayoría de las bacterias contra las que han sido probadas, tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Las cecropinas son moléculas anfipáticas que interactúan con los lípidos de las membranas, creando canales iónicos de tamaño variable (Hultmark, 1993; Hoffman, 1995; Gillespie et al., 1997).

Un segundo grupo de moléculas inducibles son las defensinas. Estas son muy activas contra bacterias Gram-negativas (Hultmark, 1993). En un principio fueron consideradas homólogas a las defensinas de mamíferos, pero las estructuras tridimensionales demostraron ser completamente diferentes. En cambio, las defensinas muestran semejanzas estructurales con toxinas del escorpión como la charibdotoxina. Al contrario de las cecropinas, las defensinas matan a las bacterias de manera muy lenta.

El tercer grupo lo forman las proteínas parecidas a las atacinas y constituyen la clase principal de moléculas efectoras que se caracterizan por la presencia de una o más copias de la región conservada G (Hultmark, 1993). En este grupo se incluyen a las sarcotoxinas II, dipterocinas y coleopterocina. Las atacinas afectan la división celular de *E. coli* y de otras bacterias Gram-negativas, ocasionando su crecimiento en forma de largas cadenas. En las abejas se han encontrado dos moléculas con alto contenido de prolinas: la apidaecina y la abaecina, que además presentan una gran homología con las dipterocinas (Hultmark, 1993; Hoffman, 1995; Gillespie et al., 1997).

En *An. gambiae*, se han aislado cuatro de estas moléculas, una defensina, dos cecropinas y la gambicina, un péptido anti-microbial nuevo. Los transcritos de estos péptidos se han localizado en el cuerpo graso, el abdomen y el tórax, así como en el cardia del intestino anterior. (Dimopoulos et al., 2001). Al parecer tienen efecto en controlar la flora ingerida durante la alimentación. La cecropina-1 y la gambicina actúan tanto en bacterias Gram-positivas como negativas, mientras que la defensina sólo contra Gram-positivas.

Aunque la existencia de péptidos anti-microbianos ha sido demostrada en insectos vectores, su participación en la eliminación de parásitos no ha sido demostrada. No obstante, existen algunas evidencias que demuestran que los péptidos anti-bacterianos pueden alterar la viabilidad de algunos parásitos. De manera interesante, se ha demostrado que dos defensinas de *Aeschna cyanea* y *Phormia terranova* son tóxicas para ooquistes y esporozoítos de *Plasmodium in vivo*, pero no son efectivos contra gametocitos u oocinetos

(Shahabuddin et al., 1998). También se demostró que la cecropina B es capaz de inhibir la movilidad de microfilarias *in vitro* y de la misma manera reduce el número de larvas en desarrollo en *Ae. aegypti* (Chalk et al., 1995). Sin embargo, sólo grandes concentraciones de cecropina B inyectadas en *An. gambiae* consiguieron detener la formación de ooquistes de *Plasmodium*. Rodríguez y cols. (1995) obtuvieron resultados análogos al incubar oocinetos de *P. berghei* con el péptido sintético Shiva-3 (péptido sintético basado en la secuencia de la cecropina B).

b. Marcadores de la respuesta inmune.

Finalmente, se ha adoptado la definición de marcadores de la respuesta inmune basándose en la sobre-expresión de genes por infecciones bacterianas. Notablemente la mayoría de estos marcadores también son sobre-expresados después de la infección de mosquitos con el parásito de la malaria, demostrando que el parásito es capaz de inducir la respuesta inmune (Dimopoulos et al., 1997, 1998, Richman et al., 1997) Estos factores de la respuesta inmune caen en distintas clase funcionales incluyendo componentes antimicrobianos (defensina), proteasas (ISP13 e ISPL5), receptores de reconocimiento (GNBP, IGALE20, ICHIT), factores de transcripción (Ag-STAT y Gambif1) y enzimas (NOS y PPO) (Barillas-Mury et al., 1996, 1999; Dimopoulos et al, 1997, 1998). La mayoría de los marcadores se expresan de manera diferencial en tejidos y muestran patrones de expresión distintos durante el desarrollo, reflejando así sus funciones específicas (Dimopoulos et al., 1999). Así mismo, estos factores también se inducen en líneas celulares 'hemocyte-like' (Dimopoulos et al., 1997; Müller et al., 1999). Durante la infección con *Plasmodium*, la cinética y niveles de inducción son diferentes para cada marcador de la respuesta inmune, probablemente como consecuencia de la regulación diferencial y especificidad tisular y temporal de su expresión, ya que existe una correlación espacial y temporal entre los estadios de desarrollo del parásito y la respuesta inmune (Dimopoulos et al., 1999).

III. ANTECEDENTES

1. Oxido Nítrico Sintasa.

Todos los organismos manifiestan una capacidad determinada genéticamente para distinguir lo propio de lo no propio, de tal forma que la función principal del sistema inmune es la defensa del organismo contra agentes infecciosos y tumores malignos (Bogdan et al., 2000) En mamíferos, los macrófagos, neutrófilos y otras células fagocíticas son componentes clave de la respuesta inmune anti-microbiana y anti-tumoral debido a que son células capaces de generar grandes cantidades de moléculas altamente tóxicas, tales como los ROIs (reactivos intermediarios de oxígeno) y RNIs (reactivos intermediarios de nitrógeno) (Bogdan et al., 2000).

Los RNIs se derivan del óxido nítrico (NO) producido por la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS), a través de dos reacciones consecutivas (Figura 3). Una molécula de L-arginina es oxidada para producir N^o-OH-L-arginina como molécula intermediaria y esta a su vez, se oxida para dar lugar a la formación de NO y L-citrulina. En total, 1.5 moléculas de NADPH y dos moléculas de O₂, ambos sirviendo como sustratos, son convertidos en 1.5 moléculas de NADP⁺ y dos moléculas de agua como coproductos (MacMicking et al., 1997).

En mamíferos, la NOS se presenta en varias isoformas y han sido clasificadas en dos categorías: constitutiva (dependiente de Ca²⁺/calmodulina, NOS endotelial y NOS neuronal) e inducible (independiente de Ca²⁺/calmodulina) (MacMicking et al., 1997). Las isoenzimas de NOS difieren en tamaño (130 a 160 kDa), en secuencia de aminoácidos (50 a 60% de identidad), distribución en tejidos, regulación transcripcional y activación por calcio intracelular (Crane et al., 1997). Sin embargo, comparten componentes estructurales y presentan dos dominios, un dominio de oxigenasa en la región amino-terminal, donde tiene sitios de unión a grupo hemo, a tetrahidropterina (H₄B) y al sustrato L-arginina (ARG), y un dominio de reductasa en el extremo carboxilo que une flavin mononucleótido (FMN), flavin adenin dinucleótido (FAD), y dinucleótido de nicotin-adenina-fosfato reducido (NADPH). Además, en su región intermedia presenta un sitio de unión a calmodulina que regula la comunicación electrónica entre ambos dominios. Así mismo, es importante para la dimerización de la enzima (Figura 4).

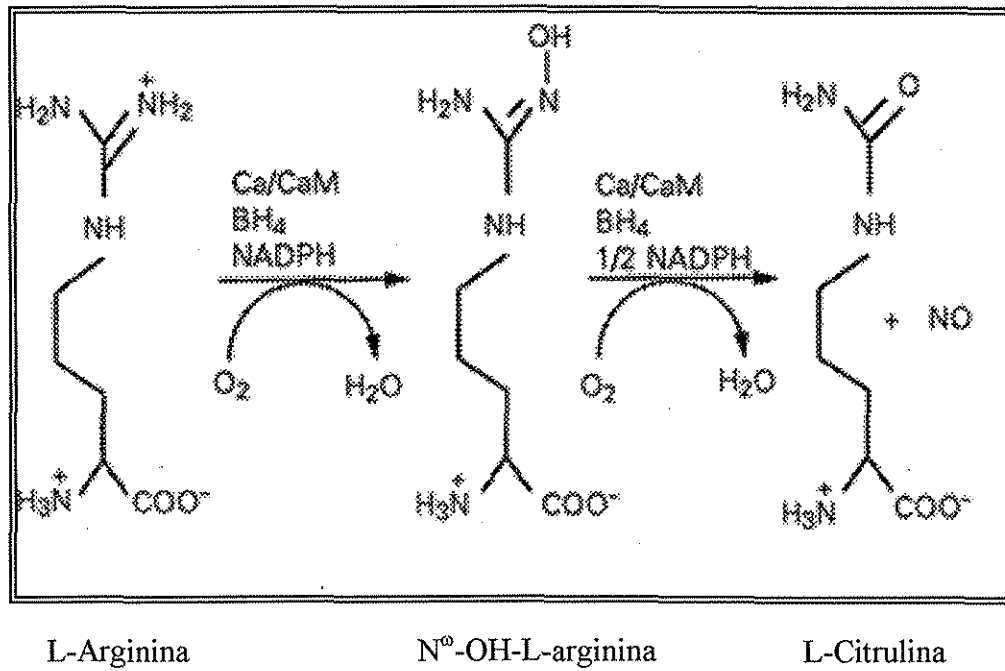


Figura 3. Reacción de síntesis del óxido nítrico. (ver texto)

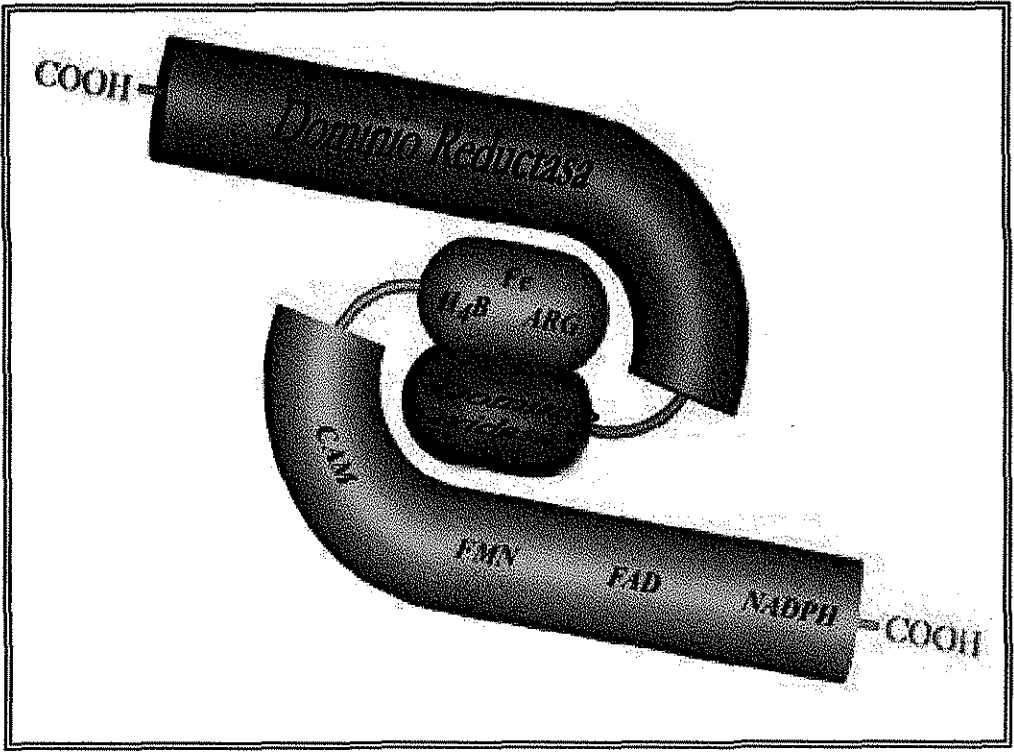


Figura 4. Representación esquemática del homodímero de la enzima NOS.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Óxido Nítrico Sintasa en Invertebrados.

La expresión de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) es ubicua en la mayoría de los organismos vivos, desde bacterias hasta mamíferos. Algunas NOS de invertebrados han sido caracterizadas. Estas enzimas muestran propiedades similares a las descritas de vertebrados, usan L-Arginina como sustrato, son inhibidas competitivamente con análogos de L-Arginina y tienen pesos moleculares entre 130 y 150 kDa (Moroz et al., 1996; Colasanti y Venturini, 1998; Colasanti et al., 1997; Palumbo et al., 1997). Los datos bioquímicos, histoquímicos y fisiológicos muestran que la producción de NO en invertebrados tiene efectos fisiológicos similares a vertebrados. En algunos insectos y moluscos, se ha demostrado la existencia de NOS en cerebro, y se ha sugerido que el NO actúa como un neurotransmisor, por ejemplo en *Drosophila melanogaster* se localiza en cerebro, mientras que en *Lymnaea stagnalis* modula la actividad de motoneuronas bucales (Regulski y Tully, 1995; Elofsson et al., 1993) Así mismo, el NO regula la dinámica oscilatoria de neuronas olfatorias de lóbulo procerebral de *Limax maximus* (Gelperin, 1994). Finalmente en *Rhodnius prolixus*, un vector de *Trypanosoma cruzi*, se ha encontrado producción de NO en las glándulas salivales, y actúa como un vasodilatador e inhibidor de la agregación de plaquetas durante su alimentación (Yuda et al., 1996).

No está claro el papel del NO y NOS en el sistema de defensa de los invertebrados, sin embargo, existen evidencias de que puede estar implicado en defensa contra bacterias y parásitos. Ottaviani y cols. (1993) demostraron que la hemolinfa de *Mytilus edulis* estimulada con lipopolisacárido (LPS) incrementa su actividad anti-bacterial y que este efecto se reduce significativamente con inhibidores de NOS. También se ha reportado que los hemocitos de *M. galloprovincialis* y *Cassostrea gigas* generan peroxinitrito en presencia de zimosán (Torreilles et al., 1999). Los inmunocitos de *Viviparous ater* muestran actividad de NOS cuando se estimulan con *E. coli*, y esta actividad es dependiente de calcio (Franchini et al., 1995). En larvas de *Bombix mori*, la actividad de NOS en el cuerpo graso es inducida por LPS, lo cual sugiere que el NO está implicado en el sistema de defensa del insecto. Recientemente se demostró que el NO está involucrado en el sistema de defensa de *Drosophila* contra parásitos eucariontes. Nappi y colaboradores (2000)

observaron un incremento en la producción de NO durante la encapsulación melanótica mediada por hemocitos de los huevos del parásito *Leptopilina boulandi*.

En *An. stephensi*, se demostró que el mosquito es capaz de limitar el desarrollo del parásito *P. berghei* a través de la síntesis inducible de NO. La inducción transcripcional de la NOS fue detectada después de la infección con *Plasmodium* a 1-3 días y 9-18 días post-alimentación. Tinciones con diaforasa sugieren que la actividad de NOS está presente en el intestino y es parcialmente alterada después de la infección con *Plasmodium* (Luckhart et al., 1998). Además, la administración dietética de inhibidores de NOS incrementa la formación de ooquistes, mientras que el precursor de NO, L-Arginina, disminuye el número de ooquistes (Luckhart et al., 1998). Por otra parte, en *An. gambiae*, también se observó expresión de NOS después de la infección con *P. berghei*. Los niveles de NOS fluctúan durante la infección. En la glándula salival se induce aproximadamente a los 10 días post-alimentación, seguido de una represión. En el abdomen se expresa en etapas tempranas y tardías durante la infección (24h y 20-25 días, respectivamente) (Dimopoulos et al., 1998, Luckhart et al., 1998). Han y cols.(2000), observaron que las células del epitelio intestinal de *An. stephensi* invadidas por oocinetos de *P. berghei* inducen la expresión de NOS y mueren probablemente por apoptosis. Todos estos datos sugieren que las NOS puede jugar un papel importante en la respuesta inmune del mosquitos durante la infección con *Plasmodium*.

3. Mecanismos de Regulación de NOS.

La regulación de NOS, así como de cualquier otra enzima, puede ocurrir a múltiples niveles: transcripción del gen, estabilidad del ARN mensajero, traducción y estabilidad de la proteína; la disponibilidad del sustrato y los cofactores; y los efectos de retroalimentación del producto NO (Bogdan et al., 2000).

En mamíferos, más de 30 citocinas inducen (por ejemplo IFN- γ y TNF- α) o suprimen (IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β) la expresión de NOS en células que participan en la respuesta inmune, tales como: macrófagos, microglia, células de Kupffer, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas y fibroblastos (Bogdan et al., 2000). Otro grupo de reguladores de NOS son los productos de virus, bacterias, protozoarios y hongos. El lipopolisacárido (LPS), otras lipoproteínas microbianas (por ejemplo la lipoproteína de 19 kDa de *Mycobacterium*

tuberculosis) y exotoxinas bacterianas (pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae*) estimulan la expresión de NOS en macrófagos y otros tipos celulares (Bogdan et al., 2000).

4. Mecanismos de acción del óxido nítrico.

El principal blanco del NO sintetizado por las isoformas NOS endotelial y neuronal es la guanilato ciclasa soluble. Esta enzima cataliza la formación de guanosin monofosfato cíclico (cGMP). El NO interactúa con el motivo heme de esta enzima para activarla, y el incremento en la concentración de cGMP provoca cambios en la función celular, afectando frecuentemente las concentraciones intracelulares de calcio (Murad et al., 1999). Los efectos del NO pueden mediar importantes eventos fisiológicos en regulación celular, comunicación célula a célula y señalización. El NO puede funcionar como un mensajero intracelular, neurotransmisor y hormonal (Murad et al., 1999).

El NO sintetizado por la isoformas inducible también activa la guanilato ciclasa, pero su principal efecto es tóxico, debido a las altas concentraciones en que se produce. Altas concentraciones de NO inactivan enzimas con metales de transición, incluyendo ciertas enzimas mitocondriales. El NO sintetizado por iNOS (NOS inducible) de macrófagos murinos activados es un mecanismo importante de defensa del huésped. Este es capaz de matar patógenos incluyendo leishmania, *Mycobacterium tuberculosis*, el parásito de la malaria y ciertos hongos. También media la inmunidad “no-específica” y es tóxico para células tumorales (MacMicking et al., 1997). El NO, y particularmente su derivado, el peroxinitrito (ONOO⁻), causa daño en el ADN patogénico e inhibe la respiración (inhibiendo la producción metabólica de energía necesaria para la división celular) (Bogdan et al., 2000). Así mismo, puede interrumpir la replicación del ADN y la síntesis de proteínas de ciertos virus, posiblemente bloqueando la actividad de la ribonucleótido reductasa y la generación de intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico (Melkova y Esteban, 1995; Karupiah y Harris 1995; Groves, 1999)

El NO también regula la función de linfocitos y puede participar en la inhibición de algunas células T ayudadoras (Th). El NO producido por macrófagos de ratón reduce la expresión de genes dependientes de NF- κ B por S-nitrosilación de p50. Así mismo, inhibe la liberación de IL-1 β e IL-18. También se puede inhibir la proliferación celular con la

presencia de donadores de NO. (Bogdan et al., 2000). En linfocitos, el ONOO⁻ puede incrementar la expresión de IL-8 en respuesta a LPS (Filep et al., 1998).

5. Óxido nítrico y oxígeno y sus derivados.

El NO es un gas radical libre muy soluble, tanto en lípidos como en agua, capaz de reaccionar con el oxígeno y sus reactivos intermedios para formar otros radicales (por ejemplo NO₂), aniones moderadamente estables (NO₂⁻), aniones muy estables (NO₃⁻), óxidos altamente inestables (N₂O₃) y peróxidos inestables (por ejemplo, ONOO⁻), de modo que existe una relación estrecha entre los RNIs y ROI's (Nathan y Shiloh, 2000) y las vías por las que se generan, pueden conectarse, como se muestra en la figura 5. A pH bajo, el nitrito (NO₂⁻) acumulado puede ser protonado a ácido nitroso, el cual puede dismutar y reconvertirse en NO. El NO puede reaccionar con tioles para dar formas de reserva (RSNO) (MacMicking et al., 1997). En condiciones biológicas, la mayoría de estos compuestos aparece pocos segundos después que la enzima NOS se ha activado. El NO se descompone rápidamente para formar nitritos y nitratos y esta reacción es catalizada por metales de transición, incluyendo el fierro. La hemoglobina inactiva al NO por unión de éste a su grupo heme, formando nitrosohemoglobina y por catálisis de la degradación del óxido nítrico en nitrito y nitrato, resultando en la formación de metahemoglobina. La enzima NOS tiene un motivo heme, por lo que el NO puede tener un efecto de retro-alimentación negativa durante su producción.

Los mecanismos que inducen la respuesta inmune en los mosquitos no han sido entendidos. Se ha considerado que la respuesta inmune podría estar regulada por factores o moléculas que son liberados a la hemolinfa en respuesta a la presencia de microorganismos (Dimopoulos et al., 2001). Entre las moléculas más importantes en la defensa de los mosquitos se encuentran las catecolaminas, que le permiten encapsular a los microorganismos o agentes extraños. (Munkirs et al., 1990). Una de las más abundantes en insectos es la dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Sin embargo, no se ha determinado el papel de las catecolaminas en la regulación de la respuesta inmune en ningún grupo de insectos.

Durante la oxidación de la L-DOPA se generan diferentes radicales libres de oxígeno, entre ellos, superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y radicales hidroxilo (·OH). Se cree que el OH es extremadamente tóxico para las células causando la

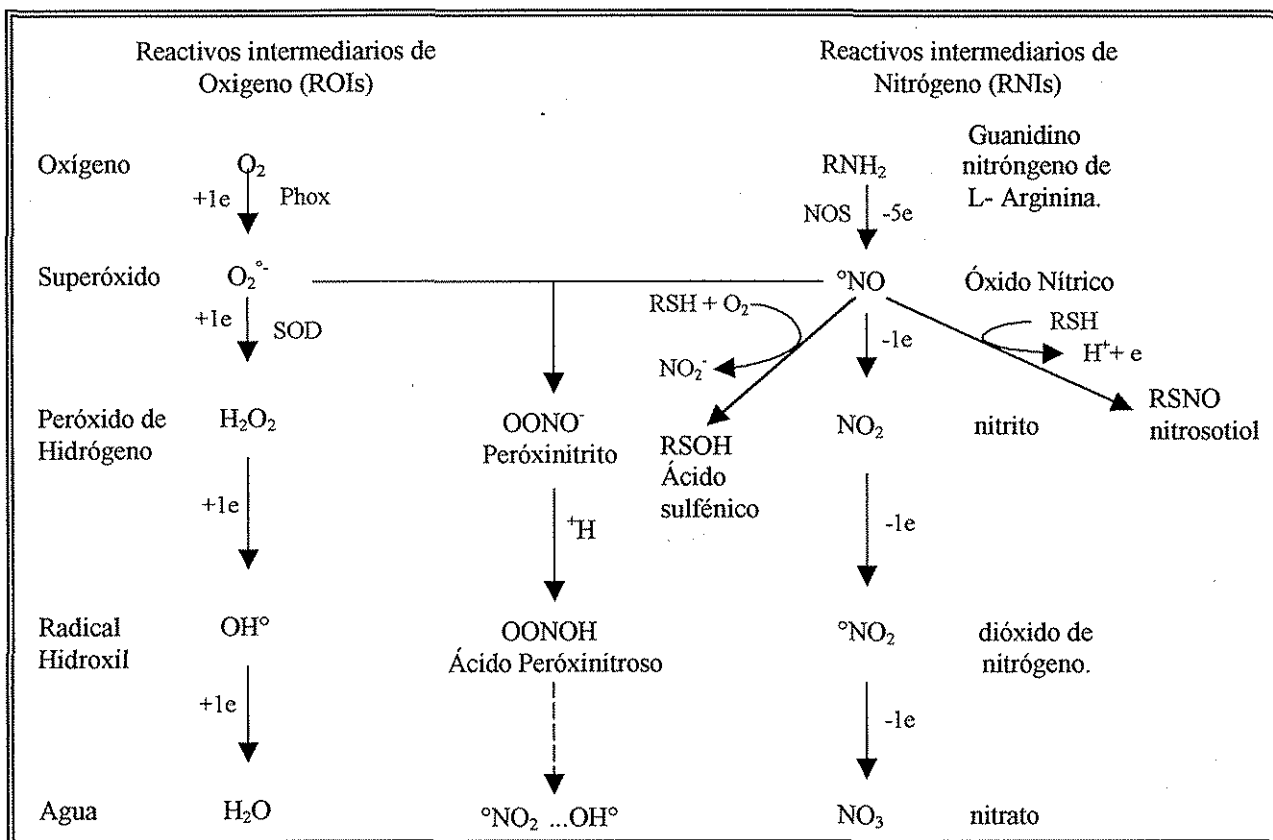


Figura 5. Vías de producción de ROIs y RNIs y su interacción. NOS (Óxido nítrico sintasa), Phox (oxidasa de fagocitos) (Nathan y Shiloh, 2000).

peroxidación de lípidos de membrana (Rikans y Hornbrook, 1997), el H_2O_2 lleva a la iodación de proteínas bacterianas, a la formación de aldehídos y a la degradación de cadenas polipeptídicas, además puede interactuar con la vitamina C formando compuestos tóxicos para muchas especies bacterianas. Recientemente se observó que la hemolinfa y el intestino de *An. albimanus* generan anión superóxido en presencia de L-DOPA y que éste resulta tóxico para los oocinetos de *P. berghei* (Lanz-Mendoza et al., 2002). Por otra parte, los radicales pueden interactuar con el NO producido por la NOS de los mosquitos durante los procesos de respuesta inmune.

IV. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento actual sobre los mecanismos de defensa de los mosquitos transmisores de malaria es muy reducido. Por lo que resulta importante conocer y caracterizar los mecanismos celulares y humorales que presentan los mosquitos, así como la naturaleza bioquímica de los factores involucrados en la inmunidad contra parásitos. Actualmente se sabe que una de las enzimas involucradas en defensa, y que puede limitar el desarrollo del parásito *P. berghei* en *Anopheles stephensi* es la NOS, sin embargo se desconoce cual es el papel del NO en la resistencia o transmisión del parásito. Además, aunque los mecanismos de NOS y NO están bien caracterizados en mamíferos y en general su expresión es ubicua para la mayoría de los organismos vivos, desconocemos si es también aplicable para todas la especies de mosquitos, y considerando que en México, *Anopheles albimanus* y *An. pseudopunctipennis* son los principales transmisores de malaria, es importante estudiar y caracterizar la función de NOS en dichas especies.

V. HIPÓTESIS

SI LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (NOS) SE EXPRESA EN LOS MOSQUITOS *An. albimanus* Y *An. pseudopunctipennis* DURANTE LA INFECCIÓN POR EL PARÁSITO *P. berghei*, ENTONCES NOS PARTICIPA EN LA RESPUESTA INMUNE DE LOS MOSQUITOS.

VI. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

DEMOSTRAR QUE LOS MOSQUITOS *Anopheles albimanus* y *Anopheles pseudopunctipennis* EXPRESAN LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (NOS) Y QUE PARTICIPA EN LA RESPUESTA INMUNE CONTRA LA INFECCIÓN CON EL PARÁSITO *Plasmodium berghei*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- * Clonar y secuenciar el cDNA de la enzima NOS de *An. albimanus* y *An. pseudopunctipennis*.
- * Caracterizar la expresión de NOS durante el ciclo de vida del mosquito y determinar en qué tejidos se expresa.
- * Investigar si los oocinetos de *P. berghei*, levaduras y bacterias son capaces de inducir la generación de NO por el mosquito.
- * Determinar el papel de la L-DOPA en la producción de NO.

VII. METODOLOGÍA

1. Mantenimiento de mosquitos.

Se utilizaron mosquitos *An. pseudopunctipennis* y *An. albimanus* obtenidos del Centro de Investigación de Paludismo (Tapachula, Chiapas) y del insectario del Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública. Los mosquitos se mantuvieron a 27 °C y 75% de humedad relativa con ciclos de 12 h luz / oscuridad y se alimentaron con una solución de sacarosa al 5%. Cuando fue necesario, se incluyó en su dieta una mezcla de antibióticos-antimicótico (concentración final: 200 U/ml penicilina, 200 µg/ml de estreptomina y 0.5 µg/ml de anfotericina, Gibco BRL) para eliminar las bacterias presentes en el interior del intestino de los mosquitos.

2. Preparación de los oocinetos de *Plasmodium berghei*.

Se utilizaron ratones BALB/c previamente tratados con 1-acetil-2 fenilhidracina (200 µl de 6 mg/ml DFH en PBS 1X) y se infectaron con *P. berghei* de la cepa ANKA 2.34 (proporcionada por el Dr. Sinden, Imperial College UK) vía intraperitoneal. 2 a 3 días post-inoculación se cuantificó el nivel de parasitemia de los ratones por frotis y tinción con Giemsa y la presencia de gametocitos mediante una prueba de exflagelación. La sangre de los ratones con parasitemia mayor al 15% y con más de 10 exflagelaciones por campo en 40X fue obtenida por punción cardiaca. Los oocinetos fueron obtenidos a partir del cultivo de gametocitos durante 24 h a 22°C en RPMI pH 8.0 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado, 50 mg/l de hipoxantina y 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 0.25 µg/ml de anfotericina (Rodríguez y cols., 2001). Los oocinetos se purificaron utilizando gradientes de nicodenz al 17% (Sigma) y centrifugando a 800 g por 24 min. a 4°C. Los oocinetos se recuperaron de la interfase, se lavaron con PBS y se suspendieron en 2 ml de medio de cultivo RPMI.

3. Cultivo de células C636.

Las células C636 son derivadas de *Aedes albopictus* (Igarashi, 1978) y se utilizaron como un modelo *in vitro* para tratar de caracterizar el gen NOS en mosquitos. Las células se mantuvieron en medio de cultivo MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado 1h a 56 °C (iSFB) y una mezcla de vitaminas (Gibco). Los pases celulares se realizaron cuando las células habían crecido a confluencia, las células se lavaron con medio

fresco y se despegaron golpeando el frasco de cultivo. Del total de células despegadas se tomaron alícuotas para los subcultivos, generalmente en dilución 1:5.

4. Extracción de ARN de mosquitos.

El ARN de mosquitos adultos, larvas y pupas, así como de intestinos de adultos se obtuvo utilizando el reactivo TriPure (Boehringer) seguido de una re-extracción empleando el kit RNaid Plus (BIO 101). Brevemente, se colocaron 20 mosquitos en 1 ml de TriPure (fenol ácido e isotiocianato de guanidina, Chomczynski y Sacchi, 1987) y se maceraron. El homogenado se incubó 5 min. a temperatura ambiente y se adicionaron 200 µl de cloroformo agitando vigorosamente. Nuevamente se incubó 15 min. a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g por 15 min. a 4°C para separar en tres fases. Se recuperó la fase superior acuosa, conteniendo el ARN total y se agregaron 500 µl de isopropanol para precipitar el ARN, se centrifugó a 12000 g por 10 min. a 4°C y el precipitado se lavó con Etanol al 75%. El ARN se resuspendió en 50 µl de agua-DEPC. La segunda extracción se realizó adicionando 500 µl de una solución amortiguadora de lisis del kit RNaid Plus y se extrajo con fenol ácido. Después de centrifugar se recuperó la fase superior y se le adicionó cloroformo/ alcohol isoamílico, centrifugando nuevamente para volver a recuperar la fase superior. El ARN se purificó utilizando una matriz de sílica para intercambio iónico suministrada en el kit, siguiendo el protocolo del mismo. La extracción de ARN de *D. melanogaster*, sangre periférica, cerebro y bazo de ratón también se llevó a cabo mediante este método.

5. Obtención de ADN de mosquitos.

Para obtener el ADN se maceraron 20 mosquitos en 500 µl de solución amortiguadora conteniendo 10mM Tris, 10 mM EDTA, 400 mM NaCl y 1% SDS, se agregó 10 µl de 10mg/ml de proteinasa K y se incubó a 56°C toda la noche para la degradación de proteína. Al día siguiente, se agregaron 200 µl de una solución saturada de NaCl (6 M) y se centrifugó 15 min. a 12000 g. El sobrenadante se recuperó y el ADN se precipitó con 100% etanol durante 1h a -70°C. Se centrifugó nuevamente y el precipitado se lavó con 70% etanol. El ADN se resuspendió en 100 µl de agua destilada estéril.

6. RT-PCR.

Previo a la síntesis de cDNA, el ARN de mosquitos se trató con DNasa I para evitar la contaminación con ADN. A 1 µg de ARN se le adicionó 1 µl de 10X de solución amortiguadora de reacción (200 mM Tris pH 8.3, 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂), 1.0 U de DNasa I (Gibco) en un volumen final de 10 µl y se incubó 15 min. a temperatura ambiente. Para inactivar la enzima, se agregó 1 µl de 25 mM MgCl₂ y se incubó a 70°C por 10 min. El ARN tratado se utilizó directamente para síntesis de cDNA.

El cDNA se sintetizó por transcripción reversa utilizando 5µg de ARN libre de ADN, 100ng de oligonucleótido dT y 200U de la enzima reverso transcriptasa RNasa H⁺ SuperScript II (Gibco BRL). La mezcla de reacción además contenía 50mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ y 10 mM DTT. La síntesis se realizó a 46°C durante 50 min. Para la reacción de polimerasa en cadena (PCR) se utilizaron 2 U/µl de enzima Taq ADN pol (Gibco BRL), 20mM Tris-HCl (pH 8.4), 50mM KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 0.25 mM de la mezcla de desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pM de cada uno de los oligonucleótidos y 2.5 µl de templado (ADN o cDNA). Se utilizaron los oligonucleótidos reportados para *An. stephensi* localizados una región correspondiente a los exones 16-18, para amplificar NOS de *An. pseudopunctipennis*: 5'-ACA TCA AGA CGG AAA TGG TTG-3' (**HL-1S**, sentido) y 5'-ACA GAC GTA GAT GTG GG CCT T-3' (**HL-2A**, antisentido), bajo las siguientes condiciones, 94°C 30s, 56°C 30s y 72°C 30s, 35 ciclos; el tamaño de producto esperado es de 250 pb (Figura 6). De la misma forma; para incrementar el rendimiento de la reacción y la especificidad del producto se utilizaron los oligonucleótidos anidados 5'-ACT GAC AGA TTC CCA AGG TAT-3' (**HL-3S**, sentido) y 5'-ATT CCG CCT CTT TGA GGG CAA-3' (**HL-4A**, antisentido), bajo las mismas condiciones se obtuvo un fragmento de 180 pb (Luckhart et al., 1998). Por otra parte, para determinar la integridad del ARN o cDNA se amplificó un fragmento del gen constitutivo de actina utilizando los siguientes oligonucleótidos: 5'-ACA TGG AGA AAA TCT GGC ACC ACA-3' (**Act1S**, sentido) y 5'-ACA GCT TTT CTT TGA TGT CGC GAA-3' (**Act2A**, antisentido), los cuales fueron diseñados en base al alineamiento de varias secuencias del gen de actina de diferentes organismos bajo las siguientes condiciones: 94°C 30s, 65°C 30s y 72°C 30s, el producto obtenido fue de 450pb. Los productos obtenidos se verificaron por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

Para la amplificación del gen HpRT (hipoxantina ribosil transferasa) de ratón, se utilizó ARN obtenido como se describe antes, a partir de bazo, cerebro y sangre periférica de ratón y se amplificó bajo las siguientes condiciones: 94°C 30s, 55°C 30s y 72°C 30s durante 30 ciclos.

7. Sistema RACE (rapid amplification of cDNA ends).

Para el RACE-5', se sintetizó cDNA utilizando el oligonucleótido anti-sentido **HL-4A**, permitiendo así la conversión de mRNA específicos en cDNA. La composición final de la reacción fue 20mM Tris-HCl (pH 8.4), 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 10mM DTT, 100nM **HL-4A**, 100µM de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 1-5 µg de ARN total y 200U SuperScript II RT. La reacción se incubó 50 min. a 42°C y la enzima se inactivó por calentamiento a 70°C durante 15 min. El ARN se degradó por adición de RNasa, incubando 30 min. a 37°C. El cDNA se purificó por intercambio iónico con el kit de purificación GLASS MAX (Gibco BRL), siguiendo las instrucciones del mismo. Al cDNA obtenido se le adicionó un tallo homopolimérico de citocinas en el extremo 3' con la enzima TdT (terminal deoxinucleotidyl transferasa), en una reacción que contenía 10mM Tris-HCl (pH 8.4), 25mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 200µM dCTP, cDNA y la enzima TdT, se incubó 10 min. a 37°C. El cDNA fue entonces amplificado por PCR con un oligonucleótido específico interno (**HL-5A**, 5' GGC CAC GCC CTT CTG AAG CAT TT-3', antisentido) y un oligonucleótido complementario al tallo homopolimérico **AAP** (5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3', sentido), en una reacción que contenía 20mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 400 nM HL-5, 400 nM AAP, 200 mM cada desoxinucleótido el cDNA y 2.5 U *Taq* ADN polimerasa, bajo las siguientes condiciones: 94°C 1 min., 55 °C 1 min. y 72°C 2.5 min., obteniendo así la amplificación de la región desconocida entre **HL-4A** y el extremo 5' del mRNA.

Para el 3' RACE, se generó cDNA a partir de 5 µg de ARN total y 500 nM de oligonucleótido dT conteniendo una región adaptadora **AP** (5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T-3'), en una mezcla de reacción que contenía 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 500 µM de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5 µg de ARN, 500 nM de oligonucleótido **AP** y 200 U SuperScript II RT. La reacción se incubó 50 min. a 42°C, seguido por 15 min.

```

3221 5' ACCAAACCGG TCATCCTGAT CGGTCCGGGA ACGGGCATTG CACCGTTCCG TTCGTTCTGG CAGGAATGGG
      HL-1S                               HL-3S
3291  ATCACATCAA GACGGAAATG GTTGA CTGCA AGATTC CCAA GGTATGGCTC TTCTTTGGCT GTCGTACAAA
3361  GAACGTGGAC CTATACCGGG ACGAAAAGGA GGAGATGGTT CAGCACGGCG TACTCGATCG AGTTTTCTTG
      HL-4A
3431  GCACTTTCAC GAGAGGAGAA CATTCAAAG ACCTACGTAC AGGATCTTGC CCTCAAAGAG GCGGAATCGA
      HL-2A
3501  TCTCCGAGCT CATCATGCAG GAGAAAGGCC ACATCTACGT CTGTGGCGAT GTCACCATGG CCGAGCACGT
3571  GTACCAGACG CTGCGCAAGA TACTGGCCAC GCGCGAAAAG CGCACGGAAA CTGAGATGGA GAAGTACATG
3641  TTAACGCTGC GGGACGAAAA CCGCTACCAC GAGGACATTT TTGGCATCAC ACTGCGAACG GCAGAAATCC
3711  ACAACAAGTC ACGTGCAACT GCCCGCATTC GGATGGCTTC TCAGCCGTAA GCTTCGGGTT TATCCTCGGT
3781  AGGAAAGTTT TACCCCCTGA GATGACGCAC GTAAGGGGTG CACCACACAA AAGAAATTGT TAGGATATAA
3851  GTGAAAAGAA AAAATTTCCC TTTTACAACA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA A 3'

```

Figura 6. Secuencia de nucleótidos del cDNA de *Anopheles stephensi* donde se localizan los oligonucleótidos utilizados para la obtención del fragmento de NOS de *An. pseudopunctipennis* (Luckhart et al 1998).

a 70°C. Entonces se amplificó por PCR utilizando el oligonucleótido específico **HL-8S** (5'-TCT CAT GCT GGC AAA TGA AT-3' sentido), en una reacción con 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 400 nM HL-8, 400 nM del oligonucleótido **AUAP** (5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'), 200 mM cada desoxinucleótido, el cDNA y 1 U/μl de *Taq* ADN polimerasa, bajo las siguientes condiciones: 94°C 1 min., 55 °C 1 min. y 72°C 2.5 min., de esta forma se obtuvo la región localizada entre el oligonucleótido **HL-8S** y el tallo poly (A).

8. Clonación y secuenciación.

Los fragmentos de cDNA obtenidos por la técnica anterior (RACE) fueron clonados mediante el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen). Después de la amplificación por PCR se incubó la reacción 30 min. más a 72°C para asegurar que todos los productos de PCR fueran adenilados en el extremo 3'. El fragmento se separó por electroforesis en un gel de 1% agarosa en TAE 1X (Tris, ácido acético, EDTA) y se purificó del gel por intercambio iónico utilizando el kit de purificación CONCERT (Gibco BRL). La reacción de clonación (6 μl) contenía 0.5 a 4 μl de producto de PCR fresco, 10 ng de vector pCR 2.1 TOPO (Figura 7) en 0.2 M NaCl/0.01 M MgCl₂ se incubó durante 5 min. a temperatura ambiente. Las bacterias competentes químicas (*Escherichia coli*, TOP10) se transformaron con 2 μl de la reacción de clonación por choque térmico, se incubaron primero en hielo durante 15 minutos, seguido de 30 s a 42°C e inmediatamente se colocaron en hielo. Se incubaron 1 h a 37°C con agitación (200 rpm) en medio SOC (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM glucosa). Cincuenta microlitros de las bacterias se sembraron en placas de LB/agar (1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7.0, 1.5% agar) conteniendo 50 μg/ml de ampicilina y 1.6 μg de X-Gal y se incubaron toda la noche a 37°C. Se seleccionaron las colonias blancas (que no expresaron β-galactosidasa) para análisis de colonias positivas por restricción y PCR. El plásmido se digirió con la enzima *EcoR* I y *BamH* I para liberar el inserto o en su caso linearizar el plásmido.

Los fragmentos clonados se secuenciaron en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM y las secuencias obtenidas se confirmaron por análisis de

identidad con otras secuencias reportadas en el GenBank con el programa BLAST (ncbi.nlm.nih.gov). Para secuenciar, fue necesario el diseño de nuevos oligonucleótidos, los cuales fueron **HL-6A** (5'-CGT ACA CCG ATG ATT CAT TT), **HL-7A** (5'- AGA TTG ATT GGA TCC CGC T), ambos en antisentido.

9. Cultivo de Bacterias y obtención de ADN plasmídico.

Las bacterias (*E. coli*) conteniendo el plásmido (pCR 2.1TOPO) con el inserto de interés se inocularon en medio líquido LB (1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7) con 50 µg/ml de ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C y agitación (200 rpm). El plásmido se obtuvo por el método de lisis alcalina, 1.5 ml del cultivo se centrifugaron en tubos eppendorff a 14000 rpm por 30s. El botón de bacterias se resuspendió en 100 µl de solución amortiguadora de lisis GTE (glucosa, Tris, EDTA) y se incubó 5 min. Se adicionaron 200 µl de solución 1% SDS/0.5 N NaOH y después de 5 min. se agregaron 150 µl de solución neutralizante (3M acetato de sodio). Se centrifugó 15 min. a 14000 rpm y el sobrenadante se recuperó para precipitar el ADN plasmídico con 100% etanol frío a -70°C durante 30 min., el ADN se lavó con 75% etanol y se resuspendió en 30 µl de agua estéril.

10. RT-PCR/ Southern.

Para semicuantificar la expresión de NOS se hizo RT-PCR tipo southern. A partir de 1 µg de ARN se sintetizó cDNA como se mencionó anteriormente y se hizo PCR con oligonucleótidos específicos de NOS de *An. pseudopunctipennis*, **HL-5A** y **HL-8S**, bajo las siguientes condiciones, 94°C 30s, 56°C 30s y 72°C 30s, 15 ciclos. El producto esperado de 600pb, se separó por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE por 1.5h a 80V. Al término de la corrida, el gel se incubó en 0.5 M NaOH/1.5 M NaCl y se transfirió a una membrana de Nylon + (Hybond, Amersham) durante 20 min. por capilaridad. El gel se enjuagó en 2X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M citrato de sodio, pH 7) y se dejó secar antes del proceso de hibridación. Para la detección del fragmento se utilizó el sistema de hibridación Alk-Phos (Amersham). La sonda utilizada para hibridar fue un producto de PCR obtenido con los mismos oligonucleótidos, marcado de acuerdo al manual del kit. La membrana se

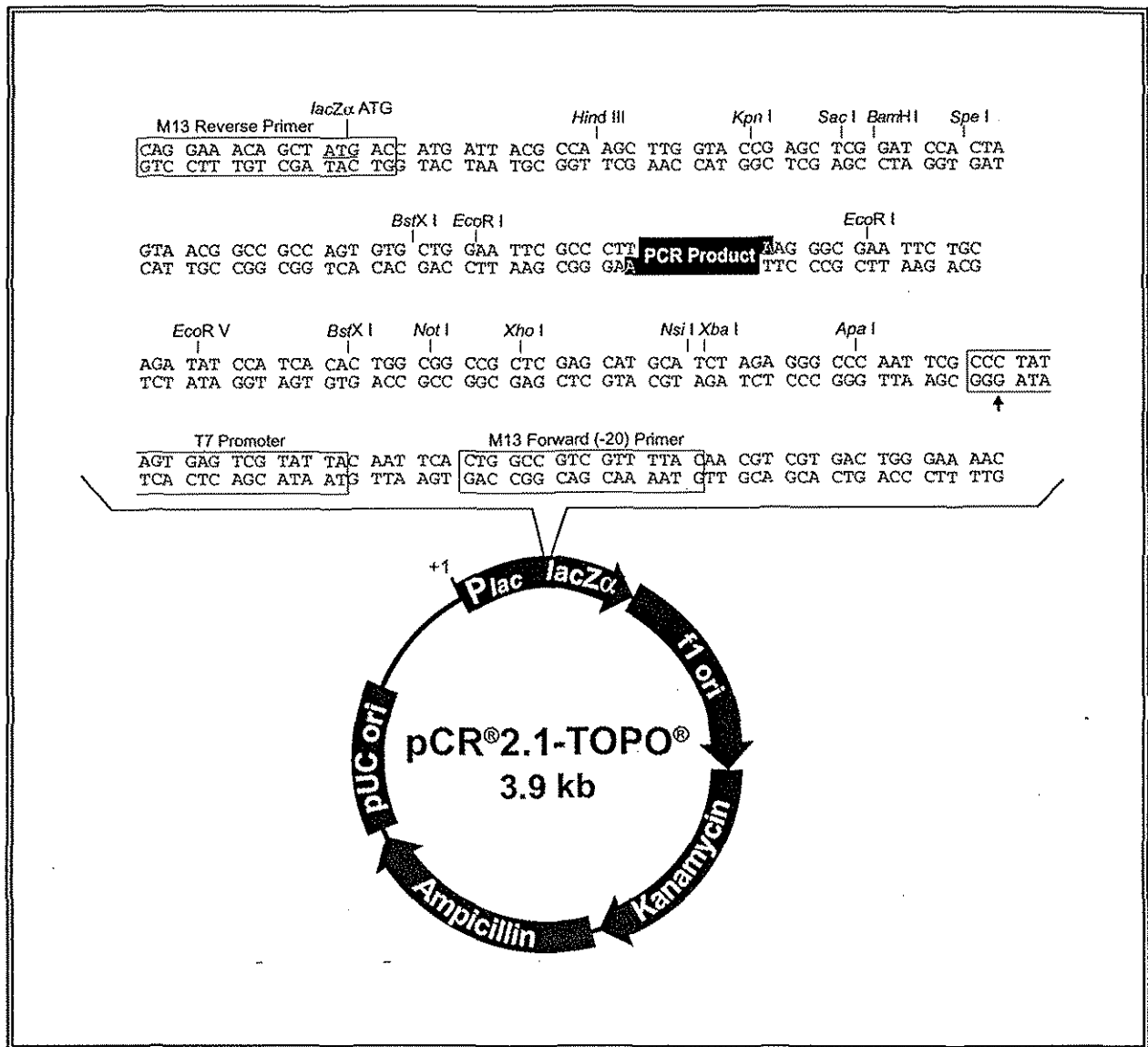


Figura 7. Vector de Clonación pCR 2.1-TOPO (Invitrogen, Life Thecnologies).
 La secuencia representa el sitio de clonación TA del vector para productos de PCR y los sitios de restricción que la flanquean. El vector presenta genes de resistencia a Kanamicina y Ampicilina, así como el gen reportero lacZ.

pre-hibridó en un volumen de solución amortiguadora de hibridación (suministrado por el kit y conteniendo 12% Urea, suplementado con 0.5 M NaCl y 4% del reactivo bloqueador) equivalente a 0.25 ml/cm² de membrana a 55°C con agitación durante 15 min. Se agregó la sonda marcada (10 ng/ml de buffer) y se hibridó toda la noche a 55°C. Los lavados post-hibridación se realizaron con una solución amortiguadora primaria (2 M Urea, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 0.2% reactivo bloqueador, 50 mM fosfato de sodio pH 7 y 1 mM MgCl₂) a 55°C, seguido de un lavado con una solución amortiguadora secundaria (50 mM Tris base, 100 mM NaCl y 2 mM MgCl₂) a temperatura ambiente. La detección de la marca se realizó utilizando el reactivo CDP-*Star* (Amersahm) y exponiendo un film por el tiempo apropiado. El film se reveló utilizando los reactivos de fotografía Kodak.

11. Cultivo de Intestinos.

Los intestinos se obtuvieron de mosquitos adultos de 3 días postemergencia. Los mosquitos se alimentaron previamente con agua azucarada y antibióticos (5% sacarosa, 200 U/ml penicilina, 200 µg/ml estreptomina y 0.5 µg/ml anfotericina), a los cuales se les separó el abdomen con agujas de disección y se les extrajo el intestino en 10 µl de PBS (solución amortiguadora salina de fosfatos: 2.6 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl y 8.2 mM NaH₂PO₄) conteniendo inhibidores de proteasas (100 mM PMSE, 10 mM TLCK y 10 mM leupeptina). Se colocaron diez intestinos por pozo en placas para ELISA de 96 pozos conteniendo 200 µl de medio de cultivo RPMI sin rojo fenol (Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado 30 min a 56°C, 10 µg/ml de concanavalina A y antibiótico-antimicótico (100 U/ml penicilina, 100ug/ml de estreptomina y 0.25ug/ml de anfotericina). Los cultivos se mantuvieron a 20°C por distintos periodos de tiempo. A los cultivos se les agregó levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (1x 10⁶/pozo) y bacterias Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae*) (1x10⁶/pozo) muertas por calor (en autoclave 15 min., a 15 lbs). Los oocinetos de *P. berghei* vivos fueron adicionados directamente en el cultivo (2 x10⁵/pozo) o fueron inoculados por enema (2 x10³/por mosquito) una hora previa a la obtención del intestino. Otros cultivos fueron incubados con diferentes concentraciones de L-DOPA (dihidroxifenilalanina, Sigma) (1, 2.5 y 5 µg/ml).

12. Determinación de la concentración de NO.

Las concentraciones de NO en los sobrenadantes de los cultivos de intestinos se determinó indirectamente mediante la cuantificación de sus productos estables, nitritos y nitratos ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) por medio de la reacción de Griess (Eckmann et al., 2000). Los sobrenadantes se recuperaron en tubos eppendorff, se centrifugaron para evitar el material suspendido en éste. Se tomaron 50 μl de los sobrenadantes y se mezclaron con 50 μl de sulfanilamida al 1% y con 50 μl de naftiletilendiamina al 0.1% preparadas en ácido fosfórico al 2.5% y se incubaron durante 10 min. a temperatura ambiente. Las lecturas de absorbancia fueron determinadas en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS) a 540 nm. Para calcular las concentraciones de nitritos presentes en el medio se hizo una curva estándar con concentraciones conocidas de nitrato de sodio, de 1 a 100 μM . La actividad de la enzima fue inhibida con L-NAME (N ω -Nitro-L-Arginina Metil Ester) un análogo competitivo de la arginina, a diferentes concentraciones (0.2, 0.6 y 1.2 μM).

13. Estadística:

Para el análisis estadístico se aplicó la prueba estadística de t de Student para encontrar la diferencia de medias entre los controles y cada uno de los tratamientos. Se consideraron como estadísticamente significativo aquellos valores con una $p < 0.001$, confianza del 99.9%.

VIII. RESULTADOS

1. AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DE cDNA DE NOS de *Anopheles albimanus* y *Anopheles pseudopunctipennis*.

Para conocer si los mosquitos *An. albimanus* y *An. pseudopunctipennis* expresaban el gen que codifica para la NOS, se realizaron ensayos de RT-PCR, a partir de ARN total de mosquitos hembras alimentadas con sangre de ratón. El ARN se obtuvo 24 h post-alimentación, considerando que la alimentación sanguínea induce la expresión del gen en otros mosquitos (Luckhart et al 1998). Los primeros resultados se obtuvieron para la especie *An. albimanus*, con los oligonucleótidos HL-1S y HL-2A, se amplificó un fragmento de aproximadamente 220 pb (Figura 8). Por otra parte, se utilizó la línea celular C636 de *Aedes albopictus*, ya que teniendo un modelo *in vitro*, se podrían diseñar experimentos que nos ayudaran a entender los mecanismos de activación de NOS *in vitro* e *in vivo*. Se utilizaron los oligonucleótidos antes mencionados para amplificar NOS de esta línea celular bajo dos condiciones distintas de estimulación, con LPS y ecdisona, suponiendo que ambos compuestos estimulan la expresión de NOS. Bajo estas condiciones, en las células C6/36 se obtuvo un fragmento de aproximadamente 200 pb, (Figura 8). Cabe mencionar, que la amplificación se obtuvo en las células sin estimular y las estimuladas con LPS, pero no en las estimuladas con ecdisona. La amplificación con los oligonucleótidos internos HL-3S y HL-4A, fue negativa tanto para *An. albimanus* como para C6/36. Los fragmentos obtenidos en la primera amplificación, el de 220 pb de *An. albimanus* y de 200 pb de las células C6/36 se secuenciaron con el oligonucleótido HL-2A, sin embargo, el análisis de las secuencias obtenidas mostró que no correspondían al gen que codifica para la enzima NOS en ninguno de los dos casos. Por lo tanto se abandonó el estudio de esta especie y de la línea celular, y se continuó con el estudio de la especie *An. pseudopunctipennis*.

Se obtuvo un fragmento de cDNA de *An. pseudopunctipennis* de aproximadamente 350 pb (Fragmento A) con el par de oligonucleótidos HL-1S y HL-2A, mientras que con los oligonucleótidos internos HL-3S y HL-4A se obtuvo un fragmento de 250 pb, como se muestra en la Figura 9. Sin embargo, ambos fragmentos eran más grandes de lo esperado (250 y 180 pb, respectivamente), por lo que se realizó un PCR anidado, haciendo combinaciones entre los oligonucleótidos internos y externos, obteniéndose los fragmentos

TESIS CON
SELLA DE ORIGEN

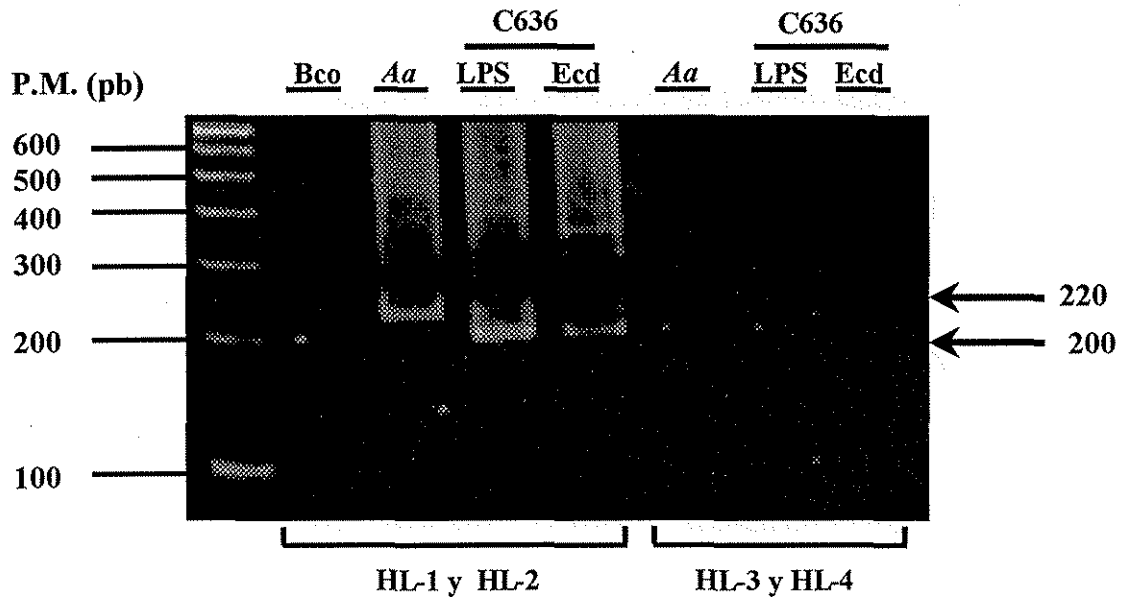


Figura 8. Amplificación del un fragmento de cDNA de *Anopheles albimanus* (*Aa*) y células C636. Se obtuvo ARN total de 15 mosquitos alimentados con sangre de ratón Balb/C y de células C636 estimuladas con LPS y ecdisona (Ecd). Se obtuvieron productos de PCR para la primera amplificación con los oligonucleótidos HL-1S y HL-2A, pero no para el producto anidado con los oligonucleótidos HL-3S y HL-4A.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

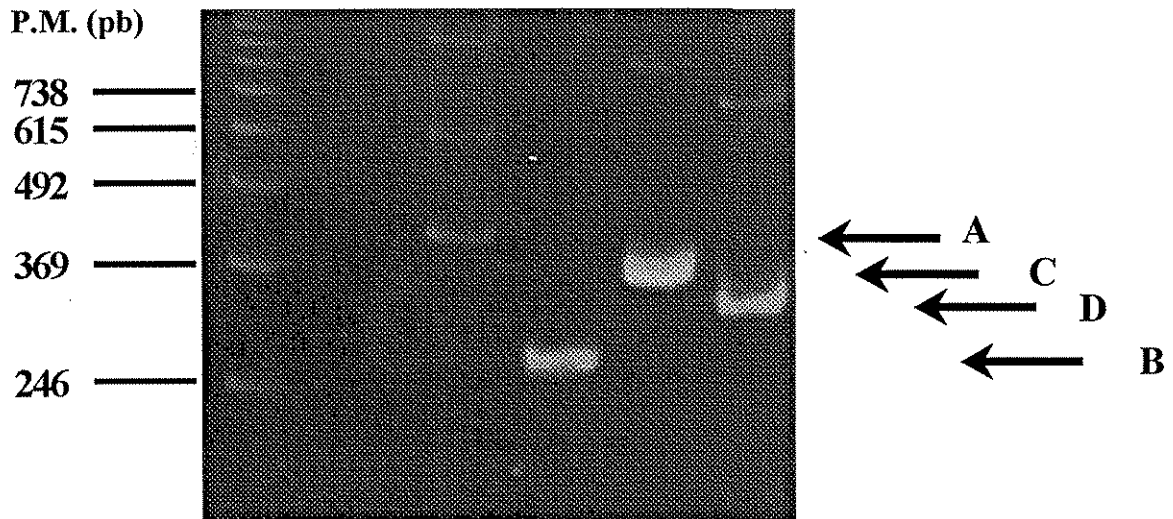


Figura 9. Amplificación del cDNA de NOS de *Anopheles pseudopunctipennis*. Se obtuvo ARN total de 15 mosquitos alimentados con sangre de ratón Balb/C. Se amplificaron por RT-PCR los fragmentos A, B, C y D con los oligonucleótidos HL-1, HL-2, HL-3 y HL-4 (ver texto), los cuales pertenecen a cDNA de NOS de *An. pseudopunctipennis*.

C (HL-1S, HL-4A) y D (HL-3S, HL-2A), los cuales eran de tamaño intermedio a los fragmentos A y B. Este resultado indicaba de alguna manera que los fragmentos obtenidos eran específicos, lo cual fue confirmado cuando se secuenció el fragmento C, donde se utilizó el oligonucleótido HL-4A para secuenciar.

La secuencia obtenida confirmó la amplificación de NOS de *An. pseudopunctipennis* y el análisis de secuencia mostró una identidad de más del 80% con la NOS de *An. stephensi* (Figura 10). La secuencia deducida de aminoácidos mostró alta identidad con las secuencias de *An. stephensi* (80-85% de identidad), *An. gambiae* (76% de identidad), y más del 50% de identidad con las NOS de *Drosophila melanogaster*, *Manduca sexta* y *Rhodnius prolixus*. Por otra parte, la comparación de las secuencias de nucleótidos mostró la presencia de un intrón de aproximadamente 100pb, lo cual indicaba contaminación del ARN con ADN del mosquito, de modo que previo a la síntesis de cDNA, el ARN se trató con DNasa I para degradar el ADN contaminante, el PCR a partir de ADN y cDNA confirman la presencia del intrón (Figura 10B). Debido a la identidad que presentan las secuencias de NOS de los diferentes organismos, nos interesó investigar si era posible amplificar NOS de otros organismos con los oligonucleótidos utilizados en los experimentos anteriores, por lo que obtuvimos ARN total de *D. melanogaster* y ratón de diferentes tejidos (bazo, cerebro y sangre periférica). Como se muestra en la figura 11, estos oligonucleótidos son capaces de amplificar el cDNA de NOS tanto en *Drosophila* como en sangre periférica de ratón, pero no en bazo ni cerebro del mismo, lo cual podría indicar una mayor homología con NOS2 que con las otras isoformas de NOS presentes en ratón.

Debido a que los oligonucleótidos son capaces de amplificar NOS de sangre periférica de ratón, quedaba la duda si el producto amplificado de *An. pseudopunctipennis* alimentadas con sangre de ratón, correspondía efectivamente al mosquito o más bien era consecuencia de la presencia de NOS en la sangre de ratón. Para descartar esta posibilidad, se hizo RT-PCR a partir del ARN de mosquitos en una cinética de 1 a 72 h post-alimentación sanguínea, amplificando un gen constitutivo de ratón (hipoxantina ribosil transferasa), y encontramos que el ARN de hipoxantina ribosil transferasa es viable sólo hasta aproximadamente 6 h post-alimentación (Figura 12), sugiriendo que probablemente ningún

ApsNOS 1 CGGAAATGGTTGACTCGAAGGTAAGGTGGCCGGTCGTTTCTTTGTACGAC
 AstNOS 1 CGGAAATGGTTGACTG-----
 consensus 1 CGGAAATGGTTGACT aaghtaaggtggccggtcgtttctttgtacgac

ApsNOS 51 ATTTAAATGACTCCGCTTAATCTCTCGCCCGCTGTAGATTCCCAAAGTAT
 AstNOS 18 -----AAGATTCCCAAAGTAT
 consensus 51 atttaaatgactccgcttaatctctcgcccgctg AGATTCCCAAAGTAT

ApsNOS 101 GGCTGTTCTTCGGTTGTCGCACGCAGAAGCTTGACCTATACCGGGACGAA
 AstNOS 34 GGCTCTTCTTTGGCTGTCGTACAAAGAACGTGGACCTATACCGGGACGAA
 consensus 101 GGCT TTTCT GG TGTCG ACg AGAA T GACCTATACCGGGACGAA

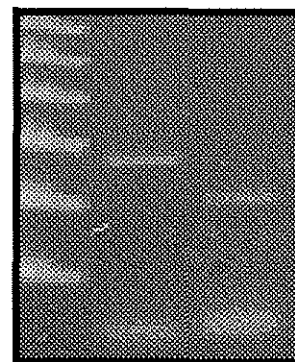
ApsNOS 151 AAGAACGAAATGCTTCAGAAGGGCGTGCTGGACCGAGTGTTCTGGCTCT
 AstNOS 84 AAGGAGGAGATGGTTTACGACCGGCGTACTCGATCGAGTTTTCTGGCACT
 consensus 151 AAGaA GAaATG TTCAG A GGCgTgCT GA CGAGT TTCCTGGC CT

ApsNOS 201 TCTCGGAGAGGAAAACACTCCAAAGGTACACTTTGAACTTTGAAAGC
 AstNOS 134 T-TCACGAGAGGAGAACATTCCAAAGACTACGTACAGGATCTTGC---C
 consensus 201 TctCgCGAGAGGaaAACA TCC AAgG AC T Aaa T T G aagC

ApsNOS 251 TTGAGATTGTGGTATAAA---CCGTTCTTTCTTTCCATCG-----CAG
 AstNOS 180 CTCAAAGAGCGGAATCGATCTCCGAGCTCATCATGCAGGAGAAAGGCCAC
 consensus 251 T AgA G GG AT aAtCtCCG CT TC T C a GaaaggCCA

ApsNOS 292 ACCTACGCCAA-----
 AstNOS 230 ATCTACGTCTGTGGCGATGTACCATTGG
 consensus 301 A CTACG C atggcgatgtcaccatgg

P.M. DNA cDNA



B

A

ApsNOS	1	--IVLSKIPKVVWLFPGCRTQKNDLYRDEINEMKGVLDRVFLAL LARGKHSQ-----
AstNOS	1	IVLVFCKIPKVVWLFPGCRTNVDLYRDEKEEMVCGVLDRVFLALSREENIPKTYVQDLA--
AgaNOS	1	SEIVLCKIPKVVWLFPGCRTNVDLYRDEKEEMVCGVLDRVFLALSREENIPKTYVQDLA--
DmNOS	1	--DPTA--PKVWLFPGCRNVDLYRDEKEEMVCGVLDRVFLALSREDAIPKTYVQDLIEQ

C

Figura 10. Comparación de la secuencia de ApsNOS con AsNOS. A) El análisis de comparación de secuencias muestra que el cDNA de NOS de *Anopheles pseudopunctipennis* (ApsNOS) presenta alta identidad con el de NOS de *Anopheles stephensi* (similitud 80%, AstNOS). En la secuencia también se encontró la presencia de un intrón, lo cual fue corroborado por PCR de ADN y cDNA, como se muestra en la fotografía (B). La secuencia corresponde al fragmento C obtenido con los oligonucleótidos HL-1S, HL-4A, cuya secuencia fue comparada con la correspondiente de *An. stephensi*, *An. gambiae* y *D. Melanogaster* (DmNOS) (C).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
VALIA DE ORIGEN

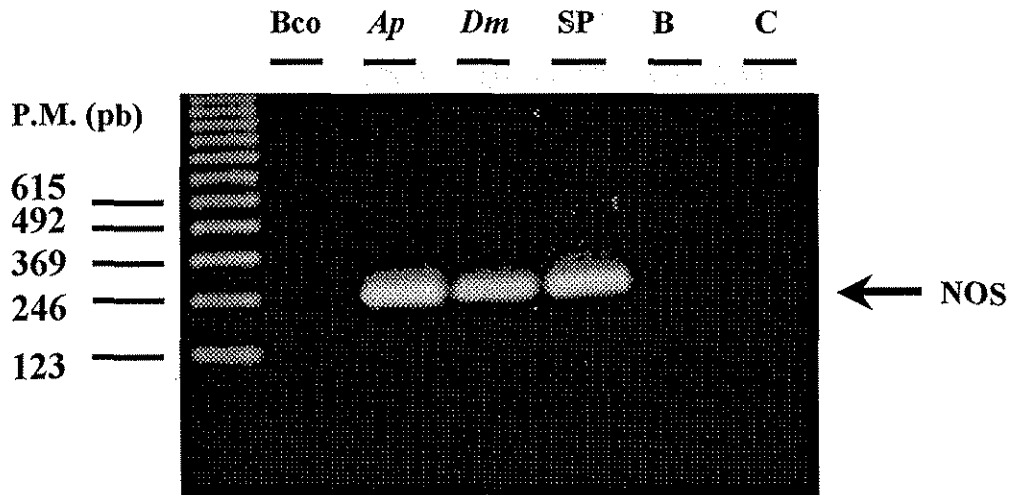


Figura 11. Amplificación de NOS en diferentes organismos. Se obtuvo ARN de mosquitos *An. pseudopunctipennis* (*Ap*), *Drosophila melanogaster* (*Dm*) y de tres tejidos diferentes de ratón Balb/C (Sangre Periférica, *SP*; Bazo, *B*; Cerebro, *C*). Los resultados muestran que NOS se amplifica tanto en *Drosophila* como en sangre periférica de ratón, pero no en bazo ni cerebro, los fragmentos amplificados son de tamaño similares al de *An. pseudopunctipennis*.

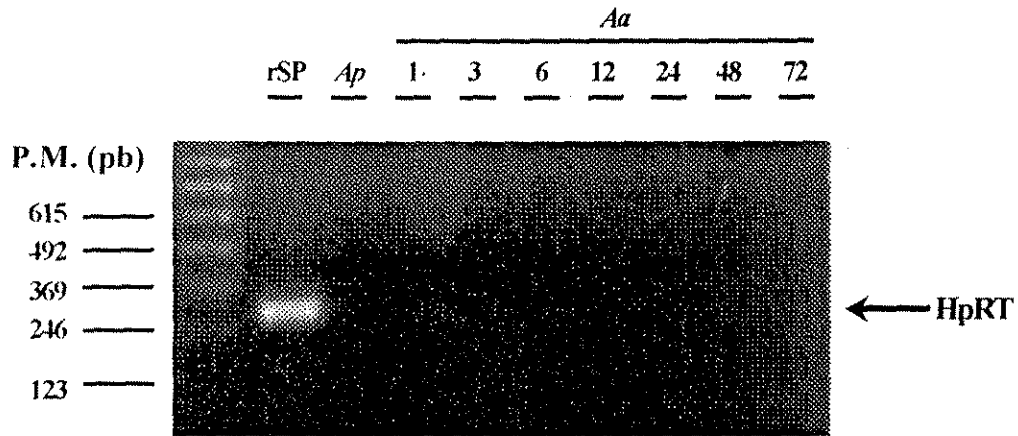


Figura 12. El ARN de la sangre de ratón ingerida por los mosquitos, no es viable después de 3h postalimentación. Se obtuvo ARN de mosquitos alimentados a diferentes tiempos postalimentación y se sintetizó cDNA, el cual fue utilizado para amplificar un fragmento del gen HpRT, un gen constitutivo de ratón.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RNA proveniente de la sangre de ratón se encuentra integro. De esta manera, se puede decir que el fragmento de cDNA de NOS amplificado de mosquitos 24 h postalimentación corresponde efectivamente al mosquito y no al ratón.

2. OBTENCIÓN DE LOS EXTREMOS 5' Y 3' DEL cDNA DE NOS DE *Anopheles pseudopunctipennis*.

El fragmento amplificado a partir del cDNA de NOS de *An. pseudopunctipennis* descrito en los resultados anteriores, se localiza cerca de la región 3' del gen, abarcando parte de la región carboxilo terminal de la enzima. Para obtener la secuencia de los extremos 5' y 3' del cDNA de NOS, se utilizó la técnica RACE 5' y 3'.

Como primer paso, en el RACE 5' se sintetizó cDNA con el oligonucleótido HL-4A (antisentido), basado en la secuencia de NOS de *An. stephensi* (Luckhart et al., 1998) y se amplificó por PCR con el oligonucleótido HL-5A (antisentido), el cual es específico porque fue diseñado en base a la secuencia obtenida de NOS de *An. pseudopunctipennis* y el oligonucleótido universal AUP (sentido). De esta forma, se obtuvieron diferentes fragmentos que variaron en tamaño, desde 100 a más de 2000 pb (Figura 13, A). Este resultado puede deberse a la unión no específica del oligonucleótido universal AUP en regiones del cDNA ricas en citocinas o bien, productos de PCR truncados. De los productos obtenidos, se aisló un fragmento de aproximadamente 1800 pb por ser la banda de mayor peso y mejor definida. Para evitar la contaminación con las otras bandas, la banda de interés se cortó del gel, y el ADN de ésta se purificó por intercambio iónico. Para comprobar que éste era un producto específico de NOS, se realizaron PCRs anidados con los oligonucleótidos HL1S-HL5A y HL-3S-HL-5A. El resultado mostró que el fragmento de aproximadamente 1800pb contiene los productos esperados para la amplificación con dichos oligonucleótidos (Figura 13, B). El producto de PCR purificado se secuenció y en base a esta secuencia que mostró ser la NOS de *An. pseudopunctipennis*, se diseñaron nuevos oligonucleótidos para seguir secuenciando el fragmento.

De esta forma, hasta el momento se tiene la secuencia de 1545 nucleótidos que codifican para la NOS de *An. pseudopunctipennis*, y la secuencia deducida de aminoácidos muestra que tiene una identidad muy alta comparada con otras NOS de insectos ya conocidas. En la Figura 14 se muestra una comparación de la región carboxilo terminal de

NOS de *An. pseudopunctipennis* (ApsNOS) con las regiones correspondientes de NOS de *An. stephensi* (AstNOS, AF130134), *D. melanogaster* (DmNOS, AF215700) y *M. sexta* (MsNOS, AF062749). Las identidades determinadas son 80%, 56% y 42%, respectivamente.

Esta región carboxilo terminal corresponde al dominio reductasa de la enzima, y en ella se pueden observar los sitios de unión a los cofactores flavin mononucleótido (FMN), flavin adenin dinucleótido (FAD) y dinucleótido de nicotin-adenina-fosfato reducido (NADPH) los cuales se encuentran muy conservados entre estos insectos.

Cabe mencionar que aún falta obtener la secuencia del cDNA correspondiente al extremo amino de la enzima y que comprende el dominio oxidasa de la misma. Sin embargo, en todos los ensayos de RACE 5' que se realizaron no se logró amplificar el extremo 5' completo, a pesar de que se diseñaron oligonucleótidos que estuvieron más cerca de esta región. Este problema pueden deberse en parte, al tamaño del gen el cual es muy grande, y además a que presenta una alta complejidad transcripcional, existiendo al menos 18 transcritos diferentes para el mosquito *An. stephensi* (Luckhart et al., 2000), y probablemente durante los ensayos realizados en este trabajo, sólo amplificamos mayoritariamente uno de estos transcritos, lo cual también puede explicar el gran número de productos de PCR obtenidos durante el RACE 5' (figura 13, A).

Finalmente, para el RACE 3' se sintetizó cDNA con oligonucleótido dT modificado, como se describe en la metodología, y se amplificó el extremo 3' por PCR usando el oligonucleótido específico HL-8S (sentido) y el oligonucleótido universal AUAP (sentido). En este caso se obtuvo una banda del tamaño esperado, la cual fue clonada en el vector pCR2.1-TOPO. Sin embargo, los resultados de la secuencia mostraron que no habíamos amplificado el producto esperado, aún cuando correspondía en tamaño. La amplificación del extremo 3' del cDNA de NOS de *An. pseudopunctipennis* está en proceso.

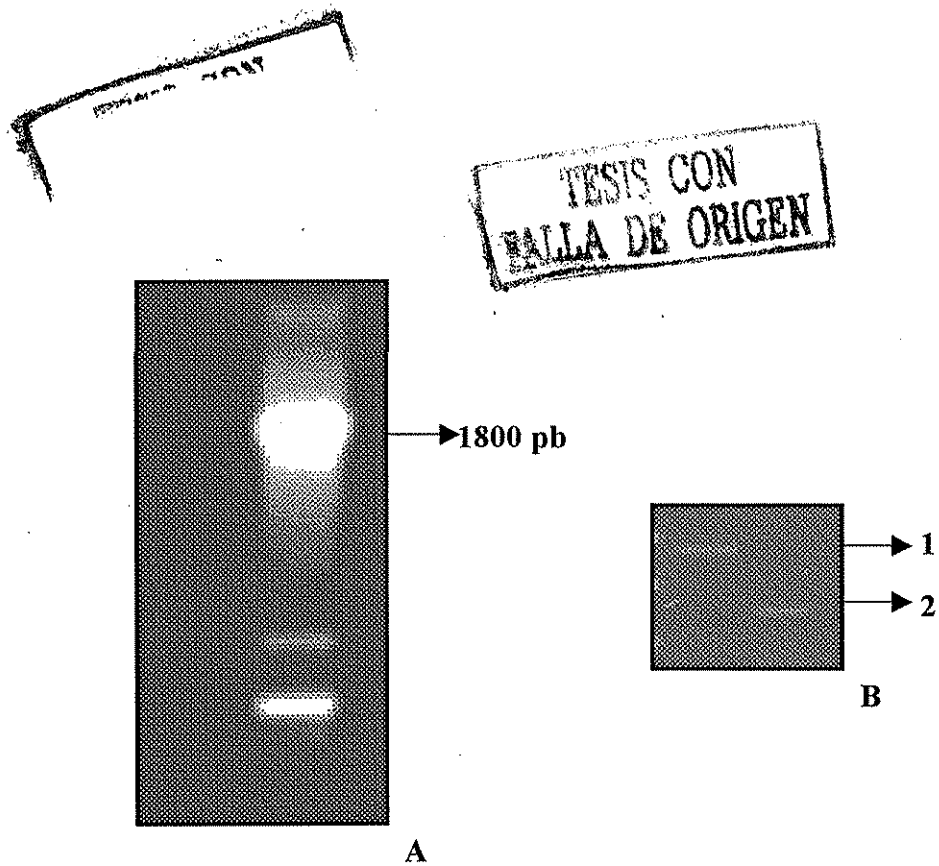


Figura 13. Amplificación del extremo 5' del cDNA de NOS de *An. pseudopunctipennis*.
A. Se realizó la técnica RACE 5' descrita en la metodología. La banda de aproximadamente 1800pb se aisló del gel y se purificó para su secuenciación. **B.** Se realizó PCR anidado para amplificar fragmentos conocidos que se encuentran dentro del fragmento de 1800pb para confirmar su especificidad. **1:** Producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos HL-1A, HL-3S; **2:** Producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos HL-3S, HL-5A.

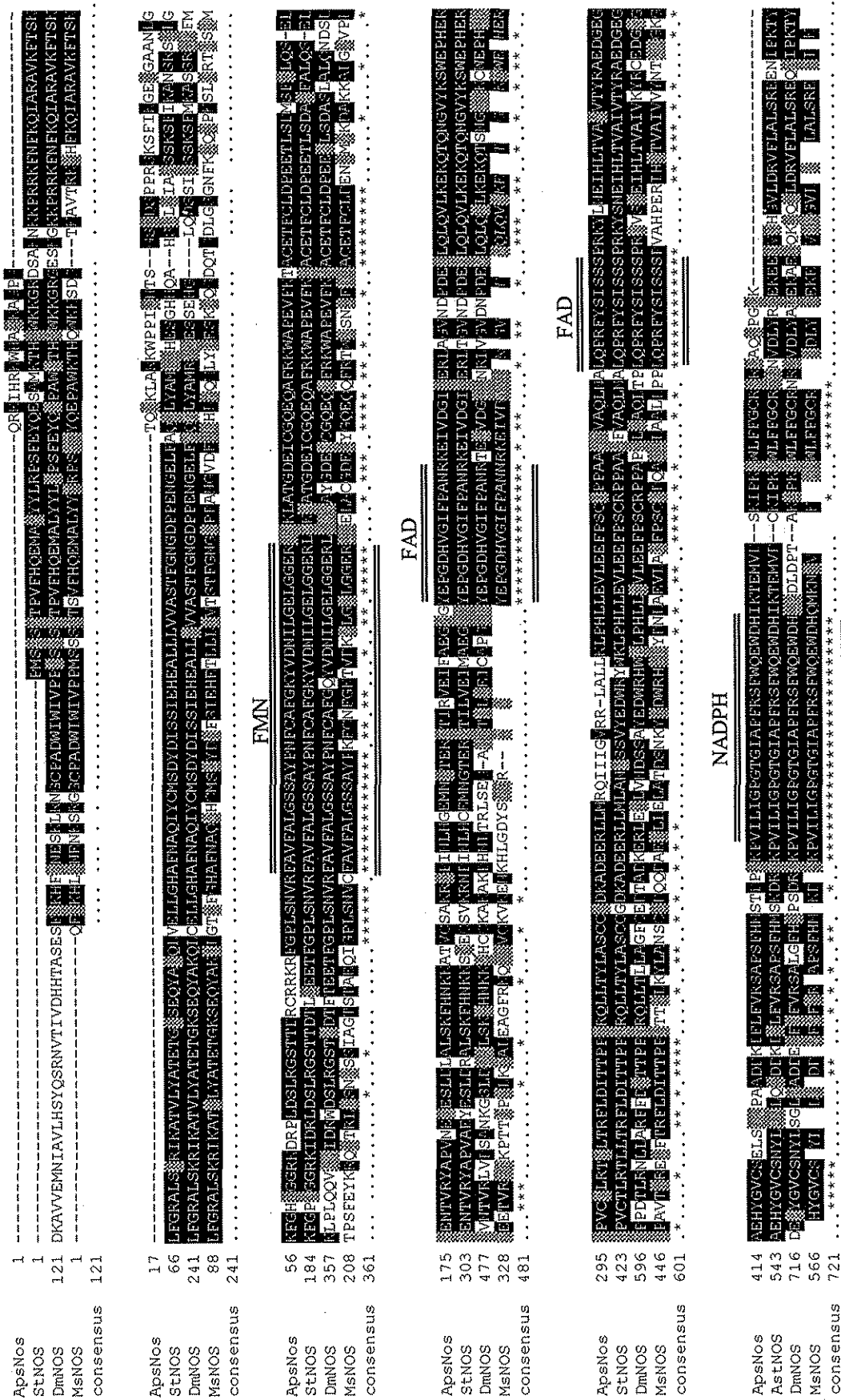


Figura 14. Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de NOS de *Anopheles pseudopunctipennis* (ApsNOS), *An. stephensi* (AstNOS, AF130134), *Drosophila melanogaster* (DmNOS, AF215700) y *Manduca sexta* (MsNOS, AF062749).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE NOS DURANTE LOS DISTINTOS ESTADIOS DEL CICLO DE VIDA DE *Anopheles pseudopunctipennis*.

Como parte de la caracterización de NOS, se determinó el patrón de expresión del gen a lo largo del ciclo de vida del mosquito. De tal forma que se obtuvo el ARN de las diferentes etapas del desarrollo de *An. pseudopunctipennis*, desde larva hasta adulto. Para medir la expresión de NOS de manera semicuantitativa se realizaron ensayos de RT-PCR/Southern, con los oligonucleótidos HL-5A y HL-8S. Los resultados en la figura 15 muestran que NOS sólo se expresa en el estado adulto, tanto en machos como hembras. También se puede observar que existe un ligero incremento en la expresión de NOS cuando el mosquito se alimenta con sangre.

Para saber si la expresión de NOS se debe a la presencia de bacterias en el intestino del mosquito, cuya población se incrementa con la ingestión sanguínea, se alimentaron las hembras con una mezcla de antibiótico-antimicótico (Gibco, metodología) durante dos días antes de la alimentación con sangre y de la extracción del ARN. Como podemos ver en la misma figura, la expresión de NOS se reprime en presencia del antibiótico, tanto en las hembras no alimentadas como en las alimentadas, indicando que probablemente la expresión de NOS se asocia a la presencia de la flora intestinal y que cuando ésta se incrementa, los mosquitos sobre-expresan NOS como un mecanismo de defensa para mantener la flora intestinal en un nivel relativamente constante, que no sea dañino para el mosquito.

4. EXPRESIÓN DE NOS EN EL INTESTINO DE *Anopheles pseudopunctipennis*.

Puesto que la expresión de la enzima NOS se abate cuando los mosquitos se alimentan con antibiótico-antimicótico, la siguiente pregunta a contestar era si este gen se expresaba en el intestino del mosquito, de modo que nuevamente, por RT-PCR de intestinos de mosquitos se demostró que el gen se expresa precisamente en este tejido, aunque por los ensayos realizados, no se puede afirmar que solamente se exprese en este órgano (figura 16).

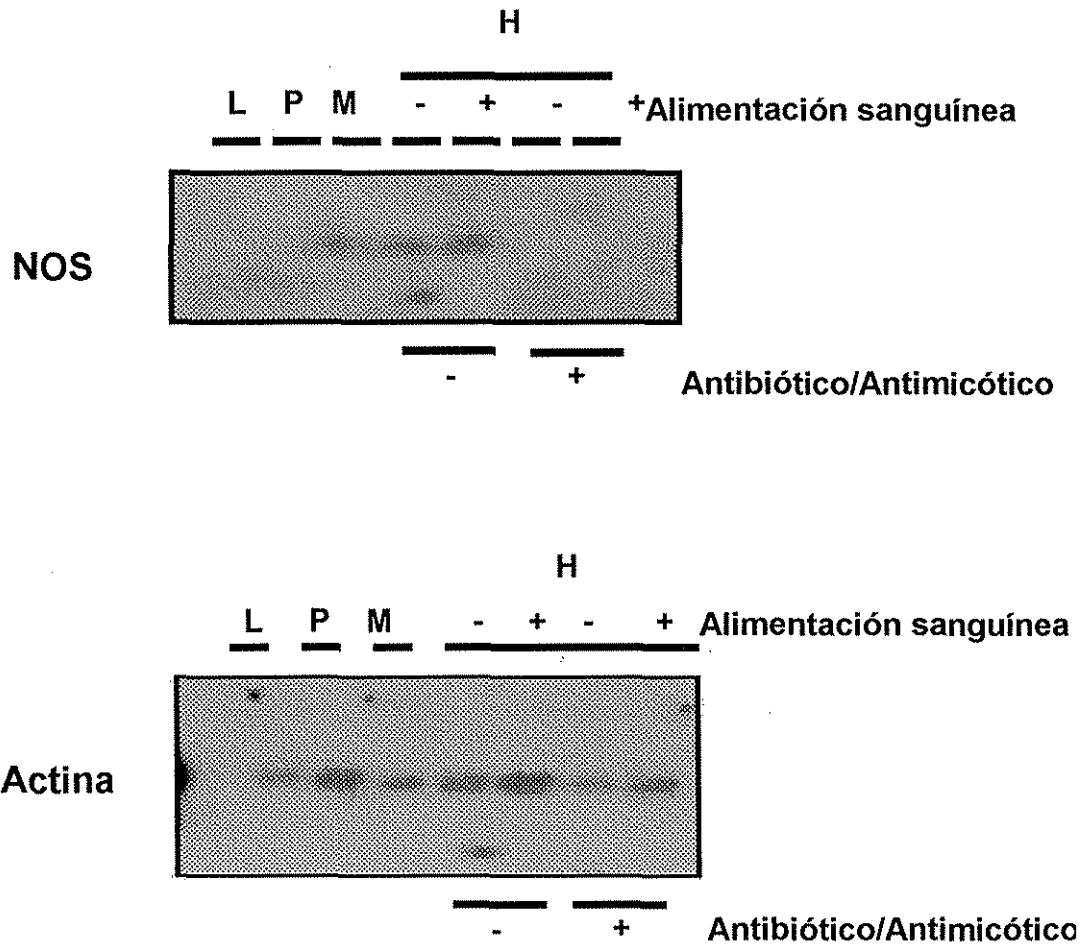


Figura 15. Expresión de NOS durante el ciclo de vida de *An pseudopunctipennis*. Se obtuvo el ARN total de Larvas (L), Pupas (P), Adultos Machos (M) y Hembras (H), con y sin alimentación sanguínea (+,-) y de Hembras pretratadas con y sin antibiótico (+,-). El producto de NOS se obtuvo con los oligonucleótidos HL-5 y HL-8, en un RT-PCR a 15 ciclos, y se procesó tipo Southern para la detección de los fragmentos. Se muestra también el producto amplificado de Actina, en las mismas condiciones.

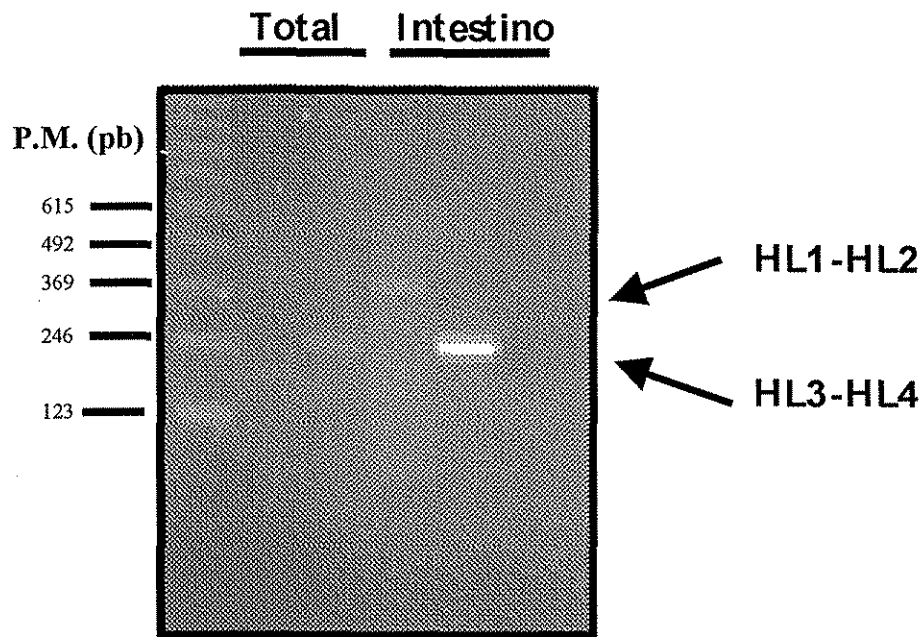


Figura 16. NOS se expresa en el intestino de *An. pseudopunctipennis*. El ARN total fue obtenido de 15 mosquitos totales o bien de 30 intestinos. Para el ensayo de RT-PCR se tomaron 5 mg de ARN y se amplificó el fragmento de NOS, con los oligonucleótidos HL-1S, HL-2A, seguido de una PCR anidado con los oligonucleótidos HL-3S, HL-4A.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN CULTIVO DE INTESTINOS DE *Anopheles pseudopunctipennis* ESTIMULADOS CON *P. berghei*.

Los resultados anteriores indicaron que la enzima NOS se expresa en el mosquito *An. pseudopunctipennis* y el intestino es uno de los tejidos que la producen. Aunque se ha determinado la expresión de NOS en otras especies de invertebrados, su función en respuesta inmune se mantiene incierta. Debido a que el mosquito *An. pseudopunctipennis* es un importante vector de la malaria en nuestro país, era necesario determinar si la enzima es capaz de producir NO en respuesta al parásito causante de la enfermedad. A causa de la dificultad de detectar el NO *in vivo*, se decidió aprovechar la estrategia de cultivo de tejidos de mosquito, la cual ya se tiene establecida en el laboratorio. De modo que se cuantificó la acumulación de nitritos, un derivado del NO en el sobrenadante de cultivos de intestinos por medio de la Reacción de Griess. Los intestinos se obtuvieron por disección de mosquitos hembras alimentadas con antibiótico-antimicótico. En los ensayos se colocaron 10 intestinos por pozo y se añadieron 200,000 oocinetos de *P. berghei*, provenientes de un cultivo de 24 h.

La figura 17 muestra que los intestinos en cultivo son capaces de generar NO cuando se adicionan oocinetos de *P. berghei* al cultivo, a las 48 h se detectaron 6.3 μM de nitritos en los sobrenadantes de los cultivos que no contenían el parásito, mientras que en presencia de éste los niveles de nitritos se elevaron hasta 665 μM (n=6, p<0.000). Lo que indica que los oocinetos activan de alguna manera a las células intestinales y estas responden mediante la generación de NO.

Ahora bien, en este procedimiento, los oocinetos están en contacto con la cara externa del intestino, mientras que *in vivo*, el contacto de los oocinetos es con la luz intestinal, de modo que para saber si los oocinetos en la luz intestinal inducen la producción de NO, estos fueron inoculados por enema antes de la disección. Se inocularon 2000 oocinetos por mosquito. En la misma gráfica podemos observar que los intestinos a los cuales sólo se les inoculó el medio de cultivo de parásitos no producen NO, a diferencia de los que habían sido inoculados, quienes presentaron 480 μM de nitritos. La producción de NO fue menor cuando comparamos estos resultados con los obtenidos en el ensayo anterior, debido

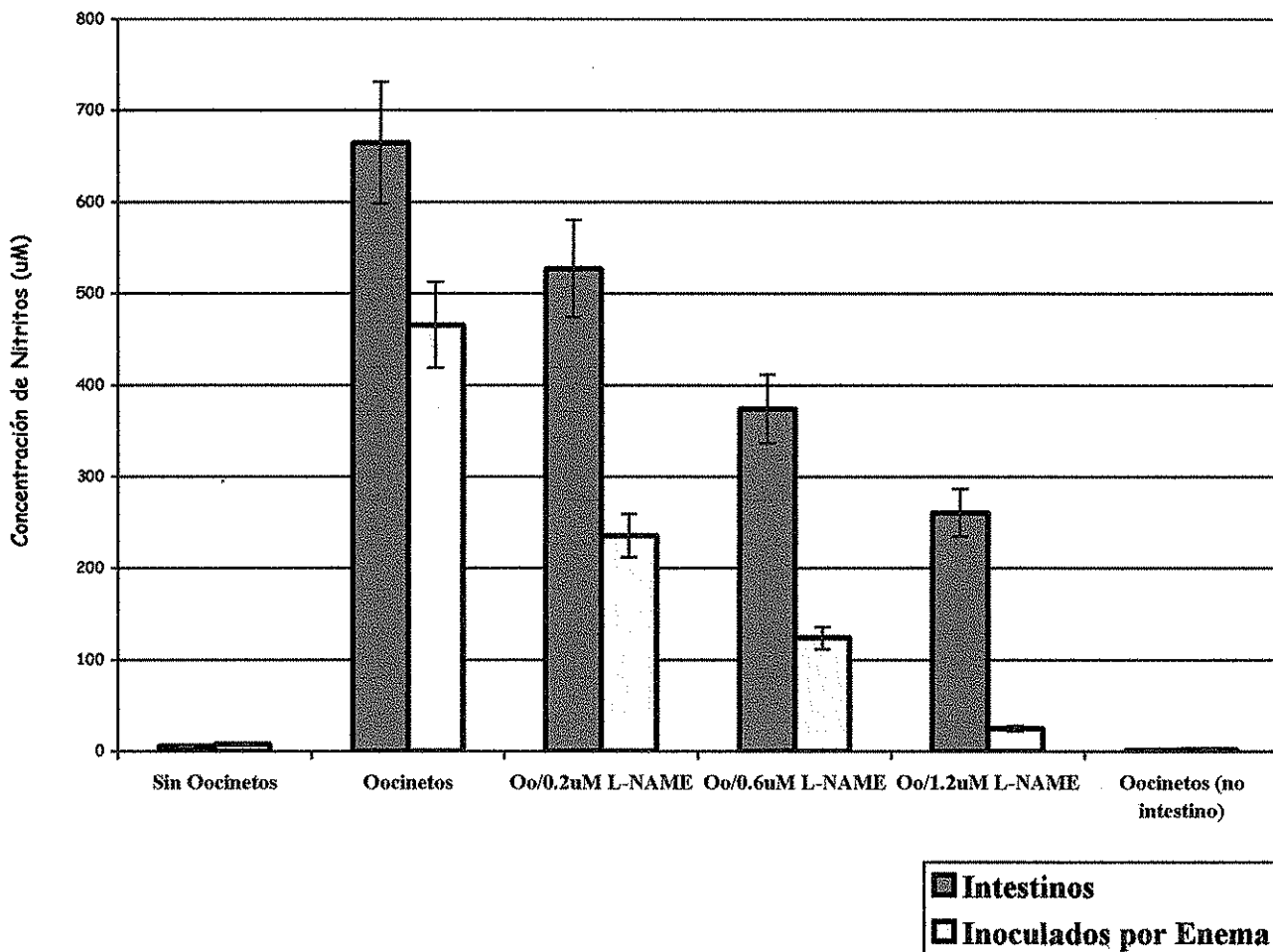


Figura 17. Los oocinetos de *P. berghei* inducen la producción de NO en intestinos de *An. pseudopunctipennis*. Se colocaron 10 intestinos de mosquitos hembras alimentadas al menos dos días con una mezcla de antibiótico-antimicótico (metodología) y se colocaron en RPMI en una placa de 96 pozos. Se adicionaron 200,000 oocinetos/pozo y 0.2, 0.6 y 1.2 µM de L-NAME. 48 h después se cuantificó la producción de NO, de manera indirecta por la reacción de Griess (Intestinos). Por otra parte los oocinetos se inocularon por enema previo a la obtención de intestinos para cultivo y se cuantificó la producción de NO 48 h después.

probablemente a la cantidad de parásitos utilizada para cada ensayo. Cabe mencionar los que los oocinetos no produjeron NO bajo nuestras condiciones de cultivo, como se observa en la figura 17. De esta forma se demostró que los oocinetos inducen la formación de NO en el epitelio intestinal del mosquito en cultivo.

Por otra parte para determinar si el incremento en la producción de NO se debía a la actividad de la NOS, a los cultivos se les agregó el inhibidor específico de la enzima L-NAME, a diferentes concentraciones (0.2, 0.6 y 1.2 μM). Los resultados en la misma gráfica (figura 17) demuestran que el L-NAME inhibe la producción de NO de manera dosis-dependiente. En el caso de los intestinos a los que se les colocó los oocinetos en el medio, 527, 374, 260 μM nitritos respectivamente ($n=6$, $p<0.007$), y valores de 235, 123 y 25 μM de nitritos en el caso de los intestinos que fueron inoculados por enema. Demostrando así que la enzima NOS de los intestinos en cultivo se encuentra activa y es capaz de responder a la presencia de *P. berghei*.

6. PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN CULTIVO DE INTESTINO DE *Anopheles pseudopunctipennis* ESTIMULADOS CON BACTERIAS Y LEVADURAS.

La respuesta inmune de los invertebrados, y en particular de los mosquitos, es un campo que aún no se ha explorado completamente, sin embargo se sabe que los mosquitos pueden responder de manera diferente a distintos estímulos (Dimopoulos et al 1999, Hernández et al 1999). Por lo que en este trabajo además se investigó si la respuesta observada en los cultivos de intestino inducida por la presencia de los oocinetos de *P. berghei* también podía presentarse en respuesta a otros microorganismos, tales como levaduras y bacterias. De modo que a los cultivos de 10 intestinos se les adicionó 1×10^6 levaduras por pozo, y 1×10^6 bacterias (*Klebsiella pneumoniae*), 48h después se cuantificó la producción de NO. En la figura 18 se muestra que las levaduras son capaces de inducir la acumulación de nitritos, pues los intestinos con levaduras presentan aproximadamente 10 veces más nitritos que el control ($n=6$, $p<0.000$), y además este incremento en la producción de NO se inhibe con L-NAME ($n=6$, $p<0.003$). De manera interesante,

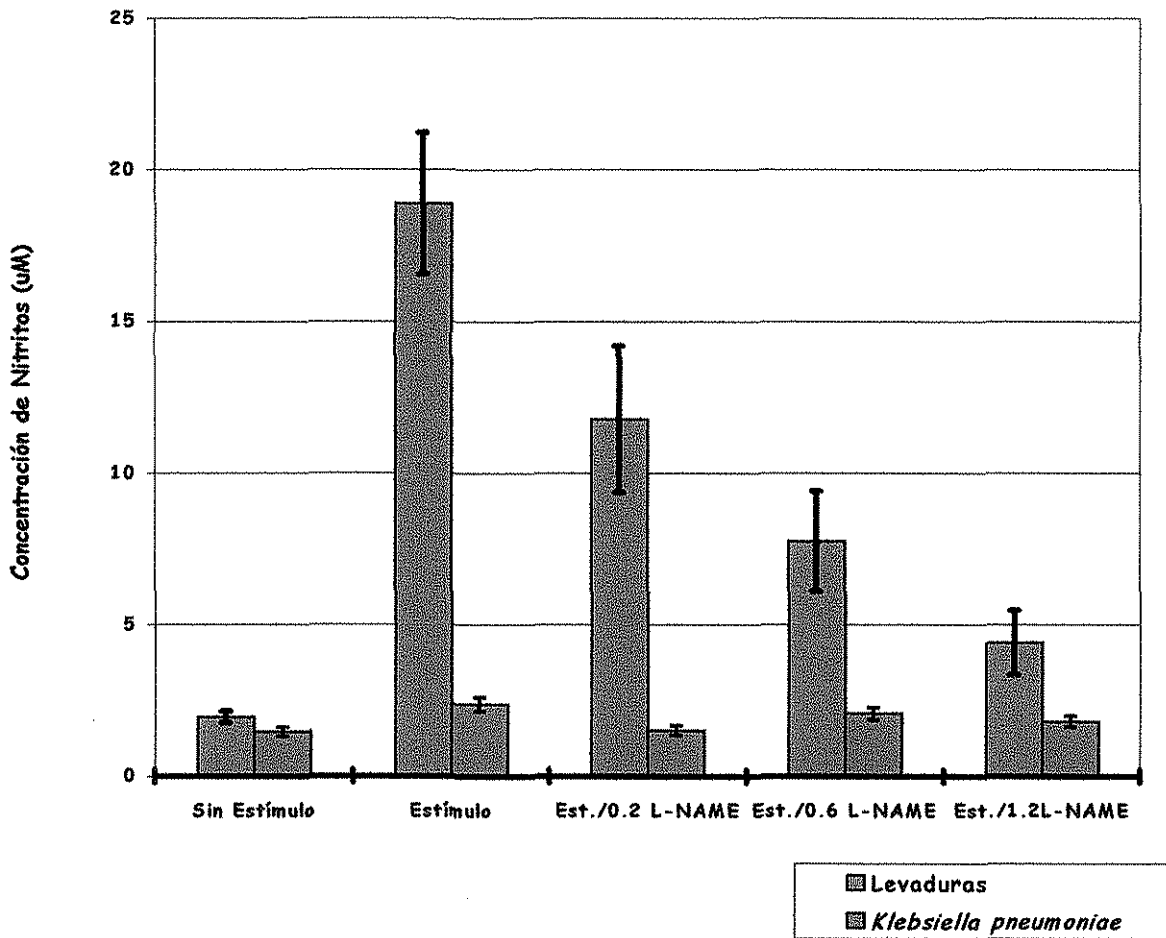


Figura 18. La producción de NO en intestinos de *An. pseudopunctipennis* se induce por la presencia de Levaduras. Se colocaron 10 intestinos de mosquitos hembras alimentadas durante al menos do días con una mezcla de antibiótico-antimicótico (metodología) y se colocaron en RPMI en una placa de 96 pozos. Se adicionaron 1×10^6 levaduras/pozo o 1×10^6 bacterias (*K. pneumoniae*)/pozo y 0.2, 0.6 y 1.2 μM de L-NAME. A las 48 h se cuantificó la producción de NO, de manera indirecta por la reacción de Griess.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Klebsiella pneumoniae no es capaz de activar la producción de NO (figura 18), sugiriendo que el intestino del mosquito responde de manera diferente a cada microorganismo.

7. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE NOS POR L-DOPA.

Por otra parte, los mecanismos que inducen la respuesta inmune en los mosquitos no han sido entendidos. Se ha considerado que la respuesta inmune podría estar regulada por factores o moléculas que son liberados a la hemolinfa en respuesta a la presencia de microorganismos (Dimopoulos y cols., 2001). Las moléculas podrían ser liberadas por distintos tejidos y actuar sobre diferentes órganos o tejidos blanco. Sin embargo, hasta el momento, estas no se han podido identificar. Dentro de las moléculas más importantes en la defensa de los mosquitos se encuentran las catecolaminas (como L-DOPA), que le permiten encapsular, mediante la formación de melanina a los microorganismos o agentes extraños. Se ha observado que la concentración de las catecolaminas se incrementa en la hemolinfa de *Ae. aegypti* como respuesta a la inoculación de microfilarias. (Munkirs y cols., 1990). Dentro de las más abundantes en insectos se encuentra la dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Por lo anterior, se evaluó el efecto de la L-DOPA en la producción de NO en intestinos en cultivo. En la figura 19 se muestra que la L-DOPA induce la generación de NO en los intestinos en cultivo cuando se colocaron concentraciones de 2.5 y 5 μM de L-DOPA a 10 intestinos en cultivo, donde se observó que la concentración de nitritos se incrementó de 2 μM (control, sin L-DOPA) a 20 μM de nitritos (5 μM L-DOPA). Este efecto fue inhibido por L-NAME, indicando actividad específica de la NOS y que ésta fue inducida por la adición de L-DOPA al cultivo.

La siguiente pregunta que se planteó fue, cuál es el mecanismo mediante el cual la L-DOPA puede incrementar la producción de NO por la NOS, se incrementa la actividad enzimática de la enzima ya presente o bien se induce la transcripción del gen y al haber más enzima hay mayor producción de NO? Se ha descrito que durante el proceso de oxidación de la L-DOPA se generan distintos radicales libres de oxígeno, entre ellos H_2O_2 , el cual resulta ser un activador de la vía NF-kB (Mercurio y Manning, 1999). La presencia de H_2O_2 en las células activa la translocación de NF-kB a núcleo, donde éste se une a las regiones reguladoras de diversos activando así su transcripción (Mercurio y Manning, 1999). Los mosquitos presentan factores de transcripción pertenecientes a la familia de NF-

kB, tales como Gambif1, mientras que NOS presenta sitios consenso de unión a éste (Barillas et. Al., 1996). Por lo que la hipótesis que se planteó fue que la oxidación de L-DOPA en los cultivos de intestino genera H_2O_2 , de forma tal que se activa la transcripción de NOS. Para confirmar esta hipótesis, se realizaron ensayos de RT-PCR tipo Southern, para evaluar si la presencia de L-DOPA induce la expresión de NOS. Los resultados se muestran en la figura 20, y se observa que 2.5 mg/ml de L-DOPA incrementa notablemente la transcripción de NOS. Para evaluar si este efecto se debía a la formación de H_2O_2 , a los cultivos se les adicionó a 0.7, 7.7 y 77 U de catalasa, enzima que reduce el H_2O_2 formando H_2O . Los resultados mostraron que la adición de catalasa, disminuye el efecto de la L-DOPA, bajando los niveles de expresión de NOS, con un efecto dosis-dependiente, e incluso los niveles de expresión de NOS bajan mas allá del nivel basal, sugiriendo que la NOS puede ser regulada vía NF-kB.

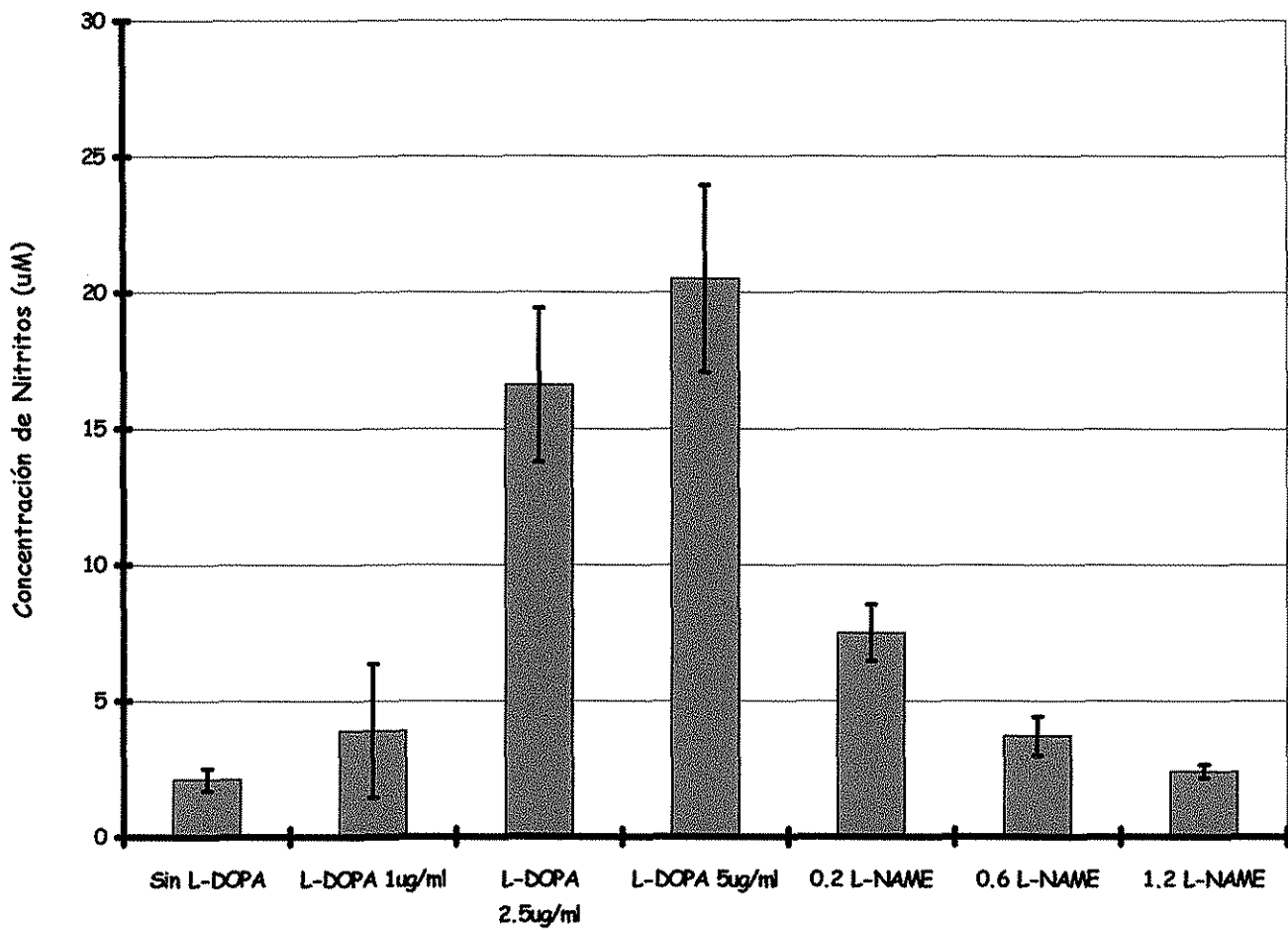


Figura 19. La L-DOPA induce la producción de NO en cultivo de intestino de *An. pseudopunctipennis*.

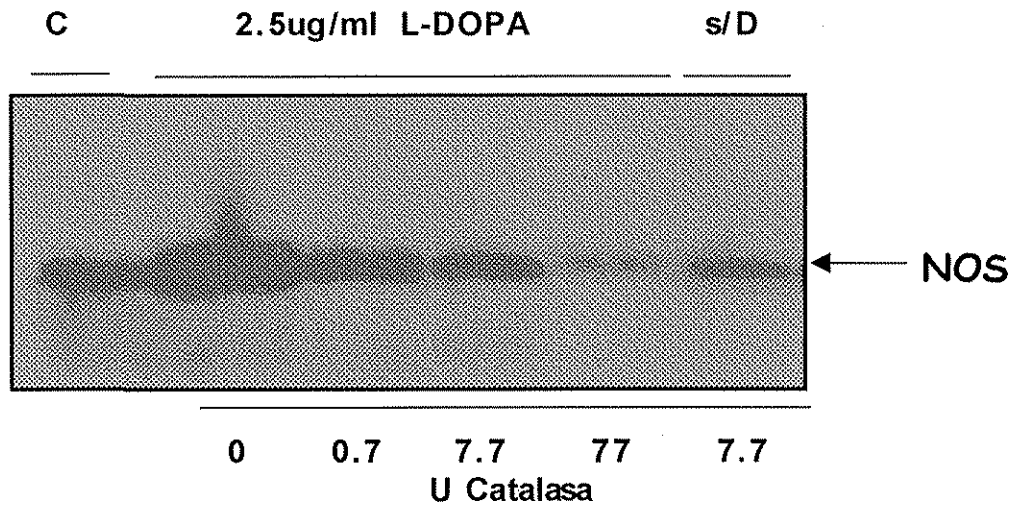


Figura 20. El H_2O_2 producido por la oxidación de L-DOPA activa la transcripción de NOS. 25 intestinos de mosquito en cultivo fueron incubados con 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de L-DOPA y catalasa como se indica en la figura. Por RT-PCR/Southern se amplificó el producto de NOS para conocer el efecto de la L-DOPA sobre la transcripción del gen y se usó catalasa para determinar si el incremento de la transcripción se debía a la presencia de H_2O_2 .

IX. DISCUSIÓN

En este trabajo se identificó y caracterizó parcialmente el cDNA de NOS de *Anopheles pseudopunctipennis*, además se analizó su expresión en distintos estadios de desarrollo y el papel de esta enzima en la respuesta inmune del mosquito; finalmente estudiamos la producción de NO en intestinos de *An. pseudopunctipennis* cultivados *in vitro*.

La secuencia de nucleótidos obtenida del cDNA de NOS de *An. pseudopunctipennis* comparte identidad significativa con los genes de NOS de otros insectos y vertebrados. La secuencia deducida de aminoácidos de las NOS de insectos, tales como *D. melanogaster*, *R. prolixus*, *An. stephensi* y *An. pseudopunctipennis*, muestran una mayor identidad con la NOS neuronal de vertebrados (51%), seguida por la NOS endotelial (48%) y finalmente por la NOS inducible (42%). La identidad conservada entre los distintos genes de NOS de insectos con la NOS neuronal de vertebrados sugiere que estos genes pueden compartir un ancestro común.

Por otra parte, no se logró amplificar el cDNA de NOS de *An. albimanus* y de células C6/36 (provenientes de *Ae. albopictus*), probablemente debido a que los oligonucleótidos utilizados en los ensayos, basados en la secuencia de *An. stephensi*, no tenían la identidad suficiente para amplificar el cDNA de dichos organismos, ya que a pesar de que se usaron distintas condiciones de PCR, como la temperatura de alineamiento y la concentración de magnesio, no se obtuvo ningún producto específico. Sin embargo, esto no significa que el gen no se esté expresando, recientemente en el laboratorio, utilizando otros oligonucleótidos (HL-8S y HL-5A, basados en la secuencia de *An. pseudopunctipennis* y en una región del gen diferente a la comprendida por los oligonucleótidos de *An. stephensi*), se amplificó un fragmento de NOS de *An. albimanus* (datos no mostrados). La diferencia en los resultados obtenidos inicialmente con éste último probablemente se deba a que los oligonucleótidos sean más conservados entre estos mosquitos, facilitando su amplificación. Además, en ensayos *in vitro* de producción de NO, a través de la reacción de Griess, se ha observado que los estómagos en cultivo de *An. albimanus*, también son capaces de generar NO, y responder a estímulos como la presencia de levaduras en el medio o inoculadas por enema (datos no mostrados). Indicando que el mosquito *An. albimanus* expresa el gen que codifica para la NOS y además la enzima es capaz de generar NO.

La expresión de NOS es ubicua en la mayoría de los organismos vivos, indicando que su función es muy importante en estos. En vertebrados la enzima NOS es responsable de la formación de NO, el cual está involucrado en múltiples procesos fisiológicos, tales como la vasodilatación, la neurotransmisión y la defensa contra bacterias y parásitos. La función de la NOS en invertebrados ha sido poco estudiada, sin embargo, el gen ha sido clonado en algunas especies de insectos (Regulski y Tully, 1995; Yuda et al., 1996; Luckhart et al., 1998; Dimopoulos et al., 1998).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que NOS sólo se expresa en los mosquitos adultos de *An. pseudopunctipennis*, mientras que se mantiene ausente en los estadios larvarios y en las pupas. De manera similar Luckhart y colaboradores encontraron que NOS se expresa de manera constitutiva en adultos hembras de *An. stephensi*, sin embargo en esta especie no se analizó su expresión en estadios larvarios ni pupas (Luckhart et al., 1998). En contraste, en *An. gambiae* se detectó expresión de NOS en todos los estadios de desarrollo del mosquito, desde huevo hasta adultos, aunque su expresión en estos últimos fue mas abundante (Dimopoulos et al., 1998).

La expresión de NOS en *An. pseudopunctipennis* por RT-PCR, se localizó principalmente en el intestino de estos, lo cual concuerda con la expresión de NOS descrita en *An. stephensi* y *An. gambiae* (Luckhart et al., 1998; Dimopoulos et al., 1998). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que se exprese en otros tejidos como se ha observado en otros insectos, por ejemplo *R. prolixus* y *D. melanogaster*, en los cuales NOS fue localizada en glándula salival y cabeza, respectivamente (Yuda et al., 1996; Regulski y Tully, 1995). Es interesante destacar el hecho de que la expresión de la enzima NOS en el mosquito *An. pseudopunctipennis* se incrementa después de la alimentación sanguínea, mientras que se abate cuando los mosquitos son tratados con una mezcla comercial de antibiótico-antimicótico. Estos datos sugieren que la enzima NOS, podría participar en el control de la flora intestinal del mosquito, ya que el NO producido podría tener un efecto citotóxico sobre los microorganismos que componen la flora intestinal de *An. pseudopunctipennis*, para disminuir la cantidad de microorganismos, manteniendo así un nivel constante de la flora intestinal. Este efecto también fue observado en *An. stephensi*, donde se demostró que el uso de gentamicina disminuye la carga bacteriana intestinal y que

al mismo tiempo se reduce la expresión de NOS en los intestinos de los mosquitos tratados con este antibiótico (Luckhart et al., 1998).

Por otra parte, el uso de sistemas *in vitro* puede facilitar el estudio de los mecanismos de respuesta inmune en los mosquitos (Müller et al., 1999). En nuestro laboratorio se ha establecido una estrategia efectiva para el cultivo y mantenimiento *in vitro* de tejidos de mosquitos. El cultivo de intestinos nos permitió determinar que este órgano es capaz de generar NO, y es cuantificable desde un mínimo de 5 μ M en un cultivo de 10 intestinos, por medio de la reacción de Griess. Cabe destacar que en otros sistemas donde se ha cuantificado por este método en hemolinfa, se requieren grandes cantidades de la misma (hemolinfa proveniente de 200 mosquitos; Luckhart et al., 1998), lo cual hace del método de cultivo de intestinos una herramienta muy útil y más sensible para la cuantificación de la producción de NO en los mismos.

De esta manera, en este trabajo también se demostró *in vitro* que el intestino del mosquito *An. pseudopunctipennis*, es capaz de responder a la presencia de microorganismos como los oocinetos de *P. berghei* y las levaduras *S. cereviceae*, mediante un incremento notable de la producción de NO, en tanto que las bacterias Gram negativas (*K. pneumoniae*) no inducen la producción de NO, lo cual concuerda con otros resultados obtenidos en nuestro laboratorio en los cuales se ha observado melanización en respuesta al inóculo de bacterias Gram positivas, pero no negativas, indicando que además la respuesta inmune del mosquito es de tipo diferencial (Hernández et al., 1999).

Así mismo, resulta interesante el hecho de que los oocinetos de *P. berghei* inoculados por enema induzcan la actividad de la NOS, pues refleja parte de lo que ocurre naturalmente cuando el parásito invade el epitelio intestinal. El NO producido probablemente es tóxico para el parásito y de ese modo podría limitar el desarrollo del parásito durante la invasión del intestino, antes o durante el establecimiento del oocineto en la lámina basal, para convertirse en ooquiste (Luckhart, et al., 1998; Han et al., 2000). Otra posibilidad es que NO active alguna otra vía de señalización importante en la respuesta inmune, como la producción de defensinas, tal como se observó en *Drosophila* (Nappi et al., 2000). Por otra parte, en *An. stephensi*, se ha observado la participación de NOS y particularmente del NO en la respuesta inmune contra *Plasmodium*. En esta especie se encontró una inducción en la actividad transcripcional de NOS en extractos de mosquito

después de la infección con el parásito (a 1-3 días post-infección, así como a 9-18 días). La inducción también se midió a nivel de actividad de la enzima y se determinó que existe un incremento en la cantidad de nitritos y nitratos presentes en la hemolinfa de los mosquitos. Así mismo, se observó que el inhibidor de NOS, L-NAME, suministrado en la dieta, incrementa la formación de ooquistes, mientras que el precursor de NO, L-Arginina, disminuye el número de ooquistes (Luckhart et al., 1998).

Dentro del contexto anterior, se puede decir que el intestino de los mosquitos es un órgano de defensa contra la infección con el parásito *Plasmodium*, así como contra otros microorganismos. Dimopoulos y colaboradores (1998) observaron un incremento en la expresión de NOS después de la infección con bacterias y con *P. berghei*. Sin embargo, dado que el NO producido durante la respuesta inmune, es una molécula incapaz de reconocer células propias de las extrañas, sería interesante conocer, cómo se defiende el epitelio intestinal de los mosquitos de 'su propio ataque'. Se ha observado que cuando los oocinetos de *Plasmodium* atraviesan las células epiteliales del intestino de *An. stephensi*, esta presenta varios cambios, como la sobre-expresión de NOS, sugiriendo un incremento en la generación de NO, y cambios morfológicos y de organización del citoesqueleto. El daño celular que se presenta es extensivo e irreversible, resultando en muerte celular (Han et al., 2000). Es probable que el NO sea en parte, responsable de este evento, pues existen evidencias de que el NO por su actividad citotóxica puede ocasionar la muerte a las células que lo producen, o bien que actúe como una señal para llevar a la célula a apoptosis (Bogdan et al., 2000). Desde el punto de vista evolutivo, se puede considerar como un precio que hay que pagar, para evitar o prevenir la replicación del genoma extraño, la evolución pudo haber seleccionado al NO, que debido a sus características, pequeña y lipofílica, pocos microorganismos pueden bloquear su entrada, de modo que presumiblemente, la utilidad del NO como agente anti-infeccioso es suficientemente alto a pesar del riesgo de causar la muerte de sus propias células (MacMicking et al.; 1997). Por otro lado, es probable que las células epiteliales del mosquito presenten mecanismos que le ayuden a evitar el daño por NO. Existen evidencias en otros organismos que involucran a enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión reductasa como detoxificadores de ROIs y por lo tanto previenen la formación de peroxinitrito y así protegen del daño por NO (Bogdan et al., 2000). Así mismo, se han identificado varios

genes cuyos productos confieren protección contra RNIs, entre ellos, la flavohemoglobina, que presenta actividad dioxigenasa NO (convierte NO a NO₃) (Bogdan et al., 2000). La formación de Nitrosotioles por las células productoras de NO es otra vía que se ha propuesto para minimizar los efectos adversos del NO, cuando es producido en exceso (Steffen et al., 2001). Estos mecanismos probablemente están presentes en los mosquitos, así como en el parásito, sin embargo, hasta la fecha no han sido cuantificados en estos organismos.

Finalmente, la L-DOPA fue capaz de inducir tanto la transcripción de NOS, como la producción de NO en intestinos cultivados *in vitro*. Así mismo, por RT-PCR, se demostró que la catalasa disminuye la expresión de NOS, lo cual sugiere que el H₂O₂ puede ser el factor que podría activar a la transcripción del gen de NOS vía NF-κB. En mamíferos, la producción de peróxido de hidrógeno durante las infecciones es un evento bien documentado y se cree que puede ser un común denominador en la señalización intracelular llevando a la activación de genes regulados por NF-κB (Mercurio y Manning, 1999); también existen evidencias de que en *Hyalophora cecropia* la presencia de especies reactivas de oxígeno es importante para la regulación de genes como el de atacina a través del factor CIF, un homólogo de NF-κB (Faye y Kanost, 1998).

En los mosquitos donde ha sido descrita la expresión de NOS y se ha caracterizado el gen, se desconoce cuál es el mecanismo que opera para que incremente la transcripción de NOS y consecuentemente la generación de NO. Sin embargo, una posibilidad es que el H₂O₂ producido por la oxidación de L-DOPA actúe activando la translocación a núcleo de factores transcripcionales como NF-κB, y éste induce la transcripción de NOS, pues se sabe que éste gen presenta sitios consenso de unión a NF-κB (Luckhart y Rosenberg, 1999). Además, se ha demostrado que la presencia de microorganismos en los mosquitos puede activar la vía de profenoloxidasa para la melanización y la fenoloxidasa utiliza como sustrato a L-DOPA, generando especies reactivas de oxígeno durante este proceso (Ratcliffe et al., 1984; Nappi et al, 1995), de modo que éste podría ser uno de los mecanismos mediante el cual los oocinetos y levaduras activan la transcripción de NOS y la generación de NO en el intestino del mosquito.

Por otra parte, se desconoce el mecanismo mediante el cual NOS y NO actúan en la eliminación del parásito, sin embargo, se sabe que la molécula citotóxica derivada del NO

es el peroxinitrito, el cual se forma por la combinación de NO y el anión superóxido (Nathan y Shiloh, 2000). Recientemente en el laboratorio, hemos observado que la combinación de L-DOPA y Nitroprusiato de sodio, un donador de NO, afectan la viabilidad de oocinetos en cultivo hasta en un 50%. Así mismo, se ha demostrado que el peroxinitrito resulta tóxico para el parásito en el hospedero vertebrado.

En resumen, en la figura 21, se esquematiza un modelo hipotético que explica el mecanismo de activación de NOS por los oocinetos de *Plasmodium* durante la invasión del epitelio intestinal, donde estos podrían inducir la liberación de factores localizados en las células epiteliales hacia la hemolinfa y otros tejidos, como el cuerpo graso, donde a su vez inducirían la liberación de L-DOPA (Hopkins y Kramer, 1992) y la cascada de melanización por la fenoloxidasa en la hemolinfa (Dunn, 1986; Nigam et al., 1996). Este proceso se generan radicales libres de oxígeno que podrían difundir hacia el epitelio intestinal y activar vías de señalización, como la de NF- κ B y de esta forma activar la transcripción de genes incluyendo NOS y consecuentemente la producción de NO, el cual a su vez, puede combinarse con otros radicales libres para formar peroxinitrito y esta molécula citotóxica podría matar al parásito.

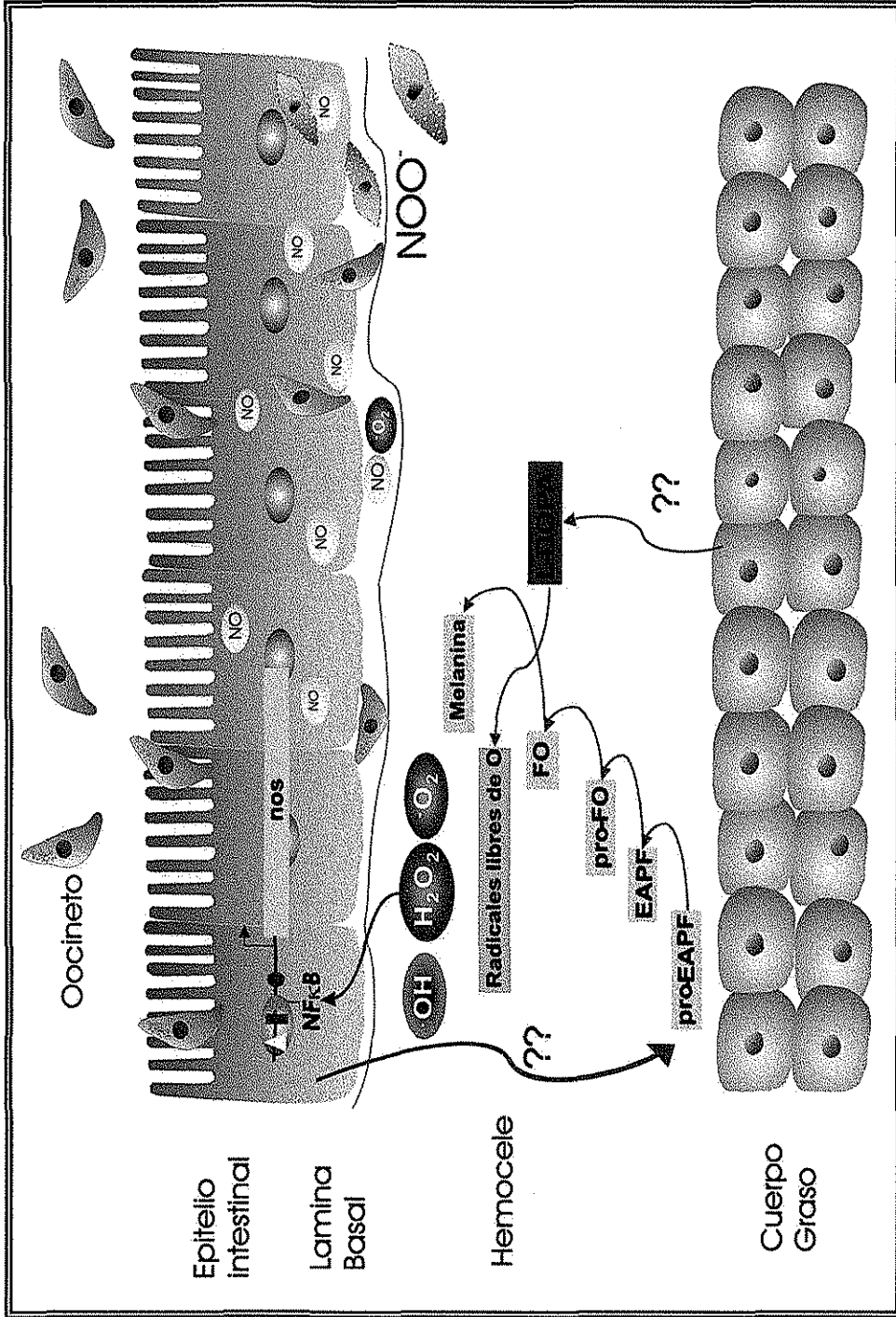


Figura 21. Modelo Hipotético sobre el mecanismo de activación de NOS y efecto de NO durante la invasión del epitelio intestinal del Mosquito *Anopheles pseudopunctipennis* por los oocinetos de *P. berghei*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

X. CONCLUSIONES.

- * El gen que codifica para NOS se expresa en *Anopheles pseudopunctipennis* y su secuencia muestra alta identidad con otras enzimas NOS conocidas.
- * La cinética de expresión por RT-PCR muestra que NOS sólo se expresa en estadios adultos de *An. pseudopunctipennis*.
- * La expresión de NOS se detectó en intestino de mosquitos *An. pseudopunctipennis* por RT-PCR. La alimentación sanguínea incrementa la expresión de NOS en *An. pseudopunctipennis* probablemente por un aumento en la flora intestinal.
- * La producción de NO puede inducirse en cultivo de intestino de mosquitos *An. pseudopunctipennis* con la presencia de levaduras y oocinetos de *Plasmodium berghei*.
- * La L-DOPA incrementa la producción de NO en intestinos de mosquitos y es probable que el H₂O₂ sea el inductor de NOS.
- * No se logró amplificar el cDNA de NOS de *Anopheles albimanus* y de las células C6/36 con los oligonucleótidos derivados de NOS de *An. stephensi*.

XI. PERSPECTIVAS.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la NOS y el NO participan en la respuesta inmune de los mosquitos *An. pseudopunctipennis* contra diversas infecciones. Se sabe que NOS se expresa en cepas de mosquitos *An. gambiae*, refractarios a la infección por *Plasmodium* (Dimopoulos et al., 1998), además el NO limita la infección por *Plasmodium berghei* en mosquitos *An. stephensi* (Luckhart et al., 1998) Por lo tanto, una línea de investigación que se puede derivar, es determinar si existen diferencias en la expresión de NOS y generación de NO durante la infección por *Plasmodium* entre las diferentes cepas de mosquitos susceptibles y refractarias de *An. pseudopunctipennis* y *An. albimanus*, que nos pudieran indicar la importancia de esta enzima en la repuesta inmune contra el parásito.

Por otra parte, también se puede estudiar cuál es el efecto del NO en el parásito. En este trabajo se demostró la generación de NO por la presencia de los oocinetos de *P. berghei* en el intestino del mosquito, sin embargo se desconoce si éste tiene un verdadero efecto sobre el parásito, si afecta su desarrollo, viabilidad, etc. por lo que actualmente en el laboratorio, ésta es una línea que hemos empezado a investigar.

Así mismo, se sabe que a pesar de los mecanismos de defensa del mosquito, cierto porcentaje de los parásitos que son ingeridos durante la alimentación sanguínea, logran desarrollarse con éxito hasta la siguiente etapa infectiva (Sinden y Billingsley, 2001), por lo que, esto abre la posibilidad de estudiar cuales son los mecanismos que el parásito tiene para defenderse de los ataques del sistema inmune del mosquito, y en este caso, de la generación de NO y otros radicales libres; es probable que los oocinetos de *P. berghei* usen algún o algunos tioles como 'scavenger' de radicales de oxígeno y nitrógeno, como sugieren algunos resultados obtenidos recientemente en nuestro grupo de trabajo (datos no publicados).

XII. BIBLIOGRAFIA

1. Anon. (1994). World Malaria situation in 1992. *Weekly Epidemiol. Rec.* **69**: 309-314.
2. Barillas-Mury, C. Graf, R.; Hagedorn, H. H. y Wells, M.A. (1991) cDNA and deduced amino acid sequence of a blood meal-induced trypsin from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect. Biochem.* **21**: 825-831.
3. Barillas-Mury, C., Charlesworth, A., Gross, I., Richman, A., Hoffmann, J. A. y Kafatos, F. C. (1996) Immune factor Gambif1, a new rel family member from the human malaria vectors *Anopheles gambiae*. *EMBO J.* **15**: 4961-4701.
4. Barillas-Mury, C., Han, Y-S., Seeley, D. y Kafatos, F. C. (1999) *Anopheles gambiae* AgSTAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacteria infection. *EMBO J.* **18**: 959-967.
5. Billingsley, P. F. y Sinden, R. E. (1997) Determinants of malaria-mosquito specificity. *Parasitol. Today.* **13**: 297-301.
6. Beier, J. C. (1998) Malaria parasite development in mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* **43**: 519-543.
7. Berner, R., Rudin, W. y Hecker, H. (1983) Peritrophic membranes and protease activity in the midgut of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae* (Liston) (Insecta: Diptera) under normal and experimental conditions. *J. Ultrastructur. Res.* **83**: 195-204.
8. Bogdan, C., Rölinghoff, M. y Diefenbach, A. (2000) Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates en innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **12**: 64-76.
9. Chalk, R. Townson, H. y Ham, P. J. (1995) *Brugia pahangi*: The effect of cecropins on microfilaria *in vitro* and in *Aedes aegypti*. *Exp. Parasitol.* **80**: 401-406.

10. Chan, A. S. T., Rodríguez, M. H. Torres, J. A. Rodríguez, M. D. C. y Villareal, C. (1994) Susceptibility of three laboratory strains of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) to coindigenous *Plasmodium vivax* in southern Mexico. *J. Med. Entomol.* **31**: 400-403.
11. Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162** (1): 156-159.
12. Christensen, B. M., Huff, B. M., Miranpuri, G. S., Harris, K. L. y Christensen, L. A. (1989) Hemocyte population changes during the immune response of *Aedes aegypti* to inoculated microfilariae of *Dirofilaria immitis*. *J. Parasitol.* **75**: 119-123.
13. Christensen, B. M. y Severson, D. W. (1993) Biochemical and molecular basis of Mosquito susceptibility to *Plasmodium* and filaroid Nematodes. En: *Parasites and pathogens of Insects*. Vol 1: Parasites. Editores: Beckage, N; Thompson, S.N. y Federici, B. Academic Press, New York. p.p. 245-266.
14. Colasanti, M., Venturini, G. Merante, A., Musci, G. y Lauro, G. M. (1997) Nitric Oxide involvement in *Hydra vulgaris* very primitive olfactory-like system. *J. Neurosci.* **17**: 493-499.
15. Colasanti, M. y Venturini, G. (1998) Nitric oxide in invertebrates. *Mol. Neurobiol.* **17**: 157-174.
16. Collins, F. H y Besansky N. J. (1994) Vector biology and the control of malaria in Africa. *Science* **264**: 1874-1875.
17. Collins, F. H. y Paskewitz, S. M. (1995) Malaria: Current and future prospects for control. *Ann. Rev. Entomol.* **50**: 195-219.

18. Crane, B. R., Arvi, A. S., Gachhui, R., Wu, C., Ghosh, D. K., Getzoff, E. D., Stuehr, D. J. y Tainer, J. A. (1997) The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science*. **278**: 425-431.
19. Dimopoulos, G., Richman, A., Müller, H. M. y Kafatos, F. C. (1997) Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94** (21): 11508-11513.
20. Dimopoulos, G., Seeley, D., Wolf, A., and Kafatos F. C. (1998) Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasites life cycle. *EMBO J*. **17** (21): 6115-6123.
21. Dimopoulos, G., Müller, H.M. y Kafatos, F.C. (1999) How does *Anopheles gambiae* kill malaria parasites?. *Parassitologia* **41**: 169-175.
22. Dimopoulos, G., Casavant, T.L. Chang, S., Scheetz, T., Roberts, C., Donohue, M., Schultz, J., Bene, V., Bork, P., Ansorge, W., et al. (2000) *Anopheles gambiae* pilot gene discovery project: identification of mosquito innate immunity genes from expressed sequence tags generated from immune-competent cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**: 6619-6624.
23. Dimopoulos, G., Müller, H.M., Levashina A.A. y Kafatos, F.C. (2001). Innate immune defense against malaria infection in the mosquito. *Curr. Opin. Immunol*. **13**: 79-88.
24. Dunn, P. (1986) Biochemical aspects of insect immunology. *Ann. Rev. Entomol*. **31**: 321-339.

25. Elofsson R, Carlberg M, Moroz L, Nezlin L, Sakharov D. (1993) Is nitric oxide (NO) produced by invertebrate neurones?. *Neuroreport*. **4** (3): 279-282.
26. Faye, I. y Kanost, M. (1998) Function and regulation of hemolin. En: *Molecular mechanism of immune response in insects*. Ed. por: P. T. Brey y D. Hultmark. Chapman&may. Londres, Inglaterra. p.p. 173-188.
27. Filep, J. G., Beauchamp, M., Baron, Ch., y Paquette, Y. (1998) Peroxynitrite mediates IL-8 gene expression and production en lipopolysaccharide-stimulated human whole blood. *J. Immunol.* **161**: 5656-5662.
28. Franc, N. C., Dimarcq, J. L., Lagueux, M., Hoffman, J. y Ezekowitz, R. A. (1996) Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/microphage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity*. **4**: 431-443.
29. Franchini, A., Conte, A. y Ottaviani, E. (1995) Nitric oxide: an ancestral immunocyte effector molecule. *Adv. Neuroimmunol.* **5**: 463-478.
30. Gelperin A. (1994) Nitric oxide mediates network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. *Nature*, **369** (6475): 61-63.
31. Gillespie, J. P.; Kanost, M. y Trenczek, T. (1997) Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* **42**: 611-643.
32. Götz, P. (1986) Mechanism of encapsulation in dipteran host. *Immune mechanism*. En: *Invertebrate vectors*. Ed. Por: Lackie, A.M. Oxford Science Publications, Oxford. p.p. 1-19.
33. Groves, J. T. (1999) Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**: 226-235.

34. Hagedorn, H. H. (1996) Physiology of mosquitoes. En: The Biology of diseases vectors. Ed. por: Beaty, B. J. y Marquardt, W. C. University Press, Colorado. USA. p.p. 273-297.
35. Han Y. S., Thompson J., Kafatos, F. C. y Barillas-Mury C. (2000) Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. *Embo J.* **19** (22): 6030-6040.
36. Hernández, S., Lanz, H.; Rodríguez, M. H.; Torres, J. A., Martínez-Palomo, A. y Tsutsumi, V. (1999) Morphological and cytochemical characterization of female *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae) hemocytes. *J. Med. Entomol.* **36** (4): 426-434.
37. Hernández-Martínez S, Lanz H, Rodríguez MH, González-Cerón L, Tsutsumi V (2002) Cellular-mediated reactions to foreign organisms inoculated into the hemocoel of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **39** (1): 61-9.
38. Hoffman, J.A. (1995) Innate immunity of insects. *Curr. Opin. Immunol.* **7** (1): 4-10.
39. Hoffman, J. A. y Reichhart J-M. (1997) *Drosophyla* immunity. *Trends in Cell Biol.* **7**: 309-315.
40. Hopkins T.L. y Kramer, K.J. (1992) Insect cuticule sclerotization. *Ann. Rev. Entomol* **37**: 273-302.
41. Hoffman, S.L. Bancroft, W.H., Gottlieb, M., James, S.L. Burroughs, E.C., Stephenson J.R. y Morgan M.J (1997) Funding for the malaria genome sequencing project. *Nature* **387**: 647.
42. Hultmark, D. (1993) Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. *Trends. Genet.* **9** (5): 178-183.

43. Huber, M., Cabib, E. y Miller, L.H. (1991) Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88** (7): 2807-2810.
44. Igarashi, A. (1978) Production of temperature-sensitive and pathogenic virus from *Aedes albopictus* cells (Singh) persistently infected with Chikungunya virus. *Arch Virol.* **62** (4): 303-312.
45. Karupiah, G. y Harris, N. (1995) Inhibition of viral replication by nitric oxide and its reversal ferrous sulfate and tricarboxylic acid cycle metabolites. *J. Exp. Med.* **181**: 2171-2179.
46. Knewll, A. J. (1991) *Malaria: A manual from the Wellcome Tropical Institute.* Oxford University Press. p.p. 40-44.
47. Lanz H.; Hernández S.; Garrido E.; Tsutsumi V. y Aréchiga H. (1993) Prophenoloxidase system activation in the crayfish *Procambarus clarki*. *Dev. Comp. Immunol.* **17**(5): 399-406.
48. Lanz-Mendoza, H., Hernández-Martínez, S., Ku-López, M., Rodríguez, M. d. C., Herrera-Ortiz, A. y Rodríguez, M. H. (2002) Superoxide anion in *Anopheles albimanus* hemolymph and midgut is toxic to *Plasmodium berghei* ookinetes. *J. Parasitol.* **8** (4): 702-706.
49. Lee, W. J., Ahmed, A., della Torre, A., Kobayashi, A., Ashida, M. y Brey, P. T. (1998) Molecular cloning and chromosomal localization of a prophenoloxidase cDNA from malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **7**: 41-50.
50. Luckhart, S., Vodovotz, Y., Cui, L. y Rosenberg, R. (1998) The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 5700-5705.

51. Luckhart, S. y Rosenberg, R. (1999) Gene structure and polymorphism of an invertebrate nitric oxide synthase gene. *GENE* **232**: 25-34.
52. Luckhart, S. y Li, K. (2000) Transcriptional complexity of the *Anopheles stephensi* nitric oxide synthase gene. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **31**: 249-256.
53. MacMicking, J., Xie, Q-W. y Nathan, C. (1997) Nitric oxide and Macrophage function. *Ann. Rev. Immunol.* **15**: 323-350.
54. Melkova, Z., y Esteban, M. (1995) Inhibition of vaccinia virus DNA replication by inducible expression of nitric oxide synthase. *J. Immunol.* **155**: 5711-5718
55. Mercurio, F. y Manning, A.M. (1999) NF- κ B as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* **18**: 6163-6171.
56. Miller, L. H., Baruc, D. I., Marsh K. y Doumbo O. (2002) The pathogenic basis of malaria. *Nature.* **415**: 673-679.
57. Moroz, L. L., Chen, D., Gillet, M. U. y Gillet, R. (1996) Nitric oxide synthase activity in the molluscan CNS. *J. Neurochem.* **66**: 873-876.
58. Müller, H. M., Dimopoulos, G., Blass C. y Kafatos F. C. (1999) A hemocyte-like cell line established from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses six prophenoloxidase genes. *J. Biol. Chem.* **274**: 11727-11735.
59. Munkirs, D. D., Chirstensen, B. M. y Tracy J. W. (1990) High-pressure liquid chromatographic analysis of hemolymph plasma catecholamines in immune-reactive *Aedes aegypti*. *J. Invertebr. Pathol.* **56** (2): 267-279.
60. Murad, F. (1999) Cellular signaling with nitric oxide and cycling GMP. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32** (11):1317-1327.

61. Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F. y Carton, Y. (1995) Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *Eur. J. Cell. Biol.* **68** (4): 450-456.
62. Nappi, A. J., Vass, E.; Frey, F. y Carton, Y. (2000). Nitric oxide involvement in *Drosophila* Immunity. *Nitric Oxide.* **4** (4): 423-430.
63. Nathan, C. y Shiloh, M. U. (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Prot. Natl. Acad. Sci.* **97** (16): 8841-8848.
64. Nigam, Y., Azambuja, P. y Ratcliffe, N.A. (1996) Insect Vector Immunity. En: *New Directions in Invertebrate Immunology*. Ed. por: Söderhäll, K., Iwanaga, S. y Vasta, G. . SOS Publications, New Jersey. p.p. 401-442.
65. Noriega, F. G., Barillas-Mury, C. y Wells, M. A. (1994) Dietary control of late trypsin gene transcription in *Aedes aegypti*. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* **24** (6): 627-31.
66. Noriega, F. G., Pennington, J. E., Barrillas-Mury, C., Wang, X. Y. y Wells. M. A. (1996) *Aedes aegypti* midgut early trypsin is post-transcriptionally regulated by blood feeding. *Insect. Molec. Biol.* **5** (1): 25-29.
67. Ottavani, E., Paeman, L. R., Cadet, P. y Stefano, G. B, (1993) Evidence for nitric oxide production and utilization as a bactericidal agent by invertebrate immunocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **248**: 319-324.
68. Palumbo, A., Ci Cosmo, A., Gesualdo, I., d'Ischia, M. (1997) A calcium-dependent nitric oxide synthase and NMDA R1 glutamate receptor in the ink gland of *Sepia*

- officinalis: a hit to regulatory role of nitric oxide in melanogenesis?. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**: 429-432.
69. Paskewitz, S. M., Brown, M. R., Lea, A. O. y Collins, F. H. (1988) Ultrastructure of the encapsulation of *Plasmodium cynomolgy* (B strain) on the midgut of a refractory strain of *Anopheles gambiae*. *J. Parasitol.* **74** (3): 432-439.
70. Phillips, R. S. (2001) Current status of malaria and potential for control. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**(1): 208-226.
71. Ratcliffe, N. A., Leonard, C. y Rowley, A. F. (1984) Prophenoloxidase activation: Nonspecific recognition and cell cooperation in insect immunity. *Science.* **266**: 557-559.
72. Regulski, M. y Tully, T. (1995) Molecular and biochemical characterization of dNOS: A *Drosophila* Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 9072-9076.
73. Richman, A. M. y Kafatos F. C. (1996). Immunity to eucaryotic parasites in vector insects. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 14-19.
74. Richman, A. M., Dimopoulos, G., Seeley, D. y Kafatos F. C. (1997) *Plasmodium* activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *EMBO J.* **16** (20): 6114-6119.
75. Rikans, L. E. y Hornbrook K. R.. (1997) Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta.* **1362** (2-3): 116-27.
76. Rodríguez, M. D. C., Zamudio, F., Torres, J. A., González-Cerón, L, Possani, L. D. y Rodríguez, M. H. (1995) Effect of a cecropin-like synthetic peptide (Shiva-3) on the sporogonic development of *Plasmodium berghei*. *Exp. Parasitology.* **80** (4): 596-604.

77. Ryan y Karp, R. (1993) Stimulation of Hemocyte proliferation in the american cockroach (*Periplaneta americana*) by the injection of *Enterobacter cloacae*. J. Insect. Physiol. **39**: 601-608.
78. Scalzo-Lichfouse, B. Townson, H. y Ham, P. J. (1990) Humoral and cellular response of *Anopheles stephensi* to infection with *Plasmodium yoeli*. Tans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **84**: 463.
79. Shahabuddin, M. y Kaslow, D.C. (1994) Biology of the development of *Plasmodium* in mosquito midgut: a molecular and cellular view. Bulletin de l' Institut Pasteur. **92**:119.
80. Shahabuddin, M., Criscio, M. y Kaslow, D. C. (1995) Unique specificity of in vitro inhibition of mosquito midgut trypsin-like activity correlates with *in vivo* inhibition of malaria parasite infectivity. Exp. Parasitol. **80** (2): 212-219.
81. Shahabuddin, M., Kaidoh, T., Aikawa, M. y Kaslow, D. C. (1995) *Plasmodium gallinaceum*: Mosquito peritrophic matrix and the parasite-vector compatibility. Exp. Parasitol. **81** (3): 386-393.
82. Shahabuddin, M., Fields, I., Bulet, P., Hoffmann, J. A. y Miller, L. H. (1998) *Plasmodium gallinaceum*: differential killing of some mosquito stages of the parasite by insect defensin. Exp. Parasitol. **89**: 103-112.
83. Sinden, R. E. y Billingsley, P. F. (2001) Plasmodium invasion of mosquito cells: hawk or dove?. Trends Parasitol. **17** (5): 209-211.

SSA (2001) Cuadro 7. Vigilancia Epidemiológica Semana 24.

84. Torreilles, J. y Romestand, B. (2001) *In vitro* production of peroxynitrite by hemocytes from marine bivalves: C-ELISA determination of 3-nitrotyrosine level in

- plasma proteins from *Mytilus galloprovincialis* and *Crassostrea gigas*. BMC Immunol. 2, 1.
85. Vernick, K. D.; Fujikoa, H.; Seeley, D. C.; Tandler, B.; Aikawa, M. y Miller, L. H.(1995) *Plasmodium gallinaceum*: a refractory mechanism of ookinete killing in the mosquito *Anopheles gambiae*. Exp. Parasitol. 80 (4): 583-595.
86. Weathersby, A. B. y McCall, J. W. (1968) The development of *Plasmodium gallinaceum* Brumpt in the hemocele of refractory *Culex pipiens* (Linn.) and susceptible *Aedes aegypti* (Linn.). J. Parasitol. 54 (5): 1017-1022.
87. WHO. (1998) MALARIA. Fact Sheet No. 94.
88. WHO. (1998) ROLL BACK MALARIA. Fact Sheet No. 203.
89. Yuda M., Hirai M., Miura K., Matsumara H., Ando K. y Chinzei, Y. (1996). cDNA cloning, expression and characterization of nitric-oxide synthase from the salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. Eur. J. Biochem. 242: 807-812.